

F. GIDA MİKROBİYOLOJİSİ

F1. Gıdalarda Toplam *Enterobacteriaceae* Sayımı

1. Genel Bilgi

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde "genel kalite indeksi" olarak analizi istenen toplam *Enterobacteriaceae* familyası sayımında standart olarak Violet Red Bile Dextrose (VRBD) Agar besiyeri kullanılır. Besiyeri bileşiminde bulunan Bu besiyerine standart yayma ve 37°C'da 24 saat inkübasyon sonunda oluşan tüm koyu kırmızı koloniler "toplam *Enterobacteriaceae*" olarak değerlendirilir.

Besiyeri bileşiminde bulunan safra tuzları ve kristal viyole başta Gram pozitifler olmak üzere refakatçi floranın gelişimini inhibe ederken, glikoz pozitif bakterilerin varlığı pH indikatörü ile koloni renginin kırmızıya dönüşmesi ve safra asitlerinin koloni etrafında çökelti oluşturması ile belirlenir. Dolayısıyla 35°–37 °C'da 24 saat süren inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri olarak sayılır. *Aeromonas* gibi *Enterobacteriaceae* üyesi olmayan bazı refakatçi bakteriler de benzer reaksiyon verir. Buna bağlı olarak rasgele seçilmiş 5 tipik koloninin oksidaz testi ile doğrulanması önerilir. *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri oksidaz negatiftirler.

Hazırlanması için dehidre besiyeri, 39.5 g/L olacak şekilde damıtık su içinde karıştırılarak kaynatılır ve kaynama başladıktan sonra en çok 2 dakika daha kaynama sıcaklığında tutulup, 45°–50 °C'a soğuyunca steril Petri kutularına 12.5'er mL dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. VRBD Agar besiyerinin aşırı ısıtılmasından kaçınılmalıdır. Aşırı ısıtma selektiviteyi azaltır. Kaynar su banyosundaki ısı işlem etkinliğinin sağlanması için besiyerinin 250 mL'den fazla hacimlerde hazırlanmaması önerilir. Önceden 0.5 L erlen içine 250 mL damıtık su konulup ağzı kapatılarak otoklavda sterilize edilmesi ve besiyerinin bu erlende hazırlanıp eritilmesi önerilir. Hazırlanmış besiyeri parlak ve koyu kırmızı-kahve renklidir, pH'sı 25 °C'da 7.3±0.2'dir.

Genel olarak ekimden sonra 15 dakika oda sıcaklığında kendi halinde bekletilen Petri kutularına ikinci kat olarak yine VRBD besiyerinden 5–6 mL kadar dökülüp, katılaştıktan sonra inkübasyon önerilmektedir.

Toplam *Enterobacteriaceae* sayımı için standart olarak VRBD Agar besiyeri kullanılmakla birlikte sanayide "standart dışı" olmak kaydı ile VRBL Agar'da renkli ve renksiz tüm kolonilerin sayımı ile VRBL Agar'a 10 g/L dekstroz ekleyerek de sayım yapılmaktadır.

Gıda işletmelerinde "koliform bakteri" sayımında kullanılan VRBL Agar besiyerinde de teorik olarak toplam *Enterobacteriaceae* sayımı yapılabilir. Buna göre; besiyerinde gelişen renkli ve renksiz tüm koloniler sayıldığında toplam *Enterobacteriaceae* sayılmış olur. İkinci olarak; VRBL besiyerine 10 g/L dekstroz eklendiğinde elde edilecek modifiye besiyerinde gelişecek tüm renkli koloniler toplam *Enterobacteriaceae* olarak da değerlendirilebilir.

Uygulamanın amacı, daha önceden koliform bakteri ve koliform olmayan *Enterobacteriaceae* ilave edilmiş gıda örneğinde bu 3 yöntemle sayım sonucu farklığının incelenmesidir.

2. Analiz

Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi laboratuvarı tarafından önceden kontamine edilen gıda örneğinden hazırlanan 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltiler, ekim ve inkübasyon standart yöntemle yapılacaktır.

Çalışma, 3 alt grup halinde yürütülecektir. Gruplar, aynı gıdadan, bağımsız olarak seyreltme, 3 farklı besiyerine ekim ve sayım yapacaklardır. Böylece 3 tekerrürlü deneme planı kurulmuş olacaktır. Tek rapor verilecektir.

3. Değerlendirme

35° – 37° °C'da 24 saat inkübasyon sonunda koloniler sayılacaktır. Gıda örneğinde bulunan toplam Enterobacteriaceae sayısı;

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

Burada;

N: Gıda örneğinin 1 g ya da 1 mL'sinde mikroorganizma sayısı

C: Sayımı yapılan tüm Petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V: Sayımı yapılan Petri kutularına aktarılan hacim, mL

n_1 : İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

n_2 : İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan Petri kutusu adedi

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

* Petri kutularında 25–250 arasındaki koloni sayıları değerlendirmeye alınır.

4. Sonuçların Verilmesi

Gruplar	VRBD Agar	VRBL Agar	Mod. VRBL Agar
Grup 1			
Grup 2			
Grup 3			

Yukarıdaki çizelge log kob/g olarak doldurulacak, basit varyans analizi ile 3 besiyeri arasında fark olup olmadığı yorumlanacaktır.

Kaynaklar

www.mikrobiyoloji.org sitesi

Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları (Ankara Üniversitesi Yayını)

Gıda Mikrobiyolojisi (Ege Üniversitesi Yayını)