

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL VE ENDÜSTRİYEL MİKROBİYOLOJİ BİLİM DALI**

**ATP-BİYOLÜMİNESANS YÖNTEMİYLE PASTÖRİZE SÜTLERİN
MİKROBİYAL KALİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Pelin OK

**Danışman
Prof. Dr. Mustafa OSKAY**



MANİSA-2019

Pelin Ok

**ATP-BİYOLÜMİNESANS YÖNTEMİYLE PASTÖRİZE SÜTLERİN MİKROBİYAL
KALİTESİNİN BELİRLENMESİ**

2019

TEZ ONAYI

Pelin OK tarafından hazırlanan “**ATP-Biyolüminesans Yöntemiyle Pastörize Sütlerin Mikrobiyal Kalitesinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışması 18/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak savunulmuş ve **oyçokluğu / oybirliği** ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof. Dr. Mustafa OSKAY
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Evrim ÖZKALE
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. H. Tansel YALÇIN
Ege Üniversitesi



TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Pelin OK



	Sayfa
İÇİNDEKİLER	
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİL DİZİNİ	viii
TABLO DİZİNİ	ix
TEŞEKKÜR	x
ÖZET	xi
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pastörize Süt ve Mikroorganizmalar	3
2.1.1. Pastörize Sütün Mikrobiyolojik Kalitesini Etkileyen Faktörler	6
2.2. ATP ve ATP Biyoluminesans Yöntemi	7
2.2.1. Gıda İşleme Endüstrisinde ATP Testi	10
2.2.2. ATP Ölçümlerini Yorumlama	11
2.3. Mikroorganizmalar ve ATP	12
2.3.1. ATP'nin Mikrobiyal Konsantrasyon ile Korelasyonları	12
2.3.1.1. Hücre İçi ATP İçeriği ve Bunu Etkileyen Faktörler	12
2.4. Lüminesans Tabanlı ATP Testlerinde İçsel Sınırlamalar	14
2.4.1. ATP Biyoluminesans Testinin Avantaj ve Dezavantajları	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. MATERYAL	16
3.1.1. Pastörize Süt Örneklerinin Temini ve Kaynağı	16
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar	16
3.2. YÖNTEM	13
3.2.1. Kültürel Yöntemle Mikroorganizma Sayımı	23
3.2.1.1. Seyreltme ve Ön İşlem	23
3.2.1.2. Mikroorganizma Sayımı	23
3.2.1.2.1. Farklı Besiyerlerinde Kültürel Sayım	23
3.2.1.2.2. Hazır PetriFilm Besiyerlerinde Kültürel Sayım	25
3.2.2. Metilen Mavisi ile Mikrobiyolojik Analiz	26
3.2.3. Pastörize Süt Örneklerinde ATP Ölçümü	27
3.2.3.1. Pastörize Süt Örneklerinin Analize Hazırlanması ve Ön İşlem	27

3.2.3.2. ATP Ölçüm Prosedürü	27
3.2.4. Seçilen Mikroorganizmaların Tanımlanması	29
3.2.4.1. Morfolojik ve Kültürel Testler	29
3.2.4.2. Biyokimyasal Testler (API Testleri)'in Yapılması	29
3.2.4.3. Moleküler Tanımlama	30
3.2.4.3.1. DNA İzolasyonu İçin Hücre Pelletinin Elde Edilmesi	30
3.2.4.3.2. Genomik DNA İzolasyonu	30
3.2.4.3.2.1. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi	31
3.2.4.3.3. 16S rRNA Geninin PCR Amplifikasyonu	31
3.2.4.3.4. 16S rRNA Gen Dizi Verilerinin Analizi, Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması ve Filogenetik Dendogramlarının Oluşturulması	32
4. BULGULAR	34
4.1. Pastörize Süt Örnekleri ve Bazı Özellikleri	34
4.2. Kültürel Yöntemle Mikroorganizma Sayımı	35
4.2.1. Farklı Besiyerlerinde Kültürel Sayım Sonuçları	35
4.2.2. Hazır PetriFilm Besiyerlerinde Kültürel Sayım Sonuçları	38
4.3. Metilen Mavisi ile Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	41
4.4. Pastörize Süt Örneklerinde ATP Ölçüm Sonuçları	41
4.5. Seçilen Mikroorganizmaların Tanımlanması	45
4.5.1. Morfolojik ve Kültürel Test Sonuçları	45
4.5.2. Biyokimyasal Testler (API Testleri)'in Sonuçları	46
4.5.3. Moleküler Tanımlama	49
4.5.3.1. Genomik DNA İzolasyon Sonuçları	49
4.5.3.1.1. DNA Miktar ve Saflık Derecesi	49
4.5.3.2. 16S rRNA Geni PCR Amplifikasyonu Sonuçları	49
4.5.3.3. 16S rRNA Gen Dizi Verileri Analizi, Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması Sonuçları	50
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60
7. KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µm	Mikrometre
pH	Hidrojen Konsantrasyonunun Eksi Logaritması
ssp.	Subspecies (alt tür)
mL	Mililitre
gr	Gram
L	Litre
sn	Saniye
dk	Dakika
h	Saat
g/mL	Gram/Mililitre
rpm	Dakikada Dönüş Hızı (Round Per Minute)
%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
ATP	Adenozin Trifosfat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
dNTP	Deoksiribonükleozid Trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
DNaz	Deoksiribonükleaz
µL	Mikrolitre
OD	Optik Densite
UHT	Ultra High Temperature
kob	Koloni Oluşturan Birim
cfu	Colony Forming Unit
Gr (-)	Gram Negatif
Gr (+)	Gram Pozitif
HTST	High Temperature Short Time
HPC	Heterotrofik Plaka Sayımı
MRSA	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	Vankomisine Dirençli Enterokok
VBNC	Canlı Fakat Kültüre Edilemeyen
RLU	Relatif Işık Miktarı

ŞEKİL DİZİNİ	Sayfa
Şekil 3.1. ATP Ölçümü İçin Kullanılan Lüminometre ve Problemleri	28
Şekil 4.1. Farklı Kültürel Besiyerlerinde Ekim Sonuçlarına ait Örnek Görüntü	38
Şekil 4.2. 3M Petrifilm Kültürel Besiyerlerine Ekim Sonuçlarına ait Örnek Görüntü	40
Şekil 4.3. Metilen Mavisi İndirgeme Testlerine ait Örnek Görüntü	41
Şekil 4.4. API Biyokimyasal Testlerine ait Görüntüler	48
Şekil 4.5. Seçilen Bakterilerden Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüleri	50
Şekil 4.6. Seçilen ve Tanımlanan Strainlerin Yakın Bakteri Tip Türleri ile Evrimsel İlişkileri	52



TABLO DİZİNİ	Sayfa
Tablo 2.1. Sütte Patojenlerin Desimal (Ondalık) Azalma Süreleri	4
Tablo 3.1. PCR Reaksiyonu Bileşenleri ve Konsantrasyonları	32
Tablo 3.2. PCR ile Ürün Eldesi için Belirlenen Koşullar	32
Tablo 4.1. Süt Örneklerinin Alındığı Yerler ve Bazı Özellikleri	34
Tablo 4.2. Farklı Besiyerlerinde Kültürel Sayım Sonuçları	36
Tablo 4.3. Kültürel Sayımlarla Elde Edilen Mikroorganizma, Pozitif ve Negatif Örnek Sayıları Sonuçları	37
Tablo 4.4. Kültürel Sayım Sonuçları (3M PetriFilm)	39
Tablo 4.5. 3M Petrifilm Kültürel Sayımlarla Elde Edilen Mikroorganizma, Pozitif ve Negatif Örnek Sayıları Sonuçları	40
Tablo 4.6. ATP Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilebilmesi için Uyarlanan Standart Değerler	42
Tablo 4.7. Mikrobiyal ATP (RLU) Ölçüm Değerleri	43
Tablo 4.8. Kültürel Sayımlarda Belirlenen Bakterin Bazı Kültürel Özellikleri	45
Tablo 4.9. İzolatların Gram Reaksiyonu ve API 20E Biyokimyasal Test Sonuçları	47
Tablo 4.10. DNA ve Protein Miktarı ile Saflık Oranları	49
Tablo 4.11. 16S rRNA Dizilerinin Gen Bankası Verileri ile Karşılaştırılması	51

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bana böyle bir çalışma imkanı veren, araştırma konumun belirlenmesinde beni yönlendiren ve sonuçlanması için her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen aynı zamanda laboratuvar çalışmalarımda bana rehberlik eden, pratik ve teorik olarak tüm bilgi birikimlerini aktaran, kıymetli danışman hocam **Prof. Dr. Mustafa OSKAY**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, beni araştırmaya teşvik eden, çalışmalarıma ilgi göstererek yönlendiren, maddi ve manevi destek olan aileme ve eşim **S. Serkan EVREN**' e teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Manisa Celal Bayar Üniversitesi tarafından, Bilimsel Araştırma Projeleri (2016–152) kapsamında desteklenmiştir. Teşekkür ederim.

Pelin OK
Manisa-2019

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ATP-Biyolüminesans Yöntemiyle Pastörize Sütlerin Mikrobiyal Kalitesinin Belirlenmesi

Pelin OK

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa OSKAY

Pastörize sütlerin tüketimden önce mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi önemli bir adımdır. Günümüzde pastörize sütlerin mikrobiyal kalitesinin belirlenmesinde zahmetli ve uzun zaman alan kültür temelli, örneklemeden sonra 1-3 gün arasında sonuç alınabilen standart metotlar kullanılmaktadır. ATP biyolüminesans tekniği, pastörize süt kalitesinin belirlenmesinde yeni bir teknolojidir. Bu çalışma, pastörize sütlerin kalite kontrollerinin ATP biyolüminesans yöntemiyle yapılması, kültürel yöntemler ile korelasyonunun belirlenmesi ve nihayetinde seçilen mikroorganizmaların biyokimyasal ve moleküler olarak tanımlanmasını kapsamaktadır.

Pastörize süt örnekleri, Manisa ili yerel marketlerinden belli zaman aralıklarında örnekleme planı yapılarak uygun miktarlarda temin edilmiş ve kültürel yöntemlerle mikrobiyolojik analize alınmıştır. Mikrobiyolojik sayımlar sonucunda toplam aerobik mikroorganizma 10^5 kob/mL'lik pastörize süt bozulma sınırının altında bulunmuştur. *Enterobacteriaceae*, test edilen numunelerin %34 (n=17)'ünde belirlenmiş olup 10^4 kob/mL'nin altında kalmıştır, bütün süt örnekleri koliform açısından negatif sonuç vermiştir. Aerobik bakteriyel spor varlığı 33 (%66) örnekte tespit edilmiş; en düşük ve en yüksek olarak sırasıyla 1.0×10^1 ve 7.6×10^2 kob/mL olarak hesaplanmıştır. Termodurik mikroorganizma sadece 2 (%4) örnekte belirlenmiş olup en yüksek 2.0×10^2 kob/mL'dir. Petrifilm hazır kültürel besiyerlerine yapılan ekimler sonucu toplam aerobik mikroorganizma sayısı, 1.0×10^1 ila 1.1×10^3 kob/mL arasında değişen ortalama değerler göstermiştir. *Enterobacteriaceae* 34 örneğin 2 (%6)'sinde en yüksek 1.2×10^2 kob/mL olarak sayım limitinin altında bulunmuştur. Bununla birlikte, analize alınan örneklerin 1 (%3)'inde tipik *E. coli* tespit edilmiştir. Örneklerin hiç birinde maya/küf belirlenmemiştir.

ATP biyolüminesans tekniği ile analize alınan 50 farklı pastörize süt örneğinin ölçüm değerleri 46-9858 RLU arasında değişmektedir. Elde edilen standart değerlerimizle ATP biyolüminesans ölçüm değerlerini karşılaştırdığımızda pastörize süt örneğinin 4 (%8)'ünün kalitesinin kötü, 5 (%10)'nin şüpheli ve diğer geri kalanların kaliteli (%82) olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak pastörize sütlerin farklı selektif besiyerleri ve petrifilm kültürleri ile elde

edilen koloni sayımları ile ATP biyolüminesans ölçüm değerleri arasında korelasyon zayıf bulunmuştur.

Kültürel yöntemlerle izolasyonlar sonucu seçilen 11 farklı bakteri morfolojik, kültürel karakteristikleri, biyokimyasal testler ve 16S rRNA sekans verileri aracılığıyla tanımlanmışlardır. Belirlenen türler sırasıyla, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter johnsonii* (2 izolat), *Acinetobacter junii* (2 izolat), *Escherichia coli*, *Aeromonas media* (2 izolat) ve *Aeromonas hydrophila*,'dır. Ayrıca 2 bakteri ise cins bazında *Escherichia* sp. ve *Acinetobacter* sp. olarak tanımlanmıştır. Pastörize süt örneklerinden izole edilen ve tanımlanan bu bakteri türleri fırsatçı patojenlerdir.

Kültürel çalışmalar ve ATP yöntemi bulgularının topluca değerlendirilmesi ve nihai olarak fırsatçı patojenlerin tanımlanması ile 8 (%16) adet pastörize sütün kalitesinin standartlara uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Araştırma bulgularına göre, ATP biyolüminesans yöntemi ile pastörize sütlerin mikrobiyal yükünün belirlenmesinin mümkün olabileceği ancak patojenlerin tespiti için kültürel ve ileri testlerin yapılmasının zaruri olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: ATP biyolüminesans, Gıda sağlığı, Lusiferaz, Pastörize süt, Fırsatçı patojen.

2019, 85 sayfa.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

Determining the Microbial Quality of Pasteurized Milk through the ATP-Bioluminescence Method

Pelin OK

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa OSKAY

Microbiological control of pasteurized milk quality is an important step before it consumed. Current standard methods for determination of pasteurized milk microbial quality are culture based, which are laborious and time-consuming, where results not are available before one to three days after sampling. ATP bioluminescence technique is a new technology in determining the quality of pasteurized milk. This study presents the quality control of pasteurized milk by ATP bioluminescence method, correlation with cultural methods and finally biochemical and molecular identification of selected microorganisms.

Pasteurized milk samples were collected from local markets in Manisa province at certain time intervals and obtained in appropriate amounts and taken to microbiological analysis by cultural methods. As a result of microbiological counts, total aerobic microorganism was found below 10^5 cfu/mL pasteurized milk spoilage limit. *Enterobacteriaceae* was determined in 34% (n=17) of the samples tested and was below 10^4 cfu/mL, all milk samples were negative for coliform. The presence of aerobic bacterial spore was detected in 33 (66%) samples; the lowest and highest values were calculated as 1.0×10^1 and 7.6×10^2 cfu/mL, respectively. The thermoduric microorganism was determined in only 2 (4%) samples with a maximum of 2.0×10^2 cfu/mL. The total number of aerobic microorganisms, as a result of the cultivation on Petrifilm ready culture media, showed average values ranging from 1.0×10^1 to 1.1×10^3 cfu/mL. *Enterobacteriaceae* was found to be below the counting limit as 1.2×10^2 cfu/mL in 34 of 2 (6%) samples. However, typical *E. coli* was detected in 1 (3%) of the samples. Yeast/mold was not detected for none of the milk samples.

The measured values of 50 different pasteurized milk samples analyzed by ATP bioluminescence technique ranged from 46-9858 RLU. When we compared the measured values of ATP bioluminescence with our standard values, it was concluded that 4 (8%) of the 50 pasteurized milk samples were analyzed bad quality, 5 (10%) were suspicious and the rest were good quality (82%). However, between colony counts obtained with petrifilm cultures or

different selective media and ATP bioluminescence measurement values of pasteurized milk were found to be weak correlation.

11 selected different bacteria as a result of isolation by cultural methods are identified by morphological, cultural characteristics, biochemical tests and 16S rRNA sequence data. The identified species are *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter johnsonii* (2 isolates), *Acinetobacter junii* (2 isolates), *Escherichia coli*, *Aeromonas media* (2 isolates) and *Aeromonas hydrophila*, respectively. In addition, 2 bacteria on the genus level were identified as *Escherichia* sp. and *Acinetobacter* sp. These bacterial species isolated and identified from pasteurized milk samples are opportunistic pathogens.

It is concluded that the quality of 8 (16%) pasteurized milk is not in accordance with the standards by collectively evaluating the cultural studies and ATP method findings and ultimately identifying opportunistic pathogens. According to the research findings, it is possible to determine the microbial load of pasteurized milk by ATP bioluminescence method but it is necessary to conduct cultural and advanced tests for the detection of pathogens.

Keywords: ATP bioluminescence, Food safety, Luciferase, Pasteurized milk, Opportunistic pathogen.

2019, 85 pages.

1. GİRİŞ

Dünyada yılda 121 milyar litre tüketilen sütün %65'i günlük süt (pastörize süt)'dür. Türkiye'de ise 1 milyar litre sade sütün sadece %5'inin günlük süt olarak tüketildiği vurgulanmaktadır. Ancak ülkemizde pastörize süt tüketimi her geçen gün artmaktadır [1]. Pastörize sütün raf ömrü, UHT (Ultra High Temperature) sterilize süte göre daha kısadır. Pastörize içme sütünün dayanıklılığı, öncelikle ham madde olarak kullanılan çiğ sütün kalitesine bağlıdır. Bu nedenle üretim koşullarının teknik ve hijyenik bakımdan optimize edilmesi ve tüm işlemlerin son derece kusursuz gerçekleştirilmesi çok önemlidir. Yüksek kaliteli çiğ süttten uygun teknik ve hijyenik koşullar altında üretilen pastörize süt, ambalajı açılmaksızın 5-7 °C'de yaklaşık 5-21 gün muhafaza edilebilmektedir. Ancak çiğ sütte ısıya dirençli enzimleri salgılayan (lipaz ve proteazlar) mikroorganizmalar (*Pseudomonas* sp. üyeleri) ve sporlar (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* gibi) kontaminasyon söz konusu ise bu süre belirgin şekilde kısalmaktadır. Pastörize sütteki canlı mikroorganizma sayısı mL'de 10^6 - 10^7 koloni oluşturan birim (kob) düzeyine ulaştığında raf ömrü sona ermektedir [2].

Süt ve süt ürünleri metabolizmaları oldukça hassas olan, çocuklar, hamile kadınlar ve yaşlılar tarafından çok fazla tüketilen değerli gıda maddelerindedir. Günlük süt ürünlerini üreten firmalar üretim işlemlerinin tüm basamaklarını kontrol etmelidir ve bu tür ürünlerin *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, aflatoksin üreten küflerden vs. gibi patojenlerden arındırılmış olduğundan emin olmalıdırlar [3]. Bu tür patojenler sıcaklığa duyarlı olduklarından sterilizasyon işlemleriyle kolayca bertaraf edilirler. Pastörizasyon işlemlerinde daha ılımlı koşullar uygulandığından bazı patojen mikroorganizmalar canlı kalabilirler [4]. Patojenlerin kültürel yöntemlerle tespiti yüksek miktarlarda örnek kullanımını, yoğunlaştırmayı ve çok fazla farklı tip/miktarda selektif/ayırt edici besiyerlerinin kullanımını gerektirmekte olup oldukça pahalıya mal olmaktadır. Hatta düşük miktarlardaki patojenler ile kültürasyonu için kompleks besiyerine gereksinim duyan mikroorganizmalar tespit edilememektedir.

Pastörize edilecek sütün en önemli kalite ölçülerinden biri de hijyenik niteliğidir. Bu durumda bakteri sayısı, bakteri türü, toksinler ve özellikle de sığağa dirençli enterotoksinler dikkate alınmalıdır. Bakteri sayısı çok yüksek çiğ sütler, pastörize süt üretimi için uygun değildir. Çünkü pastörizasyon işlemi süte uygulanan sıcaklık/süre normunda yaklaşık %99 düzeyinde bakteri redüksiyonu sağlanabilmekte, yani sütteki bakterilerin %1'i canlı kalmaktadır. Bu yüzden çiğ süt içerisinde bulunan bakteri sayısı kadar bakterinin cinsi de

önemlidir. Eğer sıcağı seven (termofilik) ve sıcağa karđı dirençli olan (termodurik) bakteri sayısı fazla ise, bunların pastörizasyon normunda redüksiyonları oldukça zordur [5].

Pastörize günlük süt ürünlerinin raf ömrünü kısaltan en önemli faktörlerden birisi ısıll işlemlerden sonra gram negatif [Gr (-)] psikrofilik bakterilerin ürüne bulaşmasıdır. Bu tür kontaminasyonlar genellikle ileri-pastörizasyon işlemleri esnasında gerçekleşmekte olup, bu aşamadan sonra herhangi bir işlem yapılmadığından dolayı sütün raf ömrü kısalmaktadır. Tüketime sunulan bu tür pastörize ürünler doğrudan halk sağlığını ilgilendirmekte ve oldukça önemlidir.

Bu çalışmada pastörize sütlerin mikrobiyal yükünün hızlı ve güvenilir bir teknik olan ATP ölçüm esaslı yöntemle belirlenmesi ve kalite kontrollerinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında pastörize sütlerin kültürel yöntemlerle mikrobiyal analizinin yapılarak ATP ölçüm tekniğiyle elde edilen sonuçlarla bir korelasyon olup olmadığı ortaya çıkarılacaktır. Böylece giderek tüketimi artan pastörize sütlerle ilgili modern tekniklerin uygulanarak mikrobiyal yüklerinin daha doğru sonuçlarla ortaya çıkarılması sağlanacak, bu tür gıda ürünlerindeki patojenlerin tüketilmeden önce hızlı tespiti ile halk sağlığı korunacak ve insanlara bulaşabilecek hastalıkların önüne geçilmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pastörize Süt ve Mikroorganizmalar

Süt pastörizasyonunun amacı, sütün içinde olduğu varsayılan patojenleri öldürerek sıvı sütün güvenliğini sağlamak ve istenmeyen enzimleri yok etmek, bozulmaya neden olan canlı mikroorganizmalarının sayısını azaltarak raf ömrünü uzatmaktır.

Pastörizasyonun hedefi, canlı mikroorganizmalarda %99.99 (5 log) azalma elde etmektir. Pastörizasyon, gıdadaki tüm mikroorganizmaları (patojen ve bozulmaya neden olan diğer mikroorganizma ve ürünlerini) öldürmek olan ticari sterilizasyonla karıştırılmamalıdır. Pastörizasyon genellikle, ayırma, standardizasyon ve homojenizasyonla birlikte sürekli ısı işlem kullanan yüksek sıcaklık-kısa süreli ekipmanlarla sağlanır. Pastörizasyon için önerilen sıcaklık-zaman kombinasyonları, mikrobiyal öldürmeyi optimize etmek ve sütün beslenme kalitesi üzerindeki olumsuz etkiyi en aza indirmek için seçilmiştir. Suda çözünen vitaminler özellikle ısıya duyarlıdır ve pastörizasyondan sonra aktivitelerinin %5-20'sini kaybederler. Pastörize süt steril olmadığından soğutma altında depolanmalı ve dağıtılmalıdır. Pastörize sütün raf ömrü genellikle, çiğ süt kalitesi ve pastörizasyon sonrası kontaminasyon kontrolü ile bağlantılıdır. Yaygın pastörize süt türleri arasında tam yağlı süt, az yağlı süt ve yağsız sütün yanı sıra aromalı süt, organik süt, az laktozlu süt ve seçilmiş besinlerle takviye edilmiş süt içecekleri bulunur [6].

Süt pastörizasyonu, çoğunlukla çiğ sütle ilişkili hastalıklara neden olan sıcaklığa dirençli, spor yapmayan organizmaları etkisiz hale getirmek için gereken minimum sıcaklık ve zaman kombinasyonunu sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. Başlangıçta en önemli hedef organizma, tüberküloza (*Mycobacterium bovis* veya *M. tuberculosis*) neden olan bakteridir. 1950'lerde, minimum pastörizasyon sıcaklığı, ısıya daha dirençli ve Q-ateşine neden olan, çiğ süt bakterisi *Coxiella burnetti*'yi yok etmek için biraz daha artırılmıştır. Günümüzde pastörizasyon için kullanılan en yaygın minimum sıcaklık ve zaman şunlardır:

161 °F (72 °C) 15 saniye (Yüksek Sıcaklık Kısa Süre)

145 °F (63 °C) 30 dakika (Düşük Sıcaklık Uzun Süre).

Sıcaklığa en dirençli patojenleri yok eden pastörizasyon koşulları, diğer potansiyel patojenlerin öldürülmesini sağlar ve ek olarak bozulmaya neden olan diğer birçok bakteri türünü de yok etme avantajına sahiptir [7].

Tablo 2.1. Sütte Patojenlerin Desimal (Ondalık) Azalma Süreleri [8].

Patojen	Sıcaklık (°C)	Zaman
<i>Bacillus</i> spp.	95.0	1.2-36.0 dk*
<i>Bacillus</i> spp.	100.0	2.0-5.4 dk
<i>Brucella abortus</i>	61.5	23 dk
<i>Brucella abortus</i>	72.0	12-14 sn
<i>Campylobacter</i> spp.	60.0	0.12-0.14 dk
<i>Clostridium botulinum</i>	100.0	240 dk
<i>Clostridium botulinum</i>	125.0	5 sn
<i>Coxiella burnetii</i>	62.2	30 dk
<i>Coxiella burnetii</i>	73.4	15.2-17 sn
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	63.0	16.2 sn
<i>Listeria monocytogenes</i>	63.3	33.3 sn
<i>Listeria monocytogenes</i>	68.9	7.0 sn
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	63.0	12.2-17.8 sn
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	66.0	5.2-6.3 sn
<i>Mycobacterium bovis</i>	64.0	6.6 sn
<i>Mycobacterium bovis</i>	69.0	0.6 sn
Pathogenic <i>Streptococcus</i>	66.0	0.1-0.2 dk
<i>Salmonella</i> spp.	62.8	0.11 dk
<i>Salmonella</i> spp.	71.7	0.004 dk
<i>Staphylococcus aureus</i>	65.0	0.2 dk
<i>Staphylococcus aureus</i>	75.0	0.02 dk
<i>Yersinia enterocolitica</i>	62.8	0.7-17.8 sn

*dk; dakika, sn; saniye.

Pastörizasyon, mikrobiyal riskleri azaltmada etkiliyken, bazı bakteriler pastörizasyondan sağ çıkar; bunlara termodurik bakteri denir. İnek için doğal olarak kabul edilen bakterilerin çoğu (örneğin, ciltte, göğüslerde bulunanlar gibi) ve ayrıca mastitis'e neden olan bakterilerin çoğu termodurik olarak kabul edilmez. Sütte bulunan termodurik bakteriler en yaygın olarak bazı kirlilik kaynakları ile ilişkilidir [7].

Taze pastörize sütün başlangıçtaki mikroflorası, genellikle çiğ sütün içinde bulunan gram-pozitif [(Gr (+)] termodurik organizmaları yansıtır. Gr (-) bakteriler genellikle çiğ sütün içindeki toplam bakteri sayıları, pastörizasyon işleminin termal tahribat kapasitesini aşmadıkça pastörizasyondan geçemez [9]. İşlenmiş süt ürünlerinden izole edilen termodurik bakteriler arasında *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Arthrobacter*, *Lactobacillus*; ve ayrıca *Bacillus*, *Paenibacillus* ve *Clostridium* gibi spor oluşturucular bulunmaktadır [10]. Taze pastörize edilmiş sütlerde *Bacillus* türleri arasında

en sık izole edilenler genellikle *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans* ve *B. subtilis*'dir [11]. Pastörizasyon için kullanılan spesifik işlem parametreleri, pastörizasyonda hayatta kalan bakteri tiplerinin nispi oranlarını etkileyecektir. Sporlu bakteriler için daha yüksek sıcaklıklar ve/veya daha uzun zaman seçmek uygun olacaktır. Çiğ sütün genel olarak pastörize sütün içindeki termodurik organizmaların ana kaynağı olduğu düşünülmese de rağmen, yanlış şekilde temizlenmiş bir süt işletme tesisi de büyük miktarlarda buna katkıda bulunabilir; kirlenme pastörizasyon işleminden önce, sırasında veya sonrasında ortaya çıkabilir [12].

Çoğu termodurik bakteri suşları, soğuk depolama koşullarında pastörize sütte ürememektedir. Bununla birlikte, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Arthrobacter* ve *Lactobacillus*'un psikrotrofik türleri tanımlanmıştır [9]. *B. cereus* suşlarının (ve ilgili organizmaların) sütün "tatlı kesilmesine" ve kremaya neden olduğu anlaşılmıştır. *Bacillus* ve diğer psikrotrofik spor oluşturucularla ilişkilendirilen diğer süt bozulmaları, süt proteinlerinin pıhtılaşmasının yanında acı tat oluşumudur. Ayrıca, *Bacillus* spp. gibi psikrotrofik Gr (+) organizmalar pastörize sütün raf ömrünü sınırlamaktan da sorumlu olabilir. 6.1 °C'de 14 gün sonra toplam bakteri sayısı 10⁶ kob/mL'yi aşan ticari pastörize süt numunelerinin dominant mikroflorasını Gr (-) çubuklar oluşturmasına rağmen, aynı örneklerden Gr (+) koklar izole edilmiştir [13]. Başka bir çalışmada, süt numunelerinin yaklaşık %7'sinde *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve diğer tanımlanamayan Gr (+) bakteri suşları, 7 °C'de iki hafta sonra 10⁷ kob/mL olarak bulunmuştur. Çoğu termodurik psikrotrof, özellikle spor oluşturanlar, süt ürünlerinde daha yavaş ve/veya daha sonra büyüme eğilimindedir. Bu nedenle, daha sonra raf ömründe kalite endişelerine neden olurlar ve *Pseudomonas* spp. gibi daha hızlı büyüyen pastörizasyon sonrası bozulmalara neden olan mikroorganizmaların yokluğunda baskın hale gelirler [14].

Gıda kaynaklı potansiyel bir patojen olan *B. cereus*, yaygın olarak sütte bulunmasına rağmen, *B. polymyxa* ve *B. circulans*'ın aksine düşük soğutma sıcaklıklarında (<5 °C) büyümeyebilir. 5 °C'de 3 hafta ve 7 °C'de 2 hafta boyunca tutulan çift süt numunelerinin sırasıyla %66 ve %86'ından *B. polymyxa* izole edilmiş olup sadece 7 °C'de 2 hafta boyunca tutulan çiğ süt numunelerinin %18'inden *B. cereus* izole edilebilmiştir. 5 °C'de tutulan üründe ise *B. cereus* izole edilememiştir. Bu durum artan sıcaklığın, organizmaların üreme yeteneklerini etkilediğini göstermektedir [7, 14].

2.1.1. Pastörize Sütün Mikrobiyolojik Kalitesini Etkileyen Faktörler

Pastörize sütün raf ömrü; çiğ sütün kalitesi, işlenmeden önce çiğ sütün depolanma süresi, kullanılan ısı işlem, ısıya dirençli mikroorganizmaların konsantrasyonu, pastörizasyon sonrası kirletici maddeler, ışık, paketleme sistemi ve pastörizasyon sonrası saklama koşullarından etkilenmektedir.

Sütün tipi: Sütün türü, farklı kimyasal kompozisyon ve enzim aktivitesinden dolayı sütün raf ömrünü etkiler. Önemli derecede, 4.5 °C veya 7 °C'de depolama sırasında yağsız sütün tam yağlı sütün daha düşük raf ömrü, yağsız sütün içindeki nispeten daha yüksek proteaz aktivitesine veya proteazın inhibe edilmesine veya proteinin bütün olarak yağ nedeniyle enzimatik proteolizden korunmasına bağlanabilir.

Çiğ sütün mikrobiyolojik kalitesi: Pastörize sütün mikrobiyolojik kalitesi, çiğ sütün içinde bulunan organizmaların tipinin yanı sıra mikrobiyal yüke de bağlıdır. Çiğ süt, *Bacillus* spp. ve *Paenibacillus* spp. gibi ısıya dayanıklı farklı cinslerin sporlarını içerebilir. *Paenibacillus* spp. soğutma sıcaklıklarında büyüyebilir ve sınırlı raf ömrü için ana faktörü temsil eder. Çiğ sütte toplam mikrobiyal floranın en büyük kısmını termodurik ve termofilik organizmalardan ziyade psikrofilik organizmalar (çiğ sütte %98, pastörize sütte %53 oranında) oluşturur [15]. Gr (+), aerobik veya fakütatif anaerobik olarak spor oluşturan, hareketli, çubuk şeklinde bir bakteri olan *Bacillus cereus*, termal olarak dirençlidir ve süt pastörizasyonuna dayanabilir. Dolayısıyla pastörizasyon ile rekabetçi spor oluşturmeyen bakteriler kaldırılarak psikrofilik spor çimlenmesi buzdolabında depolama sıcaklığında tetiklenebilir [16].

Kullanılan ısı işlem: Gıda kaynaklı mevcut organizma sayısında azalmaya neden olan ve uygulanan ısı işlem; organizmaların özellikleri, organizmanın farklı suşlarının ısıya duyarlılıklarındaki çeşitlilik, işlemde önce organizmanın fizyolojik durumu ve gıdanın kimyasal bileşimi gibi faktörlerden etkilenir [17].

Normal pastörizasyon sıcaklık ve süreleri sütteki bakteri tipi ve başlangıçtaki bakteri konsantrasyonuna dayanmalıdır. Sütün düşük sıcaklıkta pastörize edilmesi, sütteki düşük bakteri sayısını indüklemektedir. Sütün 72.9-85.2 °C sıcaklık aralığında ısıtılması, farklı bakteriyel cinsler üzerinde öldürücü etkide herhangi bir değişiklik göstermemekte, ancak sütün içinde bulunan endospor oluşturan psikrotolerant bakterilerin pastörize sütte daha etkili bir şekilde büyümesine neden olabilmektedir.

Saklama koşulları: Pastörize sütün 2-21 gün raf ömrü vardır ve çiğ sütün kalitesine, işleme yöntemine, doldurma sırasındaki hijyen koşullara ve tüm soğuk zincir boyunca sıcaklığın korunmasına bağlıdır [18]. Depolama sıcaklığı pastörize sütün mikrobiyolojik raf ömrü üzerinde daha büyük bir etkiye sahiptir ve soğutulmuş pastörize süt 6.1 °C'de depolandığında yaklaşık 10-20 günlük bir raf ömrüne sahiptir. 4-6 gün 4 °C'de saklanan pastörize süt 15 °C gibi yüksek bir sıcaklıkta depolandığında mikrobiyal aktivitenin 15 kat daha fazla olduğu kaydedilmiştir [8].

Pastörizasyon sonrası kirlenici maddeler: İşlenmiş sıvı sütte mikrobiyal bozulma, pastörizasyon sıcaklıklarında hayatta kalan Gram (+) ve/veya Gram (-) organizmalardan veya pastörizasyon sonrası kontaminasyondan kaynaklanır. Süt ürünlerinin pastörizasyon sonrası kontaminasyonları esasen dolum makineleri ve biyofilmlilerden kaynaklanmaktadır. Pastörizasyon sonrası süt temas yüzeylerinin özellikle *Bacillus cereus*'dan yalıtılması, pastörizasyon ve sanitasyon işlemlerinin etkinliğini artırmaktadır. Bu süt temas yüzeylerinde bakteri sayısı 10⁸ kob'a kadar ulaşabilmektedir [8, 14].

Pastörize sütün daha uzun raf ömrü için proses yenilikleri: Süt içeren kabın üst boşluğunun CO₂ ve N₂ ile doldurulması bakteri sayısındaki düşüşe, proteolitik ve lipolitik aktivitelerin azalmasına neden olduğu için pastörize sütün raf ömründe uzamaya sebep olmaktadır [8].

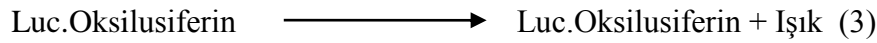
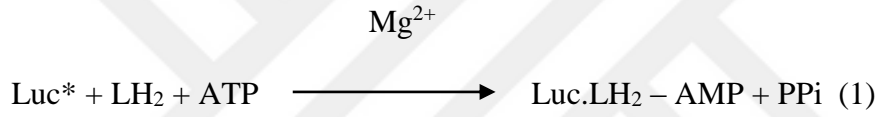
HTST pastörizasyonu, spor oluşturan bakterileri yok etmede genellikle etkisizdir. Mikrofiltrasyon kullanılarak sütteki sporlar ayrılabilir ve pastörizasyon daha verimli hale getirilebilir. Te Giffel ve van der Horst [12], mikrofiltrasyon (% 99.1-99.9) kullanarak daha fazla aerobik sporun süttten uzaklaştırıldığını bildirmiştir. HTST pastörizasyonundan (72 °C/18.6 sn) önce 10 dakika boyunca mikrofiltrasyon yapılarak elde edilen pastörize sütler 4 °C'de saklandığında 7 güne kadar sporlu bakteri üremesi göstermemiştir [8, 14].

2.2. ATP ve ATP Biyoluminesans Yöntemi

Canlı organizmalarda meydana gelen kimyasal bir reaksiyonun sonucu olan biyoluminesans, doğada yaygın bir fenomendir. Bu konuyla ilgili bilimsel araştırmalarla, ilki lusiferaz ve ikincisi lusiferin denilen enzim-substrat sisteminin keşfedilmesine yol açmıştır (Latince Lucifer'den "Işık Getiricisi" anlamındadır). Tüm biyoluminesan organizmalar arasında ateşböcekleri özellikle Kuzey Amerika ateşböceği *Photinus pyralis* (Takım: Coleoptera, Aile: *Lampyridae*) en çok incelenen ve en iyi karakterize edilen organizmadır [19].

Ateşböceği lusiferazı; oksijen 4-oksidoredüktaz (dekarboksilasyon, ATP-hidrolizi) Photinus-lusiferin olarak sınıflandırılır (EC 1.13.12.7). Substratı ateşböceği lusiferindir (LH₂) ve reaksiyon ATP, oksijen ve metalik bir katyon gerektirir. Lusiferaz için tipik emisyon spektrumu sarı-yeşil bölgede (550-570 nm) olup, 562 nm'de ve bazik ortamda (pH 7.5-7.8) zirveye ulaşır. Bununla birlikte, lusiferaz pH'a duyarlı bir enzimdir ve asit ortamda (pH 5-6) emisyonu kırmızı bölgeye (en fazla 620 nm'de) geçer, ayrıca daha yüksek sıcaklıklara ve ağır metal katyonlarına ihtiyaç duyabilir [19].

ATP bütün canlı hücrelerde enerji taşıyan temel moleküldür ve enerjisini hücresel fonksiyonlarda gerekli enzimlere aktarmakta, hücre ölümünden sonra otolisiz ile yıkılmaktadır. Lusiferin/Lusiferaz kompleksi kullanıldığında ortaya çıkan ışık miktarı ortamdaki ATP miktarıyla doğrudan ilişkilidir. Dolayısıyla örnekteki mikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde ATP yararlı bir parametredir. ATP-biyoluminesans metodu çok adımlı bir işlem olup biyokimyasal reaksiyonları aşağıda görüldüğü gibidir [20]:



* Luc: Lusiferaz, LH₂: D-Lusiferin

Günümüzde gıdaların mikrobiyolojik kalitesi heterotrofik plaka sayımı (HPC) ve beraberinde *E. coli* ve enterokoklar gibi koliformların (fokal indikatörlerin) belirlenmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu tür kültürel metotlarda genellikle sonuçlar örneklemeden sonra 1-3 gün arasında alınabilmekte ayrıca kültüre edilemeyen fakat canlı olan (unculturable, VBNC) mikroorganizmalar ise belirlenmemektedir. Son zamanlarda gıdalardaki mikroorganizmaların sayısının belirlenmesi ve tanımlanmalarında yeni/hızlı metotlar ve aletler kullanılmaktadır. Bu hızlı metotlar arasında; direk epifluoresan filtre tekniği (DEFT), flow sitometresi (FCM), bazı biyosensörler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ribotiplendirme, mikroarray gibi aglütinasyon/immünojenik teknikler yer almaktadır [20-22]. Yeni yöntemlerden bir tanesi de hızla farklı alanlarda uygulama imkânı bulan ve özellikle gıdaların kalite kontrolünün belirlenmesinde kullanılan **ATP biyoluminesans**

yöntemidir [23]. Yöntem hızlı, basit, ekonomik ve oldukça hassas olup, ilk uygulamaları 1950'li yıllarda NASA bilim adamları tarafından farklı gezegenlerde canlı hücrelerin varlığının araştırılmasında kullanılmıştır [24]. Bu yöntem Avrupa ülkelerinde özellikle içme ve kullanma suları, meyve suları, süt ve süt ürünleri ile et ürünlerinin mikrobiyal kalite kontrolünde, bina içi mikrobiyal yükün ortaya çıkarılması, klinik materyallerin ve aletlerinin hijyenite kontrolünde vb. başarılı bir şekilde uygulanmaktadır [25-28].

Günlük süt ürünlerinin ileri-pastörizasyon işlemlerinde kontaminasyonu belirlemeye yönelik çok sayıda metot tanımlanmıştır. Bu yöntemlerden bazıları ön inkübasyonda (37 °C' de 24 saat) Gr (-) bakteri inhibitörlerinin (Benzalkon A ve kristal violet gibi) kullanılarak psikrofilik organizmaları belirlemeye yöneliktir. Bu işlemlerden sonra yani ön işlemden geçmiş pastörize süt örneklerinde ATP ölçümüne bağlı olarak bakteri sayısı çok daha doğru bir şekilde belirlenebilmektedir [29]. Ön inkübasyonda psikrofilik Gr (-) bakterilerin 1 litre (L) pastörize süt örneğinde dahi tespit edilebileceği vurgulanmaktadır [30]. Ancak yapılan diğer bir çalışmada ön inkübasyonun 21 °C'de 25 saat (h) süreyle kristal violet (20 µg/mL), penisilin (200 U/mL) ve nisin (400 U/mL) inhibitörleri varlığında yapılması ile Gr (-) psikrofilik mikroorganizmaların çok daha iyi belirlenebildiği tespit edilmiştir. Pastörize sütlerin ve kremanın mikroorganizmalara bağlı olarak raf ömrü, örneklerin ön inkübasyondan geçirilmesi ve nihayetinde ATP biyoluminisans yöntemine tabi tutulması ile çok daha doğru olarak belirlenebilmekte ve elde edilen sonuçlar Avrupa komitesinin kalite testlerine uygunluk göstermektedir [31].

Süt ve süt ürünlerinin mikrobiyolojik kalite kontrolleri ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunluğu ham (çiğ) süt üzerinedir [32]. Manzano ve ark. [33], aminopeptidaz aktivitesi tayini ile buzdolabında bekletilmiş çiğ sütlerde Gr (-) bakterileri tespit etmişler, bu tür gıda ürünlerinde genellikle psikrofilik Gr (-) bakterilerin özellikle de *Pseudomonas* spp. üyelerinin mikrobiyolojik bozulmaya yol açtığını belirtmişlerdir. Elde ettikleri bakteri sayısının hızlı tekniklerden DEFT ile elde edilen verilerle uyumlu oldukları sonucuna varmışlardır.

Cunha ve ark. [34], UHT sütlerin mikrobiyolojik kalite kontrollerini kültürel ve ATP biyoluminesans yöntemiyle belirleyerek karşılaştırmışlardır. Öncelikle UHT sütlerini 48, 72 ve 168 h ön-inkübasyona almışlar, Plate Count agar (PCA) ve Beyin-Kalp İnfüzyon agar (BHI) besiyerlerinde kültürel olarak mezofilik ve psikrofilik organizmaları tespit etmişlerdir. PCA ile elde edilen mezofilik bakteri sayısının ön işleme alınan ve ATP ölçümü ile elde edilen bakteri sayısı ile paralellik gösterdiğini, ancak ATP biyoluminesans yönteminin daha

pratik ve daha doğru sonuçlar verdiğini araştırmalarında vurgulamaktadırlar. Pastörize sütlerin üretim yerinden paketlenip tüketiciye sunuluncaya kadar temas ettiği alanların (Depolama tankı, taşıma tankı, dolum tankı, pastörize süt santrifüjü) hijyenite kontrolü temizleme-dezenfeksiyon öncesi ve sonrası ATP biyoluminesans yöntemiyle belirlenmiştir. İlave olarak kültürel çalışma ile elde edilen mezofilik bakteri sayısının ATP ölçümüne bağlı olarak çıkan sonuçlarla istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir [35].

2.2.1. Gıda İşleme Endüstrisinde ATP Testi

90'lı yılların orta başlarında ATP testlerinin sağlık sektöründe temizlik uygulamalarının izlenmesinde rol oynayabileceği önerisi, sağlıkla ilişkili enfeksiyonlarda kullanımında artışa neden olmuştur. Bu tür enfeksiyonların görülme sıklığı özellikle Batı ülkelerinde yaygındı ve etkileri o zamandan beri bu ülkeler için belgelenmiştir. Bu enfeksiyonlar genellikle hastane ortamlarında yaygınlaşmış ve antibiyotik direnci kazanmış bakterilerden kaynaklanmıştır. Enfeksiyonlardan birçok farklı bakteri sorumlu olmasına rağmen, en yaygın iki tanesi metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Clostridium difficile*'dir. 2005 yılına kadar, MRSA'nın İngiltere ve Galler'de neden olduğu yıllık ölümler, 1600'ün üzerinde zirveye ulaşmıştır [36]. Sonrasında *C. difficile*'nin sorumlu olduğu ölümler 8000'e ulaşmıştır. Her ne kadar görünüşte düşüşe rağmen, her ikisi de önemli sayıda ölüm nedenidir. Kaçınılmaz ölümler ticari kuruluşlara hastane temizliği sözleşmelerinin yolunu açmıştır. Sonuçta gıda işleme endüstrisindeki uygulamalarda kullanılan ATP testi sağlık sektöründe kullanılmaya başlamıştır [27].

Gıda endüstrisinde hızlı ATP tespit kitlerinin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu tür kitlerin kullanımı, tüm potansiyel kirletici organizmaların kabul edilebilir seviyelere düşürüldüğu gıdaların üretimini sağlayacak önlemleri sistematik olarak uygulamaya koymak için bir konseptin gıda endüstrisindeki kabul edilmesine yol açmıştır. Bu olgu, tehlike analizi ve kritik kontrol noktaları (HACCP) olarak bilinir. İlk olarak, gıda zehirlenmesine neden olabilecek patojenik mikroorganizmalardan arındırılmış yiyeceklerin astronotlara tedarik edilmesi ve korunması amacıyla multi-milyon dolarlık keşife yol açmıştır [37]. Gıda güvenliği tehlikesini önlemek veya ortadan kaldırmak veya kabul edilebilir bir seviyeye indirmek için kritik kontrol noktaları (CCP) oluşturulmuştur [27].

Bir gıda işleme tesisinde CCP, belirli bir gıdanın temas edebileceği yüzeylerin mikrobiyal kontaminasyon içermediğinden emin olmaktır. Örnek vermek gerekirse; yiyecekler mikro organizmaları barındıran bir yüzeye temas ederek kontamine olabilir [38].

Yüzeze yapışan herhangi bir yiyeceğin yıkama yoluyla uzaklaştırılması gerekecektir, zira bu tür yiyecekler yüzey üzerinde bırakıldığı takdirde, ortamda bulunan mikroorganizmalar için bir besin kaynağı olarak işlev görebilir. Yiyecek artıklarını uzaklaştırmakta başarısız olmanın sonucu, mikroorganizmaların yüzeyde çoğalabilmesi ve daha sonra kendisiyle temas eden yiyecekleri kontamine etmeye devam etmesine neden olacaktır. Yüzeylerin yıkanması, genel olarak herhangi bir mikroorganizmayı öldürmek için uygun bir dezenfektan uygulaması ile gerçekleştirilir. HACCP hükümleri, kritik kontrol noktalarının “kontrol altında” kalmasını sağlamak için düzenli zamanlarda izleme prosedürlerinin uygulanmasını gerektirir. CCP’lerde kontrol yüzeyden sürtüntü örneği alınması ve ardından uygun şekilde agarlı besiyerine aktarılmasını gerektiren geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerle yeterli bir şekilde başarılabilir. Bununla birlikte, bu yaklaşımın dezavantajı, agar plakalarının 48 saat boyunca inkübasyonunun gerektiğidir. Bekletme, yani ürünün dağıtım zincirinde serbest bırakılmaması - bu tür yerlerde işlenmiş gıdaların depolanması açısından pahalıya mal olur ve diğer birçok nedenden ötürü pratik değildir. ATP ölçümü şu anda sağladığı kolaylık nedeniyle, geleneksel mikrobiyal analizlere uygun bir alternatif sunarlar ve bir yüzeyde mikroorganizma varlığının saniyeler içinde tespit edilmesini sağlar [39]. Örnek vermek gerekirse, belirli bir yerde yüksek bir ATP okuması temizlik gerektiren bir müdahaleyi, yani bir temizliği gerektiren bir durumu belirtir. Tüm yiyecekler - ister bitki ister hayvan kökenli olsun - ATP içerir ve mikrobiyal ATP, genel olarak, bir gıda işleme ortamında belirli bir yüzeyde bulunabilecek toplam ATP’nin nispeten küçük bir kısmını temsil eder [27, 40].

2.2.2. ATP Ölçümlerini Yorumlama

Rutin işlemlerden sonra yapılan yüzey ATP ölçümleri, genel organik yüzey kirliliği seviyelerinin değerlendirilmesini sağlar. Bu ölçümler, temizlik kalitesinin bir göstergesidir, ancak doğrudan mikrobiyal yüzey kirlenmesinin bir göstergesi olarak yorumlanmamalıdır. ATP hijyen takibi, süt işleme [41] ve bira üretimi [42] dahil olmak üzere çeşitli gıda işleme ortamlarında kullanılmaktadır. Hem ATP testlerinin hem de mikrobiyolojik plaka sayımlarının aynı anda yapıldığı çalışmalar, temizlikten sonraki başarısızlıkları belirlemede yaklaşık %70’lik bir doğruluk sağlamaktadır [43]. Vakaların çoğunda, iki test arasındaki farkları ortaya çıkaran numunelerin geri kalan %30’unda, çok düşük plaka sayıları ile birlikte, temizleme işlemlerinde bir başarısızlığa işaret eden yüksek ATP okumaları alınmıştır. Bu tutarsızlık, büyük ölçüde mikroorganizmalardan arındırılmış olan yetersiz temizlik nedeniyle gıda kalıntılarının varlığından dolayı ATP sinyali üretilmesi ile

açıklanabilir. Tam aksine bazı çalışmalarda bakteri sayısının yüksek, ancak ATP'nin düşük olduğu vakalarda ortaya çıkmıştır ve yanlış negatif sonuçların alınmasına neden olmuştur [27].

2.3. Mikroorganizmalar ve ATP

2.3.1. ATP'nin Mikrobiyal Konsantrasyon ile Korelasyonları

Mikrobiyal sayımlar ile ATP seviyeleri arasında bir korelasyonun varlığına dair araştırmaların incelenmesi böyle bir korelasyonun varlığına dair güçlü kanıtlar içermektedir. Mikrobiyal sayılar koloni oluşturan birim (kob) ve ATP seviyeleri göreceli ışık birimleri (RLU) olarak ifade edilir. Ivancic ve ark. [44] idrardaki mikrobiyal patojenlerin tespiti üzerine, RLU'ların kob'lara karşı iyi bir korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Ancak çalışmaların çoğunda ATP ölçüm değerlerine hedef organizmalardan başka somatik hücrelerden ve diğer organik maddelerden gelen ATP'nin katkısının olabileceği vurgulanmaktadır. Bu durum, ticari olarak temin edilebilen az sayıdaki hızlı ATP test kiti ile çözümlenmiştir [27].

2.3.1.1. Hücre İçi ATP İçeriği ve Bunu Etkileyen Faktörler

Bireysel mikrobiyal hücrelerin ATP içeriği, farklı organizma taksonlarının mikrobiyal temsilcileri arasında spesifik farklılıklar göstermektedir. Ek olarak, bir organizmanın ATP havuzu büyüdüğü ortam ve fizyolojik koşullarından ya da çevresinden etkilenmektedir. Diğer taraftan bakteri, bakteriyel spor, maya ve küf sporları için hücre başına ATP molü değişkenlik göstermektedir. Ayrıca, laboratuvar ortamında kültür edilen bakterilerin doğal ortamlarındaki hücre başına düşen ATP miktarının çok daha az olduğu hesaplanmıştır. Bu durumun aksine, Li ve ark. [45] laboratuvar ortamında geliştirilen *Listeria monotostogenes* için hücre başına 3.44×10^{-21} mol ATP bulunduğunu ve doğal ortamından daha fazla olduğunu ortaya çıkarmıştır. Venkateswaran ve ark. [46] hücre başına 0.28×10^{-15} ila 2.5×10^{-15} mol arasında değişen bir ATP miktarını, ortamdaki izole ettikleri organizmalar için şaşırtıcı derecede yüksek belirlemişlerdir. Daha yakın zamanda Hattori ve ark. [47] 54 farklı laboratuvar ortamında yetiştirilmiş mikroorganizma türünün ATP içeriğini 0.4 ile 16.7×10^{-18} mol/kob olarak tespit etmişlerdir.

Ele alınması gereken ikinci husus, bir mikrobiyal hücrenin ATP içeriğinin sabit olup olmadığıdır. Fairbanks ve ark. [48], nem stresi ve besin durumunun topraktaki *Pseudomonas paucimobilis*'in büyümesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Hücreleri 'nem stresi' altında büyüttükten sonra, ortamın tekrar nemlendirilmesi ve ayrıca glukoz, amonyum tuzlarının

ilave edilmesi ile hücre ATP seviyelerinin 2.8-5.9 kat arttığını bulmuşlardır. Schneider ve Gourse [49], laboratuvarında yetiştirilen *E. coli*'deki ATP seviyelerinin büyüme hızıyla sabit kaldığını tespit etmiş ve önceki çalışmalarda büyüme oranına bağlı farklılıkların kullanılan yöntem nedeniyle hatalı olduğunu iddia etmişlerdir.

Mikroorganizmalar, çevresel streslere hayatta kalma stratejilerini harekete geçirerek yanıt verir. Bakteriyal sporulasyon böyle bir tepkidir ve esasen *Bacillus* ve *Clostridium* cinsine ait türlerde meydana gelir. Bazı spor oluşturmeyen bakteriler ise, yaygın olarak uyusukluk olarak nitelendirilebilecek bir duruma girerek sert ortamlarda hayatta kalabilmektedirler. Örneğin, yakın tarihli bir çalışma MRSA'nın kuru plastik yüzeylerde 1000 günden fazla hayatta kalma kabiliyetine sahip olduğunu bildirmiştir [50]. Bu gibi durumlarda metabolik aktivite çok düşük bir oranda korunmaktadır. Gengenbacher ve ark. [51], besin açlığına cevaben *Mycobacterium tuberculosis*'in ATP seviyelerini normalin altına düşürdüğünü ve bunun bir sonucu olarak, bakteri tüberküloz ilaçlarının etkilerine karşı koyabilmiştir. Li ve ark. [45], strese tabi tutulmuş *Listeria monocytogenes* hücrelerinin sukroz ilavesiyle aktive edildiğinde, ATP seviyelerini %250 yükselttiğini, strese tabi tutulmayan kontrollerde ise sadece %50 arttığını gözlemlemişlerdir.

Açlık ile ilgili ancak ondan ayrı olan "canlı fakat kültüre edilemeyen" (VBNC) durumda bakteriler dengesizliği korur, ancak yapay laboratuvar ortamında üreme yeteneğini kaybeder. VBNC durumuyla ilgili çalışmaların çoğu *Vibrio* cinsi üzerinde yapılmıştır [52]. Bunun bir istisnası, Lleo ve ark. [53]'nin vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) üzerinde yaptığı çalışmadır. *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium*'un, VBNC durumundan tekrar çıktıklarında vankomisine karşı dirençlerini koruduğunu kanıtlamışlardır. Bakterilerde VBNC durumunu normal sıcaklık aralığı dışında inkübasyon ve hatta beyaz ışığa maruz kalma dahil olmak üzere indükleyebilen bir dizi faktör gösterilmiştir [54]. Hücrelerin boyutları küçülmekle birlikte makro moleküler sentez ve solunum oranlarında düşme görülmüş ancak, ATP seviyeleri VBNC durumunda yüksek kalmıştır.

Belirli bir ortamda bulunan mikro organizmaların sayısını değerlendirmek için kullanılan herhangi bir büyüme ortamı kaçınılmaz olarak seçici olacaktır. Toplam canlı sayısını (TCS) elde etmek için kullanılan katı büyüme ortamı, maya ve küflerden ziyade bakterilerin saptanması için formüle edilir. Hızlı ATP kitleri, farklı taksonlardan gelen mikroorganizmaların içinde bulunan ATP'nin serbest bırakılması bakımından farklılık göstermesi nedeniyle kültürle korelasyonu düşük olacaktır [55], ancak bu durum metot

validasyonu ile özellikle gıda maddeleri ve vücut sıvıları gibi mikrobiyal olmayan ATP kaynaklarının tespit edilmesiyle çözümlenebilecektir.

2.4. Lüminesans Tabanlı ATP Testlerinde İçsel Sınırlamalar

Belirli bir gıdanın kalite kontrolünü veya ortamın hijyenitesini değerlendirmek için kullanılan herhangi bir ölçüm sisteminin duyarlılık ve tekrarlanabilirlik açısından doğal olarak tutarlı olması gerekir. Ek olarak, ölçüm sonuçları, yaygın olarak kullanılan temizlik ve koruyucu maddelerden olumsuz olarak etkilenmemelidir.

Ortamdaki yüzeylerin temizlenmesi ve dezenfekte edilmesi, kaçınılmaz olarak, bu yüzeylerin temizlik için kullanılan ajanların kalıntılarının ortamda kalmasına neden olacaktır. Bu tür yüzeylerde ATP testi için kullanılan swablar tarafından temizleyici ajanlar toplanacak ve daha sonra tüm hızlı ATP test kitlerinin bir parçasını oluşturan reaktif tüplerine bırakılacaktır. Bu ajanların, lusiferin-lusiferaz bazlı sistemler kullanılarak yapılan ATP ölçümleri üzerinde kafa karıştırıcı bir etkisinin olabileceğini gösteren kanıtlar vardır. Örneğin, Velazquez ve Feirtag [56], bir dizi temizlik maddesi ve dezenfektanın ATP ölçümleri üzerindeki etkilerini test etmiş ve enzimatik reaksiyon sırasında üretilen ışık sinyalini azalttıklarını belirlemişlerdir. Test edilen ajanların çoğu, düşük konsantrasyonlarda ışık şiddetini arttırmış, ancak konsantrasyonları yükseldikçe ışık şiddetini azaltmışlardır. Lappalainen ve ark. [55], dezenfektanların, lusiferin-lusiferaz tahlili kullanılarak yapılan ATP ölçümlerini etkileyebileceğini doğrulamıştır. Hızlı ATP ölçümlerinde bulunan ve ATP'yi mikroorganizmalardan serbest bırakmak için kullanılan kimyasalla bazı temizlik maddelerinin benzer olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durumda alınan örneklerdeki mikroorganizmalardan salınan ATP artacaktır.

Biyolüminesans bazlı ATP ölçümlerine etti eden bir başka ajan sitrik asittir. Sitrik asit ağırlıklı olarak içecekler başta olmak üzere bazı gıda maddelerinde bulunur ve ATP ölçümlerini de etkileyebilir [57].

2.4.1. ATP Biyolüminesans Testinin Avantaj ve Dezavantajları

ATP biyolüminesans yöntemi basit, son derece hassas, uygun maliyetli, hızlı (günler alan geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında) ve dakikalar içinde gerçek zamanlı sonuçlar alınmasını sağlar. ATP biyolüminesans testi ile ayrıca:

- Çiğ süt veya süt ürünlerindeki mikrobiyal yük tespit edilebilir,

- Sığır ve domuz karkaslarının ve kıyılmış etlerin mikrobiyolojik kalitesi değerlendirilebilir,
- İç ortamdaki mikrobiyolojik aktivite izlenebilir,
- Klinik ortamlarda sıhhi koşullar izlenebilir,
- İçecek ve meyve sularındaki maya ve bakteriler izlenebilir,
- NASA uzay aracının temizliği (biyo-yükü) ve diğer gezegenlerde yaşamı (canlı hücreler) tespit edilebilir,
- Su kalitesi izlenebilir ve kullanılan klor ve dezenfektan kullanımı optimize edilebilir,
- Üretimde kullanılacak alet ve ekipmanların temizliği doğrulanabilir.

ATP biyoluminesans testinin dezavantajları nelerdir?

Testin dezavantajları kısaca şunlardır:

- ATP mikroorganizmalardan, hayvanlardan, bitkilerden ve kontaminantlardan kolayca ayırt edilemeyebilir,
- Gıda kaynaklı organik moleküllerden gelen ışıltama, gerçek ATP biyoluminesans değerlerini etkileyebilir,
- Deterjan, dezenfektan veya diğer kimyasalların varlığı da okumaları etkileyebilir,
- Sporlarda ATP seviyesi çok düşük olduğundan spor tespitinde çok hassas olmayabilir,
- Patojen varlığının tespitinde geleneksel mikrobiyolojik analizlerin yerine geçmez [24].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Pastörize Süt Örneklerinin Temini ve Kaynağı

Çalışma materyali olarak pastörize süt örnekleri, Manisa ili yerel marketlerinden belli zaman aralıklarında (Aralık 2015-Ağustos 2017) örnekleme planı yapılarak uygun miktarlarda temin edilmiş (N=50), uygun saklama koşullarında kısa sürede laboratuvara getirilerek en kısa sürede analize alınmıştır [58-60]. Süt örnekleri analize alınmaya kadar 4 ± 2 °C’ de muhafaza edilmiştir. Alınan süt örnekleri ve bazı özellikleri Bölüm 4, Tablo 4.1.’de verilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Çözeltiler ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan besiyerleri, çözelti ve kimyasallar aşağıda listelenmiştir.

Besiyerleri

Besiyeri 1: Plate Count Agar (PCA)

Ticari olarak besiyeri (Merck 1.05463.0500)’inden 22.5 g/L olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. Besiyerinin genel içeriği aşağıda verilmiştir.

Enzimatik Digest Kazein	5	g
Yeast Ekstrakt	2.5	g
Glukoz	1	g
Agar	16	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.0 ± 0.2	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış ve 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam kültürel çalışmalarda toplam mikroorganizma, termotolerant ve spor sayımı amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri 2: Eosin Methylene Blue (EMB) Agar

Ticari olarak besiyeri (Merck 1.01347.0500)’inden 36 g/L olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. Besiyerinin genel içeriği aşağıda verilmiştir.

Pepton	10	g
Laktoz	5	g
Sakkaroz	5	g
Dipotasyum Fosfat	2	g

Eosin Y	0.4	g
Metilen Mavisi	0.07	g
Agar	13.5	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.1 ± 0.2	

Besiyeri bileşenleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda toplam *Enterobacteriaceae* ve toplam koliform sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 3: Violet Red Bile Agar (VRBA)

Ticari olarak besiyeri (Lab M, Lab 31)’inden 38.5 g/L olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. Besiyerinin genel içeriği aşağıda verilmiştir.

Yeast Ekstrakt	3	g
Pepton no: 1	7	g
NaCl	5	g
Bile Salt no: 3	1.5	g
Laktoz	10	g
Nötral Red	0.03	g
Kristal Violet	0.002	g
Agar	12	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.4 ± 0.2	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılarak kullanılmıştır. Besiyeri sterilizasyon için otoklavlanmamaktadır. Ortam çalışmamızda toplam *Enterobacteriaceae* ve toplam koliform sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 4: MacConkey Agar (MCA)

Ticari olarak besiyeri (Merck 1.5465.0500)’inden 50 g/L olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. Besiyerinin genel içeriği aşağıda verilmiştir.

Jelatin Peptonu	17	g
Kazein Peptonu	1.5	g
Et Peptonu	1.5	g
NaCl	5	g

Bile Salt Karışımı	1.5	g
Laktoz	10	g
Nötral Red	0.03	g
Kristal Violet	0.001	g
Agar	13.5	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.1 ± 0.2	

Besiyeri bileşenleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda toplam *Enterobacteriaceae* ve toplam koliform sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 5: Salmonella-Shigella Agar (SSA)

Ticari olarak besiyeri (Merck 1.07667.0500)'inden 60 g/L olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. Besiyerinin genel içeriği aşağıda verilmiştir.

Pepton	10	g
Laktoz	10	g
Ox Bile	8.5	g
Sodyum Sitrat	10	g
Sodyum Tiyosülfat	8.5	g
Amonyum Demir (III) Sitrat Citrate	1	g
Brilliant Green	0.0003	g
Nötral Red	0.025	g
Agar	12	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.1 ± 0.2	

Bütün besiyeri içerikleri tamamen çözününceye kadar kaynatılarak kullanılmıştır. Besiyeri sterilizasyon için otoklavlanmamaktadır. Ortam çalışmamızda *Salmonella-Shigella* sp. sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 6: Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA)

Besiyeri formüladan hazırlanarak kullanılmıştır. Besiyerinin genel içeriği aşağıda verilmiştir.

Kazein Peptonu	5	g
----------------	---	---

Enzymatic Digest of Animal Tissue	5	g
Beef Ekstrakt	1	g
NaCl	75	g
D(-) Mannitol	10	g
Fenol Red	0.025	g
Agar	12	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.1 ± 0.2	

Besiyeri bileşenleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda toplam *Staphylococcus aureus* sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 7: Potato Dekstroz Agar (PDA)

Ticari olarak besiyeri (Oxoid CM0139)’inden 39 g/L olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. Besiyerinin genel içeriği aşağıda verilmiştir.

Patates İnfüzyonu	4	g
D(+) Glukoz	20	g
Agar	15	g
Distile Su	1000	mL
pH	5.6 ± 0.2	

Besiyeri bileşenleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda toplam maya-küf sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 8: Luria-Bertani Broth (LBB)

Ticari olarak besiyeri (Difco 244620)’inden 25 g/L olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. Besiyerinin genel içeriği aşağıda verilmiştir.

Tripton	10	g
Yeast Ekstrakt	5	g
NaCl	10	g
Distile Su	1000	mL
pH	7.0 ± 0.2	

Besiyeri bileşenleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda DNA izolasyonları için hücre pelletlerinin elde edilmesinde büyüme ortamı olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 9: Nutrient Broth (NB)

Ticari olarak besiyeri (Merck 1.05443.0500)’inden 8 g/L olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır. Besiyerinin genel içeriği aşağıda verilmiştir.

Et Peptonu	5	g
Meat Ekstrakt	3	g
Distile Su	1000	mL
pH	7 ± 0.2	

Besiyeri bileşenleri tamamen çözününceye kadar kaynatılmış 121 °C’ de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ortam çalışmamızda seçilen bakteri izolatlarının biyokimyasal testler öncesi aktiveleştirme besiyeri olarak kullanılmıştır.

Besiyeri 10: Nutrient Agar (NA)

Ticari olarak besiyeri 9 (Merck 1.05443.0500)’a 15 g/L agar ilavesi yapılarak oluşturulan besiyeridir. 121 °C’ de 15 dakika sterilize edildikten sonra çalışmada bakteri izolatlarının büyütülmesi, yatık agarlı besiyerinde kısa süreli saklanması ve saflık durumlarının kontrolü amacıyla büyüme ortamı olarak kullanılmıştır.

Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

TBE Tamponu (Tris-Borik asit-EDTA; 10x, pH 8)

Tris	121.10	g
EDTA (susuz)	5.84	g
Borik asit (Merck)	61.83	g
dDH ₂ O	1000	mL

Bütün içerikler 1000 mL’lik beher içerisine kondu. İçerisine 500 mL dDH₂O eklenerek berraklaşınca kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi. Son hacim 1000 mL’ye tamamlanarak. pH 8’e ayarlandı ve +4 °C’de saklandı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesinde tampon olarak kullanılmıştır.

TEA Tamponu (Tris, asetik asit, EDTA, 10x pH:8)

Tris base	48.4	g
Glacial acetic acid	11.42	mL
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	7.44	g
dDH ₂ O	1000	mL

Bütün içerikler 1000 mL'lik beher içerisine kondu. İçerisine 500 mL dDH₂O eklenerek berraklaşınca kadar manyetik karıştırıcıda bekletildi. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak. pH 8'e ayarlandı ve +4 °C'de saklandı. İzole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezinde yürütülmesinde tampon olarak kullanılmıştır.

0.5 M EDTA (pH:8)

Diaminoetan tetraasetik asit (FW 372.2 g/mol)	18.6	g
dDH ₂ O	100	mL

Orta sıcaklıktaki hotplate üzerinde karıştırılarak, NaOH ile pH:8' e ayarlanmalıdır. DNA izolasyonunda ekstraksiyon aşamalarında kullanılmıştır.

Lizozim (20 mg/mL)

1 M Tris-HCl (pH:8)	60	µL
Lizozim	120	mg
dDH ₂ O	5.40	mL

Verilen miktarlarda her seferinde taze olarak hazırlanan lizozim solüsyonu DNA ekstraksiyon aşamasında hücre duvarının kolayca parçalanması amacıyla kullanılmıştır.

%0.8 Agaroz Jel

Agaroz	0.8	g
TBE tamponu	100	mL

0.8 g agaroz tartılarak 100 mL TBE tamponuna alınmış, eriyinceye kadar mikrodalga fırında bekletilmiştir. 65 °C' kadar soğutulduktan sonra üzerine 10 µL DNA boyası ilave (İnvitrogen, SYBR, Safe DNA Gel Stain) edilerek manyetik karıştırıcıda homojen karışımı sağlanmış, uygun şekilde dökümü yapılarak donması beklenmiştir. İzolatların PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforez uygulamalarında kullanılmıştır.

%1 Agaroz Jel

Agaroz	1	g
TAE tamponu	100	mL

1 g agaroz tartılarak 100 mL TAE tamponuna alınmış, eriyinceye kadar mikrodalga fırında bekletilmiştir. 65 °C' kadar soğutulduktan sonra üzerine 10 µL DNA boyası ilave (İnvitrogen, SYBR, Safe DNA Gel Stain) edilerek manyetik karıştırıcıda homojen karışımı sağlanmış, uygun şekilde dökümü yapılarak donması beklenmiştir. İzolatların DNA'larının agaroz jel elektroforez uygulamalarında kullanılmıştır.

Metilen Mavisi Çözeltisi

Metilen Mavisi	19	mg
Steril Distile Su	1000	mL

19 mg saf metilen mavisi bir miktar steril saf suda çözüldükten sonra son hacim 1 L'ye steril saf su ile tamamlanır. Filtre edildikten sonra karanlık ortamda saklanmalıdır. Çalışmada metilen mavisi indirgeme testlerinde kullanılmıştır.

Kullanılan Test Kitleri

API 20E (bioMérieux, France)

DNA İzolasyon Kiti [(Wizard^R Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120)]

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kültürel Yöntemle Mikroorganizma Sayımı

3.2.1.1. Seyreltme ve Ön İşlem

Laboratuvara getirilen pastörize süt örnekleri homojen olarak karıştırıldıktan sonra, en uygun seyreltme konsantrasyonunu belirlemek için 10^{-1} ile 10^{-6} arasında seri seyreltmeleri steril ve 0.22 µm filtreden geçirilmiş %0.8'lik fizyolojik tuzlu su kullanılarak hazırlanmış, her birinden kültürel ekimler ve ATP ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonucu en uygun seyreltme konsantrasyonunun 10^{-1} 'lik seyreltme olduğu belirlenmiş ve sonraki analizler bu seyreltmede gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.2. Mikroorganizma Sayımı

3.2.1.2.1. Farklı Besiyerlerinde Kültürel Sayım

Seri dilüsyonu yapılan pastörize süt örneklerinde mikroorganizma sayımı aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır. Uygulanan yöntemler genellikle modifiye edilmiştir ve Halkman [61], Masuda-Nishimura ve ark. [62] ve Tanaka ve ark. [63] kaynaklarından yararlanılmıştır.

Toplam Mikroorganizma Sayımı: 10^{-1} 'lik pastörize süt seyreltmesinden 1 mL alınarak steril petrilere aktarılmış ve üzerine uygun dökme sıcaklığına kadar soğutulan steril Plate Count agar (PCA)'dan (Bölüm 3.1.2. Besiyeri 1) 20 mL ilave edilerek homojen olarak karıştırılmıştır. Besiyerinin katılaşması tamamlandıktan sonra ekimi yapılan petrilere psikrofilik mikroorganizma sayımı için 4 °C'de 14 gün, mezofilik mikroorganizma sayımı için 30 °C'de 2 gün ve termotolerant mikroorganizma sayımı için 45 °C'de 2 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyonlar tamamlandıktan sonra 25-250 koloni aralığında mikroorganizma gelişen petrilere seçilmiş ve sayımlar gerçekleştirilmiştir. Her sayım en az 3 tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama mikroorganizma değerleri koloni oluşturan birim (kob)/mL cinsinden hesaplanmıştır.

Toplam Enterobacteriaceae Sayımı: 10^{-1} 'lik pastörize süt seyreltmesinden 1 mL alınarak steril petrilere aktarılmış ve üzerine uygun dökme sıcaklığına kadar soğutulan steril ticari besiyerleri Eosin Methylene Blue (EMB, Besiyeri 2), Violet Red Bile Agar (VRBA, Besiyeri 3) ve MacConkey Agar (MCA, Besiyeri 4)'dan ayrı ayrı 20 mL ilave edilerek homojen olarak karıştırılmıştır. Besiyerleri katılaştıktan sonra 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrası laktoz fermentasyonu pozitif koyu kırmızı ve etrafında kırmızımsı presipitat zonu oluşturan (pH düşmesine bağlı olarak)

Enterobacteriaceae üyeleri üç tekrarlı olarak sayılarak ortalama sayıları kob/mL olarak belirlenmiştir.

Toplam Koliform Sayımı: *Enterobacteriaceae* familyası içinde çok sayıda koliform bakteri bulunur. Bununla beraber gıda mikrobiyolojisi açısından koliform grup bakteriler denildiğinde *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* ve *Citrobacter freundii* gibi bakteriler anlaşılmaktadır.

Toplam koliform sayımı için izlenen yöntem toplam *Enterobacteriaceae* sayımında izlenen yöntemle aynıdır ancak farklı olarak ekimi yapılan petriler 37 °C'de 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrası EMB agarda; menekşe renkli ve yansıyan ışıkla yeşilimsi metalik parlak görülen koloniler *E. coli*, pembe – menekşe renkli, mukoid, gri kahverengi merkezli koloniler *Enterobacter* ve diğer koliformlar olarak sayılmıştır. VRBA ve MCA'da 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler laktoz pozitif *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri olan koliform grup bakteriler olarak sayılmıştır. Her üç besiyerinde sayımlar yapılarak toplam koliform sayısı kob/mL olarak belirlenmiştir.

Salmonella-Shigella Sayımı: 10⁻¹'lik pastörize süt örneğinden 1 mL alınarak steril petrilere aktarılmış ve üzerine uygun dökme sıcaklığına kadar soğutulan steril Salmonella-Shigella agar (SSA, Besiyeri 5)'dan 20 mL ilave edilerek homojen olarak karıştırılmıştır. Besiyerinin katılaşması tamamlandıktan sonra ekimi yapılan petriler 37 °C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyonlar tamamlandıktan sonra renksiz-yarı saydam (laktoz negatif), koloni etrafında besiyeri renk değişimi sarımsı kahve ve siyah merkezli koloniler (H₂S oluşumu) *Salmonella* sp., renksiz koloni etrafı besiyeri renk değişimi kırmızı olan koloniler ise *Shigella* sp. üyeleri olarak değerlendirilmiş ve kob/mL olarak sayıları hesaplanmıştır.

Toplam Staphylococcus aureus Sayımı: 10⁻¹'lik pastörize süt örneğinden 1 mL alınarak steril petrilere aktarılmış ve üzerine uygun dökme sıcaklığına kadar soğutulan steril Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA, Besiyeri 6)'dan 20 mL ilave edilerek homojen olarak karıştırılmıştır. Besiyerinin katılaşması tamamlandıktan sonra ekimi yapılan petriler 35-37°C'de 72 saate kadar inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda kırmızı besiyerinde iyi gelişen ve parlak altın sarısı, etrafı sarı zon ile çevrili koloniler *S. aureus* olarak değerlendirilmiş ve kob/mL olarak sayıları hesaplanmıştır.

Termodurik Bakteri Sayımı: Termofil sınırlarında gelişebilen ve özellikle pastörizasyon sıcaklığında canlılığını koruyabilen bakterilerin sayımı, toplam mikroorganizma sayımı için izlenen yöntem ile aynıdır ancak farklı olarak ekimi yapılan petripler 55 °C’de 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda PCA besiyerinde gelişebilen mikroorganizmalar termodurik olarak değerlendirilmiş ve kob/mL olarak sayısı hesaplanmıştır.

Toplam Sporlu Bakteri Sayımı: Sporlu bakteri sayımı için pastörize süt örnekleri 85 °C’ de 5 dakika (dk.) ön işlemden geçirilmiş, 10⁻¹’lik seyreltmelerinden 1 mL alınarak PCA besiyerine dökme plaka ekim yöntemi ile ekilmişlerdir. Ekimi yapılan petripler spor sayımı için 30 °C’de 48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda PCA besiyerinde gelişebilen bakteriler sporlu bakteri olarak değerlendirilmiş ve kob/mL olarak sayısı hesaplanmıştır.

Toplam Maya-Küf Sayımı: 10⁻¹’lik pastörize süt örneğinden 1 mL alınarak steril petrilere aktarılmış ve üzerine uygun dökme sıcaklığına kadar soğutulan steril Potato Dekstroz Agar (PDA, Besiyeri 7)’dan 20 mL ilave edilerek homojen olarak karıştırılmıştır. Besiyerinin katılaşması tamamlandıktan sonra ekimi yapılan petripler 28 °C’de 72 saate kadar inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda besiyerinde gelişen tipik küf ve maya kolonileri sayılarak sonuçlar kob/mL olarak hesaplanmıştır. 3. gün sonunda gelişme görülmeyen petripler aynı inkübasyon sıcaklığında 48 saat daha inkübasyona tabi tutularak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.1.2.2. Hazır PetriFilm Besiyerlerinde Kültürel Sayım

3M™ Petrifilm hazır kültür ortamlarında toplam aerobik mikroorganizma, *Escherichia coli*/koliform ve Maya/Küf sayımı 34 adet pastörize süt örneğinde gerçekleştirilebilmiştir. Bu hazır ortamlar üretici firma tarafından hediye olarak tarafımıza verilmiştir. 10⁻¹’lik dilüsyonlardan 1 mL aktararak üretici firmanın önerileri dahilinde besiyerine ekimler yapılarak sonuçlar alınmıştır.

Toplam Aerobik Mikroorganizma Sayımı: 3M™ Petrifilm Aerobik Sayım (AC) Plakası, modifiye Standart Metot besin maddeleri, soğuk suda çözünür jelleştirici ajan ve koloni sayımını kolaylaştıran bir tetrazolium indikatörü içeren, örnek kullanıma hazır bir kültür ortamıdır. Çalışmada aerobik bakterilerin sayımı için petrifilm üretici firmanın önerileri dahilinde hazırlanmış 30 ± 1 °C’de 72 ± 3 saat inkübasyon sonunda kırmızı koloniler hesaplanarak kob/mL cinsinden verilmiştir.

Escherichia coli/Koliform Sayımı: 3M™ Petrifilm *E. coli*/Koliform Sayım film plakaları, Violet Red Bile (VRB) besiyeri, soğuk suda çözünebilen bir jelleştirici ajan, glukuronidaz aktivitesini gösteren ve koloni sayımını kolaylaştıran bir indikatör içerir. Çoğu *E. coli* (yaklaşık %97), koloni ile ilişkili bir mavi çökelti üreten beta-glukuronidaz üretir. Üst film, laktoz fermentasyonu yapan koliformları ve *E. coli* (yaklaşık %95) tarafından üretilen gazı yakalar. 3M Petrifilm sayım plakasında yaklaşık 1 mm koloni çapı dahilinde hapsedilmiş gazla ilişkili mavi veya kırmızı-mavi koloniler *E. coli*'yi işaret eder. ABD Gıda ve İlaç İdaresi Bakteriyojik Analitik Kılavuzu (FDA-BAM) koliformları, metabolik fermentasyon sırasında laktozdan asit ve gaz üreten Gr (-) çubuklar olarak tanımlar. 3M Petrifilm plakalarında büyüyen koliform koloniler, pH göstergesi olarak jel renginin koyu kırmızı olmasını sağlayan asit üretirler. Kırmızı koliform kolonilerin etrafında sıkışan gaz, koliformları doğrular. 3M™ Petrifilm *E. coli*/Koliform sayımı üretici firmanın direktifleri dâhilinde hazırlanmış ve sonuçlar 35 ± 2 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda alınmıştır.

Maya/Küf Sayımı: 3M™ Petrifilm Maya ve Küf Sayımı Plakası, antibiyotiklerle takviye edilmiş besin maddeleri, soğuk suda çözünür jelleştirici ajan ile maya ve küf sayımını kolaylaştıran bir indikatör içeren, kullanıma hazır bir kültür ortamıdır.

3M Petrifilm maya ve küf sayım plakasında maya ve küf kolonilerini ayırmak oldukça kolaydır. Mayalar, pembe-mavi veya mavi-yeşil renkli, tek tip renkte küçük koloniler olarak tanımlanır. Küfler ise; farklı renklerde, büyük, diffüz koloni kenarlı ve koloni merkezi daha koyu renkli olarak tanımlanır. Bu kültür besiyerinde maya ve küf sayımı üretici firmanın direktifleri dâhilinde yapılarak, sonuçlar 25 °C'de 5 gün inkübasyon sonunda alınmıştır.

3.2.2. Metilen Mavisi ile Mikrobiyolojik Analiz

Metilen mavisi indirgeme testi genellikle çiğ sütlerin hızlı mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde uygulanmaktadır. Çalışmamızda analize alınan pastörize sütlerin kalitesiyle ilgili ön bilgi edinmek ve diğer testlerle karşılaştırmak amacıyla uygulanmıştır. Analiz şu şekilde gerçekleştirilmiştir; süt örneği iyice karıştırıldıktan sonra içerisinden 10 mL örnek steril tüpe alınarak üzerine filtre ile süzölmüş 1 mL metilen mavisi çözeltisi aktarılmıştır. Plastik polipropilen hava almayan kapakla kapatılarak 2-3 kere ters düz edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan tüpler karanlık ortamda 37 °C de 6 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. Belli zaman aralıklarında (30 dk) tüplerde redüksiyon olup olmadığı kontrol edilerek kayıtları tutulmuştur. Mavi rengin beyaza döndüğü süreler tespit edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.3. Pastörize Süt Örneklerinde ATP Ölçümü

3.2.3.1. Pastörize Süt Örneklerinin Analize Hazırlanması ve Ön İşlem

Pastörize süt örnekleri laboratuvara ulaştığında vakit kaybetmeden ATP-biyoluminesans yöntemine göre analiz edilmiştir. Bunun için ATP ölçümü öncesi süt örneklerinin ardışık seyreltmeleri izotonik uygun ortamda (%0.8'lik fizyolojik tuzlu su, ultra saf su ile hazırlanmış, steril ve hücreden arındırılmış) yapılarak, sıcaklıkları su banyosunda 21-23 °C'ye ayarlanmıştır. Fosfat-tuz tamponu (PBS) ve Bovin Serum Albumin (BSA) gibi dilüsyon sıvıları bu yöntemle yanlış sonuçların alınmasına neden oldukları için (Lusiferazı inhibe edebilmektedirler) önerilmemektedir. pH kontrolleri yapılarak reaksiyon pH değerlerine uygunluğu test edilmiş ve ön denemeler ile ATP ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Pastörize süt örneklerinin ön denemelerle elde edilen sonuçlarının durumuma göre mikrobiyal yükleri indeksi (ATP miktarı) ölçümünün genellikle 10^{-1} seyreltmelerde daha uygun olduğu sonucuna ulaşılmış ve sonraki analizler bu seyreltme değerinde gerçekleştirilmiştir.

Bölümümüzde mevcut bakterilerden *Escherichia coli* (ATCC 29998) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), Luria-Bertani broth (LB, Besiyeri 8) içinde kültürlenerek, 600 nm dalga boyunda yaklaşık 0.8'lik optik yoğunluğa kadar büyütülmüştür. Bu saf kültürlerin 10^{-kat} seyreltileri, steril fizyolojik tuzlu su içinde hazırlanmış ve her bir dilüsyon ATP ölçümü için numune olarak kullanılmıştır. Ayrıca uygun her iki bakterinin uygun dilüsyonları 1:1 oranında karıştırılarak karışık kültürlerde de ATP ölçümü gerçekleştirilmiştir. Hücre yoğunluğundan dolayı cihaz tarafından tespit edilen ATP miktarını belirlemek için her dilüsyondan 10 µL kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar pastörize sütlerde gerçekleştirilen ATP ölçümlerinin değerlendirilmesinde standart olarak kullanılmış ayrıca saf bakteri kültürleri ile ATP ölçümünde kullanılacak olan lüminometrenin ışık ölçüm değerleri, ölçüm kapasitesi ve hassasiyeti kontrol edilmiştir.

3.2.3.2. ATP Ölçüm Prosedürü

Pastörize süt örneklerinde mikrobiyal ATP dışında düşük miktarlarda da olsa ekstraselüler ATP (Serbest ATP; somatik ATP) bulunabilmektedir. Literatüre göre bu miktar ATP'nin sonuçları çok değiştirmeyeceği ve ihmal edilebileceği önerilmekle beraber, daha doğru sonuçların okunabilmesi açısından toplam mikrobiyal ATP'den ayrılması gerekmektedir. Pastörize sütlerdeki ATP, canlı ve aktif hücrelere bağlı olarak Mikrobiyal ATP ve serbest ATP'den oluşmaktadır (Toplam ATP=Mikrobiyal ATP + Serbest ATP).

ATP varlığının belirlenmesinde farklı prosedürler bulunmakla beraber bu çalışma için 100 µL pastörize süt örneği prob içinde bulunan örnekleme fırçası ile alınarak proba yerleştirilmiş 2 sn sonra lüminometrede (3M Clean-Trace Luminometer LM1, USA) (Şekil 3.1.) 10 sn boyunca ölçüm yapılmıştır. Ölçüm için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 21-23 °C ve 7.5-7.8' dir.

Mikrobiyal ATP konsantrasyonu iki adımlı ATP ölçüm işlemiyle gerçekleştirilmiştir. Öncelikle serbest ATP, hücre lizisi yapılmadan yani ekstraksiyon ayırıcı eklenmeden, 1:10 oranında seyreltilen süt örneğinde serbest ATP ölçümü için geliştirilen prob (3M Clean-Trace Free ATP, AQF100) (Şekil 3.1.) ile 15 sn aralıklarla 2 dk. boyunca ölçülmüştür (8 ölçüm). Sonrasında toplam ATP, aynı süt örneği için total ATP için geliştirilen prob (3M Clean-Trace Total ATP, AQT200) (Şekil 3.1.) yardımıyla 15 sn aralıklarla 2 dakika boyunca ölçülmüştür (8 ölçüm). Elde edilen ölçüm değerlerinin ortalaması alınarak toplam mikrobiyal ATP; toplam ATP'den serbest ATP miktarının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır (Mikrobiyal ATP = Toplam ATP - Serbest ATP) [64, 65]. Her bir pastörize süt örneğinin ATP miktarları Relatif Işık Miktarı (RLU/mL) cinsinden hesaplanarak ortalama değerler mikrobiyal yük indeksi olarak verilmiştir.



Şekil 3.1. ATP Ölçümü İçin Kullanılan Lüminometre (1) ve Probları (2 ve 3 Toplam ATP, 4 ve 5 Serbest ATP Probu).

3.2.4. Seçilen Mikroorganizmaların Tanımlanması

Pastörize sütlerin kültürel analizleri ile elde edilen mikroorganizma izolatlarından birbirinden farklılık gösteren 48 adet mikroorganizma seçilerek stokları oluşturulmuştur. Gliserol stok kültürleri Bölümümüz mikroorganizma koleksiyonunda -80 °C'de saklanmaktadır. Çalışma kapsamında 48 adet mikroorganizma izolatını temsil ettiğini düşündüğümüz 11 adet mikroorganizmanın tanımlanmasında aşağıda belirtilen testler uygulanmıştır.

3.2.4.1. Morfolojik ve Kültürel Testler

Seçilen mikroorganizmalar kendi izolasyon ortamları başka olmak üzere gerektiğinde uygun besiyerlerine tekrardan ekimi yapılarak gelişmeye bırakılmış ve inkübasyon sonrası kolonilerin; koloni morfolojisi, formu, yükseltisi, kenar tipi, büyüklüğü, yüzey görünümü, yoğunluğu, rengi, kokusu ve ışık geçirgenliği gibi kriterleri belirlenmiştir. Koloni morfolojileri çıplak gözle ve gerektiğinde mikrometrik okülerli, 10X büyütmeli ışık mikroskobu kullanılarak, pigmentasyon ise görsel açıdan değerlendirilmiştir.

Ortalama 3 gün gelişen sıvı kültürlerden hazırlanan preparatlar gram reaksiyonunun belirlenmesi amacıyla gram boyama işlemine tabi tutulmuştur. 1 öze dolusu sıvı kültürlerden alınan örnekler lam üzerine 1 cm² büyüklüğünde yayılarak açık hava ortamında kurutulup tespit edildikten sonra kristal violet boyasıyla 1.5 dk. boyanıp fazla boya akıtılarak %10'luk tuzlu suyla yıkanmıştır, üzeri lugol ile kaplanarak 1 dk. bekledikten sonra tekrar hafifçe yıkama yapılmış, %95'lik etanolla 10 saniye muamele edilmiştir. Kalan etanol hafifçe yıkanarak uzaklaştırılmış ve sonrasında karşıt boya safraninle boyama yapıp 1 dakika reaksiyona girmesini takiben nazikçe tekrar yıkanmış havada kurutularak immersiyon objektifi ile ışık mikroskobunda incelenmiştir. Mor siyah renkli boyanan hücreler Gr (+), karşıt boya rengi (pembe) boyanan hücreler Gr (-) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.2. Biyokimyasal Testler (API Testleri)'in Yapılması

Günümüzde API biyokimyasal test kitleri bakteri ve maya türlerinin tanımlanmasında referans olarak kabul görmektedir. Seçilen izolatlarımız için daha önceki projelerden temin edilen API 20E biyokimyasal testleri (20 test) uygulanmıştır. Test striplerine aktarılan mikrobiyal kültürler taze olarak hazırlanmış ve üretici firmanın direktifleri doğrultusunda uygulanmıştır. İnkübasyon sıcaklığı ve süreside firmanın uygulama yönergesi ışığında gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal testlerde paralel olarak pozitif ve negatif kontroller sonuçların alınmasını kolaylaştırmıştır. İnkübasyon süresi sonunda izolatların hangi bakteri

cins/tür olduğu API tarafından önerilen nümerik tanımlama hesaplama yöntemi kullanılarak (7 rakamdan oluşan ID kod) APIWEB (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>) tabanlı yazılım sayesinde tanımlanmıştır.

3.2.4.3. Moleküler Tanımlama

3.2.4.3.1. DNA İzolasyonu İçin Hücre Pelletinin Elde Edilmesi

Katı ortamda aktif olan bakteri izolatlarından bir öze dolusu alınarak içerisinde 20 mL LB sıvı besiyerinin bulunduğu 50 mL'lik erlenlere transfer edilmiş, çalkalamalı inkübatörde 30-32 °C'de 2 gün 160 devirde geliştirilmiştir. Bu suretle bakterilerden DNA izolasyonu için uygun biomass sağlanabilmiştir. Her bir broth kültürden aseptik olarak 1.5 mL alınarak steril 2 mL'lik eppendorflara transfer edilmiş ve 15000 rpm'de 5 dk. +4 °C'de santrifüj işlemiyle hücre pelleti çöktürülmüştür. Hücre pelletinin üstünde kalan sıvı faz atılarak hücre pelleti steril ddH₂O su ile 3 kez yıkanmış ve DNA izolasyonuna geçilmiştir.

3.2.4.3.2. Genomik DNA İzolasyonu

Elde edilen hücre pelletlerinden Genomik DNA izolasyonu, Promega firmasının belirttiği koşullara uygun bir şekilde “Wizard^R Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120)” izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Prosedür kısaca aşağıdaki gibidir:

1. Hücre pelleti 480 µL 50 mM EDTA' da çözülmüştür,
2. Üzerine 120 µL litik enzim lizozim ilave edilmiş ve 37 °C' de 60 dakika inkübe edilmiştir,
3. Süre sonunda 15.000 rpm' de 2 dk. santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılmıştır,
4. Hücre lizisi için üzerine 600 µL Nukleus Lisis Solüsyonu ilave edilerek nazikçe karıştırılmıştır, 5 dk. 80 °C'de su banyosunda inkübe edilerek süre sonunda oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur,
5. Üzerine 3 µL RNaz Solüsyonu ilave edilerek karıştırılmış ve 37 °C'de 60 dk. bekletilmiş sonrasında oda sıcaklığına kadar soğuması sağlanmıştır,
6. Sonrasında üzerine 200 µL Protein Çöktürme Solüsyonu ilave edilmiş, 5 dk. soğuk buzda bekletilmiştir, süre sonunda 14.000 rpm' de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant; içerisinde 600 µL isopropanol (2-propanol, oda sıcaklığındaki) bulunan eppendof tüplerine alınmıştır,
7. Karışım 15.000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır,
8. Üzerine oda sıcaklığında bulunan %70'lik etanolden 600 µL ilave edilmiştir,

9. Etanol 15 dk. süreyle oda sıcaklığında aspire edilmiştir,
10. Elde edilen pellet üzerine DNA rehidrasyon solüsyonundan 70 µL eklenerek 1 saat 65 °C’ de inkübe edilerek DNA eldesi tamamlanmıştır.

Elde edilen DNA’lar PCR reaksiyonları gerçekleştirilinceye kadar -20 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.3.2.1. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi

DNA örneklerinin miktar tayini ve saflık derecesi, nanodrop (Thermo 2000c) 260 ve 280 nm’lerdeki absorbansları dikkate alınarak belirlenmiştir. 260 nm’de ölçülen absorpsiyon değerleri (A260) DNA çözeltisindeki DNA miktarını ve 280 nm’de ölçülen absorpsiyon değerleri (A280) ise protein miktarını göstermektedir. A260/A280 oranı 1.90 ve üzerinde olan DNA örnekleri saf olarak kabul edilmiştir [66].

Elde edilen DNA örnekleri, izolasyon işleminin bir sonucu olarak geleneksel bir metot olan agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. DNA saflık kontrolleri %1 (w/v)’lik 10 µL DNA boyası (İnvitrogen, SYBR, Safe DNA Gel Stain) eklenerek hazırlanmış agaroz jel elektroforezi ile ilk kuyucuğa DNA marker (1 kb DNA Ladder, Geneaid DL006) diğerlerine DNA örneği aktararak [(1.2 µL DNA loading boyası (biotechrabbit 6x DNA loadind dye), + (6 µL DNA örneği)] 100 V 45 dk. süreyle TAE tamponu kullanılarak yapılmıştır. Sonrasında DNA örnekleri UV transillüminatör’de (gLite gel scanner, 900 BW) incelenerek tek saf olarak bank oluşturan DNA örnekleri PCR reaksiyonuna alınmıştır.

3.2.4.3.3. 16S rRNA Geninin PCR Amplifikasyonu

Her bir bakteriden saflaştırılan genomik DNA’dan, 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için, evrensel iki primer 27F (forward primer: 16S rRNA’nın başlangıç bölgesine bağlanan evrensel primer, 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ve 1525R (reverse primer: 16S rRNA’nın son bölgesine bağlanan evrensel primer 5'-AAGGAGGTGWTCARCC-3') kullanılmıştır [67]. PCR için optimize edilen reaksiyon karışımları Tablo 3.1. ve optimize PCR koşulları Tablo 3.2.’de görülmektedir. Bu koşullarla PCR ürünü için çalışmalar Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler ile gerçekleştirilmiş ve nihayetinde elde edilen PCR ürünleri için elektroforez %0.8 agaroz jelde, ilk kuyucuğa DNA marker (100 bp DNA Ladder, Geneaid DL007) diğerlerine PCR ürünü aktararak (1.2 µL DNA loading boyası, 6x + 6 µL PCR örneği) TBE tamponu ile 100 V 30 dk. süreyle yapılmıştır. Sonrasında PCR ürünleri UV transillüminatör’de (gLite gel scanner) incelenerek tek saf olarak bank oluşturanlar sekans analizleri için ayrılarak -20 °C’de saklanmıştır.

Tablo 3.1. PCR Reaksiyonu Bileşenleri ve Konsantrasyonları.

Bileşen	Stok Konsantrasyonu	Reaksiyondaki Son Konsantrasyonu	Son Hacim (µL)
DMSO	100 %	5 %	2.5
Triton-X100	100 %	0.6 %	0.3
PCR Bufer	10X	1X	5
Mg solüsyonu*	20 mM	1.5	3
dNTP	10 mM (her birinden)	0.2 mM (her birinden)	1
Forward primer	20 µM	0.5 µM	1.25
Reverse primer	20 µM	0.5 µM	1.25
Polimeraz*	5.0 U/µL	1.6 U/µL	0.32
Template DNA	50/70 ng/µL	50	1
PCR grade su	--	--	34.38
Toplam reaksiyon hacmi	--	--	50

*ThermoScientific, *Taq* DNA polymerase, EP0402.

Tablo 3.2. PCR ile Ürün Eldesi için Belirlenen Koşullar.

Adım	Sıcaklık	Süre	Çevrim
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	5 dk	1
Denatürasyon	95 °C	60 s	
Bağlanma	49.5 °C	40 s	36
Uzama	72 °C	90 s	
Son Uzama	72 °C	8 dk	1

Elde edilen PCR ürünleri sekans analizi için GATC Biotech (Almanya) firmasına gönderilmiş ve firmadan 16S rRNA kromatogramları alınmıştır.

3.2.4.3.4. 16S rRNA Gen Dizi Verilerinin Analizi, Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması ve Filogenetik Dendogramlarının Oluşturulması

16S rRNA ve sekans analizleri yurtdışında hizmet alımları kapsamında yaptırılmıştır. Elde edilen ham sekans verileri degenaratif bazların karşılığı için BioEdit Sequence Alignment Editor programı (V, 7.2.5.) ile düzenlenerek yine aynı program kullanılarak ileri ve geri okuma sekansları birleştirilmiştir. Elde edilen sekansların düzenlenmesi ise MEGA X (V, 10.0.4) programı ile gerçekleştirilmiştir. Sonrasında işlenmiş ve düzenlenmiş sekans

verileri muhtemel türlerin belirlenmesi amacıyla gen bankasındaki verilerle karşılaştırmak için blastlanmıştır. 16S rRNA gen analizi filogenetik dendogramları için, gen databanklarından elde edilen yakın bakteri tip örneği 16S rRNA gen dizileri (referans sekanslar) ile test bakterilerinin gen dizileri karşılaştırılarak seçilen bakterilerin tür veya cins seviyesinde tanılamaları yapılmıştır. Filogenetik dendogramları Neighbour-joining, Maximum Composite Likelihood algoritmaları kullanılarak oluşturulmuştur. Filogenetik analizler için MEGA X (V, 10.0.4) paket programından yararlanılmıştır [68, 69].



4. BULGULAR

4.1. Pastörize Süt Örnekleri ve Bazı Özellikleri

Manisa ili merkez yerel marketlerinden yaklaşık 2 yıl boyunca farklı zaman aralıklarında toplanan pastörize süt örneklerinin (n=50) mikrobiyolojik kalitesi incelenmiştir. Her örnek yaklaşık 1 L'lik pastörize, yağlı (minimum %0.15-3.5), plastik, tetrapak veya cam şişelerde homojenize inek sütünden oluşmaktadır. Örneklemeden sonra, her süt örneği yalıtımlı soğutucu kutuya (yaklaşık 6 °C) koyularak ve ilk örneğin alınmasından sonra en fazla 90 dakika içinde laboratuvara taşınmıştır. Pastörize sütlerin alındığı marketlerdeki dolapların sıcaklığı ortalama olarak 8.5 ± 0.9 °C aralığında olup pastörize sütlerin saklanması için önerilen 6 °C'nin üstünde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca temin edilen pastörize sütlerin üretici firma bilgileri etik sorunlar doğurabileceği için çalışmada verilmemiştir. Örnekleme tarihleri pastörize sütün son kullanma tarihinden önce olmasına dikkat edilmiştir. Pastörize süt örneklerinin alındığı market, tarih ve bazı özellikleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Süt Örneklerinin Alındığı Yerler ve Bazı Özellikleri.

Süt Örneği No	Miktarı (mL)	Niteliği (Yağ Oranı) (%)	Ambalaj Tipi	Kaynağı	Katkılı/Katkısız	Özel İşlem (Standart)	Alındığı Market	Alınma Tarihi	Son Kullanma Tarihi
PS01	1000	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd*	Kipa	14.12.2015	26.12.2015
PS02	1000	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	14.12.2015	21.12.2015
PS03	1000	3	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Pehlivanoğlu	14.12.2015	18.12.2015
PS04	1000	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Pehlivanoğlu	21.12.2015	03.01.2016
PS05	1000	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	21.12.2015	28.12.2015
PS06	1000	3	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Pehlivanoğlu	21.12.2015	27.12.2015
PS07	1000	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Pehlivanoğlu	18.01.2016	28.01.2016
PS08	500	3	Tetrapak	İnek	Katkısız/light	Tgd	Migros	25.01.2016	30.01.2016
PS09	1000	3	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Pehlivanoğlu	25.01.2016	29.01.2016
PS10	1000	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Ege çiftiği	25.01.2016	30.01.2016
PS11	1000	3	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Bim	27.01.2016	04.02.2016
PS12	1000	3	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Pehlivanoğlu	04.01.2016	08.01.2016
PS13	500	3	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Migros	18.01.2016	24.01.2016
PS14	1000	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	24.07.2017	02.08.2017
PS15	1000	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Migros	24.07.2017	29.07.2017
PS16	1000	3.5	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	24.07.2017	31.07.2017
PS17	1000	3.1	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Bim	24.07.2017	29.07.2017
PS18	500	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Migros	24.07.2017	02.08.2017
PS19	1000	3.5	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	27.07.2017	10.08.2017
PS20	1000	3.1	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Bim	27.07.2017	03.08.2017
PS21	1000	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	27.07.2017	31.07.2017
PS22	1000	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	24.07.2017	31.07.2017
PS23	1000	3.1	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	27.07.2017	07.08.2017

PS24	1000	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	31.07.2017	03.08.2017
PS25	1000	3.5	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	31.07.2017	13.08.2017
PS26	1000	3.1	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	31.07.2017	11.08.2017
PS27	1000	3.1	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Bim	31.07.2017	07.08.2017
PS28	1000	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	31.07.2017	08.08.2017
PS29	1000	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	03.08.2017	07.08.2017
PS30	1000	3.5	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	03.08.2017	05.08.2017
PS31	1000	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Pehlivanoğlu	02.08.2017	07.08.2017
PS32	1000	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	03.08.2017	10.08.2017
PS33	1000	3.1	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Bim	03.08.2017	10.08.2017
PS34	1000	3.1	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	03.08.2017	14.08.2017
PS35	1000	3.1	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	07.08.2017	16.08.2017
PS36	1000	1.5	Tetrapak	İnek	Laktosuz	Tgd	Migros	07.08.2017	15.08.2017
PS37	1000	3.5	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Migros	07.08.2017	13.08.2017
PS38	500	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Migros	07.08.2017	13.07.2017
PS39	1000	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Migros	07.08.2017	12.08.2017
PS40	500	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Migros	07.08.2017	13.08.2017
PS41	1000	3.1	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Şok	07.08.2017	14.08.2017
PS42	1000	3.1	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Bim	07.08.2017	10.08.2017
PS43	1000	3.1	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Bim	10.08.2017	17.08.2017
PS44	1000	3.1	Plastik şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Şok	10.08.2017	17.08.2017
PS45	1000	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Pehlivanoğlu	10.08.2017	16.08.2017
PS46	500	0.15	Tetrapak	İnek	Katkısız/light	Tgd	Kipa	10.08.2017	19.08.2017
PS47	1000	3	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Migros	10.08.2017	14.08.2017
PS48	500	3.1	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	Kipa	10.08.2017	14.08.2017
PS49	1000	3	Tetrapak	İnek	Katkısız	Tgd	A101	10.08.2017	20.08.2017
PS50	1000	3.1	Cam şişe	İnek	Katkısız	Tgd	Şok	10.08.2017	21.08.2017

* Tgd: Türk Gıda Kodeksi – Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütü Tebliği (Resmi Gazete: 14.02.2000-23964, Tebliğ No: 2000/6, Güncelleme tarihi: 27.02.2019) [70]. PS: Pastörize süt.

4.2. Kültürel Yöntemle Mikroorganizma Sayımı

4.2.1. Farklı Besiyerlerinde Kültürel Sayım Sonuçları

Süt örnekleri laboratuvara ulaştığında şişeleri 10 kez ters yüz edilerek hafifçe elle karıştırılmıştır. Analizlerin başlamasından önce, iki 100 mL'lik süt alt örneği kendi kaplarından aseptik olarak çıkarılarak kapaklı 100 mL kapasiteli steril cam şişelere aktarılmıştır. Bu örnekler karanlıkta (alüminyum folyo ile sarılmış) 4 veya 8 °C'de Bölüm 3.2.'de açıklandığı gibi daha sonra incelenmek üzere saklanmıştır. Mikrobiyolojik sayımlar toplam aerobik mikroorganizma (TAM; psikrofilik, mezofilik ve termotolerantlar dahil), *Enterobacteriaceae* (TE), Toplam koliform (TK), toplam termoturik (TT), Toplam *Staphylococcus aureus* (TSA), aerobik bakteriyel spor sayımları (TSAB) ve toplam maya küf (TMY) numune alındıktan sonra kısa sürede yapılan ekimler sonucu elde edilmiştir (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Farklı Besiyerlerinde Kültürel Sayım Sonuçları ($\times 10^1$ kob/mL).

ÖN*	TAM			TE			TK	TSAB	TSS	TT	TSA	TMY
	P	M	T	b	c	d		a	e	a	f	g
	a**	a	a									
PS01	-	50	-	2	-	6	-	-	2	-	-	1
PS02	-	3	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-
PS03	-	13	1	36	2	-	-	25	3	20	7	3
PS04	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS06	-	6	-	6	-	-	-	30	-	14	4	7
PS07	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PS08	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
PS09	-	3	-	-	-	-	-	2	-	-	-	3
PS10	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PS11	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PS12	-	6	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
PS13	-	34	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS14	-	10	50	-	-	1	-	4	-	-	-	-
PS15	-	5	6	9	-	4	-	3	-	-	-	-
PS16	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PS17	-	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
PS18	-	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
PS19	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PS20	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
PS21	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-
PS22	-	18	-	-	-	-	-	3	-	-	-	40
PS23	-	4	-	35	-	19	-	1	-	-	-	2
PS24	-	1	-	-	-	-	-	28	-	-	-	-
PS25	-	2	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-
PS26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS27	-	3	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
PS28	-	3	-	-	-	-	-	76	-	-	-	-
PS29	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PS30	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PS31	6	5	9	4	-	-	-	1	-	-	-	60
PS32	33	30	6	21	-	30	-	-	-	-	-	17
PS33	5	6	2	6	-	7	-	1	-	-	-	1
PS34	-	-	1	-	-	-	-	7	-	-	-	-
PS35	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
PS36	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PS37	150	45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36
PS38	2	1	2	-	-	3	-	-	-	-	-	-
PS39	-	-	-	4	-	-	-	8	-	-	-	-
PS40	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PS41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS43	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
PS44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PS45	-	13	2	8	-	-	-	1	-	-	-	6
PS46	-	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-
PS47	-	80	9	35	-	-	-	40	-	-	-	180
PS48	-	-	-	110	-	180	-	2	-	-	-	-
PS49	-	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
PS50	-	3	6	90	-	140	-	-	-	-	-	-

* Kısaltmalar: ÖN; Örnek no, TAM; Toplam aerobik mikroorganizma (P; Psikrotrofik, M; Mezofilik, T; Termotolerant), TE; Toplam *Enterobacteriaceae*, TK; Toplam koliform, TSAB; Toplam sporlu aerobik Bakteri, TSS; Toplam *Salmonella-Shigella*, TT; Toplam termoturik, TSA; Toplam *Staphylococcus aureus*, TMY; Toplam maya/küf. ** Besiyerleri: a; PCA, b; EMB, c; VRBA, d; MacConkey, e; SSA, f; MSA, g; PDA.

Diğer taraftan TAM 10^5 kob/mL'lik pastörize süt bozulma sınırının altında bulunmuştur [70, 71]. *Enterobacteriaceae* populasyonları, test edilen numunelerin %34'ünde (n=17) belirlenmiş olup 10^4 kob/mL'nin altında kalmıştır, bütün süt örnekleri koliform varlığı açısından negatif sonuç vermiştir. Mikrobiyolojik açıdan bakıldığında, veriler Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre pastörize süt örneklerinin kalite standartlarına uygun olduğunu göstermektedir (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Kültürel Sayımlarla Elde Edilen Mikroorganizma, Pozitif ve Negatif Örnek Sayıları Sonuçları.

	Örnek Sayısı (N=50)		Mikroorganizma Sayısı (kob/mL)		Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (tebliğ no: 2009/6-68)		
	Pozitif (%)	Negatif (%)	En Düşük	En Yüksek	Kabul	Şüpheli	Red
TAM	39 (78)	11 (22)	1.0×10^1	8.9×10^2	50	0	0
TE	17 (34)	33 (66)	1.0×10^1	2.9×10^3	50	0	0
TK	0 (0)	0 (0)	0	0	50	0	0
TSAB	33 (66)	17 (34)	1.0×10^1	7.6×10^2	50	0	0
TSS	2 (4)	48 (96)	2.0×10^1	3.0×10^1	48	0	2*
TT	2 (4)	48 (96)	1.4×10^2	2.0×10^2	50	0	0
TSA	2 (4)	48 (96)	4.0×10^1	7.0×10^1	50	0	0
TMY	15 (30)	35 (70)	1.0×10^1	1.8×10^3	50	0	0

* Doğrulama testleri yapılmamıştır.

Kültürel yöntemle yapılan ekimler sonucu 50 farklı pastörize süt örneğinin 5 tanesinde psikrofilik mikroorganizma sayısı en düşük 2.0×10^1 en fazla 1.5×10^3 kob/mL olarak belirlenmiştir. Analize alınan pastörize süt örneklerinin büyük bölümünde (36 adet) mezofilik, 14 adet süt örneğinde termotolerant mikroorganizma tespit edilmiş olup mezofilik mikroorganizma sayısı 1.0×10^1 ile 8.0×10^2 kob/mL arasında; termotolerant organizma sayısı ise 1.0×10^1 ile 5.0×10^2 kob/mL arasında değişmektedir (Tablo 4.2.).

Farklı selektif besiyerlerine ekim ile elde edilen örnek görüntü Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı Kültürel Besiyerlerinde Ekim Sonuçlarına ait Örnek Görüntü.

4.2.2. Hazır PetriFilm Besiyerlerinde Kültürel Sayım Sonuçları

Pastörize süt örneklerinin 3M petrifilm hazır besiyerlerindeki mikrobiyolojik analizlerinin sonuçları Tablo 4.4.'de, örnek analiz görüntüleri ise Şekil 4.2.'de gösterilmektedir. Örnekler laboratuvara geldiği günkü yapılan mikrobiyolojik analizler ile TAM sayısı, 1.0×10^1 ila 1.1×10^3 kob/mL arasında değişen ortalama değerler göstermiştir. Aseptik olarak çekilmiş bu sütlerin alt örnekleri, 3 gün boyunca (örneklemekten 72 saat sonra) dolapta (4 veya 8 °C) laboratuvarında saklandığında, özellikle örnekler 8'de tutulduğunda, TAM'da 2 kat net artışlar kaydedilmiştir (ortalama 1.6×10^4 kob/mL).

Bununla birlikte, süt numuneleri 4 °C'de saklandığında raf ömrünün sonundaki ortalama TAM değerleri 1.1×10^3 kob/mL'nin altında kalmıştır. Ek olarak, hiçbir numunenin raf ömrü sonunda gözle görülür bir koku veya gözle görülür bozulma belirtisi olmamıştır. Bununla birlikte, bu çalışmada test numunelerinde ayrıntılı kimyasal testler veya organize duyuşal değerlendirme testleri yapılmamıştır.

Pastörize süt örneklerinde *Enterobacteriaceae* 34 örneğin 2'sinde (%6) en yüksek 1.2×10^2 kob/mL olarak sayım limitinin altında bulunmuştur. TAM sayısı 34 örneğin 26'sında (%77) pozitif olarak görülmüş, en yüksek 1.1×10^3 kob/mL olarak hesaplanmıştır, kalan 8 örnekte petrifilm besiyerlerinde üreme görülmemiştir (Tablo 4.5.).

Tablo 4.4. Kültürel Sayım Sonuçları (3M PetriFilm) ($\times 10^1$ kob/mL).

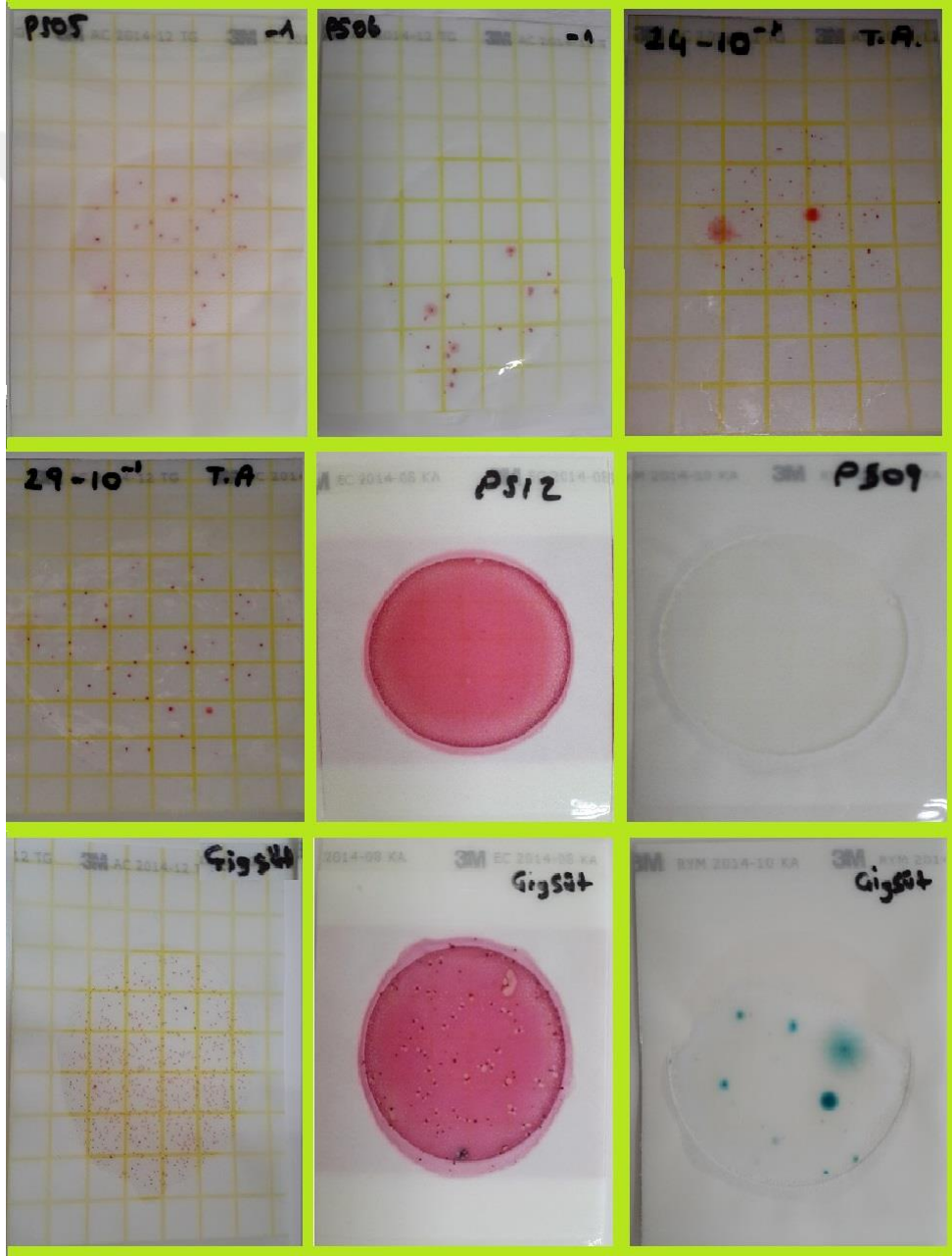
Örnek No:	<i>E. coli</i>	Toplam <i>Enterobacteriaceae</i>	Toplam Aerobik Mikroorganizma*	Maya	Küf
PS01	-	-	-	-	-
PS02	-	-	-	-	-
PS03	-	-	10	-	-
PS04	1	-	-	-	-
PS05	-	-	27	-	-
PS06	-	-	31	-	-
PS07	-	-	1	-	-
PS08	-	-	19	-	-
PS09	-	-	14	-	-
PS10	-	-	7	-	-
PS11	-	-	1	-	-
PS12	-	12	12	-	-
PS13	-	-	16	-	-
PS14	-	-	9	-	-
PS15	-	3	106	-	-
PS16	-	-	2	-	-
PS17	-	-	2	-	-
PS18	-	-	2	-	-
PS19	-	-	2	-	-
PS20	-	-	-	-	-
PS21	-	-	19	-	-
PS22	-	-	47	-	-
PS23	-	-	51	-	-
PS24	-	-	6	-	-
PS25	-	-	4	-	-
PS26	-	-	-	-	-
PS27	-	-	-	-	-
PS28	-	-	6	-	-
PS29	-	-	59	-	-
PS30	-	-	-	-	-
PS31	-	-	-	-	-
PS32	-	-	36	-	-
PS33	-	-	48	-	-
PS34	-	-	51	-	-

* PS: Pastörize süt.

Bununla birlikte, analize alınan örneklerden 1'inde (%2) tipik *E. coli* kolonisi tespit edilmiş ve bu örnek standartlara göre şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin hiç birinde TMY tespit edilmemiştir ve kalan 33 örnek standartlara göre uygun bulunmuştur (Tablo 4.5.). Pastörize süt örneklerinin mikrobiyolojik analizlerini karşılaştırmak üzere çiğ süttten 3M petrifilm tabakalarına ekim yapılmış, pozitif sonuç veren maya/küf kolonileri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. 3M Petrifilm Kültürel Sayımlarla Elde Edilen Mikroorganizma, Pozitif ve Negatif Örnek Sayıları Sonuçları.

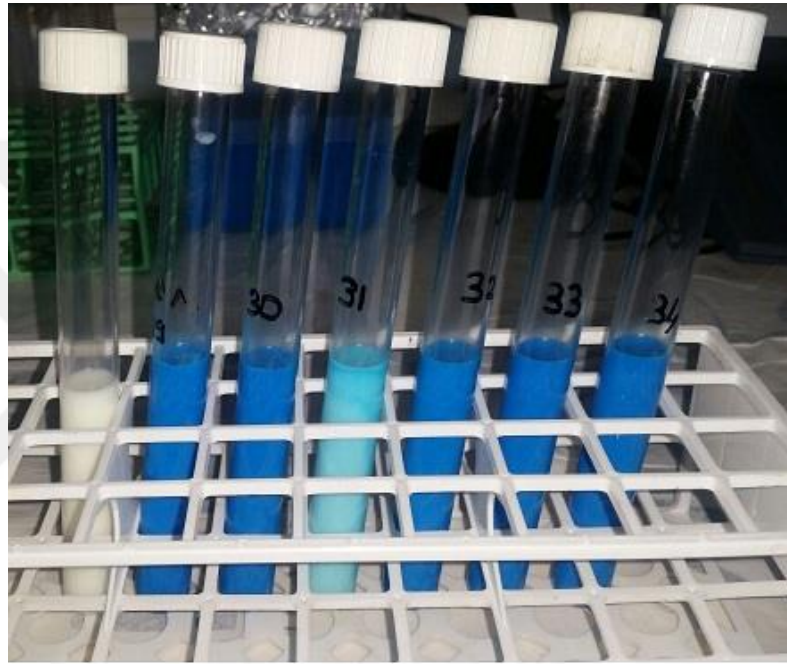
	Örnek Sayısı (N=34)		Mikroorganizma Sayısı (kob/mL)		Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (tebliğ no: 2009/6-68)		
	Pozitif (%)	Negatif (%)	En Düşük	En Yüksek	Kabul	Şüpheli	Red
TAM	26 (77)	8 (23)	1.0×10^1	1.1×10^3	34	0	0
EC	1 (3)	33 (97)	1.0×10^1	1.0×10^1	33	1	0
TE	2 (6)	32 (94)	3.0×10^1	1.2×10^2	50	0	0
TMY	0 (0)	0 (0)	0	0	50	0	0



Şekil 4.2. 3M Petrifilm Kültürel Besiyerlerine Ekim Sonuçlarına ait Örnek Görüntü.

4.3. Metilen Mavisi ile Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Bölüm 3.2.2.'de açıklanan yöntemle metilen mavisi indirgeme testleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3.). Analize alınan pastörize sütlerin hiç birinde kabul edilen inkübasyon zamanında renkte açılma gerçekleşmemiştir. Tüpteki sütün en üst yüzeyindeki 5 mm'lik kısmın beyaza dönmemesi, göz ardı edilebilir. 2 örnekte 10 saat ve üzerindeki sürelerde renkte sadece kısmi açılma gerçekleşmiştir. Sonuç olarak pastörize sütteki bakteri sayısı değil (metabolik aktivitesine bağlı olduğundan) mevcut bakterilerin patojen olup olmaması önemlidir.



Şekil 4.3. Metilen Mavisi İndirgeme Testlerine ait Örnek Görüntü.

4.4. Pastörize Süt Örneklerinde ATP Ölçüm Sonuçları

Mikrobiyal canlılığın ölçümü için geleneksel yöntemler kültürasyonu gerektirir ve zahmetlidir. Ekim yapmadan gıda ürünlerinin kalite kontrollerinin yapılabilmesi için hızlı yöntemlere ihtiyaç vardır. ATP biyoluminesans yöntemi, son derece etkili bir yöntem olarak kabul edilir; çünkü ATP, tüm canlı mikroorganizmaların enerji kaynağıdır ve mikrobiyal canlılığın hızlı bir göstergesi olarak kullanılabilir. Mikrobiyal canlılığı ATP biyoluminesans yöntemiyle tespit etmek ve pastörize sütlerin analiziyle ortaya çıkan sonuçları değerlendirebilmek için *S. aureus*, *E coli* ile bunların 1:1 oranında uygun karışımları hazırlanarak ATP ölçümleri yapılmıştır. Bakteriyel sayımlar, geleneksel plaka sayma yöntemiyle doğrulanmıştır. Tüm bu sonuçlar ile pastörize sütlerin analiziyle elde edilen değerler ve çalışmada kullanılan cihaz ile yöntem göz önünde bulundurularak ATP ölçümü

için standart değerler ortaya çıkarılmıştır. Bu değerlere göre aynı laboratuvar koşulları ve analiz parametreleri oluşturulduğunda pastörize sütlerin kabul, şüpheli ve red değerleri RLU olarak sırasıyla 0-4000, 4001-8000 ve $8001 \leq$ olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. ATP Ölçüm Sonuçlarının Değerlendirilebilmesi için Uyarlanan Standart Değerler.

Örnek (kob/mL)	RLU			Uyarlanan Standart Değerleri (RLU)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> (1:1)	Kabul	Şüpheli	Red
Dilüsyon 1 (10^6)	57.310	62.570	58.560	0-4000	4001-8000	$8001 \leq$
Dilüsyon 2 (10^5)	13.360	16.780	14.252			
Dilüsyon 3 (10^4)	7.360	7.780	7.984			
Dilüsyon 4 (10^3)	1.216	1.416	1.630			
Dilüsyon 5 (10^2)	190	264	314			
Dilüsyon 6 (10^1)	30	78	112			

ATP biyoluminesans tekniği ile analize alınan 50 farklı pastörize süt örneğinin ölçüm değerleri 46-9858 RLU arasında değişmektedir (Tablo 4.7.). Elde edilen standart değerlerimizle ATP biyoluminesans ölçüm değerlerini karşılaştırdığımızda analize alınan 50 pastörize süt örneğinden 4'ünün kalitesinin kötü (red, %8), 5'nin şüpheli (%10) ve diğer geri kalanların kaliteli (kabul, %82) olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak pastörize sütlerin farklı selektif besiyerleri ve petrifilm kültürleri ile elde edilen koloni sayımları ile ATP biyoluminesans ölçüm değerleri arasında korelasyonun zayıf olduğu bir gerçektir. Bunun nedenleri arasında ise bazı pastörize sütlerde tespit edilen serbest ATP ölçüm değerlerinin yüksek oluşu ve sonuçları etkilemesi, canlı fakat kültüre edilemeyen mikroorganizmaların sütte varlığı sayılabilir. ATP kaynağı olarak *S. aureus* ve *E. coli*'nin farklı hücre yoğunluklarına karşı yapılan biyoluminesans deneyi ile koloni sayısı arasında doğrusal olarak bir orantı gözlenmiştir. Dolayısıyla saf kültürlerle ve bunların karışık kültürleri ile oluşturulan standart değerlerle bire bir korelasyon gözlemlenmiş olup ayrıca daha güvenilir sonuçların alınabilmesi için ATP standartlarının da çalışmaya dahil edilmesi gerekmektedir.

Tablo 4.7. Mikrobiyal ATP (RLU) Ölçüm Değerleri.

P. Süt No:	Serbest ATP (RLU) (2 dk. Boyunca 15 sn. aralıklarla ölçüm)*								Serbest ATP Ortalaması (RLU)	Toplam ATP (RLU) (2 dk. Boyunca 15 sn. aralıklarla ölçüm)								Toplam ATP Ortalaması (RLU)	Mikrobiyal ATP (RLU)
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.		
PS01	1100	1120	1117	1124	1118	1116	1114	1116	1118	10600	10620	10580	10584	10586	10563	10338	10274	10506	9388
PS02	1034	1036	1034	1038	1032	1030	1032	1030	1033	4920	4926	4924	4924	4922	4900	4910	4908	4916	3883
PS03	1140	1142	1144	1140	1148	1146	1142	1140	1143	10384	10380	10386	10392	10390	10388	10382	10382	10385	9242
PS04	625	837	960	1052	1113	1162	1183	1202	1073	10234	10342	10432	10472	10483	10486	10438	10387	10434	9361
PS05	1625	2119	2450	2682	2867	2987	3101	3161	2767	7227	7308	7355	7401	7402	7436	7459	7461	7403	4636
PS06	1687	1992	2187	2314	2415	2476	2487	2531	2343	12240	12349	12348	12265	12192	12135	12089	12029	12201	9858
PS07	783	1208	1543	1813	1995	2092	2217	2289	1880	5869	5927	5905	5895	5822	5801	5782	5739	5839	3959
PS08	324	473	566	633	683	735	761	790	663	6050	6185	6193	6192	6200	6194	6209	6181	6193	5530
PS09	2831	3256	3501	3698	3874	4020	4116	4225	3813	10294	10492	10370	10289	10183	10077	9945	9858	10173	6360
PS10	2393	3143	3652	4062	4405	4668	4867	5049	4264	9462	9661	9637	9642	9669	9628	9584	9574	9628	5364
PS11	7496	7739	7706	7681	7615	7576	7527	7440	7612	4884	6149	6993	7606	8083	8478	8734	8914	7851	239
PS12	1207	1295	1358	1411	1438	1462	1480	1485	1418	4763	5322	5391	5452	5557	5744	5987	6310	5680	4262
PS13	527	774	894	969	1016	1047	1064	1076	977	2079	2063	2027	1991	1955	1931	1896	1868	1962	985
PS14	4727	4632	4552	4451	4398	4327	4263	4203	4404	4799	5076	5141	5121	5089	5410	5423	5405	5238	834
PS15	1991	2583	2979	3295	3533	3658	3734	3753	3362	6089	6126	6781	6775	6755	7456	7490	7449	6976	3614
PS16	14	16	18	20	25	27	29	31	24	3251	3284	3258	3231	3180	3102	3070	3036	3166	3142
PS17	92	118	150	163	174	197	205	211	174	3359	3354	3201	3134	3066	3016	2965	2892	3090	2916
PS18	1478	2365	2986	3346	3567	3687	3752	3769	3353	3695	3652	3544	3469	3380	3318	3246	3184	3399	46
PS19	805	996	1158	1250	1316	1369	1395	1406	1270	3597	3666	3605	3595	3564	3515	3472	3426	3549	2279
PS20	775	976	1228	1318	1381	1413	1432	1430	1311	3992	4044	4059	4006	3945	3878	3816	3764	3930	2619
PS21	818	1055	1265	1354	1414	1437	1445	1438	1344	3266	3301	3645	3621	3565	3507	3465	3407	3502	2158
PS22	443	589	719	710	700	680	684	682	681	1902	1926	2060	2037	2000	1969	1930	1894	1974	1293
PS23	1165	1430	1770	1904	2011	2079	2111	2121	1918	3217	3218	3311	3274	3219	3155	3098	3041	3188	1270
PS24	1977	2566	3089	3236	3301	3337	3329	3303	3166	4964	5097	5766	5852	5904	5924	5933	5927	5772	2606
PS25	1401	2149	2764	2974	3067	3099	3108	3086	2892	3250	3342	3547	3555	3536	3522	3511	3486	3500	608
PS26	3714	3768	4420	4413	4359	4298	4246	4198	4243	2806	3667	4367	4556	4630	4636	4605	4543	4429	186
PS27	3861	3909	4507	4511	4470	4442	4397	4360	4371	4199	5201	6143	6583	6472	6462	6407	6553	6260	1889
PS28	1701	1719	2002	1989	1962	1925	1900	1873	1910	1526	2146	2561	2635	2651	2641	2606	2560	2543	633
PS29	2135	2745	4009	4241	4359	4386	4364	4360	4066	4954	5156	5824	5920	5907	5901	5884	5871	5780	1714
PS30	754	1063	1437	1524	1547	1560	1553	1535	1460	2465	2512	2829	2842	2831	2818	2802	2786	2774	1314
PS31	1071	1405	1905	2024	2070	2078	2078	2068	1947	3598	3937	4659	4898	5160	5482	5864	6245	5178	3231
PS32	946	1361	2016	2143	2194	2222	2220	2208	2052	2662	2743	3079	3066	3045	3019	2988	2965	2986	934
PS33	1939	2553	2785	3645	3698	3707	3675	3632	3385	4574	4662	5068	5111	5118	5129	5112	5097	5042	1657

PS34	2855	3951	5011	5258	5354	5372	5348	5292	5084	6604	6880	7347	7347	7322	7293	7255	7223	7238	2154
PS35	8945	9068	9016	8950	8888	8810	8715	8633	8869	9487	10106	11366	11446	11276	10903	10491	10097	10812	1943
PS36	625	826	892	912	909	897	879	857	882	1281	1309	1328	1331	1336	1343	1342	1349	1334	452
PS37	2072	2768	3166	3399	3513	3564	3552	3512	3353	4098	4309	4699	4761	4788	4809	4823	4827	4717	1364
PS38	2267	3154	3787	4011	4123	4157	4247	4107	3941	4129	4246	4738	4789	4783	4781	4749	4724	4687	746
PS39	5338	6572	7204	7408	7641	7727	7733	7697	7426	8142	8342	8678	8749	8765	8785	8791	8806	8702	1276
PS40	4553	4695	4787	4969	4996	5047	5075	5104	4953	4576	5416	5616	5673	5655	5605	5523	5431	5560	607
PS41	3141	3957	4531	4647	4684	4680	4617	4506	4517	6451	6643	6678	6686	6680	6673	6653	6631	6663	2146
PS42	3868	4743	5087	5252	5261	5191	5084	4956	5082	6314	6597	6770	7187	7381	7521	7649	7751	7265	2183
PS43	2619	3536	4075	4645	4906	5077	5188	5245	4667	4889	5391	5716	5783	5874	5937	5971	6007	5811	1144
PS44	3827	5362	6124	6567	6826	7532	7593	7592	6799	8078	8756	8732	8654	8695	8753	8699	8635	8703	1904
PS45	5218	5684	5793	5911	5983	6034	6073	6102	5940	5584	7360	8399	9105	9598	9879	10088	10175	9229	3289
PS46	2151	2546	2648	2706	2755	2795	2832	2850	2733	1990	3034	3613	3894	4059	4158	4006	4186	3850	1117
PS47	4408	5991	6556	6753	6828	6815	6745	6635	6618	8144	8598	8880	9096	9309	9497	9657	9783	9260	2642
PS48	2682	3924	4557	5179	5401	5519	5546	5542	5095	5859	6013	6087	6134	6203	6249	6267	6294	6178	1083
PS49	1492	2344	2746	3092	3214	3252	3257	3230	3019	3570	3687	3662	3637	3627	3602	3573	3554	3620	601
PS50	3911	4843	5335	5646	5839	5914	5957	5969	5643	6906	7153	7354	7465	7567	7647	7688	7724	7514	1871

* Serbest ve toplam ATP ölçümleri 10^{-1} seyreltmelerde ölçülmüştür. PS: Pastörize süt. RLU: Relative Light Unit (Relatif Işık Birimi).

Genel olarak, çalışmamız pastörize süt kaynaklı patojenlerin tespiti ve tanımlanması ve ayrıca ATP biyoluminesans yöntemiyle karşılaştırmaya yönelik bir ön çalışmadır. Patojenlerin spesifik tanımlanmasında istenilen hassasiyet ve özgüllüğü elde etmek için birtakım tekniklerin kombinasyonu gerekir. Enzime bağlı immünosorbent (ELISA), gıda kaynaklı patojenleri hızlı bir şekilde tespit etmek için yaygın olarak kullanılır, ancak hem canlı hem de ölü hücreler, bir antijenik tepki ortaya çıkarabilir. Bu nedenle, kombine ATP biyoluminesans immünoassay, duyarlılık ve özgüllüğü korurken, canlı hücrelerin tespitini de sağlayabilecektir. Gelecekte, farklı gıdalarda patojenlerin belirlenmesinde bu tür ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Sonuç olarak koloni sayma tekniği ile karşılaştırıldığında, ATP biyoluminesans yöntemi analiz süresini önemli ölçüde azaltmakta ve pastörize sütlerin kalite kontrollerinin araştırılmasında oldukça yararlı bilgiler vermektedir. ATP testi, süt dahil olmak üzere gıda ürünlerindeki bakterilerin spesifik olmayan tespiti ve miktar tayininde mükemmel bir yardımcı yaklaşım olabilir. Ayrıca, canlı ve ölü hücreler arasındaki farklar, biyoluminesans analiziyle belirlenebilir.

4.5. Seçilen Mikroorganizmaların Tanımlanması

4.5.1. Morfolojik ve Kültürel Test Sonuçları

Çalışma sonucunda elde edilen izolatların koloni çapı yaklaşık olarak 3-15 mm arasında olup, koloniler genellikle açık krem/krem renkten pembe ve mor renklere kadar değişkenlik göstermektedir. Koloniler çoğunlukla mukoit, nemli veya yapışkanimsı özellik taşımaktadır. Koloni formu genellikle daireselden düzensize kadar değişmekle beraber koloni kenarları genellikle düz veya dalgalıdır (Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. Kültürel Sayımlarda Belirlenen Bakterin Bazı Kültürel Özellikleri.

Koloni Morfolojisi									
İzolat No	Besiyeri	Formu (Şekli)	Yükselti (Yandan Görünüşü)	Kenar Tipi	Büyüklüğü (mm)	Yüzey Görünümü	Yoğunluk (Tekstüre)	Renk (Pigmentasyon)	Işık Geçirgenliği (Opaksiti)
PS03-01	PCA	İrregular	Flat	Dalgalı	8	Damarlı	Nemli	Açık Krem	Opak
PS03-02	MSA	Dairesel	Pulvinat	Düz	4	Parlak	Mukoit	Sarı-Pembe	Açık Şeffaf
PS03-03	PCA	Filementöz	Düz	Lobat	8	Pürtüklü	Kuru	Açık-Krem	Opak
PS03-04	PDA	Dairesel	Düz	Düz	4	Pürüzsüz	Kuru	Açık-Krem	Transludent
PS03-05	PDA	Dairesel	Konveks	Testere	6	Pürüzsüz	Kuru	Açık-Krem	Transludent
PS03-06	PCA	Düzensiz	Düz	Lobat	13	Pürtüklü	Kuru	Açık-Krem	Opak
PS03-07	EMB	Filementöz	Umbunat	Filiform	3	Pürtüklü	Mukoit Benzeri	Mor-Siyah	Transludent
PS04-01	PCA	Sirkular	Yükselmiş	Düz	6	Pürüzsüz	Nemli	Açık-Krem	Opak
PS06-01	PCA	Punctiform	Umbonat	Lobat	7	Pürtüklü	Kuru	Açık-Krem	Opak
PS10-01	PCA	Sirkular	Düz	Düz	4	Parlak	Nemli	Açık-Krem	Opak
PS11-01	PCA	Derimsi-Sirkular	Konveks	Dalgalı	8	Damarlı	Kuru	Açık-Krem	Opak
PS12-01	PCA	Düzensiz	Düz	Loblu	13	Buruşuk	Yapışkanimsı	Açık-Krem	Opak
PS19-01	PCA	Düzensiz	Düz	Düz	6	Parlak	Nemli	Açık-Krem	Opak
PS23-01	PCA	Düzensiz	Konveks	Dalgalı	8	Parlak	Nemli	Açık-Krem	Opak
PS23-02	EMB	Dairesel	Düz	Düz	9	Parlak	Kuru	Mor-Siyah	Transludent
PS23-03	MAC	Düzensiz	Düz	Dalgalı	5	Parlak	Nemli	Açık-Pembe	Opak
PS23-04	PDA	Düzensiz	Konveks	Dalgalı	6	Parlak	Nemli	Açık-Krem	Opak
PS31-01	PCA	Dairesel	Pulvinat	Filementöz	3	Damarlı	Kuru	Krem-Kahve	Opak
PS32-01	PCA	Dairesel	Düz	Düz	4	Pürtüklü	Nemli	Krem	Opak
PS32-01	PCA	Düzensiz	Konveks	Dalgalı	3	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS32-02	EMB	Dairesel	Yükselmiş	Dalgalı	9	Parlak	Nemli	Mor	Opak
PS33-01	MAC	Dairesel	Düz	Düz	5	Parlak	Nemli	Pembe	Opak
PS33-01	PCA	Dairesel	Düz	Düz	2	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS34-01	PCA	Dairesel	Yükselmiş	Düz	7	Parlak	Nemli	Sarı	Opak
PS37-01	PDA	Dairesel	Düz	Düz	3	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS37-01	PCA	Düzensiz	Düz	Düz	3	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS38-02	PCA	Düzenli	Düz	Düz	2	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS39-01	PCA	Düzensiz	Konveks	Dalgalı	4	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS39-02	EMB	Düzensiz	Yükselmiş	Dalgalı	6	Parlak	Kuru	Pembe-Krem	Opak
PS43-01	PCA	Dairesel	Yükselmiş	Düz	6	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS43-02	PDA	Dairesel	Konveks	Düz	4	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS45-01	PCA	Dairesel	Düz	Dalgalı	10	Parlak	Yapışkanimsı	Krem	Opak
PS45-02	PDA	Dairesel	Düz	Düz	4	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS45-03	EMB	Düzensiz	Yükselmiş	Dalgalı	5	Parlak	Nemli	Mor	Opak
PS46-01	PCA	Dairesel	Düz	Düz	6	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS46-02	PCA	Dairesel	Yüksek	Düz	3	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS47-01	PCA	Düzensiz	Düz	Düz	8	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS47-02	PCA	Düzensiz	Düz	Dalgalı	15	Mat	Kuru	Krem	Opak
PS47-03	PCA	Düzensiz	Düz	Düz	4	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS47-04	EMB	Dairesel	Düz	Dalgalı	5	Pürüzlü	Kuru	Pembe	Opak
PS47-05	PDA	Düzenli	Düz	Düz	3	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS48-01	PCA	Düzensiz	Yüksek	Dalgalı	8	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS48-02	MAC	Düzensiz	Yüksek	Düz	4	Parlak	Nemli	Pembe	Opak
PS48-03	EMB	Düzensiz	Düz	Düz	5	Parlak	Nemli	Mor	Opak
PS49-01	PCA	Düzensiz	Yüksek	Dalgalı	6	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS49-02	PDA	Düzenli	Konveks	Düz	4	Parlak	Nemli	Krem	Opak
PS50-01	MAC	Düzensiz	Yüksek	Dalgalı	5	Parlak	Nemli	Krem-Pembe	Opak
PS50-02	EMB	Düzensiz	Yüksek	Düz	2	Parlak	Nemli	Mor	Opak

Kültürel çalışmalarla izole edilen ve birbirinden farklılık gösteren, farklı süt örneklerinden seçilen 48 farklı mikroorganizma detaylıca incelenerek bunları temsil eden 11 farklı organizmanın tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

4.5.2. Biyokimyasal Testler (API Testleri)'in Sonuçları

Seçilen bakterilerin tanımlanabilmesi için bölüm 3.2.4.2'deki yöntemle API (Analytical Profile Index) testleri uygulanmıştır. Seçilen 11 izolatın tamamı API 20E sisteminde incelenmiştir ve sonuçlar Tablo 4.9'da verilmiştir. API 20E ile elde edilen test sonuçlarında çoğu izolat %66.6 ile %100 arasında değişen benzerlik oranları göstermiştir. 4 izolat *Serratia liquefaciens* olarak tanımlanmış olup, benzerlik oranları oldukça düşüktür. PS19_01 nolu izolat %100 *Acinetobacter baumannii*, PSP4_EC nolu izolat ise %99.9 benzerlik oranıyla *Escherichia coli* olarak tanımlanmıştır. 3 izolat farklı benzerlik oranları ile *Aeromonas hydrophila* olarak tanımlanmıştır. 1 izolat %99.7, diğer 1 izolat ise %86 oranı ile *Pseudomonas aeruginosa* olarak belirlenmiştir. Nihai türlerin belirlenmesi moleküler çalışmalarla elde edilen sekans verileri ile desteklenerek kesinleşecektir.

Tablo 4.9. İzolatların Gram Reaksiyonu ve API 20E Biyokimyasal Test Sonuçları.

İzolatlar	GrR	ONPG [*]	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	ID Kod	%ID	Muhmetel Cins/Tür
PS19-01	Gr(-)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0203000	100	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceti</i>
PS23-01	Gr(-)	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	5307763	66.6	<i>Serratia liquefaciens</i>
PS32-01 (P)	Gr(-)	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3026122	75	<i>Aeromonas hydrophila</i>
PS32-02	Gr(-)	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2223000	86	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PS33-01 (N)	Gr(-)	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3206122	82.3	<i>Aeromonas hydrophila</i>
PS33-01 (P)	Gr(-)	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3206122	82.3	<i>Aeromonas hydrophila</i>
PS39-01	Gr(-)	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	5306763	76.1	<i>Serratia liquefaciens</i>
PS39-02	Gr(-)	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2212020	99.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PS43-01	Gr(-)	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	5306763	76.1	<i>Serratia liquefaciens</i>
PS48-02	Gr(-)	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	5306763	76.1	<i>Serratia liquefaciens</i>
PSP4-EC	Gr(-)	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	5144552	99.9	<i>Escherichia coli</i>

*GrR: Gram reaksiyonu, ONPG: β -Galaktosidaz, ADH: Arjinin dehidrolaz, LDC: Lizin dekarboksilaz, ODC: Ornitin dekarboksidaz, CIT: Sitrat kullanım, H₂S: Hidrojen sülfür, URE: Üreaz, TDA: Triptofan deamilaz, IND: İndol, VP: Voges-Proskauer, GEL: Jelatin hidrolizi, *Karbonhidratlardan asit oluşum Testleri; GLU: Glukoz, MAN: Manitol, INO: İnositol, SOR: Sorbitol, RHA: Ramnoz, SAC: Sukroz, MEL: Melibiyoz, AMY: Amigdalın, ARA: Arabinoz.

Bazı izolatlara ait API test sonuçları Şekil 4.4.'de gösterilmektedir. Şekil üzerinde tükenmez kalem ile verilen numaraların hangi izolatlar olduğu şekil altında dip not olarak belirtilmiştir.



Şekil 4.4. API Biyokimyasal Testlerine ait Görüntüler. *Şekil üzerinde tükenmez kalem ile belirtilen numaraların karşılık geldiği izolatlar: 6 = PS23-01, 8 = PS32-01 (P), 9 = PS43-01, 10 = PS33-01 (P), 11 = PS33-01 (N), 12 = PS39-01, 13 = PS39-02 ve 14 = PS48-02.

4.5.3. Moleküler Tanımlama

4.5.3.1. Genomik DNA İzolasyon Sonuçları

4.5.3.1.1. DNA Miktar ve Saflık Derecesi

Seçilen bakterilerden DNA izolasyonu bölüm 3.2.4.3.1. ve 3.2.4.3.2.'de verilen yönteme göre yapılarak, izole edilen DNA örneklerinin miktar tayini ve saflık derecesi, nanodrop (Thermo 2000c) ile 260 ve 280 nm'lerdeki absorbanları dikkate alınarak belirlenmiştir (Tablo 4.10.). 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A260) DNA çözeltisindeki DNA miktarını ve 280 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A280) ise protein miktarını göstermektedir. A260/A280 oranı 1.90 ve buna yakın çıkan (± 0.2 birim) DNA örnekleri saf olarak kabul edilmiştir ve agaroz jel elektroforezi ile saflık dereceleri doğrulanmıştır. Bununla ilgili sonuçlar Tablo 4.10.'da görülmektedir.

Tablo 4.10. DNA ve Protein Miktarı ile Saflık Oranları.

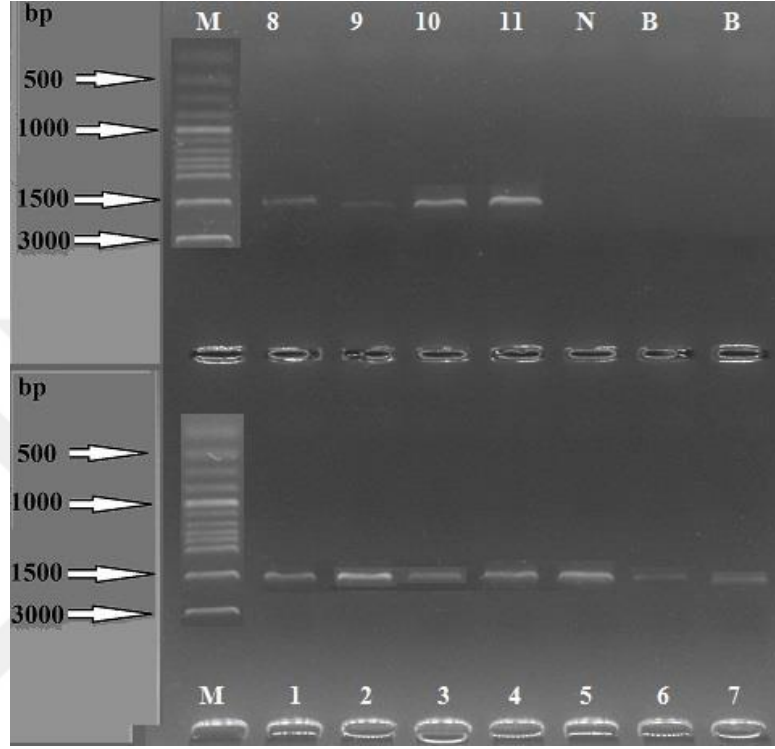
İzolat No	Nukleik Asit Konsantrasyonu (ng/ μ L)	A260	A280	260/280
PS19-01	64.60	1.320	0.680	1.94
PS23-01	142.00	3.180	1.692	1.88
PS32-01 (P)	70.60	1.430	0.733	1.95
PS32-02	210.00	4.430	2.368	1.87
PS33-01 (N)	79.92	1.848	0.970	1.90
PS33-01 (P)	48.16	1.094	0.589	1.86
PS39-01	78.60	1.547	0.799	1.93
PS39-02	52.80	1.088	0.576	1.89
PS43-01	68.64	1.744	0.927	1.88
PS48-02	160.00	3.124	1.640	1.90
PSP4-EC	91.35	1.610	0.862	1.87

PCR çalışmalarında genellikle DNA miktarı 40-80 ng/ μ L konsantrasyonda olan örnekler agaroz jel çalışmalarından sonra kontrol edilerek direkt olarak, 80 ng/ μ L konsantrasyonundan yüksek olanlar uygun şekilde seyreltilerek PCR reaksiyonlarında kalıp DNA olarak kullanılabilmiştir.

4.5.3.2. 16S rRNA Geni PCR Amplifikasyonu Sonuçları

Her bir izolattan saflaştırılan genomik DNA kalıp olarak kullanılarak, 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için, evrensel iki primer 27F ve 1525R aracılığı ile Bölüm 3.2.4.3.3.'de verilen yöntem, PCR bileşenleri ve koşulları ışığında

reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Sonrasında PCR ürünleri UV transillüminatör’de (gLite gel scanner) incelenerek tek saf olarak bank oluşturanlar sekans analizleri için ayrılarak -20 °C’de saklanmıştır. Toplamda 11 bakterinin PCR amplifikasyonu ile elde edilen ürünleri sekans analizine gönderilmiş ve sonuçlar alınmıştır. PCR ürünlerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4.5.’de verilmektedir.



Şekil 4.5. Seçilen Bakterilerden Elde Edilen PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüleri (M; 100 bp DNA markır, 1-11; bakterilerin PCR ürünü, N; negatif kontrol, B; boş). Farklı jel görüntüleri orijinalini bozmadan tek bir şekil üzerinde birleştirilmiştir.

4.5.3.3. 16S rRNA Gen Dizi Verileri Analizi, Gen Bankasındaki Sıralarla Karşılaştırılması Sonuçları

Bölüm 3.2.4.3.4.’de verilen yöntemle göre yapılmıştır. 16S rRNA sekans verileri alındıktan sonra ham diziler BioEdit Sequence Alignment Editor (V, 7.2.5.) ve MEGA X (V, 10.0.4) programı kullanılarak düzenlenmiş, muhtemel türlerin belirlenmesi amacıyla gen bankasındaki verilerle karşılaştırmak amacıyla blastlanmıştır. Elde edilen ve düzenlenen izolatların 16S rRNA sekans verilerinin gen bankasıyla karşılaştırılması sonucu en yüksek (%97 ve üzerinde) benzerlik gösteren bakterilerin verileri Tablo 4.11.’de verilmiştir.

Tablo 4.11. 16S rRNA Dizilerinin Gen Bankası (NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) Verileri ile Karşılaştırılması.

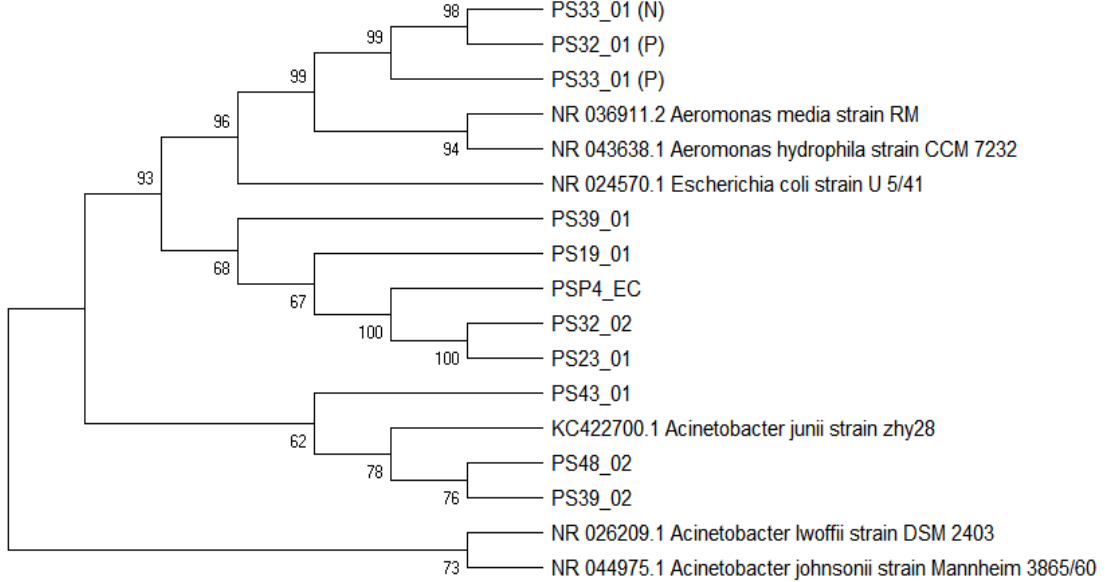
İzolat No:	Eşleşen (En yüksek benzerlik gösteren) Muhtemel Cins/Tür	Benzerlik (%)	Gen Bank Erişim No*	Atanan Cins/Tür**
PS19_01	<i>Acinetobacter</i> sp.	88	CP026426.1	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
PS23_01	<i>Acinetobacter</i> sp. T1-3	99	HF548450.1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
PS32_01 (P)	<i>Aeromonas rivipollensis</i> strain KN-Mc-11N1	99	CP027856.1	<i>Aeromonas media</i>
PS32_02	Uncultured bacterium clone XXM_1_047	97	JX559193.1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
PS33_01 (N)	<i>Aeromonas rivipollensis</i> strain KN-Mc-11N1	99	CP027856.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
PS33_01 (P)	<i>Aeromonas rivipollensis</i> strain KN-Mc-11N1	99	CP027856.1	<i>Aeromonas media</i>
PS39_01	<i>Escherichia coli</i> strain 2014C-4705	78	CP027640.1	<i>Escherichia</i> sp.
PS39_02	<i>Acinetobacter junii</i> strain zhy28	99	KC422700.1	<i>Acinetobacter junii</i>
PS43_01	<i>Acinetobacter junii</i> strain zhy28	99	KC422700.1	<i>Acinetobacter junii</i>
PS48_02	Uncultured bacterium clone SYN201307-2	97	KX508830.1	<i>Acinetobacter</i> sp.
PSP4_EC	Uncultured <i>Escherichia</i> sp. clone FecD03	93	KM244773.1	<i>Escherichia coli</i>

*Gen Bankası erişim numaraları en yüksek benzerlik gösteren muhtemel türlere aittir. **Son belirlenen (Atanan) türlerin tespitinde kültürel ve biyokimyasal karakterlerden yararlanılmıştır.

Sonuçlarımıza göre pastörize sütlerden izole edilen ve seçilen izolatların sekans verilerine göre 7 tanesi tür bazında %97 ve üzerinde benzerlik göstermiştir. PS19_1 ve PSP4_EC nolu izolatomuz ise hem sekans verileri hem de kültürel ve biyokimyasal testlerin ışığında sırasıyla *Acinetobacter lwoffii* ve *Escherichia coli* olarak tanımlanmıştır. Böylece 11 izolatın 9'u tür bazında belirlenebilmiştir. %97 ve altında benzerlik gösteren 2 izolat ise cins bazında *Escherichia* sp. ve *Acinetobacter* sp. olarak belirtilmiştir. Sıklıkla Gr (-) bakterilerin tanımlanmasında kullanılan API biyokimyasal test sonuçları ve sekans sonuçlarına göre tanımlanan bazı bakteri izolatları için genus bazında tutarlılık görülmesine rağmen tür bazında sadece 2 izolat aynı tür olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlardan PS33_01 (N) *Aeromonas hydrophila*, PSP4_EC ise *E. coli*'dir. Sonuç olarak bakteri identifikasyonunda biyokimyasal testlerin moleküler verilerle desteklenmesinin daha uygun olduğu bu çalışma ile de doğrulanmıştır. İdentifikasyonu yapılan bakterilerin (tür bazında olanlar) gen bankasına sunulması ve erişim numaralarının alınması için çalışmalarımız devam etmektedir.

16S rRNA gen analizi filogenetik dendogramları için gen bankasından alınan bakteri tip örnek dizileri ile elde ettiğimiz ve düzenlediğimiz 16S rRNA gen dizileri

karşılaştırılmıştır. Filogenetik analizler için ise MEGA X (V, 10.0.4) paket programından yararlanılmış, Neighbour-joining ve Maximum Composite Likelihood algoritmaları kullanılarak dendogramları oluşturulmuştur (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Seçilen ve Tanımlanan Strainlerin Yakın Bakteri Tip Türleri ile Evrimsel İlişkileri. (Evrimsel analizler Neighbor-Joining metodu ile 1000 replikattan elde edilen bootstrap konsensüs ağacı kullanılarak çıkarılmıştır. %50'den daha az filogenetik dallanmalar gösterilmemektedir. Evrimsel uzaklık Maksimum Kompozit Likelihood yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır [68, 69]. Boşluklar ve eksik veriler içeren tüm pozisyonlar elenmiştir).

Elde edilen filogenetik ağaçta göre izolatlarımız ve tip türler arasında net bir ayrılma/benzerlik elde edilememiş, izolatlar daha çok kendi aralarında yüksek homoloji göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Süt, erken bozulmasına neden olan çeşitli mikroorganizmaların büyümesi ve çoğalması için ideal bir ortamdır. Çiğ süt tüketimi, bazı ölümlerin kaydedildiği sayısız epidemiyolojik salgınlar olduğu için önerilmemektedir. Farklı yöntemler arasında pastörizasyon, sütü insan tüketimi için güvenli kılan yaygın olarak kullanılan bir teknolojidir. Pastörize sütün mikrobiyolojik kalitesini, çiğ sütün kalitesi, kullanılan ısı işlem, saklama koşulları ve pastörizasyon sonrası kontaminasyon derecesi gibi çeşitli faktörler etkilemektedir [8]. Mevcut çalışmada, pastörize sütün mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde ATP temelli yöntemin uygulanabilirliği ve sonuçların agar plaka yöntemleriyle tutarlığı test edilmiştir. Ayrıca ATP tabanlı yöntemin pastörize sütlerin mikrobiyal yükünün belirlenmesindeki yararları ve sınırlamaları belirlenerek, şu anda kullanılan kültür esaslı mikrobiyolojik yöntemlere göre avantajları tartışılmıştır.

Son zamanlarda, gıda ürünlerinin pastörizasyonu ve sterilizasyonunu izlemek için ATP tabanlı mikrobiyolojik izleme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu izleme sistemleri şu anda gıda üretim tesislerinde, devlet sağlık laboratuvarlarında ve ilaç şirketlerinde kullanılmaktadır. Sistemler katı yüzeylerde organik madde (canlı veya ölü) varlığını veya yokluğunu hemen tespit eder. ATP algılama cihazlarının çoğu, yüzeylerde mevcut kalan ATP seviyesini belirlemek için biyoluminesans kullanır. Yüzeyden alınan numune bir ATP ekstraksiyonunu sağlayan maddeye (lisis tamponu) ve bir ATP aktif ışık üreten substrat ve enzime (lusiferin ve lusiferaz) maruz bırakılır. Test edilen yüzeylerde bulunan ATP miktarı daha sonra enzimatik reaksiyon sırasında yayılan ışık miktarı (nispi ışık miktarı, RLU) ile ölçülebilir. ATP algılama cihazı ile sonuçların hızlı alınması onları mevcut temas agar plak uygulamalarına alternatif hale getirmiştir. Bununla birlikte, bu otomatik okuyucuların bazı gıdalardaki mikrobiyal yükü tespit etmedeki etkileri yüksek orandaki somatik ATP'den dolayı sınırlı kalmaktadır.

Pastörize edilmiş sıvı sütün mikrobiyal bozulması, tipik olarak (1) psikrotrofik Gr (-) bakterilerin (ağırlıklı olarak *Pseudomonas* spp.) ve (2) psikrotrofik spor oluşturucuların (örneğin, *Paenibacillus* sp.) üremesi ile gerçekleşmektedir. Bu çalışmada Manisa ili merkez yerel marketlerinden farklı zaman aralıklarında alınan pastörize süt örneklerinin mikrobiyolojik kalitesini belirlemek için; toplam aerobik mikroorganizma (TAM; psikrofilik, mezofilik ve termotolerantlar dahil), *Enterobacteriaceae* (TE), Toplam koliform (TK), toplam termodurik (TT), Toplam *Staphylococcus aureus* (TSA), aerobik bakteriyel spor sayımları (TSAB) ve toplam maya küf (TMY) varlığı analiz edilmiştir. TAM 10^5

kob/mL'lik pastörize süt bozulma sınırının altında bulunmuştur. *Enterobacteriaceae* popülasyonları, test edilen numunelerin %34'ünde (n=17) belirlenmiş olup 10^4 kob/mL'nin altında kalmıştır, bütün süt örnekleri koliform varlığı açısından negatif sonuç vermiştir. Kültürel yöntemle yapılan ekimler sonucu 50 farklı pastörize süt örneğinin 5 tanesinde psikrofilik mikroorganizma sayısı en düşük 2.0×10^1 en fazla 1.5×10^3 kob/mL olarak belirlenmiştir. Analize alınan pastörize süt örneklerinin büyük bölümünde (36 adet) mezofilik, 14 adet süt örneğinde termotolerant mikroorganizma tespit edilmiş olup mezofilik mikroorganizma sayısı 1.0×10^1 ile 8.0×10^2 kob/mL arasında; termotolerant organizma sayısı ise 1.0×10^1 ile 5.0×10^2 kob/mL arasında değişmektedir. Yapılan bir çalışmada 105 pastörize edilmiş sıvı süt numunesinin kapsamlı mikrobiyolojik analizinde 60 numunenin raf ömrü boyunca Gr (-) psikrofilik bakteri sayısının (TPB) 2.0×10^4 kob/mL'ye ulaştığı kaydedilmiş olup bizim çalışmamızdan daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı çalışmada, koliform olmayan, *Enterobacteriaceae* Gr (-) bakteri, numunelerin %20'sinde belirlenmiştir [72].

Çalışmamızda pastörize süt örneklerinin 3M petrifilm hazır besiyerlerindeki mikrobiyolojik TAM sayısı, 1.0×10^1 ila 1.1×10^3 kob/mL arasında değişen ortalama değerler göstermiştir. Ek olarak, hiçbir numunenin raf ömrü sonunda gözle görülür bir koku veya gözle görülür bozulma belirtisi olmamıştır. *Enterobacteriaceae* 34 örneğin 2'sinde (%6) en yüksek 1.2×10^2 kob/mL olarak sayım limitinin altında bulunmuştur. TAM sayısı 34 örneğin 26'sında (%77) pozitif olarak görülmüş, en yüksek 1.1×10^3 kob/mL olarak hesaplanmıştır, kalan 8 örnekte petrifilm besiyerlerinde üreme görülmemiştir. Bununla birlikte, analize alınan örneklerden 1'inde (%2) tipik *E. coli* kolonisi tespit edilmiş ve bu örnek standartlara göre şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin hiç birinde TMY tespit edilmemiştir ve kalan 33 örnek standartlara göre uygun bulunmuştur. Angelidis ve ark. [73]'ün yapmış oldukları bir araştırmada pastörize süt örneklerinin (n = 39) mikrobiyolojik kalitesi incelenmiş; TAM, TPM, TE ve TASB 10^7 kob/mL pastörize süt bozulmasının sınırının altında bulunmuştur. Bu sonuçlar yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir.

Etiyopya'da farklı bölgelerden toplanan 20 farklı pastörize süt örneklerinin mikrobiyolojik kalitesi incelenmiş, TAM ve TE aralığı en düşük ve en yüksek olmak kaydıyla sırasıyla 4.4×10^1 ila 4.43×10^5 kob/mL ve 4.5×10^1 ila 2.3×10^4 kob/mL olarak belirlenmiştir [74]. Bu sayılar mevcut çalışmamızda yapılan sayım sonuçlarından yüksek görünmektedir. Nairobi ve çevresinde pazarlanan çiğ ve pastörize sütün mikrobiyolojik

kalitesi belirlenmiştir. TAM, *S. aureus*, TK ve TE ortalama sayıları sırasıyla 6.05, 3.46, 2.30 ve 3.93 log₁₀ kob/mL, numunelerin %21.4'ünde 10⁶ kob/mL'den daha fazla TAM tespit edilmiştir [75]. Yapılan diğer benzer bir çalışmada ise, ticari olarak işlenmiş pastörize süt örneklerinin %77'sinde (n = 46) yüksek aerobik plaka sayımı (TAM) (10⁴ kob/mL) belirlenmiştir. Aynı çalışmada örneklerin hiçbirinde *Shigella* spp., *Salmonella* spp. ve *Campylobacter* spp. tespit edilememiştir. 14 örnekte bulunan 23 patojenik *E. coli*'nin en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu bulgular arasındadır [76]. Çalışmamızda ise nihai değerlendirmeler sonucunda seçilen organizmalardan 1'inin *E. coli* olduğu sonucuna varılmıştır. Tahran'da Mart 2014 - Ocak 2015 tarihleri arasında son kullanma tarihinde pastörize sütlerin mikrobiyolojik kalitesini belirlenmiştir. Toplam mikrobiyal sayım, koliform sayımı ve *E. coli* kontaminasyonu sırasıyla %61.1 (> 7.5 × 10⁴ kob/mL), %24.4 (>10 kob/mL) ve %8.7; ortalama toplam mikrobiyal sayım ise 7.1 × 10⁷ kob/mL olarak standart limitin üzerinde bulunmuş olup çalışmamızda elde edilen sonuçlardan oldukça yüksektir. Çalışılan örneklerin sadece %36.6'sının İran'ın Ulusal Standart sınırlarına uygun olduğu rapor edilmiştir [77]. Bangladeş'te farklı bölgelerden toplanan çiğ, pastörize ve UHT (Ultra Yüksek Sıcaklıkta İşlenmiş) süt örneklerinin mikrobiyolojik kalitesini belirlemeye yönelik yapılan bir çalışmada, çiğ süt örneklerinin TAM (5.2 × 10⁸ kob/mL) ve TK (4.2 × 10⁴ kob/mL) açısından standartların altında olduğu ortaya çıkarılmıştır. Aksine, pastörize ve UHT ile muamele edilmiş sütlerin kalitesi TAM (1.8 × 10³ kob/mL) aralığı açısından, Bangladeş Standartları ve Test Kurumu (BSTI) tarafından tavsiye edilenden biraz daha düşük olarak hesaplanmıştır [78]. Bu çalışmanın sonuçları ile kendi çalışmamızın sonuçları paralellik göstermektedir.

Süt pastörizasyonunun amacı, sütü güvenli hale getirmek ve raf ömrünü birkaç haftaya çıkarmaktır. Ancak pastörize süt bozulabilir ve kalitesinin değerlendirilmesi en önemli endişelerden biridir. Günümüzde bazı ülkelerde pastörizasyon ilkelerine genellikle uyulmamakta ve pastörize süt sadece 2-4 gün raf ömrü garantisiyle satılmaktadır. Ülkemizde ise ticari pastörize sütlerin raf ömrü 21 güne kadar çıkabilmektedir. Hindistan'da yapılan bir çalışmada standart plaka sayısı (SPC), koliform sayısı (TK), laboratuvar pastörizasyon sayısı (LPC) ve psikrofil sayısı sırasıyla örneklerin %66.25, %73.75, %76.25 ve %23.75'inde oldukça yüksek oranlarda bulunmuştur. Bütün numunelerde psikrofilik bakteriler 1.0 × 10³ - 4.9 × 10⁶ kob/mL arasında değişen oranlarda belirlenmiştir. 4 ticari pastörize sütün mikroorganizma yükü izin verilen sınırların üstünde çıkmış, bu duruma kusurlu pastörizasyon, yetersiz sterilize edilmiş pastörizasyon ekipmanı ve uygunsuz sterilize

edilmiş mutfak eşyaları gibi bir veya daha fazla faktörün neden olduğu belirtilmiştir [79]. Sütten farklı süt ürünleri üretilmekte olup kaynak sütün kalitesi nihai ürüne etti etmektedir. 124 pastörize süttten elde edilen ve 5 °C ile 7 °C'de saklanan kremadan 19 tip *Pseudomonas* spp. ve *Bacillus* spp. tanımlanmıştır. *Enterobacteriaceae* spp. ve *Acinetobacter* spp. pastörize sütlerin, %65 oranında bozulmasına neden olmuştur [14]. Çalışmamızda biyokimyasal ve moleküler olarak tanımladığımız suşlar arasında ağırlıklı olarak *Acinetobacter* spp. türleri belirlenmiştir.

Süt ve süt ürünleri arasında çiğ ve pastörize sütün kalitesini belirlemeye yönelik kültürel yöntemlere ait çok sayıda araştırma mevcuttur. Bunların sayısını artırmakta mümkündür. Yapılan çalışmalar genellikle lokal araştırmalar olup kendi ulusal standartlarına göre değerlendirilmektedir. Yapmış olduğumuz hem standart besiyerlerinde hem de 3M hazır besiyerlerinde yapılan kültürel analizler ile gelişen ve seçilen birbirinden farklı 11 bakteri izolatının fırsatçı patojenler olarak, 8 örneğe ait olduğunu belirledik. Kendi ulusal standartlarımıza göre pastörize sütlerin hiç birinde patojen organizma bulunmaması önerilmektedir. Dolayısıyla analize alınan 50 farklı ticari pastörize sütün 8 (%16)'i pastörizasyon ilkeleri açısından kusurlu bulunmuştur. Diğer alınan pastörize süt örnekleri (42 adet, %84) mikrobiyal açıdan oldukça kaliteli olarak değerlendirilmiştir.

Süt ürünlerinde pastörizasyon sonrası mikrobiyal bozulmanın tespiti için bir takım yöntemler bulunmaktadır. ATP bioluminescence yöntemi süt endüstrisinde; ham sütün kalitesi, somatik hücre sayımı, mikrobiyal sayım, pastörize süt kalitesi, pastörize krem kalitesi, süt tozu kalitesi, UHT sterilite testi, başlangıç kültürü etkinliği, hijyen takibi, proteaz ve alkalın fosfataz etkinliğinin belirlenmesi gibi uygulamalarda kullanılabilir [25]. Çalışmamızda ATP biyoluminesans tekniği ile analize alınan 50 farklı pastörize süt örneğinin ölçüm değerleri 46-9858 RLU arasında değişmektedir. Elde edilen standart değerlerimizle ATP bioluminesans ölçüm değerlerini karşılaştırdığımızda analize alınan 50 pastörize süt örneğinden 4'ünün kalitesinin kötü (%8), 5'nin şüpheli (%10) ve diğer geri kalanların kaliteli (%82) olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak pastörize sütlerin farklı selektif besiyerleri ve petrifilm kültürleri ile elde edilen koloni sayımları ile ATP bioluminesans ölçüm değerleri arasında korelasyonun zayıf bulunmuştur. Kaliteli olarak değerlendirilen pastörize sütlerin yüzde oranları hem kültürel hemde ATP yöntemine göre hemen hemen tutarlılık sergilemesine rağmen farklı süt örneklerini işaret etmeleri nedeniyle tutarsızlık sergilemektedir. Bunun nedenleri arasında ise bazı pastörize sütlerde tespit edilen serbest ATP ölçüm değerlerinin yüksek oluşu ve sonuçları etkilemesi, canlı fakat kültüre

edilemeyen mikroorganizmaların sütte varlığı sayılabilir. Diğer taraftan koloni sayımları ile ATP yöntemi sonuçlarının tutarlı olup-olmadığını test etmek için ATP kaynağı olarak *S. aureus* ve *E coli*'nin farklı hücre yoğunluklarına karşı yapılan biyoluminesans testi ile koloni sayısı arasında doğrusal olarak bir orantı gözlenmiştir. Dolayısıyla saf kültürlerle ve bunların karışık kültürleri ile oluşturulan standart değerlerle bire bir korelasyon gözlemlenmiş olup ayrıca daha güvenilir sonuçların alınabilmesi için ATP standartlarının da çalışmaya dahil edilmesi gerekmektedir.

ATP analizi kullanarak pastörize sütlerin mikrobiyolojik kalitesini belirlemeye yönelik bu çalışmada uygulanan yöntem ile literatürde şu ana kadar yapılan kapsamlı bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu yöntem daha çok çiğ ve UHT sütlerde yapılmıştır. Dolayısıyla çalışmamızda elde edilen verilerin karşılaştırmalı analizini kullandığımız ölçüm yöntemine göre değerlendirememekteyiz. Örneğin ATP Biyoluminesans tekniği ile 102 UHT tam yağlı sütlerin olası kirlenmesini hızlı bir şekilde göstermek için yapılan bir çalışmada, kültürel yöntemlerle 48, 72 ve 168. saatlerde inkübasyon ile TAM, mezofilik ve psikrotrofik aerobik mikroorganizma sayısı sonuçlarının anlamlı olarak ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. ATP tekniği ile eşik değeri 150 RLU'nun altında belirlenmiştir [34]. Bu çalışmada ise pastörize süt kullanıldığı için 4000 RLU değerlerine kadar çıkan sütlerin kaliteli olabileceğini önerilmiştir.

Çalışmada kültürel yöntemlerle elde edilen çok sayıdaki pastörize süt izolatından birbirinden farklı 11'i seçilerek biyokimyasal ve moleküler olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan türler sırasıyla *Acinetobacter lwoffii* (1 örnekte, %2), *Acinetobacter johnsonii* (2 örnekte, %4), *Acinetobacter junii* (2 örnekte, %4), *Aeromonas media* (2 örnekte, %4), *Aeromonas hydrophila* (1 örnekte, %2) ve *Escherichia coli* (1 örnekte, %2)'dir. Ayrıca cins bazında *Acinetobacter* sp. (1 örnekte, %2) ve *Escherichia* sp. (1 örnekte, %2) tanımlanmıştır.

Acinetobacter lwoffii, sağlıklı bireylerin yaklaşık %25'inde orofarinks ve cildin normal bir florası olarak görülen, fermentatif olmayan aerobik Gr (-) bir basildir. Her yerde bulunan doğası gereği, bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda potansiyel bir fırsatçı patojendir ve septisemi, zatürree, menenjit, idrar yolu enfeksiyonları, cilt ve yara enfeksiyonları gibi hastane enfeksiyonlarının bir nedeni olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, bakteriyemiye neden olduğu bildirilmektedir [80]. Soğutulmuş çiğ süt, işlenmiş sıvı süt ve süt ürünlerinin kalitesini belirlemeye yönelik yapılan mikrobiyolojik bir çalışmada, proteolitikler arasında *Lactococcus lactis* (%27.3), *Enterobacter kobei* (%14.8), *Serratia ureilytica* (%8), *Aerococcus urinaeequi* (%6.8) ve *Bacillus licheniformis* (% 6.8); lipolitikler

arasında ise *E. kobei* (%17.7), *L. lactis* (%15.6), *A. urinaeequi* (%12.5) ve *Acinetobacter lwoffii* (%9.4) izole edilmiştir [81].

Aeromonas sp. üyeleri son zamanlarda insan patojenleri olarak artan ilgiye neden olmuştur. Ancak, gerçek gıda kaynaklı patojenler olarak sınıflandırılmalarıyla ilgili olarak tartışılmaya devam edilmektedir. *Aeromonas* spp. her yerde bulunabilir ancak daha çok farklı su kaynaklarında ve genel olarak gıdalarda yaygındır. Et, çiğ süt, kümes hayvanları, balık, kabuklu deniz ürünleri ve sebzelerden kolayca izole edilirler. Birçok durumda, *Aeromonas* spp. yiyeceklerin hasat veya işleme sırasında su temasına işaret etmektedir. Örneğin hayvan rezervleri, toprak ve plankton gibi diğer rezervuarlar mevcut olsa da, su, ana besin kirliliği kaynağı olarak kabul edilir [82].

Kore'nin farklı illerinden süt toplama tanklarında *Acinetobacter* spp. prevalansı belirlenmiştir. 176 *Acinetobacter* spp. arasından 57 izolat, *Acinetobacter baumannii* olarak tanımlanmış ve halk sağlığı açısından endişe verici olduğu rapor edilmiştir [83]. Çiftliklerden ve süt dökme tanklarından 20 farklı çiğ inek sütü numunesi, lipolitik ve proteolitik mikroorganizma varlığı açısından analiz edilen bir araştırmada; toplamda 2906 izolat tanımlanmış ve bunların büyük çoğunluğunu (%62) *Pseudomonas*, *Lactococcus* ve *Acinetobacter* sp. oluşturmuştur [84].

Farklı *Acinetobacter* türleri ayrıca balık, et, peynir ve süt örneklerinden izole edilmiştir. Kirov ve ark. [85] Avustralya'da 72 çiğ süt örneği ve 183 pastörize süt örneğinden izole edilen suşların virülansını araştırmışlardır. Ham ve pastörize süttten izole edilen mikroorganizmalar toksin üretimi için test edilmiştir. Pastörize süttten elde edilen *A. sobria*, bütün ekzotoksinleri (hemolizinler, sitotoksin ve enterotoksin) üretmiştir. *Aeromonas* spp. ham numunelerin %60'ında, pastörize edilmiş numunelerin ise %3.8'inde görülmüştür. Ayrıca çiğ süttten izole edilenlerin %74'ünü *A. hydrophila* oluşturmaktadır. Sonuçta süttün içinde bulunan *Aeromonas* türlerinin insidansının yüksek olmasının gastroenteritinin bulaşmasında bir araç olarak potansiyel olabileceği sonucuna ulaşılmıştır [85]. Süpermarketlerden temin edilen 35 pastörize süt ve 25 beyaz peynir *Aeromonas* varlığı açısından değerlendirilmiştir. *Aeromonas* suşları pastörize süttlerin %28.5'inden beyaz peynir numunelerinin ise %32'inden izole edilmiştir. Pastörize süt örneklerinden izole edilen suşlar *Aeromonas caviae* (%58.9), *Aeromonas hydrophila* (%12.8) ve *Aeromonas schubertii* (%2.5) olarak tanımlanmıştır [86].

Akut gastroenterit (AGE), bağırsak sisteminin viral, bakteriyel veya paraziter enfeksiyonunun neden olduğu bir hastalıktır. Hastalık en çok çocuklar arasında yaygındır, ancak her yaşta hasta bir dereceye kadar etkilenir. Yeni tanılamaların kullanılmasıyla, akut gastroenteritle ilişkili genişleyen bir dizi enterik patojenlerin tanınması artmaktadır. AGE etiyolojisi coğrafi bölgeye, yılın zamanına ve çalışılan popülasyona göre değişir. Birçok enterik patojen, yiyecek veya su yoluyla veya bir kişiden diğerine kolayca bulaşır ve bazıları, bağışıklık sistemi zayıflamış kişilere zarar verebilir. Yeterli sıvı, elektrolit değişimi ve bakımı ile erken besleme, etkin yönetim için idealdir. Hastanın immün sisteminin baskılanmamış olup olmadığının yanı sıra eksiksiz bir klinik ve epidemiyolojik değerlendirme, teşhis çalışmalarının performansını ve antimikrobiyal tedavinin etkinliğini artıracaktır. Enterik patojenlerin yayılmasını önlemeye yönelik önemli adımlar arasında hijyen gıda işleme ve hazırlığı, sıhhi su temini, sütün pastörizasyonu, uygun el hijyeni, sıhhi atık su bertarafı, enfekte kişilerin gıdaya temasının önlenmesi gibi yöntemler bulunmaktadır [87]. Pastörize süt örneklerinden izole edilen ve tanımlanan bakteri türlerinin AGE'ye neden olabileceğine dair çok sayıda araştırma literatürde yerini almıştır.

Çalışmamızda izole edip tanımladığımız *Aeromonas* sp. ve *Acinetobacter* sp. üyelerinin büyük çoğunluğu mezofilik olmalarına rağmen *Aeromonas media* olarak tanımlanan 2 izolat psikrofiliktir. Bu tür suşlar, sütte tespit edilebilir bir bozulma olmadan yüksek sayılara ulaşabilir. Kolonizasyon ve *in vivo* toksin üretimi riski taşıyabilirler. Bunun değerlendirilebilmesi için daha ileri çalışmalar gereklidir, ayrıca depolanmış pastörize sütte ekzotoksin üretme kabiliyetine sahip psikrotrofik aeromonadların, nadir görülmesi sonucu sütte ekzotoksin üretiminin anlamlı derecede düşük olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Gıda kaynaklı patojenler her zaman halk sağlığı için bir tehdit oluştururken, mikrobiyal canlılığın geleneksel tespit yaklaşımları ile belirlenmesinin birçok dezavantajı vardır. ATP biyoluminesans algılama testinin uygulanması, gıda kaynaklı patojenlerin büyümesini izleyen güvenilir, hızlı bir tespit tekniğidir. ATP biyoluminesans algılama testi, bakteriyel canlılığı hızlı bir şekilde tespit eder. Dahası, bu yöntem, geleneksel yaklaşımlarla karşılaştırıldığında çok fazla numune almayı gerektirmez ve kısa sürede sonuç almamıza olanak sağlar. Bildiğimiz kadarıyla günümüze kadar ülkemizde pastörize sütlerin ve hatta diğer gıdaların mikrobiyal yükünün ve kalite kontrollerinin ATP biyoluminesans yöntemi ile araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışma kapsamında alınan veriler ilk kayıt olması nedeniyle oldukça değerlidir ve bu alanda literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

Çiğ süt mikrobiyal büyümeye oldukça elverişli olduğundan ve patojenleri barındırdığı için tüketimi sağlık tehlikesi oluşturabilir. Pastörizasyon, genellikle sütte bulunan tüm patojenik ve diğer patojenik olmayan ancak bozulmaya sebep olan sporsuz mikroorganizmaların tamamen imha edilmesini ve sütün besin değerini korumak bazı istenmeyen enzimlerin etkisiz hale getirilmesinin veya azaltılmasının sağlanması için yaygın olarak kullanılan en etkili yöntemdir. Pastörize süt uygun pastörizasyon sonrası, düşük sıcaklıkta saklama ve pastörizasyon sonrası kontaminasyondan kaçınılması ile güvenli hale getirilir. Ayrıca sağım ve ardından sütün işlenmesi sırasında iyi hijyen uygulamaları, çiftlikte ve süt işleme tesisinde kontaminasyon riskini azaltmak için önemlidir. Pastörizasyondan önce mikrofiltrasyon yapılması, sporların tamamen elemine edilmesini sağladığı için pastörize sütün mikrobiyolojik güvenliğini arttırmak için önerilmektedir.

Araştırmamız, ATP biyoluminesans yöntemi ile pastörize sütlerin mikrobiyal yükünün belirlenmesinin mümkün olduğu ve mikrobiyal yük indeksinin yüksek çıktığı aynı numunelerde kültürel yöntemlerle sonuçların doğrulanması, patojen varlığından şüphe duyulan numunelerden izole edilen mikroorganizmaların ise biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanmasının daha net sonuçlar verebileceği sonucuna varılmıştır. ATP yöntemi ile analize alınan çok sayıda örnekten sadece mikrobiyal yük indeksi yüksek çıkanlar ileri analizlere alındığı için bu yöntem hem ekonomik olmakta hem de zamandan kazandırmaktadır. Ancak bu yöntem çok hassas olduğu ve gıda kaynaklı ATP'den etkilendiği için paralel denemelerle yöntemin defalarca test edilmesi ve validasyonunun yapılması önerilmektedir. Diğer önemli bir husus ise süt kompleks bir gıda olduğundan ATP

ölçümlerinin 10^{-1} 'lik seyreltmelerde yapılması daha net sonuçların alınmasını sağlamaktadır.

Bu çalışma ile analize alınan pastörize sütlerin %16 (8 örnek)'sından fırsatçı patojenler izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Diğer %84 (42 örnek)'ünün standartlara uygun olduğu sonucuna varılmıştır. %16 örnekteki fırsatçı patojen kontaminasyonunun ise pastörizasyon sıcaklığı ve süresine yeterince uyulmaması veya pastörizasyon sonrası işlemlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, güvenli pastörize süt sağlamak için uygun pastörizasyon yapılması ve pastörizasyon sonrası kontaminasyonun önlenmesi önemlidir. Ayrıca pastörize süt tesislerinde personel hijyeninin sağlanmasına daha fazla önem verilmelidir.

Bu çalışmada elde edilen bulgularımız, gıdalarda ATP tabanlı bir biyo-izleme sisteminin ülkemizde uygulanabileceğini, güncellenmiş mikrobiyolojik izleme protokollerinin/standartlarının kurulmasında yararlı olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar benzer alanlarda yapılacak olan diğer araştırmalara özellikle metot ve verilerin değerlendirilmesi aşamalarında katkıda bulunabileceği ve ön kaynak teşkil edebileceği nedeniyle önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. Anonim, 2019a. <https://www.sutdunyasi.com/haberler/pastorize-sutun-raf-omru-uzadi/> (Erişim tarihi: 04.04.2019).
2. T.C. Millî Eğitim Bakanlığı (MEB), Gıda Teknolojisi, Pastörize ve Sterilize İçme Sütü 2007.
http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Past%C3%B6rize%20Ve%20Sterilize%20%C4%B0%C3%A7me%20S%C3%BCt%C3%BC.pdf (Erişim tarihi: 04.04.2019).
3. Chen, H. 2007. Use of linear, Weibull, log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk. *Food Microbiology*; 24: 197-204.
4. Kiřmartin, I., Babić, J., Aćkar, D., Slaćanac, V., řubarić, D. and Jozinović, A. 1996. Control of HACCP System Efficiency in Cream Cheese Production. *Journal of Hygienic Engineering and Design*; 96(9): 30-35.
5. Gürsel, A. 2014. İme Sütü Teknolojisi-2 ders notları, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi.
6. Meunier-Goddik, L. and Sandra, S. 2011. Liquid Milk Products: Pasteurized Milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp 274-280.
7. Anonim 2019b. The Laboratory Pasteurization Count-Thermoturic Bacteria in Raw Milk- Dairy Foods Science Notes Cornell University Milk Quality Improvement Program Department of Food Science 2007.
<https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/sites/foodsafety.foodscience.cornell.edu/files/shared/documents/CU-DFScience-Notes-Bacteria-Thermoturic-04-08.pdf> (Erişim tarihi: 10.04.2019).
8. Sarkar, S. 2015. Microbiological Considerations: Pasteurized Milk. *International Journal of Dairy Science*; 10(5): 206-218.
9. Cousin, MA. 1982. Presence and Activity of Psychrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products: A Review. *Journal of Food Protection*; 45(2): 172-207.
10. Ralyea, RD., Wiedmann, M. and Boor, KJ. 1998. Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. *Journal of Food Protection*; 61: 1336–1340.

11. Crielly, EM., Logan, NA. and Anderton A. 1994 Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *The Journal of Applied Bacteriology*; 77(3): 256-63.
12. Te Giffel, MC., Beumer, RR., Granum, PE. and Rombouts, FM. 1997. Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*; 34(3): 307-318.
13. Boor, KJ., Brown, DP., Murphy, SC., Kozlowski, SM. and Bandler, DK. 1998. Microbiological and Chemical Quality of Raw Milk in New York State. *Journal of Dairy Science*; 81(6): 1743-1748.
14. Ternström, A., Lindberg, AM. and Molin G. 1993. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *The Journal of Applied Bacteriology*; 75(1): 25-34.
15. Mahari, T. and Gashe, BA. 1990. A survey of the microflora of raw and pasteurized milk and the sources of contamination in a milk processing plant in Addis Ababa, *Ethiopia Journal of Dairy Research*; 57: 233-238.
16. Kramer, JM. and Gilbert, RJ. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Foodborne Bacterial Pathogens, Doyle, M.P. (Ed.). Marcel Dekker Inc., New York, pp 21-70.
17. Hudson, A., Wong T. and Lake, R. 2003. Pasteurisation of dairy products: Times, temperatures and evidence for control of pathogens. Institute of Environmental Science and Research Limited, Christchurch Science Centre, New Zealand, pp 1-55.
18. Rysstad, G. and Kolstad, J. 2006. Extended shelf life milk-advances in technology. *International Journal of Dairy Technology*; 59: 85-96.
19. Marques, SM. and Esteves da Silva, JCG. 2009. Firefly Bioluminescence: A Mechanistic Approach of Luciferase Catalyzed Reactions. *IUBMB Life*; 61(1): 6-17.
20. Căpriță, A. and Căpriță, R. 2005. Applications of Biochemiluminescence in Quality Assurance of Food Products. *Agroalimentary Processes and Technologies*; 4: 161-172.
21. de Boer, E. and Beumer, RR. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*; 50: 119-130.

22. López-Campos, G., Martínez-Suárez, JV., Aguado-Urda, M. and López-Alonso, V. 2012. Detection, Identification, and Analysis of Foodborne Pathogens, Book chapter 2 in *Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens*, Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition, pp 13-32.
23. Chappelle, EW. and Levin, GL. 1968. Use of the Firely Bioluminescent Reaction for Rapid Detection and Counting Bacteria. *Biochemical Medicine*; 2: 41-52.
24. Anonim, 2019c. A Question and Answer on ATP Bioluminescence Assay in Food Defense, AIB Update, September/October 2013. p: 5. https://www.aibonline.org/aibOnline_/www.aibonline.org/newsletter/Magazine/Sep_Oct2013/5BioluminescenceAssay.pdf (Erişim tarihi: 10.04.2019).
25. Griffiths, MW. 1993. Applications of Bioluminescence in the Dairy Industry. *Journal of Dairy Science*; 76: 3118–3125.
26. Dostálek, P. and Brányik, T. 2005. Prospects for Rapid Bioluminescent Detection Methods in the Food Industry - a Review. *Czech Journal of Food Science*; 23: 85-92.
27. Shama, G. and Malik, DJ. 2013. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*; 216: 115-125.
28. Lundin, A. 2014. Optimization of the Firefly Luciferase Reaction for Analytical Purposes in Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Vol: 2, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 145, 35-62, G Thouand, R Marks (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
29. Waes, G. and Bossuyt, R. 1981. A rapid method to detect postcontamination in pasteurized milk. *Antonie van Leeuwenhoek*; 48: 407-408.
30. Waes, G. and Bossuyt, R. 1982. Usefulness of the benzalkon-crystal violet-ATP method for predicting the keeping quality of pasteurized milk. *Journal of Food Protection*; 45(10): 928-931.
31. Phillips, ID. and Griffiths, MW. 1985. Bioluminescence and impedimetric methods for assessing shelflife of pasteurized milk and cream. *Food Microbiology*; 2(1); 39-51.
32. Bell, C., Bowles, CD., Toszeghy, MJK. and Neaves, P. 1996. Development of a Hygiene Standard for Raw Milk Based on the Lumac ATP-Bioluminescence Method. *International Dairy Journal*; 6: 709-713.

33. Manzano, S., Ordonez JA., de la Hoz, L. and Fernandez, M. 2005. A rapid method for the estimation of the microbiological quality of refrigerated raw milk based on the aminopeptidase activity of Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*; 15: 79-84.
34. Cunha, AF., Lage, AD., Pereira e Araújo, MM., Abreu CF., Tassinari, AR., Ferraz MA., Davenport, K. and Cerqueira, MMOP. 2014. ATP-Bioluminescence as a method to evaluated microbiological quality of UHT milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*; 66(6): 1909-1916.
35. Costa, PD., Andrade, NJ., Brandão, SCC., Passos, FJV. and Ferreira Soares, NF. 2006. ATP-Bioluminescence Assay as an Alternative for Hygiene-Monitoring Procedures of Stainless Steel Milk Contact Surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*; 37: 345-349.
36. Office for National Statistics (ONS), 2019. Deaths from MRSA in England and Wales, <http://www.statistics.gov.uk/cci/nugget.asp?id=1067> (Erişim tarihi: 10.04.2019).
37. Baumann, HE. 1974. HACCP concept and microbiological hazard categories. *Food Technology*; 28: 30-34.
38. Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R.M. and Zurera, G. 2008. Under- standing and modelling bacterial transfers to foods: a review. *Trends Food Science*; 19: 131-144.
39. Seeger, K. and Griffiths, MW. 1994. ATP bioluminescence for hygiene monitoring in healthcare institutions. *Journal of Food Protection*; 57: 509-512.
40. Lundin, A. 2000. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Methods of Enzymology*; 305: 346-371.
41. Bell, C., Stallard, PA., Brown, SE. and Standley, JTE. 1994. ATP-bioluminescence techniques for assessing the hygienic condition of milk transport tankers. *International Dairy Journal*; 4: 629-640.
42. Carrick, K., Barney, M., Navarro, N. and Ryder, D. 2001. The comparison of four bioluminometers and their swab kits for instant hygiene monitoring and detection of microorganisms in the brewery. *Journal of Institute Brewing*; 107: 31-37.

43. Griffiths, MW. 1996. The role of ATP bioluminescence in the food industry: new light on old problems. *Food Technology*; 50: 62-72.
44. Ivancic, V., Mastali, M., Percy, N., Gornbein, J., Babbitt, JT., Li, Y., Landaw, EM., Bruckner, D.A., Churchill, BM. and Haake, DA. 2008. Rapid antimicrobial susceptibility determination of uropathogens in clinical urine specimens by use of ATP bioluminescence. *Journal of Clinical Microbiology*; 46: 1213-1219.
45. Li, J., Kolling, GL., Matthews, KR. and Chikindas, ML. 2003. Cold and carbon dioxide used as multi-hurdle preservation do not induce appearance of viable but non-culturable *Listeria monocytogenes*. *Jornal of Applied Microbiology*; 94: 48-53.
46. Venkateswaran, K., Hattori, N., La Duc, MT. and Kern, R. 2003. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *Journal of Microbiological Methods*; 52: 367-377.
47. Hattori, N., Sakakibara, T., Kajiyama, N., Igarashi, T., Maeda, M. and Murakami, S. 2003. Enhanced microbial biomass assay using mutant luciferase resistant to benzalkonium chloride. *Analytical Biochemistry*; 319: 287-295.
48. Fairbanks, BC., Woods, LE., Bryant, RJ., Elliott, ET., Cole, CV. and Coleman, DC. 1984. Limitations of ATP estimates of microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*; 16: 549-558.
49. Schneider, DA. and Gourse, RL. 2004. Relationship between growth rate and ATP concentration in *Escherichia coli*: a bioassay for available cellular ATP. *Journal of Biological and Biochemistry*; 279: 8262-8268.
50. Chaibenjawong, P. and Foster, SJ. 2011. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Archive of Microbiology*; 193: 125-135.
51. Gengenbacher, M., Rao, SPS., Pethe, K. and Dick, T. 2010. Nutrient-starved, non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. *Microbiology*; 156: 81-87.
52. Oliver, JD., Hite, F., McDougald, D., Andon, NL. and Simpson, LM. 1995. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Applied Environmental Microbiology*; 61: 2624-2630.

53. Lleo, M., Bonato, B., Signoretto, C. and Canepari, P. 2003. Vancomycin resistance is maintained in *Enterococci* in the viable but nonculturable state and after division is resumed. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*; 47: 1154-1156.
54. Oliver, JD. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*; 34: 415-425.
55. Lappalainen, J., Loikkanen, S., Havana, M., Karp, M., Sjoberg, AM. and Wirtanen, G. 2000. Microbial testing methods for detection of residual cleaning agents and disinfectants prevention of ATP bioluminescence measurement errors in the food industry. *Journal of Food Protection*; 63: 210-215.
56. Velazquez, M. and Feirtag, JM. 1997. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. *Journal of Food Protection*; 60: 799-803.
57. Mubiru, DN., Coyne, MS. and Grove, JH. 2008. Citric acid interferes with adenosine triphosphate determination by bioluminescence. *Analytical Letters*; 41: 2587-2594.
58. Türk Standartları Enstitüsü (TSE), Süt ve süt ürünleri - Numune alma kılavuzu, TS 1018; Kabul Tarihi: 29.04.2002.
59. Türk Standartları Enstitüsü (TSE), Süt Standartları, TS EN ISO 707; Kabul Tarihi: 09.04.2009.
60. Türk Standartları Enstitüsü (TSE), Pastörize süt, TS 1019/T1; Kabul Tarihi: 29.06.2009.
61. Halkman, AK. 2005. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Merck, 1. Baskı, ISBN : 975-00373-0-8, Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd.Şti., Ankara.
62. Masuda-Nishimura, I., Fukuda, S., Sano, A., Kasai, K. and Tatsumi, H. 2000. Development of a rapid positive/absent test for coliforms using sensitive bioluminescence assay. *Letters in Applied Microbiology*; 30: 130-135.
63. Tanaka, H., Shinji, IT., Sawada, K., Monji, Y., Seto, M. and Yajima, O. 1997. Development and Application of a Bioluminescence ATP Assay Method for Rapid Detection of Coliform Bacteria. *Water Reserch*; 31(8): 1913-1918.

64. Vang, ÓK. 2013. ATP measurements for monitoring microbial drinking water quality. Doctoral dissertation, DTU Environment Department of Environmental Engineering Technical University of Denmark.
65. Vang, ÓK., Corfitzen, CB., Smith, C. and Albrechtsen, HJ. 2014. Evaluation of ATP measurements to detect microbial ingress by wastewater and surface water in drinking water. *Water Research*; 64: 309-320.
66. Yanmis, D. and Adiguzel, A. 2014. Molecular typing of thermophilic bacilli isolated from different hot springs of Turkey. *Research Journal of Biotechnology*; 9: 83-88.
67. Lane, DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing in nucleic acid techniques in bacterial systematics. Ed.: Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Wiley, J., Chichester, S. 115-148.
68. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*; 35: 1547-1549.
69. Saitou, N. Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*; 4: 406-425.
70. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütü Tebliği. Tebliğ No: 2000/6. Kabul Tarihi: 14.02.2000. Güncelleme Tarihi: 27.02.2019.
71. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. Tebliğ No: 2009/6-68. Kabul Tarihi: 06.02.2009. Güncelleme Tarihi: 18.10.2011.
72. Alles, AA., Wiedmann, M. and Martin, NH. 2018. Rapid detection and characterization of postpasteurization contaminants in pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*; 101(9): 7746-7756.
73. Angelidis, AS., Tsiota, S., Pexara, A. and Govaris, A. 2016. The microbiological quality of pasteurized milk sold by automatic vending machines. *Letters in Applied Microbiology*; 62: 472-479.
74. Tekilegiorgis, T. 2018. Microbiological Quality Analysis of Raw and Pasteurized Milk Samples Collected from Addis Ababa and Its Surrounding in Ethiopia. *Approaches in Poultry, Dairy and Veterinary Sciences*; 4(5): 1-8.
75. Wanjala, GW., Mathooko, FM., Kutima, PM. and Mathara, JM. 2017. Microbiological Quality and Safety of Raw and Pasteurized Milk Marketed in and Around Nairobi

Region. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*; 17(1): 11518-11532.

76. Islama, MA., Roya, S., Nabia, A., Solaimana, S., Rahmana, M., Huqa, M., Siddiqueeb, NA. and Ahmed, N. 2018. Microbiological quality assessment of milk at different stages of the dairy value chain in a developing country setting. *International Journal of Food Microbiology*; 278: 11-19.
77. Koushki, M., Koohy-Kamaly, P., Azizkhani, M. and Hadinia, N. 2016. Microbiological quality of pasteurized milk on expiration date in Tehran, Iran. *Journal of Dairy Science*; 99: 1796-1801.
78. Banik, SK., Kanta Das, K. and Uddin, A. 2014. Microbiological quality analysis of raw, pasteurized, UHT milk samples collected from different locations in Bangladesh. *Stamford Journal of Microbiology*; 4(1): 5-8.
79. Nazir, I., Kumar, A. and Singh, Y. 2014. Evaluation of Microbiological Quality of Pasteurized Milk Sold in Parts of Northern India. *Journal of Veterinary and Public Health*; 12(1): 31-35.
80. Regalado, NG., Martin, G. and Antony, SJ. 2009. *Acinetobacter lwoffii*: Bacteremia associated with acute gastroenteritis. *Travel Medicine and Infectious Disease*; 7; 316-317.
81. Ribeiro Júnior, JC., de Oliveira, AM., Silva, G., Tamanini, R., de Oliveira, ALM. and Beloti, V. 2018. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*; 101:75-83.
82. Hoel, S., Vadstein, O. and Jakobsen, AN. 2019. The Significance of Mesophilic *Aeromonas* spp. in Minimally Processed Ready-to-Eat Seafood. *Microorganisms*; 7; 91.
83. Gurung, M. Nam, HM., Tamang, MD., Chae, MH., Jang, GC., Jung, SC. and Lim, SK. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea. *Journal of Dairy Science*; 96: 1997-2002.
84. von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S. and Wenning, M. 2015. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*; 211: 57-65.

85. Kirov, SM., Hui, DS. and Hayward, LJ. 1993. Milk as a potential source of *Aeromonas* gastrointestinal infection. *Journal of Food Protection*; 56: 306-312.
86. Freitas, AC., Nunes, MP., Milhomem, AM. and Ricciardi, ID. 1993. Occurrence and Characterization of *Aeromonas* Species in Pasteurized Milk and White Cheese in Rio De Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*; 56(1): 62-65.
87. Dennehy, PH. 2019. Infectious Gastroenteritis. In Introduction to Clinical Infectious Diseases Domachowske J. (eds). Springer, pp 157-168.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Pelin OK EVREN

Doğum Tarihi : 1990

E-mail : pelinok90@gmail.com

Eğitim :

Lise : Manisa Doruk Koleji Anadolu Lisesi (YDA), 2004 – 2008.

Üniversite : Celal Bayar Üniversitesi, Lisans, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Manisa, 2009 – 2013.

Pedagojik Formasyon : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Sertifika Eğitimi, Öğretmenlik Uygulaması, Manisa, 2014 – 2014.

Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD., Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Manisa, 2014 – 2019.

İş Tecrübesi :

2016 – 2019 (devam ediyor): Manisa Organize Sanayi Bölgesi Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi (Özel MOSTEM Lisesi) Biyoloji Öğretmeni. 2016 – 2019 (**devam ediyor**).

2014 – 2016: Manisa İdealist Eğitim Öğretim Kurumu Biyoloji Öğretmeni.

2014 - 2015: Manisa Fatih Anadolu Lisesinde Biyoloji Öğretmeni.

2013 -2014: Özel Manisa Universal (Vatan) Hastanesi Laboratuvarın da Biyolog.

2011 – 2012: Manisa, Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında; Mikoloji, Seroloji, Bakteriyoloji, Elisa, PCR, Tüberküloz Laboratuvarın da Stajer Biyolog.

2009 – 2010: Manisa, Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Biyokimya Laboratuvarında Stajer Biyolog.

Seminer, Kurs ve Sertifika:

TS - EN ISO 14001 Çevre Yönetim Sistemi Eğitim Sertifikası - Ümmehan Elginkan Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi (ELGİNKAN VAKFI).

TS - EN ISO 9001 Kalite Yönetim Sistemi Eğitim Sertifikası - Ümmehan Elginkan Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi (ELGİNKAN VAKFI).

TS - EN ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Eğitim Sertifikası - Ümmehan Elginkan Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi (ELGİNKAN VAKFI).

TS - ISO 19011 Yönetim Sistemleri Denetim Standardı – İç Denetçi Eğitimi Sertifikası - Ümmehan Elginkan Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi (ELGİNKAN VAKFI).

TS-EN ISO 17025 Kalibrasyon ve Lab. Akreditasyon Yönetim sistemi - Ümmehan Elginkan Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi (ELGİNKAN VAKFI).

Temel İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitim Sertifikası - Ümmehan Elginkan Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi (ELGİNKAN VAKFI).

Risk Analizi - Ümmehan Elginkan Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi (ELGİNKAN VAKFI).

CE Ürün Belgelendirme ve Teknik Dosya Hazırlama - Ümmehan Elginkan Mesleki ve Teknik Eğitim Merkezi (ELGİNKAN VAKFI)

5S prensibi - Ümmehan Elginkan Mesleki Ve Teknik Eğitim Merkezi (ELGİNKAN VAKFI).

Ege Gökmen İSG - Ege Gökmen İş Sağlığı Ve Güvenliği Eğitimi C Sınıfı İş Sağlığı ve Güvenliği Uzmanlık Sertifikası (ÇSGB ONAYLI).