

VET410

SÜT BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ
UYGULAMA KİTAPÇIĞI

1. Giriş, laboratuvarın gezilmesi, alet ve cihazların tanıtılması
2. Sütün kimyasal analizleri I
3. Sütün kimyasal analizleri II
4. Sütlerde prezervatif maddelerin aranması
5. Yoğurdun kimyasal analizleri
6. Peynirin kimyasal analizleri
7. Tereyağının kimyasal analizleri
8. Besi yeri çeşitleri ve hazırlanmaları
9. Mikrobiyolojik analizlere hazırlık
10. Süt ve süt ürünlerinde toplam bakteri, maya-küf aranması
11. Süt ve süt ürünlerinde *S. aureus* aranması
12. Süt ve süt ürünlerinde Koliform bakteri ve *E. coli* aranması
13. Süt ve süt ürünlerinde *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* aranması
14. Süt ve süt ürünlerinde laktik asit bakterilerinin aranması

Uygulamanın adı	Giriş, Laboratuvarın gezilmesi, alet ve cihazların tanıtılması
Yapılacağı hafta	1. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

Etüv: Mikrobiyolojik ekimlerin yapıldığı besi yerlerinin gerekli süre ve sıcaklık için inkübasyona bırakıldığı, sıcaklığı sabit tutan, değişik tipleri (soğutmalı tip, soğutmasız tip ve CO₂'li) olan bir cihazdır.

Otoklav: Besi yerlerinin ve kuru hava sterilizatöründe sterilizasyona uygun olmayan materyallerin sterilizasyonunda kullanılan ve basınçlı buhar (121 °C'de, 1.1 atmosfer basınç altında en az 15 dakika) prensibine göre çalışan bir cihazdır.

Kjeldahl Protein Tayin cihazı: Gıdalarda ham protein tayini için kullanılan bir cihazdır.

Kül fırını: Analizi yapılacak numunenin yüksek sıcaklık derecelerinde (650°C'ye kadar) yakılmasının sağlandığı bir cihazdır.

Distile su cihazı: Bu cihaz da normal şebeke suyunun distilasyonunu sağlamaktadır.

pH metre: Probonun ucunda bulunan elektrot sayesinde batırıldığı numunenin pH'sını ölçmekte kullanılan cihazdır.

Su banyosu (Ben mari): İçerisine koyulan duyarlı numuneyi 0-100°C'ye kadar homojen olarak ısıtabilen ve istenilen derecelerde sabit tutmaya yarayan cihazdır.

Manyetik karıştırıcı: Hazırlanmış solüsyonların, gerekirse ısıtılmalarını da sağlayarak karışmalarını, beher ya da erlen içinde manyetik dalgalar yardımı ile sürekli dönen bir balık yardımı ile sağlayan cihazdır.

Stomacher: Gıda maddelerinin mikrobiyolojik analizleri öncesinde homojenizasyonunu sağlayan cihazdır.

Vorteks: Deney tüpünün içindeki sulandırma sıvısının ve içine ilave edilen numunenin homojen bir şekilde karışmasını sağlayan cihazdır.

Otomatik pipet: Ayarlanabilir hacimleri olan bir kaptan diğer kapa herhangi bir sıvıyı aktarmayı sağlayan pipetlerdir.

Sterilizatör: Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılacak steril malzemelerin (özellikle cam malzemelerin) kuru hava ile sterilize edilmesinde kullanılır. Bu amaçla cihaz, 170-175°C'lerde az 1 saat çalıştırılmaktadır.

Süt Refraktometresi: Sütün yağsız kuru maddesinin % olarak belirlenmesinde kullanılır.

ELİSA cihazı: Çeşitli serolojik testler amacıyla kullanılan cihazdır.

Gerber santrifüjü: Süt ve süt ürünlerinin yağ miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Desikatör (eksikatör): Kalın camdan yapılmış iki bölümlü ve cam kapaklı nemsiz ortamda saklanması gereken maddelerin muhafaza edildiği kaplardır.

Cam pipet (Dereceli pipet): İstenilen sıvı madde miktarının alınıp aktarılmasını sağlayan ve titrasyon gibi işlemlerde kullanılan cam malzemedir.

Bullu pipet (Bullü pipet, joje pipet): Üzerlerinde ağza yakın kısımda hacmi bildiren bir çizgi vardır. Orta kısmı, çekilen sıvının ağza kaçmasının engellenmesi amacıyla şişkindir. 11 ml'e ayarlı süt pipetleri böyle pipetlerdendir.

Erlen (Erlenmayer): Hacimleri 25 ml'den bir kaç litreye kadar değişebilen, ağzı dar, dip kısmı geniş bir cam malzemedir.

Beher (Beherglas): Hacimleri 10 ml'den bir kaç litreye kadar değişen. geniş ağızlı, kenarları dışa kıvrık ve silindirik şekilli bir cam malzemedir.

Balon: Cam balonlar düz ve yuvarlak dipli olmak üzere iki şekilde olup yuvarlak dipli olanlar kaynatma çalışmalarında özel ısıtıcılara oturtulabilen balonlardır. Dibi düz olanlar solüsyon hazırlamak, saklamak, distilasyon yapmak amacıyla kullanılır. Bu balonların boyun kısımlarında ölçü çizgisi yoktur.

Port tüp: Deney tüplerinin yerleştirildiği, bunların düşmemelerinin sağlandığı düzeneklerdir.

Balon joje (Ölçü balonu): İnce, uzun boyunlu olup boyun kısmındaki çizgiye kadar doldurulması halinde üzerinde yazan hacmi aldığını gösterir.

Mezür: 25 ml'den birkaç litreye kadar değişen hassasiyette olup özellikle aktarma işlemlerinde kullanılmaktadır.

Huni: Çeşitli boyun uzunluğuna ve ağız çaplarına sahiptirler. Sıvıları dar ağızlı kaplara aktarmak için kullanılırlar. Süzgeç kağıdı ile birlikte süzme işleminde kullanılırlar.

Petri kutusu: Kapak ve kutudan oluşup mikrobiyolojik ekimlerde besi yerlerinin hazırlanmasında kullanılırlar.

Deney tüpü: Kapaklı ya da kapaksız tipleri bulunan ve farklı hacimlerde olan mikrobiyolojik ya da kimyasal analiz tüpleridir.

Bütirometreler: Süt ve süt ürünlerinde yağ tayini için kullanılan haznesi, tıpası ve skalası bulunan cam malzemelerdir.

Kroze: Yakma işlemlerinde kullanılmakta olup çok yüksek sıcaklık derecelerine dayanıklı olan porselen kaplardır.

Öze: Mikrobiyolojik analizlerde sıvı besi yerlerinden katı besi yerlerine veya katıdan katıya geçişlerin yapıldığı durumlarda kullanılmakta olup platin olan uçları iğne ya da yuvarlak tiptedir.

Piset: Solüsyonları saklanmak veya deney sonrası test tüplerini ve şişeleri yıkamak için sıkılarak kullanılan polietilen yumuşak dereceli şişelerdir.

Trommel: Sterilize edilecek malzemenin (petri kutusu, pipet vb) koyulduğu ve muhafaza edildiği, paslanmaz çelik, silindirik şeklinde, kapaklı bir malzemedir.

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	SÜTÜN KİMYASAL ANALİZLERİ I
Yapılacağı hafta	2. Hafta
UYGULAMA BİLGİSİ	
▶ Kuru Madde Tayini ▶ Yağsız Kuru Madde Tayini ▶ Kül Tayini ▶ Sütte Dansite Tayini	
KURU MADDE TAYİNİ	
▶ Deneyin amacı: Su dışında kalan kuru madde miktarının belirlenmesi ▶ Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler: ▶ Rutubet petrisi (kroze), ▶ Desikatör, ▶ 105°C lik etüv, ▶ Hassas terazi ▶ Deneyin yapılışı: 1. Temiz bir petri kabı 105°C'lik etüvde 1 saat kurutulur. 2. Desikatörde 15 dakika soğutulur ve tartılır. 3. Petri darası not edildikten sonra üzerine iyice karıştırılmış 3-5 ml-g gıda örneği konur. 4. Numune miktarı da bir yere yazılarak tekrar suyunu uçurmak için 105°C'lik etüvde 4-5 saat tutulur. 5. Yaklaşık 4 saatlik etüvde nem uçurma işleminden sonra her yarım saatte bir kroze desikatörde soğutulur ve tartımı yapılır, son iki tartım eşit oluncaya kadar bu işleme devam ettirilir. • Son iki tartımın eşit olması, numunedeki suyun tamamen uzaklaştırıldığını gösterir ve bu son tartım formülde yerine	
Hesaplamalar:	
$\%Kuru\ madde = [(Son\ tartım - Petri\ darası) / Numune\ miktarı] \times 100$	

SÜTTE YAĞSIZ KURU MADDE ANALİZİ

► Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:

- Refraktometre, Distile su, Piset, Pamuk

► Deneyin yapılışı:

- Refraktometre distile su ile %0' a ayarlandıktan sonra pamuk ile silinir ve refraktometrenin merceğine 2-3 damla süt damlatılır.
- Objektiften mavi ile beyaz arasındaki rakam (kırılma indeksi) okunur. Bu rakam % yağsız kuru madde miktarını verir.
- İşlem tamamlandıktan sonra mercek distile su ile temizlenir.

HAM KÜL ANALİZİ

► Deneyin amacı: Gıdalarda ham kül miktarının belirlenmesi

► Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:

- Porselen kroze,
- Desikatör,
- Kül fırını,
- Hassas terazi

► Deneyin yapılışı:

1. Temiz bir kroze 300°C lik kül fırınında kurutulur.
2. Desikatörde 30 dakika soğutulur ve tartılır.
3. Kroze darası not edildikten sonra üzerine iyice karıştırılmış 3-5 ml-g gıda örneği konur.
4. Numune miktarı da bir yere yazılarak yakma işleminin gerçekleşmesi için 550-600°C'lik kül fırınında 5-6 saat tutulur.
5. Yaklaşık 4 saatlik yakma işleminden sonra her yarım saatte bir kroze desikatörde soğutulur ve tartımı yapılır, son iki tartım eşit oluncaya kadar bu işleme devam ettirilir.
 - Son iki tartımın eşit olması, numunedeki suyun tamamen uzaklaştırıldığını gösterir ve bu son tartım formülde yerine konur.

► Hesaplamalar:

- %Ham Kül=[(Son tartım-Petri darası)/ Numune miktarı] x 100

SÜTTE ÖZGÜL AĞIRLIK (DANSİTE) TAYİNİ

► Deneyin amacı:

- Sütlerin özgül ağırlığını belirlemektir.
 - Özgül ağırlığı düşük bulunan sütlerle su katılmış olması,
 - Yüksek bulunan sütlerin ise yağının alınmış olması ihtimali vardır.
- Suyun özgül ağırlığı 1'dir.
- Sütün özgül ağırlığı sudan fazladır.
 - Sütte bulunan ve ortalama özgül ağırlığı 1.6 olan yağsız kuru maddesidir.
 - Süt yağının özgül ağırlığı ise 0.93'dür.
- Süt bileşenlerinin oluşturduğu kolloidal, eriyik ve emülsiyon durumundan dolayı:
 - İnek sütünün yoğunluğu: 1.027-1.036
 - Manda sütünün yoğunluğu: 1.027-1.040
 - Keçi sütünün yoğunluğu: 1.028-1.041
 - Koyun sütünün yoğunluğu: 1.030-1.045'dir.

► Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:

- Mezür (250 ml), Laktodansimetre, Termometre

► Deneyin yapılışı:

- Sütün özgül ağırlığı, 15°C'de bir litre sütün kilogram cinsinden ağırlığına eşittir.
- Sütün özgül ağırlığı laktodansimetre ile belirlenir.
- Laktodansimetre süt içine daldırılarak sütün yüzey seviyesindeki skala değeri okunur.
- Özgül ağırlığın belirlendiği ısı 15°C'den düşük veya yüksek olması durumunda düzeltme faktörü dikkate alınarak gerçek değer tespit edilir.
 - Isı 15°C'den düşük ise skaladaki değerden her bir °C derece için 0.002 çıkarılır.
 - Isı 15°C'den yüksek ise her bir derece için 0.002 ilave edilir.

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	SÜTÜN KİMYASAL ANALİZLERİ II
Yapılacağı hafta	3. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- ▶ Sütte Ham Protein Tayini
- ▶ Sütte Yağ Tayini
- ▶ Sütte pH Tayini
- ▶ Sütte Asitlik Tayini
- ▶ Whiteside Testi

SÜTTE HAM PROTEİN TAYİNİ

- ▶ **Kjeldahl Yöntemi İle Protein Tayini**
- ▶ **Deneyin Prensibi:**
 - ▶ Azot içeren örneğin belli bir miktarının H_2SO_4 ile yakılarak içindeki tüm azotun $(NH_4)_2SO_4$ 'a dönüştürülmesi, çözeltinin bazikleştirilmesi ve açığa çıkan NH_3 'ın damıtılıp belli standart bir asit çözeltisi içinde toplandıktan sonra nötrleşmeyen fazla asit miktarının titrasyonla saptanmasıdır.
- ▶ **Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:**
 - ▶ Kjeldahl yaş yakma ünitesi, Kjeldahl distilasyon ünitesi, Kjeldahl tüpü, katalizör tablet, H_2SO_4 , NaOH, H_3BO_3 , metilen kırmızısı, HCl, erlen, pipet, büret, puar.
- ▶ **Deneyin yapılışı:**
 - ▶ Kjeldahl yöntemi üç aşamada yapılır.
 1. Örnekteki organik maddelerin yaş oksidasyonu (**yakma**).
 2. Organik maddelerin yaş oksidasyonu sonucu oluşan NH_3 'ın NaOH kullanılarak serbest hale getirildikten sonra damıtılması ve belli miktar ayarlı bir asit içinde tutulması (**damıtma**).
 3. H_3BO_3 tarafından nötrleştirilemeyen bazik çözeltinin ayarlı bir asitle titre edilmesi ve toplam azotun hesaplanması (**titrasyon**).
 - ▶ $1 \pm 0,1$ g örnek, hassas terazide tartılarak 250 ml hacimli Kjeldahl tüpüne aktarılır.
 - ▶ İçinde örnek bulunan tüpe 20 ml %96'lık H_2SO_4 ve bir adet katalizör tablet ilave edilir.
 - ▶ Tüplerin içerisindeki örnek, yeşil sarı saydam bir renk oluşuncaya kadar yaş yakma

işlemine tabi tutulur.

- ▶ Yakma işleminin ardından tüpler oda sıcaklığında bekletilerek soğutulur, ardından da 100 ml distile su ilave edilerek söndürme işlemi yapılır.
- ▶ Tüplerin üzerine 100 ml %40'lık NaOH ilave edilerek, tüpler distilasyon ünitesinin kaynatma kısmına yerleştirilir. Destilat toplama kısmına ise içerisinde 50 ml %4'lük H_3BO_3 ile 0,1 ml metilen kırmızı bulunan 500 ml erlenmayer yerleştirilir.
- ▶ Distilasyon sonrası toplanan destilat 0,1 N HCl ile kalıcı renk dönüşümü oluncaya kadar titre edilir.
- ▶ Titrasyonda harcanan 0,1 N'lık HCl miktarı formülde yerine koyularak örnekteki protein miktarı hesaplanır.
- ▶ $\%Protein = (V_{numune} - V_{k\ddot{o}r}) \times N \times 0,014 \times 100 \times F / m$
 - Vnumune: Örnek için harcanan 0,1 N HCl miktarı
 - Vkör: Kör için harcanan 0,1 N HCl miktarı
 - N: titrasyonda kullanılan HCl normalitesi
 - F: Gıdalar ait protein kat sayısı (Süt ve süt ürünleri için: 6,38)
 - m: numune miktarı

SÜTTE YAĞ TAYİNİ

Gıda Maddeleri Tüzüğü (GMT)'ne ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE) TS 1018 çiğ süt standardına göre;

İnek sütünde en az %3,

Keçi sütünde %4,

Koyun sütünde %6

Manda sütünde %7 oranında yağ bulunmalıdır.

▶ Deneyin prensibi:

- ▶ Yağ hariç sütün diğer elementlerini sülfürik asit yardımıyla parçalayarak açığa çıkan yağın amil alkol vasıtasıyla berrak hale getirerek, miktarının okunması işlemine dayanır.

▶ Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:

Sülfürik asit d=1.825, Amil alkol, Gerber süt bütirometresi, Süt pipeti (11ml), Asit pipeti (bullu) veya 10 ml lik asit büreti, Amil alkol pipeti (bullu), 1ml'lik büret, Isıtmalı Gerber Santrifüjü (1000-1200 devir/dak. R=40-60 cm)

Deneyin Yapılışı:

- ▶ Bütirometreler taşıyıcılara ağzı yukarıya gelecek tarzda yerleştirilir.
- ▶ İçine 10ml Sülfürik asit ($d=1.825$) bütirometrenin ağız kenarlarını buharlaştırmadan ve bütirometre içinde hava kabarcığı oluşturmaktan yavaşça konur.
- ▶ Homojen hale getirilmiş süttten 11 ml alınır, bütirometrenin ağzının alt tarafından, cidardan sülfürik asitle iki tabaka oluşacak ve ilk ‘ KARMELİZASYON OLUŞMAYACAK’ şekilde yavaşça ilave edilir.
- ▶ 1 ml amil alkol yine bütirometrenin ağzını bulaştırmadan yavaşça ilave edilir.
- ▶ Kauçuk tıpa ile bütirometrenin ağzı kapatılır.
- ▶ Bütirometrenin alt ve üst uçlarından tutularak çalkalamadan yarım döndürme hareketleriyle pıhtılaşan kazein kayboluncaya kadar alt-üst edilir.
- ▶ Tıpa kısmı santrifüjün dış kısmına, dereceli (kapalı) kısmı içe bakacak tarzda ve karşılıklı olmak kaydıyla bütirometreler gerber santrifüjüne yerleştirilir.
- ▶ 5 dakika santrifüj edilir.
- ▶ Okuma işlemi yapılır.
 - ▶ Bütirometredeki yağın alt ve üst sınırlarına denk gelen rakamların okunması şeklinde olup 10 saniye içinde yapılmalıdır.
 - ▶ Bütirometrede okunan yağın alt sınırı A, üst sınırı B olursa;

Yağ miktarı% = B-A

SÜTTE pH DEĞERİNİN BELİRLENMESİ

► Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:

- pH metre, beher, distile su, pamuk

► Deneyin yapılışı:

- pH değerini belirlemek için pH metre adı verilen cihaz kullanılır. Elektrometrik olarak pH metre ile ölçüm oldukça pratik ve hassas olduğundan kullanışlıdır. pH metrenin elektrodu numune içerisine daldırılarak pH değeri okunur.

► Hatırlatma:

- pH metre kullanılmadan önce ölçüm yapılmak istenen pH aralıkları için standart tampon çözeltiler yardımıyla standartize edilir.
- Analiz öncesi ve sonrası pH metrenin elektrodu distile su ile yıkanır ve pamuk yardımıyla kurutulur.

► Değerlendirme:

- Normal sütte pH 6.6 – 6.8'dir.
- Yoğurtta pH 4.6 – 3.8'dir.
- Ayranda pH 4.6 – 4.0'dir.

SÜTTE ASİTLİK TAYİNİ

Alkol testi

Kaynatma testi

Titrimetrik yöntemle asitlik tayini

► Alkol testi

- Su çekme özelliği olan alkol, kazein misellerinin etrafındaki suyu çekerek misellerin kolloidal durumunu bozar ve pıhtılaşmalarına neden olur. Misellerin stabilitesini sağlayan elektrik yüklerinin laktik asit oluşuyla nötralize olması alkol reaksiyonunu daha çok etkiler.
- %68'lik alkol ile reaksiyon vermeyen taze süt, asit oluşumu ile pıhtılaşır. Alkol ile reaksiyona giren sütün asitliği en az 9⁰SH, 20-21⁰D, %0.20-0.21 L.A.'dır.

► Deneyin yapılışı:

- Eşit miktarda süt ile %68'lik alkol karıştırılır ve pıhtı tanecikleri gözlenir. Bu işlem için dizayn edilmiş alkol tabancaları da kullanılmaktadır.
- Not: Koyun sütü, kolostrum, laktasyon sonu sütü %68'lik alkol ile muamele edildiğinde normal olarak pıhtılaşır.

► Kaynatma testi

- Ampirik fakat geçerli bir yöntemdir. Bilindiği gibi ısı, reaksiyonlar arttıran bir faktördür. Sütte asit oluşumuyla misellerin nötralizasyon olayı ısıtılma ile, asit miktarına bağlı olarak daha çabuk gerçekleşir, kolloidal durum bozulur ve süt pıhtılaşır.
- Kaynatılınca kesilen sütün asitliği en az 12⁰SH, 28⁰D, %0.27 L.A.'dır.

► Titrimetrik yöntemle asitlik tayini

Titre edilebilir asitliğin uluslar arası birimi % Laktik Asit (L.A.)'dir.

► Deneyin prensibi:

- 100ml sütü nötralize etmek için harcanan N/4'lük sodyum hidroksit (NaOH) miktarıdır.

► Deneyin yapılışı:

- Bu amaçla 25 ml süt bir erlene alınır, üzerine birkaç damla fenolftalein renk indikatöründen damlatılır.
- N/4'lük NaOH ile sabit pembe rengin ilk görüldüğü ana kadar titrasyon yapılır.

- ▶ Harcanan miktar 4 ile çarpılarak 100 ml'deki sütün asitliği Sokselet Henkel cinsinden bulunur.
- ▶ Sonuç 0.0225 ile çarpılarak %LA cinsine çevrilebilmektedir. GMT'üne göre, sütün asitliği 8 °SH'i geçmemelidir.

WHITESIDE TESTİ

Mastitisli sütünleri belirlemek amacıyla whiteside testi (alkali testi) kullanılır.

Yöntemin İlkesi: Hücre sayısına bağılı olarak sütün NaOH ile gösterdiği tepkimeye dayanır.

▶ Deneyin Yapılışı:

- ▶ Siyah bir zemin üzerine konulan petri kutusu veya bir cam üzerine 5 damla taze sütün örneğinden damlatılır.
- ▶ Sütün üzerine 1 damla 1 N NaOH ilave edilir.
- ▶ Bir cam baget yardımıyla 15 saniye kadar karıştırılarak 2-3 cm büyüklüğünde bir alana yayılır ve durum incelenir.

▶ Sonucun Değerlendirilmesi:

- ▶ Karıştırma sonunda hiçbir değışiklik olmadığı takdirde test sonucu “negatif” olarak nitelendirilir, yani sütün sağlıklı bir hayvandan alındığı kabul edilir.
- ▶ Çok hafif pıhtıcıkların oluşması durumunda süte şüpheli bakılır.
- ▶ Sütün pıhtılaşması, küçük pıhtı parçacıkların ve partiküllerin görülmesi durumunda test sonucu “pozitif “ olarak nitelenir, yani sütün mastitisli bir hayvandan alındığı sonucuna varılır.
- ▶ Pıhtı oluşumunun çok şiddetli, jelatimsi, viskoz bir hal alması, beyaz parçacıkların çok belirgin hal alması enfeksiyonun çok şiddetli olduğunu gösterir.

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	SÜTLERDE PREZERVATİF MADDELERİN ARANMASI
Yapılacağı hafta	4. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ
Sütlerde prezervatif maddelerin aranması Sütte peroksidaz testi Sütlerde SCC analiz metotları
SÜTLERDE PREZERVATİF MADDELERİN ARANMASI ▶ Sütte bakterilerin üremesini engellemek veya fazla bakteri üremiş sütlerdeki asitlik nedeniyle sütün kesilmesini önlemek, diğer bir deyimle dayanıklılığını arttırmak amacı ile çeşitli konservatif maddeler katılmaktadır. ▶ Bunlar karbonat, formaldehit, hidrojen peroksit, borik asit ve türevleri, salisilik asit, propiyonik asit gibi sağlığa zararlı olan maddeler olup süte katılması yasaktır. KARBONATLARIN ARANMASI: ▶ a) Bir deney tüpüne 3-5 ml süt alınır ve üzerine rozalik asidin alkoldeki %1'lik solüsyonundan birkaç damla damlatılır. ▶ Karbonat ilave edilmiş sütlerin üst tarafında pembe bir renk oluşur. ▶ Süt çalkalanırsa renk kaybolur veya katılan miktara göre sütte ayırt edilemeyen renklenmeye sebep olur. ▶ b) 5 ml süt örneği tüp içerisine alınıp üzerine birkaç damla %1'lik brom timol mavisi damlatılır. Mavi rengin oluşumu, karbonat varlığını belirtir. FORMOL (FORMALDEHİT) ARANMASI: ▶ NESSLER AYIRACI İLE FORMOL ARANMASI ▶ Temiz bir tüpe 2-3 damla Nessler ayırıcı konur ve üzerine bir miktar süt ilave edilir. Oluşan koyu kahverengi-siyah renk formaldehit varlığını gösterir. ▶ VOİSENET REAKSİYONU İLE FORMOL ARANMASI ▶ Bir deney tüpüne: ▶ 2 ml süt ▶ 2 ml hidroklorik asit ▶ 1 damla %2,5'lik feri klorür ilave edilir, karıştırılır ve kaynatılır.

- ▶ Mor renk (+) Koyu kahverengi (+) Sarı renk (-)
- ▶ Gerber yöntemi ile sütte yağ tayini yapılırken kullanılan sütte formaldehit varsa karışımın mor veya morumsu (normal sütte kahverengi) renk alması sütte formaldehitin varlığını gösterir.

SÜTTE H₂O₂ ARANMASI:

- ▶ **PİEN METODU İLE H₂O₂ ARANMASI**
- ▶ Bir deney tüpüne:
 - ▶ 2 ml süt (çiğ, pastörize, asitli)
 - ▶ 1 ml HCl konsantre
- ▶ Karıştırılır
- ▶ 2 ml potasyum iyodürün %10'luk solüsyonu ilave edilir
- ▶ Karışım kaynar su banyosunda (80-90⁰C) 1 dakika tutulur.
- ▶ Tüp akan suyun altında hızlıca soğutulur.
- ▶ 2 ml nişastanın %1'lik solüsyonundan ilave edilir.
- ▶ Hidrojen peroksit bulunan sütte hemen mavi renk veya mavi-siyah renk oluşur.

SÜTTE SALİSİLİK ASİT ARANMASI:

- ▶ Salisilik asit ve salisilatlar serbest fenol bileşikleri olduklarından ferri klorür ile mor renk verirler.
- ▶ Bir deney tüpüne 10 ml süt ve üzerine ferri klorürün %25-26'luk solüsyonundan 5 damla konur, oluşan renk mor ise sütte salisilik asit varlığını gösterir.
- ▶ Sütte salisilik asit yoksa sarı renk oluşur.

SÜTTE POTASYUM BİKROMAT ARANMASI

- ▶ Bir deney tüpüne: 2 ml süt, 10 ml %10'luk AgNO₃ konur.
- ▶ Sarı veya portakal sarı renk potasyum bikromatın varlığını gösterir.

SÜTTE ANTİBİYOTİK ARANMASI:

- ▶ Hazır test kitleri
- ▶ Yoğurt yapımı
 - ▶ Yoğurt yapımı sırasında belirli aralıklarla sütün pH'ında meydana gelen değişimlere bakılarak.

SÜTTE PEROKSİDAZ TESTİ

- ▶ Peroksidaz enzimi, hidrojen peroksidi parçalayarak aktif oksijenin açığa çıkmasına neden olur. Aktif oksijen atomu serbest halde kalmayıp kolay okside olabilen

maddelere bağlanarak oksitlenmeyi sağlar. Meydana gelen oksidasyon renk değişimi ile belirlenmektedir.

- ▶ Peroksidaz testi 85°C’de kısa süre ısıtma işlem görmüş sütlerde kullanılır.
- ▶ **Kullanılan   zelti, alet ve malzemeler:**
- ▶ Deney tüpleri, pipet, %0,2’lik H₂O₂ , %2’lik parafenilen diamin.
- ▶ **  lem:**
- ▶ Deney tüpü içerisine 18°C’de 10 ml süt  rneđi konur.
- ▶ Süt örneğinin üzerine 2 damla %0,2’lik H₂O₂   zeltisi ilave edilerek iyice karıştırılır.
- ▶ T p içerisine 2 damla %2’lik parafenilen diamin çözeltisi damlatılarak yeniden çalkalanır ve renk değişimi gözlemlenir.
- ▶ Oluşan mavi renk peroksidaz enzim aktivitesinin varlığını gösterir.
- ▶ örnek üzerine %0,2’lik H₂O₂ ilave edilmeden, sütün parafenilen diamin ile çözeltisi ile mavi renk vermesi, süte koruyucu amaçlı H₂O₂ katıldığını gösterir.

SÜTLERDE SCC ANAL Z METOTLARI

- ▶ Standart Analiz Yöntemi
- ▶ Gelişmiş Sayım Yöntemleri

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Yoğurdun kimyasal özellikleri
Yapılacağı hafta	5. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

Yoğurtta Yağ Tayini

Yoğurtta Asitlik Tayini

YOĞURTTA YAĞ TAYİNİ

► Araç ve Gereçler:

- Sülfürik asit $d=1.825$, Amil alkol, Gerber süt bütirometresi, Süt pipeti (11ml), Asit pipeti (bullu) veya 10 ml lik asit büreti, Amil alkol pipeti (bullu), 1ml'lik büret, Isıtmalı Gerber Santrifüjü (1000-1200 devir/dak. $R=40-60$ cm), Amonyum hidroksit çözeltisi (%30'luk)

► İşlem:

- Numune iyice karıştırılarak homojenize edilir.
- 100 ml'lik bir beher içerisine 50g tartılır.
- Üzerine 5 ml amonyak çözeltisi (amonyum hidroksit) katılır. Cam bagetle iyice karıştırılır.
- Her numune için 2 bütirometre alınır
 - her birine önce 10'ar ml sülfürik asit
 - sonra 11'er ml numune konur.
 - Üzerine 1'er ml izoamil alkol katılır.
- Bütirometre alt üst edilerek iyice karışması sağlanır.
- Bütirometre çifti santrifüje karşılıklı olarak yerleştirilir.
- 1100 devir/dakika hızla çalışan santrifüjde 5 dakika çevrilir.
- Okuma işlemi yapılır.
 - Bütirometredeki yağın alt ve üst sınırlarına denk gelen rakamların okunması şeklinde olup 10 saniye içinde yapılmalıdır.
- Amonyakla 1/10 oranındaki sulandırma dikkate alınarak bulunan değer 1,1 ile çarpılarak yağ oranı hesaplanır.

YOĞURTTA ASİTLİK TAYİNİ

► Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:

- Erlen, 0,01 g'a duyarlı terazi, fenolftalein, N/10'luk NaOH.

► İşlem:

- Homojen hale getirilmiş yoğurt numunesinden 10g tartılır.
- 40°C'deki distile sudan 90ml ilave edilir.
- Birkaç damla fenolftalein ilave edilip
- N/10'luk NaOH ile kalıcı pembe renk oluşuncaya kadar titre edilir.
- Sonuç formülle hesaplanır.
 - %yoğurt Asitlik = $A \times 0.009 \times 100 / M$
 - ☐ A: Titrasyonda harcanan N/10'luk NaOH miktarı (ml)
 - ☐ M. Numune miktarı (10g)
 - ☐ 0.009: 1 ml N/10'luk NaOH çözeltisini karşılayan süt asidi miktarı
 - GMT'ne göre yoğurtta asitlik derecesi %1,6'dan çok ve %0.8'den az olmamalıdır.

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Peynirin kimyasal analizleri
Yapılacağı hafta	6. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

Peynirde Yağ Tayini

Peynirde Asitlik Tayini

PEYNİRDE YAĞ TAYİNİ

► Araç ve Gereçler:

- Van Gulik bütirometresi, Gerber santrifüjü, Su banyosu, d:1.525 sülfirik asit, Amil alkol

► İşlem:

- Bütirometrenin beherciğine 3 g homojenize edilmiş peynir numunesi konur.
- Behercik bütirometrenin alt kısmına yerleştirilir.
- Skala kısmın ucundan 10 ml sülfirik asit konulduktan sonra 70⁰C'deki su banyosuna yerleştirilir. Peynir taneciklerinin erimesi beklenir.
- Erime işlemi bittikten sonra 1 ml amil alkol ilave edilip çalkalanır.
- Bütirometrenin skala kısmındaki 35 rakamına kadar sülfirik asitle doldurulur.
- Üstteki ağızda plastik tıkaçla kapatılır.
- Skala kısmı üste gelecek şekilde santrifüje yerleştirilir. 10 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüjden alınan bütirometreler peynirin yağ miktarı % gram olarak skaladan okunur.

PEYNİRDE ASİTLİK TAYİNİ

- ▶ Homojen hale getirilmiş 10 g örnek erlene tartılır.
- ▶ 40 °C sıcaklıktaki saf sudan 100 mL üzerine eklenir.
- ▶ Bir süre karıştırılır. Filtre kağıdı yardımıyla başka bir erlene süzülür.
- ▶ Süzüntüden 25 mL alınarak üzerine 2-3 damla fenolftalein indikatörü damlatılarak bürete doldurulan 0,1 N ayarlı sodyum hidroksit çözeltisi ile erlende kalıcı pembe renk gözleninceye kadar titre edilir.
- ▶ Harcanan her mL 0,1 N NaOH 0,009 g Laktik aside eşdeğerdir
- ▶ $\%A = (V \times 0,009 \times 100) / m \times SF$
 - ▶ V = Titrasyonda Kullanılan 0,1 N sodyum hidroksit çözeltisinin hacmi
 - ▶ m = Titrasyonda kullanılan peynir miktarı
 - ▶ SF = Seyreltme faktörü
 - ▶ Deney sırasında 10 g örnek alınarak üzerine 100 mL su eklenir ve bu çözeltide 25 mL alındığına göre seyreltme faktörü $100/25 = 4$ dür.

Yani bulunan değer 4 ile çarpılmalıdır.

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Tereyağının kimyasal analizleri
Yapılacağı hafta	7. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

Tereyağında pH değerinin belirlenmesi

Tereyağında Tuz Analizi

TEREYAĞINDA pH DEĞERİNİN BELİRLENMESİ

- ▶ **Deneyin amacı:** pH değerinin ölçülmesi
- ▶ **Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:**
 - ▶ pH metre
- ▶ **Deneyin yapılışı:** pH değerini belirlemek için pH metre adı verilen cihaz kullanılır. pH metrenin elektrodu tereyağının içerisine daldırılarak pH değeri okunur.
- ▶ **Hatırlatma:**
 - ▶ pH metre kullanılmadan önce ölçüm yapılmak istenen pH aralıkları için standart tampon çözeltiler yardımıyla standardize edilir.
 - ▶ Analiz öncesi ve sonrası pH metrenin elektrodu distile su ile yıkanır ve pamuk yardımıyla kurutulur.

TEREYAĞINDA TUZ ANALİZİ

► Yöntemin Prensibi

- Sodyum klorür (NaCl) formunda bulunan tuzun, normalitesi belli (0,1 N) AgNO₃ çözeltisi ile titre edilerek tuz miktarının saptanması ilkesine dayanır. Bu yönteme Mohr Metodu denir.

► Deneyin Yapılışı

1. Homojen hale getirilmiş örnekten 5 g erlene tartılır.
2. Üzerine sıcak saf su eklenerek kuvvetli bir şekilde 5-10 dakika çalkalanır.
3. Çözelti süzgeç kağıdından 500 ml'lik balon jojeye süzülür.
4. Erlen 4-5 kere sıcak su ile yıkanarak süzgeç kağıdına dökülür.
 - Böylece hem erlende kalan hem de süzgeç kağıdında kalabilecek olan tuzun suya geçmesi sağlanır.
5. Balon jojedeki süzüntü tam olarak soğuduğu zaman hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlanır.
6. Süzüntüden erlene 25 mL alınarak üzerine 2-3 damla %5'lik potasyum kromat (K₂CrO₄) çözeltisi eklenir.
7. 0,1 N'lik AgNO₃ çözeltisi ile erlendeki örnek kiremit kırmızısı renk verinceye kadar titre edilir.

► Hesaplamalar

- 1 mL 0,1 N AgNO₃ = 0,00585 g NaCl'e eşdeğer
- % Tuz (g) = [(0,00585 x V) / m] x SF x100
V = Harcanan AgNO₃ çözeltisinin hacmi (ml)
m = Alınan numune miktarı (g)
SF = Seyreltme faktörü (X g örnek 500 ml'lik balonjojeye seyreltildi. Bu çözeltiden de 25 mL alındı. Bu durumda seyreltme faktörü 500/25= 20 dir.)

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Besiyeri çeşitleri ve hazırlanmaları
Yapılacağı hafta	8. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- ▶ Besiyerleri (vasat; media; besi ortamı; kültür ortamı; kültür besiyeri) mikroorganizmaların gelişebilecekleri ortamlar olarak tanımlanır ve basit olarak su ve besin maddelerini içerir.

Besiyerleri granüler veya toz şeklinde olabilirler.

BESİYERLERİNİN SINIFLANDIRILMASI

- ▶ Fiziksel özelliklerine göre
 - ▶ Katı (Agar)
 - ▶ Sıvı (Broth)
 - ▶ Yarı Katı (Semi Solid)
- ▶ Orijinlerine göre
 - ▶ Bitkisel,
 - ▶ Hayvansal,
 - ▶ Sentetik,
 - ▶ Türev,
 - ▶ Karışık Vb.
- ▶ Kullanım amaçlarına göre
 - ▶ Genel besiyerleri
 - ▶ Özel besiyerleri

KULLANIM AMAÇLARINA GÖRE BESİYERLERİ

- ▶ Genel Besiyerleri
 - ▶ Herhangi bir inhibitör madde içermeyen, besin maddelerince yeterli veya zengin, herhangi bir mikroorganizma grubunun gelişmesini özel olarak desteklemeyen, bazı zor gelişen mikroorganizmaların da dahil olduğu çok sayıda bakterinin gelişmesini sağlayan besiyerleridir.
 - ▶ Başlıca kullanım amaçlarına;
 - toplam mezofil aerob bakteri sayımı,
 - toplam psikrofil aerob bakteri sayımı,

bozulma/hastalık etmeninin ön izolasyonu örnek verilebilir.

Örnek: Plate Count Agar, Nutrient Broth, Nutrient Agar, Tryptic Soy Agar vb.

► Özel Besiyerleri

Çalışma amacına göre seçilen, belli bir mikroorganizma grubu için hazırlanan ve yapıları daha kompleks (karmaşık) olan besi yerleridir. Özel besiyerleride kendi içinde 4 gruba ayrılır.

- Selektif Besiyerleri
- Diferansiyel Besiyerleri
- Zenginleştirme Besiyerleri
- İdentifikasyon Besiyerleri

1- Selektif Besiyerleri

- Karışık bir mikrobiyel floradan gelişmesi istenmeyenleri baskılamak ve inhibe etmek, ancak gelişmesi istenenler için herhangi bir olumsuz etki yapmamak üzere formülüze edilirler.
- Bu amaçla çeşitli inhibitör maddeler kullanılır.
- Selektif besiyerleri, belirli bir grup hatta yüksek selektivite gösterenlerde tek bir cins/ tür mikroorganizmanın gelişmesine izin vereceğinden bu besiyerleri selektif izolasyon selektif sayım ve hatta ön identifikasyon amaçları ile kullanılır.

Örnek: Oxford Listeria Selective Agar, Salmonella-Shigella Agar

- Bir besiyerine selektivite kazandırılması her zaman inhibitör madde ilavesi ile yapılmaz.
- Geliştirilmesi istenilen mikroorganizmanın kullanabileceği, ancak refakatçi mikroflora tarafından kullanılamayan besin maddeleri besiyerine katılarak selektivite sağlanabilir.

Örnek: Tartarik asit ilave edilmiş Potato Dextrose Agar (pH düşürülerek diğer mikroorganizmaların baskılanıp, maya ve küf üremesi kolaylaştırılır.)

2- Diferansiyel Besiyerleri

- Gelişmesi istenen mikroorganizma yanında diğer mikroorganizmalar da gelişebilir, ancak başta koloni morfolojisi olmak üzere çeşitli farklılıklar ile hedef mikroorganizma diğerlerinden ayrılır.
- Gelişen mikroorganizmaların ayrımı koloni morfolojisi, enzimatik aktivitelerin

belirlenmesi, gaz oluşumunun izlenmesi vb çıplak gözle yapılabileceği gibi bunlara ilave olarak fluorensansa dayalı olarak da yapılabilmektedir.

Örnek 1: Egg Yolk Tellurite Emulsion ilave edilmiş Baird Parker Agar (BPA) - BPA besiyerinde hem Stafilokoklar hem de Mikrokoklar üreyebilmektedir. Ancak *S. aureus*'un belirlenmesinde söz konusu etkenin lesitinaz enzim aktivitesi dikkate alınır. BPA'da siyah renkli üreyen kolonilerden lesitinaz enzim aktivitesine sahip olanların etrafında şeffaf zon gözlemlenir ve *S. aureus* şüpheli olarak değerlendirilir.

Örnek 2: MUG ilave edilmiş Violet Red Bile Agar (VRB) - MUG'lu VRB'de *E. coli*'lerin ayrımında kullanılır. *E.coli*'nin O157:H7 serotipi β -glukuronidaz enzim aktivitesine sahip olmadığından MUG'u parçalayamaz. MUG'lu VRB'de UV ışık altında floresan vermeyen koloniler *E.coli* O157:H7 şüpheli olarak değerlendirilir.

3- Zenginleştirme Besiyerleri

- ▶ Karışık bir mikroflora içinde hedeflenen bir mikroorganizmayı geliştirmek, sayısını artırmak gibi amaçlarla kullanılmaktadır.
- ▶ *Ön Zenginleştirme Besiyerleri*
- ▶ Hasar görmüş mikroorganizmaların aktivitelerini kazanmaları için kullanılan, bileşiminde inhibitör içermeyen ve dolayısıyla aktivite kazanması istenen mikroorganizma yanında refakatçi mikrofloranın da gelişmesini sağlayan sıvı besiyerleridir.

Örnek 1: Tamponlanmış Peptonlu Su – *Salmonella* spp.

Örnek 2: Novobiocin ilave edilmiş Modified Typtone Soy Broth – *E. coli* O157:H7

- ▶ *Selektif Zenginleştirme Besiyerleri*
- ▶ Bu aşamada karışık kültür olarak bulunan bakterilerden gelişmesi istenmeyenler çeşitli selektif inhibitörler ile engellenip aranan mikroorganizmanın karışık kültür içindeki sayısının artırılması hedeflenmektedir
- ▶ Selektif zenginleştirme aşamasını genellikle selektif bir katı besiyerine sürme yapılarak aranan bakterinin selektif izolasyonu aşaması izler.

Örnek 1: Rappaport Vassiliadis Enrichment Broth – *Salmonella* spp.

Örnek 2: Fraser Supplement ilave edilmiş Fraser Broth - *L. monocytogenes*

4- İdentifikasyon Besiyerleri

- ▶ Mikroorganizmanın belirli bir besin maddesini (genellikle karbohidratlar)

kullanıp/kullanmadığının saptanması, belirli bir besin maddesinden metabolizma sonunda tayin edilebilecek metabolitleri (örneğin triptofandan indol) oluşturup/oluşturmadığının belirlenmesi vb amaçlar için kullanılmaktadır.

Bakterinin hareketli olup olmadığının saptanması amacıyla kullanılan yarı katı (semi solid) besiyerleri de identifikasyon besiyerleri grubuna katılmaktadır.

Örnek : Simmons Citrate Agar, Üre Broth, SIM Medium vb.

Diğer Besiyerleri Çeşitleri;

- ▶ Antimikrobiyel duyarlık testlerinde kullanılan sıvı ve katı besiyerleri, saf kültürlerin korunması (=kolleksiyonu) amacıyla kullanılan besiyerleri, taşıma besiyerleri gibi özel amaçlara yönelik olarak kullanılan çeşitli besiyerleri de vardır.

BESİYERİNİN HAZIRLANMASI

- ▶ Kullanılacak cam malzemeler iyi bir şekilde yıkanmış ve durulanmış, distile sudan geçirilmiş ve kurutulmuş olması gerekmektedir.
- ▶ Besiyerinin hazırlanacağı cam malzemeler yeteri büyüklükte olmalıdır.
- ▶ Tartımın yapılacağı terazinin 0,01 gram duyarlıkta olması gerekir.
- ▶ Tartım sırasında her besiyeri için temiz spatül kullanılmalıdır.
- ▶ Besiyerlerinin kapakları açıldıktan sonra tartımın hemen yapılmalıdır.
- ▶ Tartımlar sırasında besiyeri bileşenlerinin çok az da olsa toz bulutu oluşturmamasına özen gösterilmeli, toz bulutu oluştu ise kesinlikle solunulmaması, tartım sırasında besiyeri bileşenlerinin çıplak deriye ve özellikle göze temas etmemesinin sağlanması, temas varsa da bol su ile hemen yıkanması gereklidir.
- ▶ Bazı besiyerleri suda kolay erimezler. Bu gibi durumlarda besiyerinin 50 °C'a kadar ısıtılarak karıştırılması ve/veya suyun bu sıcaklıkta kullanılması erimeyi hızlandırır.
- ▶ Eğer besiyeri sıvı ise (Broth/Buyyon) besiyeri tümüyle eridikten sonra tüplere, küçük hacimli erlenlere/balonlara dağıtılır veya doğrudan sterilize edilebilir.
- ▶ Uygun olarak depolanmış ve raf ömrü bitmemiş besiyerlerinde distile su ve temiz cam malzeme kullanılması, besiyeri sterilizasyonunun sulandırmadan sonra vakit geçirmeden yapılması ile besiyeri pH'sında bir sorun çıkmamaktadır.
- ▶ Sterilizasyon sonrasında değişir.Besiyeri pH'sı az da olsa bir miktar değiştiğinden besiyeri pH'sı sterilizasyon sonrasında ayarlanmalıdır !!!

- ▶ pH ayarlanmasında
 - ▶ pH'nın **arttırılmasında** 1 N NaOH
 - ▶ pH'nın **azaltılmasında** 1 N HCl kullanılır.
- ▶ Sterilizasyon, yaygın olarak ısıtıl işlem uygulaması ile ve zorunlu hallerde filtrasyon ile yapılır.
- ▶ Sterilizasyonun amacı dehidre besiyeri, besiyeri katkıları, cam malzeme, tartım ekipmanı, su ve pamuk/vidalı kapak vb.'den gelebilecek tüm mikroorganizmaları öldürmektir. Böylece besiyerinde gelişen mikroorganizma, çalışma özelliğine göre örnekten/ana kültürden gelmiş olacaktır.
- ▶ Isıtıl işlem, aksi belirtilmedikçe otoklavda ve **121 °C'de 15 dakika** süre ile yapılmaktadır.
- ▶ Otoklavda sterilizasyon belirli sıklıklarla kontrol edilmelidir. Bu amaçla otoklav bantları, biyolojik indikatörler (spor suspansiyonları) ve çeşitli kimyasal indikatörler kullanılmaktadır.
- ▶ Otoklav veya daha geniş tarifi ile ısıtıl işlem ile sterilizasyon sonrası agarlı besiyerleri çoğunlukla petri kutularına dökülerek kullanılır.
- ▶ Agarlı besiyerlerinin diğer kullanılış şekilleri arasında tüplerde yatık veya dik agar, erlende yatık agar, Roux şişelerinde kullanım vb sayılabilir. Sayılan bu diğer kullanım şekillerinde agarlı besiyeri genellikle anılan kaplarda sterilize edilir.
- ▶ Agarlı besiyerlerinin petri kutularında sterilize edilmeleri uygulanan bir şekil değildir.
- ▶ Agarlı besiyerleri her zaman erlen/balon/şişelerde sterilize edilir ve sterilizasyon sonrası steril petri kutularına aseptik koşullarda dökülür.
- ▶ Petri kutularında agarlı besiyeri kalınlığı 5 mm kadar olmalıdır.
- ▶ Agarlı besiyeri kullanımında en doğru uygulama otoklav sonrası besiyerinin hızla **50 °C'ye** soğutulup, bu sıcaklıkta **steril** petri kutularına dökülmesidir.
- ▶ Petri kutusunda "**dökme yöntemi kültürel sayım**" amacıyla önceden ilave edilmiş örnek varsa dökme sıcaklığı 45 °C olmalıdır.
 - ▶ Bu uygulamada dikkat edilmesi gereken diğer nokta petri kutusunda bulunan mikroorganizmaları olası termal şok zararlarından korumak için petrilerin oda sıcaklığında tutulması gerekliliğidir.
- ▶ Agarlı besiyeri kullanımında en doğru uygulama otoklav sonrası besiyerinin hızla **50 °C'ye** soğutulup, bu sıcaklıkta **steril** petri kutularına dökülmesidir.

- ▶ Petri kutusunda "**dökme yöntemi kültürel sayım**" amacıyla önceden ilave edilmiş örnek varsa dökme sıcaklığı 45 °C olmalıdır.
 - ▶ Bu uygulamada dikkat edilmesi gereken diğer nokta petri kutusunda bulunan mikroorganizmaları olası termal şok zararlarından korumak için petrilerin oda sıcaklığında tutulması gerekliliğidir.
- ▶ **Dikkat edilecek noktalar:**
 - ▶ Kapağı açılmış besiyerleri kuru ve karanlık yerde saklanmalıdır.
 - ▶ Aksine ve net bir uyarı yoksa besiyerlerinin oda sıcaklığında depolanması yeterlidir.
 - ▶ Bazı besiyerleri ambalajlarında 15 °C altında saklanması önerisine uyulması gerekir.
 - ▶ Dehidre besiyerlerinin buzdolabında saklanması kondensasyon riski nedeniyle önerilmez .
 - ▶ Besiyerleri otoklav ve/veya yıkama odası, su banyosu ve kaynar su banyosu yakını gibi nemin yüksek olduğu yerlerde ve doğrudan güneş ışını alan dolaplarda depolanmamalıdır.
 - ▶ Besiyerinde topaklaşma ve/veya renk değişimi gibi nem aldığını gösteren bir kanıt varsa o besiyeri kesinlikle kullanılmamalıdır.

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Mikrobiyolojik analizler
Yapılacağı hafta	9. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- ▶ **Alınan Örneklerin Mikrobiyolojik Ekime Hazırlanması**
- ▶ **Örneklerin Homojenizasyonu ve Seyreltimi (Dilüsyonu)**
- ▶ **Ekim Yöntemleri**
- ▶ **Değerlendirme**

ALINAN ÖRNEKLERİN MİKROBİYOLOJİK EKİME HAZIRLANMASI

- ▶ Aseptik şartlarda alınan örnekler, mikroorganizma sayısında artış ya da azalış olmayacak şekilde soğuk koşullarda en kısa zamanda laboratuara getirilmelidir.
- ▶ Örneklerin içine konulduğu kaplar, deney tüpleri, petri kutularının olası bir karışmayı önlemek için üzerleri silinmeyecek şekilde işaretlenmeli ve kontaminasyona yol açmayacak şekilde tutulmalıdır.
- ▶ Bu nedenle numune alırken bazı önlemler alınmalıdır.
 - ▶ Ambalajlı ürünlerin ambalajlarının dış kısımları açıldıkları yerde % 70'lik etil alkol ile temizlenmeli, mümkünse flambe edilmelidir.
 - ▶ Ambalajı açmak için kullanılan bütün aletler (makas, pens, konserve açacağı vb.) steril olmalıdır.

ÖRNEKLERİN HOMOJENİZASYONU VE SEYRELTİMİ (DİLÜSYONU)

- ▶ Analizi yapılması planlanan numuneden 10 gr veya ml alınarak içerisinde 90 ml steril fizyolojik peptonlu su bulunan stomacher torbasına konur.
- ▶ Sıvı numunenin homojen bir durum alması sağlandıktan sonra, sulandırma işlemine istenilen sayıda devam edilir ve takiben ekim yapmaya geçilir.
 - ▶ Ana dilüsyon, analiz numunesinde hacim veya kütlece alınan belli miktardaki deney numunesinin 9 katı sulandırma sıvısı ile karıştırılması, gerektiğinde karıştırıcı kullanılarak ve varsa büyük partiküllerin çökmesi beklenilerek hazırlanan karışımdır.
 - ▶ Sulandırma tekniğinin esası, hücre sayısını bir seri sulandırma yaparak orantılı bir şekilde azaltmaktır. Bu amaçla genellikle 1/9 (10 katı) oranında sulandırma yapılır.
- ▶ Katı gıdalarda, mikroorganizmaların ayrılması ve sayımı için, örneklerin sıvı bir

ortama alınarak homojenize edilmeleri gerekir. Dilüsyonların hazırlanması prensibi, analiz numunesindeki mikroorganizmaların mümkün olduğunca homojen dağılmasını sağlayacak şekilde ana dilüsyonun hazırlanması ve ekimi takiben petri kaplarında kolonilerin sayılabilmesidir.

- ▶ Birim hacimde izin verilen mikroorganizmaların sayılabilmesi için gerektiği kadar ondalık dilüsyonlar hazırlayarak mikroorganizmaların sayılarının azaltılması esasına dayanır.
- ▶ **Örnek:** Materyalin 1 ml'sinde 50.000 canlı hücre olduğu varsayılırsa, tüp içindeki 9 ml sulandırma sıvısına 1 ml aktarıldığında tüpteki toplam hacim $9+1=10$ ml olur.
- ▶ Materyalin her ml'sinde 50.000 canlı hücre olduğuna göre tüp içinde 50.000 canlı hücre olacaktır. Diğer deyişle ilk tüpteki her 1 ml içinde 5.000 adet canlı hücre olacaktır.
- ▶ Bu tüpten yine 9 ml sulandırma sıvısı bulunan başka bir tüpe 1 ml aktarılsa bu tüpte de $5.000 \text{ adet} / 10 \text{ ml} = 500 \text{ adet} / \text{ml}$ canlı organizma bulunacaktır.
- ▶ Üçüncü sulandırmada ise canlı hücre sayısı $500 \text{ adet} / 10 \text{ ml} = 50 \text{ adet} / 1 \text{ ml}$ olacaktır. Bu şekilde birinci tüp materyale göre 10 kez; ikinci tüp ilk tüpe göre 10 kez, materyale göre 100 kez daha az sayıda canlı organizma içerecektir.

SEYRELTME SIVILARI

- ▶ Özel durumlar hariç seyreltme işlemlerinde steril fizyolojik peptonlu su kullanılır.
- ▶ Sulandırma sıvısı,
 - ▶ Ana dilüsyon için uygun hacimdeki balon veya erlenlere
 - ▶ Ondalık dilüsyonlar için uygun hacimdeki deney tüplerine dağıtılır.
 - ▶ Deney tüplerinde miktarı sterilizasyondan sonra 9 ml veya 9 ml'nin katları hacminde (veya istenilen diğer miktarlarda) ve erlenler içerisinde ise 90 ml veya katları miktarında olmalıdır.
- ▶ Tüp ve erlenlerin ağızları kapak veya pamuk ile kapatılarak, 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.
- ▶ Sulandırma sıvısı hemen kullanılmayacak ise 0°C ila $+5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 1 aydan fazla olmamak şartıyla muhafaza edilebilir.
- ▶ Seyreltme sıvılarından fizyolojik peptonlu su (% 0,1'lik peptonlu su + % 0,85'lik NaCl) 'dan başka;
 - ▶ Tamponlanmış peptonlu su,
 - ▶ Ringer çözeltisi,

- ▶ Fizyolojik tuzlu su da kullanılmaktadır.
- ▶ Bu seyreltme sıvılarının hepsi, canlı hücreler için izotoniktir.
- ▶ Mikroorganizmalar, bu sıvıların içinde canlılıklarını devam ettirirler.
- ▶ Seyreltme sıvısı olarak distile su kullanıldığında, canlı hücreler için izotonik olmaması nedeniyle, hücreler bu ortamda canlılıklarını devam ettiremezler.
 - ▶ Sonuçta o numunede var olan gerçek mikroorganizma sayısı elde edilemez.

EKİM YÖNTEMLERİ

▶ Yüzey Ekim Yöntemi

- 1.Yayma Plak Yöntemi
- 2.Damla Plak Yöntemi
- 3.Membran Filtre Kullanılarak Çabuk Koloni Sayım Yöntemi

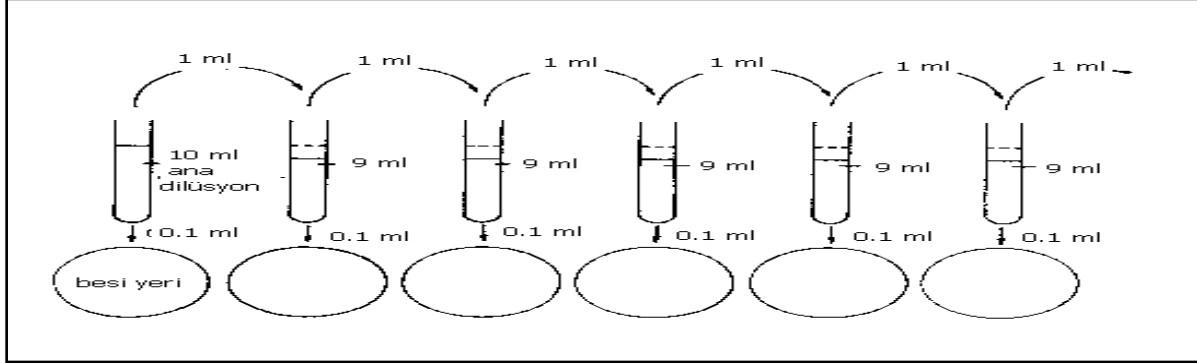
▶ Dökme Plak Yöntemi

- 1.Tek Kat Dökme Yöntemi
- 2.Çift Katlı Dökme Yöntemi
- 3.Yuvarlak Tüp Damla Yöntemi
- 4.Küçük Plak Dökme Yöntemi

YAYMA PLAK YÖNTEMİ

- ▶ Bu yöntem daha önce petrilere dökülerek katılaşması sağlanmış besi yerlerinin yüzeyine gıda örneğinden hazırlanan dilüsyonlardan konularak özel bir cam çubuk (drigalski spatülü) ile yayılması ve uygun koşullarda inkübasyonu sonucu oluşan kolonilerin sayılması esasına dayanır.
- ▶ Ekim için hazırlanan seyreltim tüplerinden 0,1'er ml alınıp besi yerine aktarılır.
- ▶ Steril drigalski spatülleri ile besi ortamının yüzeyine homojen olarak dağılımları sağlanır.
- ▶ İnkübasyon sonrası petrilerin değerlendirilmesi için besi yeri üzerindeki koloniler sayılır.
 - ▶ Koloni Sayısı X Dilusyon Oranı X 10 işlemi yapılarak sonuç verilir.
 - ▶ Sonuçların değerlendirilmesinde ise 0.1 ml ekim yapıldığı göz önünde bulundurularak sayılan ortalama koloni değerleri seyreltim faktörü ve 10 ile çarpılarak örneğin gramındaki veya mililitresindeki mikroorganizma sayısı ifade edilir.

- Ekim sonrası birim Koloni Oluşturan Birim / gr veya ml (örneğin katı veya sıvı olmasına göre) olarak kaydedilir.
 - kob/gr
 - kob/ml



DÖKME PLAK YÖNTEMİ

- Bu yöntemi, hazırlanan gıda örneği dilüsyonlarından 1'er ml steril petrilere aktırılarak üzerine 15-20 ml kadar yaklaşık 45°C'ye soğutulmuş agarlı besi yerlerinin dökülmesi ve uygun koşullarda inkübasyonu takiben oluşan kolonilerin sayılması şeklinde açıklamak mümkündür.

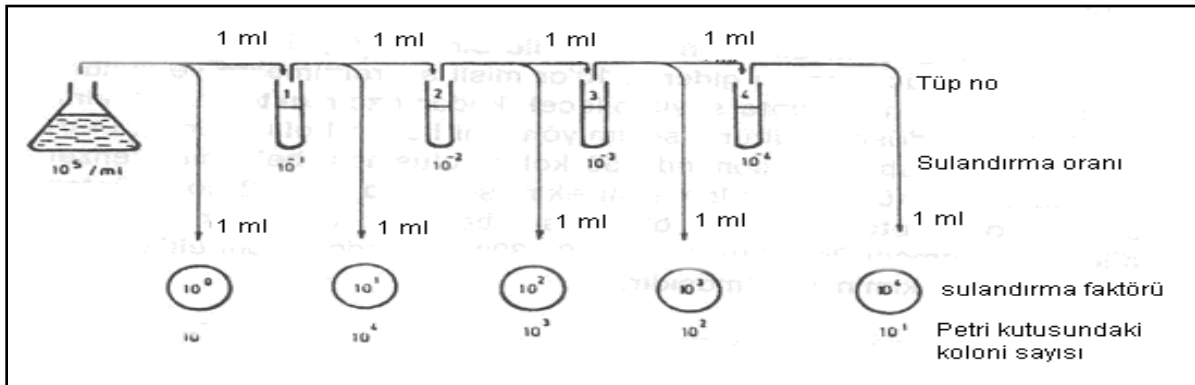
1.TEK KAT DÖKME PLAK YÖNTEMİ

- Gıda maddesi homojenize edilir ve uygun seyreltmeler yapılır.
- Agarlı besi yeri uygun şekilde hazırlandıktan sonra, 44-46°C'ye soğutulur. Her petriye 15-20 ml besi yeri dökülür.
- İşlem 10 dakika içerisinde tamamlanmalıdır.
- Petrilere hafif salınım ve çevirme hareketleri verilerek örnek sıvısı ile besi ortamının homojen karışımı sağlanmış olur.
- Sterilitenin kontrolü için ekilmemiş besi yeri ve seyreltim sıvısı da petriye dökülür ve inkübe edilir.
- Besi yerleri katılaştıktan sonra petri kutuları ters çevrilir.

2.ÇİFT KATLI DÖKME PLAK YÖNTEMİ

- Tek katlı dökme plak yönteminde olduğu gibi ekim gerçekleştirilir.
- Karışım katılaştıktan sonra aynı petri plaklarına yüzeyi kaplayacak şekilde ikinci kat besi yeri dökülerek bir süre daha bekletilir.
- Dökme sırasında besi yerinin 45°C'nin altında donacağı unutulmamalıdır.

- ▶ İnkübasyon sonrası petrilerin değerlendirilmesi için besi yeri üzerindeki koloniler sayılır.
 - ▶ Koloni Sayısı X Dilusyon Oranı X 1 işlemi yapılarak sonuç verilir.
 - ▶ Sonuçların değerlendirilmesinde ise 1 ml ekim yapıldığı göz önünde bulundurularak sayılan ortalama koloni değerleri seyreltim faktörü ve 1 ile çarpılarak örneğin gramındaki veya mililitresindeki mikroorganizma sayısı ifade edilir.
 - ▶ Ekim sonrası birim Koloni Oluşturan Birim / gr veya ml (örneğin katı veya sıvı olmasına göre) olarak kaydedilir.
 - ▶ kob/gr
 - ▶ kob/ml



- ▶ Dökme ekim yönteminde ısıcağa duyarlı organizmalar döküm sıcaklığı yüksek olursa zarar görebilir. Tersine döküm sıcaklığı düşük olursa, besi yeri ile örneğin iyi karışması sağlanamaz.
- ▶ Yüzey ekim yönteminde koloniler daha doğru şekilde sayılabilir.
- ▶ Aerob mikroorganizmalar dökme ekim yönteminde yüzeyin altında kalabilir ve inkübasyonda iyi gelişme gösteremez iken yüzeyde gelişebilenler daha çabuk ve büyük koloni oluşturarak sayımda yanılgılara neden olabilir.

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Süt ve süt ürünlerinde toplam bakteri, maya-küf aranması
Yapılacağı hafta	10. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

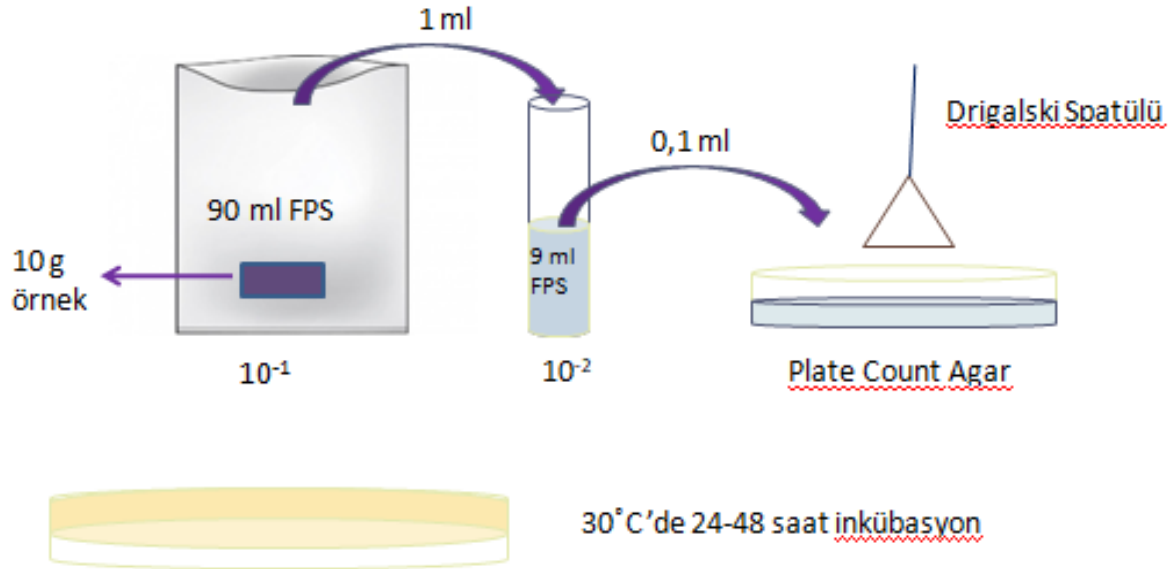
- ▶ Toplam Mezofilik Bakteri Sayısının Belirlenmesi
- ▶ Süt ve Süt Ürünlerinde Maya-Küf Sayısının Belirlenmesi

SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE TOPLAM MEZOFİLİK BAKTERİ SAYISININ BELİRLENMESİ

- ▶ Total bakteri sayısı ve özellikle mezofil aerob bakteriler, o gıdanın hijyenik ve mikrobiyolojik durumu hakkında genel bir bilgi verir.
- ▶ Fermente ürünler hariç, diğer ürünlerde yüksek total bakteri sayısı hijyenik kuralların yetersiz olduğuna işarettir.
- ▶ Diğer taraftan, düşük total bakteri sayısı da o gıdanın sağlık açısından sakınca taşımadığını göstermez.
 - ▶ Toksinogen bakteriler (Örneğin, *S. aureus*) uygulanan ısı işlemiyle tamamen öldürülmesine rağmen, üretmiş olduğu toksin etkili olabilmektedir.
 - ▶ Az sayıda bulunabilen patojen bakterilerin (Örneğin, *Salmonella* spp.), sonraki depolama sırasında çoğalabilme ve dolayısıyla sayılarında artış olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.
- ▶ KATI BESİYERİ YÖNTEMİ
- ▶ Dilüsyon hazırlama: Ana dilüsyon ve seyreltme dilüsyonları olarak Fizyolojik Peptonlu Su kullanılır.
- ▶ Fizyolojik Peptonlu Su hazırlanışı:
 - ▶ 8,5 g NaCl, 1 g Pepton, 1 l Distile Su
 - ▶ Kullanılan besiyerleri: Plate Count Agar (PCA)
- ▶ Analiz yapılacak örnekten katı ise 10 g, sıvı ise 10 ml aseptik şartlarda alınarak stomacher torbasına konur.
- ▶ Üzerine 90 ml steril fizyolojik peptonlu su ilave edilir.
- ▶ Homojenizasyon işlemine tabi tutulur.
- ▶ Homojenizasyonun ardından seri dilüsyonlar hazırlanır.
- ▶ PCA besi ortamına yayma plak tekniği ile ekim yapılarak, petriler 30°C’de 24-48 saat inkübe edilir.

- İnkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılarak aerobik mezofilik bakteri sayısı saptanır.
 - Koloni Sayısı X Ekim Yapılan Dilüsyon Oranı X 10 kob/gr-ml

Süt ve Süt Ürünlerinde Toplam Mezofilik Bakteri Sayısının Belirlenmesi

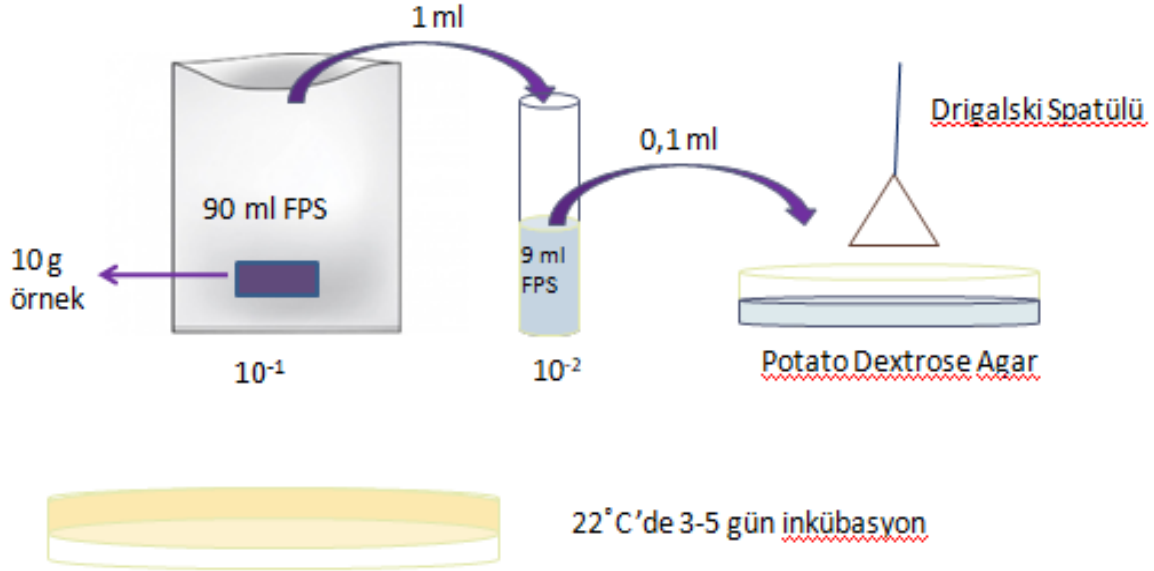


SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE MAYA-KÜF SAYISININ BELİRLENMESİ

- Analiz edilecek numunenin genel hijyen kalitesi hakkında bilgi verir.
- KATI BESİYERİ YÖNTEMİ
- Dilüsyon hazırlama: Ana dilüsyon ve seyreltme dilüsyonları olarak Fizyolojik Peptonlu Su kullanılır.
- Fizyolojik Peptonlu Su hazırlanışı:
 - 8,5 g NaCl, 1 g Pepton, 1 l Distile Su
 - Kullanılan besiyerleri: Tartarik Asit ilave edilmiş Potato Dextrose Agar (PDA)
- Analiz yapılacak örnekten katı ise 10 g, sıvı ise 10 ml aseptik şartlarda alınarak stomacher torbasına konur.
- Üzerine 90 ml steril fizyolojik peptonlu su ilave edilir.
- Homojenizasyon işlemine tabi tutulur.
- Homojenizasyonun ardından seri dilüsyonlar hazırlanır.
- PDA besi ortamına yayma plak tekniği ile ekim yapılarak, petriler 22°C'de 3-5 gün inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılarak maya küf sayısı saptanır.

Koloni Sayısı X Ekim Yapılan Dilüsyon Oranı X 10 kob/gr-ml

Süt ve Süt Ürünlerinde Maya-Küf Sayısının Belirlenmesi



Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı	İmza

Uygulamanın adı	Süt ve süt ürünlerinde <i>Staphylococcus aureus</i> aranması
Yapılacağı hafta	11. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- ▶ *S. aureus*;
 - ▶ Gram pozitif
 - ▶ Katalaz, koagulaz pozitif
 - ▶ Ubiquiter özellikte
 - ▶ Çevresel şartlara DAYANIKLI
 - ▶ Rekabetçi özelliği ZAYIF
 - ▶ Enfeksiyon
 - ▶ İntoksikasyon (Enterotoksinler)
- ▶ *S. aureus*'un üreme ve toksin oluşturması için genel koşullar

	Üreme		Toksin Oluşturma	
	Optimum	Spektrum	Optimum	Spektrum
Sıcaklık(°C)	35-37	7-48	35-40	10-45
pH	6,0-7,0	4-9,8	6,0-7,0	4,8-9,0
Aw değeri	0,98->0,99	0,83->0,99	0,98	0,86->0,99
%NaCl	0,5-4	0-20	0,5	0-10
Atmosfer	Aerob	Aerob –Anaerob	Aerob	Aerob-Anaerob

Stafilokokal İntoksikasyonlar

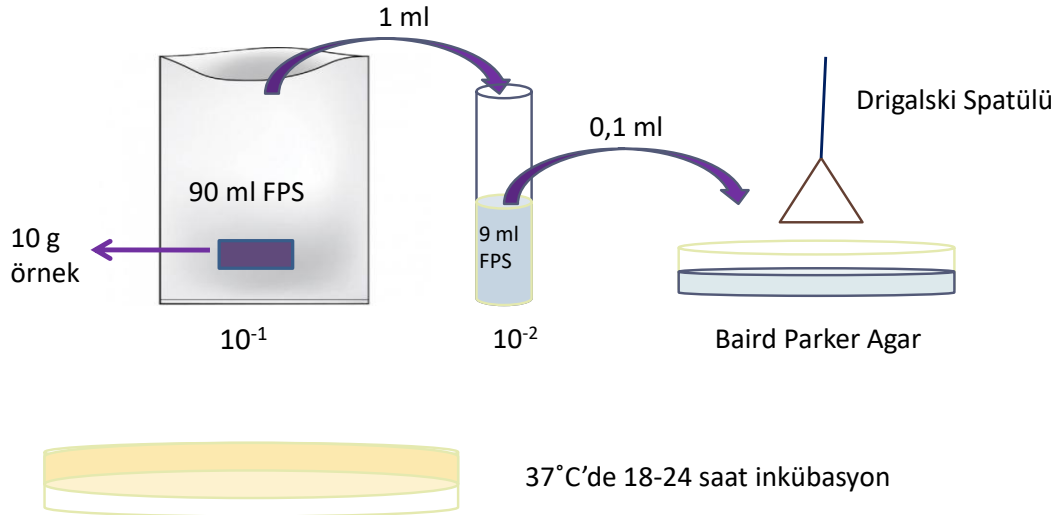
- ▶ Kaynaklar ; Hayvanlar, portör personel, kontamine alet-ekipmanlar, kontamine gıdalar, vb.
- ▶ Uygun ortam koşullarında *S. aureus* gıdada enterotoksinlerini oluşturur.
- ▶ Enterotoksinler aracılığı ile gıda tüketiminden 1-6 saat sonra gıda zehirlenmesi tablosu şekillenir.
 - ▶ Halsizlik
 - ▶ Abdominal ağrı

- Kusma
- İshal

SÜT ve SÜT ÜRÜNLERİNDE *Staphylococcus aureus* ARANMASI

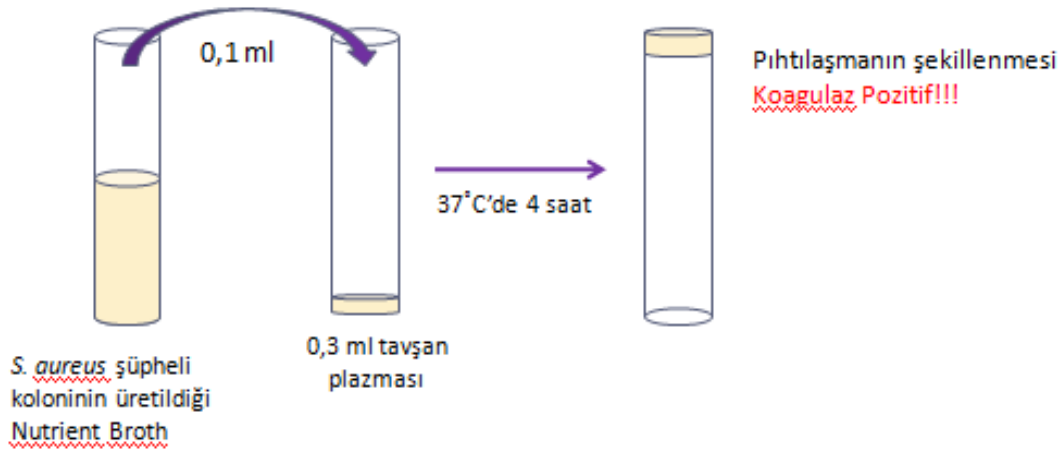
- Dilüsyon hazırlama: Ana dilüsyon ve seyreltme dilüsyonları olarak Fizyolojik Peptonlu Su kullanılır.
- Fizyolojik Peptonlu Su hazırlanışı:
 - 8,5 g NaCl, 1 g Pepton, 1 l Distile Su
 - Kullanılan besiyeri: Egg Yolk Tellurite Emulsion ilave edilmiş Baird Parker Agar (BPA)
- Analiz yapılacak örnekten katı ise 10 g, sıvı ise 10 ml aseptik şartlarda alınarak stomacher torbasına konur.
- Üzerine 90 ml steril fizyolojik peptonlu su ilave edilir.
- Homojenizasyon işlemine tabi tutulur.
- Homojenizasyonun ardından seri dilüsyonlar hazırlanır.
- BPA besi ortamına yayma plak tekniği ile ekim yapılarak, petriler 37°C'de 18-24 saat inkübe edilir.

SÜT ve SÜT ÜRÜNLERİNDE *Staphylococcus aureus* ARANMASI



- ▶ İnkübasyon sonunda oluşan siyah renkli stafilokok-mikrokok olarak değerlendirilir, siyah renkli stafilokok kolonileri içerisinde *S.aureus* için tipik olan (siyah renkli, etrafında açık renkli zon bulunan) koloniler seçilerek katalaz ve koagülaz testi uygulanır.
- ▶ Katalaz testi:
- ▶ Bakteri kültüründen öze yardımıyla koloni temiz bir lama alınıp, birkaç damla %3'lük H_2O_2 ile karıştırılır.
- ▶ Katalaz enzimine sahip etkenler H_2O_2 'yi su ve oksijene ayrıştırmakta, dolayısıyla ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlenmektedir.
- ▶ Sonuç olarak kabarcık oluşumu gözlenen koloniler katalaz pozitif olarak değerlendirilir.
- ▶ Koagülaz testi
- ▶ BPA'da üreyen *S.aureus* şüpheli koloniler 10 ml Nutrient Broth içeren tüplere aktarılaraq $37^\circ C$ 'de 18-24 saat inkübe edilir.
- ▶ İnkübasyon sonunda, 0,3 ml tavşan plazması içeren tüplere Nutrient Broth'ta gelişen kültürden 0,1 ml inoküle edilerek $37^\circ C$ 'de inkübasyona bırakılır.
- ▶ 4 saat sonra pıhtılaşma durumu kontrol edilir ve pıhtılaşmanın gözlenmesi koagülaz testi yönünden pozitif olarak değerlendirilir.

▶ Koagülaz testi



- ▶ Gıda numunesindeki *S.aureus* seviyesinin hesaplanması
- ▶ Örneğin 1 gramındaki *S.aureus* sayısı; tipik koloni sayısı ile koagülaz (+) sonuç alınan koloni sayısı, dilüsyon oranı ve ekim yönteminden gelen dilüsyon oranının çarpımının, koagülaz testi uygulanan tipik koloni sayısına oranlanması ile saptanır.

- **Örnek:** Laboratuara getirilen peynir numunesinde *S. aureus* aranması amacıyla BPA'ya yayma plak tekniği ($0,1 \text{ ml} = 10^{-1}$) ile ekim yapılmış, 24 saat 37°C 'de inkubasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 10^{-2} dilüsyonundan yapılan ekim sonucu 10 tane siyah renkli etrafı şeffaf zonlu, 25 tane de siyah renkli zonsuz koloni sayılmıştır. *S. aureus* şüpheli kolonilerden 5 tanesine koagulaz testi yapılmış, 3 tanesinde koagulaz (+) sonuç alınmıştır. Buna göre *S. aureus* sayısını hesaplayınız.

$$\begin{aligned} S. aureus \text{ sayısı} &= 10 \times 3 \times 10^2 \times 10^1 / 5 \\ &= 6 \times 10^3 \text{ kob/g} \end{aligned}$$

Öğrenci Notları

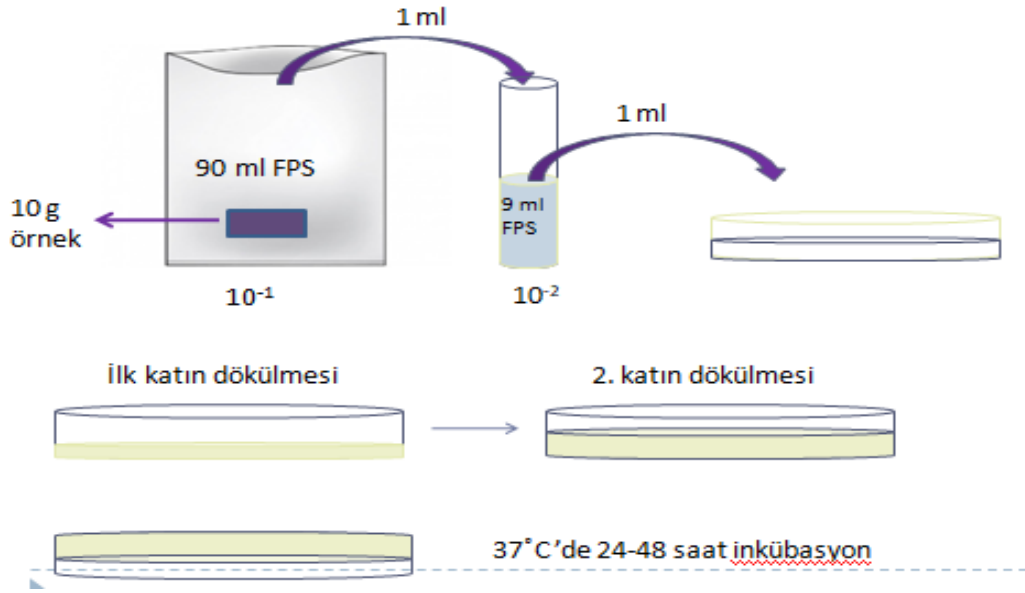
Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

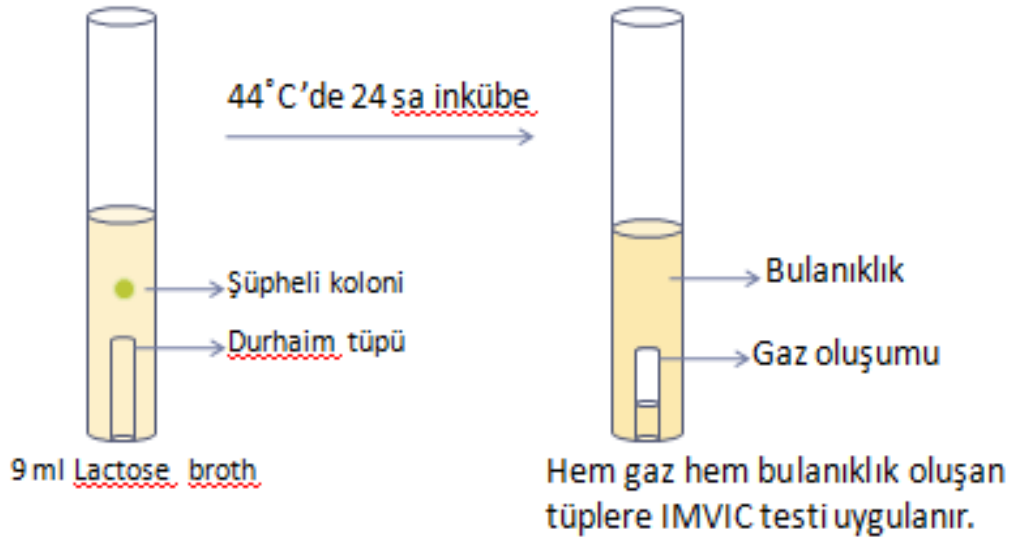
Uygulamanın adı	Süt ve süt ürünlerinde koliform bakteri ve <i>Escherichia coli</i> aranması
Yapılacağı hafta	12. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- ▶ Bir ürünün işlenmesi veya sonrasındaki hata ve kontaminasyonlar ile üretim ve muhafaza koşullarına ilişkin genel hijyenik durum hakkında bilgi veren mikroorganizmalara indikatör mikroorganizmalar denir.
- ▶ İndikatör özelliğe sahip mikroorganizmalar;
 - ▶ Kolay ve hızlı saptanabilmeli,
 - ▶ Mikrofloradaki diğer mikroorganizmalardan kolay ayırt edilmeli,
 - ▶ Varlığı patojenlerin varlığına işaret etmeli,
 - ▶ Sayıları ilgili patojenler ile korelasyon halinde olmalıdır.
- ▶ İndikatör mikroorganizmalar olarak genellikle *Enterobacteriaceae*, koliform bakteriler ve *E. coli* kullanılmaktadır.
- ▶ KATI BESİYERİ YÖNTEMİ
- ▶ Dilüsyon hazırlama: Ana dilüsyon ve seyreltme dilüsyonları olarak Fizyolojik Peptonlu Su kullanılır.
- ▶ Fizyolojik Peptonlu Su hazırlanışı:
 - ▶ 8,5 g NaCl, 1 g Pepton, 1 l Distile Su
 - ▶ Kullanılan besiyerleri: Violet Red Bile Agar (VRB), Lactose Broth, SIM Medium, MR-VP Medium, Simmons' Citrate Agar.
- ▶ Kullanılan ayraçlar: Kovacs' Çözeltisi, Metil-Red, % 40'lık NaOH, α -naphthol Çözeltisi
- ▶ Analiz yapılacak örnekten katı ise 10 g, sıvı ise 10 ml aseptik şartlarda alınarak stomacher torbasına konur.
- ▶ Üzerine 90 ml steril fizyolojik peptonlu su ilave edilir.
- ▶ Homojenizasyon işlemine tabi tutulur.
- ▶ Homojenizasyonun ardından seri dilüsyonlar hazırlanır.
- ▶ VRB besi ortamına çift katlı dökme plak tekniği ile ekim yapılarak, petriler 37°C'de 24-48 saat inkübe edilir.



- ▶ İnkübasyon sonunda kırmızı renkli koloniler koliform bakterileri olarak değerlendirilir. İnkübasyon sonunda koliform bakterilerin oluşturduğu kırmızı renkli koloniler içerisinde *E.coli* için tipik (kırmızı renkli olup etrafında pembe zon bulunan) olan koloniler seçilerek 44°C'de 24 saat içerisinde asit (laktik asit) ve gaz (CO_2) oluşturma testi ve IMVIC testleri uygulanır.
- ▶ Asit ve gaz oluşturma testi:
- ▶ Tipik koloniler steril sivri uçlu bir özeye alınarak, içerisinde ters çevrilmiş Durham tüpü ve 9 ml Laktoz Broth bulunan tüplere inokule edilir.
- ▶ Bu tüpler 44°C'de 24 saat inkübe edilerek asit ve gaz oluşumu kontrol edilir.
- ▶ Oluşan gaz Durham tüplerinde görünürken, besi ortamının bulanıklığı asit oluşumunu gösterir.
- ▶ Hem gaz hem bulanıklık oluşan bu tüplerden yararlanılarak IMVIC testleri uygulanır.



- ▶ IMVIC testi
 - ▶ I: İndol testi
 - ▶ M: Metil Red testi
 - ▶ V: Voges-Proskauer testi
 - ▶ C: Sitrat testi
- ▶ İndol testi: Hem bulanıklık hem de gaz oluşan tüplerden öze yardımıyla alınarak, Semisolid Indol Motility (SIM Medium) besi ortamını içeren tüplere inokulasyon yapıp, 37°C'de 24 saat inkübe edilir.
- ▶ İnkübasyon sonunda tüplere 0,2-0,3 ml Kovacs' çözeltisi eklenip, 10 dakika beklenir.
- ▶ Koyu kırmızı vişne rengi oluşumu pozitif olarak, portakal rengi (+/-), sarı renk ise negatif olarak değerlendirilir.
- ▶ Metil Red testi: Hem bulanıklık hem de gaz oluşan tüplerden alınan bir öze dolusu kültür, içerisinde 5 ml MR-VP medium bulunan tüplere inokule edilir ve 37°C'de 24 saat günlük inkübasyona bırakılır.
- ▶ İnkübasyonu takiben tüplere birkaç damla metil red ilave edilir ve belirgin kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilir.
- ▶ Voges-Proskauer testi: Hem bulanıklık hem de gaz oluşan tüplerden alınan bir öze dolusu kültür, içerisinde 5 ml MR-VP medium bulunan tüplere inokule edilir ve 37°C'de 24 saat günlük inkübasyona bırakılır.
- ▶ İnkübasyonun bitiminde tüplere 5 ml % 40'lık NaOH çözeltisi ilave edilip çalkalanır ve takiben 0,6 ml miktarında α -naphtol eklenerek değişimi gözlenir.

- ▶ Kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilir.
- ▶ Sitrat testi: Hem bulanıklık hem de gaz oluşan tüplerden öze ile kültür alınarak, Simmons' Citrate Agar bulunan yatık agar tüplerine inokule edilip, 37°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılır.
- ▶ İnkübasyonun ardından besi yerinin normal rengi olan yeşil renk gözlemlenirse sonuç negatif, renk maviye dönüşmüş ise pozitif olarak değerlendirilir.
- ▶ 44°C'de 24 saat içerisinde asit ve gaz oluşturma yanında; **İndol (+), Metil-Red (+), Voges-proskauer (-) ve Sitrat (-)** sonuçları, *E.coli* tip I'in varlığını gösterir.
- ▶ Koliform sayısının belirlenmesi: VRB agar'da hem zonlu hem de zonsuz tüm koloniler koliform bakteri olarak değerlendirilir.
- ▶ Numunenin 1 gramındaki koliform bakteri sayısı; koloni sayısı, dilüsyon oranı ve tipik koloni sayısının çarpılması ile saptanır.
- ▶ *E. coli* sayısı; VRB agar'da oluşan *E. coli* şüpheli tipik kolonilere yukarıda belirtilen testler uygulanır.
- ▶ Numunenin 1 gramındaki *E. coli* sayısı; tipik koloni sayısı ile IMVIC testlerinde *E. coli* için pozitif sonuç alınan koloni sayısı, dilüsyon oranı ve ekim yönteminden gelen dilüsyon oranının çarpımının, IMVIC testi uygulanan tipik koloni sayısına oranlanması ile saptanır.
- ▶ **Örnek:** Laboratuara getirilen peynir numunesinde koliform bakteri ve *E. coli* sayısının belirlenmesi amacıyla 10^{-2} dilüsyondan VRB'ye çift katlı dökme plak tekniği (1 ml = 10) ile ekim yapılmış, 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 10 tane kırmızı renkli etrafı pembe zonlu, 15 tane de kırmızı renkli zonsuz koloni sayılmıştır. *E. coli* şüpheli kolonilerden 5 tanesi öncelikle 5 farklı tüpte bulunan Lactose broth'a öze yardımıyla geçilmiş, inkübasyon sonunda 5 tüpün 4'ünde hem bulanıklık hem gaz oluşumu gözlemlenmiştir. Yapılan IMVIC testlerinde de 3 koloniye ait testler (İndol (+), Metil-Red (+), Voges-proskauer (-) ve Sitrat (-)) pozitif olarak değerlendirilmiştir. Buna göre koliform bakteri ve *E. coli* sayısını hesaplayınız.

$$\text{Koliform bakteri sayısı} = 25 \times 10^2 \times 10^0 = 2,5 \times 10^3 \text{ kob/g}$$

$$\text{E. coli sayısı} = 10 \times 3 \times 10^2 \times 10^0 / 5 = 6 \times 10^2 \text{ kob/g}$$

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

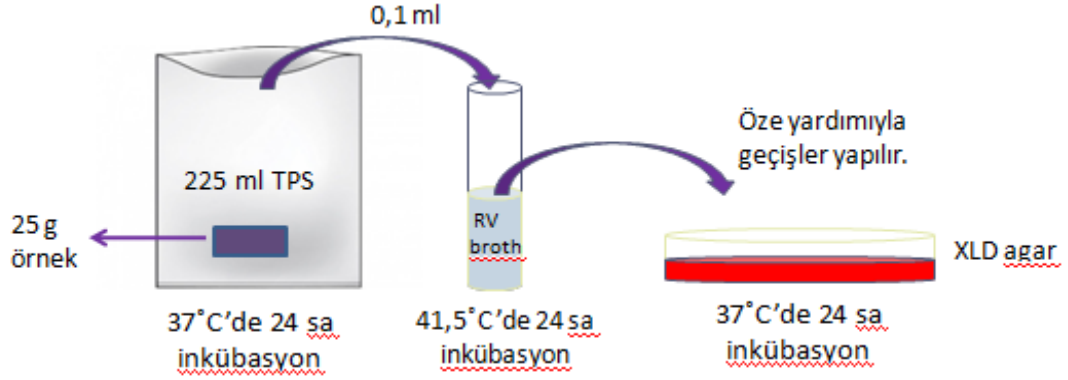
İmza

Uygulamanın adı	Süt ve süt ürünlerinde <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> aranması
Yapılacağı hafta	13. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

SÜT ve SÜT ÜRÜNLERİNDE *Salmonella* spp. ARANMASI

- ▶ *Salmonella* spp.;
- ▶ *Enterobacteriaceae*
- ▶ Gram-negatif
- ▶ Spor oluşturmayan
- ▶ Fakültatif anaerob
- ▶ Çubuk formunda
- ▶ Optimal 35-37°C (6-47°C)
- ▶ Optimal pH 6.5-7.5 (4-9)
- ▶ 0,94-0,99 aw
- ▶ %8 tuz konsantrasyonunda canlı
- ▶ Ön zenginleştirme
- ▶ Selektif zenginleştirme
- ▶ Selektif izolasyon
- ▶ İdentifikasyon
- ▶ Kullanılan besiyerleri: Tamponlanmış Peptonu Su (TPS), Rappaport Vassiliadis Enrichment Broth (RV), Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD), Urea Broth, Triple Sugar Iron Agar (TSI), Lysine Iron Agar (LIA).
- ▶ Analiz yapılacak örnekten katı ise 25 g, sıvı ise 25 ml aseptik şartlarda alınarak stomacher torbasına konur.
- ▶ Üzerine 225 ml steril tamponlanmış peptonlu su ilave edilir.Homojenizasyon işlemine tabi tutulur.
- ▶ Elde edilen homojenizat ön zenginleştirme amacıyla 37°C’de 24 saat inkübe edilir.
- ▶ İnkübasyon sonunda selektif zenginleştirme için homojenizattan 0,1 ml alınır ve Rappaport Vassiliadis Enrichment Broth’a geçilerek 41,5°C’de 24 saat inkübe edilir.
- ▶ İnkübasyonun ardından selektif izolasyon amacıyla XLD agara öze yardımı ile geçişler yapılır ve 37°C’de 24 saat inkübe edilir.

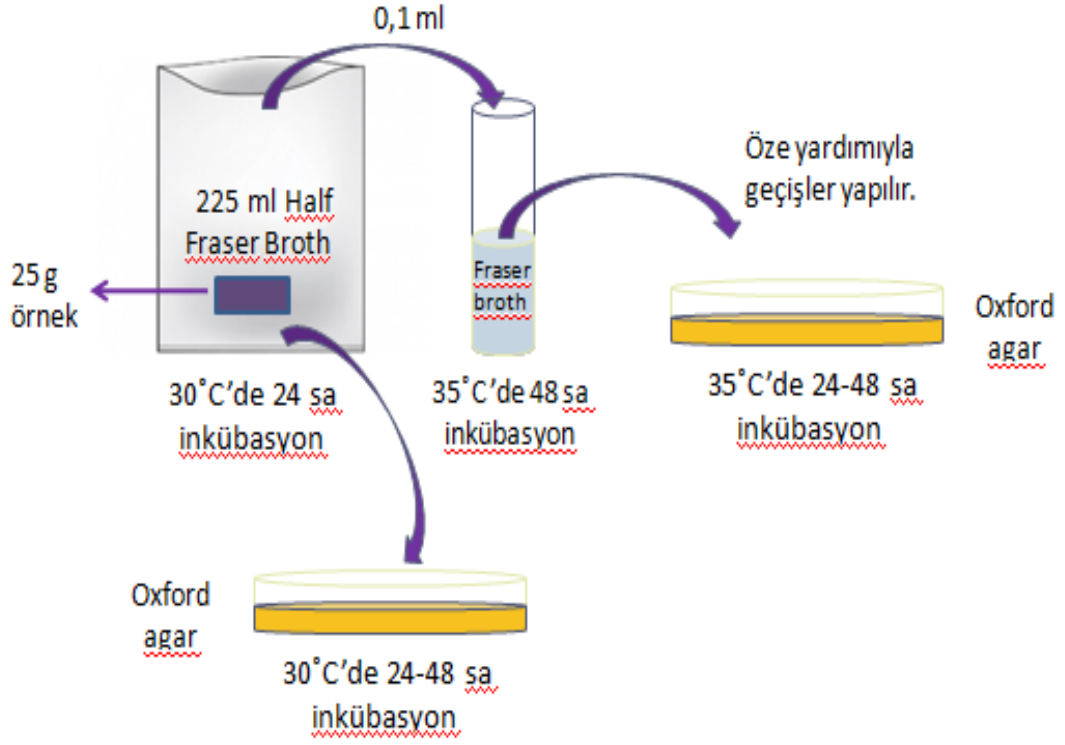


- ▶ İnkübasyon sonunda siyah renkte ya da merkezi siyah kırmızı renkli koloniler *Salmonella* spp. şüpheli olarak değerlendirilir. Şüpheli koloniler seçilerek identifikasyon amacıyla öze yardımı ile üre brotha geçilir ve 37°C'de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda kullanılan ticari besi yerinin özelliğine göre üre negatif olarak değerlendirilen kolonilerin öze yardımı ile TSI'ya ve LIA'ya geçişleri yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilir.
- ▶ TSI agarın içermiş olduğu şekerler (laktoz, sükroz ve glikoz) fermente edildiğinde, oluşan asit üretimi fenol kırmızısı indikatörü ile saptanır. Oluşan renk değişimleri asit üretimi için sarı ve alkalinizasyon için kırmızıdır. Nötral veya bazik pH'da, hidrojen sülfid (sodyum tiyosülfattan üretilen) ferröz amonyum tuzu ile reaksiyona girerek, siyah demir sülfid verir.
- ▶ TSI'da, *Salmonella* spp. yüzeyde kırmızı, dipte sarı ve siyah renk oluşturur. Bazen siyah renk sarı rengi kapatacak kadar yoğun olur. Besiyerinde gaz delikleri ve/veya gaz yarıkları *Salmonella* spp. için tipiktir.
- ▶ LIA'da; lizin dekarboksilasyonu uçta bazik (mor) bir reaksiyon, lizin deaminasyonu ise kırmızı bir slant ile saptanır. Hidrojen sülfid üretimi desiyah bir çökelti oluşması ile gözlemlenir
- ▶ LIA'da, *Salmonella* spp. yüzeyde mor, dipte siyah renk oluşturur.

SÜT ve SÜT ÜRÜNLERİNDE *Listeria monocytogenes* ARANMASI

- ▶ *Listeria monocytogenes*;
 - ▶ Gram pozitif
 - ▶ Kısa çubukçuk
 - ▶ Psikrotrof
 - ▶ Hareketli (10-25°C)

- ▶ Kapsülsüz
- ▶ Sporsuz
- ▶ Optimal 35-37°C (1-45°C)
- ▶ pH 4,3-9,6 (4-9)
- ▶ 0,92-0,99 aw
- ▶ %22 tuz konsantrasyonunda canlı (%10 NaCl'de üreyebilir)
- ▶ Ön zenginleştirme
- ▶ Selektif zenginleştirme
- ▶ Selektif izolasyon
- ▶ İdentifikasyon
- ▶ Kullanılan besiyerleri: Half Fraser supplement ilave edilmiş Half Fraser Broth, Fraser supplement ilave edilmiş Fraser Broth, Oxford Listeria Selective Agar.
- ▶ Analiz yapılacak örnekten katı ise 25 g, sıvı ise 25 ml aseptik şartlarda alınarak stomacher torbasına konur.
- ▶ Üzerine 225 ml steril Half Fraser Broth ilave edilir.Homojenizasyon işlemine tabi tutulur.
- ▶ Elde edilen homojenizat ön zenginleştirme amacıyla 30°C'de 24 saat inkübe edilir.
- ▶ İnkübasyon sonunda selektif zenginleştirme için homojenizattan 0,1 ml alınarak Fraser Broth'a geçilerek 35°C'de 48 saat inkübe edilir. Aynı zamanda homojenizattan öze yardımıyla Oxford Agar'a geçiş yapılır ve 30°C'de 24-48 saat inkübe edilir.
- ▶ İnkübasyonun ardından Fraser Broth'tan da Oxford Agar'a öze yardımı ile geçişler yapılır ve 35°C'de 24-48 saat inkübe edilir.



- Oxford Agar'da 24 saatlik inkübasyonda küçük, grimsi ve siyah zonlu koloniler, 24 saatlik inkübasyondan sonra ise yaklaşık 2 mm çapındaki ortası çökmüş, siyah zonlu koloniler, *L. monocytogenes* açısından şüpheli olarak kabul edilir.
- Bu şüpheli kolonilere hızlı identifikasyon kitleri ile (şeker fermentasyon kitleri) test edilip kesin tanı konur.
- Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne (2011) göre süt ve süt ürünlerinde 25 g'da *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* bulunmamalıdır.

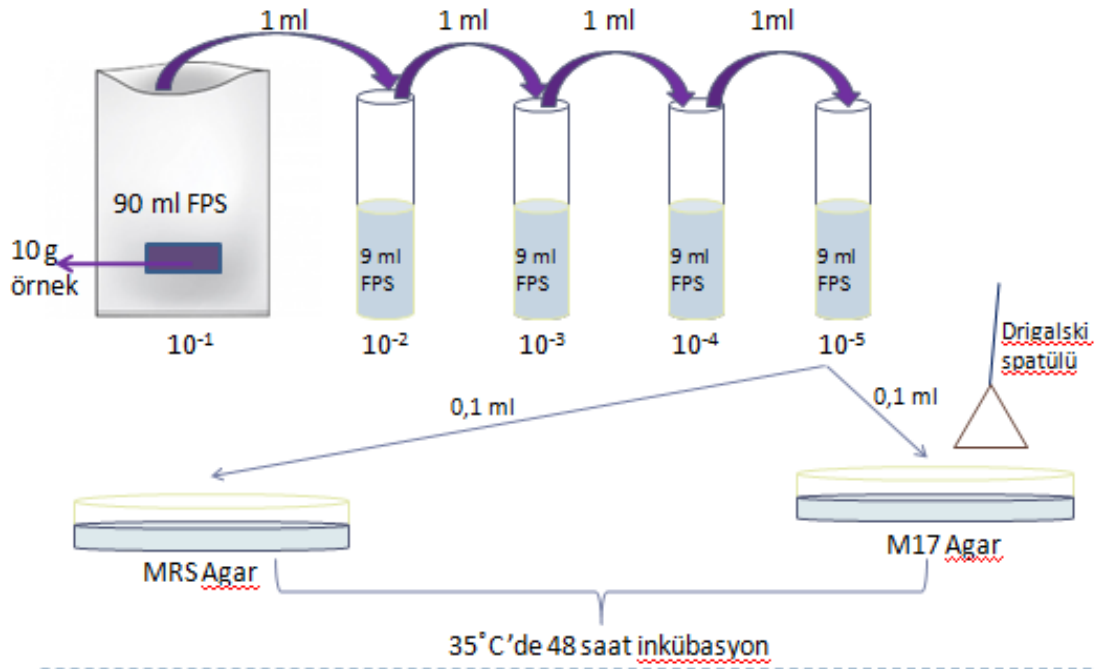
Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı	İmza

Uygulamanın adı	Süt ve süt ürünlerinde laktik asit bakterilerinin aranması
Yapılacağı hafta	14. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- ▶ Süt, non starter laktik asit bakterileri olarak adlandırılan bir bakteri grubunu içermektedir. Bu grup bakteriler, sütün pastörize edilmesi ile birlikte bir miktar yıkımlanmaktadır.
- ▶ Yoğurt, peynir gibi süt ürünlerinin yapı özellikleri gereği ürünlerde laktik asit bakterilerinin belli bir miktarın altında olması istenmemektedir.
- ▶ Süt orijinli Laktik Asit Bakterileri (LAB)’nden önemlileri;
 - ▶ *Lactobacillus* spp.,
 - ▶ *Lactococcus* spp.,
 - ▶ *Leuconostoc mesenteroides*,
 - ▶ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*’tur.
- ▶ Dilüsyon hazırlama: Ana dilüsyon ve seyreltme dilüsyonları olarak Fizyolojik Peptonlu Su kullanılır.
- ▶ Fizyolojik Peptonlu Su hazırlanışı:
 - ▶ 8,5 g NaCl, 1 g Pepton, 1 l Distile Su
 - ▶ Kullanılan besiyeri: De Man Rogosa Sharpe (MRS) Agar, %10’luk laktoz ilave edilmiş M17 Agar
- ▶ Analiz yapılacak örnekten katı ise 10 g, sıvı ise 10 ml aseptik şartlarda alınarak stomacher torbasına konur.
- ▶ Üzerine 90 ml steril fizyolojik peptonlu su ilave edilir.
- ▶ Homojenizasyon işlemine tabi tutulur.
- ▶ Homojenizasyonun ardından seri dilüsyonlar hazırlanır.
- ▶ Laktobasilluslar için De Man Rogosa Sharpe (MRS) Agar, laktokoklar için ise M17 Agar besiyeri ortamına yayma plak tekniği ile ekim yapılarak, petriler 35°C’de 48 saat inkübe edilir.



- Gıda numunesindeki laktik asit bakteri seviyesinin hesaplanması
- Örneğin 1 gramındaki laktik asit bakteri sayısı; her iki besi yerinde üremiş olan koloniler sayılarak toplanır, ekimin yapıldığı dilüsyon oranı ve ekim yönteminden gelen dilüsyon oranını ile çarpılarak hesaplanır.
- Elde edilen laktik asit bakteri seviyesinin $1,0 \times 10^{-7}$ kob/g(ml)'dan düşük olmaması istenir.
- **Örnek:** Laboratuvara getirilen yoğurt numunesi Laktik Asit Bakterileri (LAB) açısından incelenmiştir. Analizde numunenin 10^{-5} dilüsyonundan yayma plak ekim tekniği kullanılarak MRS ve M17 agarlara inokulasyon yapıp, inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda MRS agarda 46 koloni, M17 agarda ise 38 koloni sayılmıştır. Buna göre; analizi yapılan numunenin Laktik Asit Bakteri sayısını hesaplayınız.
- LAB sayısı = $(46+38) \times 10^5 \times 10^1$
= 84×10^6
= $8,4 \times 10^7$ kob/g

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı	İmza