

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

LABORATUVAR HİZMETLERİ

MİKROORGANİZMA SAYIMI

Ankara, 2015

-
- Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
 - Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.
 - **PARA İLE SATILMAZ.**

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR	ii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. İNDİKATÖR MİKROORGANİZMALAR	3
1.1. İndikatör Mikroorganizmaların Özellikleri	4
1.2. Fekal Kontaminasyon İndeksi	4
1.3. İndikatör Mikroorganizma Sayım Yöntemleri	6
1.3.1. Katı Besiyeri Yöntemine Göre Koliform Bakteri Sayımı	12
1.3.2. EMS Yöntemine Göre Koliform Bakteri Sayımı	15
UYGULAMA FAALİYETİ	23
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	26
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	27
2. PATOJEN MİKROORGANİZMALAR	27
2.1. Patojen Mikroorganizmaların Özellikleri	27
2.2. Patojen Mikroorganizmaların Aranması ve Sayımı	27
2.2.1. Aerob Patojenlerin Aranması ve Sayımı	27
2.2.2. Anaerob Patojenlerin Aranması ve Sayımı	30
UYGULAMA FAALİYETİ	32
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	34
MODÜL DEĞERLENDİRME	35
CEVAP ANAHTARLARI	37
KAYNAKÇA	38

AÇIKLAMALAR

ALAN	Laboratuvar Hizmetleri
DAL/MESLEK	Tarım Laboratuvarı / Tarım Laboratuvar Teknisyenliği
MODÜLÜN ADI	Mikroorganizma Sayımı
MODÜLÜN TANIMI	İndikatör mikroorganizmaların sayımı ve patojen mikroorganizma sayımı yapma becerilerinin kazandırıldığı öğrenme materyalidir.
SÜRE	40/32
ÖNKOŞUL	“Kültürel sayım yöntemlerini uygulamak” modülünü başarmış olmak
YETERLİK	Mikroorganizma sayımı yapmak
MODÜLÜN AMACI	Genel Amaç Uygun laboratuvar ortamı sağlandığında; tekniğine uygun olarak mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz. Amaçlar 1. İndikatör mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz. 2. Patojen mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Ortam: Mikrobiyoloji Laboratuvarı Donanım: Laboratuvar ortamı, etüv, su banyosu, blender/stomacher/mikser, hassas terazi, tartım kapları, spatül, pipet, bek, petri kutusu, deney tüpü, durham tüpü, erlen, cam yazar kalem, sentetik besiyerleri, dilüsyon sıvısı, distile su vb.
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	Modülün içinde yer alan her faaliyetten sonra verilen ölçme araçları ile kazandığınız bilgileri ölçerek kendi kendinizi değerlendireceksiniz. Öğretmen, modülün sonunda, ölçme aracı (test, çoktan seçmeli, doğru-yanlış, vb.) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığınız bilgi ve becerileri ölçerek sizi değerlendirecektir.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Bütün canlılarda, sağlıklı gıda maddelerinin tüketilmesi yaşam kalitesini artırır.

Gıda maddelerinde mikroorganizma sayısı; üzerindeki yasal kısıtlamalar, başta gıda çeşidi, mikroorganizma türü ve yasa koyucu ülkenin gelişmişlik durumu olmak üzere çok faktör tarafından etkilenmektedir. Bu yasal düzenlemelerin dışında öncelikle gıda ticaretinde giderek artan rekabet koşulları da gıda üreticilerinin daha hijyenik özelliklere sahip ürünleri üretmelerini bir anlamda zorlamaktadır. Dolayısıyla gıdalarda mikroorganizma sayısının doğru bir şekilde belirlenmesi gerekir.

Bu modülde kazanacağınız yeterlikle; indikatör mikroorganizma sayımı ve patojen mikroorganizma sayımı yaparak gıda sanayisinde iyi, doğru ve kaliteli üretime katkı sağlayacaksınız.



ÖĞRENME FAALİYETİ-1

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Gıda mikrobiyoloji laboratuvarına giderek indikatör mikroorganizmalar ve özellikleri hakkında bilgi edininiz.
- Laboratuvarda mikroorganizma sayım yöntemlerini inceleyiniz.
- Edindiğiniz bilgileri arkadaşlarınızla paylaşınız.

1. İNDİKATÖR MİKROORGANİZMALAR

Gıdalar, özellikle hayvansal gıdaların üretimi sırasında hijyen ve iyi üretim kurallarına yeterince uyulmaması sonucunda pek çok zararlı mikroorganizma ile kontamine olur. Özellikle paketleme aşamasında ve sonrasında, soğuk zincir uygulamasında yapılan hatalar sonucunda kontaminasyon riski daha da artar. Bunun yanında hijyen kurallarına uymayan personel veya kirli alet-ekipman ile fekal kontaminasyon riski yüksek düzeylere çıkar. Kontaminasyonla mikroorganizmaların bir kısmı gıdalardan insana bulaştığında, herhangi bir hastalığa sebep olmaz iken bazı mikroorganizmalar gıda zehirlenmelerine neden olur. Bu mikroorganizmalara **indikatör mikroorganizma** denir.

İndikatör mikroorganizmalar, gıda sanayisinde kurallara uygun olarak üretim yapılıp yapılmadığının göstergesi olarak değerlendirilir. İndikatör mikroorganizmalar dışkı kökenli olabileceği gibi farklı türlerde mikroorganizmalar da indikatör olarak kabul edilir. Hammadde, üretim teknolojisi, iyi ve doğru üretim uygulaması konularında indikatör mikroorganizmalar yeterli bilgi verir. Bu nedenle **indikatör mikroorganizmalar kalitenin göstergesidir**.

İndikatör mikroorganizmalar ile patojenlerin birbirine karıştırılmaması gerekir. Gıda kalitesi hakkında fikir elde etmek için aranan veya sayılan bu grup mikroorganizmalar; **toplam bakteri, toplam maya ve küf, toplam koliformlar, fekal koliformlar** gibi mikroorganizmalardır. 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 vardır. Bir görüşe göre indikatör mikroorganizmaların mutlaka dışkı kökenli olması gerekirken bir başka görüş ise her türlü mikroorganizmayı indikatör olarak kabul eder. Ancak ikinci görüş benimsenmekte ve indikatör olarak tüm mikroorganizmalar değerlendirilmektedir.

1.1. İndikatör Mikroorganizmaların Özellikleri

Gıda endüstrisinde indikatör olarak seçilen mikroorganizmalar belirli özelliklere sahiptir. Bunlar;

- İndikatör mikroorganizmanın sayımı ve tanımlanması kolay ve hızlı olmalıdır. Mümkünse bir gün içinde sonuç alınmalıdır.
- İndikatör mikroorganizma, gıda mikroflorasında bulunan diğer mikroorganizmalardan kolayca ayırt edilmelidir.
- İndikatör mikroorganizma, gıdada bulunan doğal flora tarafından bu mikroorganizmaların gelişmesi engellenmemelidir.
- İndikatör mikroorganizma, varlığına işaret ettiği patojenin rastlanmadığı bir gıdada kendisi belirli bir sayı altında olmalı ya da en iyisi hiç bulunmamalıdır.
- İndikatör mikroorganizma, patojenin üreme gereksinmelerine ve üreme hızına benzer bir özelliklere sahip olmalıdır.
- İndikatör mikroorganizma, gıdada patojenler kadar dayanıklı olmalıdır.
- İndikatör mikroorganizma, patojen ile birlikte bulunabilmelidir.



Resim 1.1: Gıda mikrobiyoloji laboratuvarı

1.2. Fekal Kontaminasyon İndeksi

Koliformlar, sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında yaşayan ve hayvanların fiziksel atıklarında, dışkılarında ve doğal olarak da toprakta bulunabilen farklı yapıda bakterilerdir.

Koliform grup bakteriler, enterobacteriaceae familyası içinde yer alan, fakültatif anaerob, gram negatif, spor oluşturmeyen, 35°C'de 48 saat içinde laktozdan gaz ve asit

oluşturan, çubuk şeklindeki bakterilerdir. Bu grupta yer alan ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan mikroorganizmalar; citrobacter freundii, enterobacter aerogenes, enterobacter cloacae, escherichia coli ve klebsiella pneumoniaedir. Koliformlar çoğunlukla insan sağlığı açısından tehlike arz eden hastalıklar oluştururlarken bazı türleri hafif enfeksiyonlara, bazı türleri de özellikle su kaynaklı enfeksiyonlara sebep olur. Koliform grup mikroorganizmalara pek çok gıda ham maddesinde rastlanır. Bunların başında; taze sebzeler, taze yumurta, çiğ süt, kanatlı etleri ve koliform bakımından sayıca zengin sulardan alınan kabuklu ve diğer su ürünleri gelir. **Koliform bakteriler**, genel karakteristik özelliklerine göre **toplam koliform** veya **fekal koliform** olarak adlandırılır ve gruplandırılır.

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 dışkı bulaştığının göstergesidir.

Fekal kontaminasyon indeksi (indikatörü) olarak *fekal koliformlar*, *enterokoklar* ve *clostridium perfringens* sayılabilir. *Fekal koliformlar* yerine yaygın olarak *escherichia coli* kullanılır.

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

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

- İndikatör mikroorganizmalar patojenler içinden seçilmez. Burada öncelikle primer patojen olmayan bakteri escherichia coli tip 1 olarak tanımlanan bakteridir. Bu bakteri, bağırsaklarda vitamin sentezine katıldığı için yararlı bir bakteridir. Ancak escherichia coli O157:H7 serotipi, en tehlikeli gıda kaynaklı patojen bakteridir. Benzer şekilde escherichia colinin diğer serotipleri ve klebsiella pneumoniae de insan ve hayvanlarda hastalıklara neden olur.
- 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 gelmez, sadece bir potansiyel tehlikenin olduğunu gösterir. İnsan dahil olmak üzere her hangi bir sıcakkanlı hayvanın bağırsağında başta escherichia coli olmak üzere diğer fekal koliformlar da mutlaka vardır ancak o bireyde salmonella ve shigella gibi yine bağırsak kökenli patojenler bulunmayabilir.
- Bu bakterilerin analiz edilen materyalde bulunması, bir hijyen kurallarına uyulmamasından ileri gelebilir; bu hijyen eksikliğini hammaddeden mi yoksa işletme koşullarından mı geldiğinin tespit edilmesi güçtür. Örneğin, tarla koşullarında kuşların ham madde üzerine dışkılamaları pratik olarak ve kolaylıkla engellenemez. Bu durumda pek çok baharatta fekal kontaminasyon doğaldır. Bunun aksine, süt sağımında meme hijyeni ve sağım koşulları kontrol altına alınır ise hayvan dışkısının çiğ süte bulaşması önenebilir. Bu durumda çiğ sütte fekal koliform bulunmaması gerekir. 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 bulaşmadan kaynaklanır. Bunun temel sorumlusu ise işletmede çalışanların tuvalet sonrası asgari hijyene dikkat etmemeleridir.

1.3. İndikatör Mikroorganizma Sayım Yöntemleri

Bu yöntemlerin prensibi, mikroorganizmanın katı besiyerinde koloni oluşturması, bu kolonilerin sayılarak örnekteki mikroorganizma sayısının hesaplanmasıdır.

Bu amaçla;

İlk aşamada sayımı yapılacak örnek ekime hazırlanır.

Daha sonra örneğin uygun seri dilüsyonları yapılır.

Uygun agarlı besiyerine ekimleri gerçekleştirilir.

Koloni oluşturması için gerekli inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon süresinin sonunda petri kutusundaki koloniler sayılır.

Toplam koloni sayısı dilüsyon faktörü ile çarpılarak örnekteki canlı hücre sayısı bulunur.

Sonuçta incelenen örneğin özelliğine göre kob/ml, kob/g veya kob/cm² olarak sonuç verilir.

Dökme, yayma ve damlatma olarak üç ana grupta ele alınır.

➤ Dökme yöntemi

- 10 g gıda maddesi tartılır ve 90 ml fizyolojik su içine konur. Bu karışım blenderde homojenize edilir. Bu dilüsyon -1 dilüsyonudur.
- 10⁻¹ dilüsyonundan 1ml alınır ve içinde 9ml fizyolojik su bulunan deney tüpüne aktarılır. Bu 10⁻² dilüsyonudur.
- 10⁻² dilüsyonundan 1ml alınarak 9 ml fizyolojik su bulunan deney tüpüne aktarılır. Bu 10⁻³ dilüsyonudur.
- Üzerlerine seyreltim değerleri yazılmış petri kutularına 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ dilüsyonlarından 1'er ml konur. Petrilerin üzerindeki numaralar seyreltim numaraları ile aynı olmalıdır.
- Katı besiyeri sıcak su banyosunda eritilir ve 45°C'ye kadar soğutulur. Her petri kutusuna 10-15 ml besiyeri dökülür.
- Agar katılaşmadan, petri kutularına düz bir yüzey üzerinde üç kez 8 hareketi yaptırılarak örnekle besiyerinin homojen karışımı sağlanır.

- Petri kutusunun kapağı kapatılır ve besiyeri katılaşmıca kadar bekletilir.
- Aynı besiyeri, sterilite kontrolü için steril iki tane boş petri kutusuna ayrı ayrı dökülür ve agarın katılaşması beklenir.
- Kapakta yoğunlaşan su damlacıklarının besiyeri üzerine damlamasını önlemek için petri kutuları kapakları alta gelecek şekilde ters çevrilerek önerilen sıcaklıkta ve sürede inkübe edilir (22°C’de 24-48 saat gibi).



Resim 1. 2: İnkübasyona için petri kutuları etüve yerleştirilmesi

- İnkübasyon bitiminde 30 ile 300, bazı kaynaklara göre 50-500 arasında koloni içeren seyreltilerin petri kutuları seçilir ve sayılır. Gram veya mililitresindeki mikroorganizma sayısı, “koloni oluşturan birim/gram (kob/gr)” olarak belirlenir. Sayısı 30’dan az, 300’den fazla koloniler dikkate alınmaz.
- Toplam bakteri sayımında farklı sıcaklık ihtiyacı olan bakteriler için farklı inkübasyon süresi önerilir.

5 - 7 °C’de 7-10 gün

20 °C’de 3-5 gün

37 °C’de..... 48 saat

45 °C’de..... 2-3 gün

55 °C’de..... 48 saat

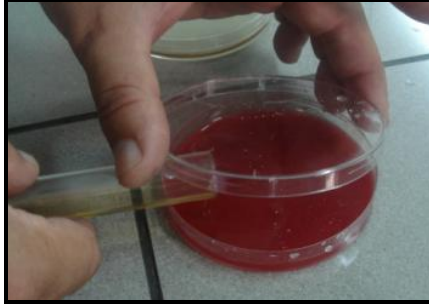
- Analiz sonrası mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzemeler, otoklavda steril edildikten sonra yıkanır veya atılır.
- Seyreltim ve ekim işlemlerinin 15-30 dakika içinde tamamlanmasına çalışılır.

➤ Çift tabakalı dökme plak yöntemiyle kültürel sayım

Ortamda sporlu bakterilerin bulunmasından şüphelenildiğinde, besiyeri üzerine ikinci bir kat besiyeri dökülerek bu grup bakterilerin neden olabileceği olumsuzluklar da ortadan kaldırılabılır. İkinci kat besiyeri, ekim yapılan birinci kat besiyerinin üstünü kaplamak ve fakültatif anaerob mikroorganizmaların gelişebileceği anaerob koşulları yaratabilmek için kullanılır.

Çoğunlukla birinci ve ikinci kat besiyerleri aynıdır. Örneğin; koliform grubu bakteriler, her iki katta da violet red bile agarın kullanıldığı çift tabakalı dökme plak yöntemiyle sayılabilir.

- Hazır tek katlı besiyeri üzerine 1ml/g numune konur. Yüzeğe iyice yayılır.
- Besiyerleri, etüvde üst kapak hafif yana kaymış şekilde kurutulur ya da oda ısısında kuruması beklenir.
- 45°C'ye kadar soğutulmuş tüp içerisindeki aynı veya farklı besiyeri, hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yavaşça besiyeri üzerine dökülür.



Resim 1.3: İkinci besiyerinin petri kutusundaki besiyerine aktarılması

- 8 hareketi yaptırılarak besiyerinin petriye iyice yayılması sağlanır.
- Donması için oda ısısında bekletilir.
- 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon bitiminde petride oluşan koloniler sayılır.
- Kullanılan bütün malzemeler, otoklavda steril edildikten sonra yıkanır veya atılır.

➤ **Yüzeğe yayma yöntemiyle kültürel sayım**

Dökme plak yöntemine göre uygulanması daha kolay bir yöntemdir. Petri kutusuna agarlı besiyeri dökülürken oluşabilecek hava kabarcıkları ekim öncesi steril bir iğne öze ile ortadan kaldırılabilir. Besiyerleri petri kutularına önceden dökülmüş ve hazır hâlde olduğu için sıcaklıktan mikroorganizmalar zarar görmez.

Yüzeğe yayma yönteminin dezavantajı, zorunlu aerobik bazı bakterilerin agar yüzeyinde çok çabuk gelişerek hemen yanındaki bakteri kolonilerini kaplayabilmesidir. Bu durum, koloni sayımını zorlaştırır ve yanıltıcı sonuçların alınmasına neden olur.

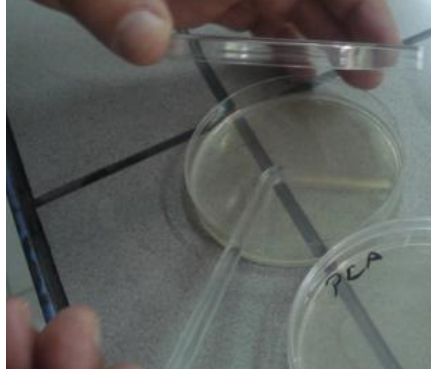
Bu yöntemin uygulanmasında bazı noktalara dikkat edilmesi gerekir:

- Drigalski özesinin sterilize edildiği alkol çözeltisi sürekli olarak yenilenmeli ve kontrol edilmelidir.
- Alkol ile drigalski özesinin temas süresi 5-10 dakikadan az olmamalıdır.
- Her yayma işlemi için yerli sayıda drigalski özesi bulundurulmalıdır.
- Alkolden çıkarılan özenin bek alevinden geçirilme nedeninin ısı ile sterilizasyon değil, sadece alkolü uzaklaştırmak olduğu unutulmamalıdır.

- Beherdeki alkolün alev almasının önlenmesine dikkat edilmelidir.

Yöntemin Aşamaları:

- 42-45°C'de erimiş steril agarlı besiyeri, 15-20 ml kadar steril petri kutularına konur. Katılaşması ve yüzeyin kuruması sağlanır.
- İncelenecek dilüsyondan veya sıvı örnekten 1-01 ml alınarak petrilere ekim yapılır.
- Steril drigalski özeleri ile besiyeri üzerinde homojen dağılım sağlanır. Ekimler yine en az paralel olacak şekilde iki ayrı petri kutusunda yapılır.



Resim 1.4: Drigalski öze ile besiyerinin yayılması

- Yayma işleminden sonra petri kutuları 10-15 dakika bekletilir. Bekletmede amaç, besiyerinin inokulumu absorblamasının sağlanmasıdır.
- Sonra 37 °C'de 24 veya 48 saat inkübe edilir.
- Sayım dökme plak yönteminde olduğu gibi yapılır. Mikroorganizma sayılarının belirlenmesinde ekimler 0,1'er ml yapılırsa, bulunan değerler seyreltim faktörü yanında 10 ile çarpılarak örneğin gram veya mililitresindeki mikroorganizma sayısı olarak belirtilir (kob/gr).
- Analizden sonra ekim yapılmış tüm malzeme otoklavda sterilize edilir. Daha sonra bu malzeme yıkanır veya atılır.

➤ Koloni sayımı

Koloni sayımı ya koloni sayacıyla ya da petri kutuları alt yüzünden bir cama yazar kalemle 4 veya 8 eşit bölüme ayrılarak pratik olarak sayılır.

Koloni sayıcısı alttan aydınlatmalı, karelere bölünmüş tablası ve büyüteci olan bir araçtır ve şu şekilde kullanılır: Koloni sayıcısının kareler bölünmüş tablasına petri kutusu yerleştirilir. Aydınlatma düğmesi açılır. Büyüteci ile incelenerek tüm koloniler sayılır.

İnkübasyondan sonra koloni sayımı hızla yapılır, hemen koloni sayımı yapılmıyorsa petri kutuları +4°C'de en fazla 24 saat depoda saklanır.

Her koloniyi bir tek mikroorganizma oluşturur. Koloni sayımı için 30-300 arasında koloni gelişen petri petri tercih edilir. Aynı dilüsyondan ekim yapılan 2-3 petride sayım yapılarak ortalaması alınır.

Elde edilen ortalama canlı sayısı, ait olduğu dilüsyonun 1cm³ündeki canlı hücre sayısını verir. Petri kutularında gelişmiş bütün kolonilerin sayılması gerekir.



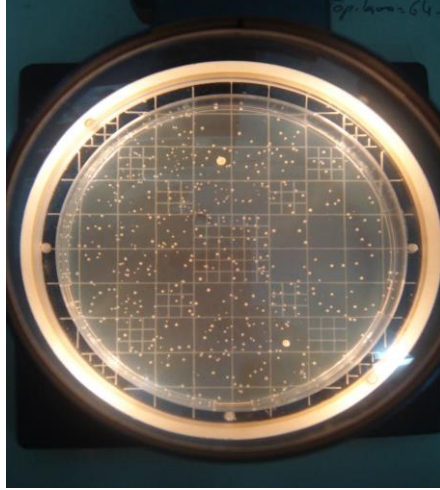
Resim 1.5: Koloni sayıcısı ve karelerin görünümü

Koloni sayıcısındaki işaretli kareler, toplam kareler alanının 1/5'ine eşittir. Bu nedenle işaretli karelerde sayılan koloni adedi 5 ile çarpılır.

Örneğin;

Toplam işaretli karelerdeki bakteri sayısı 42 bulunmuş olsun. Bu sayıyı 5 ile çarparsak;

$$42 \times 5 = 210 \text{ koloni bulunur.}$$



Resim 1.6: Kareler üzerindeki kolonilerin görünümü

Bir petri kutusunun ve koloni sayıcısının panosunun daire çapı 9 cm'dir. Alanı ise 64 cm²'dir. Bu durumda, koloni sayıcısı pano alanında 64 kare vardır demektir.

Koloni sayımında şu noktaların göz önünde tutulması gerekir:

- Koloni sayımında, eğer koloni sayıcısı yoksa kolaylık elde etmek için petri kutuları alt yüzden bir cama yazar kalemle 4 veya 8 eşit kısma ayrılarak sayılabilir. Bulunan sayı ise 4 veya 8 ile çarpılır.
- Üreyen 350'den fazla ve 10'dan veya 5'ten aşağıda olan koloniler genellikle hesaba katılmamalıdır.
- Aynı dilüsyondan paralel olarak ekilen petri kutularındaki mikroorganizma kolonileri her dilüsyon için az çok birbirine yakın sayıda olmalı ve en fazla birbirinin iki katını aşmamalıdır. Aksi takdirde ya fazla miktarda ekim yapılmış ya da pipet sıvıya fazla daldırılmış ve pipetin dış kenarlarında da agar yüzeyine mikroorganizma geçmiş diye düşünmek gerekir.
- Petri kutularına ekim yapılmadan önce kullanılacak dilüsyonlar tekrar iyice karıştırılır.
- Sayıma katılan 3 ayrı dilüsyona ait petri kutularından birinde anormal sayıda (çok fazla ya da az) koloni varsa o petri kutusu hesaba katılmaz. Bu, ya sayımda ya da ekimlerde hata yapıldığını gösterir. Böyle durumlarda işlem tekrar edilir.
- Son üç dilüsyondan 3'er petri kutusuna yapılan ekimlerde üreyen koloniler sayılarak her dilüsyon için ortalama bulunur ve buradan, orijinalindeki ortalama mikroorganizma sayısı hesaplanır.

➤ Koloni sayısının hesaplanması

Katı besiyerinde yapılan sayım sonuçlarının verilmesinde koloni oluşturan birim esas alınır. Koloni sayısı hesaplandıktan sonra sonuç, **kob/ml**, **kob/g** veya **kob/cm²** şeklinde verilir. Sonuçlar iki şekilde hesaplanabilir:

- $\text{kob/g (ml)} = \text{İki paralel plağın ortalaması} \times \text{dilüsyon faktörü}$

Örnek: Sıvı bir gıda örneğinde aerobik bakteri sayısı belirlenmek isteniyor. 10^{-1} , 10^{-5} dilüsyonlarında koloni sayısı >300 olarak bulunmuştur.

Dilüsyon	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Birinci Paralel	300	240	38	20
İkinci Paralel	250	202	52	24
Toplam	550	442	90	44
Ortalama	275	221	45	22

Tablo 1.1: Sıvı gıda örneğinde toplam ve ortalama koloni sayıları

10^{-2} dilüsyonundaki koloni sayısı yaklaşık 30-300 arasında olduğundan hesaplamalar bu plaklar üzerinden yapılır. kob/ml = İki paralel plağın ortalaması x Dilüsyon faktörü

$$= 275 \times 10^2$$

=27,500 olarak hesaplanır.

- kob/g (ml) = Koloni sayısındaki işaretli karelerdeki sayım sonucu x 5 x Dilüsyon faktörü

Örnek: Koloni sayısıyla işaretli karelerde 45 adet koloni sayılmıştır. Dilüsyon faktörü ise

10^{-2} dir. Buna göre sonuç; kob/g (ml) = $45 \times 5 \times 10^2 = 22,500$ olarak hesaplanır.

NOT: Dilüsyon faktörü = 1/ Seyreltme oranıdır. Örneğin; $1/10^{-4} = 10^4$ gibi

1.3.1. Katı Besiyeri Yöntemine Göre Koliform Bakteri Sayımı

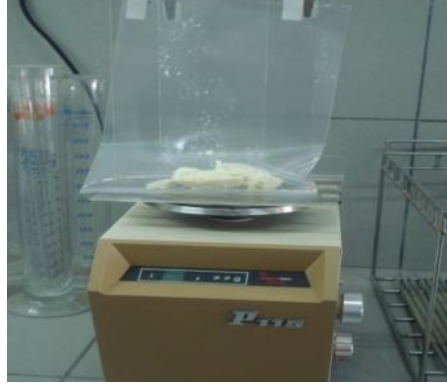
Katı yani agarlı besiyerinde sayım, canlı hücrelerin koloni oluşturması ve bu kolonilerin sayılarak "Her canlı hücre 1 koloni oluşturur." prensibi ile materyaldeki canlı hücre sayısının hesaplanması esasına dayanır.

Bu amaçla sayım yapılacak materyalden belirli bir miktar alınır ve besiyerine aktarılır. Koloni oluşması için gerekli inkübasyon süresinin sonunda petri kutusundaki koloniler sayılarak materyaldeki canlı hücre sayısı hesaplanır.

Bununla birlikte, sayımı yapılan materyalde canlılığını sürdüren ancak gelişme ve çoğalma yeteneğini yitiren koloni oluşturamayacak hücreler de gıda maddesinde bulunabilir. Bu nedenle sayım sonuçları "sadece koloni oluşturabilenlerin" sayıldığını göstermek üzere "**koloni oluşturan birim; kob/gr** " olarak verilir. Koloni oluşturan birim deyimini ile bu tip hücrelerin sayılmadığı/sayılamadığı belirtilmektedir.

➤ Koliform bakterilerin katı besiyerlerinde sayımı

Gıda örneği, Mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda direkt analize alınır.



Resim 1.7: Katı gıdanın tartılması

Homojenize etmek veya gerekirse seyreltmek için süt ve ürünleri için ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda maximum recovery diluent kullanılır.

Hazırlanan örnekten yayma, dökme ve çift tabaka dökme plaka ekim yapılır.

Koliform grubu mikroorganizma tayini için yayma yönteminde, VRB agara ekim yapılır. Bunun için; 100 ml'lik erlen içine sıvı örnekler için 10 ml, katı örnekler için 10 gr konur, fizyolojik su ilave edilip homojen olana kadar karıştırılır. Bu örneklerden 1/10,1/100'lük dilüsyonlar hazırlanır ve VRB agara yayma plaka yöntemi ile ekim yapılır. 48 saatlik inkübasyon sonunda koliform grubu bakteri olup olmadığına bakılır.

Dökme yönteminde jelleşmeden sonra yayma yönteminde ise besiyerinin sıvıyı emmesinden sonra 45-50°C'de tutulan 4-5 ml kadar erimiş VRB agar ikinci kat olarak dökülür. İkinci katında tam olarak jelleşmesinden sonra petri kutuları, kapakları üzerine çevrilerek 48°C'de 24+2 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra VRB agar'da 1-2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler **koliform bakteri** olarak sayılır.



Resim 1.8: VRB agarda koyu kırmızı renkli koloniler

Fekal koliform grup sayısı standart şekilde hesaplanır ve kob/g (ml) olarak verilir.

Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme steril edildikten sonra yıkanır veya atılır.

➤ Fekal koliform bakterilerin katı besiyerlerinde sayımı

Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda direkt analize alınır.

Homojenize etmek veya gerekirse seyreltmek için, süt ve ürünleri için ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda maximum recovery diluent kullanılır.

Hazırlanan örnekten yayma, dökme ve çift tabaka dökme plaka ekim yapılır.

Dökme yönteminde 15 ml besiyeri dökülmesi önerilir. Dökme yönteminde jelleşmeden sonra yayma yönteminde ise besiyerinin sıvıyı emmesinden sonra 45-50°C'de tutulan 7-8 ml kadar erimiş VRB agar ikinci kat olarak dökülür. İkinci katında tam olarak jelleşmesinden sonra petri kutuları, kapakları üzerine çevrilerek 44°C'de 24+2 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra VRB Agar'da 1-2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler **fekal koliform bakteri** olarak sayılır.

Fekal koliform grup sayısı standart şekilde hesaplanır ve kob/g (ml) olarak verilir.

Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme steril edildikten sonra yıkanır veya atılır.

➤ **Escherichia colinin katı besiyerinde sayımı**

Escherichia coli (Koli basili) sıcak kanlı hayvanlar olarak tanımlanan memeliler (insan, evcil hayvanlar, sığır, at, koyun, domuz) ile kanatlıların bağırsaklarında doğal olarak bulunan bir bakteridir ve doğada tek bulunduğu yer, bu hayvanların bağırsaklarıdır. Herhangi bir örnekte (gıda, içme veya kullanma suyu, deniz, havuz, göl, çalışma tezgâhları vb.) bu bakteriye rastlanırsa o örneğe doğrudan bu hayvanların dışkısının veya dolaylı olarak lağım suyu ile dışkı bulaştığının kesin göstergesidir. Escherichia colinin insanları hastalandıran ve öldüren patojen Escherichia coli O157:H7 serotipi vardır. Gıda endüstrisinde ham madde olarak kullanılan çiğ kıyma gibi birkaç istisna dışında hiç bir gıdada bu bakteriye izin verilmez.

Gıda örneği, mikrobiyolojik analiz kurallarına uyularak laboratuvara getirilir. Katı gıda tartılır ve homojenize edilir. Sıvı gıda direkt analize alınır.

Homojenize etmek veya gerekirse seyreltmek için, süt ve ürünleri için ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda maximum recovery diluent kullanılır.

Hazırlanan örnekten yayma, dökme ve çift tabaka dökme plaka ekim yapılır.

Dökme yönteminde jelleşmeden sonra yayma yönteminde ise besiyerinin sıvıyı emmesinden sonra 45-50°C'de tutulan 4-5 ml kadar erimiş VRB agar ikinci kat olarak dökülür. İkinci katında tam olarak jelleşmesinden sonra petri kutuları kapakları üzerine çevrilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilir.

İnkübasyondan sonra VRB agarda 1-2 mm çaplı koyu kırmızı renkli koloniler koliform grup bakteri olarak sayılır. Bunlardan rastgele 10 adeti seçilir; her koloni 0,2 ml steril suda çözülür ve ayrı ayrı bactrident escherichia coli test kitinin küvetlerine yerleştirilir. Küvetlere bir adet test şeridi ilave edilir, 2 saatlik inkübasyonun sonunda UV el lambası ile floresan ışığa kontrol edilir. Floresan ışığa gösteren koloniler escherichia coli olarak değerlendirilir. İdentifikasyon esaslı sayım tekniği ile petri kutusundaki kolonilerin ne kadarının escherichia coli olduğu belirlenir, buradan gıda örneğindeki escherichia coli sayısı hesaplanır ve standart kurallara göre sonuç verilir.

Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme steril edildikten sonra yıkanır veya atılır.

1.3.2. EMS Yöntemine Göre Koliform Bakteri Sayımı

Sıvı besiyeri kullanılan sayım yöntemi dendiğinde, "**En Muhtemel Sayı (EMS)**" yöntemi anlaşılır.

Yöntemin "En Muhtemel Sayı" olarak adlandırılma nedeni; yukarıda da belirtildiği gibi örnekteki mikroorganizma sayısının istatistiksel olasılık hesapları ile elde edilmiş çizelgelerden yararlanılarak hesaplanmasıdır. Ekimi yapılan tüpe en az 1 adet canlı hücre

geçer ise bu tüp inkübasyon sonunda pozitif sonuç, aksine olarak tüpe 1 adet bile canlı hücre geçmez ise inkübasyon sonunda bu tüp negatif sonuç verir.

EMS yönteminde; ardışık seyreltilerden 3'er besiyeri tüpüne ekim yapıldıktan sonra tüpler aranacak mikroorganizma için optimum sıcaklıkta ve gereken sürede inkübe edilir, bu sürenin sonunda her seyreltidede kaç tüpte pozitif sonuç alındığı kaydedilir. Örneğin, sırasıyla 3, 2, 0 pozitif sonuç alındı ise EMS tablosundan bu değer karşılığı olan 93 sayısı elde edilir ve seyreltme dikkate alınarak EMS hesaplanır.

➤ EMS yöntemi ile sayım

Yöntemin esası, ardışık 3 seyreltiden 3'er adet sıvı besiyerine 1'er ml ekim yapılması, inkübasyon sonunda tüplerin pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmesi ile elde edilecek kodun, istatistik yöntemlerle elde edilmiş çizelgeden okunmasıdır.

Tüplerin pozitif veya negatif olmasının değerlendirilmesi, aranan mikroorganizma ve buna bağlı olarak kullanılan besiyerine göre değişir. Bu değerlendirme basit olarak besiyerinde;

- Bulanıklık olması
- Durham tüpünde gaz oluşumu
- Besiyerinde renk değişimi
- Pıhtılaşma
- Floresan oluşumu gibi çok basit olarak yapılabilir.



Resim 1.9: Tüplerde gaz oluşumunu (pozitif)

EMS yönteminde ardışık 3 seyreltiden 3'er tüpe ekim yapılması gıda mikrobiyolojisinde en yaygın uygulamadır. Seyreltilerden 5'er veya 10'ar tüpe de ekim yapılabilir. Her seyreltiden ekim yapılan besiyeri sayısı arttıkça daha doğru sonuç alınacağı

açık olmakla ve güvenlik sınırları daralmakla birlikte 3 tüp yöntemi ile yeterli sonuçlar alınır. Gıda örneği sıvı ise orijinal örnekten (100 seyrelti) ekime başlanabilir. Böylelikle yöntemin duyarlılığı 10 kez artırılmış olur.

Katı gıdada ise en düşük olarak 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} seyreltelerinden 1'er ml ekim yapılabilir. Ayrıca, gerekirse katı gıda standart 10 gr + 90 ml şeklinde homojenize edilir. 10^{-1} seyreltiden 10 ml hacim alındığında orijinal örnekten 1gr alınmış gibi olur. Burada dikkat edilmesi gereken nokta 10 ml besiyerine 10 ml örnek aktarıldığında besiyerinin konsantrasyonunun yarı yarıya azalacağı, bunun önüne geçmek için başlangıçta bu besiyerlerinin çift güçlü (orijinal besiyerinin iki misli konsantrasyonunda) hazırlanmasıdır.

Örneğin, koliform grup analizinde kullanılan LST Broth besiyeri normal olarak 35,5 gr/L konsantrasyonda hazırlanır. 10 ml tüp içinde 0,355 g madde vardır.

Çift güçlü hazırlanması gerektiğinde başlangıçta 71 g/L (0,719 g / 10 ml) olarak hazırlanır. Bunun üzerine 10 ml örnek konulduğunda LST konsantrasyonu 0,71 g / 10ml'den = 0,355 g/10ml standart değere iner.

Bu tip ekimler için yeterli büyüklükte tüp kullanılmalıdır. Bu işlem için daha doğru olarak 10^3 'ar ml hacimler, içlerinde 100^3 'er ml standart besiyeri olan erlenlere aktarılmalıdır.

EMS yönteminde ardışık seyreltilerden 3'er besiyeri tüpüne ekim yapıldıktan sonra tüpler aranacak mikroorganizma için optimum sıcaklıkta ve gereken sürede inkübe edilir. Bu sürenin sonunda her seyreltide kaç tüpte pozitif sonuç alındığı kaydedilir.

Pozitif Tüpler			Sayı ve Kategori	
1 mL	0,1 mL	0,01 mL	EMS	Kategori
0	0	0	< 0,30	-
0	1	0	0,30	2
0	2	0	0,62	3
1	0	0	0,36	1
1	1	0	0,74	1
1	1	1	1,10	3
1	2	0	1,10	2
1	2	1	1,50	3
1	3	0	1,60	3
2	0	0	0,92	1
2	0	1	1,40	2
2	1	0	1,50	1
2	1	1	2,00	2
2	2	0	2,10	1
2	2	1	2,80	3
2	3	0	2,90	3
3	0	0	2,30	1
3	0	1	3,80	2
3	0	2	6,40	3
3	1	0	4,30	1
3	1	1	7,50	1
3	1	2	12,00	3
3	2	0	9,30	1
3	2	1	15,00	1
3	2	2	21,00	2
3	2	3	29,00	3
3	3	0	24,00	1
3	3	1	46,00	1
3	3	2	110,00	1
3	3	3	>110,00	

Tablo 1.2: EMS çizelgesi

Bu şekilde yapılan ekim sonucunda; Örneğin, 2 – 1 – 0 sonucu elde edildi ise gıdanın 1 ml'sinde ya da 1 gramında 1.50 adet mikroorganizma olduğu anlaşılır.

Sıvı bir gıdada sırasıyla 10, 1, 0.1 ml ekim yapıldı ve 2 – 1 – 0 sonucu elde edildi ise yukarıdaki örnekte verilen tüm değerler 10 ml için geçerlidir. Diğer bir deyişle gıdanın 1ml'sinde $1.50 / 10 = 0.15$ adet mikroorganizma bulunur.

Tersine olarak sırasıyla 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} seyreltilerinden yapılan ekimlerde; Yine 2-1-0 sonucu alınırsa 1gr ya da 1ml örnekte $1.50 / 0.01 = 150$ adet mikroorganizma bulunmaktadır.

EMS yönteminde; standart EMS çizelgesinde sonuç hesaplandıktan sonra sıvı gıdalarda EMS/ml, katı gıdalarda EMS/gr olarak sonuçlar verilir.

Yöntemin uygulanışında daha duyarlı sonuç elde etmek amacıyla ardışık 4 seyreltiden ekim yapıp sonuçlar alındıktan sonra hangi ardışık 3 seyreltinin EMS tablosunda kullanılacağı belirli bir kural çerçevesinde seçilebilir.

Bu seçimde izlenmesi gereken kurallar şunlardır:

Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 1'den fazla 3 pozitif sonuç varsa daha az konsantre olan seyrelti ile başlayan seri dikkate alınmalıdır.

Örneğin;

100 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} olmak üzere ardışık dört seyreltiden 3'er tüpe yapılan ekimlerde sırasıyla 3 – 3 – 2 – 1 şeklinde sonuç alındıysa 3 – 2 – 1 serisi dikkate alınmalıdır.

Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 1 adet 3 pozitif sonuç varsa, 3 pozitif alınan seri ile başlanılmalıdır.

Örneğin, sırasıyla 3 – 2 – 1 – 0 şeklindeki seride değerlendirilecek olan 3 – 2 – 1'dir.

Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 0 adet 3 pozitif sonuç varsa sondaki seri dikkate alınmalıdır.

Örneğin;

2 – 1 – 1 – 0 serisinde 1 – 1 – 0 serisi kullanılmalıdır ancak 1'den çok 3 negatif sonuç varsa (örneğin; 2 – 1 – 0 – 0) bu kez 2 – 1 – 0 serisi kullanılmalıdır.

EMS yönteminde değerlendirme amacıyla çok sayıda ve farklı yaklaşımlar ile hazırlanmış çizelgeler vardır. Bunlardan en yaygın olanı yukarıdaki EMS çizelgesidir.

EMS çizelgesinde, kategori bölümünde 1, 2 ve 3 olarak gösterilen 3 kategori vardır. Bu kategoriler sonuçların bir anlamda güvenliğini göstermektedir.

1 no.lu kategori ile elde edilen kodlar güvenli olup laboratuvar tarafından doğrudan değerlendirilir.

2 no.lu kategoride elde edilen kodlar daha az güvenilirdir. Bu şekilde elde edilen kodlar üst yetkiliye danışılarak değerlendirilmelidir.

3 no.lu kategoride ise kayda değer ölçüde güvenilirmez olup deney tekrarlanmalı ya da mutlaka üst yetkilinin onayı ile değerlendirilmelidir.

➤ **Gıdalarda EMS yönteminin uygulanışı şöyledir:**

- İçlerinde durham tüpleri ve 9 ml sulandırma sıvısı bulunan ağzı kapalı tüpler spora sırasıyla dizilir.
- Bu üç tüpün arkasına 9 adet yine durham tüpü konulmuş tüpler 3'er 3'er dizilir.
- Birinci sıradaki tüplerden ilkinde 1 ml + gıda örneği konur (9 + 1 = 10 ml). Buradan 1 ml alınır ikinci tüpe aktarılır. Buradan 1 ml üçüncü tüpe aktarılır ve 1 ml dışarı atılır. Böylece gıda numunesi 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} oranında seyreltilmiş olur.
- Birinci ana tüpten 1 ml alınır. Hemen arkasındaki birinci tüpe aktarılır. Ana tüpten tekrar 1 ml alınır ve yine birinci sıradaki ikinci tüpe aktarılır. Son olarak birinci ana tüpten 1 ml daha alınarak üçüncü tüpe aktarılır.
- İkinci ve üçüncü ana tüpler için de aynı işlem tekrarlanır.
- 37°C 'da 48 saat inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonunda durham tüpleri değerlendirilir. Gaz oluşumu ve bulanıklık vb. varsa sonuç pozitifdir.

Örnek:

Birinci sırada; 1. tüp = (+) İkinci sırada; 1.tüp = (+) Üçüncü sırada; 1. tüp = (+)

2. tüp = (+) 2. tüp = (+) 2. tüp = (-)

3. tüp = (+) 3. tüp = (-) 3. tüp = (-)

Birinci sıra toplamı = 3 İkinci sıra toplamı = 2 Üçüncü sıra toplamı = 1

Bunları kodlayacak olursak ; 3 + 2 + 1 = 321 kodunu oluşturur.EMS çizelgesine bakarsak 321 = 15 EMS /ml veya EMS/g olur.

Örnek:

Birinci tüpte iki (+)

İkinci tüpte bir (+)

Üçüncü tüpte bir (+) ise , kod 211 = 2 EMS/ gr (ml) Yani gıdanın 2 gramında mikroorganizma bulunduğunu belirtir.

- Analiz sonunda mikroorganizma ile temas eden her malzeme sterilize edilerek yıkanır/atılır.

- EMS yönteminin uygulanmasının sonucunda çıkan değerler raporda şu şekilde belirtilir.

Örneğin;

Yöntem sularda uygulanmışsa sonuç 100 ml'deki koliform bakteri sayısı 95 EMS/ml veya 240 EMS/ml ya da 240'tan fazla şeklinde yazılır.

Gıdalarda ise EMS sayısı, 16 EMS/g (ml) veya 64 EMS /g (ml) ya da 2400'den fazla koliform bakteri sayısı şeklinde verilir.

➤ Koliformların EMS yöntemi ile sayımı (Standart yöntem)

Kloroform grup bakteriler için Lauryl sulfate (LST) broth besiyerinde inkübasyondan sonra gelişmeye bağlı bulanıklık ve gaz oluşumu görülen tüpler "**muhtemel koliform pozitif**" olarak değerlendirilir.

Bunlardan doğrulamak amacıyla BGLB besiyerine ekim yapılır. BGLB'de, inkübasyondan sonra gelişmeye bağlı bulanıklık ve gaz oluşumu görülen tüpler ise "**doğrulanmış koliform pozitif**" olarak değerlendirilip EMS çizelgesinden koliform sayısı EMS olarak hesaplanır. Günlük uygulamada LST Broth'ta bulanıklık ve gaz görülmesi "koliform pozitif" olarak kabul edilir. BGLB'da doğrulamaya gerek kalmaz.

➤ Fekal Koliformların EMS yöntemi ile sayımı (Standart yöntem)

Fekal koliformlar, koliform bakteriler içinde yer alır ve doğrudan fekal kontaminasyon indeksi olarak aranır ya da sayılır. Fekal koliform bakteriler ile tespit edilen mikroorganizmaların hemen tamamı escheriachia coli olduğu için günlük uygulamada sadece escheriachia coli aranması genellikle yeterlidir.

Fekal koliformların EMS yöntemi, koliform bakterilerin EMS yöntemi ile aranmasıyla başlar.

LTS besiyerinde gelişme ve gaz oluşumu görülen her tüpten, içinde durham tüpü olan EC Broth besiyerine bir öze yardımıyla ekim yapılır. EC Broth tüpleri, önceden 45°C ısıtılmış su banyosunda inkübe edilir. Çoğunlukla ilk 24 saat içinde pozitif sonuç almakla beraber standart analiz yönteminde inkübasyon süresi 48 saattir.

İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık ve gaz görülen tüpler, **fekal koliform grup pozitif** olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanarak fekal koliform sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (ml) olarak verilir.

Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme steril edildikten sonra yıkanır veya atılır.

➤ **Escherichia Colinin EMS yöntemi ile sayımı (Standart yöntem)**

Gıdalarda escherichia coli analizi standart olarak EMS yöntemi ile yapılır. Fekal koliform grup bakterilerin analizinin devamı olarak kullanılır. Bu yöntemle escherichia coli aranması 5-10 gün sürmektedir.


EC Broth besiyerine gaz oluşumu görülen her tüpten, Tryptone Water (TW) besiyerine öze ile ekim yapılır. TW Broth tüpleri, önceden 45°C ısıtılmış su banyosunda 24 saat süreyle inkübe edilir.

İnkübasyon sonunda bulanıklık görülen TW Broth tüplerine 1'er ml kovacs indol çözeltisi damlatılır ve tüpler yavaşça karıştırılır. En geç bir dakika içinde tüpün üstünde vişneçürüğü renkli halka oluşması indol testinin pozitif olduğunu gösterir. Escherichia coli, indol pozitif bir bakteridir. Dolayısıyla bu tüpler **escherichia coli pozitif** olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden yararlanarak fekal koliform sayısı hesaplanır ve sonuç EMS/g (ml) olarak verilir.

Değerlendirme sonrası, mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme steril edildikten sonra yıkanır veya atılır.

UYGULAMA FAALİYETİ

İndikatör mikroorganizma sayımı yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>EMS yöntemine göre koliform bakteri sayımı yapmak için</p> <ul style="list-style-type: none">➤ BGLB (Brillant Green Lactose Broth), LB (Lactose Broth), EC Broth (E.coli Broth), EMBA (Eosin Methylene Blue Agar) besiyerlerini ve peptonlu su hazırlayınız.➤ Mikrobiyolojik analizler için numuneyi analize hazırlayınız.➤ Analiz numunesinden 25 g/ml numuneyi alıp 225 ml Maximum recovery dilüent ile karıştırarak homojenize ediniz (10^{-1} dilüsyon hazırlayınız).➤ 10^{-1} lik dilüsyonu kullanarak 10^{-2}, 10^{-3} lük dilüsyon serisini hazırlayınız.➤ İçerisinde dürham tüp bulunan 10 ml LST broth tüplerden 3-3-3 şeklinde 9 adet hazırlayınız.➤ Her 3 tüpe 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} lük dilüsyondan birer ml alarak ekim yapınız.➤ Tüpleri 36°C'de 48+2 (24+24) saat inkübasyona bırakınız➤ Dürham tüplerini kontrol ederek gaz oluşunları belirleyiniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Laboratuvar güvenlik kurallarına uyunuz.➤ Çalışma ortamını, kullanılacak araç gereç ve çözeltileri hazırlayınız. 

Koliform Bakteri Analizi

- Gaz oluşumu gözlenen LST tüplerinden birer öze dolusu alıp her birini Durham tüplü BGLB besiyeri tüplerine ekim yapınız.
- 36°C’de 48+2(24+24) saat inkübe ediniz.
- Durham tüplerini kontrol ederek gaz oluşunları belirleyiniz.
- EMS tablosuna göre sayısal değerlendirme yaparak koliform sayısını belirleyiniz.



- Besiyerini etüve yerleştirerek inkübe ediniz.
- Doğrulamak amacıyla BGLB besiyerine ekim yapıldığını unutmayınız.
- BGLB’da, inkübasyondan sonra gelişmeye bağlı bulanıklık ve gaz oluşumunu “doğrulanmış koliform pozitif” olarak değerlendiriniz.



Fekal Koliform Analizi

- Gaz oluşumu gözlenen LST tüplerinden Durham tüpü bulunan 10ml EC broth tüplerine öze ile ekim yapınız.
- 48+2(24+24) saat 45.5+ 0.2°C’de su banyosunda inkübe ediniz.
- Durham tüplerini kontrol ederek gaz oluşunları belirleyiniz.



- EMS tablosuna göre sayısal değerlendirme yaparak fekal koliform sayısı belirleyiniz.

- Standart yöntemle fekal koliform analizi, EMS yöntemi ile yapılır ve koliform grup bakterilerin analizinin devamı olarak uygulanıldığını unutmayınız.
- Tüpleri mutlaka mikroprosesör kontrollü su banyosunda inkübe ediniz.
- Su sıcaklığı; düşük olunca fekal olmayan koliformların da gelişme olasılığı yüksek olunca fekal koliformların gelişmeme olasılığı vardır, bu nedenle inkübasyon süresince su banyosu sıcaklığı maksimum ve minimum termometre ile mutlaka kontrol ediniz.
- İnkübasyon sonunda bakteri gelişmesine bağlı olarak bulanıklık ve gaz görülen tüplerin “fekal koliform grup pozitif” olarak değerlendirildiğini unutmayınız.
- Belirlenen koliform sayısını hesaplayıp sonucu EMS/g(mL) olarak veriniz.

E.coli Analizi

- Fekal koliform analizindeki gaz veren EC broth'lu tüplerden L-EMB agar petrilere öze ile tek koloni düşürme yöntemiyle ekim yapınız.
- 36°C 'de 24 saat inkübe ediniz.
- Üreme kontrolü yapmak üreme varsa makroskobik olarak inceleyerek tipik kolonileri belirleyiniz.



Escherichia coli

- Tüpleri mutlaka mikroprosesör kontrollü su banyosunda inkübe ediniz.
- Su sıcaklığı; düşük olunca fekal olmayan koliformların da gelişme olasılığı yüksek olunca Escherichia colinin gelişme olasılığı vardır, bu nedenle inkübasyon süresince su banyosu sıcaklığını maksimum ve minimum termometre ile mutlaka kontrol ediniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi indikatör mikroorganizmaların özelliklerinden biri değildir?
A) İndikatör mikroorganizmanın sayımı ve tanımlanması kolay ve hızlı olmalıdır.
B) İndikatör mikroorganizma, gıda mikroflorasında bulunan diğer mikroorganizmalardan kolayca ayırt edilmelidir.
C) İndikatör mikroorganizma, gıdada patojenler gibi dayanıksız olmalıdır.
D) İndikatör mikroorganizma, patojen ile birlikte bulunabilmelidir.
2. Katı besiyerlerinde sayım sonuçları nasıl verilmelidir?
A) kob/ml, kob/g, kob/cm²
B) kob /l, kob/g, kob/cm³
C) kob/kg, kob/ml, kob/m²
D) kob/cm³, kob/cm², kob/m
3. EMS yönteminde tüplerin pozitif olarak değerlendirilmesi nasıl yapılır?
A) Durham tüplerinde gaz oluşmasıyla
B) Besiyerinde renk değişimi ve gaz oluşmasıyla
C) Bulanıklık ve pıhtılaşma olmasıyla
D) Hepsi
4. İnkübasyon sonrasında, petri kutularında hemen sayım yapılamayacaksa petriler, kaç derecede ve en fazla kaç saat depoda saklanmalıdır?
A) +3°C'ta en fazla 20 saat
B) +4°C'ta en fazla 24 saat
C) +5°C'ta en fazla 25 saat
D) +6°C'ta en fazla 30 saat

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığımız bilgilerle patojen mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Gıda Mikrobiyoloji laboratuvarına giderek patojen mikroorganizmalar ve özellikleri hakkında bilgi edininiz.
- Laboratuvarda aerob ve anaerob patojen mikroorganizma sayım yöntemlerini inceleyiniz.
- Edindiğiniz bilgileri arkadaşlarınızla paylaşınız.

2. PATOJEN MİKROORGANİZMALAR

Gıda mikrobiyolojisinde bilinen patojen mikroorganizmalar; Salmonella, Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7, Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus gibi bakteriler ve mikotoksijenik küflerden ibarettir. Baz patojen bakteriler gıdalarda, bazıları vücutta toksin üretirler.

2.1. Patojen Mikroorganizmaların Özellikleri

Gıdada bulunan ve insanlarda hastalık yapan mikroorganizmaların patojen olarak nitelendirilmesi için 2 temel özellik vardır. Öncelikle mikroorganizma gıdada açıkça “bozuk” olarak nitelendirilemeyecek kadar az sayıda bulunduğu dahi 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.

2.2. Patojen Mikroorganizmaların Aranması ve Sayımı

Patojen mikroorganizmalar aerob patojenlerin aranması ve sayımı ve anaerob patojenlerin aranması ve sayımı olmak üzere iki başlık altında sayılır.

2.2.1. Aerob Patojenlerin Aranması ve Sayımı

Salmonella ve Listeria monocytogenes gıdalarla en çok bulaşabilen aerob patojenlerdir.

➤ **Listeria monocytogenes arama yöntemi**

Gıdalarda listeria aranması ve sonucun var/yok şeklinde verilmesi yaygın bir analiz yöntemi olmakla beraber son zamanlarda listeria sayımı için EMS yöntemi dışında selektif katı besiyeri kullanılarak yapılan sayımlar üzerinde de standart yöntem çalışmaları sürdürülmektedir.

• **Listeria aranması:**

Analiz numunesinden 25 g numuneyi alarak 225 ml enrichment broth (LEB) besiyerinde homojen hâle getirilir.

Karışım, 30°C'de 48 saat inkübe edilir.

Bu ön zenginleştirme kültüründen 24ve 48 saatlerde Oxford ve LPM agar besiyerlerine ekim yapılır.

Oxford agar 35°C'de, LPM agar 30°C'de 24-48 saat inkübasyon sonrası koloni aranır.



Resim 2.1: Oxford agarda koloninin görünümü

➤ **Salmonella arama yöntemi**

Salmonella, eskiden beri bilinen en yaygın patojenlerden biridir. İnsan ve hayvanlar için patojenik mikroorganizmaların en önemlisidir.

Salmonella aerob, spor oluşturmeyen gram negatif bir bakteridir. Vakalardan sıklıkla izole edilen salmonella türleri salmonella typhimurium ve salmonella enteridistir.

Salmonella insan ve birçok hayvanın bağırsaklarında bulunmakta ve dışkıyla atılmaktadır. Taşıyıcılarla bulaşır.

Kanatlı hayvan eti, yumurta ve bunlardan yapılan ürünler, kırmızı et ve et ürünleri, süt, krema, dondurma ve soslar ile kabuklu deniz ürünleri önemli enfeksiyon kaynaklarıdır. Salmonella, listeria monocytogenes ile birlikte ölüme en fazla neden olan gıda kaynaklı patojenlerdir.

Salmonella analizinde ön zenginleştirmede; tamponlanmış peptonlu su, Nutrient Broth, seçici zenginleştirmede ise RV(Rappoport Vasiliadis), MKTT(Müller Kauffman Tetratyonat Broth), Selenite Cystine Broth gibi besiyerleri kullanılır.

- Salmonella enterobacteriaceae familyasında yer alır ve belli özelliklere sahiptir:
 - Laktoz ve sakkaroz hariç karbonhidratı, fermente ederek asit ve gaz oluşturur.
 - Sitrati karbon kaynağı olarak kullanır.
 - H₂S oluşturur.
 - Nitratı nitrite dönüştürür.
 - İndol ve üreaz negatiftir.
 - Optimal üreme sıcaklığı 35-37°C'dir.
 - Optimal pH değeri 6,5-7,5 arasında olup 4,0-9,5 arasında da üreme görülmektedir.
- **Salmonella sayılması:** Rutin gıda kontrollerinde, salmonella 25 g /ml gıdada sadece aranırken özel amaçlı çalışmalarda bu sayım EMS yöntemi ile yapılabilir. Tamponlanmış peptonlu besiyerinde inkübasyon sonunda 3-3-3-2-0 şeklinde bakteri gelişmesi olur. Bunların tümünden 2 farklı selektif zenginleştirme besiyerine ekim yapılmış, inkübasyondan sonra bu 2 selektif besiyerinden 2'şer adet olmak üzere toplam 11 X 4 = 44 adet selektif katı besiyerine ekim yapılmıştır. İki selektif zenginleştirme besiyerinden ekim yapılan 4 agarlı besiyerinin her birinden en az 5'er tipik koloni izole edilir ve bunlara ayrı ayrı biyokimyasal ve serolojik testler uygulanır. 4 petriden elde edilen 20 koloniden bir adedi dahi pozitif sonuç verirse sonuçta o izolatin geldiği tamponlanmış peptonlu su tüpü pozitif olarak değerlendirilir.

Buradaki örneğe göre 2-0-0 serisi için Salmonella sayısı 0,92 adet/ml EMS olarak bulunur. Eğer kullanılan selektif zenginleştirme besiyerlerinde bakteriyel gelişme olup olmadığı rahatlıkla anlaşılıyorsa gelişme olmayan tüplerden selektif katı besiyerlerine ekim yapılması gereksiz olurdu. Bununla beraber aynı önzenginleştirme tüpünden 2 ayrı selektif zenginleştirme besiyerine ekim yapıp bunlardan birinde bakteriyel gelişme olmayıp diğerinde gelişme varsa ve bu gelişme olan tüpten selektif katı besiyerlerine yapılan ekimlerde oluşan kolonilerden birisi dahi Salmonella olarak tanımlanır ise yine bu izolatin geldiği ön zenginleştirme tüpü pozitif olarak değerlendirilir.

Listeria sayılması da burada gösterilen aynı mantık altında yapılır. Bu yöntemde ön zenginleştirmeden sonra tam ve yarı konsantre Fraser Broth tüplerinden 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra selektif katı besiyerlerine ekim yapılır ve Salmonella 'da olduğu gibi izole edilen koloniler tanımlanır.

2.2.2. Anaerob Patojenlerin Aranması ve Sayımı

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

Anaerob bakteriler havasız (oksijensiz) ortamlarda gelişen bakterilerdir. Bu tip bakterilerin kültürel yöntemle sayılabilmesi için gelişme ortamında yani inkübasyon ortamında hava bulunmamalıdır.

Anaerobların sayımında havanın ortamdan uzaklaştırılması için çeşitli sistemler bulunur. Bu amaçla özel inkübatörler ve/veya ekipmanlar geliştirilmiştir.

Ortamdan havanın uzaklaştırılmasında vakum ve gaz uygulaması en çok kullanılan sistemlerdir. Bu amaçla özel yapılmış inkübatör kullanılıyorsa Petri kutuları inkübatöre yerleştirildikten sonra inkübatördeki hava, vakum pompası ile boşaltılır ve inkübatör gaz ile doldurulur. Bu uygulamalara elverişli bir inkübatör yoksa özel olarak yapılmış anaerobik kavanozlar kullanılmalıdır. Ticari olarak geliştirilmiş çok değişik modellerde anaerobik kavanozlar vardır.

Anaerob ortamın sağlanmasında kuşkusuz en uygun sistemler özel inkübatör veya kavanozların kullanılmasıdır. Her iki sistem de mevcut değilse ancak ağız tam olarak kapatılabilen büyük bir kavanoz bulunuyorsa, basit ancak etkili bir yöntem ile de anaerob ortam sağlanabilir. Bu yöntemde Petri kutuları ve tüpler kavanoza yerleştirildikten sonra kavanoz içinde mum yakılır ve kavanozun kapağı kapatılır. Mum, kavanozdaki oksijeni tüketerek yanar, oksijen bittiğinde ise söner. Bu yöntem kavanozdaki oksijeni tam olarak tüketmese de en basit ve en ucuz yöntemdir. Mum yerine özel kavanozlara yerleştirilmiş elektrikli sistemler de vardır.

Anaerob ortamların sağlanmasında kullanılan gazların %10 oranında hidrojen içermesi önerilmektedir. Bu amaçla en yaygın kullanılan karışımlar; %5 CO₂ + azot içinde %10 H₂ veya sadece azot içinde %10 H₂'dir. Anaerob bakteri gelişimi için CO₂ kullanılması gerekli ise CO₂ 'in %5'lik limiti geçmemesine özen göstermek gerekir, çünkü besiyeri pH 'sının düşmesine neden olabilir. Anaerob ortam sağlanmasında kullanılan gazların hazırlanması için özel cihazlar vardır. Benzer şekilde bu gazlar ticari olarak da bulunur.

Mutlak anaerob olmayan fakültatif anaeroblar ile mikroaerofil mikroorganizmaların geliştirilmesi ve dolayısı ile sayılmaları için daha basit teknikler de vardır. Bu teknikler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Dökme veya yayma yöntemi ile Petri kutularına ekim yapıldıktan sonra, besiyeri yüzeyi 2 mm kalınlıkta %0,1 steril agar çözeltisi ile (su içinde) örtülür. Petri kutuları yayma yöntemi ile hazırlanmışsa besiyerinin seyreltilmiş materyali emmesi için yeterince beklenmelidir.

Mikroorganizma, sayımdan ziyade geliştirilmek amacı ile (ya da test edilecek materyalde var -yok şeklinde aranıyorsa) tüplerde sıvı besiyerinde üretiliyorsa, vidalı kapaklı tüpler ağzına kadar doldurulup kapakları kapatılır. Bu teknik özellikle gaz yapmayan fotosentetik bakteriler için önerilir.

Bakteriler tüp içinde katı veya sıvı besiyerinde üretiliyorsa, inokülasyondan sonra besiyeri üzeri steril %0,1 agar çözeltisi veya steril vaspar (%50 vazelin + %50 parafin) ile örtülebilir.

Mutlak anaeroblar Petri kutusunda geliştirilmek istendiğinde ve anaerobik inkübatör mevcut değilse Petri kutuları vakuma dayanıklı kavanoz içine konur. Kavanoz içine ayrıca anaerobiklik olduğunu kontrol etmeye yarayan indikatör çözelti içeren bir beher de konulur. 2-3 sefer vakum yapıp azot ilave edilerek kavanoz içindeki oksijen ortamdan uzaklaştırılır. Ortamda oksijenin kalması ve/veya sızıntı sonucu oksijen girmesi hâlinde, aktif hâldeki indikatörün sarı rengi oksidasyon sonucu maviye döner. Bu takdirde, kavanozun sızdırmazlığı kontrol edilip, kavanoz hiç açılmadan ışık ile indikatör aktive edilir. Böylece, kavanoz içinde az miktarda oksijen varsa bu, aktifleştirilmiş indikatör ile absorbe edilebilir.

➤ **Clostridium Perfringens arama yöntemi**

Clostridium perfringens gram pozitif, spor oluşturan, anaerobik, hareketsiz ve çubuk şeklinde bir bakteridir. Yüksek sıcaklıklarda aerobik koşullarda da hızlı gelişme gösterir. Toprak kökenli olup çevreden, çiğ et, insan ve hayvan bağırsaklarından izole edilir.

Gıda örneği 1:10 oranında (25 gram/225 ml) seyreltilerek homojenize edilir ve aynı şekilde (10^{-2} , 10^{-3} ...) oranlarında ileri seyreltilimler yapılır.

Her seyreltimden egg yolk emülsiyon içeren TSC agar üzerine sürme yöntemi ile 0,1 ml ekim yapılır. Yayılan seyreltim absorbe olduktan sonra yüzey tabakası oluşturmak üzere egg yolk emülsiyon içermeyen TSC agardan yaklaşık 10 ml kadar ilave edilir.

Bu işleme alternatif olarak dökme plak yöntemi ile de ekim yapılabilir. Hazırlanan seyreltilerden steril petri kutularına 1.0'er ml inokule edilir, üzerlerine 25 ml 45°C'ye soğutulmuş egg yolk emülsiyon içermeyen TSC agar dökülür ve inokulum ile karışımı sağlanır.

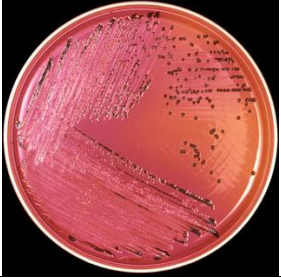
Petiriler anaerobik kavanozda gas generating (BR38) kit ve katalizör (BR 042) kullanılarak 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılır.

Clostridium perfringens, egg yolk emülsiyon içeren TSC agarda etrafında opak zon bulunan, 2-4 mm çapında siyah koloniler oluştururken, egg yolk emülsiyon içermeyen TSC agarda sadece küçük siyah renkli koloniler gözlenir/aranır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Patojen mikroorganizmalardan Salmonella varlığını ya da yokluğunu tespit ediniz.

İşlem Basamakları	Öneriler
Salmonella varlığını tespit etme ➤ Analiz araç gereçlerini hazırlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Laboratuvar güvenlik kurallarına uyunuz.➤ Çalışma ortamını, kullanılacak araç gereç ve besiyerlerini hazırlayınız.➤ Gıda örneğinin mikrobiyolojik analiz kurallarına uygun bir şekilde laboratuvara getirilip getirilmediğini kontrol ediniz.
➤ Mikrobiyolojik analizler için numuneyi analize hazırlayınız.	➤ Et, tavuk, yumurta, içme suyu vb. numunelerini tekniğine uygun olarak analize hazırlayınız.
➤ Analiz numunesinden 25 g/ml numuneyi alarak 225 ml peptonlu su içinde homojen hâle getiriniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Burada ön zenginleştirme yapıldığını yani mikroorganizma sayısının artırılmaya çalışıldığını unutmayınız.➤ Gıda örneği sıvı ise 25 ml gıdayı doğrudan bu besiyerine ekleyiniz.➤ Karışımı erlen içinde yapınız.
➤ Karışımın 37°C'de 24 saat inkübasyonunu yapınız. 	➤ İnkübasyonu etüvde, derece ve süreye uyarak yapınız.
➤ İnkübe edilmiş karışımdan 10 ml alarak 90 ml selenit sistin broth besiyerine ekleyiniz. 	➤ Selenit sistin broth besiyerinde seçici zenginleştirme yapıldığını yani Salmonella dışındaki bakterilerin gelişmesini engelleyip sadece Salmonella üremesinin sağlandığını unutmayınız.
➤ Karışımın 37°C'de 24 saat inkübasyonunu yapınız.	➤ Burada esas zenginleştirme yapıldığını yani mikroorganizma sayısının daha çok artırılmaya çalışıldığını unutmayınız.

<ul style="list-style-type: none"> ➤ Öze ile brillant green agara tek koloni düşürme yöntemiyle ekim yapınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Selenit sistin broth besiyerlerinde gelişen kültürden bir öze dolusu alarak brillant green besiyerlerine tek koloni izole etmek için ekim yapınız.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ 37°C’de 24 saat inkübasyon yapınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ İnkübasyon derece ve süresine uyunuz.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Üreme kontrolünü yapıp üreme varsa makroskobik olarak inceleyerek tipik pembe kolonileri belirleyiniz. 	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tipik kolonilerde biyokimyasal testler yapınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Katı besiyerinde gelişmiş olan tipi pembe kolonilerden Salmonella olduğu tahmin edilen kolonilerin Triple Sugar Iron Agara ekimini yapınız. ➤ 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakarak sonucunda siyah renkli koloni gözlenmesi durumuna göre Salmonella olup olmadığına karar veriniz. ➤ Siyahlık baskın bir şekilde görünüyorsa kültürü Salmonella pozitif olarak değerlendiriniz. ➤ Şüphe durumunda, biyokimyasal testleri de (üre testi gibi) yapınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi, Salmonella'nın özelliklerinden biri değildir?
A) Sitrati karbon kaynağı olarak kullanır.
B) İndol ve üreaz pozitifdir.
C) H₂S oluşturur.
D) Optimal pH değeri 6,5-7,5 arasındadır.
2. Aşağıdaki besiyerlerinden hangisi kullanılarak seçici zenginleştirmeye Salmonella dışındaki bakterilerin gelişmesini engelleyerek sadece Salmonella'nın üremesini sağlanır?
A) Selenit Sistin Broth
B) Tamponlanmış Peptonlu su
C) Billant Green Agar
D) Triple Sugar Iron Agar
3. Salmonella'nın optimal üreme sıcaklığı kaç olmalıdır?
A) 25-27 °C
B) 29-31°C
C) 35-37 °C
D) 40-44°C
4. Aşağıdakilerden hangisi Listeria'nın aranmasında kullanılan besiyeri değildir?
A) Enrichment Broth (LEB)
B) Oxford
C) LPM agar
D) EMB agar

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise "Modül Değerlendirme"ye geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. 10 g gıda maddesi tartılıp 90 ml fizyolojik su içine konarak homojenize edilmiştir. Bu dilüsyon aşağıdakilerden hangisidir?
A) 10 -1
B) 10 -2
C) 10 -3
D) 10 -4
2. Katı besiyeri sıcak su banyosunda eritildikten sonra kaç santigrat dereceye kadar soğutulmalıdır?
A) 43oC
B) 45 oC
C) 47 oC
D) 48 oC
3. Aşağıdakilerden hangisi, yüzeye yayma yönteminde dikkat edilmesi gereken noktalardan biridir?
A) Drigalski özesinin sterilize edildiği alkol çözeltisi sürekli yenilenmeli/kontrol edilmelidir.
B) Her yayma işlemi için yeterli sayıda drigalski özesi bulundurulmalıdır.
C) Drigalski özesindeki alkolü uzaklaştırmak için öze bek alevinden geçirilmelidir.
D) Hepsi
4. Agarlı besiyeri peri kutularına yaklaşık kaç mililitre dökülmelidir?
A) 3 - 5 ml
B) 5 - 10 ml
C) 10 - 15ml
D) 20 - 25 ml
5. Aşağıdakilerden hangisi, EMS yönteminde bakteri sayımı yapmak için kullanılan besiyerlerinden biri değildir?
A) BGLB (Brillant Green Lactose Broth)
B) EC Broth (E.coli Broth)
C) Tryptic Soy (CASO)
D) EMBA (Eosin Methylene Blue Agar)
6. İnkübasyon bitiminde hangi petriker dikkate alınarak sayım yapılmalıdır?
A) 5 ile 50 arasında koloni oluşturanlar
B) 10 ile 100 arasında koloni oluşturanlar
C) 25 ile 250 arasında koloni oluşturanlar
D) 30 ile 300 arasında koloni oluşturanlar

-
7. Aşağıdakilerden hangisi, yüzeye yayma yönteminde petri kutularının bekletilmesindeki amacını açıklar?
- A) Besiyerinin iyice katılaşması
 - B) Besiyerinin inokulumu absorblaması
 - C) Homojen dağılım sağlanması
 - D) Besiyerinin soğuması
8. Aşağıdaki mikroorganizmalardan hangisi patojen olup indikatör mikroorganizma grubundan sayılmaz?
- A) Escherichia coli O157:H7 serotipi
 - B) Escherichia coli tip 1
 - C) Fekal koliformlar
 - D) Koliformlar

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ 1'İN CEVAP ANAHTARI

1	C
2	A
3	D
4	B

ÖĞRENME FAALİYETİ 2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	B
2	A
3	C
4	D

MODÜL DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI

1	A
2	B
3	D
4	C
5	C
6	D
7	B
8	A

KAYNAKÇA

- ÜNLÜTÜRK Adnan, Fulya TURANTAŞ, Gıdaların Mikrobiyolojik Analizleri, Meta Basım Matbaacılık, İzmir, 2002.
- Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Ders Notları, Mikrobiyoloji Laboratuvarı Ankara, 2012.
- SAREYÜPOĞLU Barış, Temel Veteriner Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, (5. Ünite), Anadolu üniversitesi Web-Ofset Tesisleri, Eskişehir, 2011.
- ARDA Mustafa, Temel Mikrobiyoloji, (3. Baskı) Medisan Yayın, Ankara, 2006.
- BİLGEHAN Hakkı, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, (11. Baskı) İzmir, 2005.
- TEMİZ Ayhan, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 2000.
- Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıkları Araştırma Müdürlüğü, Mart, 2008.
- www.mikrobiyoloji.org