

VET505

GIDA HİJYENİ VE KONTROLÜ

UYGULAMA KİTAPÇIĞI

1. Giriş, laboratuvarların gezilmesi, alet ve cihazların tanıtılması
2. Gıdaların kimyasal analizleri 1
3. Gıdaların kimyasal analizleri 2
4. Suların kimyasal analizleri
5. Mikrobiyolojik ekimlerde kullanılan besi yerleri ve hazırlanmaları
6. Mikrobiyolojik ekime hazırlık ve ekim yöntemleri
7. Gıdalarda toplam bakteri, maya-küf, *S. aureus* aranması
8. Gıdalarda Koliform bakteri ve *E. coli* aranması
9. Suların mikrobiyolojik analizleri
10. Gıdalarda *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 aranması
11. Gıdalarda *Clostridium* ve *Vibrio* cinsi bakterilerin aranması
12. Gıdalarda laktik asit bakterilerinin aranması
13. Yumurtada tazelik-bayatlık muayeneleri
14. Kanatlı ve balık etlerinin muayenesi
15. Pratik çalışmalar için genel tekrar

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 (121⁰C'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 (650⁰C'ye kadar) yakılmasının sağlandığı bir cihazdır.
- **Distile su cihazı:** Bu cihaz da normal şebeke suyunun distilasyonunu sağlamaktadır.
- **pH metre:** Probenin ucunda bulunan elektrot sayesinde batırıldığı numunenin pH'sını ölçmekte kullanılan cihazdır.
- **Su banyosu (Ben mari):** İçerisine koyulan duyarlı numuneyi 0-100⁰C'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- 175⁰C'lerde az 1 saat çalıştırılmaktadır.
- **ELİSA cihazı:** Çeşitli serolojik testler amacıyla kullanılan cihazdır.

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

GIDALARLA İLİŞKİLİ YASAL DÜZENLEMELER

- 5996 Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu
- Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği
- Türk Gıda Kodeksi
 - Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği
 - Türk Gıda Kodeksi Yumurta Tebliği (2014/55)
 - Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı Ve Pirina Yağı Tebliği (Tebliğ No: 2017/26)
 - Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı Ve Pirina Yağı Analiz Metotları Tebliği (Tebliğ No: 2014/53)
 - Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği
 - Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (tebliğ No: 2015/6)
 - Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları Ve Et Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2018/52)
 - Türk Gıda Kodeksi Tereyağı, Diğer Süt Yağı Esaslı Sürülebilir Ürünler Ve Sadeyağ Tebliği (Tebliğ No: 2005/19)
- Hayvansal Gıdaların Resmi Kontrollerine İlişkin Özel Kuralları Belirleyen Yönetmelik
- TSE ve Gıda Standartları

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Gıdaların kimyasal analizleri 1
Yapılacağı hafta	2. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- Kuru Madde Tayini
- Kül Tayini
-

KURU MADDE ANALİZİ

- **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 konur.
- **Hesaplamalar:**
 - **%Kuru madde**=[(Son tartım-Petri darası)/ Numune miktarı] x 100

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= $[(\text{Son tartım}-\text{Petri darası}) / \text{Numune miktarı}] \times 100$

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Gıdaların kimyasal analizleri 2
Yapılacağı hafta	3. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- Ham Protein Tayini
- Yağ Tayini
- Yağlarda Asitlik Tayini

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 'ün damıtılıp belli standart bir asit çözeltisi içinde toplandıktan sonra nötrleşmeyen fazla asit miktarının titrasyonla saptanmasıdır.

○ Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:

- Kjeldahl yağ 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 yağ oksidasyonu (**yakma**).
 2. Organik maddelerin yağ oksidasyonu sonucu oluşan NH_3 'ün NaOH kullanılarak serbest hale getirildikten sonra damıtılması ve belli miktar ayarlı bir asit içinde tutulması (**damıtma**).
 3. NH_3 tarafından nötrleştirilemeyen ayarlı asit çözeltisinin ayarlı bir bazla 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 yağ 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 H₃BO₃ 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'lik HCl miktarı formülde yerine koyularak örnekteki protein miktarı hesaplanır.

1	<p>YAKMA:</p> $\text{Organik madde} + \text{H}_2\text{SO}_4 \xrightarrow[\text{Isı}]{\text{Katalizör}} \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_4^+ + \text{SO}_2$ $\text{NH}_4^+ + \text{SO}_4^{-2} \longrightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2	<p>DAMITMA:</p> $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2\text{NaOH} \longrightarrow \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2\text{NH}_4\text{OH}$ $\text{NH}_4\text{OH} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_3$ $\text{NH}_3 + \text{H}_3\text{BO}_3 \longrightarrow \text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$
3	<p>TİTRASYON:</p> $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3 + \text{HCl} \longrightarrow \text{NH}_4\text{Cl} + \text{H}_3\text{BO}_3$

$$\% \text{Protein} = (\text{V}_{\text{numune}} - \text{V}_{\text{kör}}) \times \text{N} \times 0,014 \times 100 \times \text{F} / \text{m}$$

- V_{numune}: Örnek için harcanan 0,1 N HCl miktarı
- V_{kör}: 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

YAĞ TAYİNİ

○ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİYLE YAĞ TAYİNİ

○ Deneyin Prensibi:

- Sokselet (soxhelet) ekstraksiyon cihazı kullanılarak uygun bir çözücü ile örnekteki yağın ekstrakte edilmesi.
- Kullanılan çözeltiler, alet ve malzemeler:
 - Petrol eteri, Etüv, Sokselet ekstraksiyon cihazı, Selüloz kartuş, Pamuk, Silifli

cam balon, Desikatör, Hassas terazi

○ **Deneyin yapılışı:**

1. Ekstraktör 105°C'deki etüvde kurutulup desikatör içerisinde oda sıcaklığına getirilen ve darası alınan ağzı şilifli balon ile birleştirilir.
2. Homojenize edilmiş örneklerden yaklaşık 5 g örnek selüloz kartuş içerisine alınır ve kartuş pamuk ile kapatılıp Soxhlet ekstraktörüne yerleştirilir.
3. Balon ile birleştirilmiş ekstraktör üzerinden yeteri miktarda dietil eter eklendikten sonra benmari kısmına yerleştirilir.
4. Numunenin yapısına göre 6-8 saat ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilir.
5. Ekstraksiyon işlemi sonrası içerisinde yağ ve dietil eter bulunan balon etüve alınır 105°C'de dietil eterin uçması sağlanır.
6. Desikatör içerisinde oda sıcaklığına gelen balon hassas terazide tartılır ve numunedeki yağ miktarı hesaplanır.

○ **Yağ miktarının hesaplanması;**

$$\%Yağ\ miktarı = \left[\frac{ST - D}{m} \right] \times 100$$

○

- ST: Son tartım ağırlık miktarı
- D : Daranın ağırlık miktarı
- m : Numune miktarı

YAĞLARDA ASİTLİK TAYİNİ

- Bir yağın asitlik derecesi veya asiditesi 100 gram yağdaki serbest halde bulunan yağ asitlerinin nötrleştirmek için harcanan normal alkali çözeltisinin ml sayısına denir.
- Serbest yağ asitliği ise yağlarda bağlı olmayan toplam yağ asitlerin % olarak ifadesidir.
- Deneyin Prensibi:
 - 1 gram yağda bulunan serbest yağ asitlerini nötrleştirmek için harcanan NaOH veya KOH'in mg cinsinden miktarına asit indeksi (asit sayısı) denir.
 - Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:
 - KOH veya NaOH çözeltisi (0.1 N, ayarlı), Fenolftaleyn (%1'lik), Etanol-Dietileter karışımı (1:1,v/v), beher, büret, hassas terazi, pipet

○ **Deneyin yapılışı:**

1. Erlene 5-10 gram örnek tartılır.
2. Örnek üzerine etanol dietileter (1:1) karışımından 50-100 ml eklenir.
3. Yağ ve yağ asitlerinin çözünmesi için 1 dk çalkalanır.
4. Birkaç damla fenolftaleyn damlatılır.
5. Bürete konan 0,1 N NaOH ile kalıcı pembe renk elde edilene kadar titrasyon yapılır.
6. Sonuç hesaplanır.

○ **Asitlik sayısı;**

$$\%Asitlik\ Sayısı = \left[\frac{V}{m} \right] \times 40 \times N$$

○

○ **Serbest yağ asitliği;**

$$\%Serbest\ Yağ\ Asitliği = \left[\frac{V}{m} \right] \times 100 \times N \times mEq$$

○

- V: Harcanan NaOH miktarı
- m: numune miktarı
- N: Titrasyonda kullanılan NaOH'in normalitesi
- mEq: Numunenin serbest yağ asitliğini belirleyen yağ asidinin miliekivalan ağırlığı.

Oleik asit için (0,282)

○ **TGK Zeytinyağı ve Prina Yağı Tebliği'ne göre;**

- Zeytinyağlarının oleik asit cinsinden sınıflandırılması
 - Naturel sızma 0,8
 - Naturel birinci 0,8 – 2
 - Ham zeytinyağı >2,0
 - Rafine 0,3
 - Riviera 1

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Suların kimyasal analizleri
Yapılacağı hafta	4. Hafta

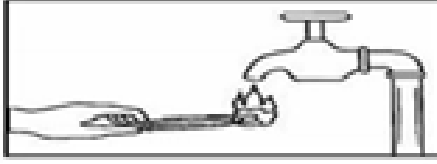
UYGULAMA BİLGİSİ

- Numune alma yöntemleri
- Toplam organik madde tayini
- Amonyak tayini
- Nitrit tayini
- pH tayini
- Sertlik tayini

SU ÖRNEĞİ ALMA

- Fiziksel ve kimyasal analizler için;
 - Koyu renkli numune şişesi
 - Temiz
 - HCl ile çalkalanmış, durulanmış ve kurutulmuş
 - Temiz kapak veya plastik tıpa
 - Numune alınacak örnekle ile çalkalanmış
- Mikrobiyolojik analizler için;
 - Koyu renkli steril cam şişe
 - Steril kapak veya plastik tıpa
- Etiket
 - Örneğin alındığı suyun cinsi (şehir şebeke, kuyu, depo)
 - Örneğin alındığı yer (ayrıntılı)
 - Örneğin alındığı tarih (gün, ay, yıl, saat)
 - Örnek alındığında hava sıcaklığı
 - Örneğin alındığı suyun sıcaklığı
 - Örneği alanın kimliği

○ Kapalı sistemlerden (musluk, tulumba gibi) numune alma



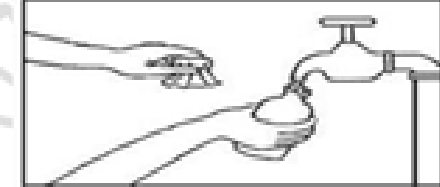
1. Bir çakmak, gazlı bir ocak veya alkol sterilizasyon ve yakıtı bir parmak tırmığıyla yakılarak musluğa bir dakika süreyle sterilize edilir.



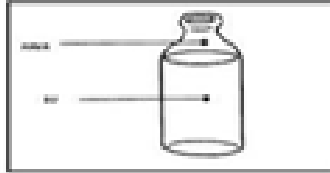
2. Musluğu dikkatle açılır ve 3-5 dakika suyun ortalarına bir hızla akmasını beklenir. Bir kez ayarlandıktan sonra musluğu tekrar ayarlamıyoruz.



3. Bir numune şişesi alınır ve kapağı dikkatle açılır veya tıpa/kapağı çıkarılır.



4. Kapağı aşağı doğru tutarak (numuneyi kirlenebilecek toz girişini önlemek için) şişeyi hemen akan suyun altına tutulur ve doldurulur.

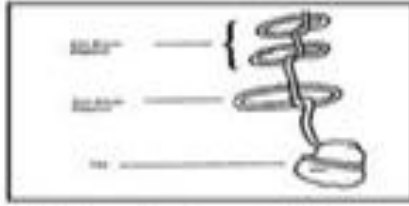


5. Drenaj/analiz örneğinde çalkalamayı kolaylaştırmak için içinde hava dolu küçük bir hacim bırakılır.



6. Tıpa yerleştirilir veya kapağı kapatılır.

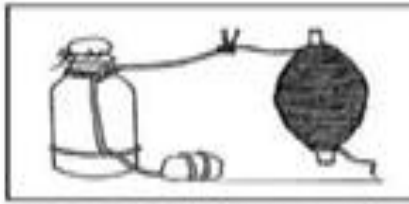
• Açık sistemlerden (göl, dere, kuyu, nehir gibi) numune alma



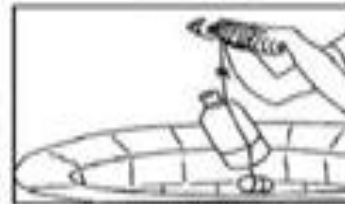
1. Spiral kovanın, Vayem kovanının (bu taş altın)



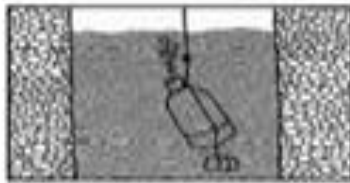
2. Bir parça ip kullanılarak, belirli bir yükseklikte numune alınarak şişeye bağlanır



3. 20 metre uzunluğunda, bir uçtan diğer ucuyla çiftleşmiş, belirli bir ip altın ve şişeye bağlanır



4. Ağzık bağlanmış şişeyi ve ipi yavaş yavaş açarak kuyuya indirilir. Şişenin kuyu duvarlarına değmesine izin verilir.



5. Şişeyi ileriye doğru iterek içine biberler ve kuyunun altına vurmadan veya herhangi bir tarta kullanmadan yitirilen içine altına indirilir.



6. Şişenin çekilmesine karar verildikten sonra ipi tekrar açmaya başlanarak şişeyi yukarıya çekilir. Şişe tamamen çıkarıldığında, hava dolu bir baloncuk açarak içine altına indirilir. Eğer örneğin belirlenmiş gibi şişenin ipinin veya kapığı koparsa...

SULARIN KİMYASAL ANALİZLERİ

○ Toplam Organik Madde Tayini

- Organik bileşiklerin fizikokimyasal ve yapısal özelliklerinin (çözünürlük, hidrofobiklik, polarlık, uçuculuk, yoğunluk, enerji.) ve miktarının bilinmesi arıtacak veya kontrol altında tutacak işlemleri seçmeye yardımcı olması açısından önemlidir.
- Organik maddelerin göl ve bu gibi su ortamlarında bulunması istenmeyen bir durumdur.
- **Deneyin Prensibi:**

- Asit ortamda permanganat kullanımı ile su içinde bulunan organik maddelerin oksitlenmesi sonucu organik maddenin

belirlenmesidir.

- Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:
 - H₂SO₄, KMnO₄ çözeltisi, Amonyum okzalat ((NH₄)₂C₂O₄), pipet, erlen, bunsen beki

○ Deneyin yapılışı:

1. Erlene 100 ml su numunesi alınır.
2. Örnek üzerine 10 ml H₂SO₄ ve 10 ml KMnO₄ eklenir.
3. 5 dakika süreyle kaynatılır.
4. Soğuması beklenmeden 10 ml amonyum okzalat ilave edilir.
5. KMnO₄ ile kalıcı pembe renk oluşuncaya kadar titrasyon yapılır.
6. Sonuç hesaplanır.

$$\text{Organik Madde (mg O}_2\text{/l)} = \text{Harcanan KMnO}_4 \times 0,8$$

○ Amonyak Tayini

- Sularda amonyak bulunması muhtemelen suyun mikroorganizmalar tarafından kirlendiğine işarettir. Bu nedenle sularda amonyak bulunması istenmez ve amonyak aranması bize suların kirliliği hakkında fikir verir.
- Amonyak varlığı tespit edilen sular içme ve kullanmaya uygun değildir.
- Deneyin Yapılışı:
 1. Temiz bir deney tüpüne 10 mL su örneğinden konur.
 2. Üzerine 3 – 5 mL Nessler çözeltisi damlatılır.
 - Sarı (turuncu) – kiremit kırmızısı renk oluşumu amonyak varlığını gösterir.

○ Nitrit Tayini

- Nitrit suda mikrobiyolojik kirlenmenin bir göstergesi olması açısından önemlidir. İçme sularında nitrit bulunması istenmez. Nitritler yüksek miktarda organik madde ile bulunursa daha büyük bir kirlenme söz konusudur. Normal dezenfektanlarla oksidasyonu kolaydır. Bu nedenle nitritli suların dezenfeksiyonuna özen gösterilmelidir.
- Deneyin Yapılışı:
 1. Erlenmayere 100 mL su örneği alınır.
 2. Sırasıyla 1 ml 6 N HCl, 2 ml %0,4 sülfanilamid, 1 ml %0,2 N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride ilave edilir.
 3. Pembe renk oluşumu nitrit varlığını gösterir.

○ pH Tayini

- 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 standardize edilir.
 - Analiz öncesi ve sonrası pH metrenin elektrodu distile su ile yıkanır ve pamuk yardımıyla kurutulur.

○ Sertlik tayini

- Suların sertliği, su içinde çözülmüş iyonların (Ca, Mg, Fe, Mn vb.) varlığından kaynaklanmaktadır.
- Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları doğal sularda diğer iyonlardan daha fazla bulduklarından Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının konsantrasyonlarının toplamı, suyun sertliği olarak ifade edilir.
- Geçici Sertlik: Bikarbonatlardan oluşan ve kaynatmayla ya da aktif kireç ilavesi ile karbonat şeklinde çökerek bertaraf edilebilen sertliktir. Su ısıtıldığı zaman geçici sertlik veren maddelerden karbondioksit ayrışır.
- Kalıcı Sertlik: Magnezyum ve kalsiyumun sülfat, klorür ve nitrat ile oluşturduğu tuzlardan kaynaklanan sertliktir. Bu sertliğe, “karbonat olmayan sertlik” veya “mineral asit sertliği” de denir. Kalıcı sertlik veren maddeler ısı ile ayrışmaz.
- Toplam Sertlik: Geçici sertlik ile kalıcı sertliğin toplamıdır. Sertlik magnezyum ve kalsiyum tuzlarından olduğundan bazen magnezyum ve kalsiyum sertliği olarak da tanımlanır.
- Suların sertlik dereceleri, (SD) içerdikleri CaO, MgO veya $CaCO_3$ miktarına bağlı olarak Alman, Fransız, Amerikan ve İngiliz sertlik dereceleri olarak belirtilir.
- Fransız sertlik derecesi: 100 ml suda çözülmüş olarak bulunan sertlik veren

maddelerin, 1 mg kalsiyum karbonat (CaCO₃) miktarına karşılık gelen madde miktarına denir. °f sembolü ile gösterilir.

- İngiliz sertlik derecesi: 70 ml suda çözülmüş olarak bulunan sertlik veren maddelerin, 1 mg kalsiyum karbonat (CaCO₃) miktarına karşılık gelen madde miktarına denir. °e sembolü ile gösterilir. Ø
- Alman sertlik derecesi: 100 ml suda çözülmüş olarak bulunan sertlik veren maddelerin, 1 mg kalsiyum oksit (CaO) miktarına karşılık gelen madde miktarına denir. °dH sembolü ile gösterilir.
- Amerikan sertlik derecesi: 100 ml suda çözülmüş olarak bulunan sertlik veren maddelerin, 0,1 mg kalsiyum karbonat (CaCO₃) miktarına karşılık gelen madde miktarına denir.

- Ülkemizde suların sertlik derecesi olarak Fransız sertlik derecesi (°f) kullanılır.

Suyun sertliği	Alman	Fransız	İngiliz
Çok yumuşak	0 – 4	0 – 0.72	0 -5
Yumuşak	5 – 8	7.3 – 14.2	6 – 10
Orta sert	9 – 12	14.3 – 21.5	11 – 15
Oldukça sert	13 – 18	21.6 – 32.5	16 – 22.5
Sert	19 – 30	32.6 – 54.0	22.5 – 37.5
Çok sert	30'dan fazla	54'den fazla	37.5'den fazla

- 1 Amerikan SD = Fransız SD x 10
- 1 Fransız SD = 0.56 Alman SD = 0.70 İngiliz SD
- **Deneyin Prensibi:**
 - Ca ve Mg iyonlarının EDTA tuzları (Etilen diamin tetra asetik asit ve bunun disodyum tuzu) ile suda çözünebilen bileşik oluşturmasıdır.
- **Kullanılan çözelti, alet ve malzemeler:**
 - EDTA, tampon çözeltisi, Eriochrom black T indikatörü, pipet, erlen
- Deneyin yapılışı:
- Erlene 50 ml su numunesi alınır.
- Sırasıyla 1 ml tampon çözeltisi ve 1-2 damla Eriochrom black T indikatörü eklenir.
- Oluşan şarap kırmızısı renk maviye dönünceye kadar EDTA ile titre edilir.
- Sonuç hesaplanır.

Toplam Fransız sertlik derecesi= Harcanan EDTA x 100 / Numune miktarı

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Mikrobiyolojik ekimlerde kullanılan besi yerleri ve hazırlanmaları
Yapılacağı hafta	5. 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 formülize 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 kullanılmayan 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 fluoresansa 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 ısıl 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.
- ▶ Isıl 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 ısıl 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 koşularda 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 ekime hazırlık ve ekim yöntemleri
Yapılacağı hafta	6. 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 $5.000 \text{ adet}/10 \text{ ml} = 500 \text{ adet /ml}$ canlı organizma bulunacaktır.
- ▶ Üçüncü sulandırmada ise canlı hücre sayısı $500 \text{ adet}/10 \text{ ml} = 50 \text{ adet/ 1 ml}$ 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 SIVISI,
 - ▶ 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°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

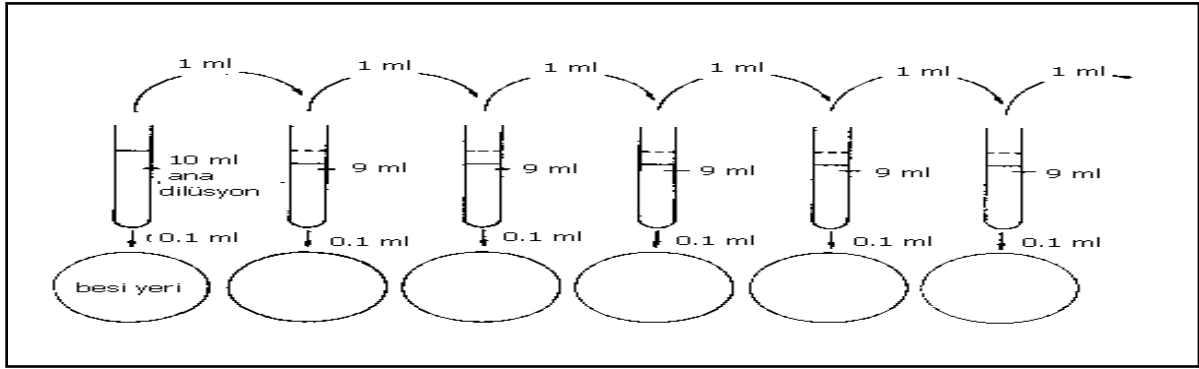
▶ Dökme Plak Yöntemi

- 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

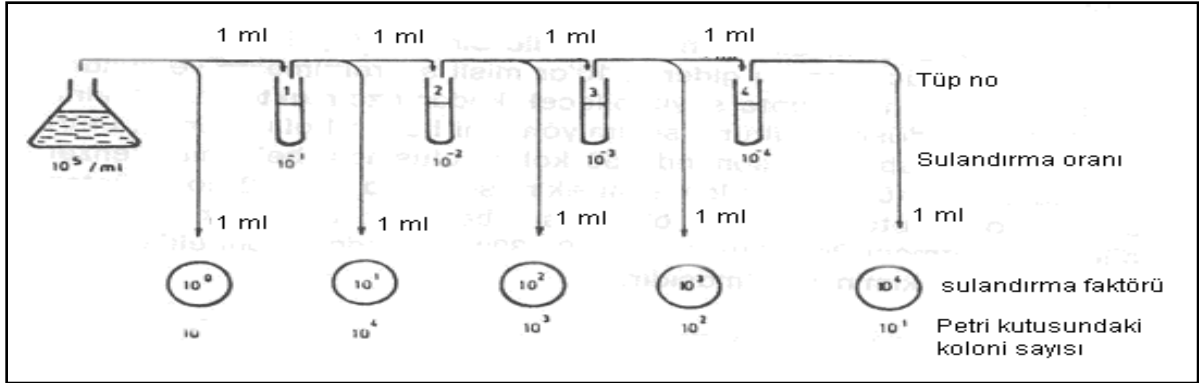
- ▶ Bu yöntemi, hazırlanan gıda örneği dilüsyonlarından 1'er ml steril petrilere aktırılarak üzerine 15-20 ml kadar yaklaşık 45°C'ye soğutulmuş agarlı besi yerlerinin dökülmesi ve uygun koşullarda inkübasyonu takiben oluşan kolonilerin sayılması şeklinde açıklamak mümkündür.

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 sıcağa 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	Gıdalarda toplam bakteri, maya-küf, <i>S. aureus</i> aranması
Yapılacağı hafta	7. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- ▶ Toplam Mezofilik Bakteri Sayısının Belirlenmesi
- ▶ Maya-Küf Sayısının Belirlenmesi
- ▶ *S. aureus* aranması

TOPLAM MEZOFİLİK BAKTERİ SAYISININ BELİRLENMESİ

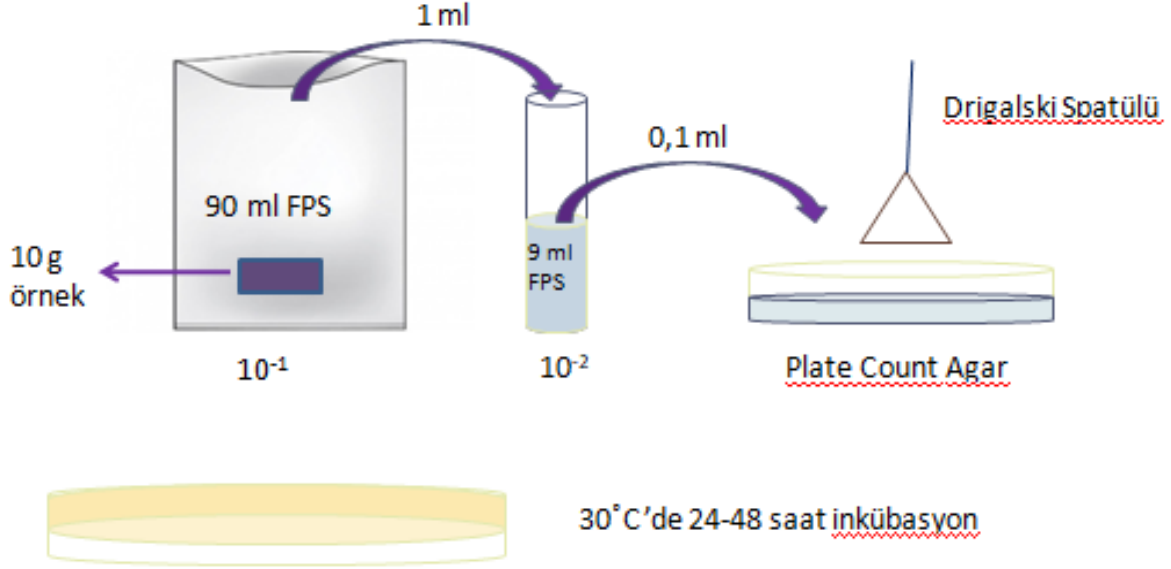
- ▶ Total bakteri sayısı ve özellikle mezofil aerob bakteriler, o gıdanın hijyenik ve mikrobiyolojik durumu hakkında genel bir bilgi verir.
- ▶ Fermente ürünler hariç, diğer ürünlerde yüksek total bakteri sayısı hijyenik kuralların yetersiz olduğuna işarettir.
- ▶ Diğer taraftan, düşük total bakteri sayısı da o gıdanın sağlık açısından sakınca taşımadığını göstermez.
 - ▶ Toksinojen 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

Toplam Mezofilik Bakteri Sayısının Belirlenmesi

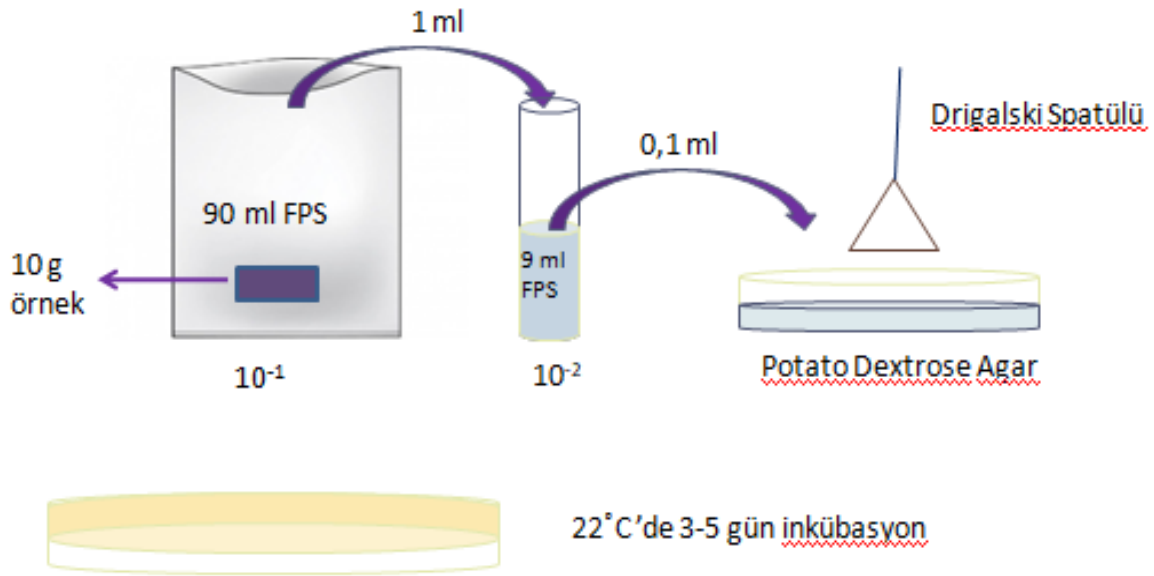


MAYA-KÜF SAYISININ BELİRLENMESİ

- ▶ 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, petriyerler 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

Maya-Küf Sayısının Belirlenmesi



Staphylococcus 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

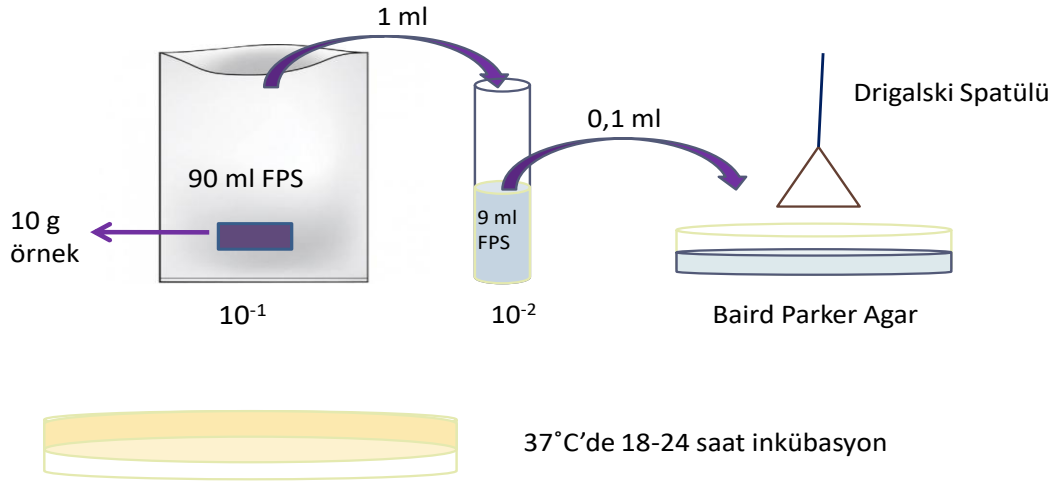
Stafilokokal İntoksikasyonlar

- ▶ 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

***Staphylococcus aureus* ARANMASI**

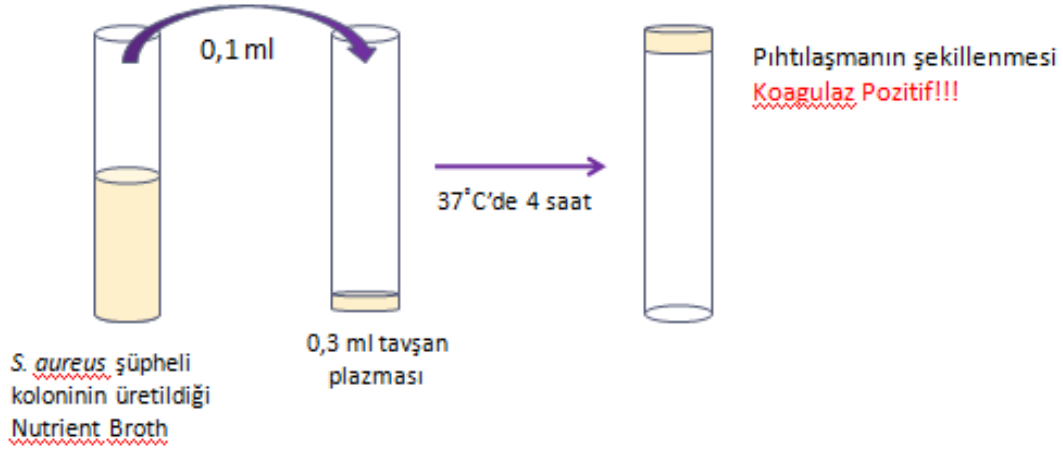
- ▶ Dilüsyon hazırlama: Ana dilüsyon ve seyreltme dilüsyonları olarak Fizyolojik Peptonlu Su kullanılır.
- ▶ Fizyolojik Peptonlu Su hazırlanışı:
 - ▶ 8,5 g NaCl, 1 g Pepton, 1 l Distile Su
 - ▶ Kullanılan besiyeri: Egg Yolk Tellurite Emulsion ilave edilmiş Baird Parker Agar (BPA)
- ▶ Analiz yapılacak 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.

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 H₂O₂ ile karıştırılır.
 - ▶ Katalaz enzimine sahip etkenler H₂O₂'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* süpheli koloniler 10 ml Nutrient Broth içeren tüplere aktarılıp 37°C'de 18-24 saat inkübe edilir.
 - ▶ İnkübasyon sonunda, 0,3 ml tavşan plazması içeren tüplere Nutrient Broth'ta gelişen kültürden 0,1 ml inokule edilerek 37°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 ml = 10⁻¹) ile ekim yapılmış, 24 saat 37°C'de inkübasyona 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 koagülaz testi yapılmış, 3 tanesinde koagülaz (+) 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

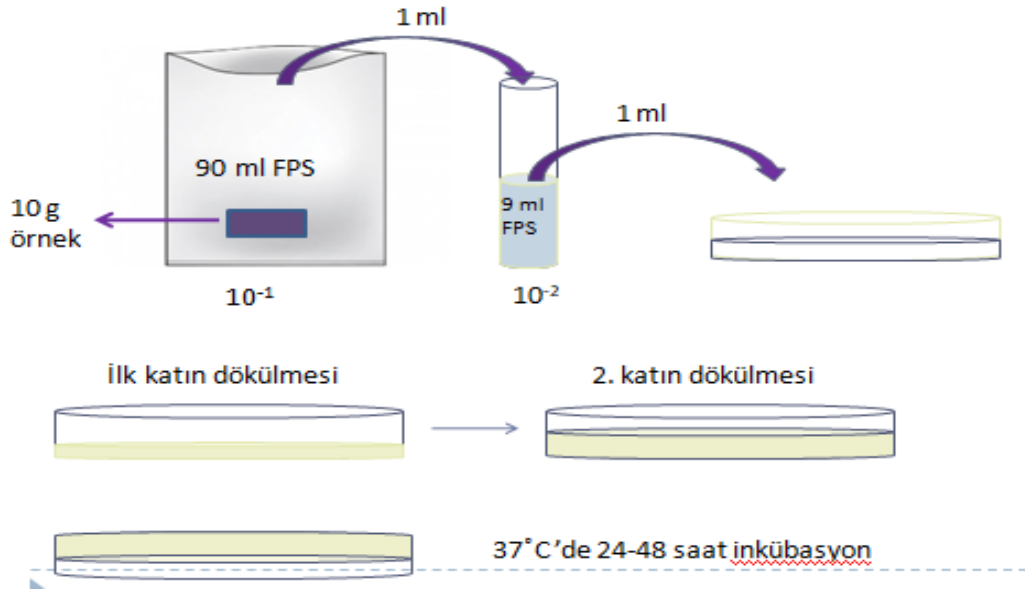
Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

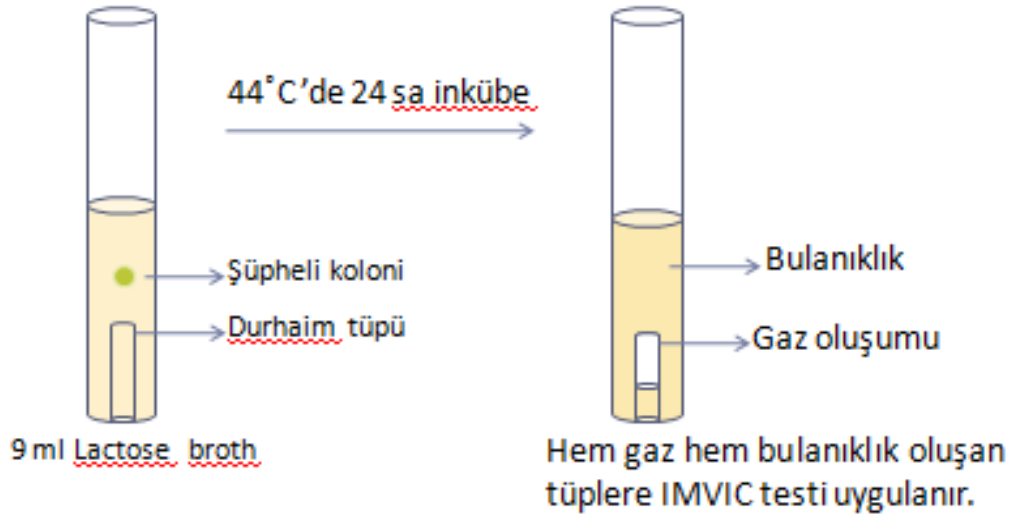
Uygulamanın adı	Gıdalarda Koliform Bakteri ve <i>E. coli</i> Aranması
Yapılacağı hafta	8. Hafta

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, petriyerler 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 (CO₂) 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

- ▶ Indol 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' çözeltilisi 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 çözeltilisi 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	Suların mikrobiyolojik analizleri
Yapılacağı hafta	9. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

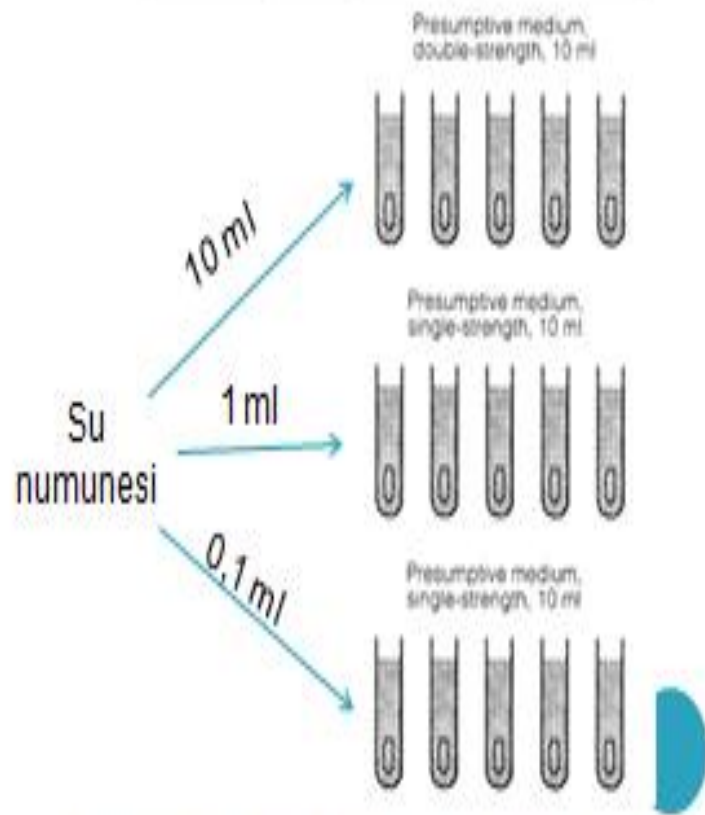
- Genel canlı bakteri sayımı
- *C. perfringens*'in belirlenmesi
- Tahmini koliform organizmaların sayımı ve *E. coli*'nin belirlenmesi
 - Suda çok az sayıda bile olsa, koliform bakterilerin varlıkları istenmediğinden fazla miktarda su numunesinin deneye sokulması gerekir. Bunun için en muhtemel sayı (EMS) yönteminden yararlanır.
 - EMS yönteminde koliform bakteriler laktozu fermente ederek asit ve gaz oluşturabildiklerinden tahmini koliform bakterilerin sayımı için kullanılan besiyerleri laktoz ve bir asit indikatörünü kapsar. Laktozdan oluşacak gazın tespiti için besiyeri bulunan tüpün içine ters çevrilmiş durhaim tüpü yerleştirilir.
- EMS Yöntemi;
 - Bu yöntemde çift güçlü ve tek güçlü laktoz broth kullanılmaktadır.
 - Tek güçlü laktoz broth çift güçlü besiyerine 1:1 oranda distile su ilave edilmesi ve steril edilmesi ile hazırlanır.
 - **Yöntemin uygulanışı:**
 - 1 numune için; 5 tanesi çift güçlü ve 10 tanesi tek güçlü toplam 9 içerisinde durhaim tüpü olan laktoz broth hazırlanır.
 - Çift güçlü tüplere 10'ar ml, 5 tek güçlü tüpe 1'er ml, son 5 tek güçlü tüplere de 0,1'er ml su numunesi ilave edilir.
 - Tüpler 37°C'de 24 saat inkübe edilir.
 - İnkübasyon sonunda hem gaz hem bulanıklık gösteren tüpler değerlendirmeye alınır.
 - Sonuçlar EMS tablosuna göre ifade edilir.

Table A5.3 MPN values per 100 ml of sample and 95% confidence limits for various combinations of positive and negative results (when five 10-ml, five 1-ml and five 0.1-ml test portions are used)

No. of tubes giving a positive reaction :			MPN (per 100 ml)	95% confidence limits	
5 of 10 ml	5 of 1 ml	5 of 0.1 ml		Lower	Upper
0	0	0	12	11	7
0	1	0	2	11	7
0	2	0	4	11	11
1	0	0	2	11	7
1	0	1	4	11	11
1	1	0	4	11	11
1	1	1	8	11	18
2	0	0	5	11	13
2	0	1	7	11	17
2	1	0	7	11	17
2	1	1	9	3	21
2	2	0	9	2	21
2	2	1	12	3	28
3	0	0	6	1	18
3	0	1	11	2	25
3	1	0	11	2	25
3	1	1	14	4	34
3	2	0	14	4	34
3	2	1	17	5	46
3	3	0	17	5	46
4	0	0	13	3	31
4	0	1	17	5	46
4	1	0	17	5	46
4	1	1	21	7	63
4	1	2	26	9	78
4	2	0	22	7	67
4	2	1	26	9	78
4	3	0	27	9	80
4	3	1	33	11	69
4	4	0	38	13	88
5	0	0	23	7	33
5	0	1	31	11	69
5	0	2	43	18	118
5	1	0	33	11	69
5	1	1	46	19	121
5	1	2	63	21	133
5	2	0	49	17	130
5	2	1	75	23	170
5	2	2	94	26	220
5	3	0	78	25	180
5	3	1	116	31	250
5	3	2	148	37	340
5	4	0	180	44	600

Table A5.3 (continued)

No. of tubes giving a positive reaction :			MPN (per 100 ml)	95% confidence limits	
5 of 10 ml	5 of 1 ml	5 of 0.1 ml		Lower	Upper
5	4	0	130	35	300
5	4	1	170	43	430
5	4	2	220	57	700
5	4	3	280	80	690
5	4	4	360	120	1000
5	5	0	240	58	750
5	5	1	300	120	1000
5	5	2	340	180	1400
5	5	3	500	300	3000
5	5	4	1000	640	5000
5	5	5	>1000	—	—



<http://www.fda.gov/oc/ohrt/ohrt.html>
<http://www.fda.gov/oc/ohrt/ohrt.html>
<http://www.fda.gov/oc/ohrt/ohrt.html>

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Gıdalarda <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 aranması
Yapılacağı hafta	10. Hafta

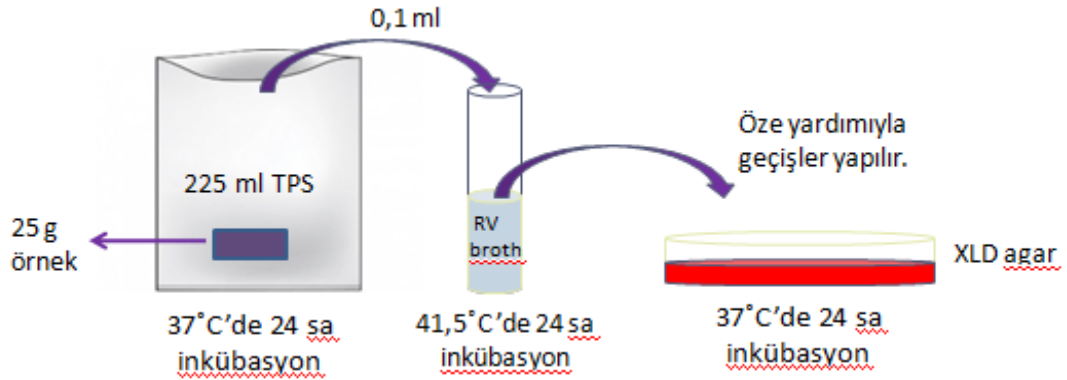
UYGULAMA BİLGİSİ

- Gıdalarda;
 - *Salmonella* spp.,
 - *Listeria monocytogenes*,
 - *E. coli* O157:H7 aranması.

***Salmonella* spp. ARANMASI**

- *Salmonella* spp. ;
 - *Enterobacteriaceae*
 - Gram-negatif
 - Spor oluşturmeyen
 - 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.

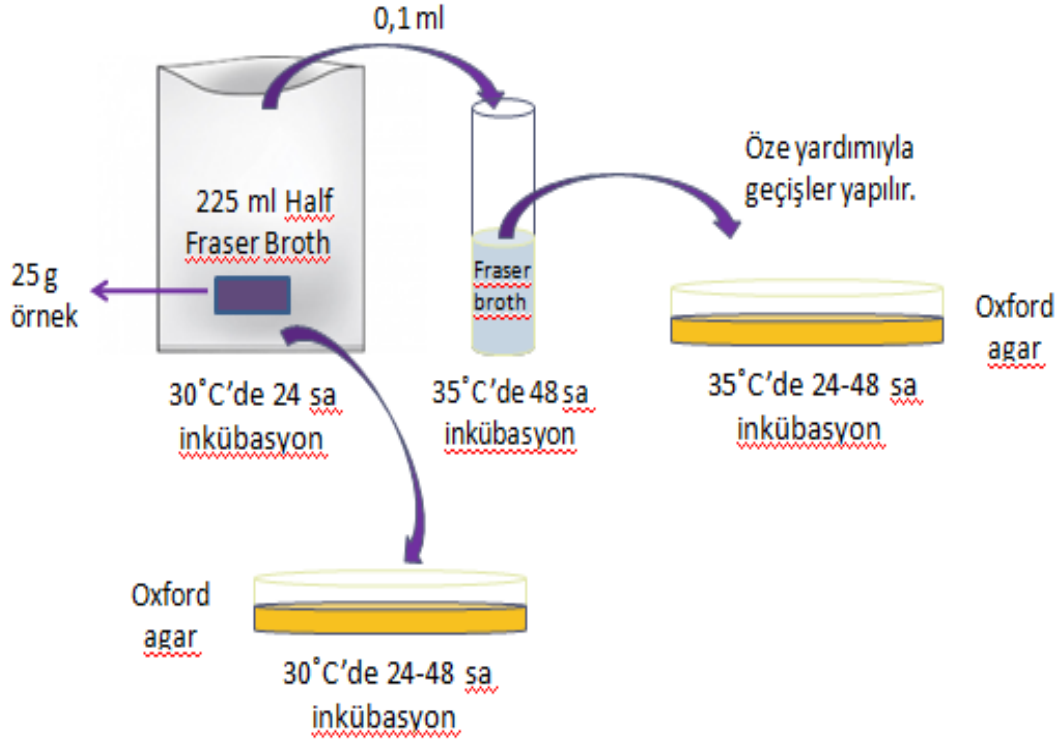
- ▶ İnkübasyon sonunda selektif zenginleştirme için homojenizattan 0,1 ml alınır ve Rappaport Vassiliadis Enrichment Broth'a geçilerek 41,5°C'de 24 saat inkübe edilir.
- ▶ İnkübasyonun ardından selektif izolasyon amacıyla XLD agara öze yardımı ile geçişler yapılır ve 37°C'de 24 saat inkübe edilir.



- ▶ 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, sükröz 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.

***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.



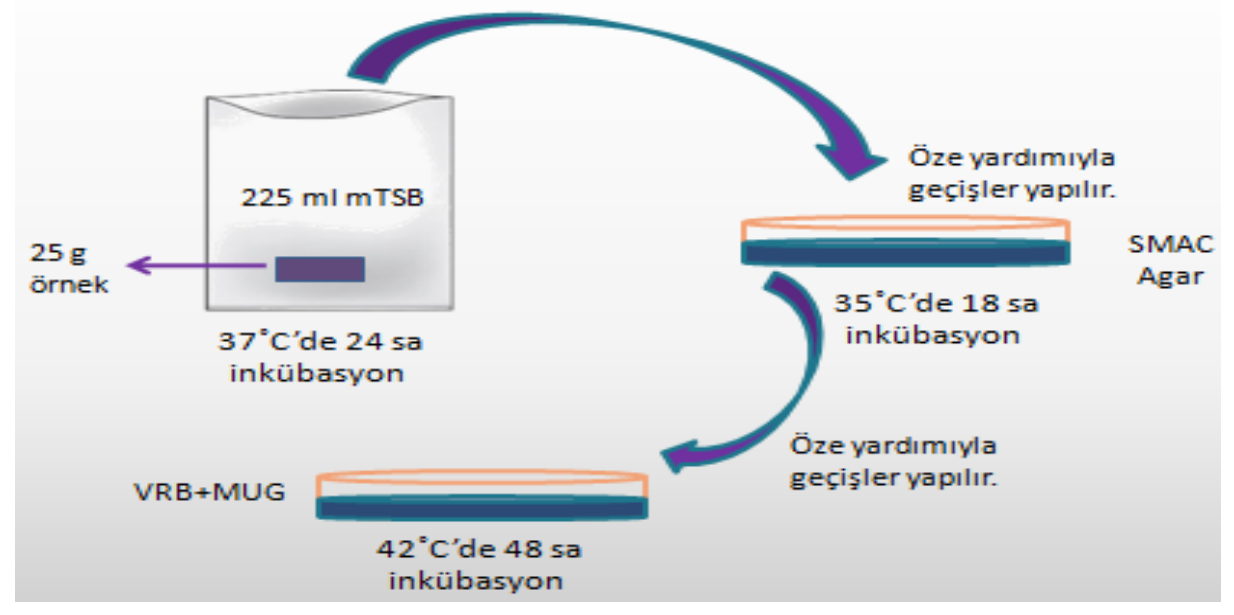
- ▶ Oxford Agar'da 24 saatlik inkübasyonda küçük, grimsi ve siyah zonlu koloniler, 24 saatlik inkübasyondan sonra ise yaklaşık 2 mm çapındaki ortası çökmüş, siyah zonlu koloniler, *L. monocytogenes* açısından şüpheli olarak kabul edilir.
- ▶ Bu şüpheli kolonilere hızlı identifikasyon kitleri ile (şeker 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.

***E. coli* O157:H7**

- Hemorajik kolitis(HC), hemolitik üremik sendroma(HUS) ve trombotik trombositopenik purpuraya (TTP) neden olur.
- Ruminant GI kanalları en önemli rezervuar
- Yeterli ısı işlem görmemiş sığır eti tüketimi,
- İnsandan insana temas,
- Kontamine su
- Etken ısıya duyarlı
- Soğuk muhafaza koşullarına dirençli
- Stx1 stx2!
- Asidorezistans (pH 4,4-9)

***E. coli* O157:H7 ARANMASI**

- Ön zenginleştirme
- Selektif zenginleştirme
- Selektif izolasyon
- İdentifikasyon
- Kullanılan besiyerleri: Novobiocin ilave edilmiş Modified Tryptone-Soy Broth (mTSB), Cefixime Tellurite ilave edilmiş Sorbitol MacConkey Agar, MUG ilave edilmiş Violet Red Bile Agar, lateks test kiti
- Analiz yapılacak örnekten katı ise 25 g, sıvı ise 25 ml aseptik şartlarda alınarak stomacher torbasına konur.
- Üzerine 225 ml steril Novobiocin ilave edilmiş Modified Tryptone-Soy Broth (mTSB) 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 öze yardımıyla Cefixime Tellurite ilave edilmiş Sorbitol MacConkey Agar geçilerek 35°C'de 18 saat inkübe edilir.
- İnkübasyonun ardından soluk pembe renkli şüpheli koloniler MUG ilave edilmiş Violet Red Bile Agar'a geçiş yapılarak 42°C'de 48 saat inkübe edilir.
- UV ışığı altında florans vermeyen koloniler şüpheli kabul edilerek lateks test kiti ile doğrulanır.



Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

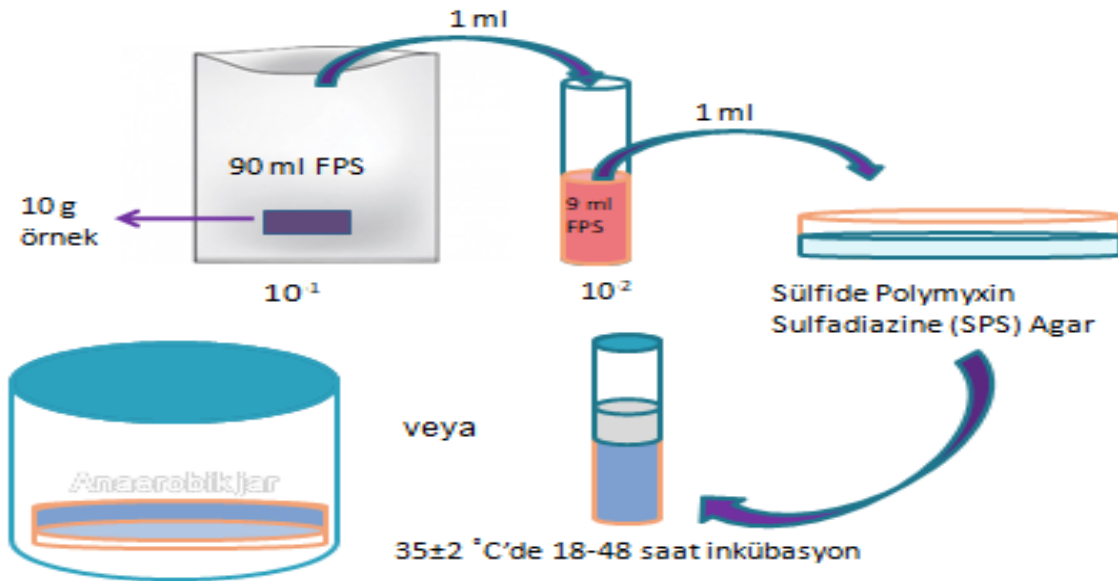
İmza

Uygulamanın adı	Gıdalarda Clostridium ve Vibrio cinsi bakterilerin aranması
Yapılacağı hafta	11. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- Gıdalarda;
 - Sülfite indirgeyen anaerob bakteriler (*Clostridium perfringens*)
 - *Vibrio parahaemolyticus* aranması.
- *Clostridium perfringens*, gıda zehirlenmelerine yol açan bir bakteridir.
- Amaca göre var/yok veya sayı
- *Cl. perfringens*;
 - Sporlu
 - Anaerob
 - Vejetatif hücreleri düşük sıcaklıklara duyarlı
 - Bu nedenle *Cl. perfringens* analizinde numune 10–15°C arasında muhafaza edilerek hızla analize alınmalıdır.
 - Analiz 8 saatten sonra yapılacak ise steril gliserin–tuz çözeltisinde kuru buz kullanılarak –60°C'da muhafaza edilir.
 - "Sülfite indirgeyen anaeroblar" ve "sülfite indirgeyen Clostridium" ile "*Clostridium perfringens*" gıda mikrobiyolojisi açısından pratikte benzerdir.
- 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.
- Sülfide Polymyxin Sulfadiazine (SPS) besi ortamına dökme plak tekniği ile ekim yapılarak, petri anaerob ortamda 35±2 °C'de 18-48 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrası oluşan siyah renkli koloniler sayılarak Sülfite indirgeyen anaerob bakteri sayısı saptanır.
 - Koloni Sayısı X Ekim Yapılan Dilüsyon Oranı kob/gr-ml
 - Sülfide Polymyxin Sulfadiazine;
 - İnokulasyon yapılmış tüplere parafin ilave edilir.
 - Petri kutuları anaerobik jar içerisine bırakılır.

Sülfite İndirgeyen Anaerob Belirlenmesi



○ *Vibrio parahaemolyticus*;

- Gram (-)
 - Sporsuz
 - Hareketli
 - Fakültatif anaerob
 - Zorunlu halofilik (% 3 NaCl ihtiyaç duyar)
 - 37 °C (5-43 °C)
 - pH 7.8-8.6
 - Minimal aw 0.94
- Analiz yapılacak örnekten 25 g aseptik şartlarda alınarak stomacher torbasına konur.
- Üzerine 225 ml Alkali Pepton besiyeri ilave edilir. Homojenizasyon işlemine tabi tutulur.
- Elde edilen homojenizat zenginleştirme amacıyla 35-37°C'de 8 saat inkübe edilir.
- Dondurulmuş ürünlerde 18-24 saat
- İnkübasyon sonunda homojenizattan öze yardımıyla TCBS Agar besiyerine geçilerek 35-37°C'de 18-24 saat inkübe edilir.
- İnkübasyonun ardından yeşil renkli dairesel koloniler şüpheli kabul edilerek biyokimyasal testlere tabi tutulur.

○ **İdentifikasyon;**

- Oksidaz +
- Hareketlilik +
- Glikozdan gaz oluşturma –
- Lizin dekarboksilaz +
- H₂S –
- %8 NaCl +
- Glikoz +
- Katalaz +
- İndol +
- VP –
- Laktoz –
- Sakkaroz -

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Gıdalarda laktik asit bakterilerinin aranması
Yapılacağı hafta	12. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

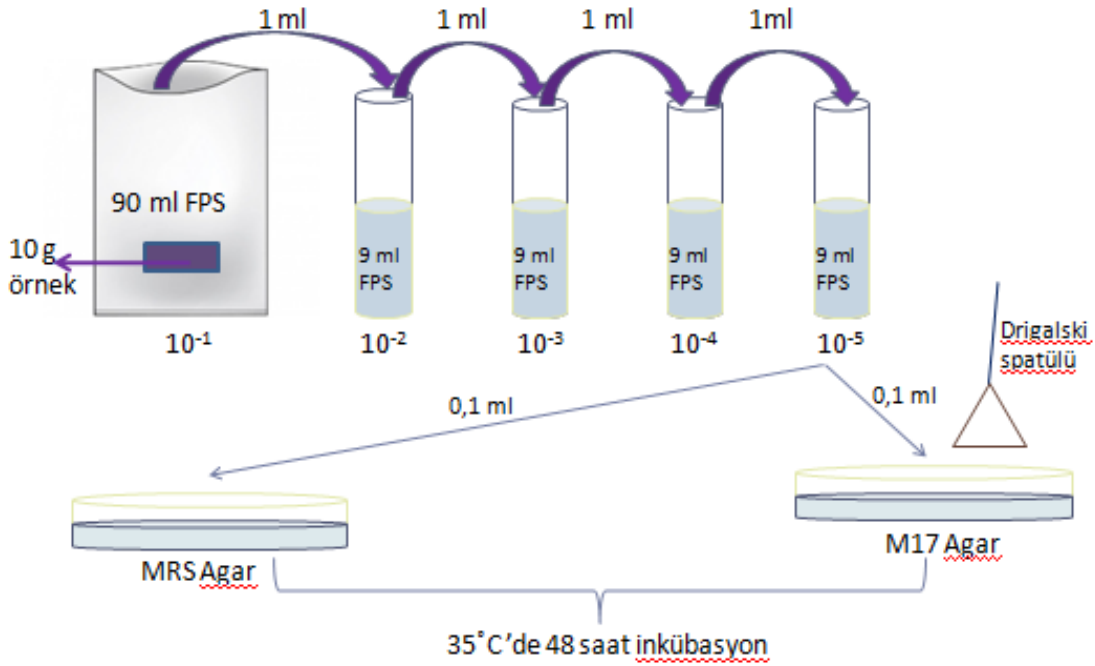
Dilüsyon hazırlama: Ana dilüsyon ve seyreltme dilüsyonları olarak Fizyolojik Peptonlu Su kullanılır.

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

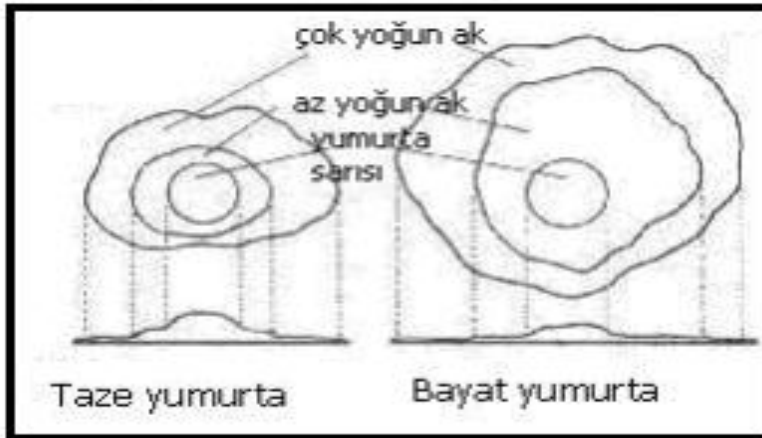
İmza

Uygulamanın adı	Yumurtada tazelik-bayatlık muayeneleri
Yapılacağı hafta	13. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- Yumurta muayenesi,
 - Dış bakı
 - Çalkalama deneyi
 - Işık muayenesi
 - Tuzlu su muayenesi
 - Kırarak muayene
 - Dış bakı
 - Yumurtanın ağırlığı, şekli, kabuk rengi ve temizliği, çatlak bulunup bulunmadığı, yüzeyin mat veya parlak oluşu belirlenir. Bir mercek yardımı ile kabuk üzerindeki porlar incelenir.
 - Çalkalama deneyi
 - Yumurta kulak mesafesinde hafifçe çalkalandığında, ses geliyorsa bayat demektir. Ses gelmesinin nedeni; bayatlayan yumurtanın hava boşluğunun artması ile sarı kısmı tutan şalaz bağlarının zayıflamasıdır.
 - Işık muayenesi
 - Yumurtanın geniş tarafı ışık kaynağına tutulmak suretiyle kabuk yapısı, hava boşluğu, yumurta akı ve sarısının şekli ve pozisyonu ile yumurta içerisindeki kan ve benzeri bozukluklar incelenir.
 - Taze yumurtada ak kısmı berrak, sarı kısmı da yuvarlak şekilde yumurtanın ortasında görülür.
 - Yumurta bayatladıkça sarısı kabuğun bir tarafına daha yakın olur ve yumurta akı da bulanıklaşır.
 - Yumurta bayatladıkça hava kamarası büyür.
 - Ekstra taze olarak satışa sunulan yumurtalarda 4 mm,
 - Diğerlerinde 6 mm'den yüksek olmamalıdır.
 - Tuzlu su muayenesi
 - Yumurtanın özgül ağırlığına göre taze veya bayat olduğu tespit edilir.

- %8 (A) ve %11'lik (B) tuzlu su çözeltisi hazırlanır.
- Bu çözeltilere yumurtalar bırakılır.
 - Çok taze yumurtalar her iki çözeltide de batar,
 - Taze yumurtalar A'da batar, B'de yüzer,
 - Bayat yumurtalar ise hem A hem de B'de yüzerler.
- Kırarak muayene;
 - Yumurta temiz, düz bir kap içerisine parçalanmadan kırılır.
 - Taze yumurtanın akı ve sarısı dağılmaz, birbirine karışmaz.
 - Taze yumurtada yumurta sarısı yüksek görünümündedir.
 - Bayat yumurtada ak kısmı gevşektir.
 - Bayat yumurtada yumurta sarısı basık ve geniş bir alana yayılmış durumdadır.
 - Bayat yumurtada sarısına bası uygulandığında kolay dağılır.



Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza

Uygulamanın adı	Kanatlı ve balık etlerinin muayenesi
Yapılacağı hafta	14. Hafta

UYGULAMA BİLGİSİ

- Kanatlıda bozulma nedenleri;
 - Kanatlı etinin yağ ve bağ doku miktarı kırmızı etten düşüktür.
 - Kesim prosesinde kontaminasyon riski yüksektir.
 - Kanatlı derisinin normal florasının yanında tüy, toz, toprak kaynaklı mikroorganizmalar da fazla bulunur.
 - Enzimatik aktivite

KASAPLIK HAYVANLARDA KOKUŞMA TESTLERİ

Nessler ayırıcı ile

1. Bir petri kutusuna numuneden bir parça alınır.
 2. Üzerine Nessler çözeltisinden birkaç damla dökülür.
- Kokuşma varsa numune üzerinde portakal renginden koyu portakal kahverengine kadar değişen bir renk oluşur.

Eber reaktifi ile

- Eber reaktifi;
 - 1 birim HCl
 - 2 birim Eter
 - 3 birim Alkol
- Deney tüpüne 2–3 ml eber reaktifi konulur.
- Numuneden fındık bir büyüklüğünde bir parça penset yardımıyla reaktife yaklaştırılır.
- Beyaz duman oluşumu kokuşmanın varlığını gösterir.

Taze-Bayat Balık Ayrımı

Özellik	Taze Balık	Bayat Balık
Görünüş	Parlak ve canlı	Donuk ve mat
Koku	Deniz ve yosun	Tiksindirici
Deri	Parlak berrak	Soluk
Gözler	Parlak kabarık	Donuk ve çökmüş
Ağız	Kapalı	Açık
Solungaçlar	Parlak kırmızı	Solgun kurşuni
Pullar	Parlak sıkı	Solgun gevşek
Yüzeydeki mukoz sıvı	Doğal ince kıvamda	Koyu kıvamda fena kokulu
Et	Parlak, sert, kılıçktan zor ayrılır	Pürüzlü, yumuşak, kılıçktan kolay ayrılır
Palpasyon	Parmak izi kalmaz	Parmak izi kalır
Karın	Normal, dolgun	Şişkin
Anüs	Normal, dolgun	Şişkin
Kan	Parlak kırmızı	Koyu siyah
Suya atılınca	Batar	Yüzer
Periton	Sıkı	Gevşek
Kuyruk veya boyundan elle tutulunca	Düz kalır	Bükülür eğilir

Balık etinin daha erken bozulmasının nedenleri

	Kasaplık Hayvan	Balık
Etkenler	Mezofil (30-37°C)	Psikrofil (12-15°C)
Etin yapısı	Fascia ve tendo zengin, Yağlar doymuş yağ asitlerinden zengin	Kaslar yumuşak, su oranı yüksek Yağlar doymamış yağ asitlerinden zengin
Etin hazırlanması	İç organlar hemen çıkar, karkas yüzeyi hemen kurur	Deri ıslak, iç organlar çıkartılmaz
Enzimatik aktivite	Normaldir	Yüksektir
pH	Düşüktür, m.o. çoğalmaları zorlaşır	Nötre yakın, enzimatik ve mikrobiyel aktivite için uygundur

Öğrenci Notları

Sorumlu Öğretim Elemanı

İmza