

NEŞE ASLI ÖNCÜ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL, 2018





T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

YENİ GELİŞTİRİLEN DOĞAL KAYNAKLI BİR STERİLİZASYON
BİYOLOJİK İNDİKATÖRÜNÜN GEÇERLİ KILMA ÇALIŞMASININ
YAPILMASI VE PERFORMANSININ TİCARİ KİTLERLE
KARŞILAŞTIRILMASI

NEŞE ASLI ÖNCÜ

DANIŞMAN
PROF. DR. ÖZGE ÖZGEN ARUN

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ PROGRAMI

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

Bu çalışma 06.11.2018 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, **Besin Hijyeni ve Teknolojisi Doktora Programı**
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ



Prof. Dr. Özge ÖZGEN ARUN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi



Prof. Dr. Kamil BOSTAN
İstanbul Aydın Üniversitesi
Güzel Sanatlar Fakültesi
Gastronomi ve Mutfak Sanatları



Prof. Dr. Seyyal AK
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi



Prof. Dr. Harun AKSU
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi



Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÇAKMAK SANCAR
İstanbul Esenyurt Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Fakültesi
Beslenme ve Diyetetik Bölümü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

NEŞE ASLI ÖNCÜ

İTHAF

Yapmış olduğum bu çalışmayı değerli aileme, eşime ve çocuğuma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Öncelikle, hayata adım attığım ilk günden bu yana sonsuz bir güven ve destekle, her anlamda yanımda olan canım annem ve özellikle babam'a gönülden teşekkür ederim.

Tanıdığım günden bu yana doktora eğitimimle ilgili bana her konuda destek olan ve ayrıca tezimle ilgili verdiği teknik desteğinden dolayı eşim Serdar Öncü'ye,

Doktora eğitimin süresince bana yol gösteren, bilimsel düşünme ve uygulama fırsatı sunan, çalışmalarımı takip ederek beni doğruya yönlendiren saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Özge Özgen Arun'a

Her daim varlığı ile yanımda olan ağabeyim Cenk Kısıkkaya'ya,

Yüksek lisans ve doktora eğitim süresince tecrübe ve bilgisini esirgemeyen Prof.Dr. Safinaz Yıldız'a,

Her ihtiyacım olduğunda yardımını esirgemeyen, içten dostluğuna inandığım ve çalışmalarım sırasında yanımda olan sevgili arkadaşım Ceyda Pembeci Kodolbaş'a,

Çalışmalarımda beni babasıyla bekleyerek sabırlı olduğu için oğlum Emir Arhan ÖNCÜ'ye

Ve son olarak birlikte çalışmaktan zevk aldığım ve bana verdiği destekten dolayı Gökmen Serdar'a,

teşekkürlerimi sunarım...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21046

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Termofilik Bakteriler	3
2.1.1. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ve genel özellikleri.....	4
2.1.2. İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri	6
2.2. Sterilizasyon.....	7
2.2.1. Sterilizasyon Yöntemleri.....	7
2.2.2. Sterilizasyon Doğrulama Yöntemleri /Monitorizasyonu	14
2.3. Biyoindikatörlerin Geçerli Kılınması İçin Şartlar (Standartlar)	17
2.4. “D değeri” ve “Z değeri”	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. GEREÇ	22
3.1.1. Çalışma Suşu ve Referans Suş	22
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	22
3.1.3. Analizlerde Kullanılan Besiyeri, Çözeltiler ve Kitler	23
3.2. YÖNTEM	25
3.2.1. Besiyerinin ve Kimyasalların hazırlanması	25
3.2.2. <i>G. stearothermophilus</i> 'un tanımlanması.....	29
3.2.3. <i>G. stearothermophilus</i> 'un Üretilmesi	29
3.2.4. Spor Toplama ve Spor Üretimi Çalışmaları.....	30

3.2.5. Canlı Spor Kantitasyonu ve Biyolojik İndikatörün Hazırlanması	31
3.2.6. Biyolojik İndikatör Isı Direnç Performans Çalışmaları	33
4. BULGULAR.....	42
4.1. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> suşunun tanımlama sonuçları	42
4.2. Spor Üretimi Çalışmaları	46
4.3. Hazırlanan Biyolojik İndikatör Test Örneklerinin Özellikleri.....	46
4.4. Biyolojik İndikatör Isı Direnç Performans Sonuçları	48
4.4.1. “D Değeri”	48
4.4.2. “Z Değeri” ve “r ² ” Belirtme Katsayısı.....	55
4.4.3. “Canlılık/Ölüm (Survival-Kill) Test” Çalışması.....	55
5. TARTIŞMA	57
KAYNAKLAR	66
EKLER.....	75
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1:	Termofilik Basillerin Biyokimyasal Özellikleri (+): Pozitif (-) Negatif, W: zayıf üreme.....	5
Tablo 2-2:	Basınç sıcaklık ilişkisi.....	10
Tablo 2-3:	Otoklavla sterilizasyonda kullanılan kimyasal indikatörler.....	16
Tablo 2-4:	Buharlı ısı sterilizasyonu standartları karşılaştırılması	18-19
Tablo 3-1:	Holcomb-Spearman Karber (HSKP) Hesaplanması	36
Tablo 3-2:	Limitli Holcomb-Spearman Karber (LHSKP) Hesaplanması.....	38
Tablo 3-3:	Örnek Regresyon analizi tablosu.....	40
Tablo 4-1:	Canlı Spor sayımı sonuçları.....	46
Tablo 4-2:	Spor germinizasyon besiyeri pH sonuçları.....	46
Tablo 4-3:	Başlangıç biyolojik indikatör canlı spor sayımı.....	47
Tablo 4-4:	I.Parti 118 °C “D Değeri” (HSKP).....	48
Tablo 4-5:	I.Parti 121 °C “D Değeri” (HSKP).....	49
Tablo 4-6:	I.Parti 124 °C “D Değeri” (LHSKP).....	49
Tablo 4-7:	II.Parti 118 °C “D Değeri” (HSKP).....	50
Tablo 4-8:	II.Parti 121 °C “D Değeri” (HSKP).....	50
Tablo 4-9:	II.Parti 124 °C “D Değeri” (LHSKP).....	51
Tablo 4-10:	III.Parti 118 °C “D Değeri” (HSKP).....	51
Tablo 4-11:	III.Parti 121 °C “D Değeri” (LHSKP).....	52
Tablo 4-12:	III.Parti 124 °C “D Değeri” (HSKP).....	52
Tablo 4-13:	Ticari Kit (Merck) 115 °C “D Değeri” (HSKP).....	53
Tablo 4-14:	Ticari Kit (Merck) 118 °C “D Değeri” (HSKP).....	54
Tablo 4-15:	Ticari Kit (Merck) 121 °C “D Değeri” (HSKP).....	54
Tablo 4-16:	Tüm partilerin ve Ticari Kit (Merck) “D Değeri” özet tablosu.....	54
Tablo 4-17:	Tüm partilerin ve Ticari Kit (Merck) Z Değeri ve r ² Belirtme katsayısı.....	55
Tablo 4-18:	Tüm partilerin “Canlılık/Ölüm test sonuçları”.....	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1:	Sterilizasyon yöntemleri.....	8
Şekil 3-1:	Biyolojik indikatör hazırlama işlem basamakları	32
Şekil 3-2:	Fraksiyon Negatif Yöntemi otoklav öncesi ve sonrası örnek uygulaması	34
Şekil 4-1:	<i>G. stearothermophilus</i> 'un API 20E identifikasyon test kitinde Reaksiyonu.....	42
Şekil 4-2:	<i>G. stearothermophilus</i> 'un API 50 CHB identifikasyon test kitinde reaksiyonu	42
Şekil 4-3:	% 1 AgaroZ Jel görüntüsü.....	43
Şekil 4-4:	Full Sekans dizileme sonucu	43
Şekil 4-5:	Blast Çıktı özetleri	44
Şekil 4-6:	<i>G. stearothermophilus</i> 'un diğer türlerle dizi benzerliği.....	45
Şekil 4-7:	Canlılık/Ölüm test uygulaması.....	56

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AAIM: Medikal Enstrümantasyon İlerleme Derneği

ANSI: Ulusal Amerikan Standartlar Enstitüsü

USP: Amerikan Farmakopisi

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

ISO: Uluslararası Standartlar Örgütü

kob: Koloni oluşturan birim

”D Değeri”: Desimal İndirgeme Süresi

”Z Değeri”: Isıl işlemden D değerinde 1 logaritma birimi değişiklik için sıcaklıkta ne kadar değişme olması gerektiğini gösteren değer.

Kcal: Kilokalori

DAS: Dezenfeksiyon Antisepsi Sterilizasyon

ETS: Elektronik Test sistemi

BİER: Biyolojik İndikatör Resistometre

HSKP: The Holcomb-Spearman Karber

LHSKP: Limited-Holcomb-Spearman Karber

R²: Belirtme Katsayısı

EMS: En muhtemel Sayı

ETS: Elektronik Test Sistemi

DPCD: Dijital Proses Provokasyon Aleti

ÖZET

ÖNCÜ, N.A. (2018). Yeni geliştirilen doğal kaynaklı bir sterilizasyon biyolojik indikatörünün geçerli kılma çalışmasının yapılması ve performansının ticari kitlerle karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21046

Çalışmada, doğal jeotermal kaynaklardan izole edilen *Geobacillus stearothermophilus* izolatu kullanılarak biyolojik indikatör geliştirme çalışmaları yapıldı. Bu amaçla çalışmada kullanılacak *Geobacillus stearothermophilus*'nin izolasyon ve identifikasyonunu gerçekleştirildi, izole edilen bakterinin stok suşları hazırlanarak spor üretimi gerçekleştirildi. Daha sonra biyolojik indikatör test örnekleri hazırlanıp ısı direnç performans çalışmaları tamamlanıp, ek olarak geliştirilen biyolojik indikatör sonuçları ile ticari kit arasındaki “D değeri”, “Z değeri” ve Canlılık/ölüm çalışması uyumu değerlendirildi.

Üretmiş olduğumuz biyolojik indikatörlere ait üç ayrı parti için (Parti No: I, II, III) $D_{121}^{\circ C}$ değeri sırasıyla 2,35, 2,07 ve 3,60 dakika olarak tespit edildi; FDA ve ISO 11138-2 2017 standartlarına göre *G. stearothermophilus* içeren buharlı ısı biyolojik indikatörler için belirlenen $D_{121}^{\circ C} \geq 1,5$ dakikanın üzerinde olduğu için kabul edilen değerlerde bulundu. Çalışmada üretilmiş olan üç ayrı parti biyolojik indikatörün (Parti No: I, II, III), “Z değeri”leri sırasıyla 5,98; 6,01; 7,91 olarak belirlendi. Değerler standartlarda istenen “Z değeri” ile uyumlu bulundu ($\geq 6^{\circ C}$). Elde edilen bulgular doğrultusunda ticari kitle karşılaştırıldığında, üretilen biyolojik indikatörlerin benzer sonuçlara sahip olduğu ve kullanılabilirliği ispatlandı.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik indikatör, *Geobacillus stearothermophilus*, Buharlı sterilizasyon, spor.

ABSTRACT

ÖNCÜ, N.A. (2018). A newly developed natural-source biological indicator is validated for use steam sterilization cycles and the performance is compared with commercial kits. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies. Besin Hijyeni ve Teknolojisi ABD. Phd Thesis. İstanbul

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 21046

The aim of this study; is to investigate and validate new developed biological indicator containing the thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus* which was originally identified and characterized from various hot springs in Turkey. Additionally the performance of this biological indicator will be compared with commercial imported kits. In accordance with this purpose; initially, the bacteria were isolated, then reproduction of stock cultures and spore production of the bacteria were performed. Then by biological indicator test samples were prepared, heat resistance performance studies were completed. In addition, the compliance between the results of the biological indicator and the commercial kit was evaluated.

In our study, the $D_{121.^\circ\text{C}}$ values for three batches (Batch no: I, II, III) ranged from as 2,35, 2,07 and 3,60 min respectively. For steam sterilization biological indicator, a minimum $D_{121^\circ\text{C}}$ value of 1,5 min is recommended by FDA and ISO 11138-2 2017 and our experimental data indicated that the three “D values” are acceptable according to these standards. It is also stated that the calculated “Z values” should be $\geq 6^\circ\text{C}$. Z values for three batches (Batch no: I, II, III) ranged from as 5,98; 6,01; and 7,91 min respectively. These values are also accepted values according to these standards. As a result, the results of our study have shown that the performance of our batch results is comparable to that of commercial imported kits.

Key Words: Biological indicator, *Geobacillus stearothermophilus*, Moist heat Sterilization, spore.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sterilizasyon, dirençli bakteri sporları da dahil olmak üzere mikroorganizmaların tüm canlı formlarının ortadan kaldırılması işlemi olarak tanımlanır. Pratikte ise, kabul edilebilir “sterilite güvence düzeyini” (SGD/SAL) sağlayacak ölçüde ortamın mikroorganizmalardan arındırılması şeklinde ifade edilmektedir (Boyd ve Hoeri 1995). Sterilizasyon işlemi hangi yöntemle yapılırsa yapılsın, uygulanan sterilizasyon işleminin gerçekten etkin olup olmadığının kontrolünün yapılması gereklidir. Sterilizasyon kontrolü, her sterilizasyon çevriminde, geçerliliği test etmek amacıyla kimyasal ve biyolojik indikatörler kullanılarak yapılır. İndikatörler sterilizasyon çevriminde elde edilmek istenen koşulların sağlanmış olduğunu belirlemeye yarar (Özinel 2002).

Biyolojik indikatörler sterilizasyon çevriminde elde edilmek istenen koşulların sağlanmış olduğunu belirlemeye yarar, malzemenin steril olduğunu kanıtlamaya yardımcı olur. Buharlı sterilizatörler için biyolojik indikatörler hazırlanırken ısıya karşı dayanıklı olarak bilinen bakteri sporları kullanılır. Özellikle sağlık hizmetlerinde önemli konulardan biri olan, steril ürünlerin üretimindeki performansın kontrolünün sağlanması amacıyla biyolojik indikatörlerin kullanımı çok eski yıllara dayanmaktadır.

Hastane infeksiyonlarının kontrol altına alınmasında alet ve malzemelerin standartlara uygun steril edilmesi ve işlem basamaklarının doğru yapıldığından emin olunması önemli rol oynamaktadır. Amerika Birleşik Devleti'nin yayınladığı rapora göre hastane kaynaklı yılda iki milyon infeksiyon görülmekte ve bu durum yılda 4,5 milyar dolar ek maliyete neden olmaktadır (Jarvis 2007).

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sterilizasyonun amacı; besiyerleri, diğer içerikler, cam/plastik malzemeler, su, pamuk vb. materyallerden gelebilecek mikroorganizmaların tümünü öldürmektir. Etkin bir sterilizasyon sağlanmazsa ise çalışmalarda yalancı pozitif sonuçlar alınabilir. Bu nedenle besiyeri içerisinde bulunabilecek tüm mikroorganizmaları öldürecek fakat besiyerine de en az zarar verecek bir ısı işlem normunun seçilmesi gereklidir. Genellikle mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan sıcaklık 121 °C'de 15-20 dakikadır (Halkman 2005).

Bunun yanı sıra gıda sanayinde de sterilizasyon, dezenfeksiyon ve yeni dekontaminasyon tekniklerinin etkinliğinin belirlenmesinde biyolojik indikatörler

yaygın olarak kullanılmaktadır. Konserve gıda sanayinde gıda kalitelerinin korunabilmesi ve besin değerlerinin kayıplarının minumuna indirilmesi için farklı sıcaklıklarda ve sürelerde sterilizasyon işlemleri yapılmaktadır. Mikroorganizmaların ısıya karşı dirençlerinde; vejetatif hücre veya spor durumunda olmaları, mikroorganizma yükleri, ortamın pH değeri ve bileşimi gibi bir çok faktörün etkisi bulunmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan *Geobacillus stearothermophilus* bakterisinin doğal ortamından izolasyonu için, rastlanma olasılığı daha yüksek olan jeotermal alanlardan örnekleme yapılmıştır. Bunun için, Türkiye'nin farklı jeotermal tesislerinden su ve çamur örnekleri toplanarak termofilik bakteri izolasyonuna tabi tutulmuş ve izolatlar morfolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Toplam 16 jeotermal örnekten 18 adet izolat elde edilmiş ve tanımlamaları sonucunda içlerinden Armutluk'dan alınan çamur örneğinde *G. stearothermophilus* varlığı belirlenmiştir. Daha sonra izole edilen bu *G. stearothermophilus* izolatı kullanılarak biyolojik indikatör geliştirilme çalışmaları yapılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada bu izolat ile üretilen sterilizasyon indikatörünün geçerli kılma çalışmaları yapılmıştır.

Günümüzde, sterilizasyon etkinliğinde kullanılan biyolojik indiktörlerin ülkemizde üretimi olmayıp yurtdışından ithal edilmektedirler. Bu çalışma ile, ülkemizde yurtdışından ithal edilen ve ticarileşme kapasitesi yüksek bir ürün olan biyoindikatörlerin üretilmesi ile yurtdışı bağımlılığının azaltılması ve ülkemiz için katma değer yaratılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Termofilik Bakteriler

Termofilik bakteriler; pek çok canlı grubunun yaşayabilmesinin imkânsız olduğu sıcaklıklarda bile yaşamlarını sürdürebilmeleri nedeniyle yoğun ilgi duyulan araştırma alanlarından biri olmuştur (Baker ve ark. 2001).

Termofil bakteriler genellikle sıcak su kaynakları ve jeotermal alanlardan izole edilirler. Termofil olmalarına rağmen mezofil çevrelerde de bulunabilirler. Bu çevrelerin yanı sıra topraktan, gübreden, lağım arıtma sistemlerinden, nehir ve göllerden, hava kontaminantlarından ve konservelelerden de izole edilebilirler (Kristjansson 1991).

Dünya’da ve Türkiye’de yapılan çalışmalar, termofilik bakteri izolasyonunun daha çok sıcak su kaynakları gibi çeşitli jeotermal alanlardan yapıldığını göstermektedir. Termofil bakteriler yüksek sıcaklıklarda büyüyen organizmalar olup gelişme sıcaklıklarına göre termofiller 35-70 °C, ekstrem termofiller 55-85 °C, hipertermofiller 75-113 °C olmak üzere üç farklı grupta değerlendirilmektedir (Baker ve ark. 2001; Nazina ve ark. 2001).

Aynı zamanda yapılan bir başka çalışmada, Kuzey İrlanda’da Eyjafjördur bölgesindeki deniz tabanında bulunan büyük deniz dibi sıcak su konik kaynaklarından elde edilen izolatların fizyolojik özelliklerinin tamamıyla kaynak suyu habitatının indikatörü olduğu saptanmış olan bu canlıların yeraltından taşınabileceğinin mümkün olduğu bildirilmiştir (Marteinsson ve ark. 1999). Jeotermal kaynaklar açısından oldukça zengin olan ülkemizde resmi kayıtlara alınmış 140 adet jeotermal saha bulunmaktadır. Ülkemiz termal kaynaklar bakımından oldukça zengin olmasına rağmen, bu kaynakların mikrobiyal özellikleri ve biyoteknolojik öneme sahip termofilik mikroorganizma profilleri açısından çok az çalışma bulunmaktadır. Oysaki termal kaynakların mikrobiyal özelliklerinin ortaya konması ve termofil bakterilerin özelliklerinin incelenmesi endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır (Akkaya ve Kıvanç 2008).

2.1.1. *Geobacillus stearothermophilus* ve genel özellikleri

G. stearothermophilus kalın bir hücre duvarı ve iç hücre zarı ile karakterize olan çubuk şeklinde gram pozitif bir bakteridir. Sıcak su kaynaklarında, okyanus diplerinde ve toprak gibi alanlarda yaygın olarak bulunan *G. stearothermophilus* endospor oluşturabilen, yüksek dirençli ve optimal olarak 55°C ve 65°C'de üreme gösteren termofilik bir bakteridir (Nazina ve ark.2001).

G. stearothermophilus'un en önemli özellikleri, anaerobik koşullarda gelişmesi, nişasta ve jelatini hidrolizlemesi, sitratı kullanamaması ve % 3 NaCl'a tolerans gösterebilmesidir. *G. stearothermophilus*'un biyokimyasal özellikleri Tablo 2-1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir (Akkaya ve Kıvanç 2008).

2001 yılında, Nazina ve arkadaşları, 16S RNA gen sekanslama analizi yaparak yeni 6 adet *Geobacillus* türü (*B.stearothermophilus*, *B.thermodenitrificans*, *B.thermoglucoasidius*, *B.thermoleovorans*, *B.kaustophilus* ve *B.thermocatenulatus*) ortaya koymuşlardır (Nazina ve ark. 2001). *Geobacillus* bakterisi suşları 50°C veya 60°C sıcaklıkta genellikle Trypticase Soy Agar (TSA) besiyerinde 18-24 saat inkübe edilerek gelişebilir. Katı besiyerine 5 mg $MnSO_4^{-1}$ eklenmesi, sporlanmanın desteklenmesini sağlar (Coorevits ve ark. 2012). Bakterinin spor özütü (10-25% su içeren) sıcaklığa ve kimyasallara karşı çok dirençlidir (Zhang ve ark. 2006). Sporum dış kısmı gevşek çapraz şekilde peptidoglikandan oluşmuştur ve bu özellik su tutmayı engeller ve kimyasallara karşı geçişim engeli oluşturur (Örneğin: lizozom) (Zhang ve ark.2006)

2.1.2. İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri

Termofilik olan bakterinin izolasyonu LB (Luria Bertani) Agar (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% maya ekstraktı, %1,5 agar) içeren petrilerde yapılır. Örneğin 100 mikrolitresi besiyeri üzerine dökülür ve 60° C'de inkübasyona bırakılır; aynı özellikteki örnek LB besiyeri içeren şişelere inököle edilerek geniş kapsamları termofiller izole edilebilir (Geldreich ve ark. 1958; Narayan ve ark. 2008).

Morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyon için, gram boyama, koloni morfolojisi, hareketlilik testi, oksidasyon fermentasyon testleri ve QTS-20 Testleri kullanılır (Wiegel ve Ljungdahl 1981).

Moleküler karakterizasyon için, DNA izolasyonunda Kronstad ve ark.'nın uyguladığı protokol kullanılır (Kronstad ve ark.1983). 16S rDNA, 9F ve 1510R üniversal primerleri sekanslama ile PCR kullanılarak gerçekleştirilir (Thompson ve ark.1994).

2.2. Sterilizasyon

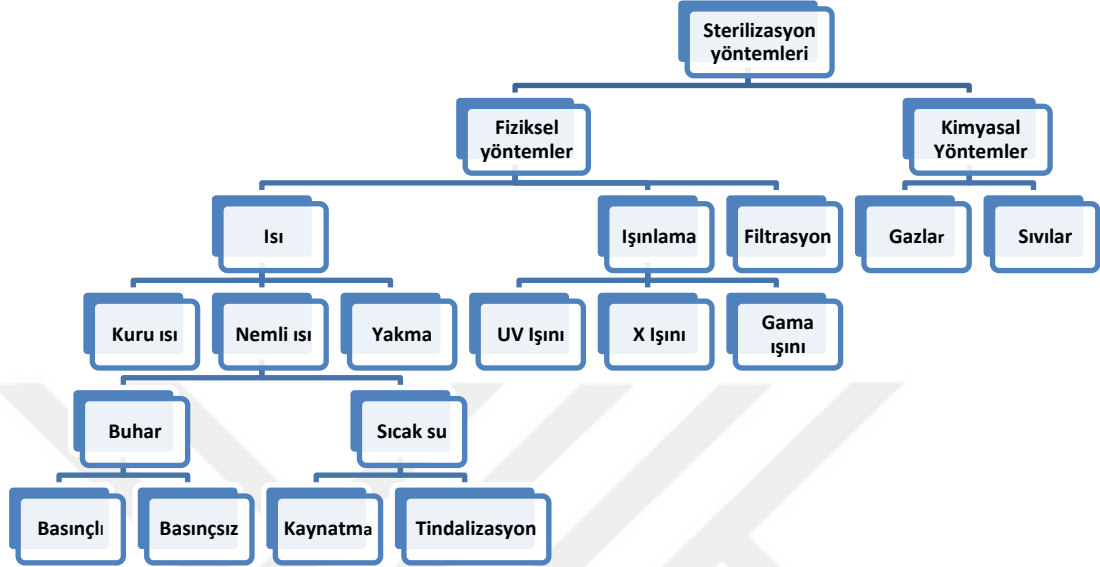
Mikroorganizmalar tüm canlılar gibi uygun ortam bulduklarında beslenerek çoğalır. Sterilizasyon ise, tüm bu yaşayan mikroorganizmaların uzaklaştırılması veya yok edilmesi için kullanılan bir terimdir. AAIM (Association for Advancement of Medical Instrumentation) tarafından sterilizasyon, “kabul edilebilir sterilite güvence düzeyini sağlayacak ölçüde ortamın mikroorganizmalardan arındırılması” olarak tanımlanmıştır (Günaydın ve ark. 2008). Benzer olarak, yaygın kullanımı ile sterilizasyon; herhangi bir maddenin veya cismin üzerinde bulunan, sporların da dahil olmak üzere tüm mikroorganizmaların yok edilmesi işlemidir (Arıkan 1997). Bunun için fiziksel (ısı, radyasyon, filtrasyon) veya kimyasal (gaz, plazma veya sıvı kimyasal) yöntemler kullanılır. Sterilizasyon için hedef, işlem sonrasında tek bir canlı mikroorganizma kalma olasılığının $\leq 10^{-6}$ olmasıdır (DAS 2008). Diğer bir ifadeyle sterilizasyonun sağlanamama olasılığının bir milyon işlemde birden daha düşük olmalıdır. Bu beklenti “Sterilite Güvence Düzeyi” (SGD) olarak tanımlanır (Günaydın ve ark. 2008).

Dezenfeksiyon ise, patojen mikroorganizmaları tamamen veya kısmen elimine ederek hastalık yapmayacak bir düzeye indirme işlemleridir. Dezenfeksiyonun etkinliği genel olarak sporsuz mikroorganizmaları kapsar. Dezenfeksiyon, ortamdaki mevcut mikroorganizma popülasyonundaki azalmadan, sterilizasyona kadar değişebilen bir aktivite gösterebilir. Ancak sterilizasyonda olduğu gibi tam bir standardizasyon ve rutin işlem kontrolleri söz konusu değildir (Samastı 2007).

2.2.1. Sterilizasyon Yöntemleri

Sterilizasyon yöntemleri temel olarak fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır (Remington ve Gennaro 2000). Sterilizasyon yöntemleri Şekil 2-1’de ayrıntılandırılmıştır.

Şekil 2-1: Sterilizasyon Yöntemleri



2.2.1.1. Fiziksel Yöntemlerle Sterilizasyon

Fiziksel yöntemler yüksek ve düşük sıcaklık uygulamaları, kurutma, ışınlama, osmotik değişiklikler, sonik-ultrasonik titreşimler, elektrik akımı, yüksek basınç ve filtrasyon yöntemleri olarak sıralanabilir. Fiziksel sterilizasyon yöntemleri sıcaklığın uygulandığı sterilizasyon yöntemleri ve sıcaklığın uygulanmadığı sterilizasyon yöntemleri olarakta iki bölümde incelenmektedir.

Sıcaklığın uygulandığı sterilizasyon yöntemleri

- Kuru ısı sterilizasyon
- Doymun su buharı (saturated steam) ile sterilizasyon (nemli ısı sterilizasyonu)
- Yakma

Sıcaklığın uygulanmadığı sterilizasyon yöntemleri

- UV ışını ile sterilizasyon
- İyonize radyasyon ile sterilizasyon
- Filtrasyon (Süzme) ile sterilizasyon

Ancak, kolay, güvenilir ve toksik olmayan bir yöntem olmasından dolayı en çok kullanılan fiziksel yöntem ısıdır. Isı, mikroorganizmaların enzim ve yapı proteinlerini

geridönüşümsüz olarak koagüle ve denatüre eder. Isı ile sterilizasyonda en sık kullanılan basınç altında nemli ısı ile yapılandır. Nemli ısının, kuru ısıya oranla mikroorganizmalar üzerine daha fazla öldürücü etkiye sahip olduğu Robert KOCH döneminden beri bilinmektedir. Yüksek sıcaklıktaki her tür ısıl işlem mikroorganizmaları öldürür. Ancak, nemli ve kuru sıcak uygulaması arasındaki fark, ısı enerjisinin iletimidir. Proteinler, kuru ortamda ısıya daha fazla direnç gösterirler. Kuru ısı uygulaması ile hücreler daha ziyade oksidasyon işlemi sonunda ölürken, nemli ısı uygulamasında proteinlerin yapısal değişimi söz konusudur (Halkman 2005).

2.2.1.1.1. Kuru ısı sterilizasyonu

Kuru ısı hem mikroorganizmaların hem de mikroorganizmaların metabolik atıklarının kimyasal olarak parçalanması esasına dayanır. Bu yöntemle metabolik atıklar yok edildiğinde aynı zamanda sterilizasyon işlemi de sağlanmış olur. Nemli ısı ile sterilizasyonda ise metabolik atıkların parçalanmasını sağlanamaz. Kuru ısı sterilizasyonu için F değeri, D değeri ve Z değeri, nemli ısı ile yapılan sterilizasyondan farklıdır.

Kuru ısı sterilizasyonu için gerekli olan yüksek sıcaklıklarda çoğu maddenin yapısında değişiklikler meydana gelir (Remington ve Gennaro 2000). Mesela selülozdan yapılmış malzemeler kömürleşmeye başlar, kauçuk oksitlenir ve termoplastikler erir. Bu nedenle kuru ısı sterilizasyonu ancak, cam veya metal malzemeler, yüksek sıcaklıkta bozulmayan ve su içermeyen yağlar veya kimyasal maddeler için uygun bir sterilizasyon yöntemidir (Lachman ve ark. 1986).

2.2.1.1.2. Buhar ile sterilizasyon

Temel prensip doymuş ve basınç altındaki su buharında 100 °C'nin üzerinde yapılan sterilizasyondur. Sıcak buhar kullanılarak yapılan sterilizasyonda mikroorganizma hücresindeki enzim ve nükleik asitler hidroliz olmaktadır. Daha büyük bir ısı enerjisine sahip olan buharın öldürücü etkisi; yoğunlaşma sırasında buharlaşma ısısını yoğunlaştığı yüzeye aktarmasından kaynaklanmaktadır (Hugo ve ark. 1982). Buhar ile yapılan sterilizasyon; düşük maliyetli, güvenilir ve değişikliklere izin verebilen aynı zamanda da ısı enerjisini daha iyi iletmediği için etkili bir sterilizasyon yöntemidir (Remington ve Gennaro 2000).

Buhar ile sterilizasyon amacıyla otoklav denilen araçlar kullanılır. Bu araçlarda, nem, ısı derecesi, uygulama süresi ve basınç kontrolü ile sterilizasyon işlemi yapılır. Otoklav sıcaklığı °C veya °F, otoklav basıncı ise kg/cm² veya psi (pound square inch = pound/inch²) ile gösterilir. Basınç deyimi ile manometrede okunan değer anlaşılmaktadır. Bu değerlere normal atmosfer basıncının ilavesi ile mutlak (absolüt) basınç değerleri bulunur. Normal atmosfer basıncı, 1 kg/cm²=14,7 psi'dir. Tablo 2-2'de çeşitli sıcaklık dereceleri için otoklav basınçları verilmiştir (Karadağ 2005)

Tablo 2-2: Basınç sıcaklık ilişkisi

Sıcaklık		Basınç	
C°	F°	Psi	Kg/cm ²
100	212	0,0	0,00
105	221	2,8	0,19
110	230	6,0	0,41
115	239	9,8	0,67
121	250	15,0	1,02
125	257	19,0	1,29
130	266	24,5	1,67
134	273	29,4	2,00

Otoklav sterilizasyonunda cam, kauçuk, sıcaklık ve basınca dayanıklı plastik malzemeler, filtreler, cerrahide kullanılan aletler, kumaş vb. materyaller kullanılır. Bir sterilizasyon döngüsü (sterilisation cycle time) malzemenin ilgili sterilizasyon sıcaklığına gelmesi için geçen zamanı (gecikme süresi), bu sıcaklıkta bekleme süresini (sterilizasyon süresi) ve malzemenin oda sıcaklığına gelmesi için geçen zamanı (soğuma süresi) içermektedir (Tırnaksız 2009). Sterilizasyon sonrası malzemeler ıslak olduğu için tümüyle kuru malzeme gerekiyor ise, vakumlu etüvler bu amaç için kullanılabilir. Otoklavda en yüksek verimi elde edebilmek için, hiç su damlacığı içermeyen kuru buharın kullanılması gerekir. Bu buhara “doygun buhar”denir. Eğer buhar az da olsa su damlası içeriyor ise sterilizasyonun etkinliği azalır (Hanlon ve ark. 1988). 121 °C’de doygun su buharı bazı önemli özelliklere sahiptir. Bunlardan birincisi, su buharının yoğunlaşmasıyla sahip olduğu enerjinin açığa çıkmasıdır. İkinci önemli özellik ise basıncın ve sıcaklığın birbirine bağlı değerler olmasıdır. Belli sıcaklıktaki

doğru buharın basıncı sabittir. Bundan dolayı, otoklav sterilizasyonu sırasında sadece sıcaklığının veya basıncının kontrol edilmesi yeterli olacaktır (Remington ve Gennaro 2000).

Su buharı ile 121 °C’de sterilizasyon yapılırken, buharın mikroorganizma ile teması şarttır. Buharın mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etkisi; cerrahi malzemelerde doğrudan, kapalı sulu çözeltilerde ise dolaylı yolla gerçekleşir. Cam şişedeki sulu çözeltinin sterilizasyonu sırasında, şişe içindeki basınç otoklav odasındaki basınçtan biraz daha fazla olur. Bunun nedeni, otoklav içindeki havanın çekilmiş olması; buna karşılık şişe içindeki havanın uzaklaştırılamamasıdır. Bundan dolayı Otoklav sterilizasyonunda kullanılan cam malzemeler basınçta dayanıklı olmalıdır. (Remington ve Gennaro 2000).

Otoklav sterilizasyonunda, otoklav içinde var olan veya buharla beraber oda içine giren havayı oluşturan gazların moleküler ağırlıkları dolayısıyla dansiteleri su buharından yaklaşık 1,5-2 kat fazladır (aynı sıcaklık ve basınçta). Bu nedenle, otoklav odasına gönderilen buhar oda içindeki havayı odanın alt kısmına iter ve hava buhar ile karışmadan bu bölgede tabakalaşmaya neden olur. Buradaki hava en fazla buharın sıcaklığına kadar ısınabilir. Buhar bu bölgedeki yüzeylerle temas edemediği için sterilizasyon gerçekleşemez. Otoklav sterilizasyonu süresi içinde buharla temas etmeyen yüzeylerin sterilizasyonu, 121 °C’de yeterince uzun süre kalamadıkları için sağlanamaz. Bu sorunu ortadan kaldırmak için sterilizasyon öncesi otoklav odasının havası vakum uygulanarak çekilir. Ayrıca malzemeler, aralarındaki havanın kolayca çıkabilmesine ve buharın bu bölgeleri doldurabilmesine olanak verecek şekilde yerleştirilir. Uygulanan vakumla oda içindeki havanın %90 kadarı boşaltılabilmektedir (Lachman ve ark.1986; Remington ve Gennaro 2000). Sterilizasyon sonrası aşama, sterilizasyon odasının basıncının normal basınca indirilmesi, yani sıcaklığın normale düşürülmesi aşamasıdır. Sterilizasyon işleminin toplam süresinin azaltılması için, soğuma aşamasının mümkün olan en kısa sürede tamamlanması gerekir. Ayrıca sterilizasyon işlemi sonrası malzemelerin sıcak ortamda bekletilmesi istenir. Bu amaçla sterilize edilmiş malzemenin cinsine bağlı olarak değişik uygulamalar yapılmaktadır. Oldukça uzun bir zaman almasına rağmen, otoklav sterilizasyonu sonucunda sterilizasyon odasındaki sıcaklığın kendi kendine azalması beklenmektedir. Sıcaklık azaldıkça oda içindeki su buharı yoğunlaşacak ve yüksek olan basınçta azalacaktır. Sıcaklık sürekli olarak azalacağından, yoğunlaşma işlemi de devam

edecektir. Oda içindeki basınç 1 bar'a indiğinde otoklav kapağı açılarak malzeme dışarı alınabilir.

Buhar sterilizasyonu tıbbi malzeme sterilizasyonu, atık sterilizasyonu, gıda endüstrisi, mikrobiyoloji laboratuvarları ve steril ürün üretimi gibi çok çeşitli proseslerde kullanılabilir.

Sağlık sektöründe kullanılan basınçlı buhar sterilizasyon yönteminde, doymuş buhar, ısı derecesi, süresi ve basınç olmak üzere dört faktör sterilizasyon işlemini etkiler. Buhar sterilizasyon uygulama sıcaklık dereceleri ve süreleri aşağıda belirtilmiştir (DAS 2008).

- 134 °C 3-3,5 dakika (onvakumlu otoklavlarda)
- 121 °C 15 dakika (onvakumlu otoklavlarda)
- 121 °C 30-45 dakika (vakumsuz otoklavlarda)

Gıda endüstrisindeki kullanımı ise konserve gıda sanayinde ürün kalitesinin korunabilmesi ve besin değerlerinin kayıplarının minumuna indirilmesi için farklı sıcaklıklarda ve sürelerde sterilizasyon işlemleri yapılmaktadır. Mikroorganizmaların ısıya karşı dirençlerinde; vejetatif hücre veya spor durumunda olmaları, mikroorganizma yükleri, ortamın pH değeri ve bileşimi gibi birçok faktörün etkisi bulunmaktadır.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sterilizasyonun amacı; besiyerleri, diğer içerikler, cam/plastik malzemeler, su, pamuk vb. materyallerden gelebilecek mikroorganizmaların tümünü öldürmektir ve bu amaçla birçok alanda uygulanmaktadır.

2.2.1.1.3. Radyasyon (Işınlama) ile Sterilizasyon

Mikroorganizmalar üzerine etkili, iyonize ve iyonize olmayan olmak üzere iki tip radyasyon vardır. İyonize radyasyon (<1 nm dalga boyu); yüksek enerjili elektronlar (e-demeti), gama ışınları ve x-ışınları olup UV ışınları (240- 280 nm) iyonize olamayan radyasyon türüdür (DAS 2008).

UV ışınlarından, büyük dalga boyu ve düşük enerji seviyesine sahip olduklarından dolayı daha çok dezenfeksiyon amaçlı, iyonize ışıklardan ise daha çok sterilizasyon amacıyla kullanılmaktadır. (DAS 2008).

Gama ışınları; yüksek penetrasyon özellikleri nedeniyle sterilizasyonda kullanımı daha yaygındır ve bu özelliğinden dolayı paketli son ürünlerin sterilizasyonuna olanak vermektedir. Ayrıca buharla sterilizasyon gibi konvansiyonel tekniklerle

steril edilemeyen ısıya hassas ürünler üzerinde rahatlıkla uygulanabilen hızlı, etkin ve güvenilir bir yöntemdir (DAS 2008).

2.2.1.1.4. Filtrasyon (Süzme) ile Sterilizasyon

Sıvı içinde süspansiyon halinde bulunan katı parçacıkların (mikroorganizma hücreleri gibi) uygun büyüklükteki bir filtreden süzülmesi ile yapılan ayırma işlemidir. Genellikle mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaktadır (Günaydın ve Gürler 2008). Bu filtrelerin gözenek çapları yapılarına göre farklılık gösterir. Bunlardan en çok kullanılanlar membran filtreler olup 0,005 mikrondan 1 mikrona kadar gözenek (por) çapları olabilmektedir. Bakterileri süzmek için 0,2 mikron por büyüklüğü yeterli olmaktadır. Filtreler yalnızca por büyüklüğüne göre mekanik olarak değil aynı zamanda elektrostatik adsorpsiyon mekanizmasıyla daha küçük partikülleri bile yüzeyinde tutabilmektedir. Süzme için negatif veya pozitif basınçtan yararlanır. Por büyüklüğünden daha büyük mikroorganizmalar için filtrasyon bu sıvıların steril olmasını sağlar (Samastı 2007)

2.2.1.2. Kimyasal Yöntemlerle Sterilizasyon

Kimyasal maddeler, mikroorganizmalar üzerinde proteinlerini pıhtılaştırarak, hücre zarlarını bozarak ve nükleik asitlerini tahrip ederek etki gösterirler. Kimyasal yöntemlerle sterilizasyon gazlarla ve sıvılarla sterilizasyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2-1) (Remington ve Gennaro 2000).

2.2.1.2.1. Kimyasal Gazlarla Sterilizasyon

Kimyasal gazlarla sterilizasyon daha çok ısıya duyarlı malzemelerin sterilizasyonunda fiziksel yöntemlere alternatif olarak kullanılmaktadır.

Etilen oksit (EO) gazı kullanılarak yapılan sterilizasyon birçok mikroorganizma grubunda hatta sporlarda bile etkili fakat oldukça zehirli bir gazdır. EO ile sterilizasyon işlemi ve havalandırma süresi uzun ve dolayısıyla maliyeti de yüksek bir yöntemdir. EO etki mekanizması bakteri proteinini alkilleyici özelliğinden kaynaklanmaktadır. EO molekülünün mikroorganizma hücresi içindeki önemli moleküllere rahatlıkla ulaşabilmesi, ortamda yeterli düzeyde suyun bulunmasına bağlıdır (Hugo ve ark. 1982).

Hidrojen peroksit (H_2O_2) oda sıcaklığında sıvı olup buharlaştırıldığında, değişik aletler ve ambalaj malzemeleri için etkili bir yüzey sterilizasyon maddesi olarak

kullanılır. Dondurarak kurutma ve değişik doldurma sistemleri gibi çok karmaşık aletlerin sterilizasyonunun yanı sıra temiz oda oluşturmak için de kullanılmaktadır. Bu sterilizasyon işleminde gazın, sterilize edilecek yüzeyin her tarafına temas etmesi sağlanmalıdır (Remington ve Gennaro 2000).

2.2.1.2.2. Kimyasal Sıvılarla Sterilizasyon

Kimyasal sıvılarla sterilizasyonda; sporisit aktivitesi olan kimyasal çözeltiler (% 7,5 hidrojen peroksit, % 2 glutaraldehit, % 0,2-0,3 perasetik asit, % 0,55 ortofitalaldehit, klordioksit v.b.) kullanılarak, ısıya duyarlı aletlerin dezenfeksiyonu için gereken süreden daha uzun sürede sterilize edilebilirler. Ancak sterilizasyon işleminden sonra kimyasal artıkların steril su ile arındırılması ve bekletilmeden kullanılması gerekir (Günaydın 2009).

2.2.2. Sterilizasyon Doğrulama Yöntemleri /Monitorizasyonu

Sterilizasyon monitörizasyonu, sterilizasyon işlemin her bir aşamasının doğru yapıldığından emin olmak için yapılan faaliyettir. Her bir basamağın test edildiğine dair elimizde kanıt bulunmasına yardımcı olur. Etkin sterilizasyon işleminin yapıldığının kanıtı olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik testlerin kullanılması ve dokümanite edilmesi gerekir. Sterilizasyon etkinliğinde kullanılan yöntemler; fiziksel, kimyasal ve biyolojik kontrol yöntemleri olmak üzere üç grupta toplanır.

2.2.2.1. Fiziksel kontrol yöntemleri

Fiziksel kontrol yöntemleri; cihaz üzerindeki program döngüsü izleyicileri, sıcaklık ve basınç ölçme cihazları, nem ölçerler vb.dir. Cihaz üzerindeki göstergeler kontrol edilerek, elektronik ve mekanik sensörlerden gelen veriler değerlendirilerek, cihaz yazıcı çıktıları kontrol edilerek süreç izlenir ve dökümanite edilir. Cihazlar zamanla duyarlılığını yitireceğinden ve yaşlanacağından sürekli kalibre edilmeleri gerekir (Günaydın 2009). Fiziksel kontrol yöntemleri örnekleri aşağıda belirtilmiştir:

Elektronik kontrol cihazları: Buhar penetrasyonu (Bowie-Dick), vakum kaçağı, hava kalıntısı ile sıcaklık, zaman ve basınç parametrelerini test edebilen Electronic Test System (ETS) ve sterilizasyon döngüsü sırasındaki sıcaklık, basınç, doymuş buhar gibi fiziksel parametreleri kaydeder (ETS kullanılıyorsa sınıf II Bowie-Dick test paketi kullanmaya gerek yoktur) (DAS 2008). Ayrıca kullanımda mevcut Digital Process Challenge Device (DPCD) ile buhar sterilizasyon çevriminin fiziksel koşullarını

elektronik olarak test etmek mümkündür. Bu tür sistemlerde fiziksel şartların zamana göre değişimini bilgisayar ortamında değerlendirmek ve hataların kaynağını tespit etmek mümkündür (Günaydın ve Gürler 2008).

2.2.2.2. Kimyasal kontrol yöntemleri

Kimyasal indikatörler, belli koşullarda renk değişimi gösteren veya katı fazdan sıvı faza geçerek sterilizasyon işlemi hakkında bilgi veren göstergelerdir ve bir veya birçok sterilizasyon işlem parametresine cevap olarak kullanılır (Karadağ 2005). Kimyasal indikatörlerin kullanım amacı yanlış ambalajlama, sterilizatörün yanlış yüklenmesi ve otoklav arızalarından kaynaklanabilecek muhtemel sterilizasyon hatalarının belirlenmesidir (Günaydın 2009). Mikrobiyolojik sterilitenin göstergesi için bir kimyasal indikatör tek başına yeterli olmayıp biyoindikatör kullanımı ile desteklenmelidir (DAS 2008).

Renk değişimi gösteren kimyasal indikatörler kullanılarak (otoklav bandı vb.) paketin sterilizasyon etkinliği kabaca anlaşılır. Genel olarak kimyasal indikatörler ISO ve EN standartlarınca taşıdıkları özelliklere göre sınıflandırılmışlardır. EN ISO 11140'a göre indikatörler aşağıda belirtildiği gibi sınıflandırılmışlardır (ISO 11140-1:2014).

1. İşlem indikatörleri
2. Spesifik testlerde kullanılan indikatörler
3. Tek parametrelili indikatörler
4. Çok parametrelili indikatörler
5. Entegratörler
6. Emülsiyon indikatörleri.

Her bir sınıf farklı bir işlemi tanımlar. Sınıf-1 indikatörler işlem indikatörleri olup, paketin işleme maruz kalıp kalmadığını anlamaya yardımcı olur. Bowie-Dick Testi sınıf-2 indikatördür ve vakumlu buhar sterilizatörlerinde doymuş buharın, steril edilmesi planlanan yüke hızlı ve düzgün bir şekilde girip girmediği, sterilizatörün hücredeki havayı çıkarma ve havanın yeniden girmesini önleme kabiliyetini test eder. Sınıf-3 tek parametrelidir, sınıf-4 çok parametrelidir indikatördür. Sınıf-5 entegratör ve sınıf-6 emülsiyon indikatördür (Günaydın ve Gürler 2008). Tablo 2-3'de otoklav sterilizasyonunda kullanılan kimyasal indikatörler verilmiştir.

Tablo 2-3: Otoklavla sterilizasyonda kullanılan kimyasal indikatörler

İndikatörler	Değişim	Sterilizasyon İşlemi
Browne tüpleri	Kırmızıdan yeşile döner	Basınç altında buhar ve kuru sıcaklıkta kullanılır
Steam-clox kağıtları	Mordan yeşile döner	Basınç altında buharda kullanılır.
Diack tüpleri	Erir ve bej renk kırmızıya dönüşür	Basınç altında buharda kullanılır.
Otoklav şeridi	Açık renkten koyuya dönüşür	Basınç altında buharda kullanılır.
Bowie-Dick şeritleri	Açık renkten koyuya dönüşür	Basınç altında buharda kullanılır.

2.2.2.3. Biyolojik kontrol yöntemleri

Biyolojik indikatörler, sterilizasyon işleminde amaçlanan biyolojik ölümün gerçekleşip gerçekleşmediğinin göstermesi bakımından önemlidir. Buharlı sterilizatörler için biyolojik indikatörler hazırlanırken ısıya karşı dayanıklı olarak bilinen bakteri sporları kullanılır (Günaydın ve Gürler 2008). Bu amaçla, basınçlı buhar sterilizasyonu indikatörü olarak kullanılan mikroorganizmalardan biri *G. stearothermophilus*'dur. Her biyoindikatör üzerinde içerdiği mikroorganizmanın tipi, her partideki mikroorganizma yükü ve üretim numarası bulunmalıdır. Spor emdirilmiş kâğıt şeritler, kendinden besiyerli kapalı sistemler ve enzim bazlı biyolojik indikatörler gibi çeşitleri mevcuttur. Bu indikatörler, direkt olarak biyolojik ölümün gerçekleştirildiğini gösterirler. Kullanılan test organizmaları steril edilecek malzemede bulunabilecek

mikroorganizmalardan çok daha dirençli ve fazla sayıda olduğundan bunların inaktivasyonu sterilizasyonun gerçekleştiğinin güçlü bir kanıtıdır (Samastı 2007). Biyolojik indikatör olarak *G. stearothermophilus* (buhar ve formaldehit sterilizasyonunda), *Bacillus subtilis* (atrophaeus) (kuru ısı, etilen oksit, hidrojen peroksit gaz plazma sterilizasyonunda) ve *Bacillus pumilus* (gama ışını ile sterilizasyonda) kullanılmaktadır. Biyolojik indikatörler işlem sonrasında mikrobiyolojik incelemeye alınır. Kapalı kendinden besiyeri içeren test sistemlerinde en fazla 48 saat içinde sonuç alınabilmektedir. Enzim bazlı (spora özgü D-glucosidase enzimini ölçen) biyolojik indikatörler çok daha hızlı (1-3 saatte) sonuç vermektedir. Floresans bir maddenin oluşmasıyla enzimatik aktivite belirlenmektedir. Sporların inaktivasyonuna paralel şekilde enzim aktivitesi de kaybolmaktadır.

Sterilizasyon çevriminin etkinliği için kullanılan bu biyolojik indikatörler medikal malzeme üreticileri, farmasötik üreticileri ve sağlık hizmetlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Canlı mikroorganizma içeren bu biyolojik indikatörler sterilizasyon indikatörleri içerisinde en hassas olanıdır ve sterilizasyon döngüsü ile ilgili en fazla bilgi veren indikatör olduğundan yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, genel olarak kimyasal indikatörler sterilizasyon döngüsü ile ilgili hızlı bir geri dönüş sağlasada, yetersiz sterilizasyon koşullarında biyolojik indikatörler kadar hassas değildir (Joslyn 1991; Greene 1982).

2.3. Biyoindikatörlerin Geçerli Kılınması İçin Şartlar (Standartlar)

Uzun yıllardan beri, biyolojik indikatörlerin son kullanıcılarının bir çoğu, bu ürünleri periyodik olarak “D değeri” ve popülasyon doğrulamasının üçüncü taraf laboratuvarlarda yapılmasını talep etmektedir. Sterilizasyon döngüsünün başlangıç validasyonunda, mikroorganizmanın sterilizasyon döngüsünde ölümünün gerçekleştiğinin göstergesidir. Hedeflenen amaca ulaşmak için, sterilizasyon döngüsünde kullanılan indikatörün ilgili standartlardaki (AAMI, ISO ve USP) gereklilikleri karşılaması gerekir. Örneğin; 121 °C’de yapılan buharlı sterilizasyonda AAMI, ISO ve USP standartlarına göre, kabul edilen “D değeri” minimum 1,5 dakika olmalıdır (ISO 11138-3 2017). Bu amaçla kullanılan standartların başında; Amerikan Farmakopisi (United States Pharmacopoeia) ANSI AAMI ST59 1999 ve ANSI/AAMI

ST19 1999; ISO 11138-1 2017; ISO 11138-3 2017; BS EN 866-7 2000, FDA Notification (510k) 2007; Nyberg 2006 gelmektedir.

Buharlı ısı sterilizasyon biyolojik indikatörler için kullanılan standartların (ISO 11138-3 2017 ve FDA Notification (510k) 2007) Tablo 2-4'de karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Tablo 2-4: Buharlı ısı sterilizasyonu standartları karşılaştırması (ISO 11138-3 2017 & FDA Notification -510(k) 2007)

İçerik	ISO 11138-3 2017	FDA Notification 510- 2007
Kapsam	Buharlı ısı sterilizasyon prosesinin performansının değerlendirilmesinde kullanılan biyolojik indikatörler için gereklilikleri karşılar.	Sağlık hizmetlerinde kullanılan sterilizasyon proseslerinin izlenmesinde kullanılan biyolojik indikatörler için gereklilikleri karşılar.
Test Organizması	Buharlı ısı sterilizasyonunda kullanılan birincil ambalaj ve taşıyıcı ISO 11138-1 2017; 5,2 ve Ek B'ye uygun olması gerekir.	Buharlı ısı sterilizasyonunda kullanılan birincil ambalaj ve taşıyıcı ANSI/AAMI/ISO 11138-1 2017 ve Ek B'ye uygun olması gerekir.
Birincil ambalaj ve taşıyıcı	Buharlı ısı sterilizasyonunda kullanılan birincil ambalaj ve taşıyıcı ISO 11138-1 2017; 5,2 ve Ek B'ye uygun olması gerekir.	Buharlı ısı sterilizasyonunda kullanılan birincil ambalaj ve taşıyıcı ANSI/AAMI/ISO 11138-1 2017 ve Ek B'ye uygun olması gerekir.
Canlı spor popülasyon sayısı	Biyolojik indikatördeki canlı spor popülasyon sayımı olmalıdır.	Canlı spor popülasyon sayımı 10^5 olmalıdır.
Direnç özelliklerinin belirlenmesi	ISO 11138-1 2017, Ek A 'a göre belirlenir. Resistometre cihazı kullanılarak Ek A'ya uygun şekilde belirlenir.	Direnç özelliği resistometre cihazı kullanılarak belirlenir. Eğer resistometre cihazı kullanılmıyorsa; sterilizasyon çevrimi sırasında kritik çevrim parametrelerinin kontrol edilmesi (harici izleme) gerekir.

İçerik	ISO 11138-3 2017	FDA Notification 510- 2007
“D Değeri”	“D değeri” olarak ifade edilen 121 °C’deki dakikalarda ki dirençtir. Üretici tarafından farklı sıcaklık dereceleri seçilebilir. D değeri her bir parti için belirlenir. Geobacillus stearothermophilus sporları içeren biyoindikatörlerin D değeri Ek A ‘ya göre $\geq 1,5$ olmalıdır.	ANSI/AAMI ST 59 veya eşdeğer metotla belirlenir. Temsili “D değeri” maruz kalma sıcaklıklarına (Örneğin; 115 °C, 120 °C, 125 °C, 130 °C) göre belirlenebilir. Bu sıcaklıklarda oluşturulan eğri lineerlik oluşturuyorsa biyolojik indikatörler uygulanan her çevrim sıcaklığı için uygundur.
“D Değeri” hesaplanması kullanılan metot	“D Değeri”nin hesaplanması için ISO 11138-1 2017’de belirtilen Ek C ve D’ye göre belirlenir. EkC=Yaşameğrisi metodu(Survivor Curve Method) Annex D= Fraksiyon negatif yöntemi (Fraction negative method)	“D değeri” hesaplanması için resistometre koşullarına sahip bir test labortuarında yapılır. ANSI/AAMI ST 59 veya eşdeğer metota göre belirlenir.
“Z Değeri”	“Z değeri” Ek B’ye göre yapılır. Biyolojik indikatörlerdeki Z değerinin belirlenmesi için en az 3 sıcaklık derecesi (110 °C ve 130 °C arasında) uygulanır. Bu verileri Ek B’de belirtilen Z değerinin hesaplanması için kullanılır ve “Z değeri” ≥ 6 °C’den büyük olmalıdır.	FDA genellikle biyolojik indikatörler için minimum “Z değeri”ni 10 °C önerir. “Z değeri” belirlemek için, ısı direnç eğrisi oluşturulur. D değerinde 1 log birimi değişiklik için gereken sıcaklık değişimi olarak tanımlanır. FDA’nın önerisine göre; Z değerinin hesaplanması için en az üç D değeri/sıcaklık değerine ihtiyaç duyulmaktadır ancak bu şekilde °C değeri en iyi uyum doğrusu grafiği ile hesaplanır (Pflug 1990).
Yaşam/ Ölüm zamanı Değeri	Yaşam /Ölüm değeri ISO 11138-1 2009, Ek E’de belirtilen formüle göre hesaplanır. En az 50 tekrar biyolojik indikatör kullanılır. “D değeri” hesaplandıktan sonra; aşağıda belirtilen formülasyon kullanılır. Yaşam zamanı= Daha az olmayacak sayıda(Nominal populasyonun logaritması-2)x D değeri. Ölüm zamanı =En fazla (Nominal populasyon +4)x D değeri.	Yaşam/Ölüm değerinin hesaplanmasının doğrulanması gerekir. USP tarafından kabul edilebilir metot kullanılır. USP tarafından aşağıdaki eşitlik kullanılır. Yaşam zamanı=Daha az olmayacak sayıda D değeri X (canlı spor populasyonun logaritması-2) Ölüm zamanı = En fazla D değeri X (Canlı spor populasyonu +4)
Raf ömrü	Birincil ambalaj ve taşıyıcı raf ömrü süresince biyolojik indikatörün özelliklerini korumalıdır. Biyolojik indikatörlerin raf ömrü süresinin etikenlenmesi ve belirlenmesi gerekir.	FDA ‘nın önerisine göre en az farklı spor ürününden üretilmiş 3 farklı lotta istatistiksel olarak değerlendirme yapılmalıdır. Raf ömrü için aşağıda belirtilen bilgilerin mutlaka verilmesi gerekir.

- Raf ömrünün etiketlenmesi
- Test edilen aralıkların belirlenmesi:

İçerik	ISO 11138-3 2017	FDA Notification 510- 2007
		0, 6 ay, 1 yıl, 2 yıl.

2.4. “D değeri” ve “Z değeri”

Öldürücü düzeyde herhangi bir işlemin (ısıtma işlemi, kimyasal madde, ışınlatma v.b.) canlılar üzerindeki etkisi, zamana bağlı bir fonksiyon olarak verilir. Tam bir sıcaklık uygulamasında, belirli bir canlı türünün toplam sayısının %90'ının (1 log birimi) azalması için gereken süre “D değeri” (desimal indirgeme süresi) olarak tanımlanır ve dakika ile ifade edilir. Isıtma işleminde D değeri, uygulanan sıcaklıkla birlikte verilir. $D_{109}=0,3$ dakika; 109°C 'de her 0,3 dakikada (18sn) canlılıkta 1 log azalma olacağını gösterir (Halkman 2005). D değeri mikroorganizma direncine ve popülasyona göre değişiklik göstermektedir. Biyolojik indikatörlerin en önemli performans özelliklerinden birisi D değerinin belirlenmesidir. Biyolojik indikatörlerdeki spor ısı direnci 121°C 'de desimal (ondalık) azalma süresi ile ölçülmektedir. FDA tarafından biyoindikatörler için kabul değeri $D_{121}\geq 1,5$ dakika olarak belirtilmektedir (FDA Notification 510k).

USP ve ISO 11138-1 2017'e göre; belirlenen “D değeri”nin doğruluğunun ispatlanması için aşağıda belirtilen üç metot kullanılmalıdır.

1. EMS Yöntemi
2. Fraksiyon Negatif Yöntemi (Fraction Negative Method) (örnek; Spearman/Karber)
3. USP Canlılık /Ölüm (Survival/Kill) eğrisi

Fraksiyon Negatif Yöntemine göre “D değeri”nin hesaplanması için üç farklı prosedür uygulanmaktadır;

- Holcomb-Spearman Karber Prosedürü (**HSKP**)
- Limitli-Holcomb-Spearman Karber Prosedürü (**LHSKP**)
- Stumbo-Murphy-Cochran Prosedürü (**SMCP**)

D değeri'nin hesaplanması için resistometre cihazı kullanılmalıdır. Bu amaçla yaygın olarak BİER (Biyolojik İndikatör- Resistometre) olarak bilinen; sterilizasyon çevrimi parametrelerin hızlı ve doğru olarak belirlendiği bir ekipman kullanılmaktadır (ANSI/AAMI ST44 2002).

“Z değeri” ise, genellikle ısı işlem için kullanılan bir kavramdır ve °C olarak ifade edilir. D değerinde 1 log birimi değişiklik için gereken sıcaklık değişimi olarak tanımlanır. Örneğin $D_{96} = 3$ dakika ise D değerinde 1 log birimi değişiklik, yani D değerinin 0,3 dakika olması için sıcaklığın ne olması gerektiğidir. Buradaki örnekte $Z=6,7^{\circ}\text{C}$ olarak bulunursa sıcaklık $96+6,7=102,7^{\circ}\text{C}$ ısı işlemde D değeri 0,3 dakika ve tersine $96-6,7=89,3^{\circ}\text{C}$ 'de D değeri 30 dakika olacaktır (Halkman 2005). Z değerinin hesaplanması için en az üç D değeri/sıcaklık değerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bu şekilde Z değeri en iyi uyum doğrusu grafiği ile hesaplanır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışma Suşu ve Referans Suş

Çalışmada TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü bünyesinde genç araştırmacılara yönelik yapılan bir çalışma kapsamında Türkiye'nin farklı jeotermal tesislerinden toplanan su ve çamur örneklerinden izole edilen *Geobacillus stearothermophilus* bakterisi kullanıldı. Aynı zamanda çalışmalarda sertifikalı liyofilize *G. stearothermophilus* ATCC 7953 (Oxoid) suşu çalışmaların kalite kontrolü için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- API (Biomeriux, Fransa) biyokimyasal tanımlama cihazı.
- İnkübatör (Binder, Fransa) 55 ± 1 °C hassasiyette ayarlanabilen)
- İnkübatör (Mettler, Almanya 35 ± 1 °C hassasiyette ayarlanabilen).
- Santrifuj (Beckman coulter allegra X-2R, ABD)
- Hassas Terazı (Kern, Almanya)
- Vorteks-Tüp Karıştırıcı (VWR International, ABD)
- Otoklav (110 Lt) (Hirayama, Japonya)
- Otoklav (Steriflow, Fransa)
- Mikroskop (Olympus, Japonya)
- pH metre (Metrohm, İsviçre)
- Buzdolabı (Kuleg, Fransa)
- Hassas Terazı (Sartorius, Alman)
- Ultra Derin dondurucu (Thermo Science)
- Su banyosu (Mettler, Almanya)
- Koloni Sayıcı (WTC BZ6 30 Colony Counter)
- Dijital Termometre (Hanna)

- Mikropipet, 100-1000 μ l (Ependrof)
- Mikropipet,100-1000 μ l (Transferpette, Almanya)
- Çoklu Mikropipet, 5-50 μ l(Thermo, ABD)
- Santrifuj tüpü (2 ml)
- Mikrodalga Fırın (Sharp, Japonya)
- Özeler
- Plastik Steril petriler (90 MM)
- Steril filtreli pipet ucu (10 μ l)
- Steril filtreli pipet ucu (100 μ l)
- Steril filtreli pipet cucu (200 μ l)
- Steril filtreli pipet ucu (1000 μ l)
- Vial
- Vial Kapağı
- Vial Kapama, açma aleti.
- Vial saklama kutuları
- Steril Plastik Falkon Tüp (50 ml)
- Mezur (250 mL, A Grade)
- Deney tüpleri (16x150 mm) ve tüp taşıyıcıları
- Manyetik Balık, Manyetik Balık tutucu
- Koyu renkli steril plastik şişeler
- Cam ve diğer laboratuvar malzemeleri

3.1.3. Analizlerde Kullanılan Besiyeri, Çözeltiler ve Kitler

- Plate Count Agar (Merck, 1.05463)
- Tryptic Soy Agar (LAB011)
- LBA Agar (Merck, 1.10283)
- LB Broth (Merck, 1.10285)

- TYGB (Kim ve Naylor 1996)
- Tryptic Soy Broth (LAB004)
- Maximum Recovery Diluent (LAB103)
- Kazein pepton (Merck,1.07213)
- Tryptone (LAB068)
- Beef Extract (LAB MC019)
- Yeast extract (MC001)
- Nutrient Broth (LAB068)
- Mn SO₄H₂O (Merck, 1.02786)
- Mn SO₄H₂O (Merck, 1.02786)
- CaCl₂H₂O (Merck, 1.02382)
- KH₂PO₄ (Merck, 1.05101)
- Çözünür nişasta (Merck, 1.01252)
- Sporulasyon Medium Agar
- Spor Germinizasyon Besiyeri
- Bromocresol purple (Merck, 103025)
- Bolton Broth (Oxoid,CM0983)
- Nutrient Agar (Merck, 1.05450)
- Bakteriyolojik Agar (Liofilchem)
- Brain hearth Infüzyon (LAB, 049)
- API Test Kiti (Biomeriux, Fransa)
- API 20E (Biomerieux, 20 100)
- API 50 CH (Biomerieux, 502300)
- API CHBE (Biomerieux, 50430)
- VP1 ve VP2 (API Kit)
- Indole kovaks reagent

- Nit 1 ve Nit 2 (API Kit)
- TDA (API Kit)
- Mineral Yağ
- Sterikon plus Bioindicator (Merck, 1.07213)
- Gram boya seti (Liofilchem, 80293)

3.2. YÖNTEM

Çalışmalar, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gıda Enstitüsü Mikrobiyolojik Analiz Laboratuvarı, Gebze-Kocaeli’nde gerçekleştirildi.

3.2.1. Besiyerinin ve Kimyasalların hazırlanması

3.2.1.1. Bolton Broth (BB) (Oxoid,CM0983)

Meat Peptone	10.0 g/L
Lactalbumin hydrolysate	5.0g/L
Yeast extract	5.0g/L
Sodium chloride	5.0g/L
Sodium pyruvate	0.5g/L
Alpha-Ketoglutaric acid	1.0g/L
Sodium metabisulphite	0.5g/L
Sodium carbonate	0.6g/L
Haemin	0.01g/L

Dehidre besiyeri istenilen miktarda tartılarak, distile su içerisinde çözündürülüp ve 121 ± 1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında aseptik şartlar altında bir tüpe 5-10 ml aktarılarak oda sıcaklığına kadar soğuması beklenerek, pH (7.4 ± 0.2) olarak kontrol edildi.

3.2.1.2. Brain Hearth Infusion Broth(LAB 049) ve (BHIB ve BHIA)

Brain-Heart Infusion	17.5 g/L
Tryptose	10 g/L
Sodium Chloride	2.0g/L
Disodiumhydrogen Phosphate	2.5g/L

Agar* 3-5g/L (BHIA)

Bileşenler distile suda ısıtılarak çözündürülüp ve 121 ± 1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında aseptik şartlar altında bir tüpe 5-10 ml aktarılarak oda sıcaklığına kadar soğuması beklenerek, pH(7.4 ± 0.2) kontrol edildi.

*BHIB'ye agar eklenerek Brain Hearth Infusion Agar hazırlandı (BHIA).

3.2.1.3. Lactose Broth (LB) (Merck:1.10285)

Peptone from casein	10.0 g/L
Yeast extract	5.0 g/L
Sodium chloride	10.0 g/L

Dehidre besiyeri 25 g/ 1 L olacak şekilde tartılarak, distile su içerisinde çözündürüldü ve 121 ± 1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası pH 7 ± 0.2 olacak şekilde ayarlandı.

3.2.1.4. Luria Bertani Agar (LBA) (Merck:1.10283)

Peptone from casein	10.0 g/L
Yeast extract	5.0 g/L
Sodium chloride	10.0 g/L
Agar Agar	12.0 g/L

Dehidre besiyeri 37g/ 1 L olacak şekilde tartılarak, distile su içerisinde çözündürüldü ve 121 ± 1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası pH 7 ± 0.2 olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan besiyeri 44 ± 1 °C- 47 °C'ye kadar soğutulup, sonra steril petri kaplarına 12-15 ml dökülerek, ışık almayacak şekilde $2-8$ °C'de 7 güne kadar saklandı.

3.2.1.5. Max.Recovery Diluent (MRD) (ryLAB103)

Peptone	1.0 g/L
Sodium chloride	8.5 g/L

Dehidre besiyeri 9,5 g/1 L olacak şekilde tartılarak, distile su içerisinde çözündürüldü, 9 ml ve 4,5 ml olacak şekilde tüplere dağıtılarak, 121 ± 1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Besiyeri pH 'sı (7.0 ± 0.2) ayarlayıp, $2-8$ °C'de 3 aya kadar saklandı.

3.2.1.6. Nutrient Agar (NA) (Merck 1.05450)

Peptone from meat	5.0 g/L
-------------------	---------

Meat extract	3.0 g/L
Agar-agar	12.0 g/L

Dehidre besiyeri 20,0 g/1 L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritildi ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renkte olup, 25 °C' da pH'sı 7.0±0.2'si olacak şekilde ayarlandı.

3.2.1.7. Nutrient Broth (NB) (Merck 1.05443)

Peptone form meat	5.0 g/L
Meat Extract	3.0 g/L

Dehidre besiyeri, 8,0 g/1 L olacak şekilde damıtık su içinde eritilip ve amaca uygun kaplara (tüp, erlen vs.) dağıtıldı ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renkli olup, 25 °C'de pH'sı 7.0±0.2'dir.

3.2.1.8. Plate Count Agar (PCA)(Merck: 1.05463)

Peptone from Casein	5.0 g/L
Yeast extract	2.5g/L
Glucose, anhyrous (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1.0g/L
Agar	9.0/L

Bileşenler distile suda ısıtılarak çözüldürüldü. Sterilizasyon sonrası pH 7±0,2 olacak şekilde ayarlanıp, 121±1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Agarlı besi ortamı hemen kullanılacaksa, su banyosunda 44±1 °C-47 °C'ye kadar soğutulup, eğer hemen kullanılmayacaksa (5±3) °C'de 3 aydan fazla depolandı.

3.2.1.9. Sporulasyon Medium Agar (SMA)

Kazein pepton	3.0 g/L
Tryptone	5.0 g/L
Meat Extract	3.0 g/L
Yeast Extract	5.0 g/L
Mn SO ₄ 4H ₂ O	0.05 g/L
Mn SO ₄ 2H ₂ O	0.05 g/L
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.05 g/L
KH ₂ PO ₄	0.05 g/L
Bakteriyolojik Agar	20.00 g/L

Bileşenler distile suda ısıtılarak çözündürüldü ve 121 ± 1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrası pH 7 ± 0.2 olacak şekilde ayarlandı. Agarlı besi ortamı hemen kullanılacaksa, su banyosunda 44 ± 1 °C- 47 °C'ye kadar 250 ml cam şişelerde; 80 ml SMA içerek şekilde yatık şekilde soğutuldu.

3.2.1.10. Spor Germinizasyon (Vejetasyon) besiyeri (SGVB)

Trypton Soy Broth	30.0 g/L
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0.18 g/L
Çözünür nişasta	1.0 g/L
Bromocresol purple	0.01 g/L

Bileşenler distile suda ısıtılarak çözündürüldü ve 121 ± 1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon öncesi pH kontrol edildi. Sterilizasyon sonrası pH 7.0 ± 0.1 olacak şekilde ayarlandı. Eğer hemen kullanılmayacaksa (5 ± 3) °C'de 1 aya kadar depolandı.

3.2.1.11. Thioglycollate Broth (TB) (Merck: 1.08190)

Peptone from Casein	15.0 g/L
Yeast extract	5.0g/L
D (+) Glucose	5.5g/L
L-Cystine	0.5g/L
NaCL	2.5g/L
Sodium thioglycollate	0.5g/L

Dehidre besiyeri istenilen miktarda tartılarak, distile su içerisinde çözündürüldü ve 121 ± 1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında aseptik şartlar altında bir tüpe 5-10 ml aktararak oda sıcaklığına kadar soğuması beklenip, pH (7.1 ± 0.2)'sı olacak şekilde kontrol edildi.

3.2.1.12. Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck 1.05459)

Peptone from casein	17.0 g/L
Peptone from soymeal	3.0 g/L
D(+) Glucose	2.5 g/L
NaCl	5.0 g/L
K ₂ HPO ₄	2.5 g/L

Dehidre besiyeri 30,0 g/ 1 L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritildi, amaca uygun kaplarına (tüp, erlen vb.) dağıtılarak ve otoklavda 121 °C'da 15

dakika sterilize edildi. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı renkte olup, 25 °C'da pH'sı 7.3±0.2'olarak ayarlandı.

3.2.1.13. Tryptic Soy Agar (TSB) (LAB011)

Tryptone	15.0 g/L
Soy peptone	5.0 g/L
Sodium chloride	5.0 g/L
Agar No.2	12.0 g/L

Bileşenler distile suda ısıtılarak çözündürüldü ve 121±1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında aseptik şartlar altında bir tüpe 5-10 ml aktarılarak oda sıcaklığına kadar soğuması beklenip, pH (7.3±0.2) kontrol edildi. Hazırlanan besiyeri 44±1 °C- 47 °C'ye kadar soğutulup, steril petri kaplarına 12-15 ml dökülerek, ışık almayacak şekilde 2-8 °C'de 7 güne kadar saklandı.

3.2.1.14. Tryptone Yeast Broth (TYGB) (Kim ve Naylor 1966)

Tryptone	10 g/L
Yeast extract	5.0 g/L
K ₂ HPO ₄	2.0g/L

Bileşenler distile suda ısıtılarak çözündürülüp ve 121±1 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Sterilizasyon sonrasında aseptik şartlar altında 10 ml ve 50 ml şişelere aktarılarak, pH (7.2±0.2) kontrol edildi. Hazırlanan besiyeri ışık almayacak şekilde depolandı.

3.2.2. *G. stearothermophilus*'un tanımlanması

Biyoidikatör üretiminde kullanılacak saf kültürlerin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi API 20E (Biomerieux, 20 100) ve API 50 CHB (Biomerieux, Bacillus) identifikasyon test kitlerinin üretici talimatları doğrultusunda kullanılması ile yapıldı.

İzole ve biyokimyasal identifikasyonu yapılan *G. stearothermophilus* izolatu (Armutlu'dan izole edilen) moleküler biyolojik yöntemlerle doğrulanması Sentromer DNA Teknolojileri Ltd. Şti. firması tarafından gerçekleştirildi

3.2.3. *G. stearothermophilus*'un Üretilmesi

İzole edilen *G. stearothermophilus* suşun aktivasyon çalışmaları üç aşamada gerçekleştirildi:

a) İzole ettiğimiz -80°C 'de kryostatik şekilde bekletilen *G. stearothermophilus* bakterisinin stok suşundan öze ile 5 ml BHIB içeren tüpe inököle edildi. Besiyerleri 55°C 'de 18 ± 2 saat inkübasyona bırakıldı. BHIB'dan PCA ve LBA besiyeri içeren petrilere öze ile çizgi ekim yapıldı. Petri kutuları 35°C ve 55°C 'lerde 24 ± 3 saat inkübe edildi.

b) İnkübasyon sonrası gelişen kolonilerden 5 ml BB içeren tüpe ve 5 ml TB içeren tüpe öze ile inököle edildi. İnököle edilen brothlar aerob ve anaerob ortam koşullarında $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübe edildi. Gelişim gösteren tüplerden SMA içeren petrilere öze ile ekim yapılarak $55\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildi.

c) İnkübasyondan sonra üreyen koloniler BHIA içerisinde (25 adet tüp) $+4^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı.

3.2.4. Spor Toplama ve Spor Üretimi Çalışmaları

Depolanması $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yapılan stok *G. stearothermophilus* bakteri suşundan öze ile BHIB içeren tüpe inökölasyon yapıldı ve 55°C 'de 18 ± 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üreme gözlenen besiyerinden 1 ml alınarak içinde 50 ml NB veya TYGB içeren şişeye inököle edildi ve 55°C 'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Spor üretimi için iki yöntem kullanıldı.

3.2.4.1. Spor Üretimi I. Yöntem

İnkübasyon sonrası TYGB Besiyerinden 0,2 ml alınıp 20 adet SMA içeren petri yüzeyine yayma ekim yapıldı ve 55°C 'de 7 gün inkübe edildi. İnkübasyon sırasında petrilerin yüzeylerinin kurumaması için etüve saf su dolu bir beher koyuldu. İnkübasyon süresi sonunda agar yüzeyi 4°C 'lik steril distile su ile süspanse edildi ve süspanse edilen sporlar 3 kez soğuk steril distile su ile yıkandı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $1000\times g$ 'de 20 dk santrifuj edildi. Elde edilen spor süspansiyonu 100°C 'de 10 dak. vejetatif formların elimine edilmesi sağlandı ve spor formları korundu. Sporlar daha sonra kullanılmak üzere 4°C 'de saklandı.

3.2.4.2. Spor Üretimi II.Yöntem

İnkübasyon sonrası TYGB besiyerinden 1 ml alınıp 100 ml yatık SMA bulunan 8 adet 250 ml'lik şişelere inököle edildi ve 55°C 'de 7 gün inkübe edildi. İnkübasyon sırasında şişelerin yüzeylerinin kurumaması için etüve saf su dolu bir beher koyuldu. Sporların toplanması amacıyla inkübasyon sonrası agar yüzeyi 4°C 'lik steril distile su

ile yıkandı. Süspansiyon edilen sporlar +4°C’de 1000xG’de 20 dk. santrifüjlenerek, çökeltiyeye soğuk steril distile su eklenerek tekrar santrifüj edildi ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Elde edilen spor süspansiyonu 100 °C’de 10 dak. vejetatif formların elimine edilmesi sağlandı. Sporlar daha sonra kullanılmak üzere 4 °C’de saklandı.

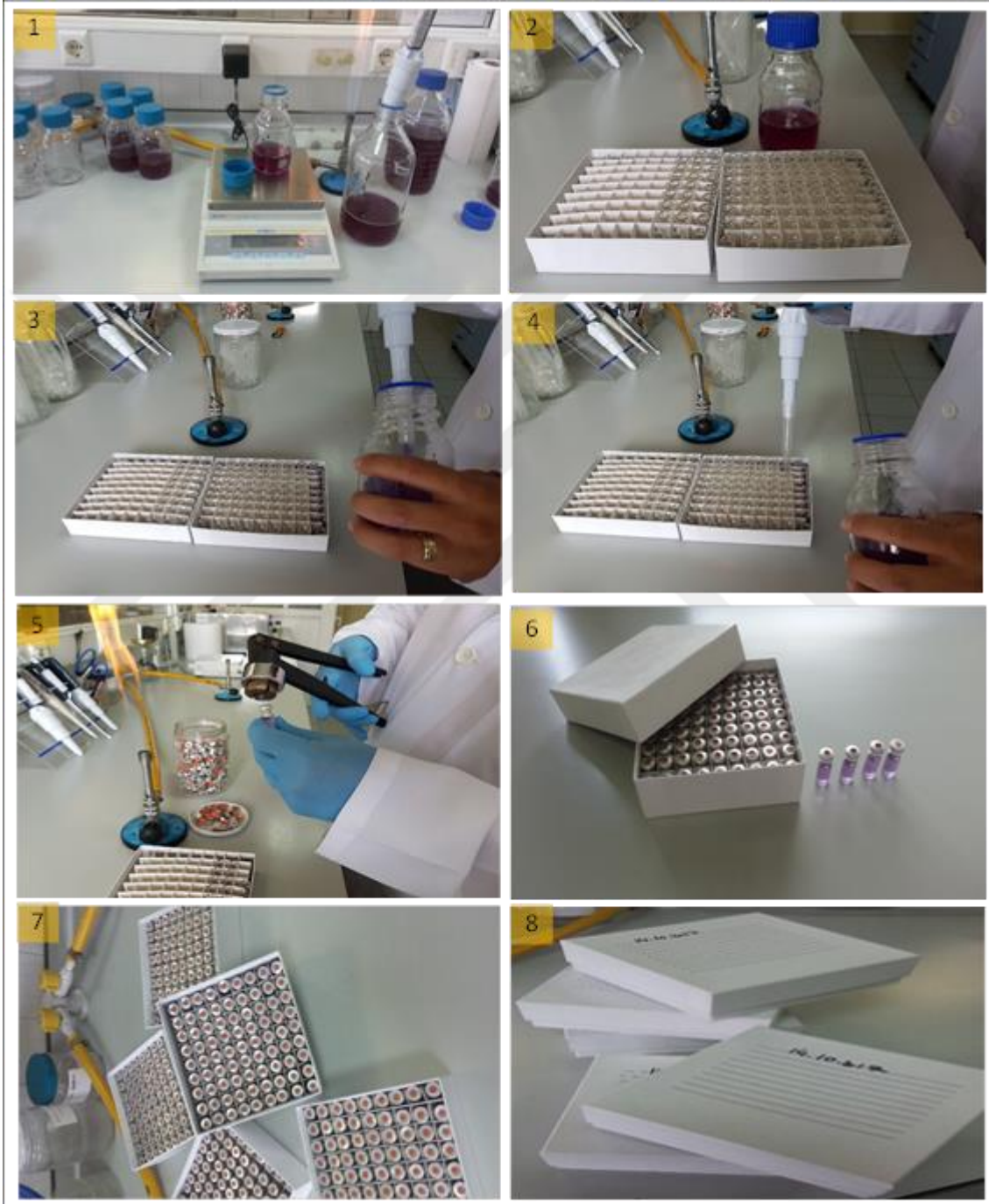
3.2.5. Canlı Spor Kantitasyonu ve Biyolojik İndikatörün Hazırlanması

Spor üretimi gerçekleştirildikten sonra +4°C’de 50 ml’lik falkon tüplerinde saf suda bekletilen sporların canlı spor sayımı gerçekleştirildi. Bunun için, steril petri kutularına her bir seyreltiden alınan 1’er ml eklenmiş üzerine 45°C’ye kadar soğutulmuş olan PCA döküldü ve 55°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra üreyen koloniler sayıldı (FDA BAM 2001).

Biyolojik indikatörlerin içerisinde kullanılmak üzere SGVB hazırlandı. Çalışmada kullanılacak her bir biyolojik indikatörün 10^5 (5 log) seviyesinde spor içermesi hedeflendi (ISO 11138-1 2017). Yapılan deneme çalışmalarında spor süspansiyonun 8 log seviyesinde spor içerdiği tespit edildi. Hedeflenen seviyede spor içeren stok çözelti hazırlamak için 8 log’luk süspansiyondan alınan 10 ml stok çözeltisi 90 ml SGVB içeren şişelere aktarıldı ve bu şekilde 1/10 dilüsyon sağlandı. Bu işlem iki kez daha tekrar edilerek spor seviyesi 10^5 olan 100 ml’lik SGVB şişesi elde edildi. Daha sonra bu besiyerinden alınan 1.5 ml stoklar cam viallere eklenerek ve kapama işlemi gerçekleştirildi. Bu şekilde her biri 10^5 spor sayısına sahip biyolojik indikatörler elde edildi.

Biyolojik indikatörler, mikrobiyoloji laboratuvar koşulları altında üretildi ve kauçuk tıpalı alüminyum kapaklarla aseptik olarak kapatıldı. Her bir parti için 800 adet biyolojik indikatör hazırlandı. Partilerden gelebilecek farklılıkları belirlemek amacıyla üç farklı parti biyolojik indikatörler ile çalışma yapıldı. Üretilen her bir parti biyolojik indikatör soğuk zincirde (+4°C) sıcaklıkta depolandı. Şekil 3.1 ’de biyolojik indikatör işlem basamakları gösterilmiştir.

Şekil 3-1: Biyolojik indikatör hazırlama işlem basamakları



3.2.6. Biyolojik İndikatör Isı Direnç Performans Çalışmaları

3.2.6.1. Biyolojik indikatördeki canlı sayımının belirlenmesi

Canlı bakteri sayısının belirlenmesi için, üretilen biyolojik indikatörlerin her bir seyreltiminden 0,5'er ml alınarak steril petri kutularına aktarıldı ve üzerine 45°C'ye kadar soğutulmuş olan PCA besiyeri döküldü. Daha sonra bu petriler 55°C'de 48 saat inkübe edilerek üreyen koloniler sayıldı (FDA BAM 2001). Çalışmada hazırlanan her parti biyoindikatören en az 4 paralel örnek ile canlı bakteri sayımı yapıldı (ISO 11138-1 2017 Ek A).

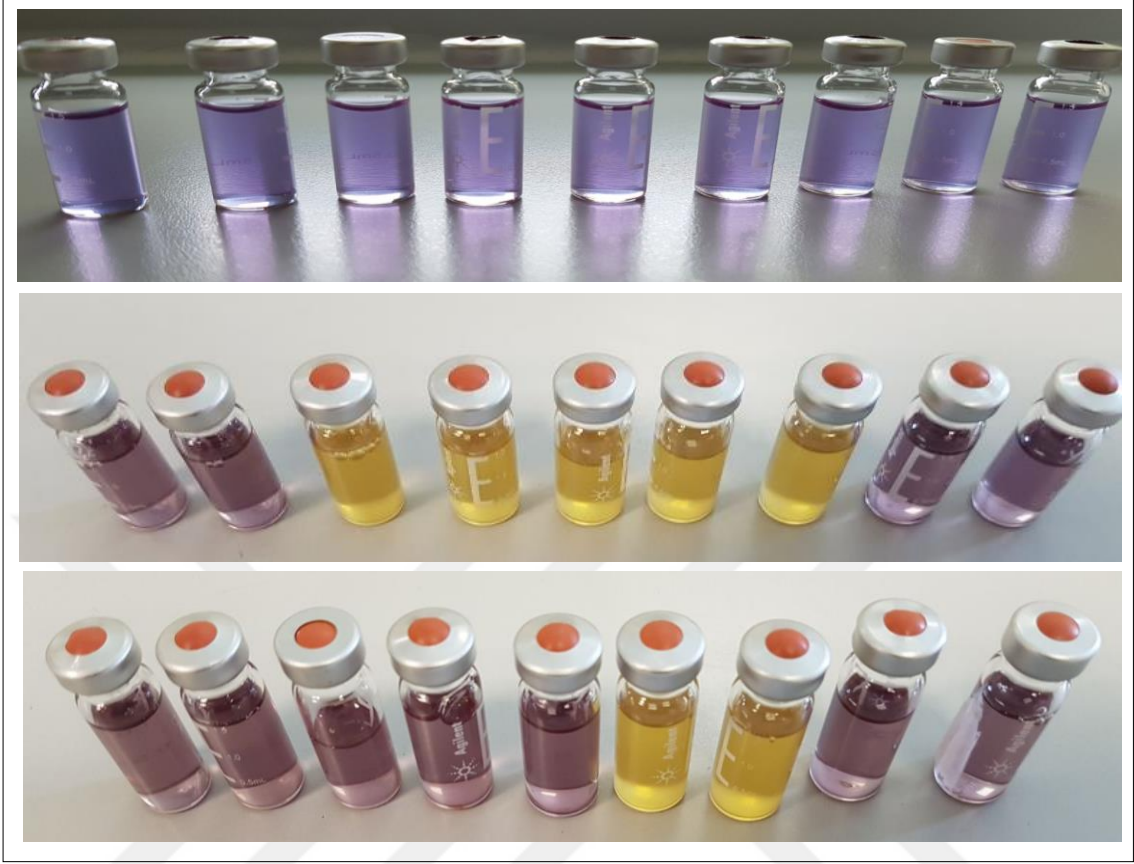
3.2.6.2. “D Değeri”nin belirlenmesi

“D değeri” sterilizasyon parametrelerinden biri olup mikroorganizma sayısının % 90 oranında azaltıldığı (1,0 log) parametre için kullanılan değerdir (ISO 11138-1 2017). ISO 11138-1 2017 standardının biyolojik indikatörler için en önemli performans özelliklerinden biri olan ısı direnç özelliğinin (D değeri) belirlenmesinde iki yöntem önerilmiştir. Çalışmada Fraksiyon negatif yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle göre hazırlanan biyoindikatörler farklı şartlara (Maruz Kalma Koşulları) maruz bırakıldı.

3.2.6.2.1. Fraksiyon negatif yöntemi ile “D değeri” nin belirlenmesi

“Fraksiyon Negatif Yöntemi”nde hesaplama canlı kalan mikroorganizmaların sıvı besi ortamındaki gelişiminin görsel olarak gözlenmesine ait sonuçlara göre yapılır (ISO 11138-1 2017 Ek D). Şekil 3.2 'de Fraksiyon Negatif Yöntemi otoklav öncesi ve otoklav sonrası besi ortamındaki görsel gelişimi gösterilmiştir. Çalışmada “**D değeri**” nin hesaplanması için Fraksiyon Negatif Yönteminin iki alt prosedürü olan Holcomb-Spearman Karber Prosedürü (HSKP) ve Limitli-Holcomb-Spearman Karber Prosedürü (LHSP) kullanıldı.

Şekil 3-2: Fraksiyon negatif yöntemi otoklav öncesi ve sonrası örnek uygulaması



3.2.6.2.1.1. “Holcomb-Spearman Karber (HSKP)” prosedürü

Bu prosedür için öncelikle kullanılacak maruz kalma koşullarının belirlenmesi gereklidir. Bu amaçla, her bir koşulda minimum 20 test örneği kullanılarak örneklerimize uygulanacak maruz kalma koşulları belirlendi.

Bunun için hazırlanan test örnekleri farklı sıcaklıklarda (118-124 °C arasında) farklı sürelerde sterilizasyon koşullarına maruz bırakıldı ve 55 °C’de 2 gün inkübasyona bırakılarak üreme durumu besiyerinde oluşan renk reaksiyonun göre takip edildi. Mordan (pH 6,9±0,1) sarıya (pH 5,5±0,1) renk değişikliği gösteren biyolojik indikatörler pozitif kabul edildi. Maruz kalma süreleri belirlenirken oransal bir artış gözletilmemiş rastgele seçim yapıldı.

Hesaplamaların yapılabilmesi için en az beş maruz kalma koşulu seçilmeli ve bu koşullar aşağıdaki durumların tümünü sağlayacak sonuçları içermelidir.

- Test örneklerinin tümünde gelişim görülen maruz kalma koşulu
- En az 2 örnek setinin hem gelişim gösterdiği en az 2 setinde gelişim göstermediği koşul
- En az 2 örnek setinin gelişim göstermediği koşul

3.2.6.2.1.2. “Holcomb-Spearman Karber (HSKP)” prosedürüne göre “D değeri” nin hesaplanması

“D değeri”nin hesaplamasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$D = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$$

Bu formülde yer alan sterilitenin ortalama zamanı (U_{HSK}) hesaplanması için;

$$U_{HSK} = \sum_{i=1}^{k-1} U_i$$

N_0 Her bir indikatörde toplam canlı sayım metodu ile belirlenen canlı sayımı ortalaması

U_i i’inci işlem süresi

k Tüm indikatörlerin negatif olduğu birinci maruziyet noktası

Bu işlemde yer alan ikinci işlem süresi (U_i) hesaplanması için

$$U_i = X_i Y_i$$

$$X_i = \frac{t_i + t_{(i+1)}}{2}$$

$$Y_i = \frac{r_{i+1}}{n_{i+1}} - \frac{r_i}{n_i}$$

r_i t_i 'inci maruz kalma dakikasında hiç üreme göstermeyen test numunesinin sayısı

n_i t_i 'inci maruz kalma dakikasında sterilizasyon etkenine maruz kalan test numunesinin sayısı.

t_1 Tüm örnekler üreme gösterdiğinden $Y_i = \frac{r_{i+1}}{n_{i+1}}$

Hesaplama yapılırken Tablo 3-1 'de verilmiş olan verilerden yararlanır.

Tablo 3-1: Holcomb-spearman karber (HSKP) hesaplanması

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) t	Maruz bırakılan örnek sayısı n	Üreme göstermeyen örnek sayısı r
$t_1(U_1)$	n_1	$r_1(r = 0)^a$
t_2	n_2	r_2
t_3	n_3	r_3
t_4	n_4	r_4
$t_5 U_{k-1}$	n_5	r_5
$t_6 U_k$	n_6	$r_6(r = n_6)$
t_7	n_7	$r_7(r = n_7)^a$
t_1	Tüm örnek biyoindikatörlerin üreme gösterdiği maruz kalma koşulunun süresi (dakika). t_1 'den t_5 'e kadar artarak ilerleyen maruz kalma koşulları oransal olarak büyür.	
	t_6 ve t_7 değerleri ise tüm örneklerin üreme göstermediği dakikalardır.	
a	Negatif birimler yoksa test geçerlidir ($r=0$); t_1 'inci dakikada tüm örnekler üreme gösterir. t_6 'nci dakikada ise tüm örneklerin üreme göstermediği dakikalardır.	

Bu sonuçlara göre D değerinin hesaplaması için;

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507 *}$$

*Eüler sabiti olup $0,5772 / \ln 10 = 0,2507$ 'den belirlenir.

Güven aralığının %95 olabilmesi için alt ve üst güven limitinin belirlenmesi şu şekilde yapıldı;

Alt güven limiti için;

$$D_{calc} = \bar{D} - 2\sqrt{V}$$

Üst güven limiti için

$$D_{calc} = \bar{D} + 2\sqrt{V}$$

Bu formülde yer alan Varyans “V” değerinin hesaplanması;

$$V = a \left(\frac{2,3026}{\ln N_0 + 0,5772} \right)^2$$

$$a = 0,25 \sum_{i=2}^{i=6} [t_{(i+1)} - t_{(i-1)}]^2 \left[r_i \frac{(n_i - r_i)}{n_i^2 (n_{i-1})} \right]$$

3.2.6.2.1.3. “Limitli-Holcomb-Spearman Karber (LHSP)” prosedürü

Bu prosedür için öncelikle kullanılacak maruz kalma koşullarının belirlenmesi gereklidir. Bunun için her bir koşulda minimum 20 test örneği kullanılarak örneklerimize uygulanacak maruz kalma koşulları belirlendi.

Bunun için hazırlanan test örnekleri farklı sıcaklıklarda (118-124 °C arasında) farklı sürelerde sterilizasyon koşullarına maruz bırakıldı ve işlem sonrası indikatörler 55 °C’de 2 gün inkübasyona bırakılarak üreme durumu besiyerinde oluşan renk reaksiyonuna göre takip edildi. Maruz kalma süreleri belirlenirken oransal bir artış gözetildi.

3.2.6.2.1.4. “Limitli-Holcomb-Spearman Karber (LHSP)” prosedürüne göre “D değeri”nin hesaplanması

“D değeri”nin hesaplamasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$D = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$$

Bu formülde yer alan sterilitenin ortalama zamanı (U_{HSK}) hesaplanması için;

$$U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$$

U_{HSK} =Sterilitenin ortalama zamanı

U_k Kopyalarının üreme göstermeyen ilk maruz kalma

d Maruz kalmalar arasındaki süre veya doz aralığı (aynı olmalı)

n Her bir maruz kalınan kopya sayısı (Her bir maruz kalmada aynı sayı olmalı örn:20)

Hesaplama yapılırken Tablo 3-2’de verilmiş olan verilerden yararlanıldı.

Tablo 3-2:Limitli holcomb-spearman karber (LHSP) Hesaplanması

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) t	Maruz bırakılan örnek sayısı n	Üreme göstermeyen örnek sayısı r
$t_1(U_1)$	n_1	$r_1(r = 0)^a$
t_2	n_2	r_2
t_3	n_3	r_3
t_4	n_4	r_4
$t_5 U_{k-1}$	n_5	r_5
$t_6 U_k$	n_6	$r_6(r = n)$
t_7	n_7	$r_7(r = n)^a$

a Negatif birimler yoksa test geçerlidir ($r=0$); U_1 'inci dakikada tüm örnekler üreme gösterir. U_1 'inci dakikada ise tüm örneklerin üreme göstermediği dakikalardır.

Bu sonuçlara göre D değerinin hesaplaması için;

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507 *}$$

*Eüler sabit olup $0,5772 / \ln 10 = 0,2507$ 'den belirlenir

Güven aralığının %95 olabilmesi için alt v e üst güven limitinin belirlenmesi şu şekilde yapıldı;

Alt güven limiti için;

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK} - 2SD}{\log_{10}N_0 + 0,2507}$$

Üst güven limiti için

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK} + 2SD}{\log_{10}N_0 + 0,2507}$$

Bu formülde yer alan Varyans “V” değerinin hesaplanması;

$$V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \sum_{i=1}^{k-1} r_i (n - r_i)$$

Standard sapma (SD): $SD = \sqrt{V}$

3.2.6.3. “Z” ve “r²” Belirtme katsayısı değerlerinin belirlenmesi

“Z değeri” “D değeri”nde 1 log birimi değişiklik için gereken sıcaklık değişimi olarak tanımlanır ve °C olarak ifade edilir. Z değerinin hesaplanması için en az üç “D değeri”/sıcaklık değerine ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmada bunun için 118, 121 ve 124 °C’ler kullanıldı.

“Z değeri” uyum doğrusu grafiği (regresyon analizi) ile hesaplanır(Tablo 3-3).

Regresyon analizinin yapılabilmesi için aşağıda yer alan formüller kullanıldı.

$$m = \frac{(nG) - (AB)}{(nC) - (A^2)}$$

m Doğrusal eğrinin eğimi

n Veri noktalarının sayısı

$$G = \sum [t(\log_n y)]$$

$$A = \sum (t);$$

$$B = \sum (\log_{10} y);$$

$$C = \sum (t^2)$$

t maruz kalınan süre

y D değerinin minimumu

Tablo 3-3:Örnek Regresyon analizi tablosu

	Maruz kalma sıcaklığı (dakika) °C	$\log_{10}y$	t^2	$t(\log_{10}y)$	$t(\log_{10}y)^2$
y_1	t_1	$\log_{10}y_1$	$(t_1)^2$	$t_1(\log_{10}y_1)=0$	$(\log_{10}y_1)^2$
y_2	t_2	$\log_{10}y_2$	$(t_2)^2$	$t_2(\log_{10}y_1)$	$(\log_{10}y_2)^2$
y_3	t_3	$\log_{10}y_3$	$(t_3)^2$	$t_3(\log_{10}y_1)$	$(\log_{10}y_3)^2$
y_n	t_n	$\log_{10}y_n$	$(t_n)^2$	$t_n(\log_{10}y_n)$	$(\log_{10}y_n)^2$
	$A = \sum_{i=1}^{i=n} t_i$	$B = \sum_{i=1}^{i=n} \log_{10}y_i$	$C = \sum_{i=1}^{i=n} (t_i^2)$	$G = \sum_{i=1}^{i=n} [t_i (\log_{10}y_i)]$	$E = \sum_{i=1}^{i=n} (\log_{10}y_i)^2$
Belirlenen değişken	A	B	C	D	E

“Z” değeri aşağıda belirtilen formülle hesaplanır.

$$Z = -1 - \left(\frac{1}{m}\right)$$

Oluşturulan regresyon denkleminin sonuçlarımıza uyumunu göstermek için r^2 (Belirleme katsayısı) $0 \leq r^2 \leq 1$ aralığında değer alabilir.

“ r^2 ” Belirtme katsayısı aşağıda belirtilen formülle hesaplandı.

$$r^2 = \frac{\left\{ (G) - \left[(A) \left(\frac{B}{n} \right) \right] \right\}^2}{[(C) - (A^2/n)][(E) - (B^2/n)]}$$

$$E = \sum (\log_{10}^y)^2$$

3.2.6.4. “Canlılık/Ölüm (Survival-Kill Test)” çalışması

ISO 11138-1 2017 Ek E’ye göre Canlılık/ölüm testi çalışması üretilen partinin performansının tutarlı olduğunu kanıtlamak için gerçekleştirilir. Bu çalışma için canlılık ve ölüm için 50’şer olmak üzere toplam 100 adet biyoindikatör test örneği kullanıldı.

Canlılık süresi (Survival Time)’nin belirlenmesi için;

Canlılık süresi = $(\log_{10}\text{nominal popülasyon}-2) \times D$ değeri

Ölüm süresi (Survival Time)'nin belirlenmesi için;

Ölüm süresi (Kill Time) = $(\log_{10}\text{nominal popülasyon}+4) \times D$ değeri

Formülleri kullanılarak hesaplamalar yapıldı ve 100 test örneğine belirlenen canlılık ve ölüm süreleri boyunca ısı işlem uygulandı 55 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmış ve üreme durumu besiyerinde oluşan renk reaksiyonun göre takip edildi.



4. BULGULAR

4.1. *Geobacillus stearothermophilus* suşunun tanımlama sonuçları

Geobacillus stearothermophilus bakterisi'nin API 20E ve API 50 CHB tanımlama test kitlerindeki 55 ± 1 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonrası görünüşleri sırasıyla Şekil 4-1 ve Şekil 4-2'de verilmiştir.

Şekil 4-1: *G. stearothermophilus*'un API 20E identifikasyon test kitinde reaksiyonu

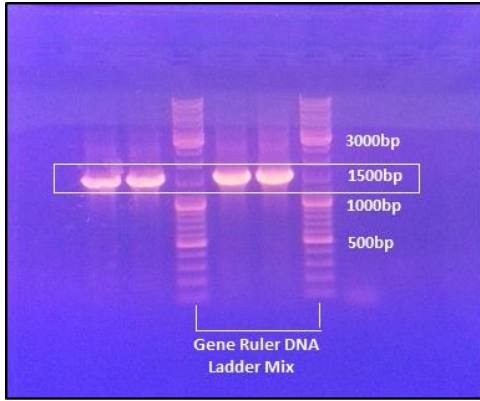


Şekil 4-2: *G. stearothermophilus*'un API 50 CHB identifikasyon test kitinde reaksiyonu



Elde edilen DNA izolatlarında 1500 bp uzunluğunda 16S primerleri kullanılarak PCR metodu kullanılarak tanımlama yapılarak, detaylı raporu Ek-1 'de verilmiştir. PCR ürünlerinin %1 agaroz jel görüntüsü Şekil 4-3'de gösterilmiştir.

Şekil 4-3: %1 Agaroz jel görüntüsü



PCR ürünlerine ait DNA dizileme sonuçlarından alınan full sekans sonuçları ise Şekil 4-4'de gösterilmiştir.

Şekil 4-4: Full Sekans dizilime sonucu

>1B-16SR

```

GGCCCACCTCTSTGKSTGCTGGGATGCTWGYAGGTTACTTCGCCGACTTCRG
GTGTTGCAAGCTMTCGTGGYGAGACGGCTGTGTACAAGGCCCGGRAACGTA
TTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGG
CGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGAGCGGCTTTTTGGGATTCGCTCCC
CCTCGCGGGTTCGCAGCCCTTTGTACCGCCCATGAGCACGTGTGTAGCCCAG
GTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGACTTGTC
GCCGGCAGTCCCTCTAGAGTGCCCAACCGAATGCTGGCAACTAGAGGCGAG
GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG
ACAACCATGCACCACCTGTCCACCTGTCCCCCGAAGGGGGGAACGCCCAAT
CTCTTGGGTTGTCAGGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTT
CGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCCTTT
GAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTATCGCGTTAGC
TGCAGCACTAAAGGGTGTGACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGC
GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCGCCTC
AGCTCAGGTGCAGGGCCAGAAGAGCCGCCTTCGACCACCTGGGATGATTC
CTCCACATCCTCCTTACGCAATTTCAACGCTACCACSGTTGCAATTCGGC
TCTCCCTCATCCTWGGCCCATCAAGTTCCCCAGTTTTCAAATGGATCCCTTT
CATMCTG

```

PCR ürünlerine ait DNA dizileme sonuçları güncel NCBI 16S rRNA veri tabanında BLAST edilmiş ve BLAST çıktı özetleri ve DNA dizileme sonuçlarının NCBI 16S RNA veritabanında çoklu hizalama sonuçlarına göre diğer *G. stearothermophilus* türleriyle dizi benzerliği Şekil 4-5, Şekil 4-6’de ve EK-1 Moleküler tanımlama raporu’ da gösterilmiştir.

Şekil 4-5: BLAST çıktı özetleri

The screenshot shows the NCBI Multiple Sequence Alignment Viewer interface. The top navigation bar includes 'Home', 'PubMed', 'GenBank', and 'BLAST'. The main content area displays a BLAST search result for a query sequence. The 'Descriptions' column lists various sequences, including the query and several hits from the NCBI database. The 'Seq Start' and 'Seq End' columns show the positions of the sequences. The 'Organism' column lists the species names, which are primarily *Geobacillus stearothermophilus* and *Geobacillus italicus*. The sequences are aligned, and the alignment is shown in a grid format. The query sequence is highlighted in red, and the hits are highlighted in green. The alignment shows a high degree of similarity between the query and the hits, with many identical nucleotides.

Descriptions	Seq Start	Seq End	Organism
Query_235217	33	875	
DQ223400.1	1,440	622	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
DQ323497.1	1,002	184	<i>Geobacillus</i> sp. SM-1
CP016552.1	2,806,347	11,625	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	93,426	52,609	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	156,147	155,330	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	524,591	523,774	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	1,342,014	1,242,197	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	11,044	11,226	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	229,858	229,142	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	271,475	270,659	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	1,630,286	1,631,102	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	2,012,202	2,807,114	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	2,012,251	2,014,019	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP016552.1	2,806,298	2,806,344	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP017892.1	2,595,262	413,059	<i>Geobacillus italicus</i>
CP017892.1	2,086,132	2,085,315	<i>Geobacillus italicus</i>
CP017892.1	2,348,422	2,347,605	<i>Geobacillus italicus</i>
CP017892.1	2,219,113	2,218,296	<i>Geobacillus italicus</i>
CP017892.1	2,595,309	2,594,492	<i>Geobacillus italicus</i>
CP017892.1	2,157,885	2,157,048	<i>Geobacillus italicus</i>
CP017892.1	2,220,628	2,219,811	<i>Geobacillus italicus</i>
CP017892.1	751,401	752,218	<i>Geobacillus italicus</i>
CP017892.1	413,012	413,829	<i>Geobacillus italicus</i>
CP017892.1	1,461,029	1,461,846	<i>Geobacillus italicus</i>
LC172202.1	1,437	620	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
KU185087.1	1,385	568	<i>Geobacillus</i> sp.
KU019269.1	1,373	556	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
KY433203.1	1,407	590	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
KY433293.1	1,430	513	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
KU783124.1	1,368	551	<i>Geobacillus</i> sp.
KU248330.1	1,457	640	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
KU248349.1	1,457	640	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
CP008903.1	3,287,415	151,104	<i>Geobacillus</i> sp. LC300
CP008903.1	3,287,462	3,286,645	<i>Geobacillus</i> sp. LC300
CP008903.1	2,000,800	1,940,460	<i>Geobacillus</i> sp. LC300
CP008903.1	2,192,436	1,999,983	<i>Geobacillus</i> sp. LC300
CP008903.1	1,221,088	1,221,905	<i>Geobacillus</i> sp. LC300
CP008903.1	151,057	477,173	<i>Geobacillus</i> sp. LC300
CP008903.1	176,162	176,679	<i>Geobacillus</i> sp. LC300

Şekil 4-6: *Geobacillus stearothermophilus*'un diğer türlerle dizi benzerliği

Job title: Nucleotide Sequence (894 letters)

RID [VYUNPW26016](#) (Expires on 09-19 14:41 pm)

Query ID [|cl|Query_225217](#)

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 894

Database Name nr

Description Nucleotide collection (nt)

Program BLASTN 2.7.0+ [▶ Citation](#)

Other reports: [▶ Search Summary](#) [\[Taxonomy reports\]](#) [\[Distance tree of results\]](#) [\[MSA viewer\]](#)

+ [Graphic Summary](#)

- [Descriptions](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 1

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Geobacillus stearothermophilus strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1317	1317	94%	0.0	95%	DQ923400.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus sp. SH-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1317	1317	94%	0.0	95%	DQ839487.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus stearothermophilus strain DSM 458, complete genome	1315	14434	94%	0.0	95%	CP016552.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus lituanicus strain N-3, complete genome	1315	13103	94%	0.0	95%	CP017692.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus stearothermophilus gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: JCM 2501	1315	1315	94%	0.0	95%	LC177207.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus sp. strain TCZ10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1315	1315	94%	0.0	95%	KX185087.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus stearothermophilus strain 95 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1315	1315	94%	0.0	95%	KX013769.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus stearothermophilus strain N1233 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1315	1315	94%	0.0	95%	KY433303.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus stearothermophilus strain N1209 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1315	1315	94%	0.0	95%	KY433293.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus sp. strain DVT21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1315	1315	94%	0.0	95%	KX785124.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus stearothermophilus strain A1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1315	1315	94%	0.0	95%	KU248350.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus stearothermophilus strain D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1315	1315	94%	0.0	95%	KU248349.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus sp. LC300, complete genome	1315	14392	94%	0.0	95%	CP008903.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus stearothermophilus strain HSB15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1315	1315	94%	0.0	95%	KR698316.1
<input type="checkbox"/>	Geobacillus stearothermophilus strain HSB11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1315	1315	94%	0.0	95%	KR698312.1

4.2. Spor Üretimi Çalışmaları

G. stearothermophilus bakterisinin eldesi ve spor üretimi için iki yöntem ile spor üretim verimi hesaplaması yapıldı.

I. yöntem ile 20 adet 15-20 ml hacimli petriden toplam 5.3×10^8 kob/ml (8 log) yükünde spor temin edilip, elde edilen spor süspansiyonun toplam hacmi 50 ml'ye tamamlandı. II. yöntem ile ise 8 adet 100 ml/250 ml hacimlik yatık cam şişeden 3.1×10^8 kob (8 log) yükünde spor toplandı. Ancak bu metot ile elde edilen spor konsantrasyonun toplam hacmi 4x50 ml olduğu tespit edildi. Spor verimi ikinci yöntemde daha fazla olduğu için sonraki spor üretim çalışmalarında ikinci yöntem uygulandı.

Spor üretimi gerçekleştirildikten sonra +4 C'de 50 ml'lik falkon tüplerinde saf suda bekletilen sporların canlı spor sayımı Tablo 4-1'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Canlı spor sayımı sonuçları

Parti	Üretim tarihi	Sayım sonucu
<i>I. parti</i>	14.10.2017	1.7×10^8 kob/ml
<i>II. parti</i>	10.11.2017	5.2×10^8 kob/ml
<i>III. parti</i>	11.01.2018	3.1×10^8 kob/ml

4.3. Hazırlanan Biyolojik İndikatör Test Örneklerinin Özellikleri

Test örneklerinde kullanılan Spor germinizasyon besiyeri için sterilizasyon sonucu pH değeri çok önemli olduğundan tüm partilere ait sonuçlar Tablo 4-2'de gösterilmiştir.

Tablo 4-2: Spor germinizasyon besiyeri pH sonuçları

Parti	Sterilizasyon öncesi pH	Sterilizasyon sonrası pH
<i>I. parti</i>	7.10	7.04
<i>II. parti</i>	7.10	7.08
<i>III. parti</i>	7.10	7.09

Çalışmada hedeflenen her bir biyolojik indikatördeki spor sayısının 10^5 (5 log) kob/ml olmasıdır. Bunun için, ISO 11138-1 2017 Ek E'ye göre her bir parti/lot olarak üretilen biyoindikatörlerden minimum 4 adet biyoindikatör alınıp, dökme plak yöntemi ile sayımları belirlendi. Her parti/lot için biyoindikatör sayım sonuçları Tablo 4-3'de gösterilmiştir.

Tablo 4-3:Başlangıç biyolojik indikatör canlı spor sayımı

Parti	Spor sayımı (kob/ml)	Üretim tarihi
I	2.1×10^5	14.10.2017
	2.5×10^5	
	2.4×10^5	
	2.4×10^5	
II	3.1×10^5	10.11.2017
	3.7×10^5	
	3.8×10^5	
	2.9×10^5	
III	3.5×10^5	11.01.2018
	3.4×10^5	
	4.5×10^5	
	5.7×10^5	
Merck	6.0×10^5	19/04/2018
	5.4×10^5	
	5.2×10^5	
	5.6×10^5	
Ort		
1.parti	2.35×10^5	
2.parti	3.37×10^5	
3.parti	4.27×10^5	
Merck	5.60×10^5	

4.4. Biyolojik İndikatör Isı Direnç Performans Sonuçları

4.4.1. “D Değeri”

Üretilen her üç partinin “D değeri”nin belirlenmesi için ISO 11138-1 2017 Ek D’ye göre “Fraksiyon Negatif Prosedürü” uygulandı.

Tüm partilere ve ticari kite (Merck) ait 118 °C, 121 °C ve 124 °C’deki “D Değeri” sonuçları Tablo 4-4, Tablo 4-5, Tablo 4-6, Tablo 4-7, Tablo 4-8, Tablo 4-9, Tablo 4-10, Tablo 4-11, Tablo 4-12, Tablo 4-13, Tablo 4-14, Tablo 4-15 ve Tablo 4-16 özet tabloların’da gösterilmiştir.

Tablo 4-4: I.Parti 118°C “D Değeri” (HSKP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) $t = \text{süre}$	Maruz bırakılan örnek sayısı n	Üreme göstermeyen örnek sayısı r
$t_1 = 30$	20	$r_1 = 0$
$t_2 = 35$	20	$r_2 = 14$
$t_3 = 37$	20	$r_3 = 16$
$t_4 = 40$	20	$r_4 = 18$
$t_5 = 42$	20	$r_5 = 20$
$t_6 = 45$	20	$r_6 = 20$

\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
6.10	5.93	6.26

Tablo 4-5: I.Parti 121 °C “D Değeri” (HSKP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 10$	20	$r_1 = 0$
$t_2 = 12$	20	$r_2 = 10$
$t_3 = 13$	20	$r_3 = 10$
$t_4 = 14$	20	$r_4 = 12$
$t_5 = 15$	20	$r_5 = 20$
$t_6 = 16$	20	$r_6 = 20$
\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
2.25	2.16	2.33

Tablo 4-6: I.Parti 124 °C “D Değeri” (LHSKP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 2$	20	$r_1 = 0$
$t_2 = 3$	20	$r_2 = 10$
$t_3 = 4$	20	$r_3 = 14$
$t_4 = 5$	20	$r_4 = 18$
$t_5 = 6$	20	$r_5 = 20$
$t_6 = 7$	20	$r_6 = 20$
\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
0.60	0.54	0.66

Tablo 4-7: II.Parti 118 °C “D Değeri” (HSKP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 25$	20	$r_1 = 0$
$t_2 = 30$	20	$r_2 = 6$
$t_3 = 33$	20	$r_3 = 4$
$t_4 = 35$	20	$r_4 = 14$
$t_5 = 37$	20	$r_5 = 16$
$t_6 = 40$	20	$r_6 = 20$
$t_7 = 42$	20	$r_7 = 20$
\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
5.78	5.58	5.99

Tablo 4-8: II.Parti 121 °C “D Değeri” (HSKP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 8$	20	$r_1 = 0$
$t_2 = 10$	20	$r_2 = 2$
$t_3 = 12$	20	$r_3 = 12$
$t_4 = 13$	20	$r_4 = 12$
$t_5 = 15$	20	$r_5 = 20$
$t_6 = 20$	20	$r_6 = 20$
\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
2.07	1.98	2.17

Tablo 4-9: II.Parti 124°C “D Değeri” (LHSP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 1$	20	$r_1 = 0$
$t_2 = 2$	20	$r_2 = 1$
$t_3 = 3$	20	$r_3 = 4$
$t_4 = 4$	20	$r_4 = 18$
$t_5 = 5$	20	$r_5 = 20$
$t_6 = 6$	20	$r_6 = 20$
\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
0.58	0.53	0.62

Tablo 4-10: III.Parti 118°C “D Değeri” (HSKP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 30$	20	$r_1 = 0$
$t_2 = 45$	20	$r_2 = 10$
$t_3 = 50$	20	$r_3 = 6$
$t_4 = 56$	20	$r_4 = 6$
$t_5 = 57$	20	$r_5 = 8$
$t_6 = 65$	20	$r_6 = 20$
\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
8.75	8.27	9.24

Tablo 4-11: III.Parti 121 °C “D Değeri” (LHSP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 18$	20	$r_1 = 0$
$t_2 = 20$	20	$r_2 = 8$
$t_3 = 22$	20	$r_3 = 12$
$t_4 = 24$	20	$r_4 = 18$
$t_5 = 25$	20	$r_5 = 20$
$t_6 = 26$	20	$r_6 = 20$
\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
3.60	3.48	3.72

Tablo 4-12: III.Parti 124 °C “D Değeri” (HSKP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 4$	20	$r_1 = 0$
$t_2 = 6$	20	$r_2 = 4$
$t_3 = 10$	20	$r_3 = 16$
$t_4 = 12$	20	$r_4 = 14$
$t_5 = 14$	20	$r_5 = 16$
$t_6 = 16$	20	$r_6 = 20$
\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
1.53	1.36	1.69

Tablo 4-13:Ticari Kit (Merck) 115°C “D Değeri” (HSKP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 35$	10	$r_1 = 0$
$t_2 = 38$	10	$r_2 = 4$
$t_3 = 40$	10	$r_3 = 8$
$t_4 = 44$	10	$r_4 = 9$
$t_5 = 45$	10	$r_5 = 10$
$t_6 = 46$	10	$r_6 = 10$
\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
6.47	6.26	6.68

Tablo 4-14:Ticari Kit (Merck) 118°C “D Değeri” HSKP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 15$	10	$r_1 = 0$
$t_2 = 17$	10	$r_2 = 4$
$t_3 = 18$	10	$r_3 = 6$
$t_4 = 19$	10	$r_4 = 8$
$t_5 = 20$	10	$r_5 = 9$
$t_6 = 22$	10	$r_6 = 10$
$t_7 = 23$	10	$r_7 = 10$
\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
2.94	2.82	3.06

Tablo 4-15:Ticari Kit (Merck) 121 °C “D Değeri” (HSKP)

Sterilizasyon etkenine maruz kalınan süre (dakika) <i>t = süre</i>	Maruz bırakılan örnek sayısı <i>n</i>	Üreme göstermeyen örnek sayısı <i>r</i>
$t_1 = 7$	10	$r_1 = 0$
$t_2 = 8$	10	$r_2 = 1$
$t_3 = 9$	10	$r_3 = 2$
$t_4 = 10$	10	$r_4 = 10$
$t_5 = 13$	10	$r_5 = 10$

\bar{D}	Alt güven sınırı	Üst güven sınırı
1.53	1.47	1.58

Tablo 4-16:Tüm partilerin ve ticari kit (Merck) “D Değeri” özet tablosu

Parti	115 °C	118 °C	121 °C	124 °C
I	-	6.10	2.25	0.60
II	-	5.78	2.07	0.58
III	-	8.75	3.60	1.53
Merck	6.47	2.94	1.53	-
ort	-	5.89	2.36	0.90

I Üretim tarihi: 14.10.2017

II Üretim tarihi: 10.11.2017

III Üretim tarihi: 11.01.2018

4.4.2. “Z Değeri” ve “r²” Belirtme Katsayısı

Üretilen her üç partinin “Z değeri” ve “r² belirtme katsayısı” belirlenmesi için ISO 11138-3 2017 Ek B’de belirtilen formül kullanılarak hesaplama yapıldı. Tüm partilere ve ticari kite (Merck) ait “Z değeri” ve “r² belirtme katsayısı” sonuçları Tablo 4-17’de gösterilmiştir.

Tablo 4-17:Tüm partilerin ve ticari kit (Merck) “Z Değeri” ve “r²” belirtme katsayısı özet tablosu

Parti	Z	r ²
I.parti	5.98	0.99
II.parti	6.01	0.99
III.parti	7.91	1,000003
Ticari (Merck)	9.52	0.99

4.4.3. “Canlılık/Ölüm (Survival-Kill) Test” Çalışması

Canlılık-Ölüm test çalışması olarak yapılan validasyon çalışma sonuçları her bir parti için Tablo 4-18’de verilmiş ve Şekil 4.7’de test sonucunda meydana gelen renk değişimi gösterilmiştir.

Tablo 4-18:Tüm partilerin “Canlılık/Ölüm test çalışması” sonuçları

Parti	Canlılık süresi	Renk	Ölüm süresi	Renk
I	≥ 7.58	<i>Sarı</i>	$\leq 21,08$	<i>Mor</i>
II	≥ 7.28	<i>Sarı</i>	$\leq 19,68$	<i>Mor</i>
III	≥ 13.06	<i>Sarı</i>	$\leq 34,66$	<i>Mor</i>
Merck	≥ 6.0	<i>Sarı</i>	$\leq 15,00$	<i>Mor</i>

Şekil 4-7: Canlılık /ölüm test uygulaması



1:Canlılık süresi belirleme uygulaması



2:Ölüm süresi belirleme uygulaması

5. TARTIŞMA

Sterilizasyon işlemi hangi yöntemle yapılırsa yapılsın, işlemin geçerliliğini test etmek amacıyla biyolojik indikatörlerin kullanılması önemli bir gerekliliktir. Bu yolla, kabul edilebilir sterilité güvence düzeyi konsepti gereğince sterilizasyon sürecinin tüm basamaklarının izlenmesi ve kontrol edilmesi mümkün olmaktadır. Canlı mikroorganizmaları içeren biyolojik indikatörlerin kimyasal indikatörlere göre daha hassas olduğu ve sterilizasyon döngüsü hakkında daha detaylı bilgi sağladığı tespit edilmiştir (Joslyn 1991; Greene 1982).

Bundan dolayı özellikle sağlık hizmetlerinde steril ürün üretimindeki performansın kontrolünün sağlanması amacıyla biyolojik indikatörlerin kullanımı çok eski yıllara dayanmaktadır. Tıbbi ve tıbbi olmayan cihaz, alet yada gıdalar (konserve gıda sanayi) yanında medikal veya kontamine olmuş atıklar gibi birçok ürünün sterilizasyon etkinliğini izlemek için biyoindikatörler kullanılmaktadır (Gillis ve ark. 2010). Tıbbi ve endüstriyel sektörlerde sterilizasyon işlemlerin etkinliğini izlemek için periyodik olarak kullanılan biyoindikatörler kurumlar için major gerekliliktir (Sella ve ark. 2012). Benzer olarak, mikrobiyoloji analiz laboratuvarlarında kullanılan otoklavlar ile etkin bir sterilizasyon işlemi yapıldığının kontrolü amacıyla ve konserve gıda sanayinde ısıl işlem uygulamasında mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesinde kullanılan sterilizasyon işleminin etkinliğinin değerlendirilmesinde de biyolojik indikatörler kullanılmaktadır (BRC 2015, Madde 4.11.7.3, IFS 2015, Madde 5.3).

Ülkemizde de bir çok sektörde sterilizasyon etkinliğinde yaygın olarak kullanılan bu biyolojik indikatörlerin yurtiçi kaynaklı üretimi olmayıp ithal edilmektedir. Biyoindikatörlerin üretilmesinde gerekli bilginin (know-how) oluşturulması ve benzeri ticari kitlerle karşılaştırılarak performansının belirlenmesi hedeflenen bu tez çalışmasıyla ülkemize katma değer bir ürün yaratmak hedeflenmiştir.

Bu tez çalışması üç farklı aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada +4 °C'de BHIB (%0.3-0.5 oranında agar içeren) besiyeri içerisinde depolanan *G. stearothermophilus* bakterisinin stok süşun çoğaltılması ve spor üretimi yapılmıştır. Bunun için, spor çimlendirme, çoğaltma ve toplama işlemler gerçekleştirilmiştir. Spor çimlendirme ve çoğaltılması aşamalarında farklı zenginleştirme besiyerleri ve farklı

inkübasyon sıcaklıklarında gerçekleştirilerek sporlu bakteri gelişimi için en uygun besiyeri ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Daha sonra, spor üretiminin geliştirilmesi ve optimizasyonu kapsamında spor verimin en yüksek olduğu spor toplama metodu belirlenmiştir (Tablo 4-1). Sıcaklık, pH, besin ve iyon içeriği gibi sporlanmayı etkileyen çevresel koşullar spor özelliklerini etkilediği gibi sporların sıcaklığa karşı direncini de etkilemektedir (Amaha ve Ordal 1957; Melly ve ark. 2002). Bazı bakteri türleri doğal olarak diğerlerine göre daha fazla ısıya dirençli olmasına rağmen; spor ısısı direnci aynı zamanda sporulasyon oranı bileşiminin mineral ve nem içeriği ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Bender ve Marquis 1985). Bu yüzden çalışmada formülden hazırlanan SMA kullanılmıştır. Bu yöntemlerle farklı zamanlarda spor üretimi yapılan üç partiye ait spor sayım sonuçları sırasıyla 1.7×10^8 , 5.2×10^8 , 3.1×10^8 kob/ml olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar farklı partilerin spor sayım sonuçlarının oldukça yakın olduğunu ve biyolojik indikatörler için ısı direncini etkileyen önemli değişkenlerden biri olan *G. stearothermophilus* sporulasyonu optimizasyonunun uygun olduğu göstermiştir.

G. stearothermophilus bakteri sporlarının ısıya dayanımlarında en etkili faktörlerden biri alfa glukozidaz enzimi olup bu enzim bakteri sporlarının kabuğunda mevcuttur (Albert ve ark.1998). *G. stearothermophilus* ATCC 7953 suşu da alfa glukozidaz enzimine hem sporulasyondaki çimlenme ve dışarıya doğru büyüme evresinde hem de normal vejetatif hücre fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde gerek duymaktadır (Albert ve ark.1998, Setlow ve ark. 2004). Enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktör sıcaklık ve pH değişimleridir. Her enzimin çalışması için gerekli optimum sıcaklık ve pH değeri vardır. Ortamdaki H⁺ iyonu konantrasyonu, enzim ve substratın spesifik grupların reaksiyona girebilmeleri için iyonize veya iyonize olmamış durumda bulunmalarına etki eder. Özellikle α -glukozidazların enzimatik reaksiyonları, aktif merkezlerinde bulunan aspartat ve glutamat köklerindeki karboksil grupların iyonlaşmasına bağlıdır. Katalitik olarak aktif olan protein molekülünün yapısı aminoasit yan zincirlerinin karakterine bağlı olduğundan pH'daki aşırılıklar da enzimin denatüre olmasına sebep olur (Rye ve Withers 2000; Erarlan ve ark. 2005). Çalışmamız için hazırlanan üç partiye ait spor germinizasyon besiyerlerinin otoklav sonrası pH değerleri sırasıyla 7,04, 7,08 ve 7,09 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4-2). *G. stearothermophilus*'un enzim sisteminin pH 7,1'de en aktif olduğu bildirilmiş olduğundan kullandığımız spor germinasyon besiyerlerinin pH değerlerinin uygun olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4-2) (Yıldız 1980). Çalışmanın devamı için, parti başına

800 adet cam vial 2,0 ml hazırlanan steril spor germinasyon besiyeri doldurulmuş ve kauçuk tıpalı alüminyum kapaklarla aseptik olarak kapatılmıştır. Çalışmada kullanılan referans standart olan ISO 11138-3:2017 standardının Ek-E'sine göre; üretilen her bir biyolojik indikatördeki canlı spor sayısının $\geq(1,0 \times 10^5 / 5 \log_{10})$ kob/ml olması gerektiği belirtilmiştir. Bunun için, çalışmada üretilen tüm biyoindikatör partilerinden minimum 4 adet örnek alınıp, dökme plak yöntemi ile sayımları yapılarak popülasyon doğrulaması çalışması yapılmıştır. Çalışmada belirlenen başlangıç biyolojik indikatör canlı spor sayımı (Tablo 4-3) sonuçlarımız standart ile uyumlu olup, sırasıyla ortalama $2,35 \times 10^5$ kob/ml ($5,37 \log_{10}$), $3,37 \times 10^5$ kob/ml ($5,52 \log_{10}$), $4,27 \times 10^5$ kob/ml ($5,63 \log_{10}$) olarak tespit edilmiştir. Çalışma partilerinin popülasyon doğrulama sonuçlarının ticari olarak biyoindikatör sonucuyla (Merck, Almanya) ($5,6 \times 10^5$ kob/ml ($5,74 \log_{10}$)) da çok yakın olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmanın son aşaması olan Isı Direnç Performans aşaması için, üretilmiş olan üç ayrı parti biyolojik indikatörün (parti: I, II, III), üç farklı sıcaklıkta (118°C , 121°C , 124°C) “D değeri” leri belirlenmiştir. “D değeri” biyolojik indikatörler için en önemli performans özelliklerinden birisi olup mikroorganizma sayısının %90'a azaltılması ($1.0 \log$) için kullanılan süredir (ISO 11138-1:2017). “D değeri” süresi, uygulanan sıcaklığa, mikroorganizmanın çeşidine ve mikroorganizmanın içerisinde bulunduğu ortamın bileşimine bağlıdır (Penna ve ark. 2003). Çalışmada “D değeri” nin hesaplanmasında her bir parti için belirlenen başlangıç biyolojik indikatör canlı spor sayımı (Tablo 4-3) kullanılmıştır. “D değeri” nin hesaplaması Fraksiyon Negatif Metodu ve Holcomb-Spearman Karber (HSKP) ve Limitli-Holcomb-Spearman Karber Prosedürleri (LHSKP) kullanılarak yapılmıştır (ISO 11138-3:2017, FDA-Food and Drug Administration 2007; USP 2008). Tüm partiler için maruz kalma koşulları belirlendikten sonra her bir koşul için minimumun 20 adet biyolojik indikatör ile değerlendirme yapılmıştır. Belirlenen maruz kalma koşullarında tutulan biyoindikatörler 55°C 'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmış üreme durumu besiyerinde oluşan renk reaksiyonun göre takip edilmiştir. Mordan (pH $6,9 \pm 0,1$) sarıya (pH $5,5 \pm 0,1$) renk değişikliği gösteren biyolojik indikatörler pozitif kabul edilmiştir. Birinci partiye ait çalışma sonucu değerleri $D_{118^\circ\text{C}}$, $D_{121^\circ\text{C}}$ ve $D_{124^\circ\text{C}}$ biyolojik indikatörler için sırasıyla 6,10; 2,25; 0,60 dakika olarak belirlenmiştir. İkinci partiye ait çalışma sonuçları $D_{118^\circ\text{C}}$, $D_{121^\circ\text{C}}$ ve $D_{124^\circ\text{C}}$ biyolojik indikatörler için sırasıyla 5,78, 2,07, 0,58 dakika olarak belirlenmiştir. Üçüncü partiye ait çalışma sonucu ise $D_{118^\circ\text{C}}$, $D_{121^\circ\text{C}}$ ve $D_{124^\circ\text{C}}$ biyolojik indikatörler için sırasıyla 8,75,

3,60, 1,53 dakika olarak belirlenmiştir. FDA 2007 ve ISO 11138-3:2017'ye göre *G. stearothermophilus* sporları içeren biyolojik indikatörlerde $D_{121}^{\circ C}$ değeri $\geq 1,5$ dakika olması gerektiği belirtilmiştir. Nitekim çalışmada her bir partiye ait $D_{121}^{\circ C}$ sonucu sırasıyla 2,25, 2,07, 3,60 dakika olarak belirlenmiş yapılan çalışmanın kabul edilebilir olduğuna karar verilmiştir.

Penna ve arkadaşları (2003), sporulasyon besiyerininin tüm bileşenlerini değiştirerek yapmış oldukları çalışmada süspansiyondaki *G. stearothermophilus* sporları için maksimum $D_{121}^{\circ C}$ değeri olarak 2,86 dakika tespit etmişlerdir. Feeherry ve arkadaşları (1987) ise, *G. stearothermophilus* sporları için $D_{121}^{\circ C}$ değeri olarak 3,46 dakika bulmuşlardır. Smith ve ark (1982)'nin çalışmasında ise ticari *G. stearothermophilus* sporları için Fraksiyon Negatif yöntemini kullanılmış ve $D_{121}^{\circ C}$ değeri olarak 1,85 ve 4,51 dakika arasında değişen değerler tespit edilmiştir. Benzer şekilde, çalışmada her bir partiye ait tespit edilen $D_{121}^{\circ C}$ sonuçları (2,25, 2,07, 3,60 dakika) yapılan çalışmalarla uyumludur.

MesaLabs tarafından üretilmiş olan Smart_Read EZ test markalı Buharlı *G. stearothermophilus* biyolojik indikatör izleme sistemi için yapmış oldukları başka bir çalışmada, dört farklı buhar sterilizasyon çevriminde ($121^{\circ C}$, $132^{\circ C}$, $134^{\circ C}$ ve $135^{\circ C}$) biyolojik indikatörün etkinliğini değerlendirmişler ve bunun için yine Fraksiyon Negatif Proseduru kullanmışlardır (<https://biologicalindicators.mesalabs.com/wp-content/uploads/sites/31/2013/11/EZTest-Steam-TIR-003.pdf>). Hazırlanan test örnekleri farklı sıcaklık ve sürelerde sterilizasyon koşullarına maruz bırakılmış ve $60 \pm 2^{\circ C}$ de 10 dakika inkübasyona bırakılarak üreme durumu besiyerinde oluşan renk reaksiyonuna göre takip edilmiştir. Çalışmamız sonuçları ile benzer olarak başlangıç biyolojik indikatör sayımı üç parti için (I, II, II) sırasıyla; $1,5 \times 10^5$, $2,1 \times 10^5$ ve $1,8 \times 10^5$ kob/ml bulunmuş; hesaplanan $D_{121}^{\circ C}$ değeri sonuçları ise 1,9, 1,9 ve 1,8 dakika olarak tespit edilmiştir. $D_{132}^{\circ C}$, $D_{134}^{\circ C}$ ve $D_{135}^{\circ C}$ değerleri de sırasıyla 0,4, 0,5, 0,3 ve 0,3, 0,4, 0,3 ve 0,3, 0,3, 0,3 dakika olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlarda, yine çalışmamız sonuçları ile benzer olarak yüksek sıcaklık koşullarına maruz kalan biyolojik indikatörlerin daha düşük D değerlerinde sahip olduğunu göstermiştir.

Guizelini ve arkadaşları (2012) buhar sterilizasyonunda biyolojik indikatörlerin geliştirilmesinde kullanılan *G. stearothermophilus* sporlarının sporlanma koşullarının ısı direncinin etkisini inceledikleri çalışmalarında başlangıç sporulasyon pH'sının, spor ısı

direncini etkileyen en önemli değişken olduğunu ve alkali pH'nın, asit pH'ya göre daha fazla ısıya dirençli sporlarla sonuçlandığını ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmada, üç ayrı parti spor germinizasyon besiyeri (parti: I, II, III) için sterilizasyon sonucu pH değeri sırasıyla, 7,04, 7,08, 7,09 olarak tespit edilmiş, $D_{121}^{\circ C}$ sonuçları ise (2,25, 2,07 ve 3,60 dakika) olarak bulunmuştur. Bulgularımız da benzer olarak alkali şartlarda daha uzun dayanım göstermiştir. Nitekim başka araştırmacılar da gıda matrisinin pH'sının D değerleri üzerine doğrudan bir etkiye sahip olduğunu, hidrojen iyonu konsantrasyonunun mikroorganizmaların ısı direnci üzerine büyük bir etkisi olduğunu belirtmişler (Stumbo 1973). Rigaux ve arkadaşları (2013) biyolojik indikatörlerde kullanılan *G. stearothermophilus* sporlarının ısı direncine yönelik yapmış oldukları çalışmada "D değerini" $D_{121}^{\circ C} = 3,3$ olarak belirlemesi çalışmamız bulgularını desteklemektedir.

Yapılan başka bir çalışmada, Hussein ve Ramaswamy (2011) *G. stearothermophilus* ve *Clostridium sporogenes* sporlarını içeren et ve havuç aljinat pürelere ısıya direnç özelliklerini araştırmışlardır. Yapmış oldukları çalışmaya göre; yüksek sıcaklık koşullarına maruz bırakılmış örneklerin yaşam eğrisinin daha dik olduğunu ve düşük D değerleri ile sporların daha yüksek oranda tahrip olduğunu göstermişler. Bu çalışmada *G. stearothermophilus* içeren aljinatlarında $D_{110}^{\circ C}$, $D_{115}^{\circ C}$, $D_{120}^{\circ C}$ ve $D_{125}^{\circ C}$ için elde edilen değerler sırasıyla havuç için 42,6, 12,4, 6,0, 1,9 dak. ve et için 40,8, 11,0, 5,7, 1,9 dak. olarak bulunmuştur. Aynı şekilde bizim çalışmada da (Tablo 4-16) *G. stearothermophilus*'a ait D Değerleri ($D_{118}^{\circ C}$, $D_{121}^{\circ C}$ ve $D_{124}^{\circ C}$) sırasıyla 6,10, 2,25, 0,60 (parti: I) 5,78, 2,07, 0,58 (parti: II) ve 8,75, 3,60, 1,53 (parti: II) dakika olarak belirlenmiş ve yüksek sıcaklık koşullarına maruz kalan biyolojik indikatörlerin daha düşük D değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Isı Direnç Performans çalışmasının önemli parametrelerinden biri olan "Z değeri" çalışmada incelenen her bir parti için 118, 121 ve 124 °C' olmak üzere üç sıcaklıkta "D değeri"lerinden hesaplanmıştır. "Z değeri" hesaplaması için en az üç D değeri/sıcaklık gereklidir. BS EN 866-7 (2000)'de belirtilen bu üç sıcaklık değeri 110 ve 130 °C aralığından seçilmelidir. Yine ISO 11138-3:2017'te belirtilen "Z değeri" hesaplaması için 110 °C ve 138 °C aralığında sıcaklık seçilmesi gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca hesaplanan "Z değeri" sonucu ≥ 6 °C olması gerektiği bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmada "Z değeri" hesaplaması için standartlarda belirtilen aralıkta sıcaklıklar seçip

regresyon analizi ile hesaplama yapılmıştır. “Z değeri” “D değeri”nde 1 log birimi değişiklik için gereken sıcaklık değişimi olarak tanımlanır ve °C olarak ifade edilir. Bizim çalışmada üretilmiş olan üç ayrı parti biyolojik indikatörün (parti: I, II, III), “Z” değerleri sırasıyla 5,98, 6,01, 7,91 (Tablo 4-17) olarak belirlenmiştir. Çalışmada her bir parti için tespit etmiş olduğumuz Z değeri sonuçları (Tablo 4-17) ISO 11138-3:2017’te belirtilen (≥ 6 °C) değerle uyumludur. Ayrıca, Prof. Douglas Goff’un Mikroorganizmaların Termal yıkımı ile ilgili yazısında (<https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/thermal-destruction-microorganisms>), küçük Z değerlerine sahip olan reaksiyonların yüksek sıcaklığa bağlı olduğunu, oysa büyük Z değerlerine sahip olanlarda zamanın düşürülmesi için sıcaklıkta daha büyük değişimler gerektiği belirtilmiş; spor oluşturan bakteriler için Z ve D değerlerini sırasıyla $Z(^{\circ}\text{C}) = 5-10$ ve $D_{121}^{\circ}\text{C} = 1-5$ (dakika) olarak belirtmiştir. Sonuçlarımızda hesaplanan Z ve D değerlerinin bu aralıklarda olduğunu görülmüştür (Tablo 4-16; Tablo 4-17).

G.stearothermophilus sporları ısıya karşı çok dirençli olduğundan; konserve gıda sanayinde uygulanan sterilizasyon işleminde canlılıklarını koruyarak, düşük asitli konserve gıdalar elverişli sıcaklıklara maruz kaldığında düz ekşime ve bozulmaya sebep olurlar (Head ve ark.2008). Liato ve arkadaşları (2015) yapmış oldukları çalışmalarında bezelye ve mısır püresi için $Z(^{\circ}\text{C})$ ve R^2 değerlerini sırasıyla 9,63, 10,27°C ve 0,97, 0,99 olarak tespit etmişlerdir. Aynı şekilde Guizeline ve ark. (2012) ve Shao ve ark. (2008) çalışmalarında çeşitli *G. stearothermophilus* suşlarının konserve gıdalarda $Z(^{\circ}\text{C})$ değerinin 8,3-11,8 (°C) aralığında olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada, Yıldız (1980) sterilizasyon indikatörü olarak *B. stearothermophilus* sporlarının üretilmesi için sıvı bir besi yeri ile optimum çevre koşullarının saptanmasına yönelik denemeler yapmıştır. Steril süt süspansiyonundaki sporların 115,6 °C, 121,1 °C ve 127,6 °C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta ölüm eğrilerini çizmiş ve regresyon analizi ile “D değeri”lerini hesaplamıştır. Bu eğrilerin eğimi ile de “Z değeri” hesaplanmıştır. Steril süt içinde üç farklı sıcaklıkta 115,6 °C, 121,1 °C ve 127,6 °C saptanan “D değeri”leri sırasıyla 22,4, 3,5 ve 0,37 olarak bulunmuş ve eğrilerin eğimi ile hesaplanan “Z değeri” ise 6,1 °C olarak bildirilmiştir.

Çalışmada kullandığımız regresyon denkleminde sonuçlarımızın uyumunu göstermek için R^2 hesaplaması yapılmıştır. Oluşturulan regresyon denkleminin R^2

(Belirleme katsayısı) $0 \leq R^2 \leq 1$ aralığında değer alabilir. R^2 değeri 1'e ne derece yakın ise denklem o derece iyi, sıfıra ne derece yakın ise denklem o derece kötü bir tahminleyici olarak kabul edilir. Ayrıca, ISO 11138-1:2017'e göre de minimum belirleme katsayısı değeri en az 0.8 olmalıdır. Çalışmada, üretilmiş olan üç ayrı parti biyolojik indikatörün (parti: I, II, III), R^2 değerleri sırasıyla 0,99, 0,99 ve 1,00 olarak belirlenmiştir (Tablo 4-17). Buna göre, çalışmada her bir parti için bulunan R^2 değerlerinin 1'e çok yakın tespit edilmesi çalışmamızın uygun olduğunu göstermiştir.

“Canlılık/ Ölüm (Survival-Kill test) çalışması” sterilizasyon işleminde belirlenen şartlar altında tüm pozitif canlı biyolojik indikatörlerin negatif biyolojik indikatörlere dönüşmesi için belirlenen maruz kalma süresi olarak tanımlanır (Schneider ve ark. 2014). Çalışmada Canlılık/ölüm testi çalışmasında kullanılmak üzere üretilen her bir parti için canlılık ve ölüm için 50'şer olmak üzere toplam 100 adet biyoindikatör test örneği kullanılmıştır. ISO 11138-1:2017 Ek-E'de belirtilen Canlılık/ Ölüm (Survival-Kill test) hesaplama formülleri kullanılmıştır. Hesaplama değerlere göre 100 test örneğinde belirlenen canlılık ve ölüm süreleri boyunca ısı işlem uygulanarak (121 °C sıcaklık) biyoindikatörler 55 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmış ve üreme durumu besiyerinde oluşan renk reaksiyonun göre takip edilmiştir. Üretilmiş olan üç ayrı parti biyolojik indikatörün (parti: I, II, III), canlılık süreleri sırasıyla ($\geq 7,58$, $\geq 7,28$, $\geq 13,06$) ve ölüm süreleri sırasıyla ($\leq 21,08$, $\leq 19,68$, $\leq 34,66$) olarak belirlenmiştir. ISO 11138-3:2017'e göre $D_{121}^{\circ C}$ 'deki canlılık süresi 4,5 dakikaya eşit veya büyük olmalıdır. Çalışmada her bir parti için $D_{121}^{\circ C}$ 'de bulmuş olduğumuz canlılık süresi değerleri belirtilen sıcaklığın (≥ 4.5 °C) üzerinde olup uygun olduğu tespit edilmiştir.

Schneider ve arkadaşları (2005) çeşitli buhar sterilizasyon biyoindikatörlerinin performanslarını değerlendirdikleri çalışmalarında, değerlendirilen biyolojik indikatörün 48 saat içerisinde pH değişimine baktıklarında, performans kriterlerinin $D_{121.1}^{\circ C}$ 1.4 dakika olduğunu, popülasyonun 2.7×10^5 kob/şerit, canlılık (survival) süresinin 5 dakika, ölüm (kill) süresinin 15 dakika olduğunu tespit etmişlerdir.

Sella ve arkadaşları (2012), *Bacillus atrophaeus* kaynaklı gliserol esaslı biyolojik indikatör sistemi geliştirdikleri çalışmalarında, çalışmada kullanılan metodolojiye benzer bir yöntem kullanılmışlar ve biyolojik indikatör sistemi geliştirilmesi için ilk önce spor germinizasyon besiyeri ve spor üretimi optimizasyonu çalışmaları yaparak tespit ettikleri performansı ticari kitle karşılaştırmışlardır. Buna

göre, ayrı zamanlarda üretilmiş olan üç farklı parti biyolojik indikatör değerlendirmiş tüm verilerle oluşturulan modelin belirleme katsayısı değeri (R^2) %91.99' un üzerinde tespit etmişler ve çalışmadaki gibi uluslararası standartlar kullanılarak performans değerlendirmesi yapmışlardır (ISO 11138 2017, FDA 2007). Hazırladıkları biyoindikatörleri 160°C sıcaklıkta 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 ve 40 dakikalardaki maruz kalma koşullarına bırakmışlardır. Geliştirdikleri üç farklı partiye ait sonuçlar; $N_0=1,2\pm 0.6 \times 10^6$ kob/birim (Başlangıç biyoindikatör canlı spor sayımı), $D_{160^\circ C}=3,1\pm 0,1$ (Dakika) Limitli-Holcomb-Spearman Karber Prosedürü (LHSP) kullanılarak hesaplanmış ve canlılık süresi 12,2 dakika ve ölüm süresi 47,4 dakika olarak belirlenmiştir.

Parti numarası, Z0382074 olan ticari biyoindikatör kitine (Merck, 1.10274.0) ait sertifika her bir biyolojik indikatördeki canlı spor sayısının $5.0 \times 10^5 + 1.0 \times 10^7$ kob/g aralığında olduğunu belirtmektedir. Biyolojik indikatörlerde *G. sterothermophilus* ATCC 7953 suşu kullanılmıştır. Bu partiye ait bir ürünün tarafımızdan yapılmış olan canlı spor sayımı sonuçları ortalama 5.6×10^5 kob/ml olarak tespit edilmiş olup sertifika değerini teyit etmektedir. Sertifikada canlılık süresi 6 dakika/121 °C ve ölüm süresi 15 dakika/121 °C ve aynı partiye ait D değeri ($D_{121^\circ C}$) 1,5-2,0 aralığında, "Z değeri" ise 7,0-10,0 °C aralığında belirtilmiştir. Bu partiye ait tarafımızdan tespit edilen canlılık süresi $\geq 6,0$ /121 °C ve ölüm süresi $\leq 15,0$ °C dakikadır. Yine tarafımızdan hesaplanan D ve Z değerleri ise sırasıyla 1,53 ve 9,52 olup sertifikada verilen tüm değerlere uyumludur. Sonuç olarak, ticari kit çalışmamız bulgularıyla karşılaştırıldığında yine her bir parti biyolojik indikatörde başlangıç spor sayımı (I, II, III) sırasıyla ortalama $2,35 \times 10^5$, $3,37 \times 10^5$, $4,2 \times 10^5$ olarak tespit edilmiş olup ticari kit ile benzer sayısal değerdedir. Üretmiş olduğumuz biyolojik indikatörlere ait üç parti için (I, II, III) D değeri sırasıyla $D_{121^\circ C}$ 2,35, 2,07 ve 3,60 dakika olarak tespit edilmiş ve FDA ve ISO 11138-2:2017 'ye göre *G.stearothermophilus* içeren buharlı ısı biyolojik indikatörler için belirlenen $\geq 1,5$ dakikanın üzerinde olduğu için kabul edilen değerlerde bulunmuştur. Ayrıca hesaplanan "Z" değeri sonucu $\geq 6^\circ C$ olması gerektiği belirtilmiştir. Bizim çalışmada üretilmiş olan üç ayrı parti biyolojik indikatörlerin (parti: I, II, III), "Z" değerleri sırasıyla 5,98, 6,01, 7,91 (Tablo 4-17) olarak belirlenmiş yine kabul edilen değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak çalışmamız bulguları ticari kitle karşılaştırıldığında üretmiş olduğumuz biyolojik indikatörlerden elde edilen sonuçların performansının ticari kitle benzer olduğu ispatlamıştır.

Sonuç olarak, sterilizasyon işleminin gerekli olduğu tüm proseslerde sterilizasyon etkinliğinin ölçümü bir zorunluluktur. Ülkemizde de benzer uygulamalar gerek tıbbi gerekse teşhis alanında periyodik olarak kullanılmaktadır. Buna karşın yerli kaynaklı bir sterilizasyon indikatörü üretimi olmayıp bu alan dış ticarete bağlı yürümektedir. Daha önceki çalışmalarımızda yerli kaynaklarımızdan izole edilerek geliştirilmiş olan bir sporlu bakteri suşunun biyoindikatör olarak üretimi ve geçerli kılınmasını amaçlayan bu çalışma ile endüstrinin önemli bir ihtiyacını karşılayacak sonuçlar elde edilmiştir. Geçerli kılma çalışması sonuçlarına göre izole edilerek üretilmiş olan tüm ürünlere ait D ve Z değerleri hesaplanmış ve gerek benzer araştıma makaleleri, standartların beklentileri ve gerekse ticari kitlerin sonuçları ile uyumluluk göstermiştir. Bu sonuçlara göre indikatör mikrobiyoloji laboratuvarları, tıbbi malzeme sterilizasyonu, atık sterilizasyonu, gıda endüstrisinde steril ürün üretimi gibi çok çeşitli proseslerde kullanılabilir. Buna karşın farklı parti üretimlerde elde edilen sonuçlar arasında farkın bulunması ancak bu farklılığın yine de kabul limitleri içerisinde olması üretilen her bir partinin seri kullanımdan önce doğrulanıp sertifikaya edilerek ürün özelliklerinin kullanıcıya bir analiz sertifikası ile beyan edilmesini gerekli kılmaktadır. Nitekim günümüzde tüm ticari kitler için benzer bir yol izlenmektedir.

KAYNAKLAR

- AAMI ST19 - Sterilization of health care products - Biological indicators - Part 3: Biological indicators for moist heat sterilization. Engineering 360. Erişim 17.08.2018, <https://standards.globalspec.com/std/462537/aami-st19>.
- AAMI ST44 - B1er/Eo Gas Vessels. Engineering 360. Erişim 17.08.2018, <https://standards.globalspec.com/std/1973377/aami-st44>
- AAMI ST59-99. Sterilization of health care products Biological indicators - Part 1: General. Erişim 17.08.2018, <https://www.techstreet.com/standards/aami-st59->
- Akkaya, S. E., & Kıvanç, M. (2008). Termofil Bakteriler Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gr (+) Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(2), 61-70.
- Albert, H., Davies, D. J., Woodson, L. P., & Soper, C. J. (1998). Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. *Journal of Applied Microbiology*, 85(5), 865-874.
- Amaha, M., & Ordal, Z. J. (1957). Effect of divalent Cations in the sporulation medium on the thermal Death Rate of *Bacillus Coagulans* Var. *Thermoacidurans*1. *Journal of Bacteriology*, 74(5), 596-604.
- Arıkan, S. (1997). Temizlik, dezenfeksiyon ve sterilizasyon.
- Baker, G. C., Gaffar, S., Cowan, D. A., & Suharto, A. R. (2001). Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiology Letters*, 200(1), 103-109.

- Bender, G. R., & Marquis, R. E. (1985). Spore heat resistance and specific mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(6), 1414-1421.
- Boyd, R. F., & Hoeri, B. G. (1995). Sterilization and disinfection. *Basic Medical Microbiology. 5th ed. Boston, New York*, 93-103.
- BS EN 866-7 2000 - Biological systems for testing sterilizers and sterilization processes. Particular requirements for self-contained biological indicator systems for use in moist heat sterilizers. (t.y.).Erişim 14.08.2018, <https://shop.bsigroup.com/ProductDetail/?pid=000000000030019732>
- BRC Global Standards 2015 - Gıda Gvenlięi, Versiyon 7. Erřim: 13.08.2018, <https://www.brcglobalstandards.com>.
- Coorevits, A., Dinsdale, A. E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., & Logan, N. A. (2012). Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearotherophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 7), 1470-1485.
- Dezenfeksiyon Antisepsi Sterilizasyon (DAS) Derneği. (2008). Sterilizasyon Rehber Taslaęı. Erřim: 13.08.2018, <https://das.org.tr/tr/dosya/rehber/steril-rehber.zip>.
- Erarslan, A., Kazan, D., Denizci, A.A., Öztrk, D.C., Karahan, N. (2005). Enzim saflaştırılmasında temel yöntemler. 8. *Uygulamalı Eğitim Kurs Kitabı* TÜBİTAK Gen Mhendislięi ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Kocaeli.

- FDA. (2001). Food and Drug Administration. Chapter 3. Aerobic Plate Count. Bacteriological Analytical Manual. Erişim 13.08.2018, <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm063346.htm>
- FDA. (2007). Food and Drug Administration, Guidance for Industry and FDA Staff, Biological Indicator (BI) Premarket Notification [510(k)] Submissions, Erişim 13.08.2018, <https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071271.pdf>
- Geldreich, E. E., Clark, H. F., Kabler, P. W., Huff, C. B., & Bordner, R. H. (1958). The Coliform Group. *Applied Microbiology*, 6(5), 347-348.
- Gennaro, A. R. (Ed.). (1995). *Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition* (19th edition). Easton, Pa: Williams & Wilkins.
- Gillis, J. R., Mosley, G. A., Kowalski, J. B., Krushefski, G., Nigenau, P. T., & McCauley, K. (2010). Understanding biological indicator grow-out times. *Pharm Tech*, 34, 1-9.
- Greene VW. Control of sterilization process. In: Russell, Hugo, Ayliffe, editors. Principles and Practice of Disinfection, Preservation, and Sterilization, Oxford:Blackwell;1982.
- Guizelini, B. P., Vandenberghe, L. P. S., Sella, S. R. B. R., & Soccol, C. R. (2012). Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. *Archives of Microbiology*, 194(12), 991-999.
- Günaydın, M. (2009.). Sterilizasyonun İzlenmesi. 6. *Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*. Erişim: 13.08.2018,

<https://www.das.org.tr/index.php/component/k2/item/31-das-kongre-kitabi-2009>.

- Günaydın, M., & Gürler, B. (2008). Hastane İnfeksiyonlarının Kontrolünde Dezenfeksiyon, Antisepsi ve Sterilizasyon “DAS” uygulamaları. *Ankem Derg*, 22(4), 221-231.
- Hanlon , G. M., Hodges, N. A., Parker , M. S. (1988). The action of physical and chemical agents on microorganism. *The science of Dosage Form Design* (Ed: ME Aulton). Churchill Livingstone. New York, 472-471.
- Halkman, K. A. (2005). Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları (Editör, Halkman). *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*, 261-281.
- Head, D. S., Cenkowski, S., Holley, R., & Blank, G. (2008). Effects of superheated steam on *Geobacillus stearothermophilus* spore viability. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 1213-1220.
- Health, C.D. (t.y.). Premarket Notification (510k) - 510(k) Submission Methods [WebContent]. Erişim 14.08.2018, <https://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/HowtoMarketYourDevice/PremarketSubmissions/PremarketNotification510k/ucm134034.htm>
- Hugo, W. B., Russell, A. D., & Ayliffe, G. A. J. (1982). *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilisation*. Oxford : Blackwell Scientific. Erişim 14.08.2018 , <https://trove.nla.gov.au/version/30671611>
- Hussein, F.H., Ramaswamy, H.S. (2011). Heat Resistance of *Geobacillus stearothermophilus* and *C.sporogenes* In Carrot and Meat Alginate pures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35, 376-385.

- IFS Uluslararası Gıda Standardı 2015 Versiyon 7. Erişim: 13.08.2018,
<http://www.ifsqn.com/forum/index.php/topic/31047-ifs-food-latest-version/>
- ISO 11138-1:2017 - Sterilization of health care products -- Biological indicators -- Part 1: General requirements. (t.y.). Erişim 13.08.2018,
<https://www.iso.org/standard/66442.html>
- ISO 11138-3:2017 - Sterilization of health care products -- Biological indicators -- Part 3: Biological indicators for moist heat sterilization processes. (t.y.). Erişim 13.08.2018, <https://www.iso.org/standard/66446.html>
- ISO 11140-1:2014 - Sterilization of health care products -- Chemical indicators -- Part 1: General requirements. (t.y.). Erişim 13.08.2018,
<https://www.iso.org/standard/55080.html>
- Jarvis, W. R. (2007). The United States approach to strategies in the battle against healthcare-associated infections, 2006: transitioning from benchmarking to zero tolerance and clinician accountability¹. *Journal of Hospital Infection*, 65, 3-9.
- Joslyn, L.J. Sterilization by heat. In: Disinfection, Sterilization and Preservation. 4 th ed. Philadelphia: Block, Lea adn Febiger; 1991.pp 495-526.
- Karadağ, A. (2005). Otoklav ile sterilizasyon. 4. *Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*.
- Kim, J., Naylor, H.B. (1966). Spore Production by *Bacillus stearothermophilus*. *Extremophiles: Applied Microbiology*, 14(4), 690-691.
- Kristjansson, J. K. (1991). *Thermophilic Bacteria*. CRC Press.
- Kronstad, J. W., Schnepf, H. E., & Whiteley, H. R. (1983). Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. Erişim 13.08.2018, gönderen /paper/Diversity-of-locations-for-Bacillus-thuringiensis-Kronstad-Schnepf/084beed0e61def16a8679375557fae0ab6c5c14b

- Lachman, L., Lieberman, H. A., & Kanig, J. L. (1986). *The Theory and practice of industrial pharmacy*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Liato, V., Labrie, S., Viel, C., Benali, M., & Aïder, M. (2015). Study of the combined effect of electro-activated solutions and heat treatment on the destruction of spores of *Clostridium sporogenes* and *Geobacillus stearothermophilus* in model solution and vegetable puree. *Anaerobe*, 35, 11-21.
- Marteinsson, V. T., Birrien, J. L., Raguénès, G., da Costa, M. S., & Prieur, D. (1999). Isolation and characterization of *Thermus thermophilus* Gy1211 from a deep-sea hydrothermal vent. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions*, 3(4), 247-251.
- Melly, E., Genest, P. C., Gilmore, M. E., Little, S., Popham, D. L., Driks, A., & Setlow, P. (2002). Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 92(6), 1105-1115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01644.x>
- Mesalabs, Technical Report of Smart_Read EZ TEST Biological Indicator Monitoring System *Geobacillus stearothermophilus* Erişim 17.08.2018, <https://biologicalindicators.mesalabs.com/wpcontent/uploads/sites/31/2013/11/EZTest-Steam-TIR-003.pdf>
- Narayan, V. V., Hatha, M. A., Morgan, H. W., & Rao, D. (2008). Isolation and characterization of aerobic thermophilic bacteria from the savusavu hot springs in fiji. *Microbes and Environments*, 23(4), 350-352.
- Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer



- of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 433-446.
- Nyberg, R. (2006). Guidance for verification of biological indicators: Understanding the acceptance criteria of D-value and population verification is key. *Pharmaceutical Technology*, 30, 80-86.
- Özinel, M. A., Günaydın, M., Esem, Ş., Sanıç A., Leblebicioğlu H (Ed). (2002). Sterilizasyon kontrolü ve uluslararası standartlar. *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane Enfeksiyonları, SIMAD Yayınları*, 17-23.
- Penna, T.C.C., Machoshvili, I.A., Taqueda, M.E.S. (2003). Effect of media on spore yield and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Biochem biotechnology*, 106, 287-294.
- Pflug, I.J. (1990). Microbiology and engineering of sterilization processes. *Environmental Sterilization Laboratory*, 100 Union Street, Minneapolis, MN 55455.
- Remington, J. P., & Gennaro, A. R. (2000). *Remington: the science and practice of pharmacy*. Baltimore, Md.: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rigaux, C., Denis, J.-B., Albert, I., & Carlin, F. (2013). A meta-analysis accounting for sources of variability to estimate heat resistance reference parameters of bacteria using hierarchical Bayesian modeling: Estimation of D at 121,1 °C and pH 7, zT and zpH of *Geobacillus stearothermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2), 112-120.
- Rye, C. S., & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(5), 573-580.

- Samastı, M. (2007). Kliniklerde dezenfeksiyon ve sterilizasyon uygulaması. Klinik gelişim. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Sayısı*, 20(4), 5-17.
- Schneider, P. M., Reich, R. R., Kirckof, S. S., & Foltz, W. G. (2005). Performance of various steam sterilization indicators under optimum and sub-optimum exposure conditions. *American Journal of Infection Control*, 33(5), S55-S67.
- Schneider, M. S., Philip, M. R. (2014). Evaluation of a new rapid readout biological indicator for use in 132 °C and 135 °C vacuum-assisted steam sterilization cycles. *American Journal of Infection Control*, 42(5), e17-e21.
- Sella, S., Milla Gouvea, P., F Gomes, V., Vandenberghe, L., Carlos Minozzo, J., & Soccol, C. (2012). Glycerol-based sterilization bioindicator system from *Bacillus atrophaeus*: Development, performance evaluation, and cost analysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 97.
- Setlow, B., Cabrera-Martinez, R.-M., & Setlow, P. (2004). Mechanism of the hydrolysis of 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucoside by germinating and outgrowing spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 96(6), 1245-1255.
- Shao, Y. (2008). *High Pressure Destruction Kinetics of Bacterial Spores in Low Acid Food at Elevated Temperatures*. McGill University. Monreal. Canada.
- Smith, G.M., Kopelman, M., Jones, A., Ptflug, I.J. (1982). Effect of environmental conditions during heating on commercial spore strip performance. *Appl Environ Microbiology*, 44, 12-18.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.

- Tırnaksız, F. (2009). Sterilizasyon. Modern Farmasotik Teknolojisi. Türkiye. *TEB Eczacılık Akademisi Yayını*, 49-62.
- Wiegel, J., & Ljungdahl, L. G. (1981). Thermoanaerobacter ethanolicus gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology*, 128(4), 343-348.
- Yıldız, F. (1980). Sterilizasyon indikatörü olarak *Bacillus stearothermophilus* sporları. *ODTÜ Gıda Mühendisliği Programı, Gıda Dergisi*, 5.
- Zhang, J., Davis, T. A., Matthews, M. A., Drews, M. J., LaBerge, M., & An, Y. H. (2006). Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(3), 354-372.

EKLER

EK-1: Moleküler Tiplendirme Analiz Raporu

LABORATUVAR ANALİZ RAPORU	 sentromer® Sentromer DNA Teknolojileri Ltd. Şti. Sarıyer Cad. 117/B T:(212) 286 2135 ABC Yolu, ABC Plaza K5 No.12 F:(212) 286 2134 İstinye, Sarıyer 34460 W: www.sentromer.com İSTANBUL E: dna@sentromer.com
Analiz Rapor No: 201709180930	Rapor Tarihi: 17/09/2017
Analiz Türü: 16S RNA Dizileme/Tipleme Gönderilen Numune: 2 adet petri; 22.08.2017 Salı günü petriler elimize ulaşmıştır.	
İŞLEM	ÇIKTI
DNA Ekstraksiyon	Nanodrop konsantrasyon/safılık tablosu
PCR	PCR şartları
Agaroz jel	Agaroz jel fotoğrafı (1500 bp 16S rRNA gen ampikonu)
Safılaştırma (ExoSAP)	+
Big Dye Sequencing	+
Safılaştırma (Sephadex)	+
DNA Dizileme	Elektroferogram (çift yönlü)
Biyoinformatik Analiz (BLAST+ Filogenetik)	Blast Tree View
Rapora eklenen çıktı dosyaları: Dizilenen bölgeye ait elektroferogram, FASTA formatında dizi, BLAST Tree View, PCR agaroz jel fotoğrafı.	
Sonuç: Yapılan çalışmalardan elde edilen dizilerin güncel NCBI 16S Ribozomal RNA dizi veritabanında incelenmesi yapılmıştır.	
İncelenen koloniler Gram pozitif termofilik <i>Geobacillus stearothermophilus</i> bakterisi olarak tanımlanmıştır. <i>G. Stearothermophilus</i> , genel olarak gıda sanayiinde nişastaların parçalanmasında rol alan α -Amilaz enziminin üretiminde kullanılmaktadır.	
Saygılarımızla,  SENTROMER DNA TEKNOLOJİLERİ LTD. ŞTİ. Pınar Akalın Sarıyer Cad. 117/B ABC Yolu Laboratuvar Müdürü ABC Plaza K5 No. 12 Sarıyer - Sarıyer / İSTANBUL Sarıyer V.D. 761 049 5836	
FO L003Bv003	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Neşe Aslı	Soyadı	Öncü
Doğ.Yeri	Kocaeli	Doğ.Tar.	25.02.1979
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	54835221864
Email	Asli.kisikkaya@tubitak.gov.tr	Tel	05325531508

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis	İstanbul Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı	2012
Yük.Lis.	Kensington Üniversitesi, İşletme Yönetimi (MSc)	2004
Lisans	Uludağ Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü	2002
Lise	Özel Kocaeli Lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Uzman Araştırmacı	TÜBİTAK MAM Gıda Enstitüsü	2006- Halen
2.	Teknik Uzman, Denetçi	Ulusal Sistem Belgelendirme	2005-2006
3.	Gıda Güvenliği Danışmanı	Food Hygiene Training Center/ Londra	2003-2004

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	İyi	Çok iyi	iyi	72.500	IELTS:6.5

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	69,005	65.948	61.948
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office (MS Word, MS Excel)	Çok iyi
Adobe Photoshop	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Öncü (Kısıkkaya), Arun, Ö,Ö, Raf Ömrü Boyunca Sıcaklık Değişimlerine Maruz Kalan Kaymaklarda *Listeria monocitogenes* Gelişiminin incelenmesi, 5.Ulusal Veteriner Gıda Hijyen Kongresi, Page:49-50,03-06 Nisan 2013.

Öncü (Kısıkkaya), Bakan, A., Aslan, O., Öncü, N.A., Bahar,B., Pelvan, E., Alasalvar, C., Ozcan, N., Dogan, C., Demirtaş, İ., Çevikkalp, S., Yaman, M., Agel, E., Oktay, İ., Ozer, H., Sunay, A.E., Samancı, T., Daştan, 'Royal Jelly: Quality, Safety and Authenticity.II.International Symposium on Bee Products Abstract Book (Bragança-Portekiz,09-12/09/2012), T. Page 43, 2012.

Öncü (Kısıkkaya), N.A, Gıda endüstrisinde "Provokasyon testinin (challenge test)" önemi, Dünya Gıda Dergisi, 10: 45-47, 2011.

Kısıkkaya, N.A, Borcaklı, M, Salo, S, Wirtanen, G, FP-6 SAFOODNET Research Report No: VTT-R-04963-09 Pilot Case 7, Hygiene in Turkish Food Research, July 6.2009.

Kısıkkaya, N.A, "Microbial Risk Management in food processes" **N. Aslı KISIKKAYA** 2nd Workshop arranged by SAFOODNET, Monitoring of Microbes on Process Surfaces and Personnel, Book of Abstracts, ISBN 978-951-38-6343-1. October 13-15, 2008.

Kısıkkaya, N.A, "Quality of Black and Herbal Tea from Turkish Market-Abstract Sayısı:1425, TÜBİTAK 2. Uluslararası Gıda ve Beslenme Kongresi, 24-26 Ekim 2007.

Kısıkkaya, N.A, "Risk Assessment in Miscellaneous Food Processing Industries including Producers of Vegetables and Spices", Risk Assessment of microbial problems and Preventive actions in food industry, 2ndOpen Seminar arranged by SAFOODNET, Book of Abstracts; ISSN 0357-9387, Ekim 2007.

Kısıkkaya, N.A, "Food Safety Providing System for auditing of Private label producer in 2004 2006", Microbial Contaminants & Contamination Routes in food industry, 1stOpen Seminar arranged by SAFOODNET, Book of Abstracts; ISSN 0357-9387, January 2007.

Sözlü Bildirimler

1. N. Aslı KISIKKAYA, Ceyda Pembeci: "The Microbiological quality of Black and Herbal Tea from Turkish Market' TÜBİTAK 2. Uluslararası Gıda ve Beslenme Kongresi, Abstract Sayısı:1425. 24-26 Ekim 2007

2. N.A. Kısıkkaya, Risk Management in Dairy Sector, Safoodnet Microbial Risk Management in Food Process 2nd Workshop, Technical University of Denmark, DTU, October 13-15,2008.

3. N.A. Kısıkkaya, Risk Management in Ready to Eat Industry, SAFOODNET Hygienic Design and Risk Management & Efficient Sanitation Programme Seminar. Technical St.Olav's Otel, Tallinn, ESTONIA May 4, 2009.

4. N.A. Öncü, Ö.Ö, Arun, Raf Ömrü Boyunca Sıcaklık Değişimlerine Maruz Kalan Kaymaklarda *Listeria monocitogenes* Gelişiminin İncelenmesi, 5.Ulusal Veteriner Gıda Hijyen Kongresi, Page:49-50, 03-06 Nisan 2013.

5. N.A.Öncü, Bakan A., Aslan Ö, Microbiological Evaluation of bee pollens collected from various countries, From Hive to Table Congress, Book of Abstracts, Oral Presentation, 2015.

Sertifikalar

15-16 Mart 2012, 'Update Microbial Safety of Fresh Produce' sertifikası. Safeconsortium-Bükreş-Romanya

15-19 Mart 2010 (1.4 ECTS)-12 th International Advanced Course "Management of Microbiological Hazards in Foods" Certificate. The Graduate School VLAG & Wageningen University, The Netherlands.

20-25 Haziran 2010 (1.5 ECTS)- Quantitative Microbial Risk Assessment Summer School, Certificate, Univerisity of technology & KWR Watercycle Research Institute, The Netherlands.

5-6 Ekim 2010 Preparation of Certified Reference materials Certificate -JRC European Commision & UME TÜBİTAK, IRM- Institute for Referance Materials and Measurments.

25-26 Ekim 2010- "Advanced Tools for shelf-life and safety prediction in the food chain" katılım sertifikası. Safeconsortium- **Bilbao-Spain**.

13-15 Ekim 2008-SAFOODNET-FP6 project- Microbial Risk Management in Food processes Workshop. DTU-Denmark.

23-24 Ekim 2008- FP7 Interactive Workshop, **RTD** Services

22-23 Ekim 2007- SAFOODNET- FP6 Project- Risk Assessment of Microbial Problems and Preventive actions in Food Industry, Semineri. **İstanbul**

22-23 Ocak 2007 SAFOODNET-FP6 Project- Microbial Contaminants & Contamination Routes in Food Industry Semineri. **Espoo-Finland**.

21-26 Eylül 2006-Proje Yönetimi eğitimi Sertifikası-TÜSSİDE

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Çocuğuma zaman ayırmak, Müzik dinlemek, Kayak yapmak.