

## 1.5 Kalite Kontrol

Günümüzde gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında yaygın olarak ticari dehidre formülasyonlardan hazırlanan besiyerleri veya kullanıma hazır besiyerleri kullanılmaktadır. Kullanıma hazır besiyerlerinin kalite kontrolleri için kullanıcı laboratuvarın sorumlulukları **Bölüm 1.3'** de verilmiştir. Dehidre formülasyonlardan hazırlanan besiyerleri için bu bölümde verilen yarı-kantitatif ve kalitatif kontrol metotları yeterlidir. Kantitatif kontrol metotlarının dehidre besiyeri veya kullanıma hazır besiyeri üreticileri tarafından uygulanması zorunludur. Laboratuvarların bir besiyerini veya farklı marka bir besiyerini ilk kez kullanacaklarında kantitatif kontrol metotlarını kullanmaları önerilmektedir.

Laboratuvarlarda hazırlanan her bir parti besiyerinin (Aynı zaman diliminde hazırlanmış aynı kod ile tanımlanmış besiyeri) bu bölümde verilen kalite kriterlerine uygunluğu değerlendirilmelidir. Kalite kriterlerini sağlamayan besiyeri partisi kullanılmamalıdır.

### 1.5.1 Fiziksel Kalite Kriterleri

Besiyerlerinin pH, hacim (Diluentler), besiyeri kalınlığı (Petrideki besiyerleri), renk, berraklık (Sıvı besiyerleri) ve jel stabilitesi (Agarlı besiyerleri) kontrol edilmelidir.

pH ve hacim kontrolü **Bölüm 1.2'** de detaylı olarak verilmiştir.

### 1.5.2 Mikrobiyolojik Kalite Kriterleri

#### 1.5.2.1 Mikrobiyal Kontaminasyon

Hazırlanan tüm besiyeri partileri kullanılmadan önce uygun koşullar altında inkübasyon yöntemi ile mikrobiyolojik kontaminasyon yönünden değerlendirilmelidirler. Laboratuvarların besiyerlerinin sterilite kontrollerine yönelik örnekleme planı ve kabul kriterleri olmalıdır. Örnekleme planı ve kabul kriterleri bir besiyeri partisinin büyüklüğüne (petri/tüp/şişe sayısı) göre belirlenebilir.

Küçük besiyeri partilerinin (<100 petri/tüp/şişe) kontaminasyon kontrolü için partiyi temsilen seçilen **≥1** adet örnek test edilmelidir. Test edilen örneklerden bir tanesinde mikrobiyolojik gelişme olması durumunda besiyeri partisi kullanılmamalıdır.

Büyük partiler için ISO 2859 standardında tanımlanan iki aşamalı örnekleme yöntemi kullanılabilir. Bu yöntemde parti büyüklüğüne bağlı olarak örnek sayıları ve kontamine örnekler için kabul ve red seviyeleri belirlenmelidir. İlk örnek grubunda kontamine örneklerin sayısı kabul ve red seviyesi arasında olduğu takdirde ikinci örnek grubundaki kontamine örnek sayısına göre karar verilebilir. Her iki örnekleme grubundaki toplam kontamine örnek sayısının red kriterini aşması durumunda parti kullanılmaz.

Küf ve maya sayımında kullanılan besiyerlerinin sterilite kontrolü amacı ile **25°C** de en az **48** saat inkübe edilmelidir. Diğer besiyerleri ise **37°C** de en az **18** saat inkübe edilmelidirler. Bazı sıvı besiyerleri, özellikle opak olanlar, inkübasyon sonunda sterilitenin teyidi için selektif olmayan agarlı bir besiyerine inokülasyon gerektirebilir.

#### 1.5.2.2 Koloni Morfolojileri

Diferansiyel ve identifikasyon besiyerlerinde hedef mikroorganizmaların fizyolojik ve biyokimyasal karakteristiklerine bağlı olarak beklenen koloni morfolojilerini göstermesi gerekmektedir.

Bazı besiyerlerinde genellikle hedef mikroorganizma ile aynı tür, cins veya familyaya ait hedef dışı mikroorganizmalar farklı koloni morfolojileri ile hedef mikroorganizmalardan ayırt edilebilir. Besiyerlerinin bu ayırt edici özelliği **Spesifiklik (Specificity)** olarak isimlendirilmektedir. Örneğin BP agar koagülaz negatif Stafilokoklar için seçici değildir. Koagülaz negatif Stafilokoklar, hedef mikroorganizmalar olan koagülaz pozitif Stafilokoklardan koloni morfolojisi ile ayırt edilebilirler.

Besiyerlerinin koloni morfolojileri **1.5.2.3** Verimlilik ve Seçicilik başlığı altında verilen kontroller esnasında değerlendirilebilir.

#### 1.5.2.3 Verimlilik ve Seçicilik

Verimlilik (Productivity) besiyerinde hedef mikroorganizmanın gelişme durumuna yönelik bir kalite kontrol kriteridir. Seçicilik ise seçici besiyerlerinin hedef dışı mikroorganizmaların gelişmesini baskılama gücüdür. Her iki

kalite kontrol kriteri kantitatif, yarı-kantitatif ve kalitatif olarak üç farklı metot ile değerlendirilebilir. Katı ve sıvı besiyerleri için kontrol metotları farklıdır.

### **Katı Besiyerleri için Metotlar**

#### **Kantitatif metot**

Verimlilik kontrolü için hedef mikroorganizma süspansiyonundan test edilen besiyerine ve referans besiyerine inokülasyon yapılır. Referans besiyeri selektif olmayan bir besiyeridir. Bakterilere yönelik besiyerlerinin kontrolünde referans besiyeri olarak Tryptone Soya Agar (TSA), küf ve mayalara yönelik besiyerleri için Sabouraud Dextrose Agar (SDA) kullanılabilir. Rutin uygulamalarda inokülasyon için dökme petri yöntemi kullanılan besiyerlerinin testlerinde dökme petri yöntemi kullanılabilir.

Test için her iki besiyerinden birden çok petri kullanılabilir. İdeal olarak inkübasyon sonunda referans besiyeri petrilerinde toplam koloni sayısı 100' ün üzerinde olmalıdır. Verimlilik, besiyerlerindeki koloni sayıları ile hesaplanan verimlilik oranı (**Productivity Rate,  $P_R$** ) ile değerlendirilir.

$$P_R = N_S / N_O$$

Bu formülde  $N_S$  test edilen besiyeri petrielerindeki toplam koloni sayısı,  $N_O$  ise referans besiyeri petrielerindeki toplam koloni sayısıdır.

Seçici olmayan besiyerleri için (Ör., Plate Count Agar)  $P_R$  değeri 0,7' den büyük olmalıdır. Seçici besiyerlerinin  $P_R$  değeri ise 0,5' den büyük olmalıdır.

Seçici besiyerlerinin seçiciliği uygun hedef dışı mikroorganizmanın selektif olmayan sıvı besiyerindeki 18-24 saatlik kültüründen hazırlanan ondalık dilasyonlar ile değerlendirilebilir. Test edilen besiyeri ve referans besiyerindeki koloni sayıları ile seçicilik faktörü (**Selectivity Factor,  $S_F$** ) hesaplanır.

$$S_F = D_O - D_S$$

Bu formülde  $D_O$  referans besiyerinde en az 10 koloni gözlenen en yüksek dilasyon,  $D_S$  ise test edilen besiyerinde referans besiyeri ile yakın sayıda (>10) koloni gözlenen en yüksek dilasyondur.  $S_F$ ,  $D_O$  ve  $D_S$  logaritmik olarak ifade edilmelidir. Seçicilik faktörünün hesaplanmasına yönelik bir örnek ' de Tablo verilmiştir. Seçici besiyerleri için  $S_F$  en  $\geq 2$  olmalıdır.

**Tablo 1.2** BP agar' ın *Escherichia coli* (ATCC 25922) ile gerçekleştirilen seçicilik kontrolü sonuçları

Besiyeri	Dilasyonlar ve koloni sayıları							
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
TSA (Referans besiyeri)					SKF*	SKF	55	5
BP agar (Test besiyeri)	120	13	1	-	-	-	-	-

\* Sayılamayacak kadar fazla

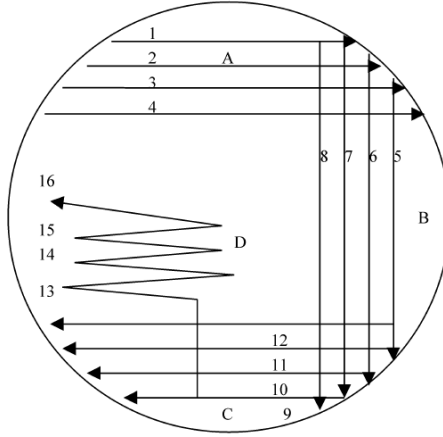
Tablo 1.2' de verilen koloni sayılarına göre  $D_O$  7 ( $10^{-7}$ ),  $D_S$  ise 2 ( $10^{-2}$ )' dir. Bu örnekte  $S_F$  5' dir.

#### **Yarı kantitatif metot**

Katı besiyerlerinin verimlilikleri ve seçicilikleri **Ekometri** tekniği ile yarı kantitatif olarak değerlendirilebilir. Bu amaçla petri kutusundaki besiyeri hedef veya hedef dışı mikroorganizmanın selektif olmayan sıvı besiyerindeki 18-24 saatlik kültürü ( $10^7$  - $10^8$  kob/ml) ile inoküle edilir. Rutin uygulamalarda dökme petri yöntemi için kullanılan besiyerleri de önceden petriye dökülerek bu yöntem ile değerlendirilebilirler.

İnokülasyon **1  $\mu$ L** lik öze kullanılarak **Şekil 1'** de verilen hatlara göre yapılmalıdır. Öze mikroorganizma kültürüne daldırılır ve agar yüzeyi ile 20°- 30° açı yapacak şekilde A bölgesinde paralel 4 hat halinde inokülasyon yapılır. Daha sonra öze yeniden mikroorganizma kültürüne daldırılmaksızın B ve C bölgesi hatları oluşturulur ve işlem D bölgesindeki tek hat ile sonlandırılır. Bu işlemde özenin sabit basınç ve hız ile kullanılması önemlidir. Ayrıca mikroorganizma kültürüne daldırılan özede fazla sıvı kalmamasına ve hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmelidir.

Test edilen besiyeri için metot ile tanımlanan sıcaklık ve sürede inkübasyon sonunda her bir hattaki gelişme değerlendirilir. Hattın yarısından uzun bir bölümünde koloni gözleendiği takdirde **1** puan olarak değerlendirilir. Bu gelişme kriterini sağlamayan hatlara puan verilmez. Elde edilen toplam puan Gelişme indeksi ( $G_i$ ) olarak isimlendirilir. Bu durumda Ekometri tekniğinde en yüksek  $G_i$  değeri **16'** dir. Selektif besiyerlerinde hedef mikroorganizma için  $G_i$  değeri 6' dan yüksek olmalıdır. Selektif olmayan besiyerleri için daha yüksek  $G_i$  değerleri limit olarak kabul edilebilir. Selektif besiyerlerinde hedef dışı mikroorganizma kısmen veya tamamen inhibe olmalıdır.



**Şekil 1.2** Ekometri tekniğinde inokülasyon hatları

### **Kalitatif metot**

Bu metot yalnızca görsel değerlendirmeye dayalıdır. Petri kutusundaki besiyeri hedef mikroorganizmanın selektif olmayan sıvı besiyerindeki 18-24 saatlik kültürü ( $10^7 - 10^8$  kob/ml) ile inoküle edilir. Rutin uygulamalarda dökme petri yöntemi için kullanılan besiyerleri de bu yöntem ile değerlendirilebilirler.

İnokülasyon **1  $\mu$ L'** lik öze kullanılarak yapılmalıdır. Öze mikroorganizma kültürüne daldırılır düz hatlar halinde inokülasyon yapılır. Bu metotta aynı petriye inokülasyon hatları birbirleri ile kesişmediği sürece farklı mikroorganizmalar inoküle edilebilir.

Test edilen besiyeri için metot ile tanımlanan sıcaklık ve sürede inkübasyon sonunda petrilerdeki gelişme değerlendirilir. Gelişme gözlenmeyen petriler **0** puan, zayıf gelişme gözlenen petriler **1** puan ve iyi gelişme gözlenen petriler **2** puan olarak değerlendirilir. Hedef mikroorganizma için kabul kriteri **2** puandır. Selektif besiyerlerinde hedef dışı mikroorganizma kısmen veya tamamen inhibe olmalıdır (**0** veya **1** puan).

### **Sıvı Besiyerleri için Metotlar**

#### **Kantitatif metot**

Verimlilik kontrolü için hedef mikroorganizma süspansiyonundan test edilen besiyerine ve referans besiyerine inokülasyon yapılır. Bakterilere yönelik besiyerlerinin kontrolünde referans besiyeri olarak Tryptone Soya Broth (TSB), küf ve mayalara yönelik besiyerleri içinse Sabouraud Dextrose Broth (SDB) kullanılabilir. Test edilen ve referans besiyerleri hedef mikroorganizma ile 10-100 kob/10 mL düzeyinde inoküle edilir ve metot ile tanımlanan sıcaklıkta ve sürede inkübe edilir. İnkübasyon sonunda doğrudan besiyerlerinden ve dilusyonlarından seçici olmayan katı besiyerlerine inokülasyon yapılır ve test edilen mikroorganizma için uygun sıcaklıkta ve sürede inkübe edilir. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılır ve verimlilik oranı ( $P_R$ ) katı besiyerleri için verilen formül ile hesaplanır. Elde edilen  $P_R$  değeri **0,1'** den büyük olmalıdır.

Seçici besiyerlerinin seçicilik kontrolü için test edilen besiyeri ve referans besiyeri uygun hedef dışı mikroorganizma ile  $>1000$  kob/10 mL düzeyinde kontamine edilmelidirler. Test edilen ve referans

besiyelerinin metot ile tanımlanan sıcaklıkta ve sürede inkübasyonunu takiben doğrudan besiyelerinden ve dilusyonlarından seçici olmayan katı besiyerine inokülasyon yapılır. İnoküle edilen petriyeler kullanılan mikroorganizma için uygun sıcaklıkta ve sürede inkübe edilir. İnkübasyon sonunda petriyelerdeki koloniler sayılır ve seçicilik faktörü ( $S_F$ ) katı besiyerleri için verilen formül ile hesaplanır. Elde edilen  $S_F$  değeri **2**'den büyük olmalıdır.

Referans besiyeri kullanılmadığı takdirde, test edilen sıvı besiyerinin verimliliği inkübasyon sonunda selektif olmayan katı besiyeri üzerinde saptanan mikroorganizma sayısı ile değerlendirilebilir. Bu durumda besiyerinde hedef mikroorganizma sayısı  $10^6$  kob/mL' nin üzerinde olmalıdır. Seçici besiyerleri için hedef dışı mikroorganizma sayısı ise  $10^4$  kob/mL' nin altında olmalıdır.

Diluentlerin kontrolü diğer sıvı besiyerlerinden farklıdır. Bu amaçla diluent uygun mikroorganizma (Ör., *Escherichia coli* ATCC 25922) kültürü ile 100-1000 kob/10mL düzeyinde kontamine edildikten sonra oda sıcaklığında 45 d bekletilir. Bu sürenin başında ve sonunda mikroorganizma sayısı selektif olmayan katı besiyeri kullanılarak belirlenir. 45 d sonunda elde edilen mikroorganizma sayısı, başlangıçta elde edilen mikroorganizma sayısından  $\pm 50\%$  nin üzerinde farklı olmamalıdır.

#### **Yarı kantitatif metot**

Verimlilik kontrolü için test edilen besiyeri hedef mikroorganizma ile 10-100 kob/10 mL düzeyinde kontamine edilir. Test edilen besiyeri seçici bir besiyeri ise seçicilik kontrolü amacıyla hedef dışı mikroorganizma ile >1000 kob/10mL düzeyinde kontamine edilmelidir. Kontaminasyonu takiben besiyerleri metot ile tanımlanan sıcaklıkta ve sürede inkübe edilirler. İnkübasyondan sonra **10  $\mu$ L** lik öze kullanılarak verimlilik testi için seçici bir katı besiyerine ve seçicilik testi için seçici olmayan bir katı besiyerine inokülasyon yapılır. İnoküle edilen petriyeler kullanılan mikroorganizma için uygun sıcaklıkta ve sürede inkübe edilir. Kabul edilebilir bir verimlilik için inkübasyon sonunda seçici besiyerinde **en az 10** hedef mikroorganizma kolonisi gözlenmelidir. Kabul edilebilir bir seçicilik için seçici olmayan besiyerinde gözlenen hedef dışı mikroorganizma koloni sayısı **10' dan az** olmalıdır.

#### **Kalitatif metot**

Bu metot yalnızca görsel değerlendirmeye dayalıdır. Sıvı besiyerleri hedef mikroorganizmanın selektif olmayan sıvı besiyerindeki 18-24 saatlik kültürü ile **1  $\mu$ L** lik öze kullanılarak inoküle edilir.

Test edilen besiyeri için metot ile tanımlanan sıcaklık ve sürede inkübasyon sonunda besiyerinin verimliliği tüplerdeki bulanıklık ile değerlendirilir. Bulanıklık gözlenmeyen tüpler **0** puan, zayıf bulanıklık gözlenen tüpler **1** puan ve iyi gelişme gözlenen tüpler **2** puan olarak değerlendirilir. Hedef mikroorganizma için kabul kriteri **2** puandır. Selektif besiyerlerinde hedef dışı mikroorganizma kısmen veya tamamen inhibe olmalıdır (**0** veya **1** puan).

**Tablo 1.3** Besiyerlerinde gözlenen problemler ve muhtemel nedenleri

<b>Problem</b>	<b>Muhtemel neden</b>
Agarın katılaşmaması	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük pH' nın asit hidrolizine neden olması Yanlış tartım Agarın tamamen çözülmemesi Bileşenelerin yetersiz karışması
Hatalı pH	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük saf su kalitesi Kimyasal kontaminasyon pH' nın yanlış sıcaklıkta ölçülmesi pH metrenin hatalı kalibrasyonu Düşük kalite dehidre besiyeri
Anormal renk	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük saf su kalitesi Düşük kalite dehidre besiyeri Hatalı pH Kontaminasyon
Presipitasyon	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük saf su kalitesi Düşük kalite dehidre besiyeri pH kontrolünün yetersizliği
Düşük verimlilik, inhibisyon	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük saf su kalitesi Düşük kalite dehidre besiyeri Yanlış formülasyon (Ör., bileşenlerin doğru tartılmaması, katkıların yanlış konsantrasyonda ilavesi)
Düşük seçicilik	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük saf su kalitesi Düşük kalite dehidre besiyeri Katkıların yanlış konsantrasyonda veya yanlış sıcaklıkta ilavesi