

29823

CEŞİTLİ GIDALARDA ESCHERICHIA COLI
SAYIMINDA KULLANILAN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

TÜRKİYE
BİLİMSEL ve TEKNİK
ARAŞTIRMA KURUMU
KÜTÜPHANESİ

Z.Yeşim Özbaş

Hacettepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

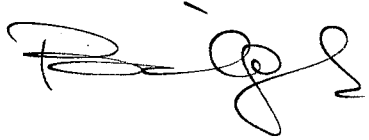
YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ

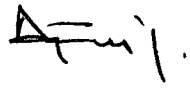
Olarak Hazırlanmıştır

ŞUBAT-1987

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İşbu çalışma, jürimiz tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalında
YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doc. Dr. İlbilge SALDANLI 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayhan Temiz 

Üye : Doc. Dr. Jale Acar 

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu
onaylarım.

.../.../ 1987



Prof. Dr. Acar Işın

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

AILEME



ÖZET

Bu araştırmada, gıdalarda Escherichia coli sayımı için geliştirilmiş altı farklı yöntem karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır.

Araştırmanın ilk aşamasında, doğal olarak E.coli ile kontamine olduğu belirlenen çiğ süt örnekleri kullanılarak AOAC'nin (Association of Official Analytical Chemists) EMS (En Muhtemel Sayı), MDP (Modifiye Direkt Plaka), TSA/VRBA (Triptik Soy Agar/Violet Red Bile Agar), VRBA/VRBA (Violet Red Bile Agar/Violet Red Bile Agar) yöntemleri ve tarafımızca tasarlanan MVRBA (Modifiye VRBA) ve MEMS (Modifiye EMS) yöntemleri karşılaştırılmıştır.

Elde edilen bulguların istatistiksel analizi sonucunda, çiğ süt örnekleri ile çalışıldığında yöntemler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olmadığı saptanmıştır. En yüksek E.coli sayım sonucu ortalamaları sırasıyla AOAC'nin EMS, MEMS ve MDP yöntemleri ile elde edilmiştir.

İkinci aşamada, dondurulmuş et örnekleri ile aynı sayım yöntemleri kullanılarak E.coli sayımları gerçekleştirilmiştir. Sayım sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi, dondurulmuş et örnekleri için yöntemler arasında farklılaşmalar olduğunu ortaya koymuştur. En yüksek sayım sonucu ortalamasını MDP yöntemi vermekle birlikte, yine yüksek sayım sonucu ortalamalarını veren AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemleri ile bu yöntem arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark olmadığı saptanmıştır. Bu yöntemlerle direkt plaka yöntemleri olan VRBA/VRBA, TSA/VRBA, MVRBA yöntemleri arasındaki fark ise

istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Çalışmanın son bölümünde, dondurulmuş etlerden izole edilerek hazırlanan stres olmayan E.coli kültürleri ve bunların -20 °C'de 24 saat dondurulmasıyla hazırlanan stres formlarıyla çalışılmıştır. Bu farklı özellikteki E.coli formlarına, altı sayım yöntemi uygulanmış ve yöntemler E.coli sayımının yanısıra referans kabul edilen TSA (Triptik Soy Agar) dökme plaka yöntemine göre bağıl geri kazanma duyarlılığı yönünden de incelenmişlerdir.

Stres olmayan E.coli kültürlerinde en yüksek sayımı sonucu ortalamasını AOAC'nin EMS yöntemi vermiş, ancak yine yüksek bir sayım sonucu ortalaması veren MEMS yöntemi ile aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark olmadığı bulunmuştur. Bağıl geri kazanma duyarlılığı yönünden AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemleri diğer yöntemlere göre üstün bulunmuştur.

Stres E.coli formlarında ise, genel olarak altı sayım yöntemi arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamazken, en yüksek sayım sonucu ortalamalarını MDP ve TSA/VRBA yöntemlerinin verdiği görülmüştür. Bağıl geri kazanma duyarlılığı yönünden de MDP ve TSA/VRBA yöntemleri diğer yöntemlere göre üstün bulunmuştur.

Stres olmayan ve stres E.coli formları sayım sonuçlarından yararlanılarak, bir formül uygulanmasıyla her bir yöntemin geri kazanma oranları referans TSA dökme plaka yöntemine göre bağıl olarak hesaplanmıştır. Sonuçta, MDP ve TSA/VRBA yöntemlerinin diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek bağıl geri kazanma oranları verdiği saptanmıştır.

SUMMARY

In this study, six different enumeration methods for Escherichia coli in foods were compared with each other.

In the first step, E.coli in naturally contaminated raw milk samples was counted by using AOAC's (Association of Official Analytical Chemists) MPN (Most Probable Number), MDP (Modified Direct Plate), TSA/VRBA (Tryptic Soy Agar/Violet Red Bile Agar), VRBA/VRBA (Violet Red Bile Agar/Violet Red Bile Agar) methods. Also MVRBA (Modified Violet Red Bile Agar) and MMPN (Modified Most Probable Number) methods developed in our research laboratories were utilized and results were compared with those of above. The statistical analysis of data indicated no significant difference among these methods when raw milk was used as a sample. The maximum E.coli counts were obtained when the AOAC's MPN, MMPN and MDP methods were used.

In the second step, naturally contaminated frozen meat with E.coli were chosen and the methods mentioned above were used for E.coli enumeration. In the experiment, the statistical analysis of data showed some significant differences among these methods. Enumeration of E.coli by using MDP, AOAC's MPN and MMPN methods resulted in maximum counts, but there was no significant difference among them. On the other hand, statistical analysis of data indicated a significant difference between these methods and direct plate methods such as VRBA/VRBA, TSA/VRBA, MVRBA.

Finally, these six different enumeration methods were used for counting the stressed and unstressed forms of E.coli and the results obtained from each method were compared. In this context, their sensitivity to relative recovery of E.coli using TSA pour plate count as a reference was also examined, and the results were compared. The stressed form of E.coli isolated from frozen meat as unstressed form was prepared by freezing the culture at -20°C for 24 hours. Eventhough, maximum mean E.coli counts for unstressed form were obtained from AOAC's MPN and MMPN methods, there was no significant difference between these two methods. In terms of sensitivity of relative recovery, AOAC's MPN and MMPN methods were found to be superior to the others.

While there was no appreciable difference between the six enumeration methods, MDP and TSA/VRBA methods showed maximum mean counts for stressed E.coli form. In terms of sensitivity of relative recovery, MDP and TSA/VRBA methods were found to be better than the others.

The results of stressed and unstressed forms of E.coli counts obtained from six different enumeration methods were used for the calculation of sensitivity of relative recovery ratio. For this calculation, appropriate formulas were used and TSA pour plate method was accepted as a reference. The values obtained from this calculation were higher for MDP and TSA/VRBA than those of others.

TEŞEKKÜR

Bana bu tez konusunu vererek, çalışmalarım sırasında karşılaştığım sorunların çözümünde yardımlarını ve yakın ilgisini esirgemeyen tez hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Ayhan Temiz'e içten teşekkürlerimi sunarım. Bu tezin hazırlanmasında, bana her türlü çalışma olanağını sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Doç.Dr.Gürol Ergin'e ve Gıda Mühendisliği Bölümü'ne teşekkür ederim.

Araştırmama, değerlendirme aşamasında yararlı uyarı ve önerileri ile katkıda bulunan Sayın Doç.Dr.F.Zehra Muluk'a, verilerin istatistiksel analizlerini gerçekleştiren Sayın Yüksek Mühendis M.Erol Şanlıtürk'e ve Sayın Kimya Yüksek Mühendisi Süleyman Ali Tuncel'e teşekkür ederim.

Dondurulmuş et örneklerinin sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen, H.Ü.Beytepe Kampüsü Kafeterya İşletmeleri Müdürlüğü'ne ve Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü Ankara Et Kombinasyonu Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Materyal	31
3.1.1. Çiğ süt örnekleri	31
3.1.2. Dondurulmuş et örnekleri	31
3.1.3. Saf <u>E.coli</u> kültürlerinden hazırlanan stres olmayan ve stres <u>E.coli</u> formları	32
3.1.4. Nuflow sellüloz asetat membran filtre kağıtları	32
3.1.5. U.V.Lambası	32
3.1.6. Denemelerde kullanılan besiyerleri; dilüsyon sıvıları ve çözeltiler	32

	<u>Sayfa</u>
3.2. Metot	33
3.2.1. Çiğ süt örneklerinin analize hazırlanması	33
3.2.2. Dondurulmuş et örneklerinin analize hazırlanması	34
3.2.3. Dondurulmuş et örneklerinden <u>E.coli</u> suslarının izolasyonu ve saf kültürlerin elde edilmesi	35
3.2.4. Saf <u>E.coli</u> kültürlerinin bazı niteliklerinin saptanması	36
3.2.4.1. Gram reaksiyonu	36
3.2.4.2. İndol testi	37
3.2.4.3. Metil red testi	37
3.2.4.4. Voges - Proskauer testi	37
3.2.4.5. Sodyum sitrat testi	37
3.2.4.6. Lauril sülfat triptoz broth besiyerinde gaz oluşumu testi	38
3.2.4.7. Hareket testi	38
3.2.4.8. Diğer testler	41
3.2.5. Saf <u>E.coli</u> kültürlerinden stres olmayan ve stres <u>E.coli</u> formlarının hazırlanması	41
3.2.6. Denemelerde kullanılan <u>E.coli</u> sayım yöntemleri	42
3.2.6.1. AOAC'nin EMS (En Muhtemel Sayı) yöntemi	43
3.2.6.2. Modifiye direkt plaka yöntemi	46
3.2.6.3. Triptik soy agar/Violet red bile agar dökme plaka yöntemi	48

	<u>Sayfa</u>
3.2.6.4. Violet red bile agar/Violet red bile agar dökme plaka yöntemi	50
3.2.6.5. Modifiye violet red bile agar dökme plaka yöntemi	52
3.2.6.6. Modifiye EMS yöntemi	53
3.2.7. Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel yöntemler	54
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	55
4.1. Çiğ süt örneklerine ilişkin sayım sonuçları ...	55
4.1.1. İzolatlara uygulanan tamamlama test sonuçları	66
4.2. Dondurulmuş et örneklerine ilişkin sayım sonuçları	79
4.2.1. İzolatlara uygulanan tamamlama test sonuçları	89
4.3. Saf <u>E.coli</u> kültürlerinden hazırlanan stres olmayan ve stres formlarla yapılan çalışma sonuçları	98
4.3.1. Saf <u>E.coli</u> kültürlerine uygulanan bazı test sonuçları	98
4.3.2. Stres olmayan <u>E.coli</u> kültürleri ile ilgili sayım sonuçları	99
4.3.3. Stres <u>E.coli</u> kültürleri ile ilgili sayım sonuçları	107

	<u>Sayfa</u>
4.3.4. Stres olmayan ve stres <u>E.coli</u> formları sayım sonuçlarından ölüm ve geri kazanma yüzdelerinin hesaplanması	115
5. SONUÇ	120
EK AÇIKLAMALAR	
A. Araştırmada kullanılan besiyerleri, dilüsyon sıvıları ve çözeltiler	126
Harrison' nun diski	136
KAYNAKLAR	137

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. MDP yönteminde membran yüzeyinde üreyen indol pozitif kolonilerin, indol reaktifi eklenmesinden sonraki görünüşleri	68
4.2. MDP yönteminde, membran yüzeyinde üreyen indol pozitif ve indol negatif kolonilerin, direkt güneş ışığı altında membranın kurutulmasından sonraki görünüşleri	68
4.3. TSA/VRBA dökme plaka yönteminde tipik ve atipik kolonilerin görünüşü	69
4.4. VRBA/VRBA yönteminde tipik kolonilerin besiyerindeki görünüşleri	70
4.5. Çiğ süt örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile MDP yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	71
4.6. Çiğ süt örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile TSA/VRBA dökme plaka yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	71
4.7. Çiğ süt örnekleri için AOAC'nin EMS yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	72
4.8. Çiğ süt örnekleri için AOAC'nin EMS yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	72

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9. Çiğ süt örnekleri için AOAC'nin EMS yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	73
4.10. Çiğ süt örnekleri için MDP yöntemi ile TSA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	73
4.11. Çiğ süt örnekleri için MDP yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	74
4.12. Çiğ süt örnekleri için MDP yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	74
4.13. Çiğ süt örnekleri için MDP yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	75
4.14. Çiğ süt örnekleri için TSA/VRBA yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	75
4.15. Çiğ süt örnekleri için, TSA/VRBA yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	76
4.16. Çiğ süt örnekleri için, TSA/VRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	76
4.17. Çiğ süt örnekleri için,VRBA/VRBA yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	77

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.18. Çiğ süt örnekleri için, VRBA/VRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	77
4.19. Çiğ süt örnekleri için, MVRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	78
4.20. Dondurulmuş et örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile MDP yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	90
4.21. Dondurulmuş et örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile TSA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	90
4.22. Dondurulmuş et örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	91
4.23. Dondurulmuş et örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	91
4.24. Dondurulmuş et örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	92
4.25. Dondurulmuş et örnekleri için, MDP yöntemi ile TSA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	92

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.26. Dondurulmuş et örnekleri için, MDP yöntemi ile VBRA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	93
4.27. Dondurulmuş et örnekleri için, MDP yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	93
4.28. Dondurulmuş et örnekleri için, MDP yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	94
4.29. Dondurulmuş et örnekleri için, TSA/VRBA yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	94
4.30. Dondurulmuş et örnekleri için TSA/VRBA yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	95
4.31. Dondurulmuş et örnekleri için, TSA/VRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	95
4.32. Dondurulmuş et örnekleri için, VRBA/VRBA yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	96
4.33. Dondurulmuş et örnekleri için VRBA/VRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	96

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.34. Dondurulmuş et örnekleri için, MVRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması	97
4.35. Stres olmayan <u>E.coli</u> formlarına ait ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri	104
4.36. Stres <u>E.coli</u> formlarına ait ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri	112
4.37. Araştırmaya alınan yöntemler için stres olmayan ve dondurularak stres hale getirilmiş <u>E.coli</u> formlarının sayım sonuçlarından yararlanılarak hesaplanan bağıl geri kazanma yüzdeleri	118
Harrison'nun diskisi	136

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Koliformların ayrımı	39
3.2. <u>E.coli</u> 'nin yakın diğer Enterobacteriaceae üyelerinden ayrımı	40
3.3. EMS değerlendirme tablosu	45
3.4. AOAC'nin EMS yöntemi	46
3.5. Modifiye direkt plaka yöntemi	48
3.6. TSA/VRBA dökme plaka yöntemi	50
3.7. VRBA dökme plaka yöntemi	51
3.8. Modifiye VRBA dökme plaka yöntemi	53
3.9. Modifiye EMS yöntemi	54
4.1. Çiğ süt örneklerinden elde edilen sayım sonuçları	57
4.2. Çiğ süt örneklerinden elde edilen sayım sonuçlarının logaritma değerleri	58
4.3. Çiğ süt örneklerine ilişkin bazı istatistiksel parametreler	59
4.4. Lineer regresyon/korelasyon analizi sonucunda elde edilen yöntemler arası korelasyon katsayıları	60

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.5. Çiğ süt örnekleri için Bonferroni çoklu karşılaştırma testi	63
4.6. Dondurulmuş et örneklerinden elde edilen sayım sonuçları	80
4.7. Dondurulmuş et örneklerinden elde edilen sayım sonuçlarının logaritma değerleri	81
4.8. Dondurulmuş et örneklerine ilişkin bazı istatistiksel parametreler	82
4.9. Lineer regresyon/korelasyon analizi sonucunda elde edilen yöntemler arası korelasyon katsayıları	83
4.10. Dondurulmuş et örnekleri için Bonferroni çoklu karşılaştırma testi	85
4.11. <u>E.coli</u> kültürlerine uygulanan biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları	98
4.12. Stres olmayan kültürlerle ilişkin sayım sonuçları	100
4.13. Stres olmayan kültürlerle ilişkin sayım sonuçlarının logaritma değerleri	101
4.14. Stres olmayan <u>E.coli</u> kültürlerine ilişkin bazı istatistiksel parametreler	102

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.15. Stres olmayan <u>E.coli</u> hücreleri için bağıl yüzde geri kazanma oranları	103
4.16. Stres olmayan saf <u>E.coli</u> kültürleri için Bonferroni çoklu karşılaştırma testi	106
4.17. Stres kültürlerine ilişkin sayım sonuçları	108
4.18. Stres kültürlerine ilişkin sayım sonuçlarının logaritma değerleri	109
4.19. Stres <u>E.coli</u> kültürlerine ilişkin bazı istatistiksel parametreler	110
4.20. Stres <u>E.coli</u> hücreleri için bağıl yüzde geri kazanma oranları	111
4.21. Stres saf <u>E.coli</u> kültürleri için Bonferroni çoklu karşılaştırma testi	114
4.22. <u>E.coli</u> kültürlerinin stres olmayan ve stres formları kullanılarak elde edilen % ölüm sonuçları	116
4.23. <u>E.coli</u> kültürlerinin stres olmayan ve stres formları kullanılarak elde edilen bağıl % geri kazanma oranları	117

1. GİRİŞ

Gıda zehirlenmeleri ve diğer patojenik mikroorganizmalar açısından gıdaların güvenilirliği, genelde fekal veya diğer indikatör organizmaların varlığının araştırılmasıyla ortaya konmaktadır.

Koliform gurubu bakteriler ve bunlardan özellikle Escherichia coli, gıdaların mikrobiyolojik kalitelerini belirlemeye dönük testlerde en sık olarak başvuru indikatör mikroorganizmalardır.

Sıcak kanlı hayvanların barsak florasında doğal olarak bulunan E.coli 'nin gıdalardaki varlığı, fekal kontaminasyonun dolayısıyla zayıf hijyenik koşulların bir göstergesi olup, aynı zamanda gıdada diğer enterik patojenlerin de bulunabileceğinin bir kanıtı olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle tuzük ve standartlarda çeşitli gıda maddelerinde bulunabilecek E.coli sayısının sınırlandırılması yoluna gidilmektedir (Ercöşkun, 1984; Anonymous, 1978 b; Anonymous, 1983 a; Anonymous, 1983 b; Anonymous, 1984 c).

Gıda maddelerindeki E.coli sayısının belirlenmesinde yaygın olarak AOAC'nin (Association of Official Analytical Chemists) EMS (En Muhtemel Sayı) yöntemi önerilmekte ve kullanılmaktadır. Mikrobiyolojik kalite kontrollerinde sonuçların elde edilmesi için geçen süre, karşılaşılan en önemli sorunlardan birini oluşturmaktadır. Gıdalarda E.coli sayımı AOAC'nin EMS yöntemi kullanılarak gerçekleştirildiğinde çok uzun bir süre almaktadır. Yöntemin tamamlanması genellikle

7 - 14 gün arasında değişmektedir (Rayman et.al.,1979; Silliker, 1982).

Teknoloji ve bilimin gelişmesi her alanda olduğu gibi gıdaların mikrobiyolojik kalitesi ve güvenilirliğinin kontrolü çalışmalarında da daha duyarlı, kesin ve hızlı yöntemlere duyulan gereksinimi artırmıştır. Bu durum dikkate alındığında gıda maddelerinde E.coli sayısının belirlenebilmesi için daha hızlı, duyarlı ve ekonomik olan yeni yöntemlerin kullanılabilirliği konusunda karşılaştırmalı bir yöntem araştırmasına gerek duyulmuştur. Diğer taraftan dondurulmuş, kurutulmuş, ısıtılmış, düşük pH'lı gıda maddelerinde bulunabilecek ve stres E.coli olarak adlandırılan E.coli'lerin geri kazanılmasının (sayıma dahil edilmesinin) EMS yöntemi ile tam olarak gerçekleştirilemediği bir çok kaynakta belirtilmektedir (Anderson and Baird-Parker,1975 ; Powers and Latt, 1979; Holbrook et al., 1980; Silliker; 1982).

Bu tür gıda maddelerinde varolan, ancak EMS yöntemi ile daha düşük düzeyde sayılabildiği bildirilen E.coli 'ler, hem gıda kalite kontrolünün sonuçlarını saptırması yönünden hem de E.coli'lerin çocuklarda ve yetişkinlerde diyare ile sonuçlanan hastalıklara yol açabildiği dikkate alındığında halk sağlığı açısından önem kazanmaktadır.

Bu çalışma ile gıda maddelerindeki E.coli 'lerin sayımında rutin analiz yöntemi olarak kullanılan ancak tamamlanması uzun bir süre, fazla harcama ve işgücü gerektiren AOAC'nin

EMS yöntemine seçenek olarak, daha hızlı ve daha az har -
cama gerektiren, ayrıca stres E.coli'lerin de sayımına
olanak sağladığı bildirilen bazı yeni yöntemler ve bu ko-
nuda tarafımızca tasarlanan iki yöntem karşılaştırmalı
olarak incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler bir-
birleri ile ve AOAC'nin EMS yöntemi ile karşılaştırılarak
ekonomi, zaman ve stres E.coli'lerin geri kazanılabilmesi
açılarından en iyi yöntem belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışmada çiğ süt ve dondurulmuş et gibi iki farklı özel-
likte gıda maddesi ele alınarak yöntemlerin gıda ve uygu-
lanan işlem bazında da duyarlılıklarının incelenmesi amaç-
lanmıştır.

Dondurulmuş etlerden izole edilerek, saf kültürleri elde
edilen E.coli suşlarının stres olmayan ve stres formları
ayrı ayrı hazırlanmıştır. Bu kültürlerle aynı sayım yöntem-
leri ile referans olarak kabul ettiğimiz TSA (Triptik Soy
Agar) dökme plaka yöntemi birlikte uygulanmış ve böylece
yöntemlerin stres E.coli'leri geri kazanma açısından
gıda maddesi etkileşimi olmaksızın birbirleri ile karşı-
laştırılması amaçlanmıştır. Yöntemlerin referans TSA dökme
plaka yöntemine göre bağıl geri kazanma oranları saptana-
rak dondurularak stres formları hazırlanmış E.coli'lerin
sayımında en üstün yöntem belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışmanın, farklı özelliklerdeki gıda maddelerinde E.coli'lerin sayımı için hızlı, güvenilir ve ekonomik yöntemlerin belirlenmesi çalışmalarına ve bu konunun öneminin anlaşılmasına ışık tutacağı kanısındayız. Bu çalışma ve ileride değişik gıda maddeleri ile gerçekleştirilebilecek benzeri çalışmaların ilgili gıda standartlarında yer alması ve bu standartların hazırlanmasında yararlı olacağı düşünülmektedir. Diğer taraftan, gıda işletmelerindeki zayıf hijyenik koşulların ortaya konulmasında da hızlı, güvenilir ve ekonomik E.coli sayım yöntemlerinin belirlenip kullanılması ve elde edilecek sonuçlara göre işletmede gerekli önlemlerin alınması, daha ekonomik ve sağlıklı bir gıda ürünü elde edilmesini sağlayabilecektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Escherichia cinsi organizmalar Enterobacteriaceae familyasına dahil olup, koliform olarak adlandırılan gurubun bir üyesidirler. Bu cins, Escherichia coli olmak üzere yalnızca bir türe sahiptir. E.coli türü bakterilerin, bazıları insan için patojen olabilen bir çok biyotip ve serotipleri bulunmaktadır. E.coli, gram negatif, sporsuz, hareketli olanları peritiriş flajellaya sahip, kısa çubuk şekilli bir bakteridir. İnsan ve diğer sıcak kanlı hayvanların barsak sistemlerinde doğal olarak bulunurlar. Gelişebileceği pH sınırları 4.4-8.8, sıcaklık sınırları ise 9-45,5 °C arasındadır. Optimum sıcaklık derecesi 35-37 °C'dir. Tuz gereksinimi % 0-6,5 arasında olup, üremenin mümkün olduğu en düşük su aktivitesi değeri 0,96'dır. Kültürleri fakültatif anaerop, sitokrom oksidaz negatif olup, potasyum siyanide duyarlıdır (Anonymous, 1974 a; Anonymous, 1978 a; Fraizer and Westhoff, 1978; Jay, 1978).

E.coli 'nin iki önemli biyotipi bulunmaktadır. Bunlardan E.coli biyotip I tipik E.coli olarak da bilinmekte olup, indol pozitifdir. E.coli biyotip II ise indol negatifdir. Her iki biyotip de sitratı karbon kaynağı olarak kullanmamaktadır. Glukoz, arabinoz, mannitol ve ksilozu fermente ederek laktik asit, asetik asit, formik asit, etil alkol ve 1:1 oranında karbondioksit ve hidrojen oluşturmaktadır.

Asetilmetil karbinol ve diasetil üretememektedir. E.coli biyotip I'in önemli ayırteci bir özelliği 44 - 45.5 °C'de laktoz safra-tuz besiyerlerinde gaz oluşturmalarıdır (Fraizer and Westhoff, 1978 ; Anonymous, 1978 a ; Mehlman and Romero, 1982).

Alkalescens - Dispar E.coli suşları, anoerojenik, hareketsiz, laktozu geç fermente eden veya hiç etmeyen bakterilerdir. Başlangıçta Shigella cinsi içerisinde sokulan bu bakteriler, bazı biyokimyasal ve özellikle antijen özelliklerine bakılarak Escherichia cinsi içerisinde incelenmektedir. Ancak insanlarda basilli dizanteri karakterinde ishallere neden olabildikleri dikkate alınarak Shigella içerisinde ya da bu iki cins arasında ayrı bir guruba dahil edilmesini önerenler de bulunmaktadır. Bu grup bakteriler indol pozitifdir. Genelde Beta - galaktosidaz enzimine sahip olmalarına karşın, laktoz ancak çok uzun bir sürede fermente edilebilir. Sellobioz, adonitol ve inositolü genellikle fermente etmezler. Sitrati tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanamamakta ayrıca asetilmetil karbinol ve diasetil üretememektedir. İnaktif E.coli ya da anoerojenik E.coli olarak da adlandırılabilen bu grup bakteriler, E.coli biyotip I ve II'den laktozu 37 °C'de 48 saat içerisinde kullanamaması ve gaz oluşturmaması özellikleriyle ayrılırlar (Serter ve Bilgehan ; 1978 ; Anonymous, 1978 a ; Mehlman and Romero, 1982).

Fekal koliformlar ya da fekal koli terimi, koliform bakteriler arasında E.coli ve yakından ilgili suşların varlığını,

saflaştırmaya gerek duyulmaksızın hızlı ve güvenilir yöntemlerle göstermeyi ve saymayı amaçlayan girişimler sonucunda ortaya çıkmıştır. Bu amaca, kültürlerin inkübasyonunu 44 - 45.5 °C gibi normalden daha yüksek derecelerde gerçekleştirilerek erişilmiştir. Koliform testinden olumlu sonuç alınan incelenmekte olan kültür, EC (Escherichia coli) broth besiyerinde 45.5 ± 0.2 °C'de ve 24 - 48 saat içerisinde laktozdan gaz oluşturur ya da BGLB (Brilliant Green Lactose Bile Broth) % 2 besiyerinde 44 ± 0.1 °C 'de, ve 24 - 48 saat içerisinde laktozdan gaz oluşturup, aynı inkübasyon koşullarında indol pozitif sonuç verir ise fekal koliform olarak kabul edilmektedir (Anonymous, 1978 a). Yalnızca laktozdan gaz oluşumunu dikkate alan birinci durumda, kültürler E.coli biyotip I'in yanısıra fekal orijinli olmayabilen "düzensiz tip II ve tip VI" yı da içerebilecektir. (Bölüm 3.2.4; Çizelge 3.1).

Buna karşın laktozdan gaz oluşumunun yanısıra indol oluşumunu da dikkate alan ikinci durumda ise, kültürlerin yalnızca fekal orijinli olan E.coli biyotip I'i içerecekleri bildirilmektedir (Anderson and Baird-Parker, 1975). Diğer taraftan selektif katı bir besiyerinde, inkübasyonun 44 °C gibi normalden daha yüksek sıcaklık derecelerinde gerçekleştirildiği durumlarda IMViC test sonuçları (Indol, Metil Red, Voges-Proskauer ve Sitrat) +++- ve + - - - olan bakterilerin de fekal orijinli olarak ele alındığı bildirilmektedir. Ancak katı besiyerlerinde, organizmaların laktozdan gaz oluşturma özellikleri saptanamamaktadır. Bu konuya açıklık getirmek üzere gerçekleştirilen bir araş -

tırmanın sonuçlarına göre, incelemeye alınan E.coli varyetelerinin 48 saat içerisinde % 90'ının laktozdan gaz oluşturduğu, buna karşılık % 99'unun indol oluşturduğu bildirilmektedir. Araştırmacılar kendi yaptıkları çalışma sonuçlarını da değerlendirerek, E.coli 'nin belirlenmesinde indol üretiminin, laktoz fermantasyonuna kıyasla daha kesin bir belirleyici özellik olduğu genellemesine varmışlardır (Anderson and Baird-Parker, 1975; Holbrook, et al., 1980).

Yapılan çeşitli araştırmalar, E.coli biyotip I ve II'nin sahip olduğu tipik özellikleri göstermeyen E.coli suşları ile E.coli olmadığı halde bu özellikleri gösteren organizmaların varlığını ortaya koymuştur. Diğer taraftan E.coli gurubu bakterilerin aktif E.coli, inaktif E.coli, E.dysenteriae, E.blattae, E.ewingii ve E.fergusonii olmak üzere en az altı alt grupta incelenebileceği bildirilmektedir. E.coli gurubu ile Enterobacteriaceae familyasındaki karışıklığa yol açabilecek yakından ilgili diğer bakteriler arasındaki ayrıcalıkları gösteren Çizelge Bölüm 3.2.4'de verilmiştir (Çizelge 3.2).

E.coli 'yi diğer yakın bakterilerden tam olarak ayırabilmek için uygulanacak test sayısının artırılması gerektiğine düşünülmektedir. Bu amaçla uygulanması önerilen testler, indol, metilred, Voges-Proskauer, sitrat, glukozdan gaz, sitokrom oksidaz, malonat, laktoz, sellobioz, KCN, lizin dekarboksilaz, arjinin dihidrolaz, ornitin dekarboksilaz ve gram boyamadır. Diğer taraftan E.dysenteriae'nin biyokimyasal ve fizyolojik bir tanımı bulunmadığı için,

bu bakterinin ancak serolojik testlerle tanımlanabileceği bildirilmektedir (Mehlman and Romero, 1982).

İnsanda kolera benzeri sendromu veya dizanteri benzeri sendromu adı verilen hastalıklara neden olan E.coli serotipleri enteropatojenik E.coli (EEC) olarak tanımlanmaktadır. EEC, tipik E.coli 'ye özgü reaksiyonları göstermeyebilmektedir. Aynı şekilde 45.5 °C'de üremeyen veya laktozu gaz oluşturarak fermente edemeyen EEC tipleri de bulunmaktadır. Bu nedenle EEC serotiplerinin tanımlanmasında güçlüklerle karşılaşılmaktadır. Kesin bir tanımlamaya gidebilmek için biyokimyasal-fizyolojik testlerin yanısıra, O (somatik), K (kapsül veya mikrokapsül) ve H (Flajella) antijenlerine özgü hazır polivalan ve manovalan antiserumların kullanıldığı serolojik testler ve enteropatojenik potansiyeli ortaya koymayı amaçlayan diğer testler önerilmektedir (Anonymous, 1978 a ; Serter ve Bilgehan, 1978 ; Mehlman and Romero, 1982).

EEC'nin gastroenteritis şeklinde görülen en az iki gıda zehirlenmesi olayında, yanlışlıkla *Paracolobactrum* veya *Shigella* türleri olarak belirlendiği bildirilmektedir (Anonymons, 1978 a).

Kolera benzeri sendromuna ya da enterotoksijenik hastalığa neden olan, enterotoksin üreten EEC suşlarıdır. Enterotoksijenik suşlar, özellikle çocuklarda bol su kaybıyla sonuçlanan ve şiddetli diyare ile seyreden hastalığa neden olmaktadır. Bu suşların ayrıca seyahat

diyarelerinin de nedeni olduğu düşünülmektedir. Enterotoksijenik EEC serotipleri, gıdanın tüketiminden sonra ince barsağın üst kısmında yerleşmekte ve burada toksin oluşturmaktadır. İstilacı (invazif) EEC serotipleri ise, dizanteri benzeri sendromuna neden olmaktadır. Bu serotiplerin toksijenik olmadığı barsakta ürediği ve barsak mukozasının epitel hücrelerini sararak bu hastalığa yol açtığı belirtilmiştir (Anonymous 1978 a ; Fraizer and Westhoff, 1978). Enterotoksijenik ve invazif hastalıkların oluşabilmesi için EEC'nin çok fazla miktarda vücuda alınması gereklidir. Bu nedenle, hastalığa neden olan gıdaların aşırı derecede kontamine olduğu, yetersiz korunduğu ya da çok miktarda üremeye olanak sağlayacak düzeyde yetersiz soğutulduğu bildirilmiştir (Fraizer and Westhoff, 1978).

Toksijenik ve invazif hastalıkların inkübasyon süresi genellikle 6-36 saat arasında olup hastalık belirtileri 24 saat ya da bir kaç gün sürebilmektedir. Bu sürenin bazen 9 gün hatta 77 gün sürdüğü de görülmüştür (Anonymous, 1978a).

Yapılan çalışmalar, enterotoksinin ısıya duyarlı ve ısıya dayanıklı formlarının olduğunu ve enterotoksin üretiminin, aktarılabilen plasmidlerle kontrol edildiğini ortaya koymuştur. Az miktarda enterotoksijenik E.coli 'nin vücuda alınmasından sonra, kalın barsakta yerleşmiş E.coli'lere enterotoksin plasmid aktarımının gerçekleşebileceği ve böylece bazı E.coli suşlarının enterotoksijenik özellik kazanabileceği belirtilmiştir (Fantasia, et al., 1975; Anonymous, 1976).

Amerika'da enterotoksijenik E.coli tiplerinin çocuklarda ki diyare ile seyreden hastalıklara yol açtığı görüşü yaygınken, Hindistan, Vietnam ve Japonya'da yapılan çalışmalar, EEC'nin yalnızca çocuklarda değil yetişkinlerde de bu hastalığa yol açabildiğini göstermiştir (Fantasia, et al., 1975).

Fantasia ve arkadaşları (1975), yaptıkları bir araştırmada Fransa'dan ithal edilen ve gıda zehirlenmesine yol açan Camambert peynirlerinde gıda zehirlenmelerine yol açan organizmalardan hiç birini saptayamadıklarını, ancak yüksek düzeyde E.coli saydıklarını belirtmişlerdir.

Calderon ve Levin (1981), diyare ile seyreden hastalıkların özellikle gelişmemiş ülkelerde ölümlere yol açtığını belirtmişler ve ısıya duyarlı toksin üreten EEC'nin nicel olarak saptanabilmesi için hızlı bir metot geliştirmeye çalışmışlardır.

Escherichia coli, insan ve hayvanların barsak sistemlerindeki doğal florada yer aldığından, bu organizmanın gıdalarda bulunması genellikle dolaylı ya da dolaysız fekal bir kirlenmenin işareti olarak açıklanmaktadır. Bu nedenle E.coli, suda, deniz ürünlerinde, süt ürünlerinde ve diğer gıdalarda bulunması olası enterik patojenler için klasik bir indikatördür. Diğer bir deyişle, herhangi bir gıda maddesinde E.coli varlığının saptanması, bu gıda maddesinde enterik bir patojenin bulunabileceğine işaret eder. Fekal kirlenme derecesinin belirlenmesini gerektiren pek

çok durumda, E.coli varlığının ortaya konması yerine daha çok sayının saptanması yoluna gidilmektedir. Bu durumda E.coli sayısı gıdaların hazırlanması ve tüketime sunulması aşamalarındaki olumsuz hijyenik koşulların ve el - verişsiz depolamanın bir göstergesidir. Diğer taraftan, sayının yüksek olması enterik patojen tehlikesini daha da artırabilecektir (Anonymous, 1978 a; Lück and Lategan, 1983). Ülkemizde çeşitli gıda standartlarında bu yönde, E.coli ya da fekal koli bulunmayacak şekilde bir sınırlamaya gidilmektedir (Anonymous, 1978 b; Anonymous. 1983 a ; Anonymous, 1983 b ; Anonymous, 1984 c).

Gıdalardaki koliform, fekal koliform ve E.coli sayıları, genelde her biri kompleks ve pahalı olan ve ardarda üç basamakta gerçekleştirilen EMS (En Muhtemel Sayı) yöntemiyle saptanmaktadır. Koliformların EMS yöntemiyle saptanabilmesi için dünyanın bir çok laboratuvarında kullanılan üç farklı yol olduğu bildirilmiştir. Bunlardan birincisi, (Kuzey Amerika yöntemi) ; LST (Lauril Sülfat Triptoz) broth besiyerinde gaz oluşumuyla sonuçlanan tahmin incelemesinden sonra, her biri 35 - 37 °C'de inkübe edilen BGLB (Brilliant Green Lactose Bile Broth) besiyerinde gaz oluşumu ya da EMB (Eosine Methylene Blue Agar) veya Endo agar besiyerinde tipik kolonilerin saptandığı doğrulama testini içeren yöntemdir. İkincisi (İngiltere yöntemi); doğrulama işlemi olmaksızın, Mac Conkey Broth besiyerinde gaz oluşumunun saptanmasıyla sonuçlandırılan yöntemdir. Üçüncüsü ise; BGLB besiyerinde tahmin , VRBA (Violet Red Bile

Agar) yada Endo Agar besiyerinde doğrulama testi ile sonuçlanan yöntemdir (Anonymous, 1978 a ; Silliker, 1982).

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) tarafından, bu üç metot arasından en iyisinin seçilebilmesi amacıyla uluslararası iki ortak çalışma yapılmıştır (Anonymous, 1978 a; Silliker, et al., 1979 ; Silliker, 1982).

İlk çalışmada; çeşitli gıdalardan izole edilmiş tipik Enterobacter aerogenes ve Escherichia coli kültürleri, çeşitli donmuş ve düşük nemli gıdalara iki farklı düzeyde aşılantı yapılmıştır. Üç yöntemin uygulanması ile alınan sonuçlara göre, yöntemler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı bildirilmiştir. Diğer çalışmada ise, doğal olarak kontamine olmuş çeşitli gıdaların incelendiği ve bu çalışma sonunda da yöntemler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı açıklanmıştır.

Koliform sayımında EMS yöntemlerinin yanısıra yaygın olarak VRBA/VRBA dökme plaka yönteminden de yararlanılmaktadır. Yöntemin uygulanmasında önce, çalışılacak örneğin VRBA besiyeri kullanılarak dökme plaka yöntemiyle ekimleri yapılmakta, ardından besiyeri katılaştıktan sonra yüzeyi bir kat daha VRBA ile kaplanmaktadır. 35 - 37 °C'de inkübasyon sonunda 0.5 mm ya da daha büyük çaplı ve koyu kırmızı renkli koloniler sayıma alınmaktadır.

ICMSF tarafından gerçekleştirilen uluslararası ortak di-
ğer bir çalışmada, Kuzey Amerika EMS yöntemi ile VRBA/
VRBA dökme plaka yöntemi arasında istatistiksel olarak bir
fark olmadığı bildirilmiştir (Anonymous, 1978 a).

Fekal koliformların belirlenebilmesi için, ICMSF tarafın-
dan iki yöntem önerilmiştir. Bunlardan ilki Kuzey Amerika
yöntemi adı ile anılmaktadır. Bu yöntemde, aşılama yapı-
lan ve $35 - 37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 - 48 saat inkübe edildikten sonra
gaz oluşumu gözlenen durhamlı LST broth besiyerini içeren
tüplerden, durham tüplü EC broth besiyerine aktarmalar ya -
pılmaktadır. $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübasyon sonun-
da gaz oluşumu görülen EC broth tüpleri fekal koliformlar
için pozitif olarak değerlendirilmektedirler.

İkinci yöntem Avrupa'da yaygın olarak kullanılmakta olan
ve bu isimle anılan bir yöntemdir. Burada, ekimleri yapı-
lan ve $35 - 37^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra
gaz oluşumu gözlenen Mac Conkey broth besiyerinden dur-
ham tüplü BGLB broth 2% ve pepton water besiyerine ayrı
ayrı aktarmalar yapılmaktadır. BGLB broth besiyerini
içeren tüpler $44 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 - 48 saat inkübasyon so-
nunda gaz oluşumu yönünden, pepton water besiyerini içe-
ren tüpler ise $44 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyon sonunda
indol oluşumu yönünden incelenmektedir. Gaz oluşumu ve
indol oluşumu pozitif olan kültürlerde, fekal koliform -
ların bulunduğu kabul edilmektedir.

ICMSF tarafından gerçekleştirilen uluslararası ortak bir çalışmada, fekal koliformların belirlenmesi için önerilen bu iki yöntem arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır (Anonymous, 1978 a; Silliker, et al., 1979 ; Silliker, 1982).

Koliform sayısının belirlenmesi, gıdaların güvenilirliği açısından başvurulmuş sınırlandırıcı bir değer olmasına rağmen, bu grup içerisindeki fekal kontaminasyonun en önemli göstergesi olan E.coli sayısının belirlenmesi çok daha fazla önem taşımaktadır.

E.coli sayısının belirlenebilmesi için önerilen AOAC'nin (Association of Official Analytical Chemists) EMS (En Muhtemel Sayı) yönteminde, yöntemin tamamlanabilmesi için 168 - 240 saate (7-10 gün), bazı kaynaklarda ise 10 - 14 güne gerek duyulduğu belirtilmektedir (Rayman, et al., 1979 ; Silliker, 1982 ; Sharpe, et al., 1983).

Anderson ve Baird-Parker (1975), EMS yöntemine dayanan sayımların yorucu ve uzun olduğunu ayrıca direkt plaka sayım yöntemlerine kıyasla daha az kesin olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar tarafından gıdalarda E.coli sayımı için, direkt sayıma olanak sağlayan yöntemler araştırılmış ve 44 °C'de indol üretimini temel alan seçenek bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Çalışmada, petrideki TBA (Tryptone Bile Agar) besiyeri üzerine yerleştirilmiş sellüloz asetat membran filtre kağıtlarından yararlanılmıştır. Pişmiş ve pişmemiş et ürünleri

uygun şekilde homojenize edilip dilüsyonları hazırlandıktan sonra 0.5 ya da 1.0 ml miktarlarda membran yüzeyine aktarılmış ve yayılmaları sağlanmıştır. Örnek membran tarafından absorbe edildikten sonra petrilere ters çevrilmeden 44 ± 1 °C 'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda her bir membran, içerisinde 1-2 ml indol ayıracağı (N-HCl'de hazırlanmış % 5 p-dimetilaminobenzaldehit) bulunan petri kapaklarına aktarılmıştır. İndol pozitif olduğu 5 dakika içerisinde pembe renge dönüşmesiyle anlaşılan koloniler, ayrıca uzaklaştırıldıktan sonra sayılmış ve dilüsyon faktöründe gözönüne alınarak E.coli sayısı hesaplanmıştır. Sonuç E.coli/g gıda olarak verilmiştir. Membranın güneş ışığı ya da U.V. lamba altında kurutularak sabitleştirilebileceği ve referans olarak saklanabileceği bildirilmiştir.

Bu çalışmada, koloni transfer / destek materyali olarak sellüloz asetat membranlar yerine selofan, filtre kağıdı gibi maddelerin denendiğini ancak bunların daha az geçirgen olması, zayıf renk reaksiyonu vermeleri gibi çeşitli nedenlerle, en başarılı sonucun sellüloz asetat membranlarla elde edildiği bildirilmiştir (Anderson and Baird-Parker, 1975).

Membran filtre kağıtları oldukça saf sellüloz esterlerinden üretilmişlerdir. Filtre disklerinin çaplarının 13 mm'den 293 mm'ye kadar değişebildiği ve gözenek ölçüsünün de 0.22 , 0.80 ve 1.2 μ m olabileceği belirtilmiştir. Bu membranların kalınlıkları ise 125 μ m'dir. Membran filtrelerin mikrobiyoloji alanındaki kullanımlarında,

bakteri hücreleri membran filtreleri üzerindeki gözeneklerde tutulmaktadır. Membranlar uygun kültür ortamına yerleştirildiklerinde, inkübasyon aşamasında başlıbaşına her bir hücre besin elementlerini alabilmekte ve kendi kolonilerini oluşturabilmektedir (Anonymous, 1974 b ; Dutka, 1981).

Araştırmacılar, 843 gıda örneğinin çalışılmasıyla membranlar üzerinden izole ettikleri 555 indol pozitif koloninin % 95'inin E.coli biyotip I (IMVIC ; + + - -) ve % 3.4'nün fekal orjinli Escherichia (IMVIC ; + + + - ya da + - - -) olduğunu saptamışlardır (Anderson and Baird-Parker, 1975).

Aynı çalışmayla safraya dirençli ve indol üreten diğer bazı bakterilerin TBA (Tryptone Bile Agar) besiyeri üzerindeki membranlarda, 37 ve 41.5 °C ' lerde iyi bir şekilde geliştiği ve E.coli ' den ayırdedilemediği bildirilirken, 44 °C'de ise diğer tüm indol üreten bakteriler ile E.coli varyeteleri arasında çok iyi bir ayırımın başarılabildiği gösterilmiştir (Anderson and Baird - Parker, 1975).

Direkt plaka yönteminin, yalnızca tipik E.coli'yi değil, aynı zamanda çoğu enteropatojenik olan laktoz negatif ve anaerojenik indol pozitif varyeteleri de belirleyebildiği bildirilmiştir (Mehlman et al., 1974 ; Holbrook et al., 1980).

Anderson ve Baird - Parker (1975), aynı araştırma kapsamı içinde, pişmiş ve pişmemiş etlerden oluşan 248 adet örnekte E.coli sayısını belirlemek için, geliştirdikleri direkt plaka yöntemi ile EMS yöntemini karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Sonuçta domuz eti dışındaki diğer örnekler için her iki yöntem arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark ($P = 0.05$) olmadığını belirtmişlerdir. Domuz etinde, direkt plaka yöntemi ile daha yüksek sayılar elde edilmiştir.

Holbrook ve arkadaşları (1980), direkt plaka yöntemini, dondurulmuş, kurutulmuş, ısıtılmış işlem görmüş ya da düşük pH'lı gıdalarda bulunan hasara uğramış (stres) E.coli'lerin belirlenebilmesi amacıyla modifiye etmişlerdir.

Çalışmamızdaki yöntemlerden birisini oluşturan MDP (Modifiye Direkt Plaka) yönteminde, uygun şekilde hazırlanmış gıda örneği MMGA (Minerals Modified Glutamate Agar) ya da Nutrient Agar besiyeri üzerindeki Nuflow sellüloz asetat membranları yüzeyine aktarılıp yayılmıştır. 37 °C'de 4 saat bir ön inkübasyonun ardından, membranlar aseptik koşullarda petrideki yüzeyi kurutulmuş TBA besiyerlerine aktarılarak, 44 °C'de 18 saat inkübasyona terkedilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda indol pozitif kolonilerin direkt plaka yöntemindeki gibi incelendiği belirtilmiştir (Holbrook, et al., 1980).

Araştırmacılar, triptofandan optimal indol üretimi için belli besleyici koşulların gerektiğini, ancak E.coli'nin

yararlanabileceği glukoz ve diğer karbohidratların yüksek derişimde bulunması halinde, triptofonaz sentezinin inhiye edilip, indol üretiminin duracağını bildirmişlerdir. Bu durumda yüksek derişimde karbohidrat içeren gıdalarda E.coli 'nin DPM (Direkt Plaka Metodu) ile belirlenmesinin engelleneceği bildirilmektedir. DPM 'nin modifiye edilmesi ile, yöntemin stres E.coli'ler için de kullanılabilmesi ve indol üretimi üzerine karbohidratlardan gelebilecek inhibitör etkilerin uzaklaştırılacağı açıklanmıştır (Holbrook, et al., 1980).

Çalışmada ; ısıtma dondurma ve kurutma ile hasara uğratılmış E.coli'lerin geri kazanılmasında çeşitli canlandırma süre ve sıcaklıklarını içeren inkübasyon koşulları denenmiş ve esas geri kazanmanın Nütrient Agar besiyeri için 37 °C'de 2 saatlik bir ön inkübasyondan sonra oluştuğu bildirilmiştir. Donma ile hasara uğramış hücrelerde geri kazanmanın 20-30 °C'lerde 5 saatden daha uzun süre aldığı, ancak 37 °C'de hücrelerin % 90'ının 2 saatte onarılabilmesi belirtilmiştir. Isıtma ya da kurutmanın oluşturduğu hasarlarda ise, hasar görmüş hücrelerin % 90'ının onarılabilmesi için 37 °C'de 4 saatlik bir süre gerektiği açıklanmıştır (Holbrook, et al., 1980).

Aynı araştırmacılar çalışmalarında, DPM'da, E.coli tarafından indol üretimine karbohidratların inhibitör etkisinin, aşılana örnekdeki karbohidrat tipine ve derişimine bağlı olduğunu göstermişlerdir. DPM'u kullanıldığında,

çiğ süt ve dondurma örneklerindeki karbohidrat derişiminin E.coli ' nin indol üretimini inhibe ettiği, MDP (Modifiye Direkt Plaka Metodu) kullanıldığında ise, ön inkübasyon aşamasında, karbohidratların kullanılan ilk besiyeri tarafından absorbe edildiği, membranın ikinci besiyerine aktarılmasından sonra da indol üretiminin gerçekleşebildiği bildirilmiştir (Holbrook, et al., 1980).

Holbrook ve arkadaşları (1980), tarafından EMS, DPM ve modifiye DPM'ları kullanılarak doğal olarak kontamine olmuş donmuş etlerden E.coli'nin geri kazanılması için karşılaştırmalı bir çalışma yapılmıştır. DPM'nun, NA ya da MMGA kullanılan Modifiye DPM'na kıyasla daha düşük sayım sonucu verdiği ($P = 0.05$), DPM 'nun ise Mac Conkey broth ve Minerals Modified Glutamate Broth besiyerleri kullanılan iki EMS yönteminin sonuçlarından önemli ölçüde farklı olmadığı açıklanmıştır.

Araştırmacılar tarafından, enteropatojenik olan ve olmayan E.coli varyetelerinin belirlenebilmesinde, zaman ve güç açısından modifiye DPM'nun klasik EMS yöntemlerine kıyasla üstün olduğu da vurgulanmıştır.

Andrews ve Presnell (1972), kabuklu deniz hayvanlarının yetiştiği suların bakteriyal kalitesinin belirlenebilmesi için kullanılan standart APHA (American Public Health Association) EMS yöntemine seçenek, hızlı ve güvenilir olduğu belirtilen A-1 isimli bir yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemde özellikle E.coli ' lerin geri kazanılabilmesi için formüle edilmiş durham tüplü A-1

besiyeri kullanılmaktadır. Ekim yapılan besiyerleri, 44.5 °C'de su banyosunda 24 saat inkübasyona terkedilmekte ve süre sonunda durham tüplerinde gaz oluşumu incelenmektedir. Gaz oluşumu gözlenen tüpler fekal koliformlar açısından pozitif olarak değerlendirilmekte ve pozitif tüpler esas alınarak indikatör organizma yoğunluğu standart EMS tablolarından hesaplanmaktadır.

Andrews ve arkadaşları (1979), tarafından, A-1 yöntemine hasara uğramış hücrelerin onarılabilmesi amacıyla bir canlandırma basamağı eklenerek Modifiye A-1 yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, ekim yapılmış A-1 besiyerlerine önce, 35 °C'de 3 saatlik bir ön inkübasyon uygulanmakta, daha sonra bu besiyerleri 44.5 °C'de su banyosunda inkübasyona terkedilmektedirler.

Andrews ve arkadaşları (1979), yaptıkları çalışmada 11 çeşit gıda maddesinde, fekal koliform ve E.coli sayımı için AOAC'nin EMS yöntemini direkt A-1 ve Modifiye A-1 yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Fekal koliform sayımı için her üç yöntem, iki gıda çeşidi dışında istatistiksel olarak eşit bulunmuştur. Bu iki gıda çeşidinde ise A-1 ve modifiye A-1 yöntemlerinin, AOAC'nin EMS Yöntemine kıyasla önemli ölçüde yüksek değerler verdiği bildirilmiştir. E.coli sayımında ise A-1 ve modifiye A-1 yöntemleri ile AOAC'nin EMS yöntemi eşit bulunmuş, farklı iki gıda çeşidinde ise ilk iki yöntem, AOAC'nin EMS yöntemine göre önemli ölçüde yüksek sayım sonuçları vermiştir. Araştırmacılar, çalışılan tüm gıda çeşit-

lerinde, fekal koliformlar ve E.coli sayımında, AOAC'nin EMS yöntemi ile modifiye A-1 yöntemi arasında önemli bir korelasyon olduğunu bildirmişler, sayımlarda A-1 direkt ve modifiye A-1 yöntemlerinin kullanılması durumunda, AOAC'nin EMS yöntemine kıyasla 72 saatlik bir süreye kazanılabileceğini açıklamışlardır.

Varga ve Doucet (1984), yaptıkları çalışmada, modifiye A-1 yönteminde 44.5 °C'deki inkübasyon süresinin uzatılması ile, yöntemin taze ve donmuş balıkçılık ürünlerinde fekal koliformların sayımı için standart APHA'nın EMS yöntemiyle karşılaştırılabilir sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir.

Son yıllarda, stres bakterilerin sıvı ve katı ortamlarda geri kazanılabilmesi için pek çok yöntem önerilmiştir. Bunlardan birisi de stres fekal koliformların belirlenmesi ve hızlı sayımı için geliştirilmiş, çalışmamızdaki E.coli sayım yöntemlerinden birini oluşturan TSA/VRBA (Tryptic Soy Agar / Violet Red Bile Agar) direkt plaka yöntemidir (Powers and Latt, 1979).

Yöntem, uygun şekilde hazırlanmış gıda örneğinin TSA besiyeri kullanılarak dökme plaka yöntemiyle ekiminden sonra, 35 °C'da 2 saatlik bir ön inkübasyon ve ardından bu besiyeri yüzeyinin VRBA besiyeri ile kaplanarak 45.5 °C'de 24 saatlik inkübasyon aşamalarını içermektedir. İkinci inkübasyondan sonra fekal koliformların sayılarak, doğrulanmalarının yapılabilmesi için IMViC testlerine

geçildiği, böylece yöntemin tamamlanması için geçen toplam sürenin 72 saat olduğu bildirilmiştir.

Araştırmacılar, VRBA besiyerinde 45.5 °C'de E.coli'nin üreyebilmesine rağmen, diğer koliformların üreyemediklerini ya da E.coli den kolaylıkla ayırdedilebilen küçük atipik koloniler verdiklerini bildirmişlerdir.

Stres olmayan ve dondurularak stres hale getirilmiş E.coli hücrelerinde 35 ve 45.5 °C'lerde 24 saatlik inkübasyon sonunda geri kazanma yüzdesi VRBA, TSA/VRBA yöntemleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu denemede yukarıdaki yöntemlere paralel olarak TSA besiyerine de dökme plaka yöntemiyle ekim yapıldığı ve buradan alınan sayım sonuçlarının % 100 geri kazanma olarak kabul edildiği bildirilmiştir. Stres olmayan hücreler için, klasik VRBA yönteminde geri kazanma oranı, 35 ve 45.5 °C'lerde sırasıyla % 78 ve % 84 iken aynı hücrelerin -40°C'de dondurulması ile elde edilen stres hücrelerde bu oranın % 4.3 ve % 10.4'e düştüğü bildirilmiştir. TSA/VRBA yönteminde ise; stres ve stres olmayan hücreler için denenen her iki sıcaklık derecesinde de geri kazanma % 100'ün üzerinde bulunmuştur. Çalışmada, TSA/VRBA yöntemi ile AOAC'nin EMS yöntemi stres ve stres olmayan E.coli hücrelerinin geri kazanılması yönünden karşılaştırılmış ve TSA/VRBA yönteminin her iki durumda da üstün bulunduğu bildirilmiştir.

Araştırmacılar, stres hücrelerin sayımında, TSA besiyerinin yüzeyine VRBA besiyeri kaplanmadan önce zorunlu

olarak bir canlandırma periyoduna gereksinim duyulduğunu belirtmişlerdir. Bu ön inkübasyon işlemi sırasında, sayım yapılacak ortamda hücre sayısının artmasından kaynaklanacak sorunların ancak, TSA gibi hücreyi hareketsizleştirerek tek bir koloni oluşturacak şekilde üreten katı bir onarım ortamının kullanılması ile kaldırılabileceğini belirtmişlerdir (Powers and Latt, 1979).

Hartman ve arkadaşları (1975), hasar görmüş hücrelerin, yüksek sıcaklık uygulaması ve ortamda inhibitör ajanların bulunması gibi durumlarda gelişemediklerini bildirmişler ve stres koliformların sayımı için modifiye bir VRBA besiyeri geliştirmişlerdir. Besiyerinin formülünde yaptıkları değişiklikle, stres hücrelerin onarılacağını ve hücre çoğalmasını engelleyen seçici inhibitör ajanlarla karşılaşmadan geri kazanılacağını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada, su, cottage peyniri, dondurulmuş sebzeler ve çiğ süt örnekleri kullanılarak, modifiye VRB-2 besiyeri ile otoklavda ve kaynatılarak sterilize edilmiş klasik VRBA besiyerleri stres koliformların geri kazanılması yönünden karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Araştırmacılar, VRB-2 besiyerinin denenen diğer iki VRBA ortamına kıyasla daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Donmamış gıdalarda olduğu gibi, donmuş gıdalarda da koliform bakterilerin sayımı için seçici sıvı ve katı ortamlar kullanılmaktadır. Gram negatif bakterilerde, donma ve dondurarak kurutma işlemlerinden sonra bazı yüzey aktif ajanlara karşı duyarlılığın ortaya çıktığı bildirilmiş -

tir (Ray and Speck, 1972 ; Draughon and Nelson, 1981).

E.coli hücrelerinde, donma ve çözünme olayları sırasında geçirgenlik engelinin bozulduğu, protein, peptit, amino_ asit, nükleik asit gibi hücre bileşenlerinin dışarı sızdığı ve dışarıdan çeşitli iyonların hücreye girdiği açıklanmıştır. Hücre için elzem olan bu bileşenlerin kaybının, hasara ve ardından da ölüme yol açtığı bildirilmiştir (Ray and Speck, 1972).

Ray ve Speck (1973), dondurulmuş gıdalarda bulunan koliform bakteriler ve E.coli'nin büyük bir yüzdesinin hasar görmüş durumda bulunabileceğini bildirmişlerdir. Dondu - rulmuş gıdaların mikrobiyolojik analizlerinde kullanılan seçici ortamların stres hücreleri belirlemede yetersiz kalacağı, bu durumda bu tip gıdaların hijyenik kalitesinin belirlenmesinde yanılgılara neden olacağı ve kalite gelişimini engelleyeceği belirtilmiştir. Araştırmacılar tarafından dondurulmuş örneklerde koliform sayımında, stres hücreler için seçici olmayan zengin besi ortamlarında bir onarım işleminin gerektiği sonucuna varılmıştır. Onarımı, üremeden ayırabilmek için de onarım sırasındaki sıcaklık ve sürede bir standardizasyona gidilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Warseck ve arkadaşları (1973), dondurulmuş gıdalarda hasara uğramış koliformların onarımı ve sayımı üzerine yaptıkları araştırmada, suya ya da steril gıdalarda -20 °C'de

dondurulan E.coli'lerin VRBA ve DLA (Deoxycholate Lactose Agar) besiyerlerinde koloni oluşturmalarının inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Araştırıcılar, hasar görmüş hücrelerin TSB (Trypticase Soya Broth) besiyerinde ve çeşitli gıdalarda onarımını incelemişler, TSB besiyerinde 25 °C'de 1 saat bir ön inkubasyon aşaması sonucunda gerçekteleşen onarımın daha zayıf olmakla beraber gıdalarda da oluşabildiğini göstermişlerdir.

Dökme plaka yöntemi ile stres koliformların onarımı ve sayımını inceleyen Speck ve arkadaşları (1975), donmuş gıdalardan izole ettikleri koliform kültürleri, E.coli K-12 kültürü ve dondurmalarla yaptıkları çalışmalarda, donma ile hasar görmüş hücrelerin sayımı ve onarımı için TSA/VRBA dökme plaka yöntemini en uygun yöntem olarak belirlemişlerdir. Araştırıcılar, TSA besiyerine ekimi yapılan örneklerdeki stres hücrelerin, 25 °C'de 1-2 saatlik ön inkubasyon aşamasında onarılacağını, bunu izleyen VRBA besiyeri ile kaplama işleminin de besiyerinde koliform olmayan kolonilerin gelişimini engelleyeceğini belirtmişlerdir. Dondurma örnekleri ile yaptıkları çalışmada, TSA/VRBA yönteminin, tek kat VRBA ve VRBA/VRBA dökme plaka yöntemlerine kıyasla daha fazla koliform saydığını saptamışlardır.

Hall (1984), dondurulmuş gıdalardan E.coli biyotip I, düzensiz tip II ve tip VI'nın direkt izolasyonuna olanak sağlayan, canlandırma basamağı ile birleştirilmiş, yeni bir

direkt plaka yöntemi geliştirdiğini bildirmiştir. Yöntemin, hızlı bir indol testi ile, E.coli biyotip I'in 24 saat içerisinde belirlenebilmesine olanak sağladığı, stres hücreleri geri kazandığı ve düşük bir maliyet ile tamamlanabildiği belirtilmiştir. Bu yöntemle laktozdan geç asit oluşturan ya da diğer yöntemlerde negatif sonuç veren anaerojenik E.coli varyeteleri de saptanabilmektedir. İzolatlarla daha ileri çalışmaların, gerektiğinde indol testinden sonra da yapılabilirdiği açıklanmıştır.

Araştırmacı, dondurulmuş gıdaları ele alarak, kendi geliştirdiği yöntem ile, klasik EMS ve VRBA yöntemleri ve Holbrook ve arkadaşlarının (1980), modifiye direkt plaka yöntemini karşılaştırmayı amaçlayan bir çalışma yapmıştır. Çalışmanın sonucunda, geliştirdiği yeni yöntem ve modifiye direkt plaka yönteminin, geri kazanma ve sayımda diğer iki yönteme kıyasla daha üstün sonuçlar verdiğini saptamıştır. Donma sonrasında, bazı varyetelerin laktozu fermente etme ve indol oluşturma yeteneklerini kaybettikleri, modifiye direkt plaka yönteminde bu özelliklerin tekrar geri kazandırılmazken Hall (1984)'ın yönteminde bunun başarıldığı bildirilmiştir. Ancak, çalışmada bu tür varyetelere % 3 gibi çok düşük oranda rastlandığı da açıklanmıştır.

Hall (1985), daha sonra yaptığı diğer bir çalışmada, yöntemindeki mikrotüplerin kullanımını gerektiren uzun ve zor indol testi aşamasını daha kolaylaştıran bir direkt

plaka sayım yöntemi geliştirdiğini bildirmiştir.

Gıdalardan stres E.coli'nin geri kazanılabilmesi amacıyla geliştirilmiş direkt plaka yöntemlerinden bir diğeri de, fluorojenik glukuronidaz substratını esas alan yöntemdir (Damaré, et al., 1985). Yöntemde kullanılan PTG (Pepton Tergitol Glucuronide) agar besiyeri, tergitol 7 ve 4 - methylumbelliferyl B-D-Glucuronide fluorojenik substratını içermektedir. E.coli kolonileri U.V. lambası altında incelenmekte ve yöntem 24 saatte tamamlanmaktadır.

Araştırmacılar, dondurulmuş etlerden izole edilen E.coli kültürleri ile yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada, stres E.coli hücrelerinin bağıl geri kazanılmasında, PTG agar direkt plaka yöntemi ile VRBA/VRBA, Anderson ve Baird-Parker (1975)'in geliştirdiği direkt plaka yöntemi ve Holbrook ve arkadaşlarının (1980), modifiye direkt plaka yöntemlerini incelemişlerdir. Donma ile stres hale getirilmiş E.coli hücreleri açısından PTG agar ve ön inkübasyon aşamasını içeren Holbrook ve arkadaşları'nın (1980), modifiye direkt plaka yöntemi, diğerlerine kıyasla daha yüksek bir geri kazanma göstermiştir. Isıl işleme stres hale getirilen E.coli hücrelerinin geri kazanılmasında ise, PTG agar ve ardından modifiye direkt plaka yöntemi en yüksek geri kazanma oranlarını vermiştir.

Motes ve arkadaşları (1984), kabuklu deniz hayvanları ve bunların yaşadığı sularda E.coli sayımı için yaptıkları

bir çalışmada, APHA'nın standart EMS, Fransız EMS, sel - lüloz asetat membran filtre kağıtlarını kullanan direkt plaka ve dönen tüp direkt sayım yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Çalışılan tüm örnek çeşitlerinde, BGLB broth besiyerini kullanan Fransız EMS yöntemi ile APHA'nın standart EMS yöntemi arasında yüksek bir korelasyon bulunmuştur. Direkt plaka yönteminin sonuçları ise, APHA'nın standart EMS yöntemine kıyasla, tüm örnek çeşitleri için önemli ölçüde düşük bulunmuştur. İngiliz dönen tüp yöntemi, yalnızca iki örnekte APHA'nın EMS yöntemine yakın sonuçlar göstermiştir.

Rayman ve arkadaşları (1979), tarafından ICMSF organizasyonu ile gerçekleştirilen uluslararası ortak bir çalışmada, doğal olarak kontamine olduğu saptanan donmuş ve donmamış etlerde E.coli biyotip I'in sayımı için Anderson ve Baird-Parker'in direkt plaka yöntemi ile AOAC'nin EMS yöntemi karşılaştırılmıştır. Direkt plaka yönteminin EMS yöntemine kıyasla donmuş örneklerde daha yüksek E.coli sayımı verdiği, donmamış örneklerde ise her iki yöntemin de birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Dondurulmuş örneklerde, direkt plaka yönteminin daha az değişken sonuçlar verdiği ve örneklerdeki düşük sayıdaki E.coli'leri de saptayabildiği belirtilmiştir. Direkt plaka yönteminin E.coli biyotip II ve ara tipleri belirleyememesi dezavantajına rağmen , bu Escherichia varyetelerinin yalnızca % 3-5 oranında olduğu, bu nedenle yöntemin donmamış et örneklerinde daha az değişken olması,

donmuş et örneklerinde yüksek geri kazanma yüzdesi vermesi, zaman ve besiyeri harcamasının daha az olması nedenleri ile EMS yöntemine tercih edilebileceği açıklanmıştır.

Gıdalardaki E.coli biyotip I'in sayımı için yapılan karşılaştırmalı yöntem çalışmalarından bir diğerinde de EMS yöntemi ile Anderson ve Baird-Parker'in (1975) direkt plaka ve ekimin filtrasyonla yapıldığı hidrofobik grid-membran filtre yöntemleri ele alınmıştır. Hidrofobik membran filtre yönteminin birkaç gıda çeşidinde daha yüksek geri kazanma oranı vermesine rağmen, her iki membran yöntemi sonuçları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur. Ancak bu iki yöntem, çalışılan gıda örneklerinin çoğunda EMS yöntemine kıyasla önemli ölçüde, yüksek geri kazanma değerleri vermiştir (Sharpe, et al., 1983).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çiğ süt örnekleri

Bu çalışmanın birinci aşamasında, Ankara'nın değişik semtlerindeki sokak sütçülerinden sağlanan 50 çiğ süt örneği incelemeye alınmıştır. Bunlardan doğal olarak Escherichia coli ile kontamine olduğu bir ön deneme ile belirlenen 23 örnek araştırmanın materyalini oluşturmuştur.

Çiğ süt örnekleri daha önce 170 °C'de 2 saat kuru havada sterilize edilen metal kapaklı cam kavanozlara aseptik koşullarda alınarak hemen H.Ü.Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarına getirilmiştir.

3.1.2. Dondurulmuş et örnekleri

Çalışmanın ikinci aşamasında incelemeye alınan dondurulmuş et örnekleri, Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü Ankara Et Kombinası'nın donmuş et depoları ile, yine bu kurumun Hacettepe Üniversitesi Kafeteryası'na pazarladığı, donmuş etlerin saklandığı kafeteryadaki donmuş et depolarından sağlanmıştır. Her biri farklı karkaslardan aseptik koşullarda alınan 33 dondurulmuş et örneği yine aseptik koşullarda, önceden sterilize edilen metal kapaklı uygun cam kavanozlara aktarılarak hemen H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarına getirilmiştir. Bir ön deneme ile, doğal olarak E.coli ile kontamine olduğu belirlenen 22 örnek araştırmanın bu aşamasındaki materyalini oluşturmuştur.

3.1.3. Saf E.coli kültürlerinden hazırlanan stres olmayan ve stres E.coli formları

Çalışmanın üçüncü aşamasında donmuş et örneklerinden izole edilip, belirli bazı biyokimyasal ve fizyolojik nitelikleri saptanmış olan on farklı E.coli kültürü ile çalışılmıştır. Bu saf E.coli kültürlerinin her birinden ayrı ayrı hazırlanan stres olmayan ve stres E.coli formları bu aşamadaki materyali oluşturmuştur.

3.1.4. Nuflow sellüloz asetat membran filtre kağıtları

Bu araştırmadaki sayım yöntemlerinden birisi olan "Modifiye Direkt Plaka Yöntemi" de kullanılan Nuflow sellüloz asetat membran filtre kağıtları (çap; 85 mm ve gözenek ölçüsü; 450 nm) Oxoid firmasından sağlanmıştır (Holbrook, et al., 1980).

3.1.5. U.V. lambası

Modifiye Direkt Plaka yönteminde, membran yüzeyinde oluşan koloni renklerinin sabitleştirilmesi ve gerektiğinde membranların referans olarak kullanılması amacıyla, direkt güneş ışığından yararlanılamayan günlerde 366 nm'de çalışabilen U.V. lambası (Universal U.V.lamp-CAMAG) kullanılmıştır (Rayman, et al., 1979; Holbrook, et al., 1980).

3.1.6. Denemelerde kullanılan besiyerleri, dilüsyon sıvıları ve çözeltiler

Bu çalışmada, uygulanan yöntemlerde kullanılan tüm besiyerleri, dilüsyon sıvıları ve çözeltilerin bileşimleri

ve hazırlanışları toplu halde Ek-A'da verilmiştir. Bu nedenle anlatımlarda yalnızca isimleri belirtilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Çiğ süt örneklerinin analize hazırlanması

Bölüm 3.1.1.'de açıklandığı şekilde alınan ve laboratuvara getirilen çiğ süt örneklerinin doğal olarak E.coli ile kontamine olanlarının belirlenebilmesi için, örnekler bir ön denemeden geçirilmişlerdir (Warseck et al., 1973).

Bu amaçla örneklerin tamponlu peptonlu su içerisinde uygun dilüsyonları hazırlandıktan sonra, sterilize edilip yaklaşık 44 - 46 °C'ye kadar soğutulmuş TSA (Triptik Soy Agar) besiyeri kullanılarak dökme plaka yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. 35 °C'de 2 saatlik bir ön inkübasyon aşamasından sonra, besiyerinin yüzeyi eşit miktarda steril VRBA (Violet Red Bile Agar) besiyeri ile kaplanmıştır (Powers and Latt, 1979). 45.5 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda, kültürlerin incelenmesiyle doğal olarak E.coli ile kontamine olduğu belirlenen örnekler esas denemeye alınmışlardır.

Ön denemede ekimleri gerçekleştirilen örnekler esas denemenin yapılacağı bir sonraki güne kadar 0 - 5 °C'de buzdolabında saklanmışlardır. Esas denemeye alınan örneklerden steril bir pipet ile 10 ml alınarak içerisinde 90 ml steril tamponlu peptonlu su bulunan erlene akta-

rılmıştır. Böylece elde edilen 10^{-1} dilüsyonu kullanılarak diğer dilüsyonlara geçilmiştir. Çiğ süt örneğinden 10^{-1} - 10^{-9} arasında hazırlanan dilüsyonlar kullanılarak bölüm 3.2.6'da verilen altı farklı E.coli sayım yöntemine göre ekimlere geçilmiştir. İncelemeye alınan her dilüsyon, her bir yöntemde üç paralel olarak çalışılmıştır.^x

3.2.2. Dondurulmuş et örneklerinin analize hazırlanması.

Bölüm 3.1.2'de belirtildiği şekilde alınan ve laboratuvara getirilen dondurulmuş et örneklerinin doğal olarak E.coli ile kontamine olanlarının belirlenebilmesi için, her bir kavonozdaki donmuş etden alınan örneklerin önce 0 - 5 °C de buzdolabında çözümleri sağlanmıştır. Bu örnekler, kaynar su ve alkol kullanılarak temizlenen ve dezenfekte edilen kıyma makinasından geçirilerek homojen hale getirilmiştir. Daha sonra, örneklerin her biri ayrı ayrı steril petrilere alınmışlardır. Et örneklerinin herbirinden, aseptik koşullarda 10g tartılarak, içerisinde steril cam boncuklar ve 90 ml tamponlu peptonlu su bulunan erlenlere aktarılmışlardır. Böylece

x Çalışılan yöntemler içerisinde "Modifiye Direkt Plaka Yöntemi" olarak belirtilen ve yurtdışından getirilen Nuflow sellüloz asetat membran filtre kağıtlarının kullanımını gerektiren sayım yöntemi, bu membranların sayısının üç paralel çalışmaya yetmemesi nedeni ile iki paralel olarak çalışılmıştır.

elde edilen 10^{-1} dilüsyonundan sonra diğer dilüsyon - lara geçilmiştir. Örnek dilüsyonları bölüm 3.2.1'de çiğ süt için belirtildiği şekilde bir ön denemeden geçirilmiş ve böylece doğal olarak E.coli ile kontamine olan dondurulmuş et örnekleri belirlenmiştir.

Ön deneme için ekimleri gerçekleştirilen örnekler denemenin yapılacağı bir sonraki güne kadar $0 - 5^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmışlardır. Esas denemeye alınan örnek - lere ön denemede açıklanan bir seri işlem uygulanmış ve $10^{-1} - 10^{-9}$ arasında hazırlanan örnek dilüsyonları bölüm 3.2.6'da verilen altı farklı E.coli sayım yöntemi için kullanılmıştır. İncelemeye alınan her dilüsyon çiğ süt örneklerinde olduğu gibi her bir yöntemde üç paralel olarak çalışılmıştır.

3.2.3. Dondurulmuş et örneklerinden E.coli suşlarının izolasyonu ve saf kültürlerin elde edilmesi

Araştırmanın üçüncü aşamasında, saf E.coli kültürleri ile yapılan çalışma için, dondurulmuş et örneklerinden E.coli suşlarının izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bölüm 3.2.6.1'de açıklanan ve AOAC'nin (Association of Official Analytical Chemists) EMS (En Muhtemel Sayı) yönteminde kullanılan, dondurulmuş et örneklerine ait EMB (Eosine Methylene Blue) agar besiyerinde üreyen yeşil metalik pırıltı veren tipik kolonilerden EMB agar besiyerine tek koloni düşürme yöntemi ile sürme ekimleri yapılmıştır. 35°C 'da 24 saat inkübasyon sonunda tipik özellik gösteren kolonilerden tüpteki yatık

PCA (Plate Count Agar) besiyerine aktarmalar yapılmıştır. 35 °C'deki 24 saat inkübasyon sonunda izolasyon gerçekleştirilmiş ve saf E.coli kültürleri elde edilmiştir. Bu kültürler daha sonra kullanılmak üzere buzdolabında saklanmışlardır. Kültürlerden ayda bir kez yatık PCA besiyerine aktarmalar yapılarak yenilenmeleri sağlanmıştır.

3.2.4. Saf E.coli kültürlerinin bazı niteliklerinin saptanması

3.2.4.1. Gram reaksiyonu

Gram reaksiyonlarının belirlenebilmesi amacıyla, yatık PCA besiyerindeki 18-24 saatlik kültürlerden hazırlanan preparatlara Hucker'in modifiye gram boyama yöntemi uygulanmıştır (Anonymous, 1978 a).

3.2.4.2. Indol testi

Bu test için yatık PCA besiyerindeki 18-24 saatlik kültürlerden Tryptone Broth besiyerine ekim yapıldıktan sonra tüpler 35 °C'de 24 ± 2 saat inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda indol oluşumunu saptamak için her bir tüpe 0.2 - 0.3 ml Kovacs'ın indol ayıracı damlatılmıştır. Tüpteki kültür sıvısının üst tabakasında kırmızı renk oluşumu indol pozitif olarak değerlendirilmiştir (Anonymous, 1984 b).

3.2.4.3. Metil red testi

Metil red testi için yatık PCA besiyerindeki 18-24 saatlik kültürlerden tüpteki Glukoz Fosfat Broth besiyerine ekim yapılmıştır. 35 °C'de 48 ± 2 saatlik inkübasyon sonucunda tüplere metil red çözeltisinden 5'er damla damlatılmıştır. Tüpteki kültür sıvısında kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Anonymous,1984 b).

3.2.4.4. Voges - Proskauer testi

Yatık PCA besiyerindeki 18-24 saatlik kültürlerden Glukoz Fosfat Broth besiyerine ekim yapılmış ve tüpler 35 - 37 °C'de 48 ± 2 saat inkübe edilmişlerdir. Her tüpe 1 ml kültür için % 5'lik α - naftol çözeltisinden 0.6 ml ve % 40'lik potasyumhidroksit çözeltisinden 0.2 ml ilave edilip karıştırılmış ve iki saat beklenmiştir. Tüplerdeki kültür sıvısında, süre sonunda pembe renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Anonymous,1984 b).

3.2.4.5. Sodyum sitrat testi

Bu test için Simmons Sitrat Agar besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinin yatık yüzeyine ekim yapıldıktan sonra, tüpler 35 - 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda besiyeri renginin maviye dönmesi pozitif, renkte herhangi bir değişim olmaması ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Anonymous, 1978 a).

3.2.4.6. LST (Lauril Sülfat Triptoz) Broth besiyerinde gaz oluşumu testi

Bu test için yatık PCA besiyerindeki 18-24 saatlik kültürlerden durham tüplü LST broth besiyerine ekimler yapılmıştır. 35 °C'de 48 ± 2 saatlik inkübasyon sonucunda durham tüplerinde gaz oluşumu incelenmiştir. Gaz oluşumu görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Anonymous, 1984 b).

3.2.4.7. Hareket testi

Hareket testi kültürlerin Nutrient Broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat inkübasyonundan sonra asılı damla yöntemi ile saptanmıştır (Harrigan and McCance, 1976).

IMViC (I:İndol, M:Metil Red ; V: Voges-Proskauer; C: Sitrat) testlerinden alınan sonuçlar Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de verilen biyokimyasal sınıflandırma tablolarına göre değerlendirilmiştir (Anonymous, 1978 a; Mehlman and Romero, 1982).

Çizelge 3.1 : Koliformların Ayrımı^x (Anonymous, 1978 a)

	44-45.5°C'de				
	Laktoz safra-tuz besiyerinde gaz	İndol testi	Metil Red testi	Voges- Proskauer testi	Sitrat testi
<u>Escherichia coli</u>					
Biyotip I (Tipik)	+	+	+	-	-
Biyotip II	-	-	+	-	-
<u>Ara tipler</u>					
Tip I	-	-	+	- ¹	+
Tip II	-	+	+	- ¹	+
<u>Enterobacter aerogenes</u>					
Tip I	-	-	-	+	+
Tip II	-	+	-	+	+
<u>Enterobacter cloacae</u>					
	-	-	-	+	+
<u>Düzensiz tipler</u>					
Tip I	-	+	+	-	-
Tip II	+	-	+	-	-
Tip VI	+	-	-	+	+
Düzensiz diğer tipler	Değişken Reaksiyonlar				

x : Bu mikroorganizmaların hepsi, 35-37 °C'de 48 saat içerisinde laktozdan asit ve gazoluşturma yeteneğindedirler.

1 : Seyrek olarak zayıf bir pozitif reaksiyon verdikleri bulunmuştur.

Çizelge 3.2 : E.coli'nin yakın diğer Enterobacteriaceae üyelerinden ayrımı (Mehlman and Romero, 1982).

Kültür	IMVIC	37°C'de		Glukoz	Lak-Manni-	Sorbi-	Sello-	Malo-	Ado-	Üre
		Hareket	Sitokrom-							
Tipik										
E.coli	+++	+	-	+	+	+	-	-	-	-
İnaktif										
E.coli	+++	-	-	-	+	-	-	-	-	-
E.blattae	+++	-	-	+	-	-	-	+	-	-
E.fergusonii	+++	-	-	+	+	-	+	-	+	-
E.ewingii	+++	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Plesiomonas shigelloides	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Klebsiella, Taxon 53	+++	-	-	-	+	-	+	+	+	+
Klebsiella Taxon 62	+++	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Klebsiella Taxon 68	+++	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Hafnia alvei	+++	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Aeromonas drophila	+++	+	-	+	+	+	+	-	-	-

3.2.4.8. Diğer testler

Dondurulmuş etlerden izole edilen saf E.coli kültürlerine, glukoz, laktoz, mannitol, üre, lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz, arjinin dihidrolaz testleri de uygulanmıştır. Bu testler Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir (Faddin, 1980).

3.2.5. Saf E.coli kültürlerinden stres olmayan ve stres E.coli formlarının hazırlanması

Stres olmayan ve stres formların hazırlanabilmesi için bölüm 3.2.3 ve bölüm 3.2.4'de belirtildiği gibi elde edilen ve bazı nitelikleri belirlenen on adet saf E.coli kültüründen yararlanılmıştır.

Bu amaçla yatık PCA besiyerinde geliştirilen kültürlerden önce TSB (Tryptic Soy Broth) besiyerine aktarma yapılmıştır. 35 - 37 °C'de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen kültürler stres olmayan E.coli formları olarak değerlendirilmişlerdir. Bu kültürlerden steril bir pipetle 1 ml alınarak içerisinde 9 ml tamponlu pepton suyu bulunan tüpe aktarma yapılmış ve böylece stres olmayan E.coli formlarının 10^{-1} dilüsyonu elde edilmiştir. Buradan yine tamponlu pepton suyu kullanılarak diğer dilüsyonlara geçilmiştir. Bu arada geriye kalan TSB besiyerindeki kültür hemen -20 °C'de deep freeze'e (Seaars Cold Spot) alınarak, 24 saat süreyle dondurulmuş ve bu kültürler stres E.coli formları olarak değerlendirilmişlerdir (Ray and Speck, 1972 ; Warseck, et al., 1973; Speck et al., 1975).

Stres olmayan formların 10^{-1} - 10^{-9} arasında hazırlanan dilüsyonları kullanılarak, bunların TSA (Tryptic Soy Agar) besiyerine dökme plaka yöntemi ile ekimleri yapılmış ve 45.5°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda, bu dilüsyon örneklerine bölüm 3.2.6. da belirtilen altı farklı E.coli sayım yöntemi de ayrıca uygulanmıştır. İncelemeye alınan her dilüsyon, her bir yöntemde üç paralel olarak çalışılmıştır. TSA besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilen sayım sonuçları referans olarak kabul edilmiştir (Speck, et al., 1975 ; Powers and Latt, 1979).

-20°C 'de 24 saat dondurularak hazırlanan stres E.coli formları $0-5^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında çözündürülmüştür. Bu stres formlardan tamponlu peptonlu su kullanılarak, 10^{-1} - 10^{-8} arasında hazırlanan dilüsyonlara stres olmayan forma uygulanan tüm işlemler ve yöntemler aynen uygulanmıştır. TSA besiyerinde, 24 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen sayım sonuçları yine referans olarak kabul edilmiştir.

3.2.6. Denemelerde kullanılan E.coli sayım yöntemleri

Bu çalışmada, bölüm 3.2.1 ile 3.2.2. de belirtilen gıda maddelerindeki E.coli sayımı ile dondurulmuş et örneklerinden izole edilen saf E.coli kültürlerinden yararlanılarak hazırlanan stres olmayan ve stres E.coli formlarının sayımı için, altı farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler sırasıyla aşağıda açıklanmıştır.

3.2.6.1. AOAC'nin En Muhtemel Sayı Yöntemi

Bu çalışmada sayım yöntemlerinden birisi olarak AOAC'nin EMS yöntemi kullanılmıştır (Silliker, 1982; Anonymous, 1984 b).

Bu yöntemde bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'de açıklandığı şekilde hazırlanan gıda maddeleri ile bölüm 3.2.5'de belirtilen stres olmayan ve stres E.coli kültürlerinin seçilen üç dilüsyonunun herbirinden üçer tane olmak üzere durham tüplü LST (Lauril Sülfat Triptoz) broth besi yerine ekimleri yapılmıştır. Tüpler 35 °C'de inkübasyona alınmış ve 24 ile 48 saat aralıklarla gaz oluşumu yönünden incelenmiştir. Gaz oluşumu gözlenen tüplerden, standart (3 mm) bir öze yardımı ile durham tüplü EC (Escherichia coli) broth besiyerine aktarmalar yapılmıştır. Tüpler 45.5 °C'de inkübe edilmiş ve 24 ile 48 saat aralıklarla gaz oluşumu yönünden gözlenmişlerdir. Bu süreler sonunda durham tüplerinde gaz oluşumu saptanan tüplerden EMB agar besiyeri içeren petrilere standart bir öze kullanarak tek koloni düşürme tekniğiyle sürme yapılmıştır. Petriler 35 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda incelenmiş ve tipik özellik gösteren kolonilerden tüpteki yatık PCA besiyerine ekimler yapılmıştır. 35 °C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra, bu kültürlerin biyokimyasal tanımlamaları için kültürlere bölüm 3.2.4'de verilen IMVIC testleri ile LST broth besiyerinde gaz oluşumu testi uygulanmıştır (Anonymous, 1984 b). Kültürler ayrıca, bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı şekilde gram reaksiyonları

yönünden incelenmişlerdir.

IMVIC test sonuçları (++) ya da (- + --) olan ve LST broth besiyerinde 35 °C'de 48 ± 2 saatlik inkübasyon bitiminde gaz oluşturan, gram (-) kısa çubuk şeklindeki basiller E.coli olarak değerlendirilmişlerdir (Anonymous, 1984 b).

İncelenen örneğin ml'si ya da gramındaki E.coli sayısı ise, EMS tablosundan yararlanılarak; EC broth besiyerinde gaz oluşumu saptanan ve IMVIC testleriyle tanımlanan dilüsyonlar esas alınarak hesaplanmıştır.

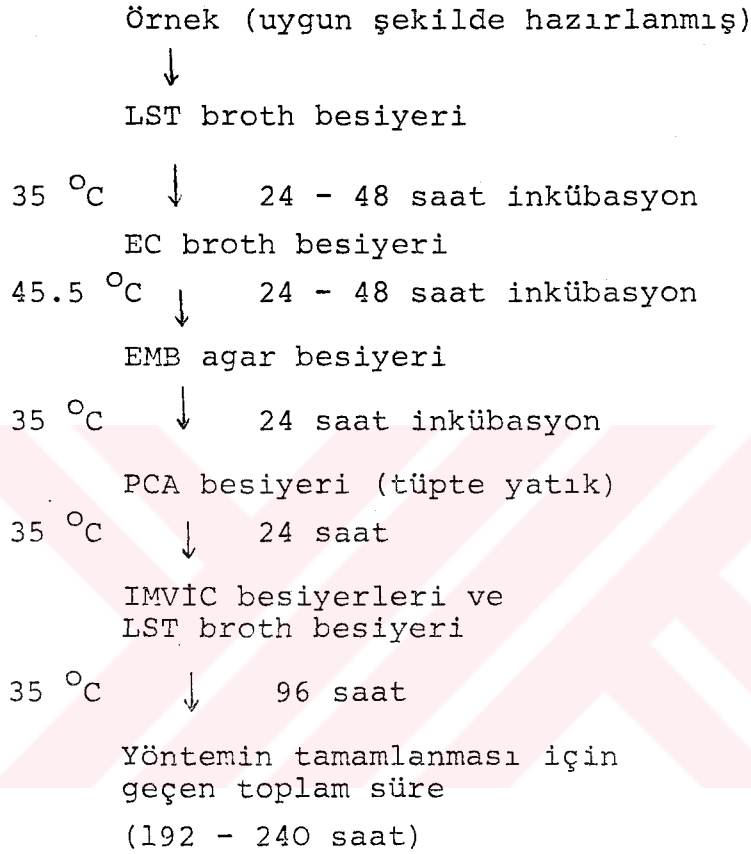
Kullanılan EMS tablosu Çizelge 3.3'de verilmiştir (Anonymous, 1984 b).

Çizelge 3.3 : EMS değerlendirme tablosu (Anonymous, 1984 b).

Pozitif Tüpler			Pozitif Tüpler			Pozitif Tüpler			Pozitif Tüpler		
O.1	O.O1	O.OO1 EMS	O.1	O.O1	O.OO1 EMS	O.1	O.O1	O.OO1 EMS	O.1	O.O1	O.OO1 EMS
0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	0	23
0	0	1	1	0	1	7.2	2	0	1	14	39
0	0	2	1	0	2	11	2	0	2	20	64
0	0	3	1	0	3	15	2	0	3	26	95
0	1	0	1	1	0	7.3	2	1	0	15	43
0	1	1	1	1	1	11	2	1	1	20	75
0	1	2	1	1	2	15	2	1	2	27	120
0	1	3	1	1	3	19	2	1	3	34	160
0	2	0	1	2	0	11	2	2	0	21	93
0	2	1	1	2	1	15	2	2	1	28	150
0	2	2	1	2	2	20	2	2	2	35	210
0	2	3	1	2	3	24	2	2	3	42	290
0	3	0	1	3	0	16	2	3	0	29	240
0	3	1	1	3	1	20	2	3	1	36	460
0	3	2	1	3	2	24	2	3	2	44	1100
0	3	3	1	3	3	29	2	3	3	53	>1100

AOAC'nin EMS yöntemi kısaca Çizelge 3.4'de görüldüğü gibi şematize edilebilir (Silliker, 1982).

Çizelge 3.4 : AOAC'nin EMS yöntemi (Silliker, 1982)



3.2.6.2. Modifiye direkt plaka yöntemi

Çalışmada, diğer bir sayım yöntemi olarak Modifiye Direkt Plaka Yöntemi kullanılmıştır. (Holbrook, et al., 1980).

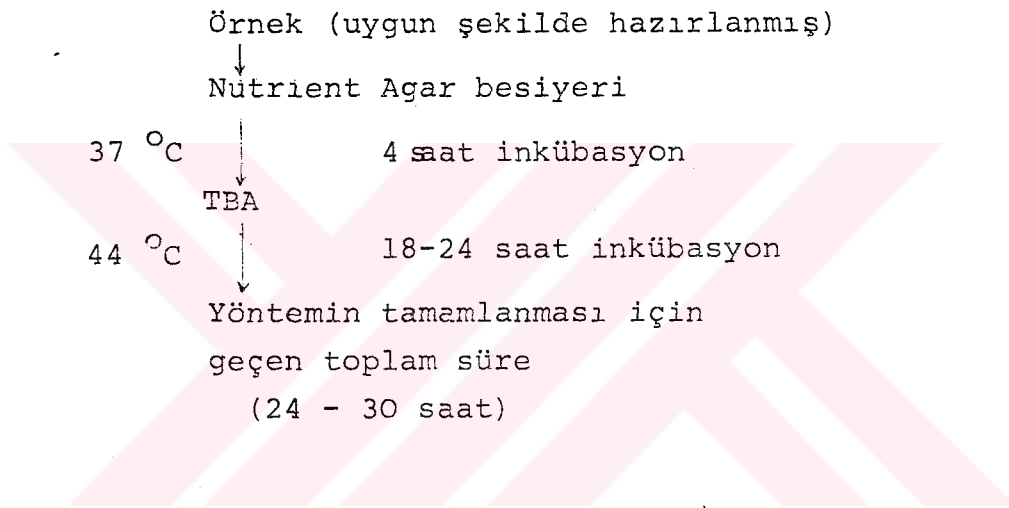
Bu yöntem Anderson ve Baird-Parker (1975), tarafından geliştirilen direkt plaka yönteminin bir modifiye şeklidir. Yöntemde, daha önce hazırlanmış ve sterilize edilmiş Nutrient Agar besiyeri, çapı 9 cm olan steril petri kutularına 12-15 ml miktarlarda dağıtılmıştır. Petrideki besiyerlerinin yüzeyleri etüvde kurutulmuştur. Bu besi-

yerlerinin kuru yüzeylerine, önceden aliminyum folyo - lara sarılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiş olan Nuflow sellüloz asetat membran filtre kağıtları, aseptik koşullarda steril bir pens yardımıyla orjinal paketlerindeki yüzleri üste gelecek şekilde yerleştirilmişlerdir. Membran filtre kağıdı ve besiyerinin yüzeyi arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'de açıklandığı şekilde hazırlanan gıda maddeleri ve bölüm 3.2.5'de belirtilen kültürlerin çalışılan dilüsyonlarından steril bir pipetle 1'er ml membranların yüzeyine aktarılmıştır. Steril cam çubuklar yardımı ile örneğin yüzeyde homojen dağılımı sağlandıktan sonra, petriler 15-30 dakika bekletilerek örneğin membran filtre kağıtları tarafından absorbe edilmesi sağlanmıştır. Petriler 37 °C'de 4 saatlik bir ön inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda, membranlar aseptik koşullarda steril bir pens yardımı ile, daha önceden hazırlanmış, petrilere dökülmüş ve yüzeyleri etüvde kurutulmuş olan TBA (Tryptone Bile Agar) besiyerine yüzeyle membranlar arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde aktarılmışlardır. Petriler 44 °C'de 18-24 saat inkübe edilmişlerdir. Inkübasyon süresi sonunda membranlar, içerisinde 1-2 ml modifiye Kovacs indol ayıracı (Anderson ve Baird - Parker, 1975) aktarılmış petri kutusu kapaklarına yerleştirilmişlerdir. Direkt güneş ışığı ya da U.V. lambası altında yaklaşık 5-20 dakika içerisinde kırmızı-pembe renge dönüşen koloniler indol pozitif olarak değerlendirilmişlerdir. Bu koloniler sayılarak dilüsyon

faktörü ile çarpılmış ve sonuç E.coli/g gıda maddesi, E.coli/ml gıda maddesi ya da E.coli/ml kültür sıvısı olarak verilmiştir.

Yöntem kısaca Çizelge 3.5'de görüldüğü gibi şematize edilebilir (Silliker, 1982).

Çizelge 3.5 : Modifiye direkt plaka yöntemi (Silliker, 1982).



3.2.6.3. Triptik Soy Agar/Violet Red Bile Agar dökme plaka yöntemi

Powers ve Latt (1979), tarafından önerilen TSA/VRBA (Triptik Soy Agar/Violet Red Bile Agar) dökme plaka yöntemi, araştırmanın diğer bir sayım yöntemini oluşturmuştur.

Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2 'de açıklandığı şekilde hazırlanan gıda maddeleri ile bölüm 3.2.5'de belirtilen stres olmayan ve stres E.coli kültürlerinin seçilen dilüsyonlarından 1'er ml steril petri kutularına aktarılmış ve

üzerlerine daha önceden sterilize edilmiş 44-46 °C'ye kadar soğutulmuş TSA besiyerinden 12-15 ml dökülerek homojen karışımları sağlanmıştır. Petriler 35 °C'de 2 saat bir ön inkübasyona alındıktan sonra, yüzeyleri 12-15 ml miktarlarda sterilize edilip soğutulmuş olan VRBA besiyeri ile kaplanmıştır. Besiyerinin katılaşması beklendikten sonra petriler 45.5 °C'de 24 ± 2 saat inkübasyona alınmışlar ve bu süre sonunda tipik koloni oluşumu yönünden incelenmişlerdir. Koyu kırmızı ya da pembe renkli, çapları 0.5 mm veya daha büyük olan ve çevrelerinde safra reaksiyonundan kaynaklanan bir zon oluşmuş koloniler tipik koloniler olarak tanımlanmış ve sayılmışlardır (Anonymous, 1978 a). Sayımda, 30-300 arasında koloni içeren petriler değerlendirmeye sokulmuştur (Harrigan and McCance, 1976). Sayımın yapıldığı petrilerde üreyen tipik koloniler, E.coli tanımlamasının yapılabilmesi amacı ile Harrison's disk yöntemi^x aracılığı ile seçilmiş ve izole edilmişlerdir. (Harrigan and McCance, 1976). Disk yardımı ile saptanan kolonilerin herbirinden yatık PCA besiyerine ekimler yapılmış ve bunlar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. Elde edilen bu kültürlerin gram reaksiyonları saptanmış ve kültürlerden biyokimyasal tanımlamalar için IMViC testlerine geçilmiştir.

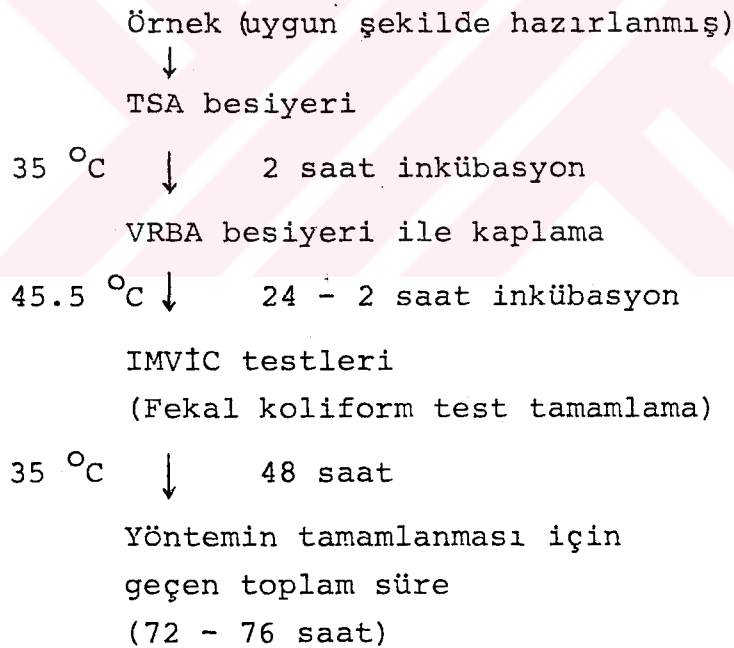
x Harrison disk, mikrobiyal kolonilerin incelenmesi ve sayımı için istatistiksel bir yöntem olup, ilgili şekil Ek-B'de verilmiştir.

Bu testler daha önce bölüm 3.2.4'de belirtildiği şekilde uygulanmış ve değerlendirilmiştir.

TSA/VRBA dökme plaka yönteminde sayım sonuçları, seçilen dilüsyonlar dikkate alınarak E.coli/g gıda maddesi, E.coli/ml gıda maddesi ya da E.coli/ml kültür sıvısı olarak verilmiştir.

Yöntem kısaca aşağıdaki şekilde şematize edilebilir (Powers and Latt, 1979).

Çizelge 3.6 : TSA/VRBA dökme plaka yöntemi (Powers and Latt, 1979).



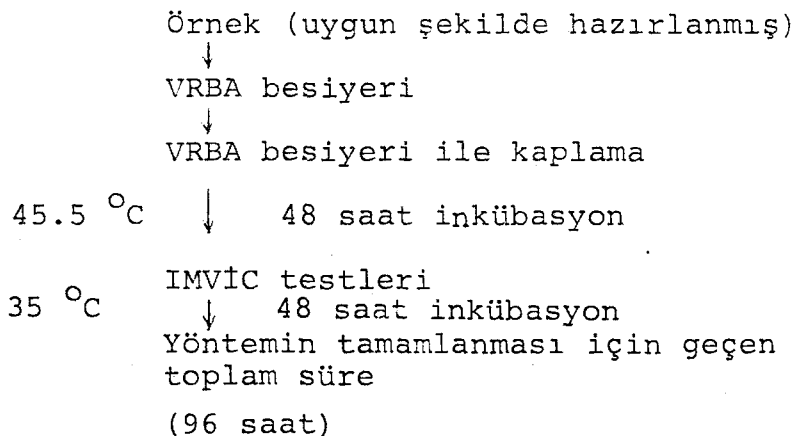
3.2.6.4. Violet Red Bile Agar dökme plaka yöntemi

Bu direkt plaka yönteminde, bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'de açıklandığı şekilde hazırlanan gıda maddeleri ile bölüm 3.2.5'de belirtilen stres olmayan ve stres E.coli kül-

türlerinin seçilen dilüsyonlarından 1'er ml steril petri kutularına aktarılmıştır. Sterilize edilip 44 - 46 °C'ye kadar soğutulmuş VRBA besiyerlerinden, petrideki örnekler üzerine dökülerek homojen karışımları sağlanmıştır. Besiyerinin katılaşması beklendikten sonra yüzeyi yaklaşık 12-15 ml kadar steril VRBA besiyeri ile kaplanmıştır. Petriler 45.5 °C de 48 saat inkübe edilmişler ve süre sonunda bölüm 3.2.6.3'de belirtilen tipik özellikleri taşıyan koloniler sayıma alınmışlardır. Harrison's disk yöntemi yardımıyla seçilen ve izole edilen kolonilere IMVIC testleri uygulanarak biyokimyasal tanımlamaya geçilmiştir. IMVIC testleri ve gram reaksiyonları bölüm 3.2.4'de belirtildiği şekilde yapılmış ve değerlendirilmiştir. Sonuçlar, seçilen dilüsyon örnekleri dikkate alınarak E.coli/g gıda maddesi, E.coli/ml gıda maddesi ya da E.coli/ml kültür sıvısı olarak verilmiştir.

Yöntem Çizelge 3.7'de görüldüğü gibi özetlenebilir (Powers and Latt, 1979).

Çizelge 3.7 : VRBA dökme plaka yöntemi (Powers and Latt, 1979).



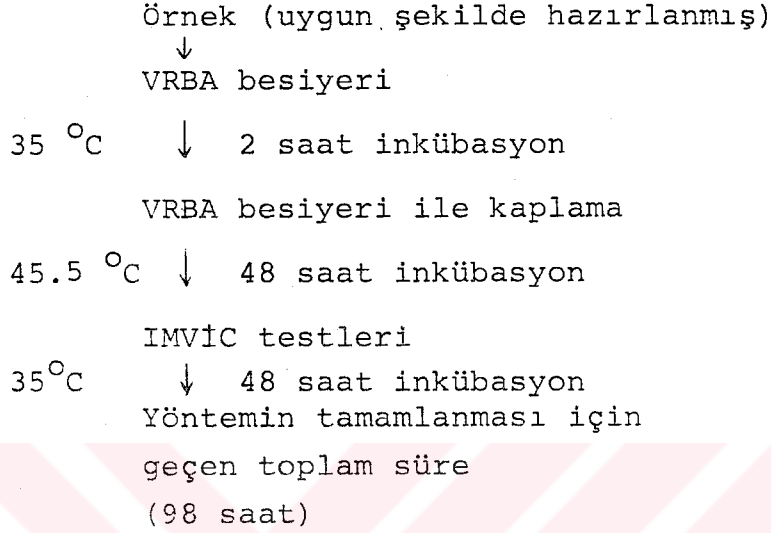
3.2.6.5. Modifiye VRBA dökme plaka yöntemi

Bölüm 3.2.6.3'de belirtilen TSA/VRBA dökme plaka yönteminde bazı durumlarda kolonilerin tipik tanımlamasının her zaman yapılamadığı bildirilmektedir (Powers and Latt,1979). Bu durum dikkate alınarak tipik kolonilerin daha iyi gözlenebildiği VRBA besiyerini kullanan ve bir ön inkübasyon aşamasını içeren direkt plaka yöntemi tasarlanmış ve denemeye sokulmuştur.

Yöntemde bölüm 3.2.1 ve 3.2.2.'de belirtildiği gibi hazırlanan gıda maddeleri ile bölüm 3.2.5'de belirtilen stres olmayan ve stres E.coli kültürlerinin seçilen dilüsyonlarından 1'er ml steril petri kutularına aktarılmıştır. Daha sonra petrilere, sterilize edilip 44-46 °C'ye soğutulmuş VRBA besiyerinden 12-15 ml miktarlarda aktarılarak ekimler gerçekleştirilmiştir. Petrilere 35 °C'de 2 saat ön inkübasyona bırakılmışlar ve bu süre sonunda besiyerinin yüzeyi yaklaşık aynı miktarda VRBA besiyeri ile kaplanmıştır. 45.5 °C'de 48 saatlik inkübasyon sonunda 30-300 koloni içeren petrilere tipik koloniler sayıma alınmışlardır. Harrison's disk yöntemi ile seçilen ve izole edilen kolonilerden biyokimyasal tanımlama için IMVIC testlerine ve gram reaksiyonu testine geçilmiştir. Bu testler bölüm 3.2.4'de belirtildiği şekilde uygulanmış ve değerlendirilmiştir. Sonuçlar, çalışılan dilüsyon örnekleri dikkate alınarak E.coli/g gıda maddesi, E.coli/ml gıda maddesi ya da E.coli/ml kültür sıvısı olarak verilmiştir.

Yöntem şematik olarak Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8 : Modifiye VRBA dökme plaka yöntemi



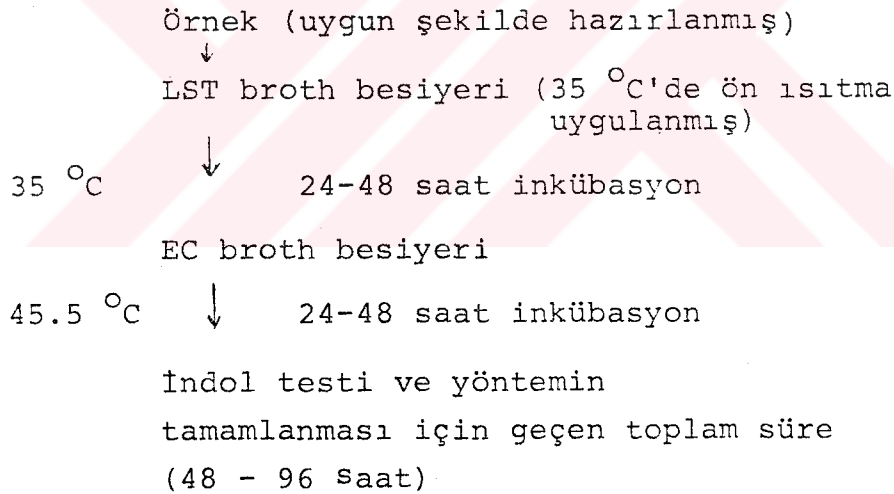
3.2.6.6. Modifiye EMS yöntemi

AOAC'nin EMS yönteminin gerçekleşmesi için geçen toplam süreyi azaltmak amacıyla tasarlanmış olan modifiye EMS yöntemi bu çalışmanın diğer bir sayım yöntemini oluşturmuştur.

Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'de açıklandığı şekilde hazırlanan gıda maddeleri ile bölüm 3.2.5'de belirtilen stres olmayan ve stres E.coli kültürlerinin seçilen dilüsyonlarının herbirinden üçer tane olmak üzere, içinde durham tüpü bulunan LST broth besiyerlerine 1'er ml aktarılmıştır. Durham tüplü LST broth besiyerleri daha önce etüvde 35 °C'de bir ön ısıtmaya tabi tutulmuşlardır. Tüpler 35 °C'de 24 - 48 saat inkübe edilmişler ve 24. ve 48. saatlerde gaz oluşumu yönünden incelenmişlerdir.

Gaz oluşumu gözlenen tüplerden standart bir öze ile durham tüplü EC broth besiyerini içeren tüplere aktarmalar yapılmış ve tüpler 45.5 °C'de 24-48 saat inkübe edilmişlerdir. Süre sonunda gaz oluşumu saptanan tüplere Kovacs ayırıcı damlatılarak, tüpler indol oluşumu yönünden incelenmiştir. İncelenen örneğin ml'sindeki ya da gramındaki E.coli sayısı, EMS tablosundan yararlanılarak ve EC broth besiyerinde gaz oluşumu saptanan ve indol pozitif sonuç veren dilüsyonlar esas alınarak hesaplanmıştır. Yöntemin şematize şekli Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9 : Modifiye EMS yöntemi



3.2.7. Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel yöntemler

Çalışmadan elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde, lineer regresyon/korelasyon analizi ve Bonferroni çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (Miller, 1966; Schafer and Macready, 1975; Ertek, 1982; Şanlıtürk, 1986).

4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Çiğ süt örneklerine ilişkin sayım sonuçları

Araştırmada 50 çiğ süt örneği incelenmiş, bunlardan 23'ünün doğal olarak Escherichia coli kontamine olduğu saptanmıştır. Bu 23 çiğ süt örneğine, altı farklı E.coli sayım yönteminin uygulanması ile alınan sayım sonuçları ile bunların hesaplanan logaritma değerleri Çizelge 4.1 ve 4.2'de ayrı ayrı verilmiştir.

23 çiğ süt örneğine ait, altı farklı yöntemle alınan sayım sonuçları $36-42 \times 10^6$ E.coli/ml arasında değişmektedir.

Sayım sonuçlarının logaritma değerleri esas alınarak hesaplanmış olan, yöntemlerin karşılaştırılmasında kullanılan istatistiksel parametrelere ilişkin özet bilgiler Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3'ün incelenmesinden anlaşılacağı gibi, yöntemler genelinde, sayım sonuçlarının ortalama logaritma değerleri 3.9906 ile 4.4398 arasında değişmekte olup, toplam 138 gözlem sonucunun ortalaması 4.1950 ' dir. Standart sapma değerleri ise, modifiye direkt plaka yöntemine ait 0,9159 ve modifiye EMS yöntemine ait 1.6378 değerleri arasında değişmektedir. Toplam 138 gözlemin kitle ortalaması güven aralığı ise (α : 0.05) ; $4.0969 < \mu < 4.2930$ olarak bulunmuştur.

İlk aşamada her bir yöntem, lineer regrasyon/korelasyon analizi kullanılarak birbirleri ile karşılaştırılmışlardır (Ertek, 1982). Karşılaştırılan yöntemler arasındaki doğrusal bağıntıyı açıklayan matematiksel ifadeler çıkarılmış ve r ile gösterilen korelasyon katsayıları hesaplanmıştır.

Yöntemler arası korelasyon katsayılarına ilişkin değerler toplu olarak Çizelge 4.4'de verilmiştir.



Çizelge 4.1 : Çiğ süt örneklerinden elde edilen sayım sonuçları (E.coli/ml) x

ÖRNEK No	Sayım Yöntemleri xx						
	AOAC/EMS	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS	
1	2 900	17 500	2 800	2 960	3 530	2 900	
2	2 100	22 700	196 000	74 000	58 000	2 900	
3	280	20 600	1 130	1 186	8 930	21 000	
4	21 000	24 550	12 060	11 750	546 000	110 000	
5	210 000	435 000	600 000	625 000	3 560	110 000	
6	110 000	8 000	3 600	3 630	1 750	21 000	
7	21 000	5 650	3 550	2 030	55	36	
8	110	440	720	64	486 000	42 000	
9	21 000 000	320 000	463 000	636 000	22 600	20 000	
10	9 200	16 750	20 500	23 700	113 000	53 000	
11	13 000	107 000	128 000	118 666	43 000	35 000	
12	2 800	1 320	353	860	55 600	1 100 000	
13	44 000	87 500	16 860	18 300	22 000	53 000	
14	2 000 000	87 500	38 000	47 600	35 000	21 000 000	
15	290 000	16 800	13 600	19 900	22 000	53 000	
16	21 000 000	241 000	34 300	38 000	57 300	21 000 000	
17	29 000	77 500	4 800	5 460	52 300	21 000	
18	5 300 000	117 500	55 000	58 000	74 000	5 300 000	
19	4 400 000	231 000	78 000	72 000	150	4 400 000	
20	200	455	510	460	7 400	1 100	
21	1 100	7 050	8 400	8 550	455	350	
22	420	500	500	570	1 390	2 900	
23	2 900	3 750	1 170	1 310			

(x) Verilen her bir sayım sonucu üç paralel çalışmanın ortalamasıdır. Yalnızca MDP yönteminde iki paralel olarak çalışılmıştır.

(xx) AOAC/EMS : AOAC'nin En Muhtemel Sayı Yöntemi (Anonymous, 1984 b).

MDP : Modifiye Direkt Plaka Yöntemi (Holbrook et al., 1980).

TSA/VRBA : Triptik Soy Agar/Violet Red Bile Agar Dökme Plaka Yöntemi (Powers and Latt, 1979).

VRBA/VRBA: Violet Red Bile Agar /Violet Red Bile Agar Dökme Yöntemi (Powers and Latt, 1979).

MVRBA : Modifiye VRBA Yöntemi.

MEMS : Modifiye EMS Yöntemi.

Çizelge 4.2 : Çiğ süt örneklerinden elde edilen sayım sonuçlarının (E.coli/ml) x Log₁₀ değerleri

ÖRNEK NO	Sayım Yöntemleri ^{xx}					
	AOAC/EMS	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS
1	3.4623	4.2430	3.4471	3.4712	3.5477	3.4623
2	3.2222	4.3560	5.2922	4.8692	4.7634	4.4623
3	2.4471	4.3138	3.0530	3.0740	2.9684	2.5440
4	4.3222	4.3900	4.0813	4.0700	3.9440	4.3222
5	5.3222	5.6384	5.7781	5.7958	5.7371	5.3222
6	5.0413	3.9030	3.5563	3.5599	3.5514	5.0413
7	4.3222	3.7520	3.5502	3.3074	3.2430	4.3222
8	2.0413	2.6434	2.8573	1.8061	1.7403	1.5563
9	7.3222	5.5051	5.6655	5.8034	5.6866	7.6232
10	3.9637	4.2240	4.3117	4.3747	4.3541	4.3010
11	4.1139	5.0293	5.1072	5.0743	5.0530	4.7242
12	3.4471	3.1205	2.5477	2.9344	2.6812	3.3802
13	4.6434	4.9420	4.2268	4.2624	4.6334	4.5440
14	6.3010	4.9420	4.5797	4.6776	4.7450	6.0413
15	5.4623	4.2253	4.1335	4.2988	4.3424	4.7242
16	7.3222	5.3820	4.3552	4.5797	4.5440	7.3222
17	4.4623	4.8893	3.6812	3.7371	4.7581	4.3222
18	6.7244	5.0700	4.7403	4.7634	4.7185	6.7242
19	6.6434	5.3636	4.8920	4.8573	4.8692	6.6434
20	2.3010	2.6580	2.7075	2.6627	2.7041	2.1760
21	3.0413	3.8481	3.9242	3.9319	3.8692	3.0413
22	2.6232	2.6989	2.6989	2.7558	2.6580	2.5440
23	3.4623	3.5682	3.0681	3.1172	3.1430	3.4623

(x) Verilen her bir sayım sonucu üç paralel gelişmanın ortalamasıdır. Yalnızca MDP Yöntemi iki paralel olarak çalışılmıştır.

(xx) AOAC/EMS : AOAC'nin En Muhtemel Sayı Yöntemi (Anonymous, 1984 b).

MDP : Modifiye Direkt Plaka Yöntemi (Holbrook et al., 1980).

TSA/VRBA : Triptik Soy Agar/Violet Red Bile Agar Dökme Plaka Yöntemi (Powers and Latt, 1979).

VRBA/VRBA : Violet Red Bile Agar/Violet Red Bile Agar Dökme Plaka Yöntemi (Powers and Latt, 1979).

MVRBA : Modifiye VRBA Yöntemi.

MEMS : Modifiye EMS Yöntemi.

Çizelge 4.3 : Çiğ süt örneklerine ilişkin bazı istatistiksel parametreler^x

Yöntemler	Gözlem Sayısı	Ortalama	Varyans	Standart sapma	Standart Hata	Kitle Ortalama ^{xx}	
						Güven Aralığı Alt Sınır	Güven Aralığı Üst Sınır
AOAC/EMS	23	4.4398	2.5655	1.6017	0.3339	3.7462	5.1333
MDP	23	4.2916	0.8390	0.9159	0.2003	3.8949	4.6882
TSA/VRBA	23	4.0189	0.9235	0.9610	0.2003	3.6028	4.4350
VRBA/VRBA	23	3.9906	1.0340	1.0168	0.2120	3.5503	4.4309
MVRBA	23	4.0111	1.0916	1.0448	0.2178	3.5587	4.4635
MEMS	23	4.4177	2.6825	1.6378	0.3415	3.7085	5.1268
GENEL	138	4.1950	0.3412	0.5841	0.0497	4.0969	4.2930

(x) Hesaplamalar, sayım sonuçlarının Çizelge 4.2'deki logaritma₁₀ değerleri esas alınarak yapılmıştır.

(xx) α : 0.05

Çizelge 4.4 : Lineer Regresyon / Korelasyon Analizi Sonucunda Elde Edilen
Yöntemler Arası Korelasyon Katsayıları

Yöntemler	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS
AOAC/EMS	0.7940	0.6910	0.7470	0.7420	0.9872
MDP		0.8592	0.8913	0.9203	0.8293
TSA/VRBA			0.9654	0.9335	0.7355
VRBA/VRBA				0.9718	0.7951
MVRBA					0.7819

Çizelge 4.4 genel olarak incelendiğinde çiğ süt örnekleri için, tüm sayım yöntemleri arasında oldukça yüksek bir korelasyon olduğu görülmektedir. Ancak en yüksek korelasyon, $r = 0.9872$ korelasyon katsayısı ile AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemleri arasında görülmüştür. En düşük korelasyon ise, $r = 0.6910$ korelasyon katsayısı ile AOAC'nin EMS ve TSA/VRBA yöntemleri arasında saptanmıştır.

Çiğ süt örneklerine ait AOAC'nin EMS yöntemi ve diğer beş yöntemden elde edilen E.coli sayım sonuçlarının tek tek karşılaştırılması ile bulunan bağıntı ve korelasyon katsayıları sırasıyla Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, ve 4.9 ' da verilmiştir. Şekil 4.9'da görüleceği gibi, AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemlerinden elde edilen sayım sonuçları lineer regresyon doğrusuna çok yakın bir dağılım göstermektedirler. Bu iki yöntem arasındaki kuvvetli korelasyon büyük ölçüde her iki sayım yönteminin de aynı besiyerlerini, inkübasyon koşullarını ve daha çok da aynı EMS değerlendirme tablosunu kullanmasından kaynaklanabilir.

MDP yöntemi ile diğer sayım yöntemleri arasındaki ilişkilerin karşılaştırılması ile elde edilen bağıntı ve korelasyon katsayıları Şekil 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13'de verilmiştir. Bu yöntemin en yüksek korelasyonu ($r = 0.9203$) MVRBA yöntemi ile gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.12). MDP yöntemi ile TSA/VRBA, VRBA/VRBA ve MEMS yöntemleri arasında da kuvvetli bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Şekil 4.10, 4.11, 4.13).

TSA/VRBA yöntemi en kuvvetli korelasyonu ($r = 0.9654$) VRBA/VRBA yöntemi ile yapılan karşılaştırmada göstermiştir (Şekil 4.14). MVRBA yöntemi ile yapılan karşılaştırmada da benzer bir ilişki ($r = 0.9335$) bulunmuştur (Şekil 4.15).

VRBA/VRBA yöntemi ve çalışan diğer yöntemler arasındaki ilişki karşılaştırıldığında, en iyi korelasyonun ($r=0.9718$) MVRBA yöntemi ile alındığı saptanmıştır (Şekil 4.17).

35 °C'lik bir ön inkübasyon basamağı ile klasik VRBA/VRBA dökme plaka yönteminden ayrılan MVRBA yöntemi, çiğ süt örnekleri için klasik yöntemle karşılaştırılabilir sonuçlar vermiştir.

Genelde, yöntemler arasında iyi bir korelasyon olduğu lineer regresyon/korelasyon analizi ile saptandıktan sonra, araştırmadaki altı farklı E.coli sayım yöntemine, bağımlı örneklerin ortalamalarını karşılaştırmak için geliştirilmiş olan Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. (Miller, 1966; Schafer and Macready, 1975; Şanlıtürk,1986).

Bonferroni çoklu karşılaştırma testinin sonucu Çizelge 4.5' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 : Çiğ süt örnekleri için Bonferroni çoklu kararlaştırma testi (P : 0.05)

	MVRBA	TSA/VRBA	MDP	MEMS	AOAC/EMS
VRBA/VRBA	E ^x	E	E	E	E
MVRBA		E	E	E	E
TSA/VRBA			E	E	E
MDP				E	E
MEMS					E

(x) E : Eşit (Equal)

Bonferroni çoklu karşılaştırma testinin sonuçlarına göre, çiğ süt örnekleri için, araştırmamızda kullandığımız altı farklı E.coli sayım yöntemi arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadığı saptanmıştır.

Çiğ süt örneklerinde, E.coli sayımı için kullanılan yöntemler arasında fark bulunamaması en üstün yöntemin seçiminde daha değişik parametrelerin dikkate alınmasını gerektirmektedir.

Birçok araştırmacı tarafından da vurgulandığı gibi, gıdalarda E.coli sayımı için kullanılan EMS yöntemleri güç pahalı ve ardarda birçok deney aşamalarını içeren uzun bir çalışma periyodunu gerektirmektedir (Rose, et al., 1975; Rayman, et al., 1979; Motes, et al., 1984 ; Hall, 1985). Bunun yanısıra En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemlerinde değerlendirme aşamasında

kullanılan ve istatistiksel yollarla elde edilmiş olan EMS tablolarının kendisinden kaynaklanabilecek hataların da olabileceği ileri sürülmektedir (Silliker, et al., 1979; Hall, 1984).

Bu araştırmadaki diğer bir En Muhtemel Sayı Yöntemi olan MEMS yönteminin AOAC'nin EMS yöntemine göre bazı üstünlükleri bulunmaktadır. MEMS yönteminde, sonuca gaz oluşumu saptanan EC Broth tüplerine doğrudan indol testi uygulayarak ulaşılması nedeni ile, ek besiyeri harcaması gerekmemekte ve yöntem daha kısa sürede, az bir çaba ile tamamlanabilmektedir. Bu yöntemde laktozdan gaz oluşturma özelliğinin yanısıra, E.coli sayımında daha belirleyici bir özellik olduğu ileri sürülen (Anderson and Baird-Parker, 1975; Holbrook et al., 1980) indol üretimi birlikte değerlendirilmektedir. Yalnızca bu iki yöntem ele alındığında daha az süre ve çaba ile tamamlanan ve daha az besiyeri harcamasını gerektiren MEMS yöntemi AOAC'nin EMS yöntemine seçenek olarak önerilebilir. Ancak MEMS yöntemi diğer En Muhtemel Sayı yöntemlerinde olduğu gibi, değerlendirmede aynı EMS tablosunu kullandığından, tablodan kaynaklanabileceği ileri sürülen değerlendirme hatalarını da doğal olarak içerecektir (Silliker, et al., 1979; Hall, 1984).

Araştırmada kullanılan sayım yöntemleri, tamamlanma süresi dikkate alınarak incelendiğinde, E.coli sayımının MDP yöntemi ile 18-24 saat içerisinde tamamlanabildiği görülmektedir. Çalışılan yöntemler içerisinde süre açısından en üstününün MDP yöntemi olduğu görülmekle beraber; yöntemin

uygulanabilmesi için gerekli olan sellüloz asetat membranlar maliyeti oldukça yükseltmektedir. TSA/VRBA yöntemi 72-76 saatte tamamlanabilmekte ve MDP yönteminde olduğu gibi özel bir materyalin kullanılmasını gerektirmemektedir. 96 saat içerisinde sonuç veren VRBA/VRBA dökme plaka yöntemi, TSA/VRBA yöntemindeki gibi iki farklı besiyerinin kullanımına ve bir ön inkübasyon aşamasına gerek göstermemektedir. MVRBA yönteminde de TSA/VRBA yöntemindeki gibi iki saatlik bir ön inkübasyon aşaması vardır. Yönteme bir canlandırma basamağı eklenmesinin en önemli amacı, özellikle işlem görmüş gıdalarda hasar görmüş durumda bulunabilecek E.coli'lerin de geri kazanılabilmesidir. Bu nedenle çiğ sütteki E.coli sayımında MVRBA ve TSA/VRBA yöntemlerinin kullanılmasının, VRBA/VRBA yöntemine kıyasla süreyi az da olsa artıracacağı ve TSA/VRBA yönteminin farklı ikinci bir besiyeri hazırlamadan kaynaklanan ek bir çabayı gerektireceği açıktır.

TSA/VRBA yöntemi, bir ön inkübasyon aşaması içermesine karşılık, bu üç direkt plaka yöntemi arasında en kısa sürede tamamlanan yöntem olarak dikkati çekmektedir. Diğer taraftan direkt plaka yöntemlerinin her biri, AOAC'nin EMS yöntemine kıyasla çok daha kısa süre ile daha az besiyeri harcaması ve çabayla başarılabilir. Aynı şekilde TSA/VRBA, MVRBA ve VRBA/VRBA direkt plaka yöntemleri, MEMS yöntemiyle süre, besiyeri harcaması ve çaba yönünden karşılaştırıldığında TSA/VRBA yönteminin en kısa sürede tamamlandığı, VRBA/VRBA yönteminin ise bir ön inkübasyon

aşamasını içermemesi ve farklı bir besiyeri hazırlanmasını gerektirmemesi nedenleriyle en az çabayla başarıldığı görülmektedir.

Çiğ süt gibi yüksek düzeyde karbohidrat içeren gıdalarda, karbohidratların indol üretimini belli ölçüde engellediği görüşü doğrultusunda, yöntemler arasında farklı bir sonuç elde edilememiştir (Holbrook, et al., 1980). Bu olumsuz durumu kaldırdığı bildirilen MDP yönteminin, araştırma sonuçlarına göre diğer yöntemlerden fazla bir ayrıcalığı olmadığı görülmektedir. Diğer taraftan MDP yönteminin tamamlanması için U.V. lambasına gerek duyulabilmesinin bir çok laboratuvara ek bir mali yük getireceği açıktır.

MDP, TSA/VRBA, VRBA/VRBA yöntemlerinde membran yüzeyi ve besiyerlerinde üreyen kolonilerin görünüşleri Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4'de verilmiştir. TSA/VRBA dökme plaka yönteminde, besiyerinde gelişen tipik kolonilerin silik görünüşü dikkati çekmektedir.

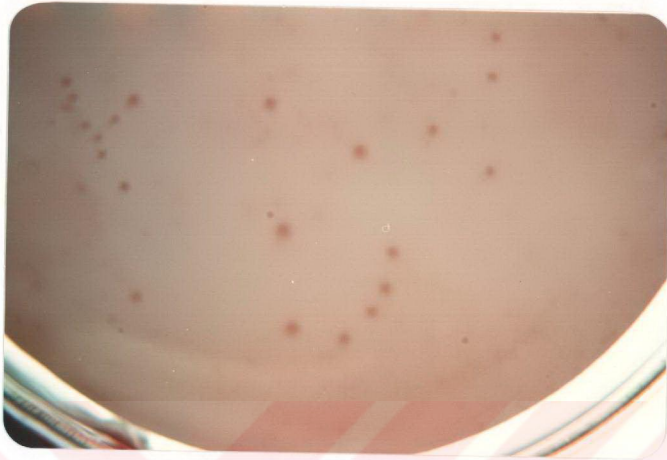
4.1.1. İzolatlarla uygulanan tamamlama test sonuçları

AOAC'nin EMS yönteminde, son aşamada EMB agar besiyerindeki tipik kolonilerden hazırlanan saf kültürler ile, TSA/VRBA, VRBA/VRBA ve MVRBA yöntemlerindeki besiyerlerinden sayım sonrası Harrison's disk yöntemi ile seçilen ve izole edilen kültürlerle gram boyama ve IMVIC testleri uygulanmıştır.

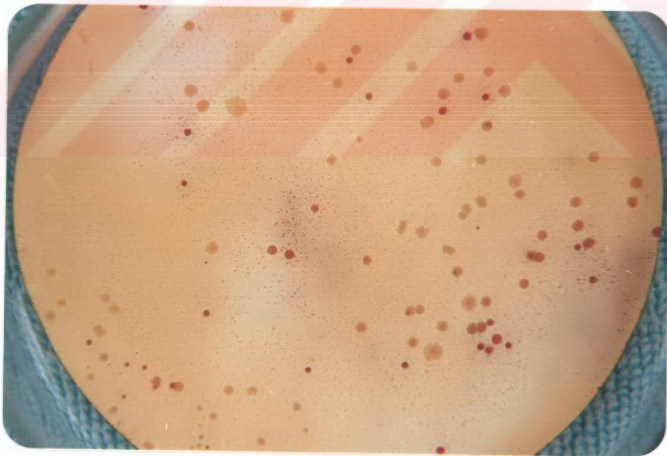
Gram boyama uygulanan 201 izolattan 198 tanesinin (% 98.51), gram (-), sporsuz, kısa çubuk şeklinde basiller oldukları belirlenmiştir. Bu özellikteki izolatların % 92,54'nün E.coli biyotip I (++) , % 3,98'inin E.coli biyotip II (-+ - -) oldukları (toplam % 96,52), % 3,48'nin ise bunların dışında sonuçlar verdikleri saptanmıştır. Bu sonuçlar, bu konuda yapılan diğer araştırma sonuçlarıyla yakın benzerlikler göstermektedir (Anderson and Baird-Parker,1975 ; Holbrook et al., 1980). İzolatların büyük çoğunluğunun indol pozitif sonuç vermesi, E.coli sayım yöntemlerinin tamamlanma aşamasında indol testinin tek başına yeterli olabileceğini düşündürmektedir.

Bu testlerin yanısıra AOAC'nin EMS yönteminde uygulanan LST broth besiyerinde gaz oluşumu testinde ise, tüm izolatlar pozitif sonuç vermişlerdir. Bu durumda çiğ süt örneklerinden elde edilen izolatların hiçbirisinin anaerojenik E.coli suşu (Alkalescens-Dispar) olmadığı doğrulanmıştır.

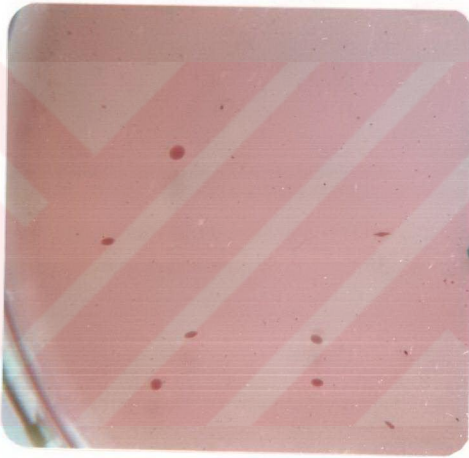
MEMS yönteminde ise, gaz oluşumu görülen EC tüplerine uygulanan indol testinde, testin uygulandığı tüm kültürler pozitif sonuç vermişlerdir. Bu yöntemde, kültürlerin 45.5 °C'de inkübasyonu sonucunda triptofandan indol oluşturma özellikleri dikkate alınmaktadır. Sonuçta incelenen çiğ süt örneklerinin her birinde, bu yöntem uygulandığında varlığı ortaya konabilecek indol pozitif E.coli suşlarının olduğu söylenebilir.



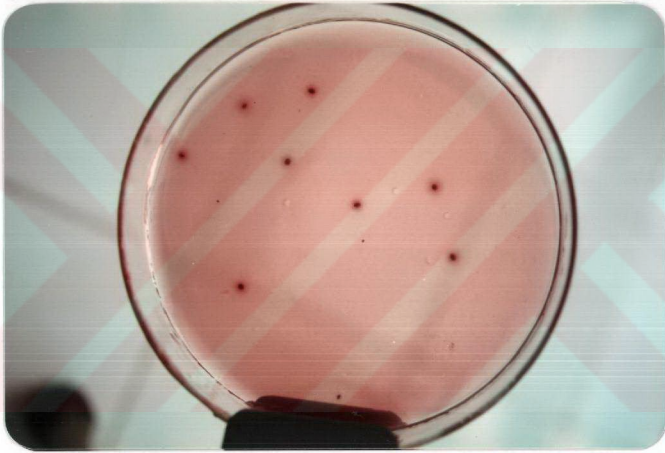
Şekil 4.1 : MDP yönteminde membran yüzeyinde üreyen indol pozitif kolonilerin, indol reaktifi eklenmesinden sonraki görünüşleri.



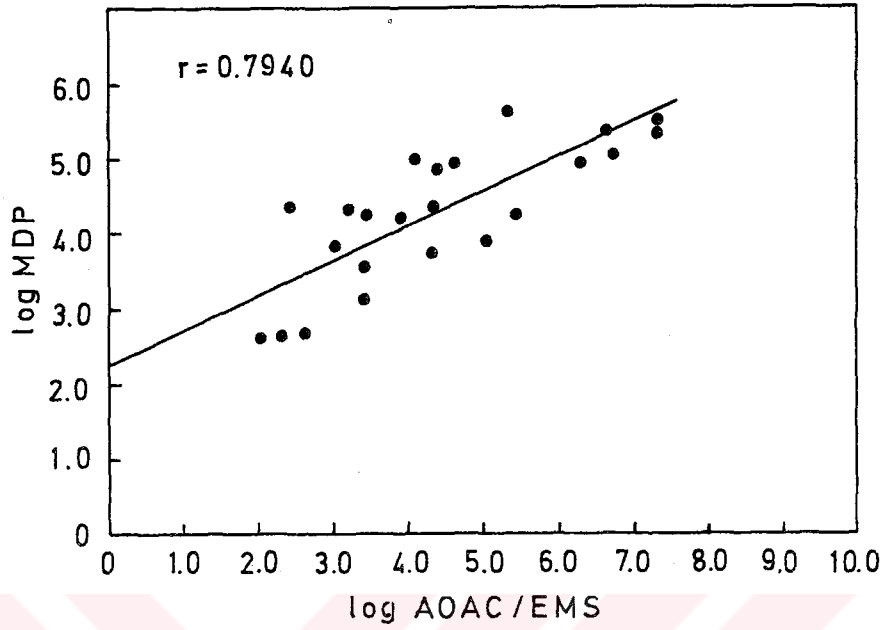
Şekil 4.2 : MDP yönteminde, membran yüzeyinde üreyen indol pozitif ve indol negatif kolonilerin, direkt güneş ışığı altında mebranın kurutulmasından sonraki görünüşleri (indol pozitif koloniler koyu kırmızı, indol negatif koloniler ise sarı renktedir).



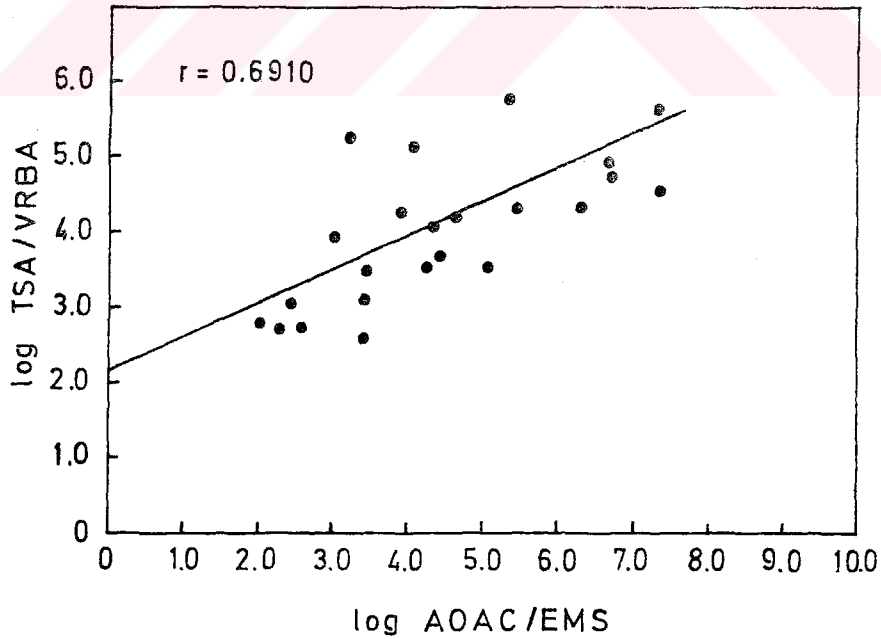
Şekil 4.3 : TSA/VRBA dökme plaka yönteminde tipik ve atipik kolonilerin görünümü (Tipik koloniler büyük kırmızı, atipik koloniler ise küçük ve silik olanlardır).



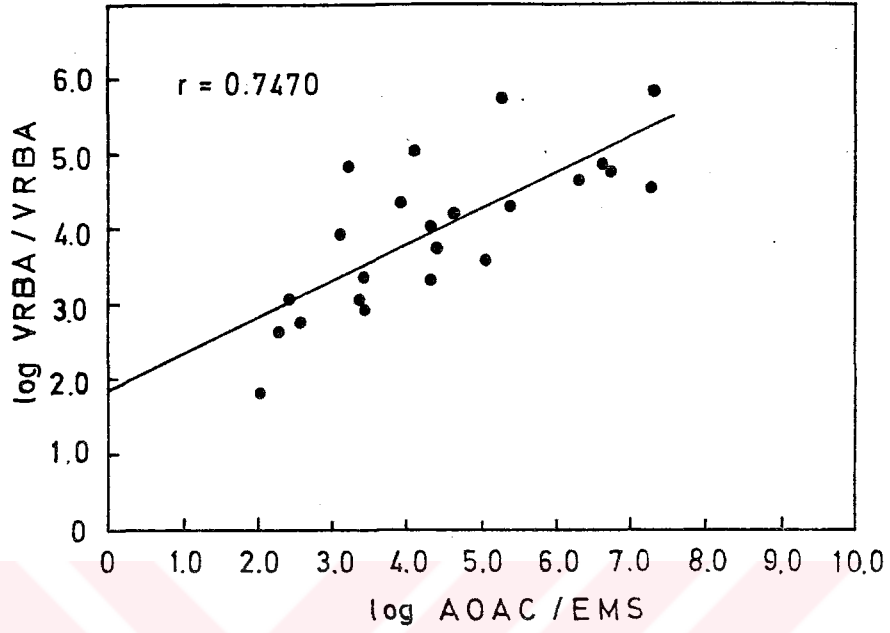
Şekil 4.4 : VRBA/ VRBA yönteminde tipik kolonilerin besiyerindeki görünüşleri



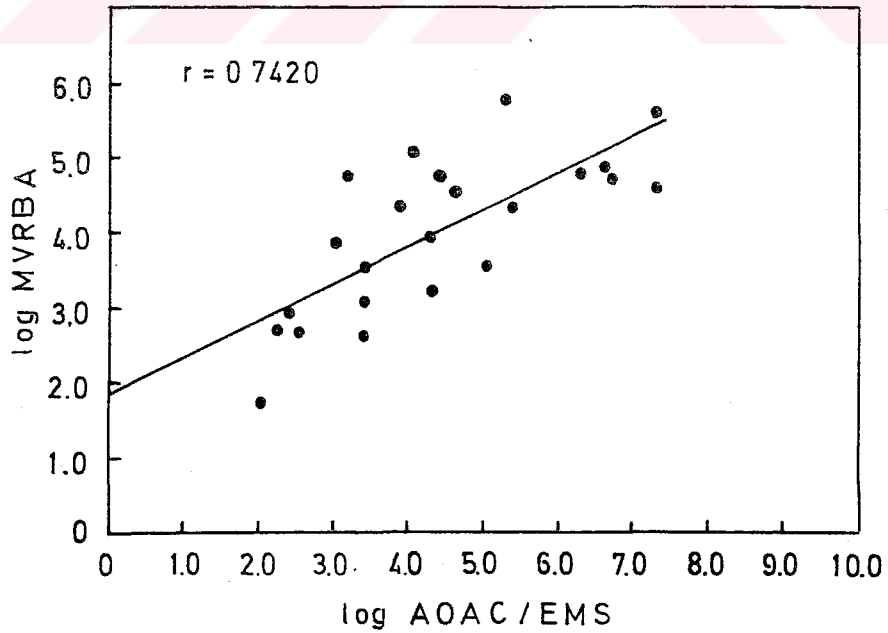
Şekil 4.5: Çiğ süt örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile MDP yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 2.2755 + 0.4540 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.7940$).



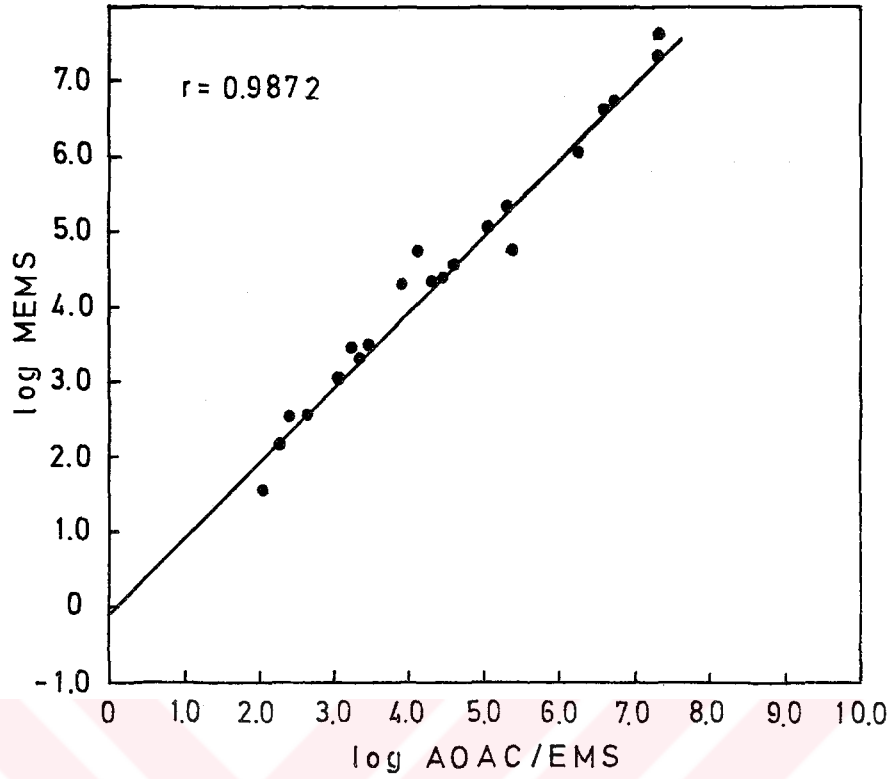
Şekil 4.6: Çiğ süt örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile TSA/VRBA dökme plaka yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 2.1782 + 0.4146 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.6910$).



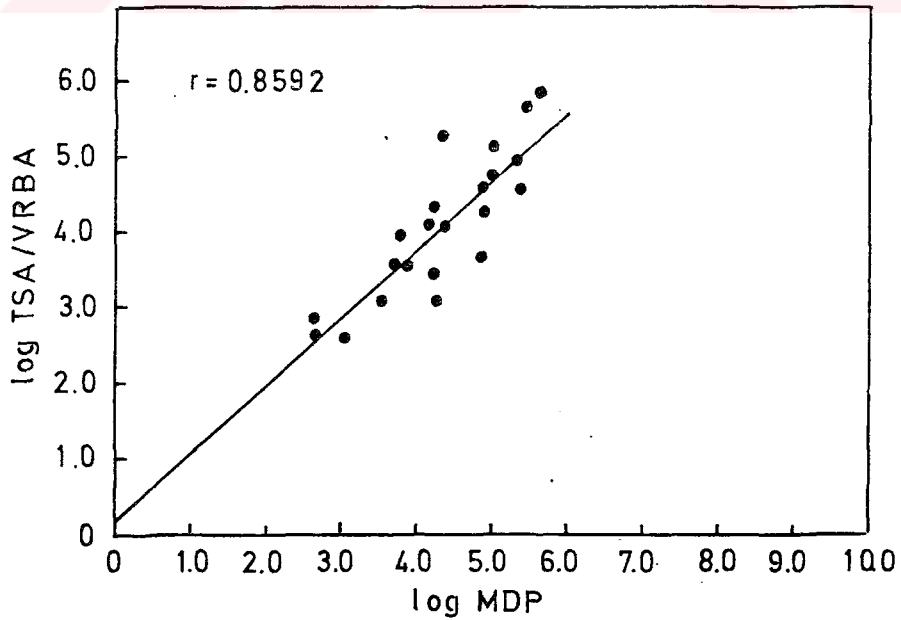
Şekil 4.7 : Çiğ süt örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 1.8849 + 0.4742 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.7470$).



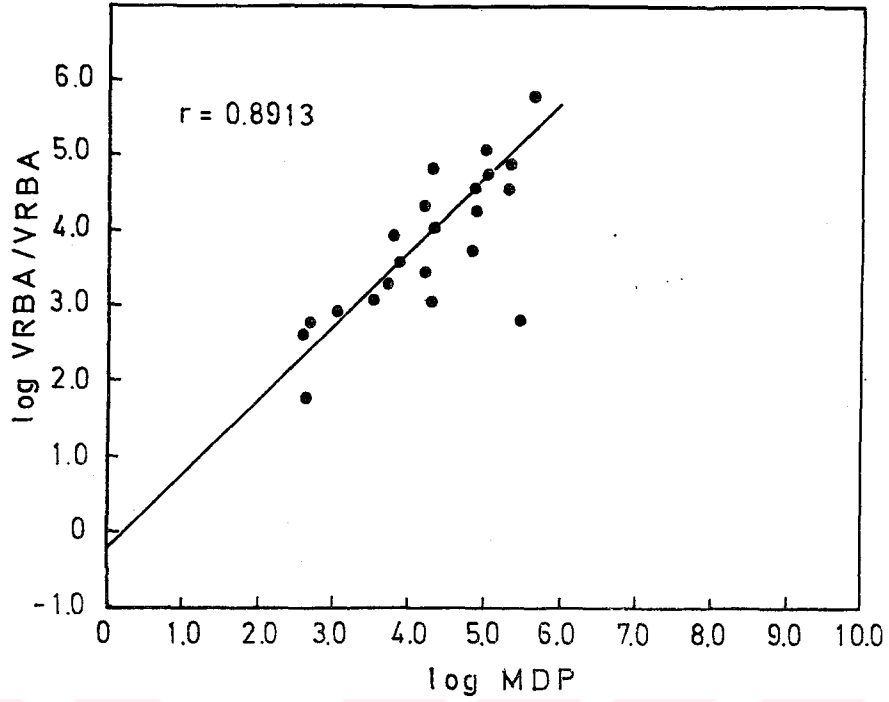
Şekil 4.8 : Çiğ süt örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 1.8622 + 0.4840 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.7420$).



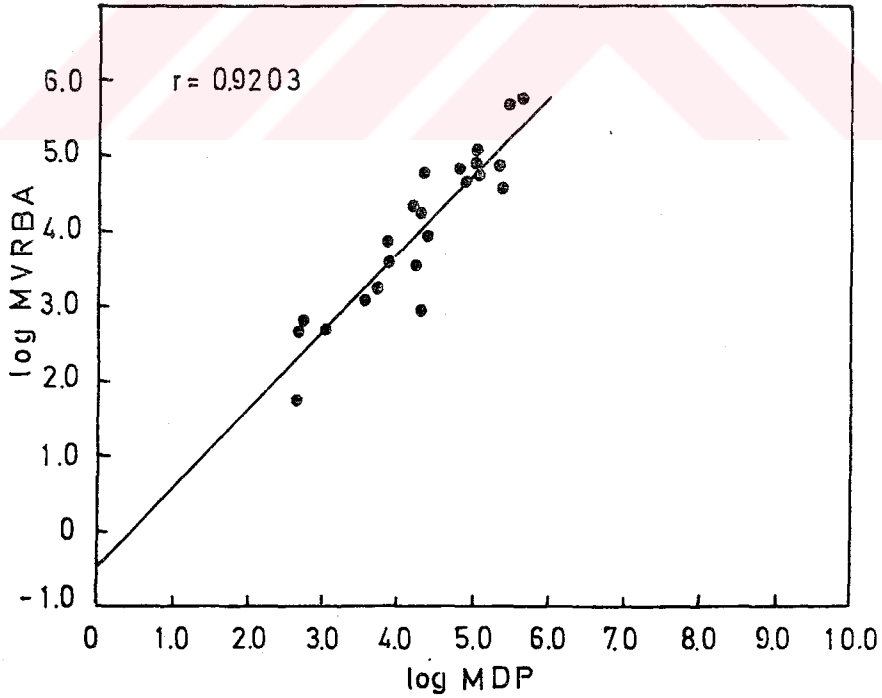
Şekil 4.9 : Çiğ süt örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = -0.0643 + 1.0095 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.9872$).



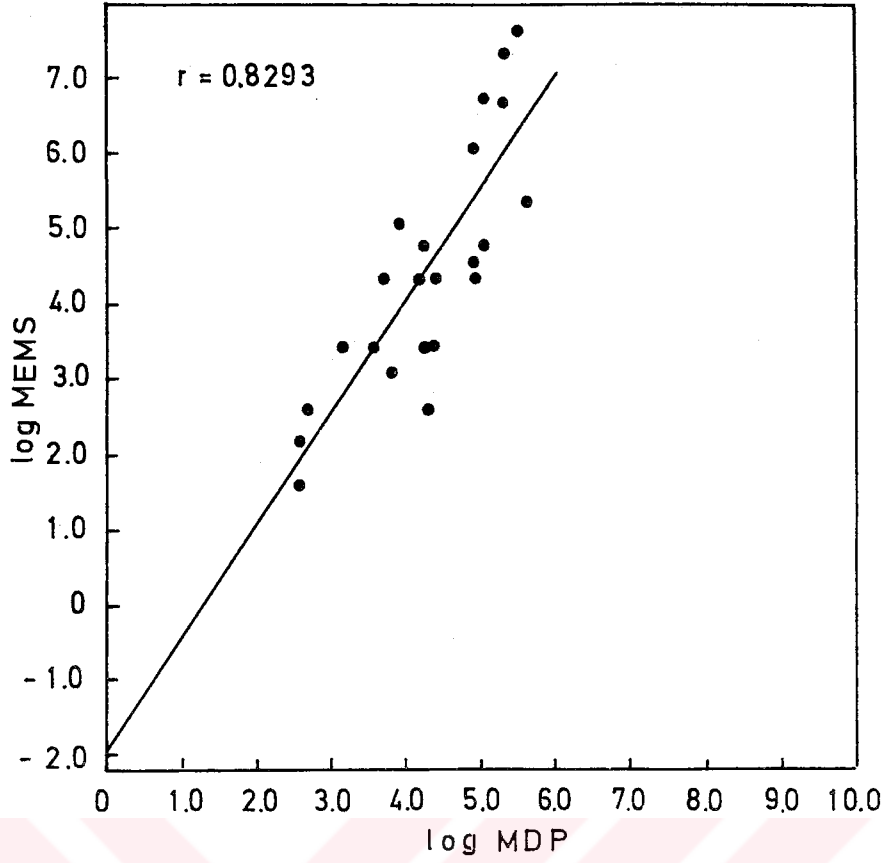
Şekil 4.10 : Çiğ süt örnekleri için, MDP yöntemi ile TSA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.1501 + 0.9015 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8592$).



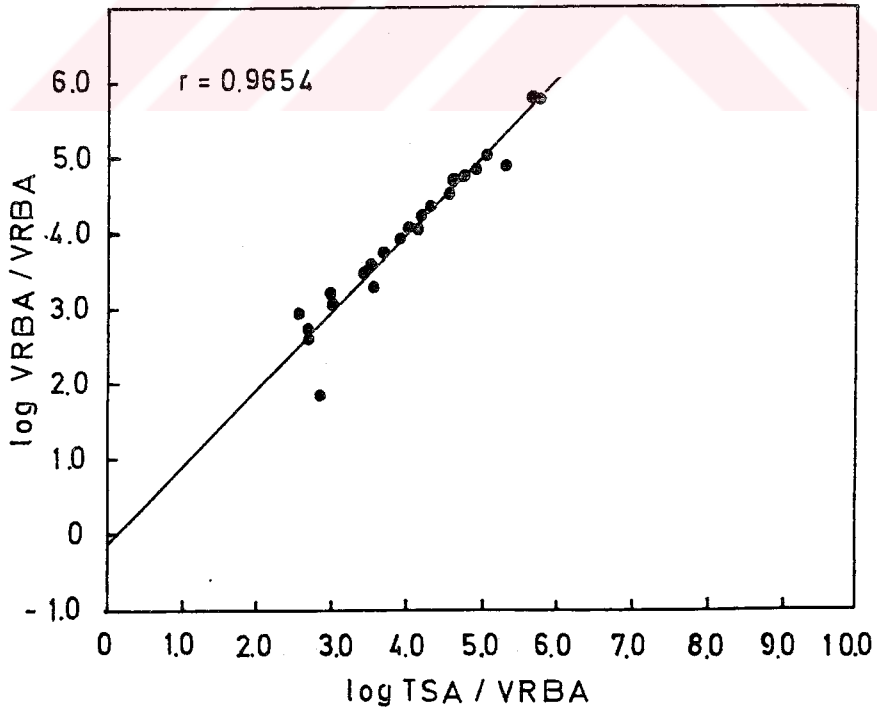
Şekil 4.11 : Çiğ süt örnekleri için, MDP yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = -0.2560 + 0.9895 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8913$)



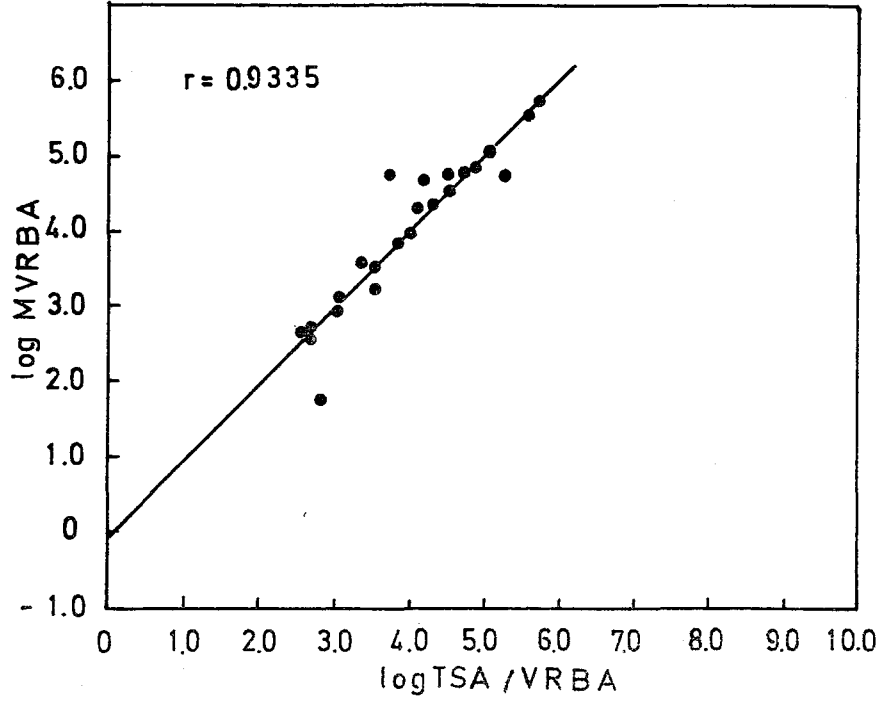
Şekil 4.12 : Çiğ süt örnekleri için, MDP yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = -0.4938 + 1.0497 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.9203$).



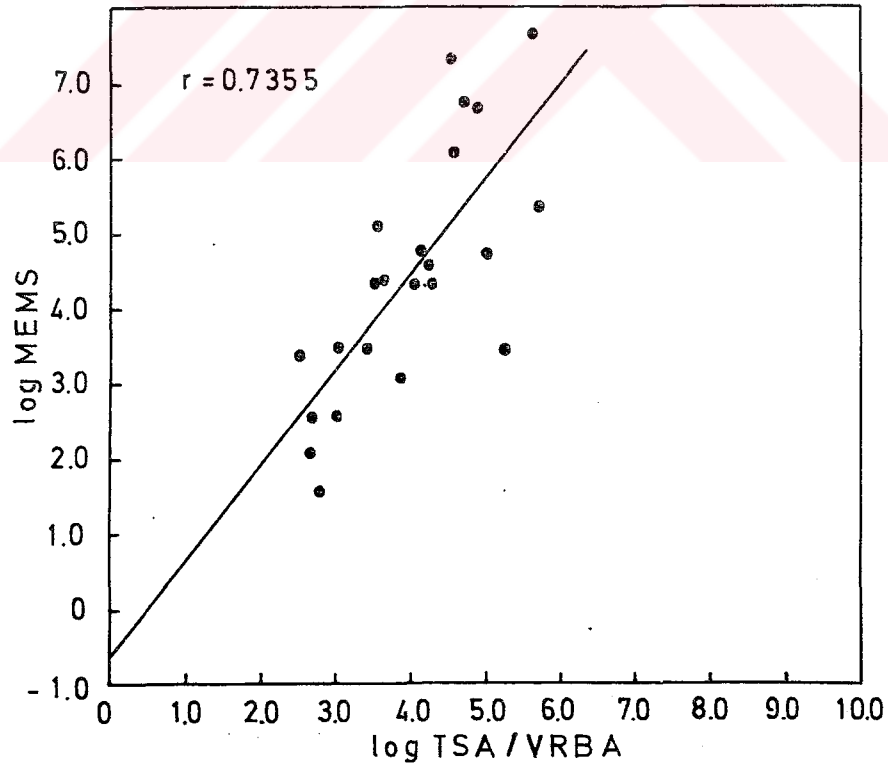
Şekil 4.13 : Çiğ süt örnekleri için,MDP yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = -1.9463 + 1.4829 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8293$).



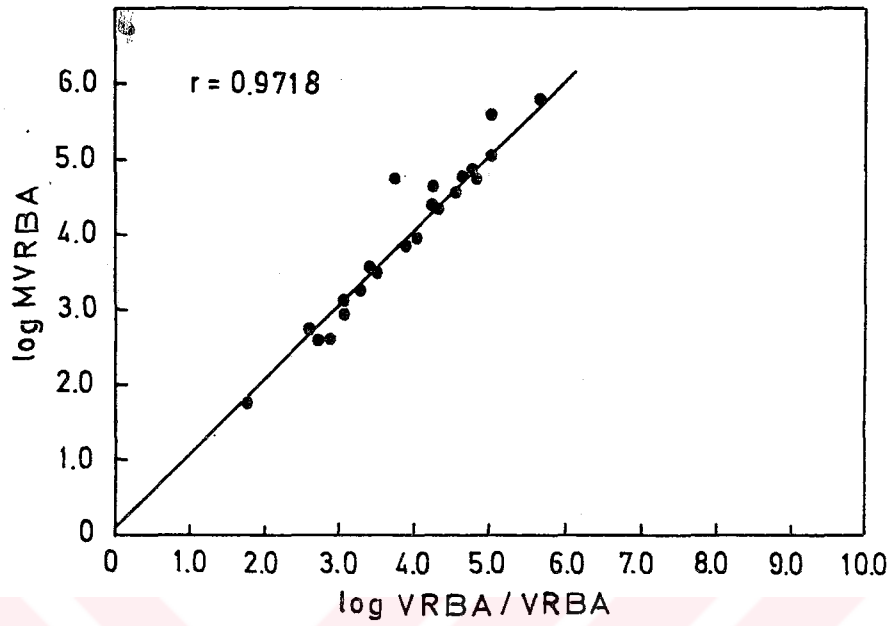
Şekil 4.14 : Çiğ süt örnekleri için,TSA/VRBA yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = -0.1152 + 1.0216 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.9654$).



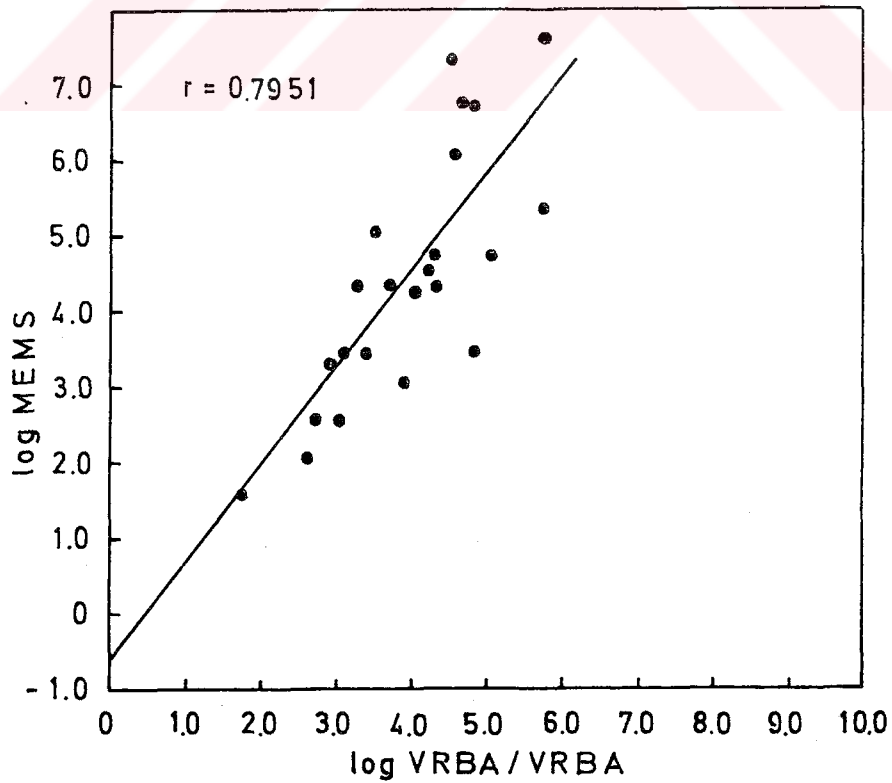
Şekil 4.15 : Çiğ süt örnekleri için ,TSA/VRBA yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = -0.6803 + 1.0150 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r=0.9335$).



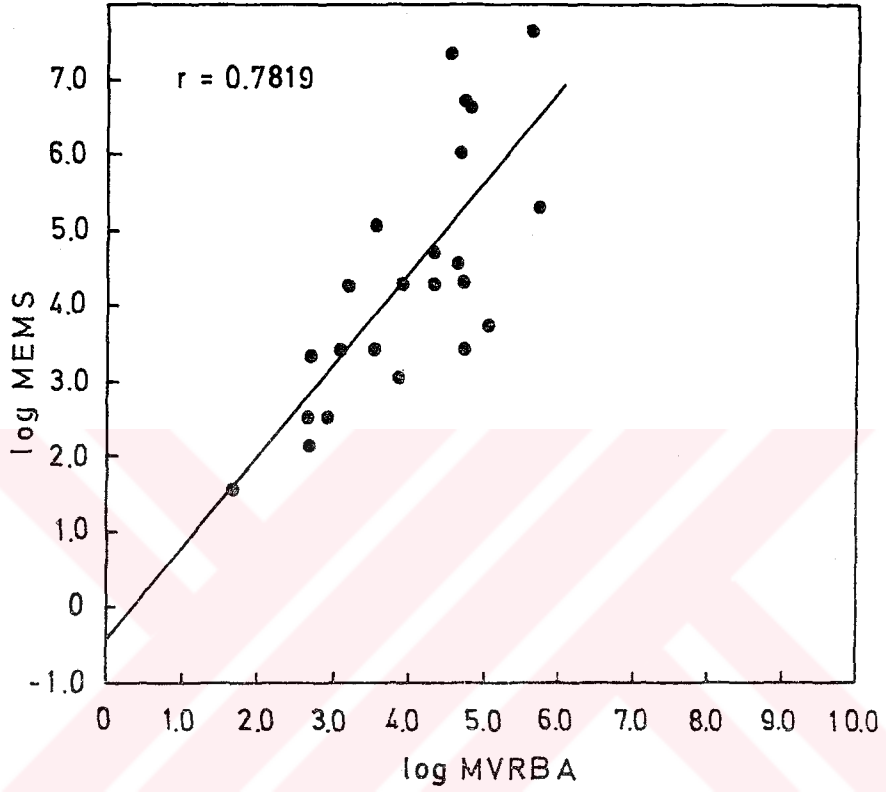
Şekil 4.16 : Çiğ süt örnekleri için ,TSA/VRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = -0.6205 + 1.2536 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r=0.7355$).



Şekil 4.17 : Çiğ süt örnekleri için,VRBA/VRBA yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.0262 + 0.9985 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r=0.9718$).



Şekil 4.18 : Çiğ süt örnekleri için,VRBA/VRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = -0.6934 + 1.2808 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r=0.7951$).



Şekil 4.19 : Çiğ süt örnekleri için, MVRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = -0.4992 + 1.2258 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.7819$).

4.2. Dondurulmuş et örneklerine ilişkin sayım sonuçları

Araştırmada, incelenen 33 dondurulmuş et örneğinden 22'sinin doğal olarak E.coli ile kontamine olduğu belirlenmiştir. 22 dondurulmuş et örneğine altı farklı E.coli sayım yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sayım sonuçları ile bunların hesaplanan logaritma değerleri Çizelge 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.

Dondurulmuş et örneklerine ait altı farklı yöntemle alınan sayım sonuçları $80-1.1 \times 10^6$ E.coli/g arasında değişmektedir.

Yöntemlerin karşılaştırılmasında kullanılan istatistiksel parametrelerle ilgili özet bilgiler, Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Bu çizelgeden de görüleceği gibi, yöntemler genelinde sayım sonuçlarının ortalama logaritma değerleri 3.5198 ile 4.1023 arasında değişmekte olup, toplam 132 gözlemin kitle ortalaması güven aralığı ise ($\alpha: 0.05$); $3.7200 < \mu < 3.8327$ olarak bulunmuştur.

Altı farklı E.coli sayım yönteminin karşılaştırılmasında, ilk aşamada her bir yöntem, lineer regresyon/korelasyon analizi kullanılarak birbirleriyle karşılaştırılmışlardır (Ertek, 1982). Karşılaştırılan yöntemler arasındaki doğrusal bağıntıyı açıklayan matematiksel ifadeler çıkartılmış ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Donmuş et örnekleri için, yöntemler arası korelasyon katsayılarına ilişkin değerler toplu olarak Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.6 : Dondurulmuş et örneklerinden elde edilen sayım sonuçları (E.coli/g) x

ÖRNEK NO	Sayım Yöntemleri xx						MEMS
	AOAC/EMS	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS	
1	110 000	130 500	8 830	4 060	8 400	110 000	
2	200	4 600	3 330	3 760	3 430	150	
3	200	335	330	420	1 300	150	
4	270	300	330	490	463	200	
5	1 100	303	303	166	216	720	
6	610	316	316	80	103	610	
7	15 000	3 200	3 200	3 660	4 000	35 000	
8	11 000	5 030	5 030	5 500	5 200	35 000	
9	11 000	1 300	1 300	1 960	1 300	7 300	
10	11 000	1 200	1 200	1 600	1 050	11 000	
11	1 100 000	68 000	68 000	80 600	66 600	210 000	
12	35 000	10 366	10 366	12 200	10 230	35 000	
13	27 000	9 230	9 230	12 200	9 760	35 000	
14	42 000	60 300	60 300	71 300	69 600	43 000	
15	11 000	3 400	3 400	3 660	3 460	11 000	
16	20 000	2 490	2 490	2 200	2 500	20 000	
17	1 500	386	386	333	345	2 700	
18	35 000	18 260	18 260	31 300	17 400	35 000	
19	1 500	393	393	470	435	1 500	
20	35 000	22 400	22 400	22 800	20 000	43 000	
21	35 000	17 130	17 130	15 900	14 060	35 000	
22	210 000	35 000	35 000	33 600	35 000	210 000	

(x) Verilen her bir sayım sonucu üç paralel çalışmanın ortalamasıdır. Yalnızca MDP yöntemi iki paralel olarak çalışılmıştır.

(xx) AOAC/EMS: AOAC'nin En Muhtemel Sayı Yöntemi (Anonymous, 1984 b).

MDP : Modifiye Direkt Plaka Yöntemi (Holbrook et al., 1980).

TSA/VRBA: Triptik Soy Agar/Violet Red Bile Agar Dökme Plaka Yöntemi (Powers and Latt, 1979).

VRBA/VRBA: Violet Red Bile Agar/Violet Red Bile Agar Dökme Plaka Yöntemi (Powers and Latt, 1979).

MVRBA : Modifiye VRBA Yöntemi .

MEMS : Modifiye EMS Yöntemi.

Çizelge 4.7 : Dondurulmuş et örneklerinden elde edilen sayım sonuçlarının
(E.coli/g) x Log₁₀ değerleri

ÖRNEK NO.	Sayım Yöntemleri xx					
	AOAC/EMS	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS
1	5.0413	5.1156	3.9459	3.6085	3.9242	5.0413
2	2.3010	3.6627	3.5599	3.5751	3.5352	2.1760
3	2.3010	2.4771	2.5250	2.6232	2.4771	2.1760
4	2.4313	2.5854	2.5185	2.6901	2.6655	2.4471
5	3.0413	2.6989	2.4814	2.2201	2.3344	2.8573
6	2.7853	2.5502	2.4996	1.9030	2.0128	2.7853
7	4.1760	4.9978	3.5051	3.5634	3.6020	4.5440
8	4.0413	4.0064	3.7015	3.7403	3.7160	4.5440
9	4.0413	3.4313	3.1139	3.2922	3.1139	3.8633
10	4.0413	3.5563	3.0791	3.2041	3.0211	4.0413
11	6.0413	5.1072	4.8325	4.2063	4.8234	5.3222
12	4.5440	4.5797	4.0156	4.0863	4.0098	4.5440
13	4.4313	4.6283	3.9652	4.0863	3.9894	4.5440
14	4.6232	5.1889	4.7803	4.8530	4.8726	4.6334
15	4.0414	3.7781	3.5314	3.5634	3.5390	4.0414
16	4.3010	3.5854	3.3962	3.3424	3.3979	4.0413
17	3.1760	3.7323	2.5865	2.5224	2.5378	3.4313
18	4.5440	5.2600	4.2615	4.4955	4.2405	4.5440
19	3.1760	3.8356	2.5943	2.6720	2.6384	3.1770
20	4.5440	5.3263	4.3502	4.3579	4.3010	4.6334
21	4.5440	4.5563	4.2337	4.2013	4.1480	4.5440
22	5.3222	5.5910	4.5440	4.5263	4.5263	5.3222

(x) Verilen her bir sayım sonucu üç paralel gelişmanın ortalamasıdır. Yalnızca MDP yöntemi iki paralel olarak çalışılmıştır.

(xx) AOAC/EMS : AOAC'nin En Muhtemel Sayı Yöntemi (Anonymous, 1984 b).
MDP : Modifiye Direkt Plaka Yöntemi (Holbrook et al., 1980).
TSA/VRBA : Triptik Say Agar/Violet Red Bile Agar Dökme Plaka Yöntemi (Powers and Latt, 1979).
VRBA/VRBA : Violet Red Bile Agar/Violet Red Bile Agar Dökme Plaka Yöntemi (Powers and Latt, 1979).
MVRBA : Modifiye VRBA yöntemi.
MEMS : Modifiye EMS yöntemi.

Çizelge 4.8: Dondurulmuş et örneklerine ilişkin bazı istatistiksel parametreler^x

Yöntemler	Gözlem Sayısı	Ortalama	Varyans	Standart Sapma	Standart Hata	Kitle Ortalaması ^{xx}	
						Alt Sınır	Üst Sınır
AOAC/EMS	22	3.9767	0.9933	0.9966	0.2124	3.5342	4.4193
MDP	22	4.1023	0.9826	0.9913	0.2113	3.6621	4.5424
TSA/VRBA	22	3.5464	0.6175	0.7858	0.1675	3.1974	3.8953
VRBA/VRBA	22	3.5469	0.7244	0.8511	0.1814	3.1690	3.9240
MVRBA	22	3.5198	0.6869	0.8288	0.1767	3.1517	3.8878
MEMS	22	3.9660	0.9526	0.9760	0.2080	3.5326	4.3994
GENEL	132	3.7763	0.1076	0.3281	0.0285	3.7200	3.8327

(x) Hesaplamalar, sayım sonuçlarının Çizelge 4.5'deki logaritma değerleri esas alınarak yapılmıştır.

(xx) α : 0.05

Çizgege 4.9 : Lineer regresyon/korelasyon analizi sonucunda elde edilen yöntemler arası korelasyon katsayıları

Yöntemler	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	M.VRBA	MEMS
AOAC/EMS	0.8366	0.8435	0.8090	0.8332	0.9719
MDP		0.8929	0.8750	0.8989	0.8735
TSA/VRBA			0.9771	0.9902	0.8269
VRBA/VRBA				0.9904	0.7946
MVRBA					0.8221

Çizelge 4.9 genel olarak incelendiğinde, dondurulmuş et örnekleri için, tüm sayım yöntemleri arasında yine yüksek bir korelasyon olduğu görülmektedir. En yüksek korelasyonun $r = 0.9904$ ile VRBA/VRBA ve MVRBA yöntemleri arasında olduğu saptanmıştır. Diğerlerine kıyasla en düşük korelasyon ise $r = 0.7946$ ile VRBA/VRBA ve MEMS yöntemleri arasında bulunmuştur.

Donmuş et örneklerine ait, AOAC'nin EMS yöntemi ve diğer beş yöntemden elde edilen sayım sonuçlarının tek tek karşılaştırılmasıyla bulunan bağıntı ve korelasyon katsayıları sırasıyla Şekil 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24 ' de verilmiştir. AOAC'nin EMS yöntemi, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, en yüksek korelasyonu $r = 0.9719$ ile MEMS yönteminin verdiği görülmektedir.

Şekil 4.27 ve 4.25'de görüleceği gibi MDP yöntemi ile MVRBA ve TSA/VRBA yöntemleri arasında kuvvetli bir korelasyon ($r = 0.8989$ ve $r = 0.8929$) olduğu bulunmuştur. TSA/VRBA ve MVRBA ($r = 0.9902$) yöntemleri arasında da VRBA/VRBA ve MVRBA yöntemlerinde olduğu gibi çok yüksek bir korelasyon saptanmıştır (Şekil 4.30 ve 4.32).

Genelde yöntemler arasında iyi bir korelasyon olduğu saptandıktan sonra, araştırmada kullanılan altı farklı E.coli sayım yöntemine, bağımlı örneklerin ortalamalarını karşılaştırmak için geliştirilmiş olan Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır (Miller, 1966; Schaffer and Macready, 1975 ; Şanlıtürk 1986).

Bonferroni çokluk karşılaştırma testinin sonucu Çizelge 4.10'-da verilmiştir.

Çizelge 4.10 : Dondurulmuş et örnekleri için Bonferroni çoklu karşılaştırma testi (α : 0.05)

	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MEMS	AOAC/EMS	MDP
MVRBA	E ^x	E	N ^{xx}	N	N
TSA/VRBA		E	N	N	N
VRBA/VRBA			N	N	N
MEMS				E	E
AOAC/EMS					E

(x) E : Eşit : (Equal)

(xx) N : Eşit değil : (Not equal)

Bonferroni testinin sonuçlarına göre, TSA/VRBA, VRBA/VRBA ve MVRBA yöntemleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamış, ancak bu yöntemler ile AOAC'nin EMS, MDP ve MEMS yöntemleri arasındaki fark, $P < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. AOAC'nin EMS, MDP ve MEMS yöntemleri arasında ise istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır.

Çizelge 4.8'e göre en yüksek ortalama değerine sahip olan MDP yöntemi ve onu izleyen AOAC'nin EMS, MEMS yöntemleri süre açısından karşılaştırıldıklarında, 18-24 saat içerisinde sayım sonuçlarını veren MDP yönteminin diğerlerine

göre çok daha üstün olduğu söylenebilir. Besiyeri harcaması yönünden de daha ekonomik olan bu yöntemin en önemli dez - avantajı sellüloz asetat filtre membranları gibi özel ve pahalı bir materyalin kullanımını gerektirmesidir.

Özellikle işlem görmüş gıdalar için geliştirilen MDP yöntemi birçok araştırmacı tarafından klasik yöntemlerle karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır (Holbrook, et al., 1980 ; Sharpe, et al., 1983; Hall, 1984).

Holbrook ve ark. (1980), doğal olarak kontamine olmuş donmuş etlerle yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada farklı besiyerlerini kullanan iki EMS yöntemi ile MDP yöntemi arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığını bildirmişlerdir.

Sharpe ve arkadaşları (1983), ise çalıştıkları gıdaların çoğunda MDP yönteminin EMS yöntemine kıyasla daha yüksek sayım sonuçları verdiğini saptamışlardır.

Bu konuda yapılan diğer karşılaştırmalı çalışmalar incelendiğinde, MDP yönteminin çalışılan gıda çeşidine ve bu gıdaların görmüş olduğu işlemlere göre, diğer yöntemlerle eşit ya da onlardan üstün sonuçlar verdiği, ancak süre ve stres organizmaların geri kazanılması ile laktoz negatif anaerojenik suşların saptanmasındaki üstünlükleri nedeniyle klasik yöntemlere kıyasla önerilen bir yöntem olduğu görülmektedir (Sharpe, et al., 1983; Hall, 1984). Ancak bu konuda yapılan birçok araştırmada, laktoz negatif anaerojenik E.coli suşlarının genel toplam içinde çok küçük bir

orani oluşturduğu ve bunun ihmal edilebileceğine değinilmektedir (Anderson and Baird-Parker, 1975 ; Rayman,et al., 1979; Hall,1984).

MDP yönteminin çalışılması sırasında karşılaşılan ve bazı araştırmacılar tarafından da vurgulanan diğer bir konu, sayıma dahil edilen örnek dilüsyonlarının iyi seçilememesi durumlarında, membran üzerindeki kolonilerin çok sık bir şekilde yan yana gelmesi nedeniyle indol negatif bazı kolonilerin indol pozitif olarak reaksiyon verebilmesi ve ayırımın tam olarak gerçekleştirilememesidir (Sharpe,et al., 1983 ; Hall, 1984).

Çizelge 4.8'in incelenmesi ile görülebileceği gibi MDP yönteminin en yüksek sayım sonucu ortalamasını vermesi, stres hücrelerinin saptanmasında bu yöntemin üstünlüğünü savunan diğer araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir (Rayman,et al., 1979 ; Holbrook,et al., 1980 ; Sharpe, et al., 1983).

TSA/VRBA yöntemi, işlem görmüş gıdalardaki hasara uğramış E.coli'leri canlandırabilmek amacıyla dönük olarak geliştirilen ve bir ön inkübasyon aşamasını içeren direkt plaka yöntemidir (Powers and Latt, 1979). MVRBA yöntemi de bu amaçla bir ön inkübasyon aşamasını içerecek şekilde tasarlanarak araştırmaya dahil edilmiştir. Bu iki yöntem ve canlandırma için bir ön inkübasyon aşamasını içermeyen VRBA/VRBA yöntemi, incelemeye alınan dondurulmuş et örneklerindeki stres E.coli'lerin geri kazanılmasındaki üstünlükleri

yönünden karşılaştırıldığında, yöntemler arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemsiz olduğu görülmektedir.

Bir çok araştırmacı VRBA besiyerinde, besiyerine seçicilik özelliği veren ajanların gıdalara uygulanan çeşitli işlemler sonucunda hasara uğrayan hücrelerin üremelerini inhibe ettiklerini bildirmişlerdir (Ray and Speck, 1973 ; Speck, et al., 1975 ; Egan, 1978). Bu durum dikkate alındığında, ön inkübasyon aşamasında, stres hücrelerinin onarımına dolayısıyla da gerçek sayının saptanmasına olanak sağlayabilecek TSA gibi genel bir besiyerinin kullanıldığı TSA/VRBA yönteminin daha üstün olduğu söylenebilir. Bu yöntemin ayrıca tamamlanma süresi yönünden de üstün olduğu görülmektedir.

MEMS yöntemi ve AOAC'nin EMS yöntemi ile TSA/VRBA, MVRBA ve VRBA/VRBA yöntemleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Çizelge 4.7 incelendiğinde görüleceği gibi, daha yüksek ortalama değerlerine sahip AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemlerinin diğer üç direkt plaka yöntemine göre daha üstün olduğu söylenebilir. Bu durumda daha kısa sürede tamamlanabilen MEMS yönteminin diğer yöntemlere tercih edilebileceği ortaya çıkmaktadır. Aynı şekilde MDP yöntemi ile AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamaması, süre ve maliyet açısından ele alındığında MEMS yönteminin tercih edilebileceğini göstermektedir.

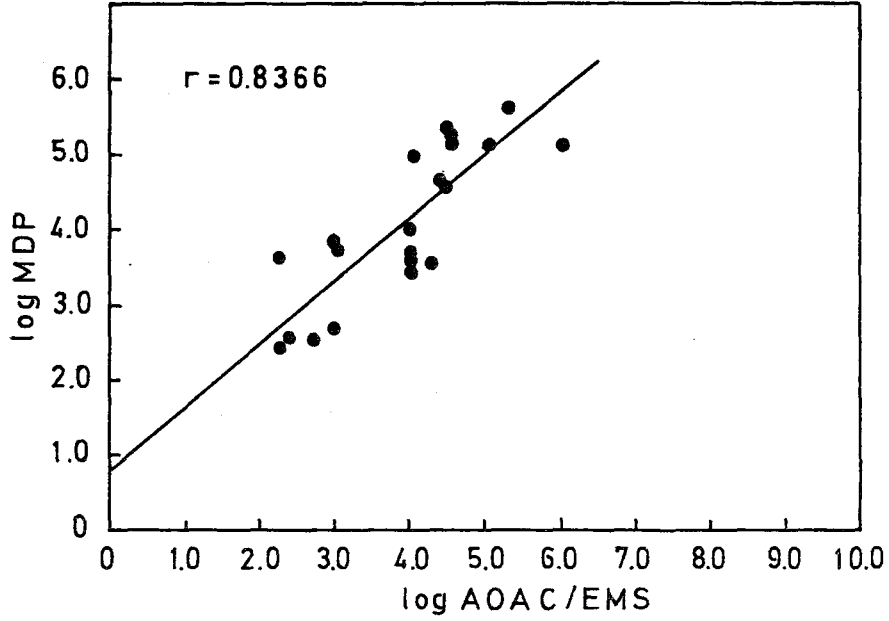
4.2.1. İzolatlara uygulanan tamamlama test sonuçları

AOAC'nin EMS yönteminde, son aşamada EMB agar besiyerindeki tipik kolonilerden hazırlanan saf kültürler ile TSA/VRBA, VRBA/VRBA ve MVRBA yöntemlerindeki besiyerlerinden sayım sonrası Harrison's disk yöntemi ile seçilen ve izole edilen kültürlerle Gram boyama ve IMVIC testleri uygulanmıştır.

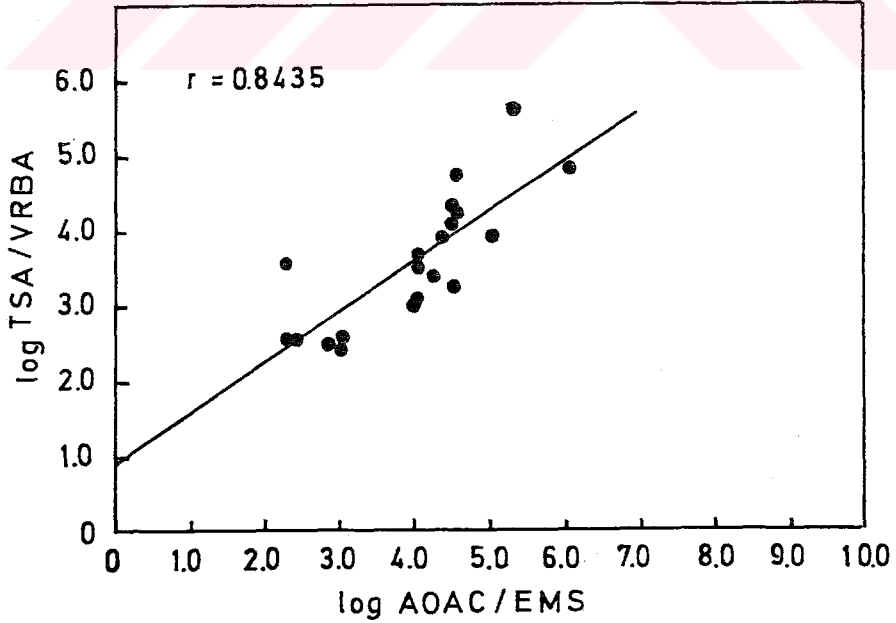
Gram boyama uygulanan 179 izolattan 175 tanesinin (% 97.76) Gram (-), sporsuz kısa çubuk şeklinde basiller oldukları belirlenmiştir. IMVIC test sonuçlarına göre, bu izolatların % 87.79'unun E.coli biyotip I (++ --), % 3.11'inin E.coli biyotip II (-+ - -) oldukları toplam (% 90.9), % 9.10'nun ise bunların dışında sonuçlar verdikleri saptanmıştır. Bu sonuçlar çiğ süt örneklerinden elde edilen ve bu konuda yapılan diğer araştırma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir (Anderson and Baird-Parker, 1975; Holbrook, et al., 1980).

Bu testlerin yanısıra AOAC'nin EMS yönteminde uygulanan LST broth besiyerinde gaz oluşumu testinde tüm izolatlar pozitif sonuç vermişlerdir.

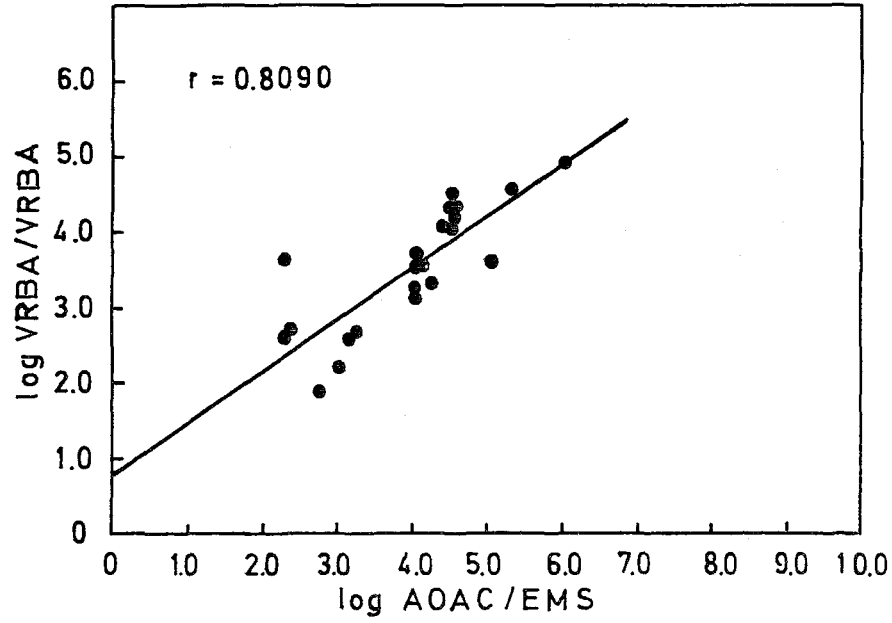
MEMS yönteminde ise, gaz oluşumu gözlenen EC tüplerine uygulanan indol testinde, testin uygulandığı tüm kültürler pozitif sonuç vermişlerdir. Çiğ süt örneklerinde olduğu gibi, incelemeye alınan dondurulmuş et örneklerinin her birinde, bu yöntem uygulandığında varlığı ortaya konulabilecek indol pozitif E.coli suşlarının olduğu söylenebilir.



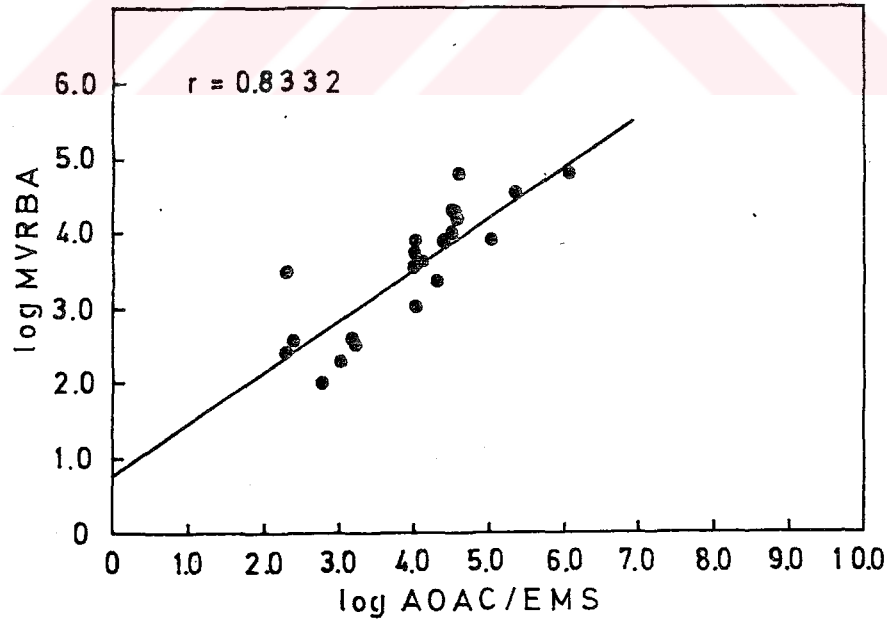
Şekil 4.20 : Dondurulmuş et örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile MDP yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.7931 + 0.8321 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8366$).



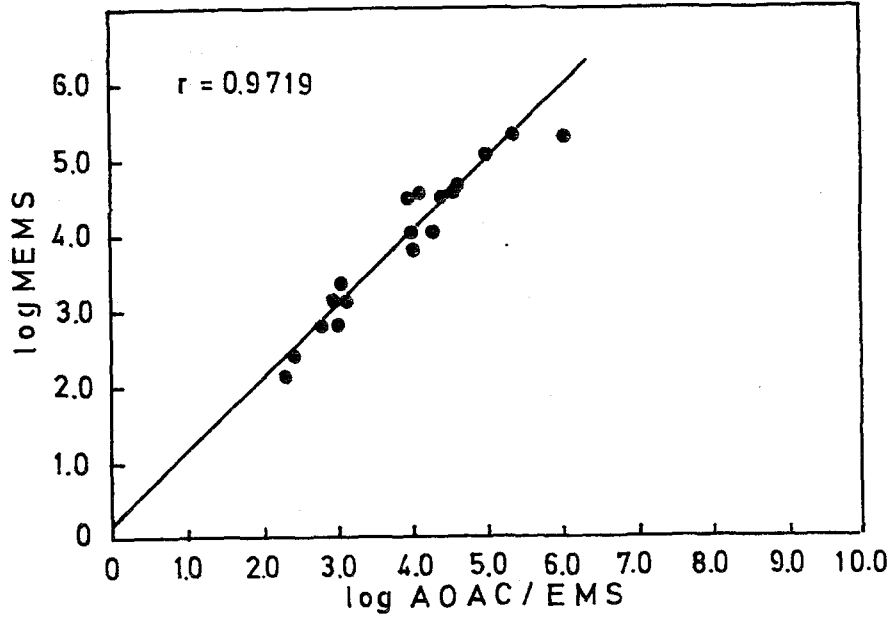
Şekil 4.21 : Dondurulmuş et örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile TSA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.9014 + 0.6651 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8435$).



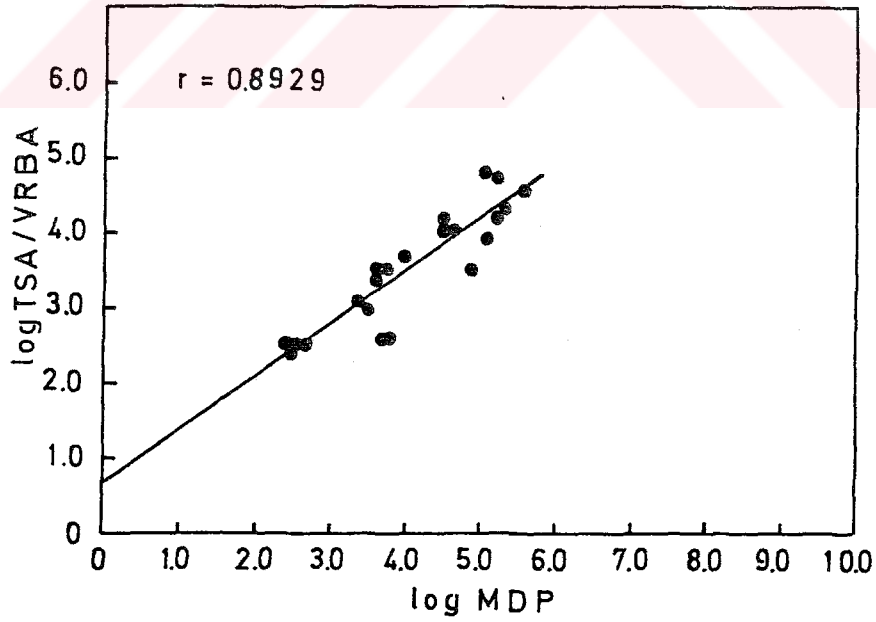
Şekil 4.22 ; Dondurulmuş et örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.7995 + 0.6908 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8090$).



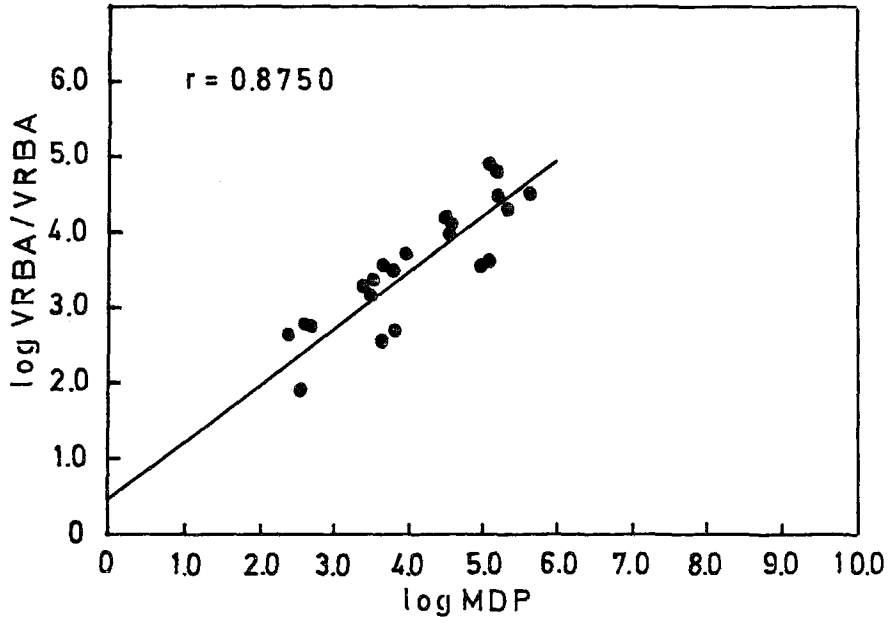
Şekil 4.23 : Dondurulmuş et örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.7725 + 0.6903 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8332$).



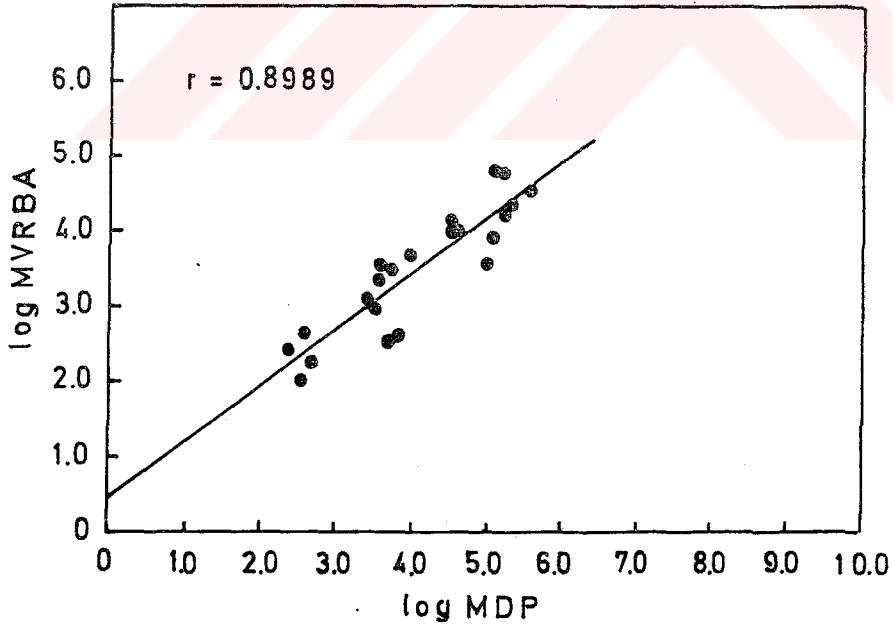
Şekil 4.24 : Dondurulmuş et örnekleri için, AOAC'nin EMS yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.1806 + 0.9518 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.9719$).



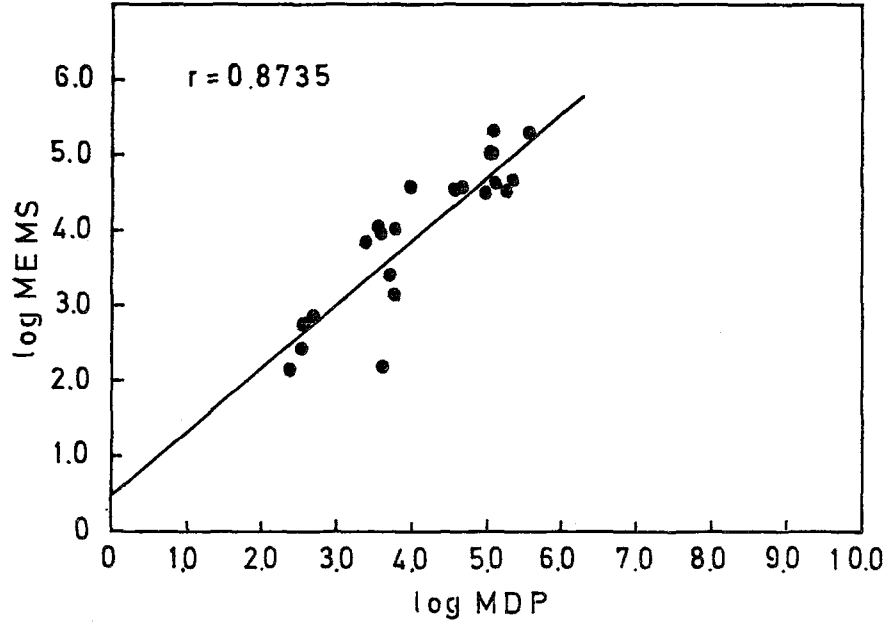
Şekil 4.25 : Dondurulmuş et örnekleri için, MDP yöntemi ile TSA/VRBA yönteminin karşılaştırılması ve $\log y = 0.6423 + 0.7079 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8929$).



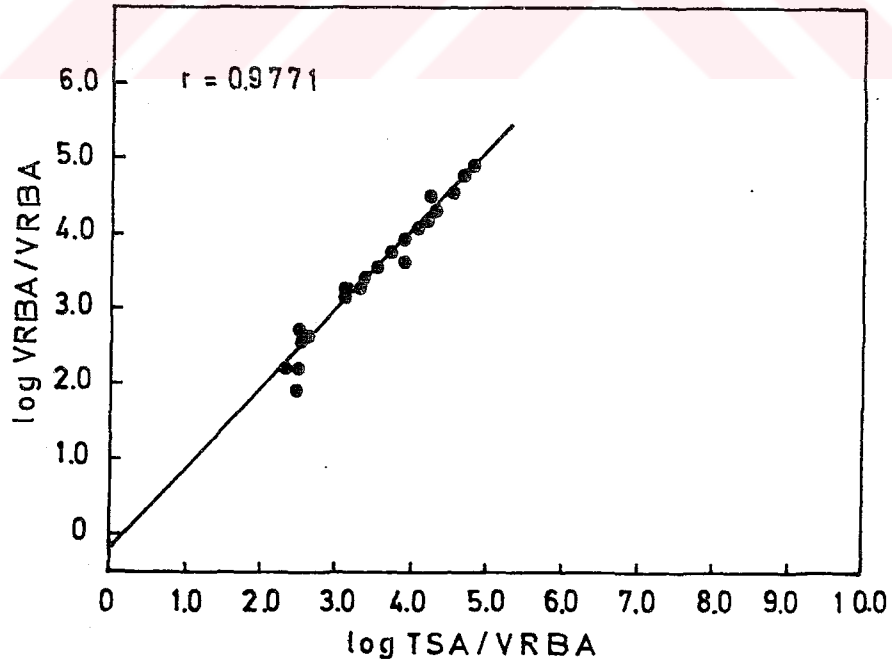
Şekil 4.26 : Dondurulmuş et örnekleri için,MDP yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.4649 + 0.7513 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8750$)



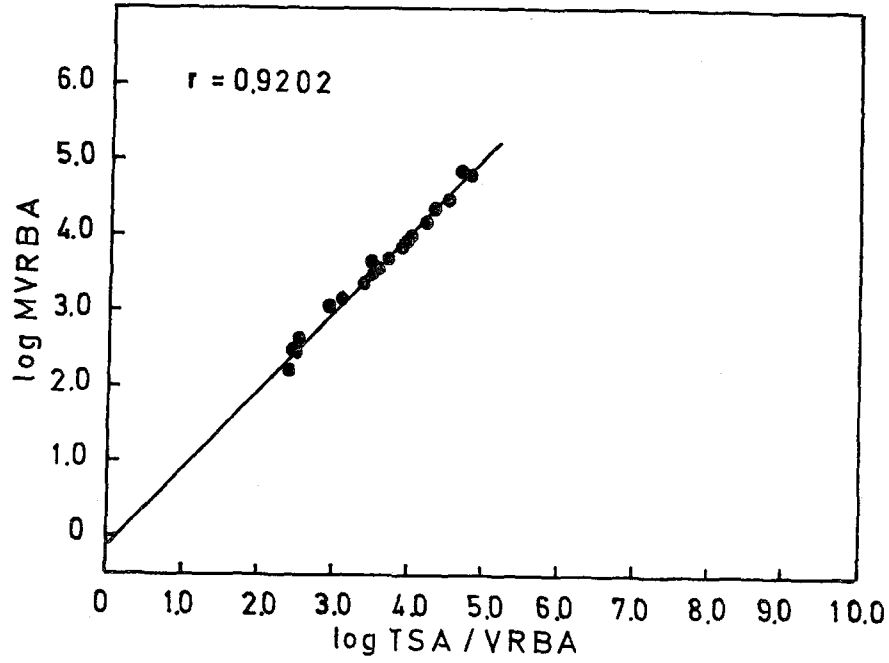
Şekil 4.27 : Dondurulmuş et örnekleri için,MDP yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.4461 + 0.7488 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8989$).



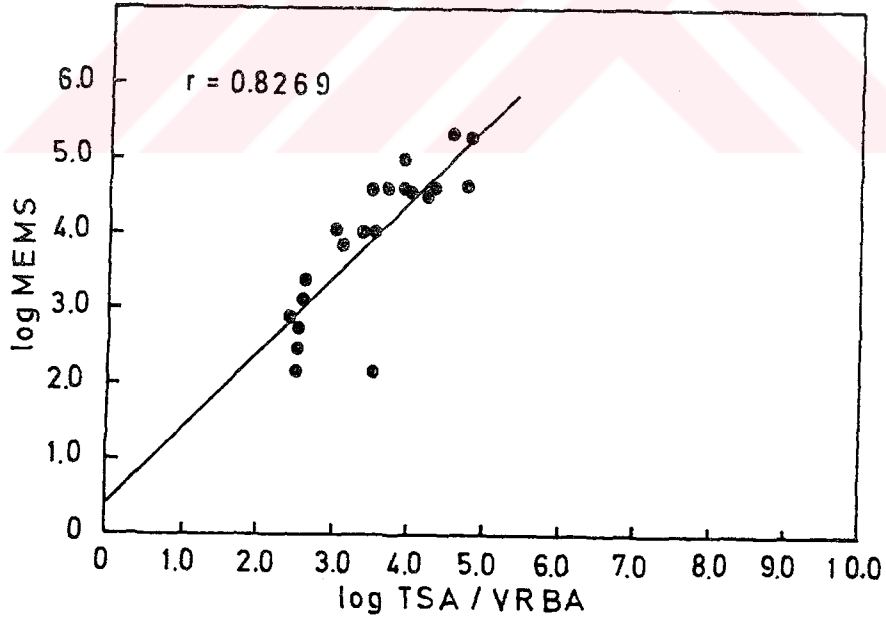
Şekil 4.28 : Dondurulmuş et örnekleri için,MDP yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.4377 + 0.8600 \log x$ ile ifade edilen regresyon değrusu ($r = 0.8735$).



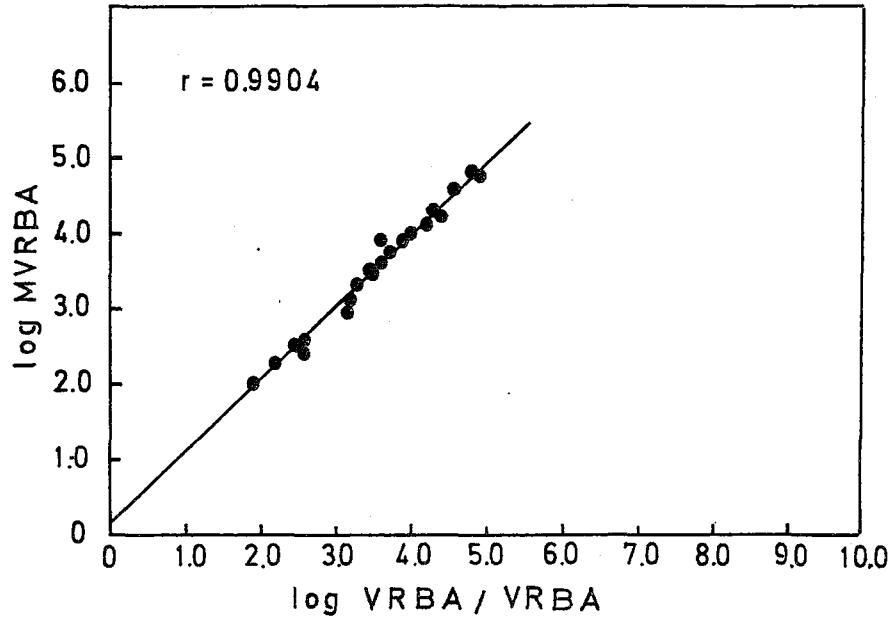
Şekil 4.29 : Dondurulmuş et örnekleri için,TSA/VRBA yöntemi ile VRBA/VRBA yönteminden elde edilen sonuç - ların karşılaştırılması ve $\log Y = -0.2064 + 1.0583 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğ - rusu ($r = 0.9771$).



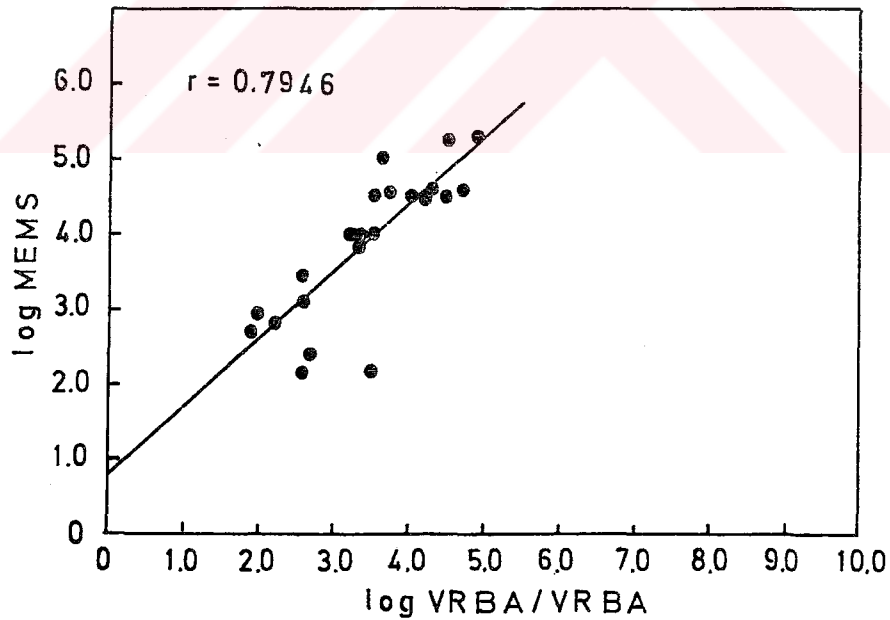
Şekil 4.30 : Dondurulmuş et örnekleri için, TSA/VRBA yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = -0.1722 + 1.0405 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.9902$).



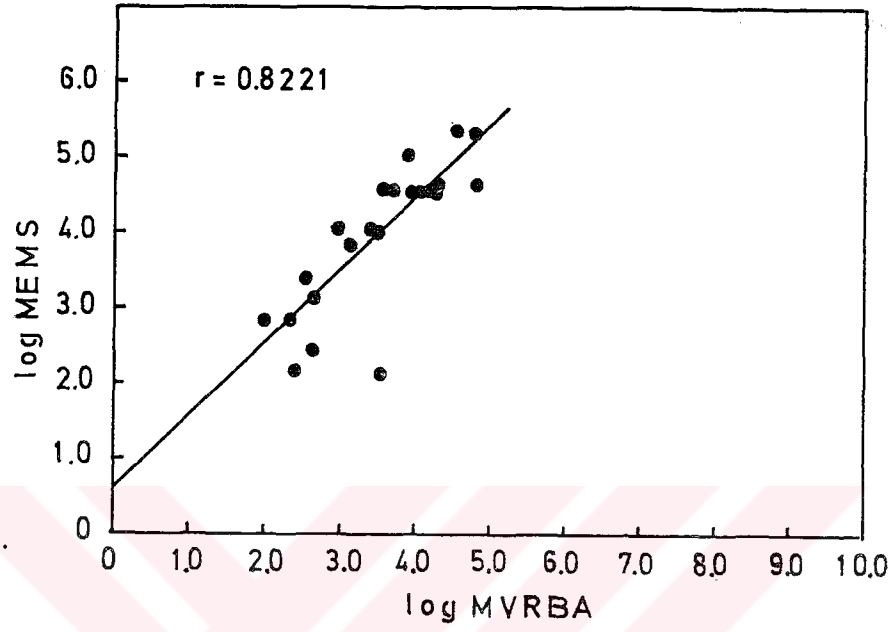
Şekil 4.31 : Dondurulmuş et örnekleri için, TSA/VRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.3233 + 1.0271 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8269$).



Şekil 4.32 : Dondurulmuş et örnekleri için, VRBA/VRBA yöntemi ile MVRBA yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.1096 + 0.9609 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.9904$).



Şekil 4.33 : Dondurulmuş et örnekleri için, VRBA/VRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.7335 + 0.9113 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.7946$).



Şekil 4.34 : Dondurulmuş et örnekleri için, MVRBA yöntemi ile MEMS yönteminden elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve $\log y = 0.5473 + 0.9717 \log x$ ile ifade edilen regresyon doğrusu ($r = 0.8221$).

4.3. Saf E.coli kültürlerinden hazırlanan stres olmayan ve stres formlarla yapılan çalışma sonuçları

4.3.1. Saf E.coli kültürlerine uygulanan bazı test sonuçları

Dondurulmuş et örneklerinden izole edilen on adet E.coli kültürünün bazı niteliklerinin saptanabilmesi amacıyla uygulanan testlerin sonuçları Çizelge 4.11'de topluca gösterilmiştir.

Çizelge 4.11: E.coli kültürlerine uygulanan biyokimyasal ve fizyolojik test^x sonuçları

Kültür No.	Hareket	I	M	V	C	Glu.	Lak.	Üre	Man.	Liz.	Arj.	Orn.
1	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
2	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
3	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
4	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
5	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
6	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
7	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
8	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
9	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
10	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+

(x) I : İndol
M : Metil Red
V : Voges-Proskauer
C : Sitrat
Glu:Glukoz
Lak. : Laktoz
Man. : Mannitol
Liz. : Lizin dekarboksilaz
Arj. : Arjinin dihidrolaz
Orn. : Ornitin dekarboksilaz

IMViC test sonuçları yönünden incelendiğinde izolatların tümünün Escherichia coli biyotip I olduğu görülmektedir (Anonymous, 1978 a). İzolatlar glukoz, laktoz, üre ve mannitol testlerinde benzer sonuçlar vermişlerdir. Lizin dekarboksilaz, arjinin dihidrolaz ve ornitin dekarboksilaz testlerinden ise bazı farklı sonuçlar alınmıştır. 1 numaralı kültür, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz testlerine, 2 numaralı kültür ornitin dekarboksilaz, 8, 9 ve 10 numaralı kültürler ise, arjinin dihidrolaz testlerine olumsuz cevap vermişlerdir. Çeşitli kaynaklarda E.coli biyotip I suşlarının bu üç teste değişken cevap verdikleri bildirilmektedir (Anonymous ; Ergüllü 1984).

4.3.2. Stres olmayan E.coli kültürleri ile ilgili sayım sonuçları

Dondurma işlemi uygulanmamış olan, stres olmayan saf E.coli kültürlerine altı farklı E.coli sayım yöntemi ve referans olarak alınan TSA dökme plaka yönteminin uygulanmasıyla alınan sayım sonuçlarıyla bunların hesaplanmış logaritma değerleri Çizelge 4.12 ve 4.13'de verilmiştir.

On farklı saf E.coli kültürüne ait sayım sonuçları, $34 \times 10^7 - 11 \times 10^9$ E.coli/ml arasında değişmektedir.

Sayım sonuçları esas alınarak yöntemlerin karşılaştırılmasında kullanılan istatistiksel parametrelere ilişkin özet bilgiler Çizelge 4.14'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12 : Stres olmayan kültürlere ilişkin sayım sonuçları
(E.coli/ml)^x

Kültür No	Sayım Yöntemleri ^{xxx}										Referans ^{xxx}
	AOAC/EMS	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS					
1	1100x10 ⁷	11x10 ⁸	136x10 ⁷	124x10 ⁷	148x10 ⁷	35x10 ⁷					287x10 ⁷
2	1100x10 ⁷	15x10 ⁸	190x10 ⁷	176x10 ⁷	207x10 ⁷	290x10 ⁷					240x10 ⁷
3	1100x10 ⁷	1425x10 ⁶	1545x10 ⁶	1676x10 ⁶	1626x10 ⁶	34x10 ⁷					109x10 ⁷
4	1100x10 ⁷	157x10 ⁷	169x10 ⁷	1943x10 ⁶	160x10 ⁷	1100x10 ⁷					196x10 ⁷
5	11x10 ⁷	127x10 ⁷	118x10 ⁷	140x10 ⁷	142.6x10 ⁷	21x10 ⁷					154x10 ⁷
6	1100x10 ⁷	129.5x10 ⁷	128x10 ⁷	135x10 ⁷	121x10 ⁷	1100x10 ⁷					126x10 ⁷
7	290x10 ⁷	135x10 ⁷	137x10 ⁷	135x10 ⁷	135x10 ⁷	290x10 ⁷					157x10 ⁷
8	290x10 ⁷	102x10 ⁷	117x10 ⁷	138x10 ⁷	130x10 ⁷	240x10 ⁷					127x10 ⁷
9	1100x10 ⁷	142x10 ⁷	36x10 ⁸	265x10 ⁷	245x10 ⁷	1100x10 ⁷					290x10 ⁷
10	1100x10 ⁷	159x10 ⁷	286x10 ⁷	268x10 ⁷	272x10 ⁷	1100x10 ⁷					255x10 ⁷

(x) Verilen her bir sayım sonucu üç paralel gelişmanın ortalamasıdır. Yalnızca MDP yöntemi iki paralel olarak çalışılmıştır.

(xxx) AOAC/EMS : AOAC'nin En Muhtemel Sayı Yöntemi (Anonymous, 1984 b).

MDP : Modifiye direkt plaka yöntemi (Holbrook et al., 1980).

TSA/VRBA : Tryptic Soy Agar/Violet Red Bile Agar dökme plaka yöntemi (Powers and Latt, 1979).

VRBA/VRBA: Violet Red Bile Agar/Violet Red Bile Agar dökme plaka yöntemi (Powers and Latt, 1979).

MVRBA : Modifiye VRBA yöntemi.

MEMS : Modifiye EMS yöntemi.

(xxx) Referans : TSA dökme plaka yöntemi.

Çizelge 4.13 : Stres olmayan kültürlerle ilişkin sayım sonuçlarının
(E.coli/ml) x Log₁₀ değerleri

ÖRNEK NO	Sayım Yöntemleri xx										Referansxxx
	AOAC/EMS	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS					
1	10.0414	9.0414	9.1335	9.0934	9.1702	8.5540	9.4579				
2	10.0414	9.1761	9.2787	9.2455	9.3160	9.4624	9.3802				
3	10.0414	9.1538	9.1890	9.2242	9.2111	8.5314	9.0394				
4	10.0414	9.1959	9.2280	9.2884	9.2041	10.0414	9.2922				
5	8.0414	9.1038	9.0718	9.1461	9.1541	8.3222	9.1875				
6	10.0414	9.1122	9.1072	9.1303	9.0827	10.0414	9.1003				
7	9.4624	9.1303	9.1367	9.1303	9.1303	9.4624	9.1959				
8	9.4623	9.0086	9.0681	9.1340	9.1140	9.3802	9.1038				
9	10.0414	9.1522	9.5563	9.4232	9.3891	10.0414	9.4624				
10	10.0414	9.2014	9.4563	9.4281	9.4345	10.0414	9.4065				

(x) Verilen her bir sayım sonucu üç paralel çalışmanın ortalamasıdır. Yalnızca MDP yöntemi iki paralel olarak çalışılmıştır.

(xx) AOAC/EMS : AOAC'nin En Muhtemel Sayı Yöntemi (Anonymous, 1984 b).
MDP : Modifiye Direkt Plaka Yöntemi (Holbrook et al., 1980).

TSA/VRBA : Triptik Soy Ağar/Violet Red Bile Agar dökme plaka yöntemi (Powers and Latt, 1979).
VRBA/VRBA : Violet Red Bile Agar/Violet Red Bile Agar dökme plaka yöntemi (Powers and Latt, 1979).

MVRBA : Modifiye VRBA yöntemi.
MEMS : Modifiye EMS yöntemi.

(xxx) Referans : TSA dökme plaka yöntemi.

Çizelge 4.14 : Stres olmayan E.coli kültürlerine ilişkin bazı istatistiksel parametreler^x

Yöntemler	Gözlem Sayısı	Ortalama	Varyans	Standart Sapma	Standart Hata	Kitle Ortalaması Güven Aralığı ^{xx}	
						Alt Sınır	Üst Sınır
AOAC/EMS	10	9.7256	0.4081	0.6388	0.2020	9.2653	10.1858
MDP	10	9.1275	4.0353×10^{-3}	0.0635	0.0200	9.0817	9.1732
TSA/VRBA	10	9.2225	0.0272	0.1651	0.0522	9.1035	9.3415
VRBA/VRBA	10	9.2243	0.0149	0.1223	0.0386	9.1362	9.3124
MVRBA	10	9.2206	0.0143	0.1197	0.0378	9.1343	9.3068
MEMS	10	9.3862	0.4778	0.6912	0.2186	8.8880	9.8848
Referans	10	9.2624	0.0251	0.1584	0.0500	9.1482	9.3765
Genel	70	9.3099	0.1063	0.3261	0.0389	9.2322	9.3877

(x) Hesaplamalar, sayım sonuçlarının Çizelge 4.13'deki logaritma değerleri esas alınarak yapılmıştır.

(xx) α : 0.05

Çizelge 4.14'ün incelenmesiyle, yöntemler genelinde sayım sonuçları ortalama değerlerinin 9.1275 ile 9.7256 arasında değiştiği, 70 gözlem sonucunun ortalamasının da 9.3099 olduğu görülmektedir. Standart sapma değerleri ise; MDP yöntemine ait 0.0635 ile MEMS yöntemine ait 0.6912 değerleri arasında, değişmektedir. Toplam 70 gözlemin kitle ortalaması güven aralığı (α : 0.05) ; $4.0969 < \mu < 4.2930$ olarak bulunmuştur.

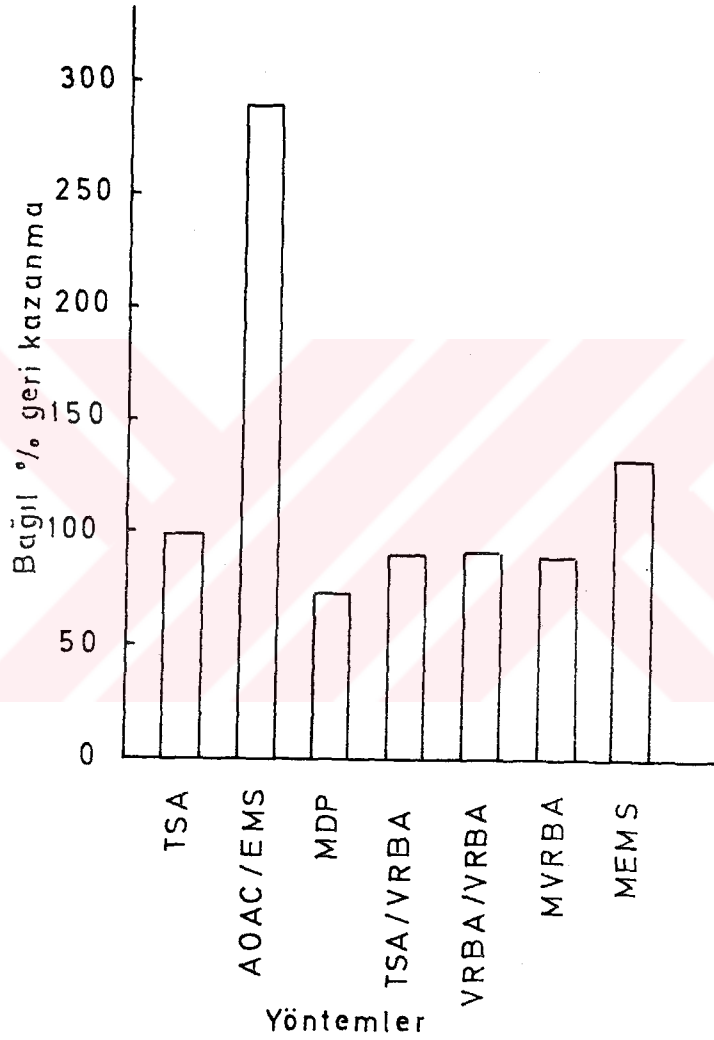
Stres olmayan saf E.coli kültürlerinden elde edilen sayım sonuçları kullanılarak, ilk aşamada altı farklı E.coli sayım yönteminin, sayım sonuçları % 100 kabul edilen referans TSA dökme plaka yöntemine göre ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri hesaplanarak, yöntemler karşılaştırılmışlardır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 : Stres olmayan E.coli hücreleri için bağıl yüzde geri kazanma oranları

Yöntemler	Bağıl % geri kazanma
AOAC/EMS	290.53
MDP	73.30
TSA/VRBA	91.22
VRBA/VRBA	91.60
MVRBA	90.82
MEMS	132.98
TSA ^x	100.00

(x) TSA dökme plaka yöntemi referans olarak ele alınmıştır.

Stres olmayan E.coli formlarının referans TSA dökme plaka yöntemine göre hesaplanan ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri Şekil 4.35 ' de gösterilmiştir.



Şekil 4.35 : Stres olmayan E.coli formlarına ait ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri (TSA dökme plaka yöntemi referans olarak ele alınmıştır).

Şekil 4.35 incelendiğinde görüleceği gibi stres olmayan E.coli formları ile çalışıldığında AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemlerinin referans olarak kabul edilen TSA dökme plaka yöntemine göre daha yüksek ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri verdiği saptanmıştır.

Direkt plaka sayım yöntemleri olan TSA/VRBA, VRBA/VRBA, MVRBA yöntemlerinin birbirine yakın ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri verdiği görülmüştür. MDP yöntemi ise bu üç yöntemden daha düşük düzeyde bir ortalama bağıl geri kazanma yüzdesi vermiştir.

Powers ve Latt'in (1979), yapmış oldukları benzer bir çalışmada, stres olmayan E.coli formlarının referans olarak alınan TSA dökme plaka yöntemine göre, TSA/VRBA yönteminin VRBA/VRBA yönteminden daha yüksek bağıl geri kazanma yüzdesi verdiği bildirilmektedir. Aynı şekilde araştırmada kullanılan EMS yönteminin sonuçları % 100 olarak kabul edildiğinde TSA/VRBA yönteminin daha yüksek bağıl geri kazanma yüzdesi verdiği bildirilmektedir.

Stres olmayan E.coli formları için, AOAC nin EMS ve MEMS yöntemlerinde yüksek ortalama bağıl geri kazanma oranlarının elde edilmesi bu iki yöntemin diğer direkt plaka yöntemlerinden farklı olarak sıvı besiyerlerini kullanması şeklinde açıklanabilir.

Daha sonraki aşamada, referans yöntemde dahil olmak üzere çalışmada kullanılan tüm E.coli sayım yöntemlerine Bonfer-

roni çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yöntemler birbirleri ile karşılaştırılmışlardır (Miller, 1966 ; Schafer and Macready, 1975 ; Şanlıtürk, 1986).

Bonferroni testinin sonuçları Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16 : Stres olmayan saf E.coli kültürleri için Bonferroni çoklu karşılaştırma testi (P : 0.05)

	MVRBA	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	Referans	MEMS	AOAC/EMS
MDP	E ^x	E	E	E	E	N ^{xx}
MVRBA		E	E	E	E	N
TSA/VRBA			E	E	E	N
VRBA/VRBA				E	E	N
Referans					E	E
MEMS						E

(x) E: Eşit : (Equal)

(xx) N: Eşit değil (Not equal)

Bonferroni çoklu karşılaştırma testinin sonuçlarına göre AOAC'nin EMS yöntemi ile MDP yöntemi, MVRBA yöntemi, TSA/VRBA yöntemi ve VRBA/VRBA yöntemi arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

En yüksek ortalama değerini veren AOAC'nin EMS yöntemi ile MEMS yöntemi arasında ise istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır. Bu durumda AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemlerinin stres olmayan E.coli kültürlerinin sayımında diğer yöntemlere kıyasla daha üstün olduğu söylenebilir.

4.3.3. Stres E.coli kültürleri ile ilgili sayım sonuçları Dondurularak stres formları hazırlanmış olan saf E.coli kültürlerine altı farklı E.coli sayım yöntemi ve referans olarak alınan TSA dökme plaka yönteminin uygulanmasıyla elde edilen sayım sonuçlarıyla bunların hesaplanan logaritma değerleri Çizelge 4.17 ile 4.18'de verilmiştir.

On farklı saf stres E.coli kültürüne ait sayım sonuçları 9×10^7 - 290×10^7 E.coli/ml arasında değişmektedir.

Sayım sonuçları esas alınarak yöntemlerin karşılaştırılmasında kullanılan istatistiksel parametrelere ilişkin özet bilgiler Çizelge 4.19'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.18'in incelenmesiyle, yöntemler genelinde sayım sonuçları ortalama değerlerinin 8.7121 ile 9.0104 arasında değiştiği, 70 gözlem sonucunun ortalamasının da 8.9326 olduğu görülmektedir. Standart sapma değerleri ise; AOAC'nin EMS yöntemine ait 0.4783 ile MDP yöntemine ait 0.1427 değerleri arasında değişmektedir. Toplam 70 gözlemin kitle ortalaması güven aralığı ($\alpha : 0.05$) ; $8.8798 < \mu < 8.9854$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.17 : Stres kültürlerine ilişkin sayım sonuçları (E.coli/ml)^x

Kültür No.	Sayım yöntemleri xx							Referans xxx
	AOAC/EMS	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS		
1	27x10 ⁷	54x10 ⁷	51x10 ⁷	68x10 ⁷	65x10 ⁷	20x10 ⁷	64x10 ⁷	
2	35x10 ⁷	140x10 ⁷	110x10 ⁷	131x10 ⁷	132x10 ⁷	28x10 ⁷	128x10 ⁷	
3	35x10 ⁷	88.5x10 ⁷	91x10 ⁷	83.5x10 ⁷	883.3x10 ⁷	28x10 ⁷	100x10 ⁷	
4	44x10 ⁷	115.5x10 ⁷	93.6x10 ⁷	101x10 ⁷	101.3x10 ⁷	53x10 ⁷	125x10 ⁷	
5	9.1x10 ⁷	75.5x10 ⁷	83x10 ⁷	15x10 ⁷	9x10 ⁷	9.1x10 ⁷	118x10 ⁷	
6	290x10 ⁷	94.5x10 ⁷	99x10 ⁷	98x10 ⁷	94.6x10 ⁷	290x10 ⁷	112x10 ⁷	
7	210x10 ⁷	88x10 ⁷	88x10 ⁷	95x10 ⁷	89x10 ⁷	160x10 ⁷	132x10 ⁷	
8	64x10 ⁷	119x10 ⁷	112x10 ⁷	89x10 ⁷	89x10 ⁷	53x10 ⁷	117x10 ⁷	
9	120x10 ⁷	141x10 ⁷	181x10 ⁷	200x10 ⁷	185x10 ⁷	75x10 ⁷	230x10 ⁷	
10	210x10 ⁷	157x10 ⁷	180x10 ⁷	177x10 ⁷	191x10 ⁷	95x10 ⁷	242x10 ⁷	

(x) Verilen her bir sayım sonucu üç paralel çalışmanın ortalamasıdır. Yalnızca MDP yöntemi iki paralel olarak çalışılmıştır.

(xx) AOAC/EMS : AOAC'nin En Muhtemel Sayı Yöntemi (Anonymous 1984 b).

MDP : Modifiye direkt plaka yöntemi (Holbrook et al., 1980).

TSA/VRBA : Tryptic Soy Ayar/Violet Red Bile Agar dökme plaka yöntemi (Powers and Latt,1979).

VRBA/VRBA: Violet Red Bile Agar/Violet Red Bile Agar dökme plaka yöntemi (Powers and Latt,1979).

MVRBA : Modifiye VRBA yöntemi.

MEMS : Modifiye EMS yöntemi.

(xxx) Referans : TSA dökme plaka yöntemi.

Çizelge 4.18 : Stres kültürlerle ilişkin sayım sonuçlarının (E.coli/ml) ^x
Log₁₀ değerleri

Kültür No.	Yöntemler xx							Referans
	AOAC/EMS	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS		
1	8.4313	8.7324	8.7075	8.8325	8.8130	8.3010	8.8061	
2	8.5440	9.1461	9.0414	9.1172	9.1205	8.4471	9.1072	
3	8.5440	8.9469	8.9590	8.9220	8.9450	8.4471	9.0000	
4	8.6434	9.0607	8.9712	9.0043	8.0050	8.7242	9.0970	
5	7.9590	8.8780	8.9190	8.1761	7.9542	7.9590	9.0718	
6	9.4624	8.9754	8.9956	8.9912	8.9759	9.4024	9.0492	
7	9.3222	8.9444	8.9444	8.9777	8.9494	9.2041	9.1205	
8	8.8061	9.0755	9.0492	8.9494	8.9494	8.7242	9.0681	
9	9.0791	9.1492	9.2576	9.3010	9.2671	8.8750	9.3617	
10	9.3222	9.1959	9.2552	9.2480	9.2810	8.9777	9.3838	

(x) Verilen her bir sayım sonucu üç paralel çalışmanın ortalamasıdır. Yalnızca MDP yöntemi iki paralel olarak çalışılmıştır.

(xx) AOAC/EMS : AOAC'nin En Muhtemel Sayı Yöntemi (Anonymous, 1984 b).

MDP : Modifiye Direkt Plaka Yöntemi (Holbrook et al., 1980).

TSA/VRBA : Triptik Soy Agar/Violet Red Bile Agar dökme plaka yöntemi (Powers and Latt, 1979).

VRBA/VRBA: Violet Red Bile Agar/Violet Red Bile Agar dökme plaka yöntemi (Powers and Latt, 1979).

MVRBA : Modifiye VRBA Yöntemi.

MEMS : Modifiye EMS Yöntemi.

(xxx) Referans : TSA dökme plaka yöntemi.

Çizelge 4.19 : Stres E.coli kültürlerine ilişkin bazı istatistiksel parametreler^x

Yöntemler	Gözlem Sayısı	Ortalama	Varyans	Standart Sapma	Standart Hata	Kitle Ortalaması	
						Alt Sınır	Üst Sınır
AOAC/EMS	10	8.8113	0.2288	0.4783	0.1512	8.4667	9.1559
MDP	10	9.0104	0.0203	0.1427	0.0451	8.9076	9.1132
TSA/VRBA	10	9.0100	0.0258	0.1606	0.0508	8.8942	9.1257
VRBA/VRBA	10	8.9519	0.0954	0.3089	0.0976	8.7293	9.1744
MVRBA	10	8.9260	0.1386	0.3723	0.1177	8.6578	9.1942
MEMS	10	8.7121	0.1976	0.4445	0.1405	8.3918	9.0324
Referans	10	9.1065	0.0277	0.1666	0.0526	8.9865	9.2265
Genel	70	8.9326	0.0490	0.2215	0.0264	8.8798	8.9854

(x) Hesaplamalar, sayım sonuçlarının Çizelge 4.18'deki logaritma değerleri esas alınarak yapılmıştır.

(xx) σ : 0.05

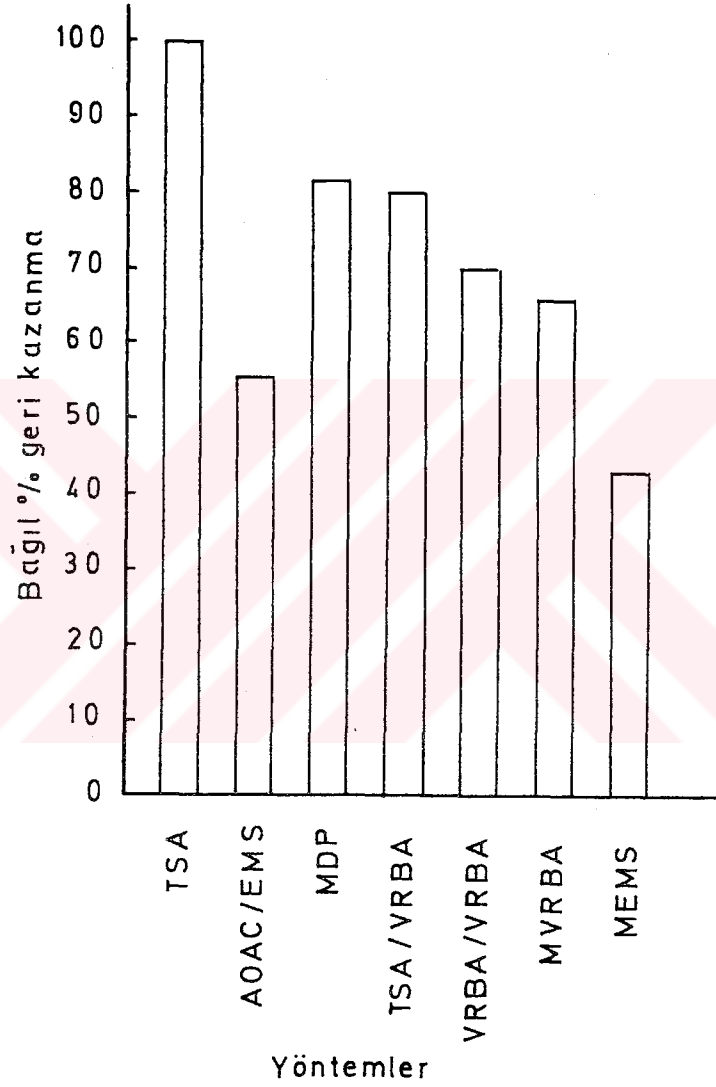
Stres saf E.coli kültürlerinden elde edilen sayım sonuçları kullanılarak, ilk aşamada altı farklı E.coli sayım yönteminin, sayım sonuçları % 100 kabul edilen referans TSA dökme plaka yöntemine göre ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri hesaplanarak, yöntemler karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20 : Stres E.coli hücreleri için bağıl yüzde geri kazanma oranları

Yöntemler	Bağıl % geri kazanma
AOAC/EMS	50.67
MDP	80.14
TSA/VRBA	80.07
VRBA/VRBA	70.04
MVRBA	65.99
MEMS	40.32
TSA ^x	100.00

(x) TSA dökme plaka yöntemi referans olarak ele alınmıştır.

Stres E.coli formlarının referans TSA dökme plaka yöntemine göre hesaplanan ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri Şekil 4.36'da gösterilmiştir



Şekil 4.36 : Stres E.coli formlarına ait ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri (TSA dökme plaka yöntemi referans olarak ele alınmıştır).

Şekil 4.36 incelendiğinde görüleceği gibi, stres E.coli formları ile çalışıldığında AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemlerinin, referans olarak kabul edilen TSA dökme plaka yöntemine göre en düşük ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri verdiği bulunmuştur. En yüksek ortalama bağıl geri kazanma oranlarını MDP ve TSA/VRBA (% 80.14 ve % 80.07) yöntemleri vermiştir. VRBA/VRBA ve MVRBA yöntemlerinin ise, birbirlerine yakın olmakla beraber MDP ve TSA/VRBA yöntemlerinden daha düşük ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri verdikleri görülmektedir.

Powers ve Latt'ın (1979), yapmış oldukları benzeri bir çalışmada, -40 °C'de dondurarak stres hale getirdikleri E.coli formlarına referans olarak alınan TSA dökme plaka yöntemine göre bağıl geri kazanma yüzdeleri hesaplanmıştır. TSA/VRBA yöntemlerinin VRBA/VRBA yöntemine göre çok yüksek bir bağıl geri kazanma oranı gösterdiği bildirilmektedir. Aynı şekilde, araştırmada kullanılan EMS yönteminin sonuçları % 100 olarak kabul edildiğinde, TSA/VRBA yönteminin yine çok yüksek bir bağıl geri kazanma yüzdesi verdiği rapor edilmektedir.

Değerlendirmenin daha sonraki aşamasında, referans yöntemde dahil olmak üzere, çalışmada kullanılan tüm E.coli sayım yöntemlerine Bonferroni çoklu karşılaştırma testi uygulanarak yöntemler birbirleri ile karşılaştırılmışlardır (Miller, 1966 ; Schafer and Macready, 1975 ; Şanlıtürk, 1986).

Bonferroni testinin sonuçları Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.21 : Stres saf E.coli kültürleri için
Bonferroni çoklu karşılaştırma testi
(P : 0.05)

	AOAC/EMS	MVRBA	VRBA/VRBA	TSA/VRBA	MDP	Referans
MEMS	E ^x	E	E	E	E	N ^{xx}
AOAC/EMS		E	E	E	E	E
MVRBA			E	E	E	E
VRBA/VRBA				E	E	E
TSA/VRBA					E	E
MDP						E

(x) E : Eşit : (Equal)

(xx)N : Eşit değil : (Not equal)

Bonferroni çoklu karşılaştırma testinin sonuçlarına göre, MEMS yöntemi ile referans yöntem arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). TSA gibi genel amaçlı bir katı besiyerini kullanan referans yöntemle elde edilen sayım sonucu ortalaması, MEMS yönteminden elde edilen sayım sonucu ortalamasına göre daha yüksektir.

Stres formların sayımında en yüksek ortalama değerini veren ve katı besiyerlerini kullanan MDP ile TSA/VRBA yöntemlerinin, AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemlerine kıyasla daha üstün olduğu söylenebilir.

Stres olmayan ve stres E.coli formları ile yapılan çalışmalar genel olarak incelendiğinde, stres olmayan formlarda en yüksek sayım sonucu ortalamalarını sırasıyla AOAC'nin EMS yöntemi ve MEMS yöntemi gösterirken, aynı kültürlerin dondurularak stres hale getirilmiş formlarında ise, en yüksek sayım sonucu ortalamasını MDP ve TSA/VRBA yöntemlerinin verdiği görülmektedir. Bu durumun büyük ölçüde MDP ve TSA/VRBA yöntemlerinin stres hücreleri geri kazanmadaki üstünlüklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.3.4 : Stres olmayan ve stres E.coli formları sayım sonuçlarından ölüm ve geri kazanma yüzdelerinin hesaplanması

Stres olmayan ve dondurularak stres hale getirilmiş E.coli formları sayım sonuçlarından ölüm ve geri kazanma yüzdelere - ninin hesaplanmasında şu eşitliklerden yararlanılmıştır (Powers and Latt, 1979; Draughon and Nelson, 1981).

$$\% \text{ Ölüm} = 100 \times \left[\frac{\text{Donmadan önceki sayı} - \text{Donmadan sonraki sayı}}{\text{Donmadan önceki sayı}} \right]$$

$$\% \text{ Geri kazanma} = 100 - \% \text{ ölüm}$$

Yukarıdaki eşitliklerin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar Çizelge 4.22 ve 4.23'de verilmiştir. Geri kazanma oranları TSA dökme plaka yöntemiyle alınan sonuç % 100 kabul edilerek hesaplanmış ve değerlendirme sonuçları Şekil 4.37'de gösterilmiştir.

Şekil 4.37'ye göre en düşük ortalama geri kazanma yüzdesi AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemlerinde elde edilirken, en yüksek geri kazanma yüzdesini MDP yönteminin verdiği saptanmıştır.

Çizelge 4.22: E.coli kültürlerinin stres olmayan ve stres formları kullanılarak elde edilen % ölüm sonuçları

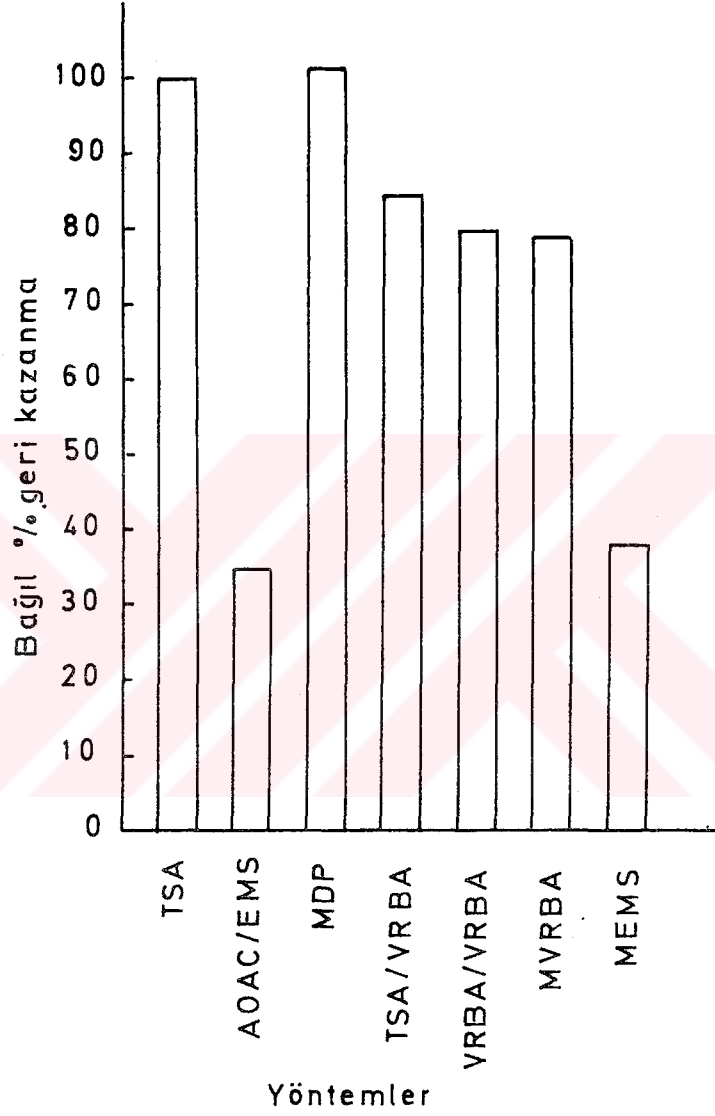
Kültür No.	Yöntemler						
	TSA ^x	AOAC/EMS	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS
1	78	97	51	62	45	56	75
2	47	97	7	42	25	36	90
3	8.2	97	38	41	44	46	18
4	36	96	26	45	48	36	95
5	23	17	40	30	90	94	57
6	11	74	27	23	28	22	74
7	16	27	35	36	30	34	45
8	8	78	14	4.2	35	31	78
9	21	89	0.7	50	24	24	93
10	5	81	1.2	37	34	30	91
GENEL	25.3	75	24	37	40.3	40.9	71.6

(x) TSA dökme plaka yöntemi % 100 olarak ele alınmıştır.

Çizelge 4.23 : E.coli kültürlerinin stres olmayan ve stres formları kullanılarak elde edilen bağıl % geri kazanma oranları

Kültür No.	Y ö n t e m l e r						
	TSA ^x	AOAC/EMS	MDP	TSA/VRBA	VRBA/VRBA	MVRBA	MEMS
1	22	3	49	38	55	44	25
2	53	3	93	58	75	64	10
3	91.8	3	62	59	56	54	82
4	64	4	74	55	52	64	5
5	77	83	60	70	10	6	43
6	89	26	73	77	72	78	26
7	84	73	65	64	70	66	55
8	92	22	86	95.8	65	69	22
9	79	11	99.3	50	76	76	7
10	95	19	98.8	63	66	70	9
GENEL	74.7	25	76	63	59.7	59.1	28.4

(x) TSA dökme plaka yöntemi % 100 olarak ele alınmıştır.



Şekil 4.37 : Araştırmaya alınan yöntemler için stres olmayan ve dondurularak stres hale getirilmiş E.coli formlarının sayım sonuçlarından yararlanılarak hesaplanan bağıl geri kazanma yüz - deleri.

Araştırmanın bu aşamasında saf E.coli kültürleri ile çalışılarak gıda maddesinin doğasından ya da görmüş olduğu işlemin gıdaya kazandırdığı özelliklerden kaynaklanabilecek herhangi bir etkileşimin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Bu aşamada elde edilen sonuçlar çiğ süt örnekleri ve dondurulmuş et örneklerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında gıdanın doğasından gelebilecek etkileşimlerin önemli olduğunu düşündürmektedir.



5. SONUÇ

Gıdalarda fekal kontaminasyonun en önemli göstergesi olarak kabul edilen E.coli 'nin belirlenmesi ve sayımı için, şu anda geçerli olan klasik yöntemlerin uygulanmasında karşılaşılan güçlükler, bu konuda hızlı, güvenilir ve ekonomik yeni seçenek yöntem arama ve bunları standartlara yerleştirme çabaları, araştırma konumuzun seçiminde bizi yönlendiren ana öğeler olmuştur.

Araştırmada seçilen E.coli sayım yöntemlerinin özellikleri de göz önüne alınarak, önce işlem görmemiş bir gıda maddesi olan çiğ süt ile dondurulmuş et olmak üzere ayrı iki gıda çeşidi ile çalışılmıştır. Daha sonraki aşamada gıda maddesinden ya da gıda maddesine uygulanacak işlemlerden kaynaklanabileceği düşünülen etkileşimi ortadan kaldırmak amacıyla, dondurulmuş etlerden izole edilen saf E.coli kültürlerinin, hazırlanan stres olmayan ve stres formlarıyla denemeler tekrarlanmıştır.

Araştırma bulguları, çalışılan materyaller bazında ve genel olarak irdelendiğinde elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir :

- Çiğ süt örnekleri ile çalışıldığında, karşılaştırılan E.coli sayım yöntemleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır. Seçenek olarak çalışmaya alınan yöntemlerin en az klasik yöntemler kadar duyarlı sonuçlar verebileceğini ortaya çıkaran bu durum, çiğ süt örnekleri için en uygun yöntemin seçilmesi konusunda, yöntemin tamam-

lanabilmesi için geçen süre, maliyet ve uygulama kolaylığı gibi faktörlerin incelenmesini gerekli kılmıştır. Bu faktörlerden hangisinin ön planda tutulacağı, büyük ölçüde karşılaşılan sorunun tipi ve ivediliği ile yöntemi uygulayan kurum ya da kişi ve bunların laboratuvar olanaklarına bağlı olacaktır.

Tamamlanma süresi tek başına ele alınıp, yöntemler karşılaştırıldığında MDP yönteminin üstün olduğu söylenebilir. Sürenin kısalığı açısından bu yöntemi sırasıyla TSA/VRBA, MEMS, VRBA/VRBA, MVRBA yöntemleri izlemektedir. AOAC' nin EMS yöntemi ise bu yönden incelendiğinde, en uzun sürede tamamlanabilen yöntem olarak görülmektedir.

MDP yöntemi her ne kadar çok kısa bir sürede tamamlanabiliyorsa da maliyeti yükseltmekte ve uygulamada bir takım güçlükler neden olabilmektedir.

Kesin bir maliyet analizi yapılmamış olmakla beraber, yöntemler maliyet ve uygulama kolaylığı açısından karşılaştırıldıklarında sırasıyla VRBA/VRBA, MVRBA, TSA/VRBA ve MEMS yöntemlerinin üstün olduğu söylenebilir.

Diğer araştırmacılarında değindiği gibi, TSA/VRBA yönteminde kolonilerin her zaman tam tipik bir görünüm vermedikleri gözlenmiştir (Powers and Latt, 1979). Bu durumdan kaynaklanabilecek yanlışları en aza indirmek için besiyeri formülünün iyileştirilmesi üzerine çalışmaların yapılması gerekli görülmektedir.

AOAC'nin EMS yöntemi çiğ süt örnekleri için tamamlanma süresi, maliyet, uygulama kolaylığı gibi özellikler ele alındığında uygun bir yöntem olarak görülmemektedir.

- Dondurulmuş et örnekleri ile çalışıldığında, yöntemler istatistiksel açıdan kendi içlerinde farklılaşmayan ancak birbirleri ile istatistiksel açıdan aralarındaki fark önemli bulunan iki grupta oluşturulmuşlardır. Bunlar daha yüksek sayım sonucu ortalamalarını veren AOAC'nin EMS, MDP ve MEMS yöntem grubu ile TSA/VRBA, VRBA/VRBA ve MVRBA yöntem grubudur. İstatistiksel açıdan aralarında önemli bir fark bulunmamakla birlikte, ilk grupta en yüksek sayım sonucu ortalamasını MDP yönteminin verdiği bulunmuştur.

Sürenin önemli olduğu durumlarda, dondurulmuş et örnekleri için MDP yöntemi önerilebilir.

İstatistiksel açıdan aralarında fark önemli bulunan TSA/VRBA, VRBA/VRBA ve MVRBA yöntem grubuna göre daha yüksek sayım sonucu ortalaması veren ve AOAC'nin EMS yöntemine göre çok kısa sürede tamamlanan MEMS yöntemi, dondurulmuş et için önerilebilecek diğer bir yöntemdir.

- Elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, MDP yönteminin işlem görmüş ya da görmemiş gıda maddelerindeki E.coli'lerin sayımında en kısa sürede tamamlanabilen bir yöntem olduğu görülmektedir. Bu nedenle maliyetin önemsiz olduğu ivedi bir sorunla karşılaşıldığı durumlarda bu yönteme başvurulabileceği söylenebilir.

AOAC'nin EMS, TSA/VRBA, VRBA/VRBA ve MVRBA yöntemleri so -
nucunda E.coli izolatları ile yapılan çalışmalarda, izolat -
ların büyük bir çoğunluğunun, E.coli biyotip I (+ + - -) ya
da indol pozitif sonuç veren E.coli suşları olması bu yön -
temlerin tamamlanmasında tek başına indol testinin yeter -
li olabileceğini düşündürmektedir.

- Dondurulmuş et örneklerinden izole edilerek hazırlanan
stres olmayan E.coli formları ile yapılan çalışmada AOAC' -
nin EMS yöntemi en yüksek sayım sonucu ortalamasını ve -
rerek, MDP, MVRBA, TSA/VRBA, VRBA/VRBA yöntemlerinden ista -
tistiksel açıdan farklı bulunurken, MEMS yöntemi ile
aralarında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunma -
mıştır.

TSA dökme plaka yöntemi referans olarak ele alındığında,
yöntemler arasında AOAC'nin EMS ve MEMS yöntemlerinin da -
ha yüksek bağıl geri kazanma yüzdeleri verdiği saptanmış -
tır.

- Dondurulmuş et örneklerinden izole edilen ve donduru -
larak stres formları hazırlanan E.coli kültürleri ile ça -
lışıldığında ise; genel olarak yöntemler arasında ista -
tistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamakla beraber, en
yüksek sayım sonucu ortalamasını özellikle stres hücrele -
rin geri kazanılabilmesi amacıyla geliştirilmiş olan MDP
ve TSA/VRBA yöntemlerinin verdiği saptanmıştır.

TSA dökme plaka yöntemi referans olarak ele alındığında
yöntemler arasında MDP ve TSA/VRBA yöntemlerinin daha yük -

sek ortalama bağıl geri kazanma yüzdeleri verdikleri sap -
tanmıştır.

- Son aşamada stres olmayan ve stres E.coli formları sayım sonuçlarından yararlanılarak, bir formül yardımıyla her bir yöntemin geri kazanma oranları referans dökme plaka yöntemine göre bağıl olarak hesaplanmıştır. Sonuçta MDP ve TSA/VRBA yöntemlerinin diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek yüzde geri kazanma oranları verdiği ve bu nedenle de bu yöntemlerin stres olmayanların yanısıra stres E.coli hücrelerini de saymada başarılı olduğu söylenebilir.

- Saf E.coli kültürleriyle elde edilen bu sonuçlar, çiğ süt örnekleri ve dondurulmuş et örneklerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, E.coli sayımında gıdanın doğasından ya da görmüş olduğu işlemin gıdaya kazandıracığı özelliklerden kaynaklanabilecek etkileşimlerin önemli olduğu düşünülmektedir.

- E.coli sayım yöntemlerinin gıda maddesinin yapısına ve gıdaya uygulanan işlemlere göre farklı sonuçlar verebileceği dikkate alınarak, her bir gıda çeşidi için bu yönde seçilecek sayım yöntemleri arasında en uygun olanının saptanması amacıyla, örnek sayısının da artırılacağı karşılaştırmalı araştırmaların yapılması gerekli görülmektedir.

Bu karşılaştırmalı çalışmalardan elde edilecek sonuçların değerlendirilerek ilgili gıda standartlarına yansıtılması önerilebilir.

Belirlenecek hızlı, güvenilir ve ekonomik E.coli sayım yöntemlerinin gıda işletmelerindeki hijyenik kaliteyi ortaya koyma ile, daha sağlıklı ve güvenilir bir gıda üretiminde de yararlı olacağı düşünülmektedir.

Diğer taraftan, ülkemizdeki gıda üretim koşulları ülke genelinde sosyo-ekonomik ve kültürel düzeyde ele alınıp incelendiğinde, tüzük ve standartlardaki bazı gıda maddeleri için hijyenik kalite ile ilgili sınırlamaların yeniden, daha gerçekçi bir yaklaşımla değerlendirilmesi ve bu yönde gerekli önlemlerin alınması gerektiği düşünülmektedir.

EK AÇIKLAMALAR - A

ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ, DİLÜSYON SIVILARI
VE ÇÖZELTİLERA.1. EC Broth besiyeri (Escherichia coli broth besiyeri)

Triptoz	20.0 g
Laktoz	5.0 g
Bile Salts (Safratuzları) No.3	1.5 g
Dipotasyum fosfat	4.0 g
Monopotasyum fosfat	1.5 g
Sodyum klorür	5.0 g

pH 6.9 ± 0.2 (25 °C)

Yukarıda belirtilen maddelerin 1000 ml damıtık su içerisinde, sıcak su banyosunda ısıtılarak çözünmesi sağlanmıştır. Besiyeri, içerisinde Durham tüpü bulunan deney tüplerine 10'ar ml aktarılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

A.2. EMB Agar besiyeri (DIFCO)

Pepton	10.0 g
Laktoz	5.0 g
Sukroz	5.0 g
Dipotasyum fosfat	2.0 g
Agar	13.5 g
Eosin y.	0.4 g
Metilen mavisi	0.065 g

pH 7.2 ± 0.2 (25 °C)

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 36 g tartılarak 1000 ml damıtık su içinde kaynar su banyosunda çözünmesi sağlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

A.3. Glukoz Fosfat Broth besiyeri

Pepton	5.0 g
D - glukoz	5.0 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	5.0 g

pH 7.5

Karışım, 1000 ml damıtık su içerisinde, sıcak su banyosunda çözülmüş ve 5 ml miktarlarda deney tüplerine dağıtılarak 121 °C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

A.4. Lauril Sülfat Triptoz Broth besiyeri

Triptoz	20.0 g
Dipotasyum hidrojen fosfat	2.75 g
Potasyum dihidrojen fosfat	2.75 g
Sodyum klorür	5.0 g
Sodyum lauril sülfat	0.1 g
Laktoz	5.0 g

pH 6.8 \pm 0.2 (25 °C)

Karışımın 1000 ml damıtık su içerisinde, sıcaksu banyosunda çözünmesi sağlanıp 10 ml miktarlarda içerisinde Durham tüpü bulunduran deney tüplerine dağıtılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

A.5. Nutrient Agar besiyeri (Holbrook, et al., 1980)

Pepton	5.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Lab-Lemco (Et özütü)	4.0 g
Agar	15.0 g

pH 7.2

Bileşenlerin 1000 ml damıtık su içerisinde, kaynar su banyosunda çözünmesi sağlandıktan sonra besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

A.6. Nutrient Broth besiyeri

Lab-Lemco (Et özütü)	10.0 g
Pepton	10.0 g
Sodyum klorür	5.0 g

pH 7.5

Bileşenlerin 1000 ml damıtık su içerisinde, sıcak su banyosunda çözünmesi sağlandıktan sonra, tüplere 10'ar ml olarak dağıtılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

A.7. Plate Count Agar (Tryptone Glucose Yeast Agar)
besiyeri

Tripton	5.0 g
Maya Özütü	2.5 g
D-glukoz	1.0 g
Agar	15.0 g

pH 7.0 ± 0.2 (25 °C)

Yukarıda belirtilen bileşenlerin 1000 ml damıtık su içerisinde kaynar su banyosunda çözünmesi sağlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

A.8. Simmons Sitrat Agar besiyeri (DIFCO)

Magnezyum sülfat	0.2 g
Amonyum dihidrojen fosfat	1.0 g
Dipotasyum fosfat	1.0 g
Sodyum sitrat	2.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Agar	15.0 g
Bromtimol mavisi	0.08 g

pH 6.8 ± 0.2 (25 °C)

Bileşimi verilen hazır besiyerinden 24.2 g tartılıp 1000 ml damıtık su içerisinde, kaynar su banyosunda çözünmesi sağlanmış ve tüplere 5-6 ml miktarlarda dağıtıldıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Sterilizasyondan sonra besiyerinin yatık olarak katılaşması sağlanmıştır.

A.9. Tripton Bile Agar besiyeri (Anderson and Baird-Par - ker, 1975)

Tripton	20.0 g
Bile Salts (Safra tuzları) No.3	1.5 g
Agar	15.0 g

pH 7.2

Yukarıda belirtilen bileşenlerin 1000 ml damıtık su içerisinde, kaynar su banyosunda çözünmesi sağlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

A.10. Triptik Soy Agar (Soybean-Kazein Digest Agar) besiyeri (DIFCO)

Tripton	15.0 g
(Pancreatic digest of casein)	
Soytone	5.0 g
(Papain digest of soybean meal)	
Sodyum klorür	5.0 g
Agar	15.0 g

pH 7.3 ± 0.2 (25 °C)

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 40 g tartılıp 1000 ml destile su içinde kaynar su banyosunda

çözünmesi sağlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

A.11. Triptik Soy Broth besiyeri

Tripton (Pancreatic digest of casein)	17.0 g
Soyton (Papain digest of soybean meal)	3.0 g
Glukoz	2.5 g
Sodyum klorür	5.0 g
Dipotasyum fosfat	2.5 g

pH 7.3 \pm 0.2 (25 °C)

Karışımın 1000 ml damıtık su içerisinde, sıcak su banyosunda çözünmesi sağlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

A.12. Pepton Water besiyeri

Tripton	10.0 g
Sodyum klorür	5.0 g

pH 7.2 \pm 0.2 (25 °C)

Bileşenlerin 1000 ml damıtık su içerisinde, sıcak su banyosunda çözünmesi sağlanıp, 5 ml miktarlarda deney tüplerine dağıtılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

A.13. Violet Red Bile Agar besiyeri (OXOID)

Maya özütü	3.0 g
Pepton	7.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Bile Salts (Safra tuzları) No.3	1.5 g
Laktoz	10.0 g
Nötral red	0.03 g
Kristal violet	0.002 g
Agar	12.0 g

pH 7.4

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 38.5 g tartılıp 1000 ml damıtık su içerisinde, kaynar su banyosunda çözünmesi sağlanmıştır. Bu besiyerinin sterilizasyonu kaynar su banyosunda, besiyerinin sık sık karıştırılarak 30 dk tutulması ile sağlanmıştır.

A.14. Tamponlu Pepton Suyu Dilüsyon Sıvısı (T.S. 3446)

Pepton	10.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Disodyumhidrojen fosfat	9.0 g
Potasyum dihidrojen fosfat	1.5 g

pH 7.0 ⁺ 0.1

Karışımın 1000 ml damıtık su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Dilüsyon sıvısı, tüp ve erlenlere belirli miktarlarda dağıtıldıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

A.15. Gram boyamada kullanılan çözeltiler

- Kristal violet çözeltisi

Kristal violet	2.0 g
Etil alkol (% 95)	20.0 ml
Amonyum oksalat	0.8 g
Damıtık su	80.0 ml

Bu çözelti kristal violetin etil alkolde, amonyum oksalatın damıtık suda çözündürülüp, her iki çözeltilinin karıştırılması ile hazırlanmıştır.

- İyot çözeltisi

İyot	1.0 g
Potasyum iyodür	2.0 g
Damıtık su	300 ml

İyot ve potasyum iyodür damıtık su içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

- Safranin boya çözeltisi (karşıt boya)

Safranin O	0.25 g
Etil alkol (% 95)	10.0 ml
Damıtık su	100 ml

Bu çözelti safraninin etil alkolde çözündürülüp, buna damıtık suyun karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

A.16. IMVIC testlerinde kullanılan ayıraç ve çözeltiler

- Kovacs'ın indol ayracı :

Amil ya da izoamil alkol	150.0 ml
p-dimetilamino benzaldehit	10.0 g
Derişik hidroklorik asit	50.0 ml

p-dimetilamino benzaldehit alkol içerisinde çözüldükten sonra, yavaşça asit eklenmiştir.

- Modifiye Kovacs indol reaktifi (Anderson and Baird - Parker, 1975).

p-dimetil amino benzaldehit	5.0 g
N - HCl	100 ml

p-dimetilaminobenzaldehitin HCl içerisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

- Metil Red Çözeltisi

Metilred	0.1 g
Etil alkol (% 95)	300 ml
Damıtık su	500 ml

Belirtilen miktarda metilred etilalkol içerisinde çözülmüş ve damıtık su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

- Voges - Proskauer test ayıraçları :

(A) α - naftol çözeltisi (% 5) :

α - naftol	5.0 g
Saf alkol	100 ml

Belirtilen miktarda α - naftalün 100 ml saf alkolde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

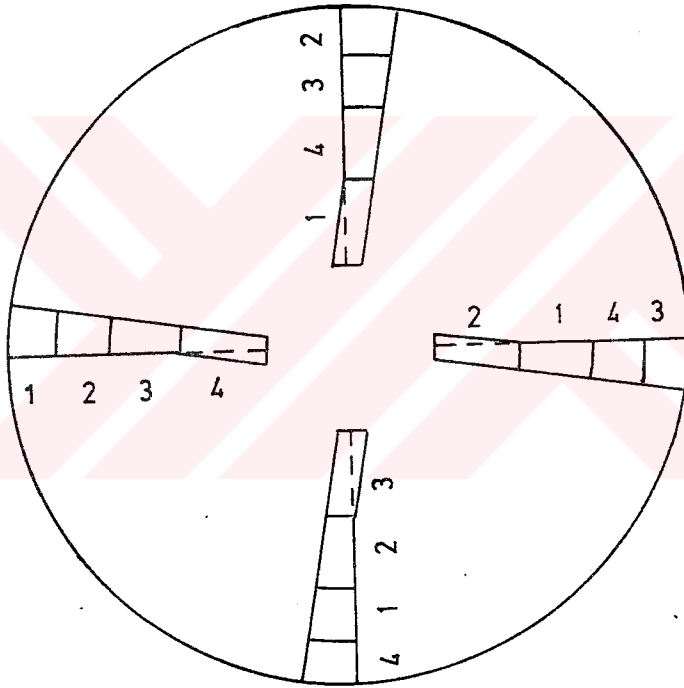
(B) % 40'lık potasyum hidroksit çözeltisi

Potasyum hidroksit	40.0 g
Damıtık su	100 ml

Belirtilen miktarda potasyumhidroksit damıtık su içeri - sinde çözülmüş ve 100 ml'ye tamamlanmıştır.

EK AÇIKLAMALAR - B

HARRISON'NUN DİSKİ



KAYNAKLAR

- Anderson, J.M. and Baird-Parker, A.C., 1975, A rapid and direct plate method for enumerating Escherichia coli biotype I in food : J. Appl. Bacteriol., 39, III-117.
- Andrews, W.H. and Presnell, M.W., 1972, Rapid recovery of Escherichia coli from estuarine water : Appl. Microbiol., 23, 3, 521-523.
- Andrews, W.H., Duran, A.P., McClure, F.D. and Gentile, D.E., 1979, Use of two rapid A-I methods for the recovery of fecal coliforms and Escheria coli from selected food types : J. Food Science, 44, 1, 289-291.
- Anonymous, Enterobacteriaceae, API 20, Netto Instituts- und Apotheken-Preis, 12p.
- Anonymous, 1974 a, Bergey's manual of determinative bacteriology, Eight edition : The Williams and Wilkins Comp., Baltimore, 1268 p.
- Anonymous, 1974 b, Membrane filtration with Oxoid nuflow membrane filters and membrane media : Oxoid Ltd., England, 25 p.

Anonymous, 1976, Microbiological aspects of food hygiene :
World Health Organization, Geneva, Technical
report series No: 598, 103 p.

Anonymous, 1978 a, Microorganism in foods 1, Their signifi-
cance and methods of enumeration : University
of Toronto Press, Toronto, 433 p.

Anonymous, 1978 b, T.S.E., Hazır kuru çorbalar standardı
(TS-3190) : Türk Standardları Enstitüsü, Ankara.

Anonymous, 1979, T.S.E., Et ve et mamullerinde Salmonella
aranması (Referans metod) (TS-3446) : Türk Stan-
dardları Enstitüsü, Ankara.

Anonymous, 1983 a, T.S.E., Sucuk standardı (TS-1070) : Türk
Standardları Enstitüsü, Ankara.

Anonymous, 1983 b, T.S.E., Alkolsüz gazlı içecekler stan-
dardı (TS-4080) : Türk Standardları Enstitüsü,
Ankara

Anonymous, 1984 a, Difco manual : Tenth edition, Difco
Laboratories, U.S.A., 1155 p.

- Anonymous, 1984 b, Official methods of analysis of the association of official analytical chemist : Association Of Official Analytical Chemists, Inc., U.S.A., 1141 p.
- Anonymous, 1984 c, T.S.E., Dondurma Standardı (TS-4265) : Türk Standardları Enstitüsü, Ankara.
- Calderon, R.L. and Levin, M.A., 1981, Quantitative method for enumeration of enterotoxigenic Escherichia coli : J.Clinical Microbiol., 13, 1, 130-134.
- Damaré, J.M., Campbell, D.F. and Johnston, R.W., 1985, Simplified direct plating method for enhanced recovery of Escherichia coli in food : J.Food Science, 50, 6, 1736-1737.
- Draughon, F.A. and Nelson, P.J., 1981, Comparison of modified direct plating procedures for recovery of injured Escherichia coli: J.Food Sci., 46, 1, 1188-1191.
- Dutka, B.J., 1981, Membrane filtration, applications, techniques, and problems : Marcel Dekker, Inc. New York, 612 p.

- Egan.A.F., 1978, Enumeration of stressed cells of Escherichia coli: Can.J.Microbiol., 25, 116-118.
- Ercoskun,A., 1984,Gıda Maddeleri Tüzüğü : Hemay Yayınları, Ankara, 346 s.
- Ergüllü,E., 1984, Süt ve mamüllerinden izole edilen koliform gurubu bakterilerin tanımı üzerine araştırmalar: Gıda Dergisi, 9, 2, 107-114
- Ertek,T., 1982, Ekonometriye giriş : Araştırma, Eğitim, Ekin Yayınları, İstanbul, 271 s.
- Faddin, J.F., 1980,Biochemical tests for identification of medical bacteria : Waverly Press, Inc., Second edition, U.S.A. 527 p.
- Fantasia, L.D., Mestranrea, L., Schrade, J.P. and Yager , J., 1975, Detection and growth of enteropathogenic Escherichia coli in soft ripened cheese : Appl.Microbiol., 29,2. 179-185.
- Fraizer, W.C.and Westhoff,D.C., 1978, Food Microbiology : Tata Mc Graw-Hill Publishing Comp.Ltd., New Delhi, 540 p.

- Hall, L.P., 1984, A new direct plate method for the enumeration of Escherichia coli in frozen foods : J.Appl.Bacteriol., 56, 227 - 235.
- Hall, L.P., 1985, A direct plate count method for detection E.coli in frozen food by detecting indole in colonies : Food Microbiol., 2, 31-37.
- Harrigan, W.F. and McCance, M.E., 1976, Laboratory Methods in food and dairy microbiology : Academic Press Inc., London, 452 p.
- Hartman, P.A., Hartman, P.S. and Lanz W.W., 1975, Violet red bile 2 agar for stressed coliforms : Appl. Microbiol., 29, 4, 537-539.
- Holbrook, R., Anderson, J.M. and Baird-Parker, A.C., 1980, Modified direct plate method for counting Escherichia coli in foods : Food Technol. in Australia, 32, 2, 78-83.
- Jay, J.M., 1978, Modern food microbiology : D.Van Nostrand Comp., New York 479 p.
- Lück, H., Lategan, B., 1983 Comparison of tests for determining the number of total coliforms and faecal coliforms in milk products : S.African J.Dairy Technol., 15, 1, 7-9.

Mehlman, I.J., Simon, N.T., Sanders, A.C. and Olson, J.C., 1974,
Problems in the recovery and identification of
enteropathogenic Escherichia coli from foods :
J.Milk Food Technol., 37, 6, 350-355.

Mehlman, I.J., and Romero, A., 1982, Enteropathogenic
Escherichia coli methods for recovery from foods:
Food Technol., 36, 73-79.

Miller, R.G., Jr., 1966, Simultaneous statistical inference :
Mc Graw-Hill Book Company, U.S.A., 272 p.

Motes, M.L., McPhearson, R.M., and De Paolo A., 1984,
Comparison of three international methods with
APHA method for enumeration of Escherichia coli
in estuarine waters and shellfish : J.Food
Protection, 47, 7, 557-561.

Powers, E.M. and Latt, T.G., 1979, Rapid enumeration and
identification of stressed fecal coliforms :
J.Food Protection, 42, 4, 342-345.

Ray, B. and Speck, M.L., 1972, Repair of injury induced by
freezing Escherichia coli as influenced by
recovery medium : Appl.Microbiol. 24, 2, 258-263.

- Ray, B and Speck M.L., 1973, Enumeration of Escherichia coli in frozen samples after recovery from injury : Appl.Microbiol., 25,4, 499-503.
- Rayman, M.K., Jarvis, G.A., Davidson, C.M., Lang, S., Allen, J.M., Tang, T., Dodsworth, P., McLaughlin, S., Greenberg, S., Shaw, B.G., Beckers, H.J., Qvist, S., Nottingham, P.M. and Stewart, B.J., 1979, ICMSF methods studies. XIII, An international comparative study of the MPN procedure and the Anderson-Baird-Parker direct plating method for the enumeration of Escherichia coli biotype I in raw meats : Can.J.Microbiol., 25, 1321-1327.
- Rose, R.E., Geldreich, E.E. and Litsky, W., 1975, Improved membrane filter method for fecal coliform analysis : Appl.Microbiol., 29, 4, 532-536.
- Schafer, W.D. and Macready, G.B., 1975, A modification of the Bonferroni procedure on contrast which are grouped into internally independent sets : Biometrics, 31, 227-228.
- Serter, F. ve Bilgehan, H., 1978, Klinik Mikrobiyoloji : Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir, 483 s.

Sharpe,A.N., Rayman,M.K., Burgener,D.M.Conley,D.,Lait,A., Milling,M.,Peterkin,P.I., Purvis,U. and Malcolm,S., 1983, Colloborative study of the MPN, Anderson-Baird-Parker direct plating, and hydrophobic grid-membrane filter methods for enumeration of Escherichia coli biotype I in foods : Can.J. Microbiol., 29, 1247 - 1252.

Silliker,J.H.,Gobis,D.A. and May,A, 1979, ICMSF methods studies. XI Collaborative/comparative studies on determination of coliforms using the most probable number procedure : J.Food Protection,42, 8, 638-644.

Silliker,J.H., 1982 Selecting methodology to meet industry's microbiological goals for the 1980's : Food Technol., 36, 65-69.

Speck,M.L., Ray,B. and Read, R.B., 1975, Repair and enumeration of injured coliforms by a plating procedure : Appl.Microbiol., 29, 4, 549 - 550.

Şanlıtürk,M.E., 1986, Multiple comparisons for the single-factor experiments : Yüksek Mühendislik tezi, H.Ü.Mühendislik Fakültesi, Beytepe, Ankara, 352 s.(yayınlanmamış).

Varga,S. and Doucet,A., 1984, Quantitative estimation of fecal coliforms in fresh and frozen fishery products by APHA and modified A-1 procedures : J.Food Protection, 47, 8, 602-603.

Warseck,M., Ray, B. and Speck,M.L., 1973, Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods: Appl.Microbiol., 26, 6, 919-924.