

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEMBRAN FİLTASYON TEKNİĞİ İLE KOLİFORM ANALİZİNDE  
KULLANILAN BESİYERLERİNİN KIYASLANMASI

Sevda TAŞTEMÜR

Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Ankara

2013

## **ETİK BEYAN**

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Sevda TAŞTEMÜR

İmzası

**Prof. Dr. Kadir HALKMAN** danışmanlığında, **Sevda TAŞTEMÜR** tarafından hazırlanan bu çalışma 19/ 12/ 2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ayhan TEMİZ İmza:

Üye : Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN İmza:

Üye : Prof. Dr. Nevzat ARTIK İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Membran Filtrasyon Tekniği ile Koliform Analizinde Kullanılan Besiyerlerinin Kıyaslanması

Sevda TAŞTEMÜR

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Bu çalışmada, çeşitli gıdalardan izole edilen 46 adet koliform grup üyesi bakteri, kontrol olarak PCA ile koliform grup için selektif olan Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC NKS olmak üzere 4 farklı besiyerinde ve 2 farklı inkübasyon sıcaklığında analiz edilmiş ve ayrıca karışık kültür olarak denenmiştir. Saf kültürlerde elde edilen sonuçlara göre besiyerleri arasında bir fark bulunamamıştır ( $P>0,01$ ). Ancak bakteri türüne göre sıcaklık faktörünün etkisi açık olarak görülmüştür ( $P<0,01$ ). Fekal koliform özelliği gösteren *Escherichia coli* (30 izolat), 37 ve 44,5 °C'da aynı sayıda koloni verirken, *Enterobacter aerogenes* (8 izolat), *Klebsiella pneumoniae* (7 izolatın 6 adedi) ve *Citrobacter freundii* (1 izolat) için inkübasyon sıcaklığı etkili olmuş ve bu bakteriler 44,5 °C'da gelişmemişlerdir. Fekal koliform özellik gösteren 1 adet *Klebsiella pneumoniae* izolatu ise 44,5 °C'da kolaylıkla gelişmiştir.

Karışık kültürlerde besiyeri farkı yok iken ( $P>0,01$ ) sıcaklık farkı etkili olmuştur ( $P<0,01$ ). 44,5 °C'da gelişebilen tüm kolonilerin *E. coli* olduğu anlaşılmıştır.

Denemelerde 2 adet indol negatif *E. coli*, 1 adet  $\beta$ -GUR negatif *E. coli* ve sadece 1 adet *E. coli* olmayan fekal koliform olarak *Klebsiella pneumoniae* izole edilmiştir.

Bulgulara göre koliform bakteriler için selektif olan 3 farklı besiyeri çeşidi arasında fark görülemediğii olması, bu 3 besiyerinin birbiri yerine kullanılabileceğini göstermez. Çünkü günlük kontrollerde kullanılan su numunelerindeki koliform bakterilerin stres altında olma olasılığı vardır ve stres altındaki bakterilere düşük ya da zayıf selektivitenin ne denli etkili olacağı bu çalışmada araştırılmamıştır. Ancak aktif bakteri kültürü kullanıldığında her 3 selektif besiyerinin de kontrol besiyeri olan PCA ile aynı düzeyde sonuç verdiğii için birbirlerinin yerine kullanılabileceğii söylenilebilir.

Aynı selektif besiyerinde 4 farklı koliform grup üyesi bakterinin morfolojik görüntüleri arasında sübjektif (gözle yapılan) değerlendirmede kayda değer bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Yıl ve Sayfa Sayısı (2013, 40 sayfa)

**Anahtar kelimeler:** Koliform bakteriler, fekal koliformlar, *E. coli*, membran filtrasyon, besiyerleri

## ABSTRACT

MSc Thesis

Comparison of Culture Media Used in Coliform Analysis via Membrane Filtration Technique

Sevda TAŞTEMÜR

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

In this study, 46 coliform group bacteria which were isolated from various foods, were analyzed on 4 different culture media such as Tergitol TTC NKS, Endo NKS and mFC NKS that are selective for coliform group and at 2 different incubation temperatures such as 37 and 44.5°C with the control media PCA. Besides, 3 mixed cultures of those isolates were also analyzed. According to the results obtained from pure cultures, no difference was found between the culture media ( $P>0.01$ ) however, the temperature factor was found as effective ( $P<0.01$ ) depending on the bacterial species. While fecal coliform *Escherichia coli* (30 isolates) gave the same number of colonies at the temperatures of 37 and 44.5 °C, different incubation temperatures were found as effective for *Enterobacter aerogenes* (8 isolates) and *Klebsiella pneumonia* (6 of 7 isolates) and *Citrobacter freundii* (1 isolate) and these bacteria could not grow at 44.5 °C. One *Klebsiella pneumonia* isolate that showed a fecal coliform characteristic grew easily at 44.5 °C.

While there was no difference between the culture media in mixed culture studies ( $P> 0.01$ ), the temperature differences were found as effective ( $P <0.01$ ). All colonies that grew at 44.5 °C were found to be *E. coli*.

In the assays, 2 indole-negative *E. coli*, 1  $\beta$ -GUR negative *E. coli* and only 1 fecal coliform other than *E. coli*, that's *Klebsiella pneumoniae* were isolated.

According to the findings, no difference found between 3 different selective media do not show that they can be used interchangeably. Because there is a probability of under stress factor of coliform bacteria in water samples analyzed during daily routine controls and the effectiveness of low or poor selectivity was not investigated in this study. However when active bacterial culture is used, it can be said that each of these selective media can be used interchangeably since they gave the same results with the control media PCA.

No significant difference was found between the morphological images of 4 different coliform group bacteria on the same selective medium during the subjective (visual) evaluation.

Year and Page Number (2013, 40 pages)

**Key words:** Coliforms, fecal coliforms, *E. coli*, membrane filtration, culture media

## TEŞEKKÜR

Eğitim ve alıŐma hayatım boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalıŐmaktan onur duyduğum, duyduğu güvenle beni cesaretlendiren ve laboratuvar imkânlarından en verimli Şekilde faydalanmamı sağlayan değerli hocam sayın Prof. Dr. Kadir HALKMAN'a, çalıŐmalarım boyunca desteğini ve yardımını esirgemeyen, Gıda Mühendisi Hilal SELAMOĞLU'na, yaŐamım boyunca beni her anlamda destekleyen ve yanımda olan annem, ağabeyim ve kardeŐime, Sn. Ömer ERDEM'in Őahsında; bu çalışmada sarf malzemesi olarak kullanılan Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC NPS besiyerleri ile membran filtreleri bağış yolu sağlayan [www.sartonet.com](http://www.sartonet.com); Sartonet Seperasyon Teknolojileri Ltd. Şti. İstanbul'a teşekkür ederim.

Sevda TAŞTEMÜR  
23 Kasım 2013, Ankara

## İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI .....	<i>i</i>
ONAY SAYFASI .....	<i>ii</i>
ÖZET .....	<i>iii</i>
ABSTRACT .....	<i>iv</i>
TEŞEKKÜR .....	<i>v</i>
İÇİNDEKİLER .....	<i>vi</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	<i>vii</i>
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	<i>viii</i>
SİMGELER DİZİNİ .....	<i>ix</i>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER .....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Genel Özellikleri .....	3
2.2. Koliform Grubu Bakterilerin Genel Özellikleri .....	4
2.3. Suların Mikrobiyolojik Analizleri .....	6
2.3.1. Membran filtrasyon .....	7
2.3.2. Sularda koliform grubu bakterilerin analizinde kullanılan besiyerleri .....	9
<b>3. GEREKÇE ve AMAÇ .....</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>16</b>
<b>4.1. Materyal .....</b>	<b>16</b>
<b>4.2. Yöntem .....</b>	<b>16</b>
4.2.1 Bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması .....	16
4.2.2. Membran filtrasyon .....	17
4.2.3. İstatistik analizler .....	18
<b>5. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>19</b>
5.1. Tanımlama Sonuçları .....	19
5.2. Sayım Sonuçları .....	19
<b>6. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>22</b>
6.1. İzolatların Tanımlanması .....	22
6.2. Sayım Sonuçları .....	24
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>31</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>34</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>41</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Selüloz asetat filtre gözenek yapısı .....	8
Şekil 2.2. Membran filtre kesiti .....	9
Şekil 2.3. Membran filtrasyon .....	9
Şekil 2.4. VRB Agar 'da koliform bakteriler.....	10
Şekil 2.5. Tergitol TTC besiyeri sarı benek kontrolü.....	12
Şekil 2.6. Chromocult Coliform Agar' da koliform bakteriler.....	13
Şekil 2.7. m-FC Agar'da koliform bakteriler.....	13
Şekil 2.8. Endo Agar'da koliform bakteriler.....	14
Şekil 6.1. <i>E. coli</i> , <i>Ent. aerogenes</i> , <i>Kleb. pneumoniae</i> ve <i>Citr. freundii</i> izolatlarının Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC besiyerlerinde 37 °C ve 24 saat inkübasyon sonundaki görüntüleri .....	27
Şekil 6.2. mFC besiyerinde <i>E. coli</i> izolatının 35 ve 44,5 °C'da 24 saat inkübasyon sonundaki koloni morfolojisi .....	28



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 5.1.</b> Membran filtrasyon sonuçları; tek bakteri (log KOB/mL) .....	19
<b>Çizelge 5.2.</b> Membran filtrasyon sonuçları; karışık kültür (log KOB/mL) .....	21
<b>Çizelge 6.1.</b> M-Endo, LES Endo ve Endo Agar bileşimleri (g/L) .....	25

## SİMGELER DİZİNİ

4-MU	4-methylumbelliferly
AOAC	Amerikan Resmî Analitik Kimyacılar Birliği
APHA	Amerikan Halk Sağlığı Kuruluğu
BAM	Bacteriological Analytical Manual
EC	E. coli Broth
EMS	En Muhtemel Sayı Yöntemi
ISO	Uluslararası Standartlar Örgütü
KOB	Koloni oluğuşturan birim
MR	Metil Red Testi
MRD	Maximum Recovery Diluent
MUG	4-methylumbelliferly- $\beta$ -D-glucorinide
NKS	Nährkartonscheiben
NPS	Nutrient Pad Set
PCA	Plate Count Agar
PNPG	p-nitrophenol $\beta$ -D-glucorinide
SIM	Sulfide Indole Motility
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
TTC	Trphenyl-tetrazoliumchlorid
TW	Trypton Water
UV	Ultraviyole
VP	Voges-Proskauer testi
VRB	Violet Bile Red
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galacto pyranoside
XGLUC	5-bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-glucorinide
$\beta$ -GUR	$\beta$ -glucorinidase

## 1. GİRİŞ

Koliform grup olarak adlandırılan bakteriler doğada yaygın bir şekilde bulunurlar ve buna bağlı olarak pek çok çevresel örnek ile işlenmemiş gıdaların hammaddelerinde doğal flora olarak görülürler. Dolayısı ile minimum düzeyde işlem görmüş gıdaların bir kısmında koliform grup bakterilere rastlanması kabul edilir ve pek çok ülkenin kodeksinde bazı gıdalarda düşük sayılarda bulunmalarına izin verilir.

Koliform grup üyesi olan *E. coli* ise doğada sadece sıcakkanlı hayvanların (memeliler ve kanatlılar) bulunur ve bir gıda ya da çevresel örnekte *E. coli* görülmesi fekal bulaşmayı kanıtlamaktadır.

Koliform grup bakteriler ve *E. coli* analizi konusunda numunedeki hedef/ beklenen bakteri sayısına göre yayma plak, dökme plak, en muhtemel sayı ve membran filtrasyon yöntemleri kullanılır. Bu analizlerde kullanılan besiyerleri standart yöntemlerde belirtilmiş olmakla birlikte kullanıcılar başka besiyeri çeşitlerini de tercih etmektedirler. Devamında aynı besiyeri çeşidi üzerinde farklı ticari markalar küçük modifikasyonlar yapmaktadırlar.

Türkiye'de içme ve kullanma suyunda koliform grup bakteri analizinde; membran filtrasyon yöntemi ve ISO 9308-1:2000 numaralı standartta geçen ismi ile "Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate" besiyeri kullanılması hükme bağlanmıştır.

Günlük uygulamada kullanıcılar Endo Agar ve mFC Agar besiyerlerini de tercih ettikleri gibi besiyeri üreten firmaların kendi web sayfalarında birbirleri ile çelişkili bilgiler verdiklerine de rastlanmaktadır. Örneğin, aynı besiyeri ve aynı amaç için farklı ticari firmaların web sayfalarında farklı inkübasyon sıcaklıklarına rastlanabilmektedir.

Bu çalışmada farklı markaların aynı çeşit besiyerini kıyaslamak değil, aynı markanın koliform grup bakteri analizinde sıklıkla tercih edilen 3 farklı besiyerini kıyaslamak yoluna gidilmiştir.

Bu amaçla gıda örneklerinden izole edilen toplam 46 adet koliform grup üyesi bakterinin tanımlamaları yapılmış, bunların aktif kültürleri steril damıtık suya eklenip gerekli seyreltiler yapıldıktan sonra membran filtreden geçirilmiş, filtreler 3 ayrı besiyerinde 2 farklı inkübasyon sıcaklığında tutularak kültürlerdeki bakteri sayıları hesaplanmış ve istatistik yöntemlerle sonuçlar kıyaslanmıştır.

Devamında *E. coli* ile fekal koliform üyesi olmayan 3 ayrı koliform bakteri türü ayrı ayrı kombine edilerek aynı testler uygulanmıştır.

Günlük uygulamada; içme suyu dolumu yapan fabrikaların ve hatta kamu kontrol kuruluşlarının laboratuvarlarında hangi besiyeri kullanılması, inkübasyon sıcaklığı ve süresi konusunda sorgulamalara rastlanabilmektedir. Oysa mevcut standart ve yönetmelikler yoruma gerek kalmayacak kadar açıktır. Sorgulamanın kaynağında, yoğun refakatçi flora maskeleyen olan numunelerde koliform grup bakteri kolonilerinin ayırt edilmesinden kaynaklanmakta, laboratuvarlar daha selektif olan Endo Agar kullanmak istemektedirler. Beraberinde, fiyat politikasına bağlı olarak bazen mFC besiyeri de tercih edilebilmektedir.

Oysa öncelikle düşük/ yüksek selektiviteli besiyeri tercihinde analiz edilecek mikroorganizmanın aktif konumda mı yoksa stres altında mı olduğu önemlidir. Aktif kültür, her zaman kolaylıkla gelirken, stres altında olanın yüksek selektiviteli besiyerinde gelişememe olasılığı vardır.

Buna bağlı olarak bu çalışmanın kurgusunda 3 farklı çeşit selektif besiyerinin birbiri yerine kullanılıp kullanılamayacağını araştırılması yoktur çünkü denemelerde tüm bakterilerin aktif kültürleri kullanılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. *Enterobacteriaceae* Genel Özellikleri

"Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" adlı kitabın 1994 yılı baskısında *Enterobacteriaceae*, Grup 5, Fakültatif Anaerob Çubuklar bölümünün 1. alt grubunda yer almaktadır. Bu familyanın üyeleri genellikle 0,3-1,8 µm boyunda Gram negatif, spor oluşturmayan düz çubuklardır. Büyük çoğunluğu peritrik flagellumları ile hareketlidir. Fakültatif anaerob ve kemoorganotorofik olup hem aerob solunum hem de fermantatif metabolizmaya sahiptirler. Çoğu 37 °C'da optimum gelişme gösterirken, *Yersinia* ve *Erwinia* türleri 25-30 °C'da daha aktif metabolizmaya sahiptirler. Glukoz ve diğer pek çok karbohidratı asit ve çoğu tür gaz oluşturarak fermente edebilirler. *Shigella dysenteriae* O Grup 1 dışındakiler oksidaz negatif ve katalaz pozitiflerdir. Bu familya üyelerinin çoğu nitratı indirger. Toprak, su, meyve ve sebzeler, tahıllar, çiçekli bitkiler, ağaçlar ile böcekler de dâhil olmak üzere pek çok hayvan türünde doğal olarak bulunurlar. Ekolojik olarak önemli ölçüde heterojenite gösterirler ve insanlarda, hayvanlarda, böceklerde ve bitkilerde potansiyel patojendirler. Bazı türleri tifo ve basilli dizanteri de dâhil olmak üzere ishale neden olurlar. Normal olarak ishale neden olmayan pek çok tür fırsatçı patojen olarak davranır. 30 cins altında 115'ten fazla tür ve alttür bulunur (1).

Bu aile içinde önemli bağırsak patojenleri *Salmonella*, *Shigella* ve *Yersinia* ve diyarejenik *E. coli* serotipleridir. Bazı üyeleri de gastrointestinal sistemde kolonize olurlar. Bunlar *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* gibi bakteriler olup, bunlar "Enterik bakteri" olarak da adlandırılırlar. *Enterobacteriaceae* içindeki bakterilerin çoğu pepton veya et özlü besiyerlerinde, NaCl veya başka madde ilave etmeden üreme özelliğinde olmaları, MacConkey Agarda iyi gelişmeleri, DNA'da G+C oranları %39-59 arasında olmaları, *Erwinia* cinsi dışındaki tüm enterik bakteri türlerinde ortak Enterobacteria antijeni bulundurmaları gibi ortak özellikleri de paylaşırlar (2-4).

*Enterobacteriaceae* üyeleri gıda mikrobiyolojisini en fazla ilgilendiren bakterilerdir. Bu grupta bulunan koliform bakteriler, fekal koliformlar, *E. coli* Biyotip 1, diyarejenik *E. coli* serotipleri, *Salmonella*, *Shigella* ve *Yersinia enterocolitica* pek çok gıda mikrobiyolojisi laboratuvarındaki

rutin analizlerde aranır ya da sayılır. Bunların dışında toplam *Enterobacteriaceae* sayımı da hijyen indeksi olarak önem kazanmıştır (5-7).

## 2.2. Koliform Grubu Bakterilerin Genel Özellikleri

*Enterobacteriaceae* içinde yer alarak ailenin genel özelliklerini taşıyan ve 35-37 °C'de 48 saat içinde laktozdan gaz ve asit oluşturan bakteriler koliform grup olarak tanımlanır. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* bu grupta yer alan ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli bir yere sahip olan bakterilerdir (3, 8).

Bu grubu oluşturan bakteriler, pek çok gıda maddesinde kalite göstergesi olarak aranır/ sayılırlar. Grubun *E. coli* dışındaki türleri genellikle bitki ve toprak kaynaklıdır. Gıdalarda bitki ve toprak kaynaklı olan koliform bakterilere düşük sayılarda izin verilebilir ya da izin verilmez (7, 8). Örneğin, 2011 tarihli Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği; tahıl unları, soya unu patates unları dâhil diğer unlarda  $10^4$  KOB/g sayıda koliform bakteriye izin verirken, yufka ve kadayıfta bu sayı  $10^3$  KOB/g ve sade kek, sade bisküvi, sade krakerler vb., kaplamalı, dolgulu ve/ veya çeşnili bisküviler, kekler ve krakerler ve gofrette (sade, kremalı, dolgulu, kaplamalı vb.) ise  $10^2$  KOB /g şeklindedir (9).

Bazı gıdalarda bulunmasına izin verilen koliform grup bakterilere içme-kullanma, içme suları ve kaynak sularında bulunmasına izin verilmez. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliğin 2011 yılı baskısında (10) ve 2013 yılında değiştirilen yeni yönetmelikte (11) içme-kullanma sularının 100 mL'sinde, içme suları ve kaynak sularının 250 mL'sinde da koliform grup bakteri sayısı 0 olarak verilmiştir.

Koliform grup olarak tanımlanan adı geçen 5 tür bakteri, genellikle insan sağlığı açısından önemli bir tehlike oluşturmaz. Ancak, fırsatçı patojen olarak davranabildikleri gibi özellikle bazı *E. coli* serotipleri ölüme kadar giden enfeksiyonlara neden olabilmektedir (3, 12, 13).

Grubun en iyi bilinen üyesi olan *E. coli*, 1885 yılında Alman çocuk doktoru olan Theodor Escherich tarafından izole edilmiş ve *Bacterium coli commune* olarak adlandırılmıştır. Verilen bu isim, bakterinin bağırsakta normal flora halinde bulunduğunu gösterir. *E. coli*, bağırsakta vitamin sentezine katıldığı ve zararlı bakterileri baskıladığı için yararlı bir bakteri olarak da tanımlanabilmekle birlikte 1950'li yıllardan itibaren insanlarda enfeksiyonlara neden olan serotiplerinin bulunması ile birlikte bu bakteriye olan yaklaşım değişmiştir (13, 14).

Bireysel hastalanmalar dışında ilk kez 1982 yılında ABD'de Oregon ve Michigan'da 2 salgın ile görülen *E. coli* O157:H7 serotipi daha sonraki yıllarda da pek çok kişinin hastalanmasına ve ölmesine neden olmuştur. 2011 yılında Almanya'dan başlayıp tüm Avrupa'ya yayılan *E. coli* O104:H4 serotipi ise toplam 50 kişinin ölümüne yol açmıştır (13-15).

Koliform grup bakteriler içinde sadece *E. coli*, sıcakkanlı hayvanların (memeliler ve kanatlılar) bağırsak florasının doğal üyesidir. Dolayısı ile gıda ya da çevresel bir örnekte bu bakteriye rastlanması doğrudan ya da kanalizasyon vb. yollarla dışkı bulaştığının kanıtıdır. Dışkının bulaşması ile bağırsak kökenli *Salmonella*, *Shigella*, parazitler vb. gibi primer patojenlerin bulunma potansiyelini gösterir. Buna bağlı olarak *E. coli*'nin, fekal bulaşma göstergesi olması nedeni ile gıda, yem ve çevre örneklerinde bulunması istenmez (2, 3). Ancak koliform grup bakterilerin diğer 4 üyesi içinde de bağırsak kökenli olanlar bulunur. Bir diğer deyiş ile *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* ve *Klebsiella pneumoniae* bitki-toprak ya da dışkı kaynaklı olabilir ve dolayısı ile dışkı kaynaklı olanlar, *E. coli* gibi fekal bulaşma göstergesi olarak kabul edilirler. Eijkman tarafından 1904 açıklanan yöntem ile koliform grup bakterilerin bitki-toprak ya da dışkı kaynaklı oldukları yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı ile ayrt edilebilir. Fekal koliformlar olarak tanımlanan bu grup, 45,5 °C'da laktozu fermente edebilir. Gıda analizlerinde bu sıcaklık derecesi kullanılmasına karşın su, kabuklular ve kabukluların üretildiği suların analizinde 44,5 °C inkübasyon sıcaklığı uygulanır. Fekal koliformlar kimi kaynaklarda termotolerant/ ısıya dayanıklı koliformlar olarak da anılır (3, 5, 7, 13).

Fekal koliform grup içinde asıl olarak *E. coli* yer almakla birlikte özellikle bitkisel gıdaların analizinde *E. coli* olmayan örneklerde diğer fekal koliform bakterilere rastlanılabilmektedir (16). Dolayısı ile gıda, su ve çevresel örneklerin analizinde *E. coli* yerine fekal koliformların analizi, fekal bulaşmanın daha kesin bir göstergesi olacaktır. Ancak, inkübasyon sıcaklığının kritik olması ve buna bağlı olarak analizde sahte negatif ya da sahte pozitif sonuç alınma olasılığı, *E. coli* analizinin çok kolay bir şekilde yapılabilmesi gibi nedenlerle çoğu ulusal ve uluslararası standartta fekal bulaşma göstergesi olarak *E. coli* analizi yapılır (3, 6, 7, 17, 18).

### **2.3. Suların Mikrobiyolojik Analizleri**

Gıda, yem, su ve çevresel örneklerde var/ yok ya da sayım şeklinde yapılan mikrobiyolojik analizlerde doğru sonuçların alınması için çeşitli kurallar vardır. Bunların başında analiz edilen numuneye dışarıdan bir bulaşma olmamasının sağlanması gelir. Materyaldeki mikroorganizmaların çalışanlara ve çevreye bulaşmaması da önemlidir. Genel laboratuvar kurallarına uyulması konusunda çeşitli ulusal ve uluslararası standartlar bulunmaktadır. (8, 19, 20).

Var/ yok testleri genellikle patojenler için uygulanırken, sayım testleri genellikle çürükçüller için kullanılır. Sayım, hedef alınan mikroorganizmanın numunedeki muhtemel sayısı ya da hedeflenen sayısı dikkate alınarak yayma plak kültürel sayım, dökme plak kültürel sayım, En Muhtemel Sayı yöntemi ile sayım ve membran filtrasyon yöntemi ile yapılır. Bunların dışında mikroskobik sayım, metabolizmaya dayalı sayım vb. başka sayım yöntemleri de vardır. Suların mikrobiyolojik analizinde 1 mL numunede 22 °C'da koloni sayımı ile 37 °C'da koloni sayımının dökme kültürel sayım yöntemi ile ancak, 250 mL numunenin *E. coli*, enterokoklar, koliform bakteri, *Pseudomonas aeruginosa*, anaerob sporlu sülfid indirgeyen bakteriler ve patojen stafilkokların membran filtrasyon yöntemi ile analizi hükme bağlanmıştır (8, 11).



### 2.3.1. Membran filtrasyon

Membran filtre, Göttingen Üniversitesi'nden Prof. Richard Zsigmondy tarafından icat edilmiş, 20. yüzyılın en önemli buluşlarından biridir. Prof. Zsigmondy, “inorganik ve kolloid kimya” üzerinde yaptığı çalışmalar nedeniyle 1925 yılında Nobel ödülü kazanmıştır. Ölümünden 2 yıl önce 1927 yılında Sartorius desteği ile kurduğu Membranfiltergesellschaft m.b.H. firması membran filtreye teknik gelişim yanı sıra, ticari anlamda fırsatlar doğurmuştur. İkinci Dünya Savaşı sonrası, yıkılan alt yapının yarattığı içme suyunda kontaminasyon ve özellikle kolera riski nedeni ile membran filtrenin mikrobiyolojik analizlerde kullanılma olanağı doğmuş, bu olanak membran filtreyi günümüzde de halen işlev gören ilk amacına ulaştırmıştır (21). Bugün su dolumu yapan işletmelerin çok büyük bir bölümü, kaynak sularını mikroorganizmalardan arındırmak için membran filtrasyon sistemi kullanmaktadırlar.

Prensip olarak bir süzgeç gibi işlev görür. Standart olarak kullanılan 0,45 µm porlu (gözenekli) membran filtreden bakteriler geçemez ve filtre üzerinde kalır. Maya ve küf analizlerinde daha büyük porlu (0,65; 0,8; 1,2 µm) membran filtreler kullanılır. Membran filtrasyon sisteminden geçirilen sıvı ve gazlardaki mikroorganizmalar filtre üzerinde tutulur. Daha sonra bu filtre, uygun bir besiyeri üzerine yerleştirilir ve hedef mikroorganizma için uygun sıcaklık, süre ve gaz atmosferinde inkübasyona bırakılır. Besiyeri olarak;

-Besiyeri emdirilmiş ve kurutulmuş pedin ıslatılarak aktive edilmesi ile hazırlanan hazır ticari preparat,

-Boş pede sıvı besiyeri ilavesi ile hazırlanan ticari olan ya da olmayan preparat,

-Laboratuvarda hazırlanan besiyeri

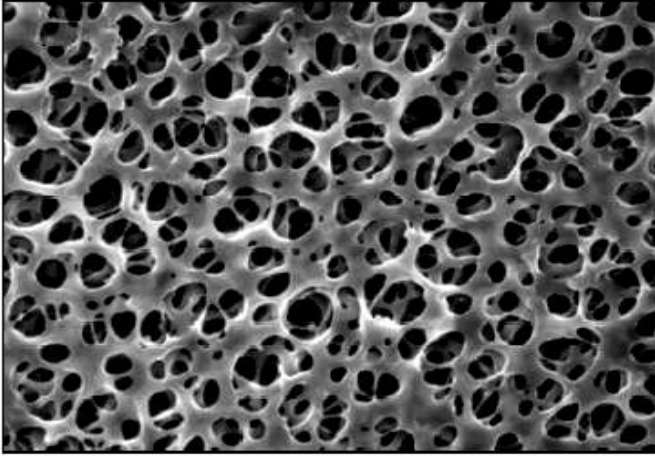
olmak üzere farklı besiyerleri kullanılabilir.

Yerli ve yabancı ticari kuruluşlar hazır pedlere ilgili besiyerini emdirip, kurutmakta ve bu pedleri steril plastik Petri kutuları içine yerleştirerek kullanıcılara sunmaktadırlar. Bu kitler kullanım aşamasında steril saf su ile ıslatılarak aktive edilmektedir.

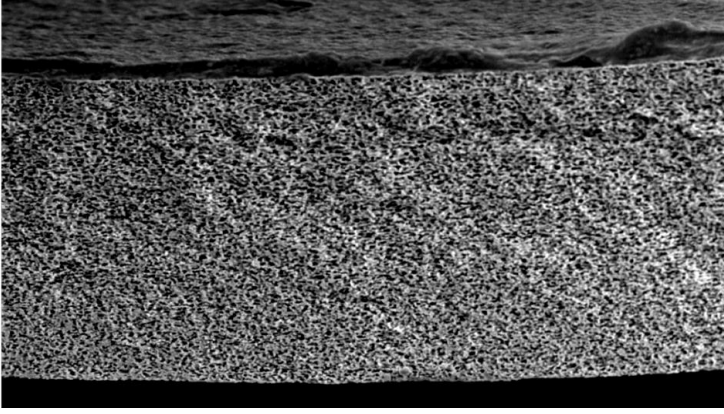
Yine yerli ve yabancı ticari kuruluşlar tarafından hazırlanıp piyasaya sunulan diğer besiyeri seçeneğinde boş steril pedler, steril Petri kutusuna yerleştirilerek sunulmaktadır. Yaygın pazarlama şekli ile bu kitlerin yanında sıvı besiyeri de verilmekte, kullanıcı steril pede steril sıvı besiyerini ilave ederek besiyerini hazırlamaktadır. Sıvı besiyeri, kit ile birlikte pazarlanabildiği gibi kullanıcı tarafından laboratuvarında da hazırlanabilir.

Doğrudan agarlı besiyerleri de bu amaçla kullanılabilir. Bu amaçla kullanıcı, besiyerini laboratuvarında hazırlayabileceği gibi hazır olarak pazarlanan agarlı besiyeri de kullanabilir. Her 3 seçeneğin de bilimsel olarak bir farkı yoktur (21-23).

Membran filtreler selüloz nitrat, selüloz ester, karışık ester vb. bileşimlerde olabilmektedir. Şekil 2.1'de selüloz asetat filtre gözenek yapısı, Şekil 2.2'de membran filtre kesiti görülmektedir.

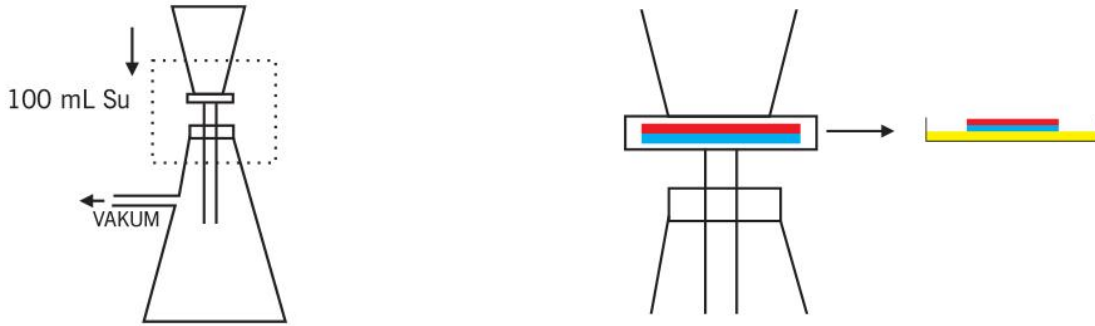


**Şekil 2.1.** Selüloz asetat filtre gözenek yapısı (21 nolu kaynaktan izin alınarak kullanılmıştır).



**Şekil 2.2.** Membran filtre kesiti (21 nolu kaynaktan izin alınarak kullanılmıştır)

Suların membran filtrasyonunda hedef hacimde (100; 250 mL) su, vakum desteği ile filtreden geçirilir ve mikroorganizmaların tutunmuş olduğu yüzey üstte kalacak şekilde uygun bir besiyerine yerleştirilir (Şekil 2.3)



**Şekil 2.3.** Membran filtrasyon (8 nolu kaynaktan izin alınarak kullanılmıştır)

### **2.3.2. Sularda koliform grubu bakterilerin analizinde kullanılan besiyerleri**

Çeşitli ulusal ve uluslararası standartlarda gerek genel olarak gıdalarda gerek içme ve kullanma sularının toplam koliformlar, fekal koliformlar ve *E. coli* analizi için önerilen farklı besiyerleri olduğu gibi, besiyeri üreticisi ticari kuruluşlar tarafından pazarlanan başka bileşimli çok sayıda besiyeri de vardır. Bunlar içinde Violet Red Bile (VRB) Agar, Lauryl Sulfate (LST) Broth ve

Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate, uluslararası standartlarda en çok değinilen besiyerleridir. Bu besiyerleri bileşimleri aynı olmakla birlikte farklı ticari kuruluşlar tarafından farklı isimlerle de pazarlanabilmektedir. Aşağıda bu amaçla en yaygın kullanılan besiyerleri hakkında kısa bilgiler verilmiştir (8, 21) Bu bölümde kullanılan bütün fotoğraflar, adı geçen kaynakların izni ile kullanılmıştır.

**-VRB Agar:** Bileşimi, Peptone from meat 7,0 g/L; Yeast Extract 3,0 g/L; Lactose 10,0 g/L; NaCl 5 g/L; Ox Bile (Bile Salt Mixture) 1,5 g/L; Neutral Red 0,03 g/L; Crystal Violet 0,002 g/L; Agar 13 g/L şeklinindedir. ISO 4832 ve FDA Form 2400a 3/01 ve pek çok uluslararası standarda uygun olarak koliform grup analizinde kullanılır. VRBL (Violet Red Bile Lactose) Agar adı ile de anılır. Besiyeri bileşiminde bulunan safra tuzları ve kristal viyole başta Gram pozitifler olmak üzere refakatçi floranın gelişimini inhibe ederken laktoz pozitif bakterilerin varlığı pH indikatörü ile koloni renginin kırmızıya dönüşmesi ve safra asitlerinin koloni etrafında çökelti oluşturması ile belirlenir.



**şekil 2.4.** VRB Agar 'da koliform bakteriler

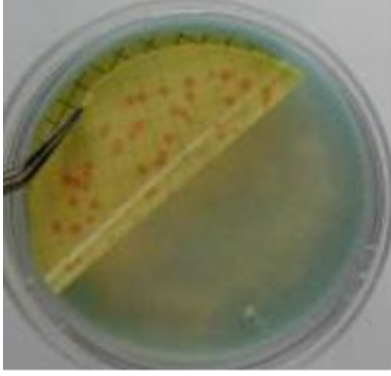
**-LST Broth:** ISO 4831 ve pek çok uluslararası standartta koliform grup bakterilerin EMS yolu ile sayılması için önerilen besiyeridir. Lauryl Sulfate Broth, Lauryl Sulfate Tryptose adları ile de bilinir. Bileşimi, Tryptose 20,0 g/L; Lactose 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Sodium Lauryl Sulfate 0,1 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,75 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,75 g/L şeklinindedir. Besiyeri bileşiminde bulunan lauryl sulfate refakatçi floranın gelişimini baskımlarken yüksek düzeyde bulunan besin maddeleri ve fosfat

tampon "laktozu yavaş kullanan" koliform bakterilerin dahi hızlı gelişimini ve fazla miktarda gaz çıkışını sağlar.

**-Brilliant Green Bile (BGB) Broth:** Bileşimi, Peptone 10,0 g/L; Lactose 10,0 g/L; Ox Bile 20,0 g/L; Brilliant Green 0,0133 g/L şeklindedir. Pek çok uluslararası standartta koliform doğrulama besiyeri olarak kullanıldığı gibi, bazı standartlarda koliform bakterilerin var/yok testinde zenginleştirme besiyeri olarak da kullanılmaktadır. Bu besiyeri Brilliant Green Bile Lactose Broth, Brilliant Green Bile Lactose Broth %2 ve BRILA Broth isimleri ile de bilinir. Besiyeri bileşiminde bulunan brilliant green ve safra tuzları refakatçi floranın gelişimini baskımlarken, koliform grup bakteriler laktozdan gaz oluşturarak gelişirler.

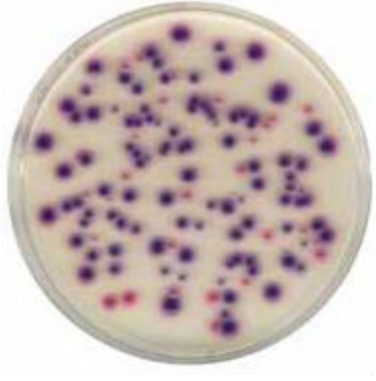
**-Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate:** ISO 9308-1:2004 numaralı standarttaki bu olmakla birlikte farklı ticari markalar tarafından Lactose TTC Agar with Tergitol® 7, Tergitol TTC, Tergitol-7 Agar gibi isimlerle de bilinir. Bileşimi, Lactose 20,0 g/L; Peptone 10,0 g/L; Yeast extract 6,0 g/L; Meat extract 5,0 g/L; Bromothymol Blue 0,05 g/L; Tergitol 7 0,1 g/L; agar 12,7 g/L şeklindedir. TTC, otoklavlanmış besiyerine sonradan eklenir. ISO 9308-1 sayılı standarda uygun olarak özellikle su analizlerinde koliform bakterilerin membran filtrasyon yöntemi ile sayılmasında kullanılır. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkındaki Yönetmelik, sularda koliform grup bakteri analizinin membran filtrasyon yöntemiyle yapılması gerektiğini ve bu amaçla Tergitol TTC kullanılmasını hükme bağlamıştır (ISO 9308-1). Tergitol TTC, koliform grup bakteriler için kullanılanlar arasında zayıf selektiviteye sahip bir besiyeridir. Buna bağlı olarak yakın akraba türler, bu besiyerinde yeterince baskılanmaz. Ancak besiyerinin zayıf selektiviteye sahip olması, stres altındaki koliformların da gelişmesine izin verir. Koliform grup bakteriler laktozdan asit oluşturur. Bu asitlik filtre altındaki sarı benek ile belirlenir. Filtrenin üzerindeki kolonilerde görülen sarı/ turuncu renk, oluşan asitlikten değil, TTC'nin zayıf olarak indirgenmesinden kaynaklanır. Koliform grup bakteriler TTC'yi zayıf bir şekilde indirgerler ve buna bağlı olarak sarı/ turuncu renkli koloni yaparlar. Koliform grup bakterilerin dışında da bu besiyerinde gelişebilen ve zayıf bir şekilde TTC'yi indirgeyerek sarı/ turuncu renkli koloni yapabilen bakteriler bulunabilir. Dolayısı ile koliform grup bakteriler için tipik reaksiyon olan laktozdan asit oluşumu, filtre üzerindeki sarı/ turuncu renkli kolonilerin, filtre altında sarı benek vermesi ile kontrol edilir. Sarı benek kontrolü, emdirilmiş besiyeri olan pedin altından değil,

filtrenin altından yapılmalıdır. Sarı benek kontrolü, emdirilmiş besiyeri olan pedin altından değil, filtrenin altından yapılmalıdır.



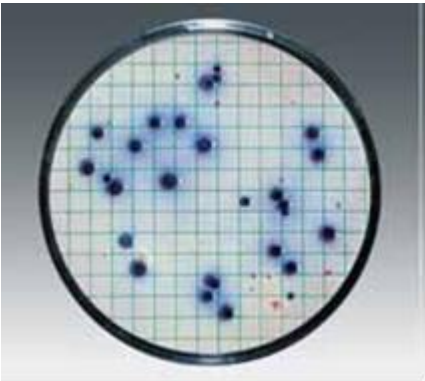
**Şekil 2.5.** Tergitol TTC besiyeri sarı benek kontrolü

**-Chromocult Coliform Agar:** Bileşimi, Peptone 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,2 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,7 g/L; Sodium pyruvate 1,0 g/L; Tryptophane 1,0 g/L; Agar 10,0 g/L; Sorbitol 1,0 g/L; Tergitol 7 0,15 g/L; Chromogenic mixture 0,4 g/L şeklindedir. Besiyeri bileşiminde bulunan seçilmiş peptonlar, piruvat ve fosfat tampon ağır hasar görmüş koliform bakterilerin kendilerini onarmalarını sağlarken tergitol-7, Gram pozitiflerin ve bazı Gram negatiflerin gelişimini baskılar. Koliform grup bakteriler için karakteristik olan  $\beta$ -D-galactosidase enzimi Salmon-GAL kromojenik substratını parçalayarak koliform bakterilerin pembemsi kırmızı koloni oluşturmasını sağlar. Bileşimdeki X-Glucuronide substratı ise *E. coli* için karakteristik olan  $\beta$ -D-Glucuronidase enzimi tarafından parçalanır. Böylece *E. coli* koliform bakteri olarak Salmon-GAL'i parçalaması yanında X-Glucuronide substratını da parçalayarak diğer koliform bakterilerden koyu mavi-menekşe renkli koloni oluşturması ile ayrılır.



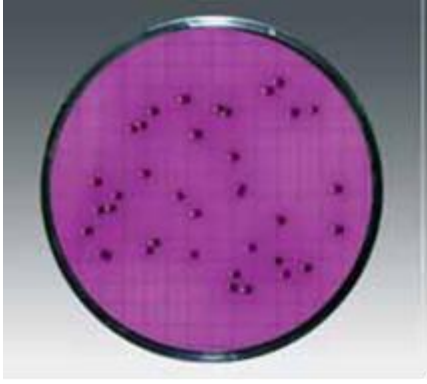
Şekil 2.6. Chromocult Coliform Agar' da koliform bakteriler

**-m-FC Agar:** AOAC, APHA ve EPA yönergelerine uygun olarak membran filtrasyon yöntemi ile sularda fekal koliformların aranması için ve sayımı için selektif katı besiyeri olarak kullanılır. m-FC NKS olarak bilinen ticari marka olarak da pazarlanmaktadır. Bileşimi Proteose peptone 5,0 g/L; Tryptose 10,0 g/L; Yeast extract 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Bile salts 1,5 g/L; Lactose 12,5 g/L; Methyl blue 0,1 g/L; Agar-agar 15,0 g/L. Bileşimde, daha önceden kullanılan Aniline blue yerine artık Methyl blue kullanılmaktadır. Pepton ve maya ekstraktı besin kaynağı iken, safra tuzları Gram negatif refakatçi florayı baskılar. Laktoz, yüksek sıcaklıkta fekal koliformlar tarafından fermente edilir ve mavi renkli koloni oluşturur. Besiyerinde gelişebilen diğer koloniler gri renkli koloni yapar. Yüksek inkübasyon sıcaklığı, dışkı kökenli olmayan (non-fecal) koliformları baskılar. İnkübasyon 36 °C'da yapılırsa, fekal olan ve olmayan tüm koliformlar aynı renk ve büyüklükte koloni oluştururlar. Bu nedenle, fekal koliform analizinde 44,5±0,5 °C inkübasyon sıcaklığı kullanılmalıdır.



Şekil 2.7. m-FC Agar'da koliform bakteriler

**-ENDO Agar:** SMWW yönergelerine uygundur. ENDO NKS adı ile ticari marka olarak da pazarlanmaktadır. Bileşimi Peptones 10,0 g/L;  $K_2HPO_4$  2,5 g/L; Lactose 10,0 g/L;  $Na_2SO_3$  (anhydrous) 3,3 g/L; Pararosanilin (Fuchsin) 0,3 g/L; Agar-agar 12,5 g/L şeklindedir. Besiyeri bileşimindeki sodyum sülfid ve fuksin Gram pozitif bakterilerin gelişimini baskılar. *E. coli* ve koliform bakteriler laktozu asit ve aldehit oluşturarak metabolize eder. Oluşan aldehit, fuksin-sülfid bileşiğindeki fuksini serbest bırakır ve böylece koloni rengi kırmızı olur. *E. coli*'de bu reaksiyon çok kuvvetli olarak gerçekleşir ve kolonideki fuksin kristalleri koloni renginin metalik parlak yeşil (fuksin parlaklığı) olmasını sağlar.



**Şekil 2.8.** Endo Agar'da koliform bakteriler



## GEREKÇE ve AMAÇ

İçme ve kullanma sularının yasal mikrobiyolojik analizinde farklı parametreler incelenmektedir. Bunlardan en önde gelen kontrollerden birisi koliform grup bakteri analizidir. Membran filtrasyon tekniği ile yapılan bu analizde uluslararası standartlara göre; Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate besiyeri kullanılmaktadır. Zayıf bir selektiviteye sahip olan bu besiyerinde koliform grup bakteriler yanında yakın akraba türler de kolaylıkla gelişebilmektedir. Ancak bu besiyerinin zayıf selektivitesinin avantajı hasar görmüş olan koliformların gelişmesini sağlamaktadır.

Günlük uygulamalarda ENDO besiyerinin sıklıkla tercih edildiği bilinmektedir. Koliform grup bakteriler içinde özellikle *E. coli* analizi gerekli ise bu besiyerinde metalik parlak renk ile *E. coli* kolaylıkla diğer koliform bakterilerden ayırt edilebilmektedir. ENDO, selektivitesi yüksek olan bir besiyeridir.

mFC ise, fekal koliformların yüksek inkübasyon sıcaklığında mavi renkli koloni oluşturması ile ayırt edilmesini sağlayan yine zayıf selektiviteli bir besiyeridir. Bu besiyerinde selektiviteyi asıl olarak sağlayan yüksek inkübasyon sıcaklığıdır. Günlük kullanımda bu besiyerinin 37 °C'da inkübe edildiğine rastlanılmaktadır.

Özellikle içme suyu üretim tesislerindeki günlük uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bu 3 besiyerinde koliform grup ve *E. coli* analizlerinde hatalı besiyeri ve/ veya inkübasyon sıcaklığı kullanımına bağlı olarak sahte negatif ya da sahte pozitif sonuçlar alınabilmektedir. Sahte negatif sonuçlar halk sağlığını tehdit ederken, sahte pozitif sonuçlar ise gereksiz ekonomik kayba yol açmaktadır. Bu gibi hatalı sonuçlar alınıyor ise bunun önüne geçilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, kullanılan 3 besiyeri ile 37 °C ve 44,5 °C'da yapılan inkübasyonlarda elde edilen koliform grup/ *E. coli* sayım sonuçları karşılaştırılmıştır.

## **4. MATERYAL ve YÖNTEM**

### **4.1. Materyal**

Bu tez, Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bakterileri elde etmek için Ankara semt pazarından alınan marul, tere, maydanoz, roka, çilek numuneleri, lokantadan temin edilen salata numuneleri, Atatürk Orman Çiftliği Süt Fabrikasından (Ankara) alınan çiğ süt numuneleri kullanılmıştır.

Denemelerde kullanılan Tergitol TTC NKS (14056), ENDO NKS (14053) ve m-FC NKS (14068) ile bu besiyerlerine ilişkin membran filtreler, Sartonet Separasyon Teknolojileri Ltd. Şti. İstanbul tarafından bu çalışma için bağış yolu sağlanmıştır.

### **4.2. Yöntem**

#### **4.2.1 Bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması**

Pazardan alınan marul, tere, maydanoz, roka, çilek ile lokantadan temin edilen salata numunelerinden 10 g tartılıp üzerine 90 mL steril Maximum Recovered Diluent (MRD; Merck) konularak karıştırılmıştır. MRD eklenen numunelerden ve çiğ sütlerden 0,1 mL alınarak VRB Agar (Merck) besiyerine yayma metodu ile ekim yapılmış, 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Saf kültür elde etmek için 1-2 mm çapında presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler belirlenmiş, iğne öze ile bu koloniler alınarak CASO Broth (Merck) besiyerine ekilmiş, 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gelişme olan besiyerlerinden öze yardımı ile saflaştırma amacıyla tekrar VRB Agar'a çizgi ekim yapılarak 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde izole edilen 1-2 mm çapında presipitat zonu ile çevrili kırmızı tek koloniler vida kapaklı yatık CASO Agar (Merck) besiyerine sürülerek 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılmış ve bu şekilde çalışma kültürü koleksiyonu oluşturulmuştur.

Tanımlama testleri öncesinde belirlenmiş tüm bakteriler aktif hale gelmesi için CASO Broth besiyerine öze ile ekilerek 37 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (8).

Tanımlama testleri için ilk aşamada bakteriler Fluorocult LST Broth (Merck) besiyerine aşılanmış, 37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda uzun dalga boylu (366 nm) UV lamba ile floresan oluşturan bütün kültürlerle indol testi (bknz. Ek 1) uygulanmıştır. Floresan ışımaya veren ve indol pozitif sonuç veren bütün kültürler *E. coli* olarak tanımlanmıştır (8).

Bu test sonuçlarına göre *E. coli* olmadığına karar verilen kültürlerin tanımlanması için; Metil Red (MR), Voges Proskauer (VP), H<sub>2</sub>S oluşturma, hareket, mannitol fermantasyonu, sorbitol fermantasyonu, sakkaroz fermantasyonu ile özellikle *E. coli* olmayan fekal koliform bakterilerin belirlenmesi için Eijkman (44,5 °C'da gelişme) testi (bknz. Ek 1) uygulanmıştır (8, 24, 25).

#### **4.2.2. Membran filtrasyon**

Aktifleştirilen kültürlerde 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> KOB/mL bakteri olduğu kabul edilerek standart yöntemle ve MRD kullanılarak 10<sup>-7</sup>'ye kadar seyreltileri yapılmış, bu seyreltiden 100'er mL steril saf suya ayrı ayrı olacak şekilde 1 ve 0,1 mL kültür eklenmiş, bu şekilde saf kültür ile bulaştırılan su örneklerine membran filtrasyon uygulanmıştır. Membran filtrasyonda Sartorius marka 3 hüneli sistem kullanılmıştır. Her bakteri için 2 seyrelti, 3 farklı besiyeri ve 2 inkübasyon sıcaklığı (37±0,5 ve 44,5±0,2) için 12 kez membran filtrasyon yapılmış, ayrıca kıyaslama amacı ile 10<sup>-5</sup> ve 10<sup>-6</sup> seyreltilerden Plate Count Agar (PCA; Merck) besiyerine 2 paralel olarak yayma kültürel sayım ile ekim yapılmış, her seyreltme serisinden 1 takım 37±0,5 °C, diğeri 44,5±0,2 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda PCA besiyerinde 30-300 arasında membran filtrelerde ise ~20-30 koloni olan seyreltiler dikkate alınarak standart formül ile kültürdeki sayı belirlenmiş ve log KOB/mL olarak çizelgelere işlenmiştir.

Orijinal kültürün  $10^{-7}$  seyreltisinden 0,1 mL/ 100 mL damıtık su ile 44,5 °C'da inkübasyon ile yapılan analizde koloni gelişmesi olmayan tüm sonuçlar çizelgelerde <6 log KOB/mL olarak çizelgelere işlenmiştir. Devamında, bu kültürler 4 besiyerine öze ile sürülerek 44,5 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılmış ve koloni gelişmesi izlenmiştir.

Son olarak 1 adedi *E. coli*, diğeri fekal olmayan koliform bakteri olmak üzere 3 adet karışık kültürden yukarıda açıklandığı şekilde 100 mL damıtık suya eklenmiş ve filtrasyon yapılarak besiyeri ve özellikle inkübasyon sıcaklığının etkisi araştırılmıştır.

Kullanılmış tüm malzeme 121 °C'da 15 dakika sterilize edildikten sonra atılmış/ yıkanmıştır.

#### **4.2.3. İstatistik analizler**

Minitab 15.0 programında 2 faktörlü varyans analizi ile yapılmıştır.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. Tanımlama Sonuçları

Denemelerde kullanılan farklı gıda numunelerinden izole edilen bakteriler; 1 adet *Citr. freundii*, 8 adet *Ent. aerogenes*, 7 adet *Kleb. pneumoniae* ve 30 adet *E. coli* olarak tanımlanmıştır.

### 5.2. Sayım Sonuçları

Denemelerde izole edilen 46 bakterinin 37 ve 44,5 °C inkübasyon sonunda PCA, Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC NKS besiyerlerindeki sayım sonuçları Çizelge 5.1'de toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 5.1. Membran filtrasyon sayım sonuçları; tek bakteri (log KOB/mL)

Bakteri	37 °C PCA	44,5 °C PCA	37 °C Terg	44,5 °C Terg	37 °C Endo	44,5 °C Endo	37 °C mFC	44,5 °C mFC
<i>Citr. freundii</i> 01	8,78	<6*	8,82	<6	8,92	<6	8,81	<6
<i>E. coli</i> 01	8,86	8,79	8,90	8,94	8,85	8,94	8,73	8,97
<i>E. coli</i> 02	9,02	8,97	9,16	9,08	9,08	9,09	9,13	9,13
<i>E. coli</i> 03**	8,69	8,60	8,48	8,59	8,73	8,68	8,54	8,63
<i>E. coli</i> 04	8,67	8,65	8,72	8,30	8,73	8,32	8,77	8,70
<i>E. coli</i> 05	9,39	9,45	9,37	9,33	9,33	9,34	9,37	9,40
<i>E. coli</i> 06	9,15	9,23	9,28	9,16	9,24	8,79	9,29	9,30
<i>E. coli</i> 07	8,90	8,91	9,10	8,93	9,05	8,04	9,08	8,91
<i>E. coli</i> 08	9,13	9,15	9,15	9,09	9,12	9,09	9,18	8,12
<i>E. coli</i> 09	8,83	8,84	8,92	8,84	8,90	7,78	8,94	8,77
<i>E. coli</i> 10	9,08	8,85	9,14	8,83	9,23	8,53	9,21	8,91
<i>E. coli</i> 11	9,58	9,61	9,60	9,53	9,59	9,29	9,59	9,60
<i>E. coli</i> 12	9,46	9,48	9,51	9,42	9,41	9,20	9,46	9,45
<i>E. coli</i> 13	9,30	9,26	9,31	9,34	9,59	9,08	9,33	9,03
<i>E. coli</i> 14	9,10	9,10	9,00	8,86	9,00	8,52	9,06	8,98
<i>E. coli</i> 15	8,85	8,90	8,91	7,90	8,97	7,90	8,91	8,81

Bakteri	37 °C PCA	44,5 °C PCA	37 °C Terg	44,5 °C Terg	37 °C Endo	44,5 °C Endo	37 °C mFC	44,5 °C mFC
<i>E. coli</i> 16***	9,14	9,15	9,16	8,87	9,10	7,60	9,05	8,96
<i>E. coli</i> 17	9,28	9,22	9,25	9,23	9,35	9,24	9,24	9,27
<i>E. coli</i> 18	9,31	9,32	9,25	9,28	9,17	9,02	9,20	9,33
<i>E. coli</i> 19	9,14	9,01	9,10	8,98	9,08	8,04	9,03	9,06
<i>E. coli</i> 20	9,31	9,32	9,25	9,28	9,17	9,02	9,20	9,33
<i>E. coli</i> 21	8,96	9,11	8,94	8,03	9,07	8,18	8,99	8,01
<i>E. coli</i> 22	9,19	9,11	9,28	8,63	9,23	8,36	9,27	9,78
<i>E. coli</i> 23	9,26	8,86	9,23	8,70	9,24	8,04	9,13	9,10
<i>E. coli</i> 24	9,25	9,18	9,18	9,16	9,18	9,16	9,12	9,22
<i>E. coli</i> 25	9,07	9,04	9,09	8,18	9,10	8,54	9,14	9,06
<i>E. coli</i> 26	9,29	9,26	9,26	9,29	9,27	9,08	9,29	9,28
<i>E. coli</i> 27	9,03	8,99	9,01	9,06	9,00	8,97	8,98	9,02
<i>E. coli</i> 28	9,13	9,23	9,22	9,25	9,26	9,18	9,23	9,28
<i>E. coli</i> 29***	9,06	8,85	9,05	8,57	9,08	8,51	9,05	8,79
<i>E. coli</i> 30	9,26	9,11	9,18	8,91	9,23	8,88	9,17	9,10
<i>Ent. aerogenes</i> 01	9,42	<6	9,37	<6	9,45	<6	9,49	<6
<i>Ent. aerogenes</i> 02	9,21	<6	9,11	<6	9,17	<6	9,21	<6
<i>Ent. aerogenes</i> 03	8,76	<6	8,91	<6	8,76	<6	8,88	<6
<i>Ent. aerogenes</i> 04	9,28	<6	9,10	<6	9,27	<6	9,21	<6
<i>Ent. aerogenes</i> 05	9,21	<6	9,36	<6	9,28	<6	9,22	<6
<i>Ent. aerogenes</i> 06	8,80	<6	8,79	<6	8,78	<6	8,83	<6
<i>Ent. aerogenes</i> 07	9,39	<6	9,36	<6	9,42	<6	9,41	<6
<i>Ent. aerogenes</i> 08	9,19	<6	9,19	<6	9,25	<6	9,09	<6
<i>Kleb. pneumoniae</i> 01****	9,18	9,05	9,12	8,32	9,38	7,95	9,20	8,34
<i>Kleb. pneumoniae</i> 02	8,61	<6	8,71	<6	8,72	<6	8,76	<6
<i>Kleb. pneumoniae</i> 03	8,56	<6	8,49	<6	8,63	<6	8,63	<6
<i>Kleb. pneumoniae</i> 04	8,52	<6	8,56	<6	8,63	<6	8,57	<6
<i>Kleb. pneumoniae</i> 05	9,06	<6	8,95	<6	8,91	<6	9,02	<6
<i>Kleb. pneumoniae</i> 06	8,53	<6	8,30	<6	8,58	<6	8,58	<6
<i>Kleb. pneumoniae</i> 07	8,41	<6	8,18	<6	8,60	<6	7,95	<6

\* Orijinal kültürün  $10^{-7}$  seyreltisinden 0,1 mL/ 100 mL damıtık su ile yapılan analizde koloni gelişmesi olmamıştır. Devamında, bu kültürler 4 besiyerine öze ile sürülerek 44,5 °C'da 24 saat inkübasyona bırakılmış ve koloni gelişmesi izlenmiştir ancak hiçbir koloni gelişmesi olmamasına rağmen, fiilen sayım yapılmadığı gerekçesi ile bu sonuçlar bu çizelgede 0 değil <6 log KOB/mL olarak gösterilmiştir.

\*\* floresan ( $\beta$ -GUR) negatif *E. coli*

\*\*\* İndol negatif *E. coli*.

\*\*\*\* Fekal koliform *Kleb. pneumoniae*

*E. coli* ve fekal koliform olmayan birer adet *Citr. freundii*, *Ent. aerogenes* ve *Kleb. pneumoniae* karışık kültürü ile yapılan ekim ve inkübasyon sonuçları Çizelge 5.2'de verilmiştir.

**Çizelge 5.2.** Membran filtrasyon sayım sonuçları; karışık kültür (log KOB/mL)

Karışık Bakteri Kültürü	37 °C PCA	44,5 °C PCA	37 °C Terg	44,5 °C Terg	37 °C Endo	44,5 °C Endo	37 °C mFC	44,5 °C mFC
<i>E. coli</i> + <i>Citr. freundii</i>	9,91	8,62	8,92	8,34	8,94	8,36	8,93	8,53
<i>E. coli</i> + <i>Ent. aerogenes</i>	9,30	8,99	9,34	8,95	9,35	8,99	9,29	8,99
<i>E. coli</i> + <i>Kleb. pneumoniae</i>	8,88	8,48	8,97	8,58	8,91	8,59	8,82	8,57

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. İzolatların Tanımlanması

Denemelerde kullanılan farklı gıda numunelerinden izole edilen 46 koliform bakterinin; 1 adedi *Citr. freundii*, 8 adedi *Ent. aerogenes*, 7 adedi *Kleb. pneumoniae* ve 30 adedi *E. coli* olarak tanımlanmıştır.

Bunlardan 1 adet *Kleb. pneumoniae*, fekal koliform özelliği gösterirken 2 adet *E. coli* izolatu indol negatif sonuç vermiştir.

*E. coli* olmayan fekal koliformlar üzerinde yapılmış bir çalışmada, çeşitli gıdaların EMS yöntemi ile yapılan standart fekal koliform analizinde fekal koliform pozitif olarak işaretlenen tüplerden VRB+MUG Agar besiyerine aşılama yapılmış, burada gelişen kolonilerden floresan ( $\beta$ -GUR) negatif 308 koloni izole edilmiş, bunların 267'sinin *Enterobacter aerogenes* (%86,7), 25'inin *Klebsiella pneumoniae* (%8,1) ve 16 adedinin  $\beta$ -GUR negatif *E. coli* (%5,2) olduğu saptanmıştır (16).

*E. coli* dışında fekal koliformlara gıdalarda rastlanıldığı bilinmektedir (13, 26, 27). Çeşitli gıdalarda *E. coli* olmayan fekal koliformlar üzerine yapılan araştırmalarda materyale göre değişmek üzere farklı sonuçlar alındığı görülmektedir. Örneğin, su örneklerindeki fekal koliformların araştırıldığı bir çalışmada (28) isolatlar *E. coli* (%96,69), *Ent. cloacae* (%2,32), *Kleb. pneumoniae* (%0,66) ve *Citr. freundii* (%0,33) olarak saptanmıştır. Bir başka kaynağa göre ise (29) istiridye ve deniztarağından izole edilen *E. coli* olmayan fekal koliformlar yaygın olarak *Klebsiella* türleri olarak tanımlanmış, bunların %80 kadarının *Kleb. pneumoniae* olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen 30 *E. coli* izolatının 2 adedi (*E. coli* 29 ve *E. coli* 30) indol negatif sonuç vermiştir. İndol negatif *E. coli* suşları *E. coli* Biyotip 2 olarak adlandırılır ve bu suşların



tüm *E. coli* izolatları içinde bulunma olasılığı sadece %1 olarak bildirilmektedir (30). Oysa her ikisi de laboratuvara yeterince farklı tarihlerde gelen çiğ süt örneklerinden izole edilen 30 adet *E. coli* izolatından 2 adedinin (2/30; %6,7) indol negatif sonuç vermesi, en azından izolatın elde edildiği hammaddeye göre *E. coli* Biotip 2 bulunma olasılığının bir kez daha gözden geçirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu sonuca göre standart analizde, basit olarak LST Broth besiyerinde gelişme ve gaz oluşumu ⇒ EC Broth besiyerinde gelişme ve gaz oluşumu ⇒ Triptofan Broth besiyerinde indol oluşumu ile tanımlanan TS 6063 ISO 7251 (31) standardına göre analiz edilen gıdada *E. coli* olduğu halde *E. coli* olmadığı şeklinde sahte negatif sonuçların elde edilmesi beklenildiğinden daha yüksektir. Devamında, fekal bulaşma göstergesi olarak *E. coli* yerine fekal koliform analizinin daha gerçekçi sonuçlar vereceği (16) ancak, analiz süresi açısından değerlendirildiğinde hâlâ *E. coli* analizinin geçerliği olduğunun ciddi bir şekilde tartışılması gerektiği açık olarak görülmektedir.

İzole edilen 30 adet *E. coli* izolatı içinde 1 adet floresan ( $\beta$ -GUR) negatif sonuç elde edilmiştir. Bu izolatın EHEC serotipi olduğu (*E. coli* O157:H7) konusunda endişe edilmektedir. Buna bağlı olarak bu çalışma kapsamını ilgilendirmemekle beraber, bu izolat CT-SMAC (Merck) besiyerine sürülmüş ve 37 °C'da 24 saat inkübasyon sonunda tipik renksiz (mannitol negatif) koloni elde edilmiştir. Bu bulguya göre bu izolat *E. coli* O157:H7 olarak değerlendirilebilirse de daha ileri testler ile kesinleştirme önerilmektedir (8).

Kısaca EHEC olarak tanımlanan **Enterohemorajik Escherichia coli** serotiplerine başta çiğ et ve çiğ süt olmak üzere çeşitli gıdalarda rastlanabilmektedir. Bunlardan en yaygın görülen *E. coli* O157:H7 serotipi ilk kez 1982 yılında ABD'de birbirini izleyen 2 salgın ile görülmüştür. Karın krampları, şiddetli ishal ve Hemolitik Üremik Sendrom (HUS)'a neden olur. HUS, akut böbrek yetmezliği, hemolitik anemi, trombositopeni ile karakterize edilir (32). 2011 Mayıs ayında Almanya'dan başlayıp tüm Avrupa'ya yayılan *E. coli* O104:H4 serotipinin neden olduğu salgında 908 HUS vakası ve 34 ölüm, 3167 EHEC vakası ve 16 ölüm görülmüştür (33).

## 6.2. Sayım Sonuçları

Çizelge 5.1'den görüldüğü gibi *E. coli* izolatları arasında besiyeri ve sıcaklık açısından fark yoktur ( $P>0,01$ ). 30 *E. coli* izolatının hepsi 4 farklı besiyerinde ve 2 farklı sıcaklıkta istatistik açıdan benzer sayım sonuçlarını vermişlerdir ( $P>0,01$ ). Bu sonuçlara indol negatif olan 2 adet izolat ile floresan ( $\beta$ -GUR) negatif olan 1 adet izolat da dâhildir. Bir diğer deyiş ile indol negatif 2 izolat ile  $\beta$ -GUR negatif olan 1 adet izolat, *E. coli* Biyotip 1 izolatlarından farklı sonuç vermemiştir. İstatistik analiz sonuçları Ek 2'de verilmiştir. *Enterobacter aerogenes* izolatları için ise besiyerleri arasında farklılık görülmemiş ( $P>0,01$ ) ancak sıcaklık faktörü etkili olmuştur ( $P<0,01$ ). Buna göre tüm *Enterobacter aerogenes* izolatları 44,5 °C'da gelişemedikleri için fekal koliform özelliği taşımamaktadırlar. *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının tümü için besiyerleri arasında fark görülmemektedir ( $P>0,01$ ). Ancak 01 numaralı izolat, 44,5 °C'da gelişerek diğerlerinden farklı bir özellik göstermiştir ( $P<0,01$ ). Bulgular bu izolatın fekal koliform olduğuna işaret etmektedir.

İstatistik analizi yapılan 45 bakterinin tümü kontrol besiyeri olan PCA ile 37 °C inkübasyon sonunda aynı sonucu vermiştir. PCA, genel besiyeri özelliğinde olup inhibitör maddeler içermez. Ancak, Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC NKS besiyerleri koliform bakteriler için selektif besiyerleridir ve *Enterobacteriaceae* dışındaki bakterilerin gelişmelerini baskılamaya yönelik kimyasal bileşenler içerirler. Koliform bakteriler başta laktozdan asit oluşturabilmeleri nedeni ile *Enterobacteriaceae* üyelerinden farklı renkte koloni verirler ayrıca bu besiyerlerinde kullanılan inhibitörlere dirençlidirler. Bunlardan Endo, diğer 2 besiyerine kıyasla daha fazla selektif inhibitör içerir. Su analizlerinde kullanılan standart besiyeri ise Tergitol TTC olup, zayıf selektivitesi ile hasar görmüş olma ihtimali olan koliform grubu bakterilerin de gelişmesine izin verir. mFC besiyeri de zayıf selektiviteli bir besiyeridir (8, 21).

Bu araştırma sonuçlarına göre 3 besiyerinin birbiri yerine kullanılacağı söylenemez. Bunun temel nedeni denemelerde kullanılan bakterilerin tümünün aktif halde iken kullanılmış olmasıdır. Dolayısı ile besiyerleri arasında selektivite farkı görülmemiştir. Bu, zaten beklenen bir durumdur. Ancak güncel kontrol amaçlı ekimlerde bakterilerin zayıf/ stres altında olması durumunda Endo

besiyerinde koloni gelişmesi görülmemesi olasıdır. Dolayısıyla bu uygulamalarda standartta yazılan Tergitol TTC kullanılması gereklidir. Bununla beraber, ABD Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual (BAM-AOAC), içme sularının koliform bakteriler açısından analizinde membran filtrelerin M-Endo medium ya da LES Endo Agar besiyeri üzerine yerleştirilerek analizini göstermektedir. Aşağıda Çizelge 6.1.'de bileşenler açısından bu 3 besiyerinin içerikleri verilmiştir (8, 34)

**Çizelge 6.1.** M-Endo, LES Endo ve Endo Agar bileşimleri (g/L)

Bileşen	M-Endo medium	LES Endo Agar	Endo Agar (Merck)
Tryptose/ polypeptone	10,0	7,5	Peptones 10,0
Thiopeptone/ thiotone	5,0	3,7	
Casitone or trypticase	5,0	3,7	
Yeast Extract	1,5	1,2	
Lactose	12,5	9,4	10,0
NaCl	5,0	3,7	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,375	3,3	2,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,375	1,0	
Sodium lauryl sulfate	0,05	0,05	
Sodium desoxycholate	0,10	0,1	
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	2,10	1,6	3,3
Basic fuchsin	1,05	0,8	0,3
Agar	15,0	15,0	12,5

Bu çizelgeden görüldüğü gibi her 3 besiyeri arasında özellikle standart Endo Agar (Merck formülü) bileşim açısından farklar görüldüğü için birbirlerinin yerine kullanılıp kullanılmaması gerektiği konusunda yorum yapılmamıştır.

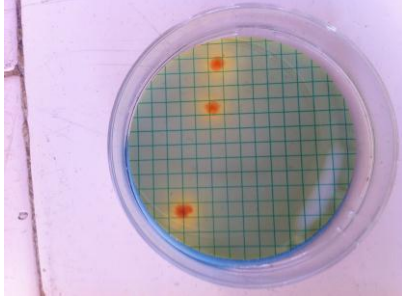
Kimi uygulamalarda mFC besiyerinin, membran Faecal Coliform olan ismi nedeni ile membran filtrasyon uygulamasında sadece fekal koliformları geliştirebileceği şeklinde hatalı bir bilgi

vardır. Fekal koliform bakteriler için geliştirilmiş bir besiyeri yoktur. Nitekim bu çalışmada elde edilen bulgular, fekal olmayan izolatların da 37 °C'da kolaylıkla gelişebildiğini göstermiştir. İlginç olarak, Sartorius-Stedim Biotech web sayfasında mFC NKS için 36±2 °C'da 18–24 saat inkübasyon önerilmektedir ve "*E. coli* ve koliform bakteriler mavi zonlu mavi koloniler oluştururlar. Bu renk, fekal koliformlarda kuvvetli laktoz fermantasyonu nedeni ile koyu mavi iken, fekal olmayan koliformlarda zayıf laktoz fermantasyonuna bağlı olarak daha açık mavidir" şeklinde ifade vardır ve devamında yüksek inkübasyon sıcaklığının fekal olmayan koliformları baskılayacağı belirtilmiştir (<http://www.sartorius.com>, 2013).

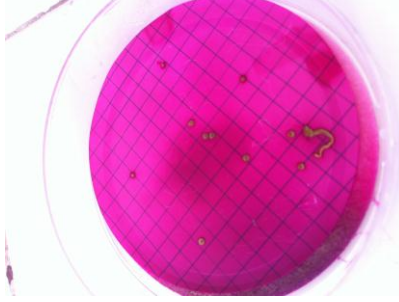
mFC besiyerinin laktoz yerine inositol kullanılması ve Carbenicillin ilavesi ile özellikle *Klebsiella* analizinde kullanılan formülü de vardır (<http://himedialabs.com/TD/M1124.pdf> 2013).

Koliform grup bakteriler 3 farklı besiyerinde tipik morfolojide koloni oluşturmuşlardır. Sadece *Klebsiella pneumoniae*, tipik mukoit yapıda koloni oluşturması ile diğer koliform grup bakterilerden morfolojik olarak farklılık göstermiştir.

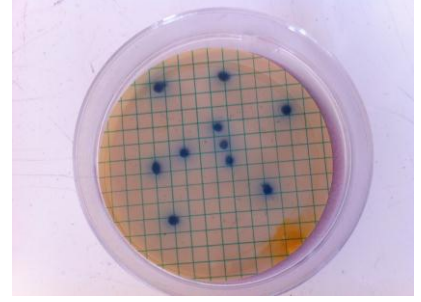
Şekil 6.1'de *E. coli*, *Ent. aerogenes*, *Kleb. pneumoniae* ve *Citr. freundii* izolatlarının Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC NKS besiyerlerinde 37 °C ve 24 saat inkübasyon sonundaki görüntüleri verilmiştir.



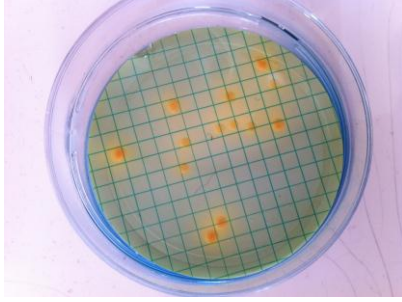
Tergitol TTC NKS;  
*E. coli*



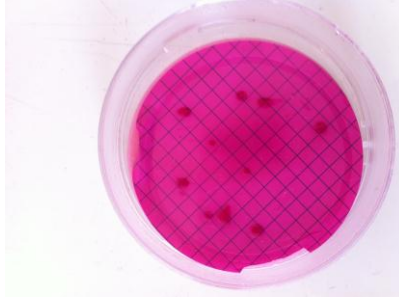
Endo NKS;  
*E. coli*



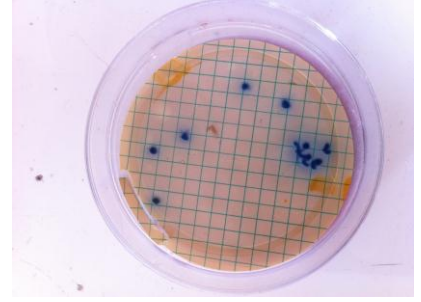
mFC NKS;  
*E. coli*



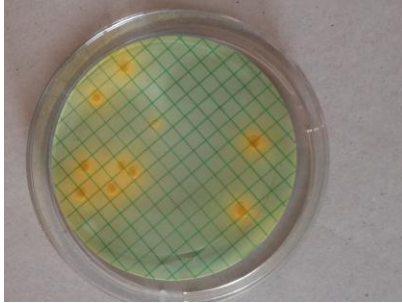
Tergitol TTC NKS;  
*Ent. aerogenes*



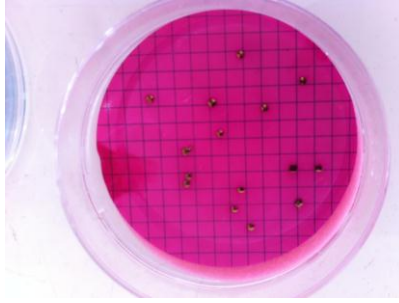
Endo NKS;  
*Ent. aerogenes*



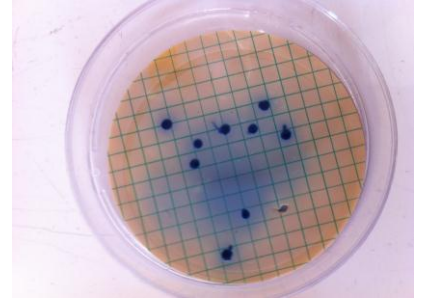
mFC NKS;  
*Ent. aerogenes*



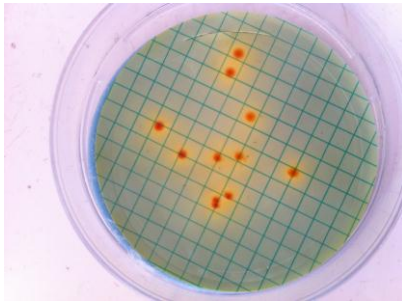
Tergitol TTC NKS;  
*Kleb. pneumoniae*



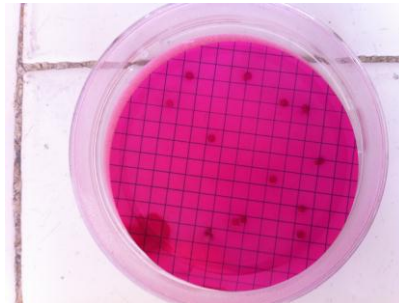
Endo NKS;  
*Kleb. pneumoniae*



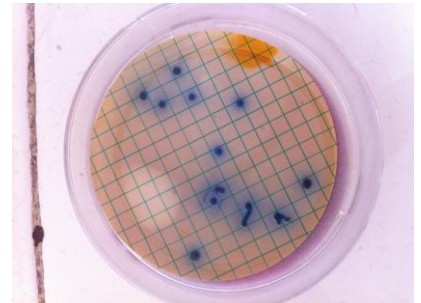
mFC NKS;  
*Kleb. pneumoniae*



Tergitol TTC NKS;  
*Citr. freundii*



Endo NKS;  
*Citr. freundii*

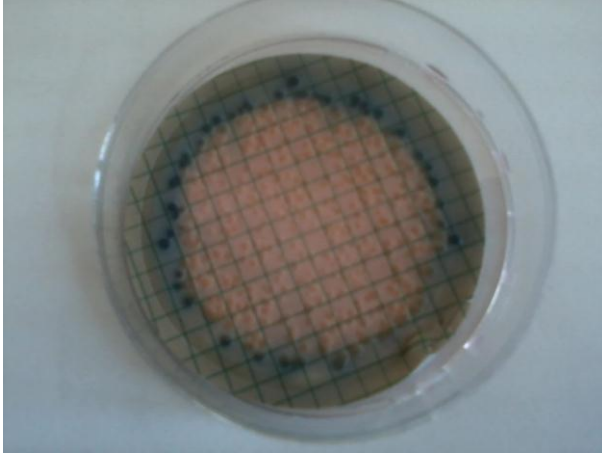


mFC NKS;  
*Citr. freundii*

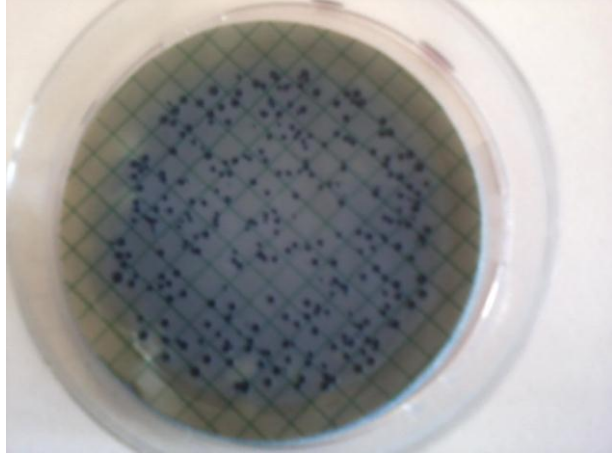
**Şekil 6.1.** *E. coli*, *Ent. aerogenes*, *Kleb. pneumoniae* ve *Citr. freundii* izolatlarının Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC besiyerlerinde 37 °C ve 24 saat inkübasyon sonundaki görüntüleri

Şekil 6.1'den görüleceği gibi koliform grup üyesi bakteriler aynı besiyerinde birbirlerine çok yakın koloni morfolojileri vermişlerdir. Dolayısı ile koloni morfolojisi üzerinden tür ayırımına gidilmesi konusundaki görüşlerin bir geçerliği olmadığı görülmektedir. Ancak, suş farklılıklarının önemi de açıktır. Bir diğer deyiş ile aynı bakteriye ait farklı suşlar daha fazla asit oluşturma, TTC'yi daha zayıf ya da daha kuvvetli indirgenmeye vb. fizyolojik özelliklerine bağlı olarak farklı morfolojiler oluşturabilirler. Bu durumda çok daha fazla izolat ile bu testlerin yapılması gerekliliği ve hatta oluşan renk farklılıklarının sübjektif değil, objektif değerler ile karşılaştırılması gerektiği söylenebilir.

mFC besiyerinde aynı bakterinin 37 °C ve 44,5 °C'da farklı morfolojide koloni oluşturduğu görülmüştür. Şekil 6.2'de *E. coli* için bu fark verilmiştir.



mFC; *E. coli*; 37 °C



mFC; *E. coli*; 44,5 °C

**Şekil 6.2.** mFC besiyerinde *E. coli* izolatının 35 ve 44,5 °C'da 24 saat inkübasyon sonundaki koloni morfolojisi

Her ne kadar aynı izolata ait bu görüntülerde (şekil 6.2), 37 °C'daki inkübasyonda daha yoğun koloni gelişmesi görüldüğü açık ise de bu farklılığın sadece yoğun koloni gelişmesi ile açıklanmasından çekinilmektedir.

*E. coli*, gıda ve çevresel örneklerde fekal bulaşmanın kanıtı olarak değerlendirilirken, *E. coli* olmayan koliform bakterilere bitki ve toprak başta olmak üzere pek çok kaynaktan rastlanılmaktadır. Buna bağlı olarak çeşitli gıdalarda belirli sayılarda koliform grup bakteriyeye izin verilirken, *E. coli* bulunması istenmez. Bununla beraber, çeşitli standartlarda fekal bulaşma göstergesi olarak *E. coli* yerine fekal koliform grup bakterisi aranması söz konusudur. Çünkü *E. coli* olmayan çevre ve gıda örneklerinde nadiren de olsa *E. coli* olmayan fekal koliform bakterilere rastlanılmaktadır (16, 34). Ancak fekal koliform analizinde hassas bir inkübasyon sıcaklığı olması nedeniyle sıklıkla sahte negatif ve sahte pozitif sonuç alınma olasılığı nedeniyle halen tüm dünyada fekal bulaşma göstergesi olarak *E. coli* analizi yapılmaktadır. *E. coli*'de yapısal olarak bulunan  $\beta$ -GUR enzimi (MUG) testi ile yapılan *E. coli* analizi, Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO) ve FDA BAM-AOAC tarafından (34, 35) kabul görmüştür.

Çizelge 5.2'de verilen karışık kültür ekim sonuçları değerlendirildiğinde besiyerleri arasında bir sayım sonuçları arasında fark görülmemişken ( $P>0,01$ ), sıcaklık etkili olmuştur ( $P<0,01$ ). 37 °C'da yapılan ekimlerde her iki bakteri türüne rastlanırken, 44,5 °C'da yapılan inkübasyonda beklenildiği gibi sadece *E. coli* gelişimi olmuştur ve sıcaklıklar arasında görülen fark, fekal olmayan koliformların gelişmemesinden kaynaklanmaktadır.

Bu çalışma sonunda elde edilen somut bulgular şu şekilde sıralanabilir.

-Koliform bakteri izolasyonu amacıyla materyal olarak kullanılan gıdalardan yapılan ekimlerde ağırlıklı olarak *E. coli* izole edilmiştir (30/46; %65,2). *Enterobacter aerogenes* (8/46; %17,4) ve *Klebsiella pneumoniae* (7/46; %15,2) rastlanan izolatlar iken, *Citrobacter freundii* (1/46; %2,2) az rastlanan türdür ancak diğer koliform bakteri üyesi olan *Enterobacter cloacae* türüne hiç rastlanmamıştır.

-Aktif bakteriler, bütün besiyerlerinde kontrol olarak kullanılan PCA ile aynı sayıyı vermişlerdir. Bu sonuçlardan, aktif bakteri ile çalışıldığında Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC NKS besiyerlerinin birbirleri yerine kullanılabileceği söylenebilir. Bu bulgu, denenmedikleri için diğer ticari markalar için geçerli değildir.

-Günlük analizlerde, numunedeki koliform bakterilerin ne denli stres altında bulunduğu bilinemediği ve bu besiyerlerinin selektivitesinin bu konuda ne denli etkili olacağı da bilinmemektedir. Buna bağlı olarak günlük analizlerde selektivitesi düşük olan ve standart olarak önerilen besiyerinin (Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate) kullanılması gereklidir.

-Kaynaklarda sadece %1 olduğu bildirilen indol negatif 2 adet (2/30; %6,7) *E. coli* izole edilmiş olması, indol testi ağırlıklı tanımlamalarda daha dikkatli olunması gerektiğini ortaya koymaktadır.

-*E. coli*, mFC NKS besiyerinde 44,5 °C'da tipik koyu mavi renkli koloni oluştururken 37 °C'daki inkübasyonda merkezde pembe, dışarıda koyu mavi renkli koloni oluşturduğunun nedeni anlaşılamamıştır.

-Aynı besiyerinde farklı türlere ait bakteriler, koloni morfolojisi açısından gözle (sübjektif olarak) incelendiğinde dikkate değer bir morfolojik fark gözlemlenmemiştir. Buna bağlı olarak; çeşitli kaynaklarda belirtilen morfolojik farklılıkların daha fazla izolat ile çalışılması ve değerlendirmelerin buna göre yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini göstermektedir.

-β-GUR negatif *E. coli* izolatının CT-SMAC Agar besiyerinde tipik renksiz koloni yapmış olması bu izolatın *E. coli* O157:H7 serotipi olma olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Her ne kadar bu tez ile doğrudan ilgili bir bulgu olmamakla birlikte; bu izolatın elde edilmiş olduğu materyalin çiğ süt olması, çiğ süt tüketimini savunanların çok dikkatli olması gerektiğini ortaya koymaktadır.



## KAYNAKLAR

1. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins; c1994. 787p.
2. Halkman AK, Doğan HB, Noveir M. Gıda Maddelerinde *Salmonella* ile *E. coli* Arama ve Sayma Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Ankara: Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisleri Bölümü, Gıda Teknolojisi Derneği; 1994. Yayın No 21
3. Çakır İ. Koliform Grup Bakteriler ve *E. coli*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara: Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı, Sim Matbaası; 2000. 522 s.
4. Tunail N. Mikrobiyoloji. Ankara: Pelin Ofset; 2009. 434s.
5. Ünlütürk A, Turantaş F. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi. 2. baskı. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri; 2002. 186 s.
6. Sekin Y, Karagözlü N. Gıda Mikrobiyolojisi. İstanbul: Literatür Yayıncılık; 2004. 358 s
7. Aldsworth T, Dodd CER, Waites W. Food Microbiology. In, Food Science and Technology. Ed Geoffrey Campbell-PlattWiley-Blackwell. Singapore: 2009. 508 p.
8. Anonim 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: Halkman AK. Ankara: Başak Matbaacılık Ltd. Şti; 2005. 358 s
9. Anonim 2011. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. 29.12.2011 tarih ve 28157 sayılı Resmî Gazete
10. Anonim 2011. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik. 17.02.2011 tarih ve 25730 sayılı Resmî Gazete
11. Anonim 2013. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik 07.03.2013 tarih ve 28580 sayılı Resmî Gazete
12. Davidson P, Roth L, Gambrel-Lenarz L. Coliform and Other Indicator Bacteria. 17th ed. Eds: Wehr H, Frank J, Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Washington DC: American Public Health Association; 2004. 570 p.
13. Feng P, Weagant SD, Grant MA, Burkhardt W. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual; 2002. Chapter 4. [Erişim tarihi; 10 Ekim 2013]. Erişildiği adres: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/Laboratory Methods/ucm064948.htm>
14. Halkman AK, Noveir M, Doğan HB. *Escherichia coli* O157:H7 Serotipi. Ankara: Orkim Ltd Şti. Yayını, Sim Matbaacılık; 2001. 44 s.

15. Halkman AK. Gıda Mikrobiyolojisi II ders notları. Ankara; Ank. Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü: 2013. Erişildiği adres: [http://food.eng.ankara.edu.tr/files/files/ogrenci\\_icin\\_dosya\\_indirme/gdm310.pdf](http://food.eng.ankara.edu.tr/files/files/ogrenci_icin_dosya_indirme/gdm310.pdf)
16. Halkman HBD, Halkman AK 2004. Gıdalarda *Escherichia coli* Olmayan Fekal Koliformlar Üzerine bir Araştırma. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 02(02)1-5. [Erişim tarihi; 10 Ekim 2013]. Erişildiği adres: <http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702040201.pdf>
17. Harrigan W. Laboratory Methods in Food Microbiology 3<sup>rd</sup> Ed. San Diego, California; Academic Pres: 1998. 532 p.
18. Temiz A. Gıdalarda İndikatör Mikroorganizmalar. Ed: Gıda Mikrobiyolojisi, A. Ünlütürk, F. Turantaş . İzmir; META Basım Matbaacılık Hizmetleri: 2003. 605 s.
19. Halkman AK, Doğan HB. Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı; Genel Bilgiler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara: Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası; 2000. 522 s.
20. Andrews WH, Hammack TS. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. Bacteriological Analytical Manual, 2003. Chapter 1. [Erişim tarihi; 10 Ekim 2013]. Erişildiği adres: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063335.htm>
21. Anonim 2012. Gıda, İçecek ve İlaçlarda Mikrobiyolojik Analizlerin Kolay ve Güvenilir Yolu. İstanbul: Membran Filtrasyon. Sartonet Seperasyon Teknolojileri Ltd. Şti. ; 63 s.
22. Çakır İ, Doğan HB. Membran Filtrasyon Uygulamaları. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara: Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı. Sim Matbaası; 2000. 522 s.
23. Johnson T, Case C. Bacteriologic Water Quality: Membrane–Filtration. Laboratory Experiments in Microbiology. San Francisco: 2010 [Erişim tarihi; 10 Ekim 2013]. Erişildiği adres: [http://www.smccd.edu/accounts/case/biol675\\_water/doc/membr\\_filt.pdf](http://www.smccd.edu/accounts/case/biol675_water/doc/membr_filt.pdf)
24. MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3<sup>rd</sup> Edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2000. 912 p.
25. Özkaya DF. Genel İdentifikasyon Testleri. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara: Ank. Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı, Sim Matbaası; 2000. 522 s.
26. Halkman B, Çakır İ, Keven F, Worobo RW, Halkman K. Relationship among fecal coliforms and *Escherichia coli* in various foods. Eur Food Res Technol. 2003; 216(4): 331-334
27. Halkman AK, Doğan HB, Çakır İ, Coşansu S, Keven F, Kırıl N, Doğan T. Gıdalarda Fekal Koliform Aranması. Ankara: Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Proje No: 97111201; 1999

28. Warren LS, Benoit RE, Jessee JA. Rapid Enumeration of Fecal Coliforms in Water by a Colorimetric beta-galactosidase Assay. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 35:136-141
29. Hood MA, Ness GE, Blake NJ. Relationship Among Fecal Coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Shellfish. *Appl. Environ Microbiol.* 1983; 45:122-126
30. Farmer JJ. 1995. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. 438-449. 6th Ed. *Manual of Clinical Microbiology.* Ed in Chief PR Murray American Society for Microbiology ASM, Washington DC, 1482 pp
31. Anonim 1996. Mikrobiyoloji - Muhtemel *Escherichia coli* Sayımı için Genel Kurallar En Muhtemel Sayı Tekniği, TS 6063 ISO 7251; Nisan 1996
32. WHO World Health Organization. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). [Erişim tarihi; 18 Kasım 2013a]. Erişildiği adres: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>
33. WHO Outbreaks of *E. coli* O104:H4 infection. World Health Organization. [Erişim tarihi; 18 Kasım 2013b]. Erişildiği adres: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/food-safety/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection>
34. BAM (Bacteriological Analytical Manual (BAM)). [Erişim tarihi; 18 Kasım 2013]. Erişildiği adres: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>
35. ISO. Milk and milk products, Enumeration of presumptive *Escherichia coli*. Part 1: Most probable number technique using 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG). ISO 11866-1: 2005 (IDF 170-1: 2005).

## EKLER

### EK 1:

Bu çalışmada uygulanan identifikasyon testleri, kısaca uygulanaşı ve kullanılan kimyasallar aşıağıdaki gibidir:

**İndol Testi:** Triptofanaz enzimine sahip bakteriler triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirirler. Oluşan indol, Kovacs' ayıracı ile belirlenir. Triptofan içeren bir besiyerine ekim ve 37 °C'da 24 saat inkübasyondan sonra besiyerine Kovacs' ayıracı damlatılır. 0,5-1 dakika içinde tüpün üzerinde görülen vişneçürüğü halka indol oluşumunu gösterir (indol pozitif sonuç). Bu çalışmada indol testi LST+MUG Broth (Merck) besiyerinde yapılmıştır. İnkübasyondan sonra Durham tüpünde gaz pozitif tüple, floresan açısından değerlendirilmiş, sonra gaz pozitif tüm tüplere indol testi uygulanmıştır. İndol testi bir anlamda  $\beta$ -GUR (MUG, floresan) pozitif tüplere uygulanması gereken ve *E. coli* tanımlanmasını kesinleştiren bir test iken, gaz pozitif  $\beta$ -GUR negatif tüplere de indol testi uygulanış ve böylece rastlantısal olarak *E. coli* O157:H7 olduğu sanılan tanımlama yapılmıştır.

**$\beta$ -GUR Testi:** *E. coli* yapısal enzimi olan  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -GUR), 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide (MUG) substratını glucuronic acid ve floresan bir madde olan 4-methylumbelliferyl'e parçalar. Reaksiyon, loş bir ortamda uzun dalga boylu (366 nm) UV lamba ile kontrol edilir. Floresan ışımaya görülmesi  $\beta$ -GUR olarak değerlendirilir. Bazen, oluşan aşırı asitlik floresan ışımayı maskeleyebilir. Standart 10 mL olan besiyerine 1 N NaOH çözeltisinden 1 ml eklenmesi ile asitlik nötralize olur ve floresan ışımaya belirginleşir. NaOH ilavesi daha sonra yapılacak olan indol testini etkilemez. Bu çalışmada  $\beta$ -GUR testi için LST+MUG Broth (Merck) kullanılmıştır.

**Metil Kırmızısı Testi:** Bu test, glikozun fermentatif olarak metabolize olması sonunda besiyerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılır. Metil kırmızısı çözeltisi pH 6,0'da sarı renk ve pH 4,4'den aşıağıda kırmızı renk gösterir. MR/VP

besiyerine ekimi yapılan tüpler 37 °C'da 2-7 gün inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda metil kırmızısı çözeltisinden 4-5 damla damlatılır ve iyice karıştırılır. Çözelti besiyerine damlatıldıktan sonra üstte kırmızı renkli bir halkanın meydana gelişi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Bu çalışmada metil kırmızısı (Metil Red) testi için MR-VP Broth (Merck) kullanılmıştır.

**Voges-Proskauer Testi:** Bu test, bazı mikroorganizmaların glikozu fermente edilerek, nötral bir ürün olan acetylmethylcarbinol'u (acetoin) meydana getirme yeteneğini tayinde kullanılır. Voges Proskauer testi ile metil kırmızısı testi, ortamlarının aynı olması nedeniyle birlikte uygulanabilirler. Metil kırmızısı pozitif olanlarda (organik asit fazla olması nedeniyle), VP reaksiyonu negatif olabilir. İlk başlangıçta MR testi pozitif görülebilir. İnkübasyon süresi uzarsa acetoin oluşabilir. İçinde glikoz bulunan MR/VP besiyerine kültürlerden ekilir ve 37 °C'de 2-7 gün inkube edilir. Bu sürenin sonunda kültürlerle ve ekilmemiş tüplere ayıracıktan (O'Meara) 1 mL ilave edilerek hafifçe çalkalanır ve su banyosunda (37 °C'da) 4 saat tutulur. Aralıklı olarak hafifçe çalkalanır. Besiyerinin üstünde 2-5 dakika içinde pembe rengin oluşu, acetoin varlığını ortaya koyduğundan pozitif reaksiyon olarak kabul edilir. Eğer sarı renk meydana gelirse negatif olarak dikkate alınır.

**Ejikman Testi:** Bu test ile fekal koliformlar 44,5 °C'da gelişme yeteneğine göre diğerlerinden ayrılmaktadır. EC Broth besiyerine bakteri ekimi yapılır ve 44,5 °C'de 48 saat inkübasyon sonrası gaz çıkışı gözlemlenen tüpler pozitif sonuç olarak kabul edilir.

**Sitrat Testi:** Bu test, mikroorganizmaların, besiyerlerine katılan sitrati karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada kullanılır. Sitrat metabolizmasında elde edilen ürünlerin ortamın pH'sı ile sıkı bir ilişkisi vardır. Son ürün ne olursa olsun, sitrat fermentasyonunda esas basamak, piruvat'ın meydana gelişidir. Piruvatın ayrışma ürünleri besiyerinin pH'sına bağımlıdır. Bakteriler, yatık agara hazırlanan Simmons Citrate besiyerine çizgi ekim yapılarak ekilir ve tüpler 2-7 gün 37 °C'da inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası hiçbir üremenin olmaması ve ortamın orijinal yeşil rengini muhafazası negatif reaksiyon ve ekim hattı boyunca üreme ile birlikte koyu mavi rengin meydana gelmesi de pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir.

## **Hidrojen Sülfür Testi**

Bu test, mikroorganizmaların, sülfür içeren bazı aminoasitleri (sistin, sistein, metionin, glutation) veya bileşikler (sülfatları) ayrıştırarak hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) meydana getirebilme durumlarını saptamak için yapılır. Bakteri, SIM besiyerine iğne öze ile dikine ekilir. Tüpler 37 °C'de 2-7 gün inkübasyona bırakılarak her gün gözle kontrol edilirler. Pozitif reaksiyon genellikle 24 saat sonunda alınır. SIM besiyerinde, inokülasyon hattı boyunca siyah rengin (demir sülfür) meydana gelmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Hiçbir değişiklik yoksa negatif olarak kabul edilir.

**Hareket Testi:** Bakterilerin hareketliliklerinin araştırıldığı bir testtir. Bakteri, Sulfide Indole Motility (SIM) besiyerine iğne öze ile dikine ekilir. Tüpler 37 °C'da 2-7 gün inkübasyona bırakılarak her gün gözle kontrol edilirler. SIM besiyerinde, inokülasyon hattından yanlara doğru yayılan üreme, hareketi ifade eder.

## Ek 2: İstatistik Analiz Sonuçları

### General Linear Model: Veri versus Bakteri; Sicaklik

Factor	Type	Levels	Values
Bakteri	fixed	3	E. coli; Ent. aerogenes; Kleb. pneumoniae
Sicaklik	fixed	2	37; 44,5

Analysis of Variance for Veri, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Bakteri	2	1469,47	1469,47	734,73	949,23	0,000
Sicaklik	1	770,74	1885,18	1885,18	2435,53	0,000
Bakteri*Sicaklik	2	1359,69	1359,69	679,85	878,32	0,000
Error	354	274,01	274,01	0,77		
Total	359	3873,90				

### Descriptive Statistics: Veri

Variable Bakteri	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Maximum
E. coli	240	9,0314	0,0223	0,3458	7,6000	9,7800
Ent. aerogenes	64	4,5810	0,5770	4,6200	0,0000	9,4900
Kleb. pneumoniae	56	4,946	0,5790	4,3300	0,0000	9,3800

### Descriptive Statistics: Veri

Variable Sicaklik	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Maximum
37	180	9,0679	0,0211	0,2837	7,9500	9,6000
44,5	180	6,1420	0,3100	4,1540	0,0000	9,7800

**Descriptive Statistics: Veri**

**Results for Bakteri = E. coli**

Variable Sicaklik	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Maximum
37	120	9,1310 <sup>A</sup>	0,0192	0,2106	8,4800	9,6000
44,5	120	8,9318 <sup>A</sup>	0,0383	0,4194	7,6000	9,7800

**Results for Bakteri = Ent. aerogenes**

Variable Sicaklik	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Maximum
37	32	9,1616 <sup>A</sup>	0,0405	0,2289	8,7600	9,4900
44,5	32	0,0000 <sup>B</sup>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

**Results for Bakteri = Kleb. pneumoniae**

Variable Sicaklik	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Maximum
37	28	8,6907 <sup>A</sup>	0,0604	0,3197	7,9500	9,3800
44,5	28	1,2020 <sup>B</sup>	0,5670	3,003	0,0000	9,050

**Descriptive Statistics: Veri**

**Results for Sicaklik = 37**

Variable Bakteri	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Maximum
E. coli	120	9,1310 <sup>A</sup>	0,0192	0,2106	8,4800	9,6000
Ent. aerogenes	32	9,1616 <sup>A</sup>	0,0405	0,2289	8,7600	9,4900
Kleb. pneumoniae	28	8,6907 <sup>B</sup>	0,0604	0,3197	7,9500	9,3800



### Results for Sicaklik = 44,5

Variable Bakteri	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Maximum
E. coli	120	8,9318 <sup>A</sup>	0,0383	0,4194	7,6000	9,7800
Ent. aerogenes	32	0,0000 <sup>C</sup>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Kleb. pneumoniae	28	1,2020 <sup>B</sup>	0,5670	3,0030	0,0000	9,0500

### General Linear Model: Veri versus Bakteri; Besiyeri

Analysis of Variance for Veri, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Bakteri	2	1469,47	1469,47	734,73	106,40	0,000
Besiyeri	3	0,91	0,19	0,06	0,01	0,999
Bakteri*Besiyeri	6	0,48	0,48	0,08	0,01	1,000
Error	348	2403,05	2403,05	6,91		
Total	359	3873,90				

### Descriptive Statistics: Veri

Variable Bakteri	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Maximum
E. coli	240	9,0314 <sup>A</sup>	0,0223	0,3458	7,6000	9,7800
Ent. aerogenes	64	4,5810 <sup>B</sup>	0,5770	4,6200	0,0000	9,4900
Kleb. pneumoniae	56	4,9460 <sup>B</sup>	0,5790	4,3300	0,0000	9,3800

### Descriptive Statistics: Veri

Variable Besiyeri	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Maximum
PCA	90	7,660 <sup>A</sup>	0,349	3,315	0,000	9,610
Terg	90	7,593 <sup>A</sup>	0,347	3,294	0,000	9,600
Endo	90	7,528 <sup>A</sup>	0,345	3,274	0,000	9,590
mFC	90	7,637 <sup>A</sup>	0,349	3,311	0,000	9,780

### Two-Sample T-Test and CI: Sıcaklık\_37; Sıcaklık\_44,5

Two-sample T for Sıcaklık\_37 vs Sıcaklık\_44,5

	N	Mean	StDev	SE Mean
Sıcaklık_37	12	9,130	0,317	0,092
Sıcaklık_44,5	12	8,666	0,247	0,071

Difference =  $\mu$  (Sıcaklık\_37) -  $\mu$  (Sıcaklık\_44,5)

Estimate for difference: 0,464

95% CI for difference: (0,223; 0,705)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 4,00 P-Value = 0,001 DF = 22

Both use Pooled StDev = 0,2845

### Descriptive Statistics: Sıcaklık\_37; Sıcaklık\_44,5

Variable	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Maximum
Sıcaklık_37	12	9,1300	0,0916	0,3174	8,8200	9,9100
Sıcaklık_44,5	12	8,6658	0,0714	0,2474	8,3400	8,9900

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Sevda TAŞTEMÜR

**Doğum Yeri:** Kırıkkale

**Doğum Tarihi:** 03.06.1978

**Medeni Hali:** Bekâr

**Yabancı Dili:** İngilizce

### Eğitim Durumu

**Lise:** Polatlı Lisesi, Ankara (1993-1996)

**Lisans:** Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Trabzon (1997-2001)

**Yüksek Lisans:** Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara (2010 - )

### İş Tecrübesi

<b>Kurumu</b>	<b>Görevi</b>	<b>Yılları</b>
Çalışma ve İş Kurumu	İş ve Meslek Danışmanı	2012-
MIS-Dent	Ürün Müdürü	2010-2011
Dinçsa İlaç	Kalite Güvence Sorumlusu	2009-2010
LSG-Sky Chefs	Kalite ve Hijyen Şefi	2007-2009
Ülker	Mikrobiyoloji Lab. Sorumlusu	2003-2006