Meyve Sularının Bakteriyolojik Muayenesi

Genel Bilgiler

- Meyve suları yüksek asitlikleri nedeni ile bakteriler açısından oldukça güvenilir bir gıdadır. Bununla birlikte meyve sularında 4,5 pH altında gelişebilen bazı bakteriler sorun çıkarabilmektedir.
- Isıl işleme dayanıklı ve yüksek asit seven toprak kökenli sporlu basiller (termofilik-asidofilik; termoasidofilik bakteriler) içinde yer alan *Alicyclobacillus* türleri özellikle meyve suları gibi pastörizasyon ile korunan asitli gıdalarda bozulmalara neden olmaktadır.
- Bu bakteriler 1980'li yılların ikinci yarısından itibaren dünya meyve suyu ticaretinde kayda değer ölçüde maddi kayıplara neden olmuştur.

Genel Bilgiler

- *Alicyclobacillus* cinsi içinde 3 tür bulunmaktadır. Bunlar ;
    - 60^{o}C'de gelişebilen *Alicyclobacillus acidocaldarius*,
    - 50^{o}C'de gelişebilen *Alicyclobacillus acidoterrestris,*
    - 40^{o}C'de gelişebilen *Alicyclobacillus cycloheptanicus*'tur.
- Bunlar arasında en önemlisi olarak *Alicyclobacillus acidocaldarius* gösterilmektedir.

Genel Bilgiler

- *Alicyclobacillus acidocaldarius*, elma sularında kimyasal adı guaiacol olan petrol kokusu oluşturması ile bilinmektedir. Elma suyu konsantrelerinde canlılığını korur.
- İlk kez 1971 yılında izole edilmiştir.
- 44-73^{o}C 'da, pH 2,0-6,0 arasında gelişebilir. Özellikleri *Bacillus coagulans*'a benzemektedir.

Genel Bilgiler

- Diğer *Alicyclobacillus* türleri de ve özellikle *Alicyclobacillus acidoterrestris* başta elma ve portakal suyu olmak üzere meyve suları ve meyveli içeceklerde tat ve koku bozukluklarına neden olmaktadır.
- 1982 yılında Almanya'da üretilmiş ve aseptik olarak ambalajlanmış elma sularında sıcak bir mevsimde uzun süreli depolama sırasında alışılagelmemiş bir bozulma olmuştur.
- Bu bozulma *Alicyclobacillus acidoterrestris*'in neden olduğu koku ve berrak elma suyunda hafif bir bulanıklık oluşması ile ilk ticari meyve suyu bozulması olarak kayıtlara geçmiştir.

Standart Analiz Yöntemi

- Belirlenmesindeki temel analiz yöntemi meyve suyunun önce pastörize edilmesi, sonra yüksek sıcaklıkta ve düşük pH'lı bir besiyerinde inkübasyona bırakılması şeklindedir.
- Gelişme olan besiyerlerinde sonuç "termoasidofilik bakteri" varlığı olarak verilir.

Standart Analiz Yöntemi

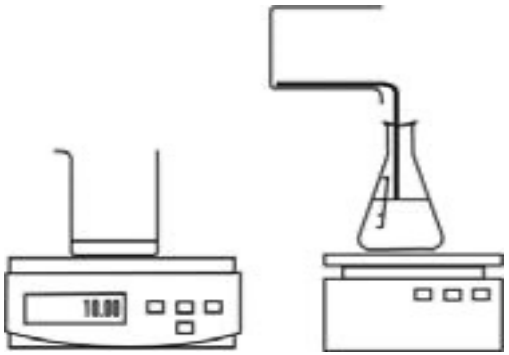
- Tür bazında teşhis ancak gelişmiş laboratuvarların yapabileceği bir uygulamadır ve uluslararası meyve suyu ve konsantresi ticaretinde bu sonuç yeterlidir.
- Bu şekilde belirli bir hacimdeki örnekte var/yok testi yapılabileceği gibi EMS yöntemi veya membran filitrasyon uygulaması ile de sayım yapmak mümkündür.

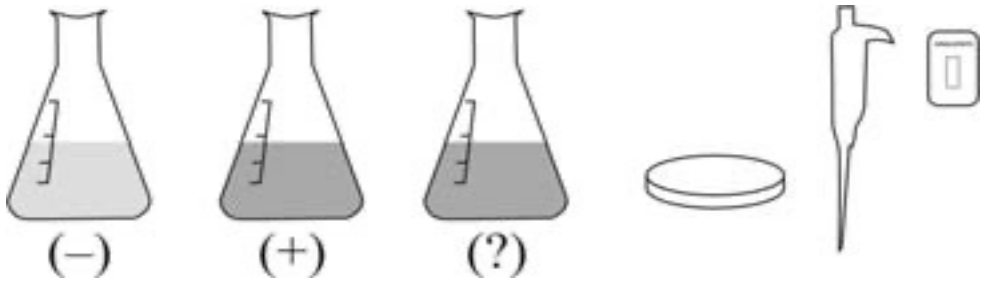
Var/Yok Testi

- "Analiz edilen örnekte hedef mikroorganizma sayısı 0 olmalıdır" şeklindeki standartlara uyulup uyulmadığının kontrolünde uygulanır.
- Bu analizlerde sayı "0" değilse ne olduğu önemli değildir. Varsa, sayısı önemli değildir, ancak başka mikroorganizmalara belirli sayılarda izin verilebilir.
- Örneğin 100 mL numune çift kuvvette hazırlanmış uygun bir sıvı besiyerine ekilir; inkübasyon sonunda besiyerinde mikroorganizma gelişmemesi hedeflenir. Eğer mikroorganizma gelişimi olmazsa, sonuç "yok/100 mL" olarak verilir.

İşlem Aşamaları

1. Analizi yapılacak meyve suyu örneği önce 80^{o}C 'da 13-15 dakika pastörize edilir.
2. pH'sı tercihen malik asit ile 3,5'a ayarlanmış triptik soy broth besiyerine ekim yapılır ve tüpler 55 - 60^{o}C'da 3 gün inkübe edilir.
3. Besiyerlerinde oluşan gelişme (basit bir bulanıklık ya da renk dönümü) pozitif sonuç (termoasidofilik bakteri varlığı) olarak değerlendirilir.





İşlem Aşamaları

NOT 1: Bu uygulamada 100 mL meyve suyu 100 mL çift kuvvette hazırlanmış besiyerinde* inkübasyonu önerilmektedir.

NOT 2: Besiyeri pH'sının meyve suyu ilavesinden sonra 3-4 arasında (optimum olarak 3,5) olduğu kontrol edilmelidir.

NOT 3: Konsantre analizlerinde 10 mL örneğin doğrudan 100 mL normal triptik soy broth besiyerine ilavesi gerekir (Besiyeri analize alınan gıdanın 9 misli hacminde olmalıdır.)

*Çift kuvvetli besiyeri

- EMS ile yapılan sayımda 10 mL besiyerine 10 mL örnek aktarıldığında, besiyerinin konsantrasyonu yarı yarıya azalır ve burada sağlıklı bir mikrobiyel gelişme olmaz.
- Bunun önüne geçmek için, 10 mL gıda örneği (homojenizat) ilave edilecek tüplerde, başlangıçta bu besiyerleri çift kuvvette (2 misli konsantrasyonda) 6 hazırlanır.

*Çift kuvvetli besiyeri

- Örnek olarak, koliform grup bakteri analizinde kullanılan LST Broth besiyeri normal olarak 35,5 g/L konsantrasyonda hazırlandığında, 10 mL tüp içinde 0,355 g madde vardır.
- Çift kuvvetle hazırlanması gerektiğinde, başlangıçta 71 g/L (0,71 g/10 mL) olarak hazırlanır, bunun üzerine 10 mL örnek konulduğunda LST konsantrasyonu 0,71 g/10 mL'den 0,355 g/10 mL standart değere iner.

EMS (En Muhtemel Sayı) Yöntemi

- Yöntemin ‘En Muhtemel Sayı’ olarak adlandırılma nedeni örnekteki mikroorganizma sayısının istatistiksel olasılık hesapları ile elde edilmiş çizelgelerden yararlanılarak hesaplanmasıdır.
- Tüplerin pozitif veya negatif olmasının değerlendirilmesi, aranan mikroorganizma ve buna bağlı olarak kullanılan besiyerine göre değişir.

EMS (En Muhtemel Sayı) Yöntemi

- EMS yönteminde ardışık 3 seyreltiden 3'er tüpe ekim yapılması gıda mikrobiyolojisinde en yaygın uygulamadır.
- Seyreltilerden 5'er veya 10'ar tüpe de ekim yapılabilir.
- Her seyreltiden ekim yapılan besiyeri sayısı arttıkça daha doğru sonuç alınacağı açık olmakla ve güvenlik sınırları daralmakla birlikte 3'lü tüp yöntemi ile yeterli sonuçlar alınmaktadır.

EMS (En Muhtemel Sayı) Yöntemi

- Bu değerlendirme basit olarak besiyerinde;

  - Bulanıklık olması,
  - Durham tüpünde gaz oluşumu,
  - Besiyerinde renk değişimi,
  - Pıhtılaşma,
  - Floresan oluşumu

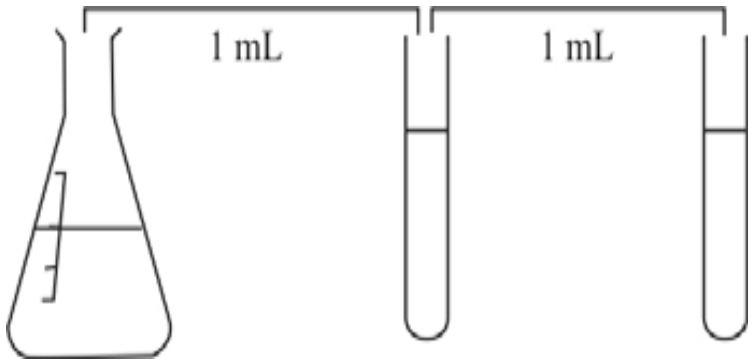
  kontrolü yapılır.

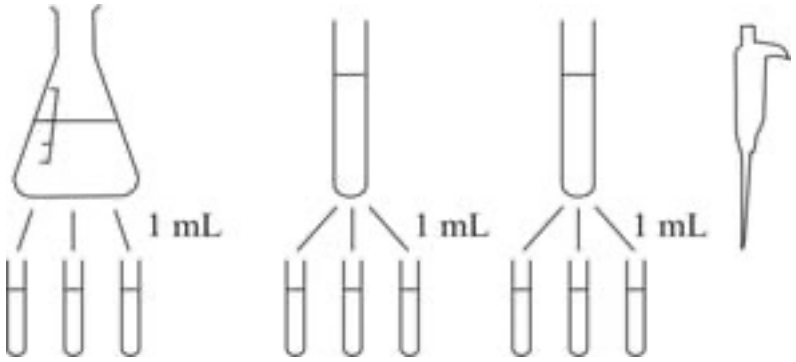
EMS (En Muhtemel Sayı) Yöntemi

- Gıda örneği sıvı ise orijinal örnekten (100 seyrelti) ekime başlanabilir (10^0 ;10^{-1}; 10^{-2}). Böylelikle yöntemin duyarlığı 10 kez artırılmış olur. Katı gıdada ise en düşük olarak 10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3} seyreltilerinden 1'er mL ekim yapılabilir.
- EMS yöntemi uygun besiyeri kullanmak şartı ile tüm bakteri ve maya sayımları için kullanılabilir.
- Küfler ise sıvı besiyerlerinde rahat gelişemedikleri için EMS yöntemi ile sayılamaz.

İşlem Aşamaları

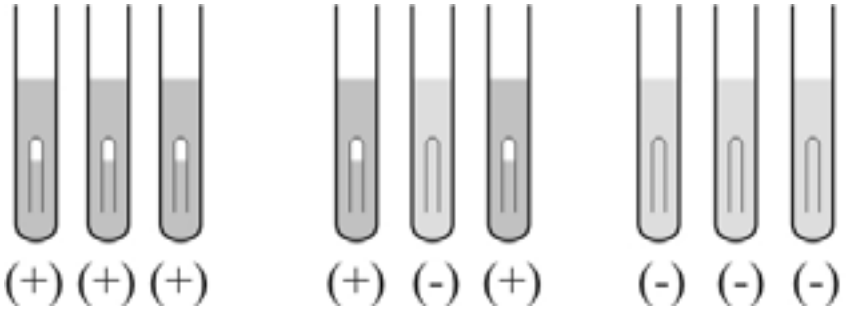
1. Gıda örneği 1:9 oranında homojenize edilip (10^{-1}), bundan standart yöntemle devam edilerek 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltiler elde edilir.
2. Her seyreltiden 3'er adet sıvı besiyerine ayrı ayrı 1'er mL aktarılır. Gıdada beklenen ya da hedef alınan sayıya göre ilk seyreltiden çift kuvvette hazırlanmış besiyerlerine 10'ar mL ekim yapılabilir.





İşlem Aşamaları

3. İnkübasyondan sonra bütün tüpler (+) ya da (−) olarak değerlendirilir. Bu, basitçe bulanıklık ve/veya gaz oluşumu ile yapılabileceği gibi, muhtemel pozitif tüplerden sıvı ya da katı besiyerlerine ekim yapılabilir.



İşlem Aşamaları

Hesaplama:

- Her seyreltiden 3'er tüpe ekim yapılıp, 3 tüpün kaç adedinde (+) sonuç alındığı sayılır ve bu şekilde bir kod elde edilir.
- Örnekteki mikroorganizma sayısı hakkında hiçbir tahmin yoksa ardışık 4 seyreltiden (10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) ekim yapılır.
- Ardından hangi 3 ardışık 3 seyreltinin seçileceğine aşağıdaki yöntemlere göre karar verilir.
  - 1'den fazla 3lü pozitif sonuç varsa daha seyreltik seriden başlanarak 3'lü seri değerlendirmeye alınmalıdır.
  - 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} dilüsyonlardan ekim yapılmış ve 3 3 2 1 şeklinde sonuç alındıysa 3 2 1 serisi dikkate alınmalıdır.

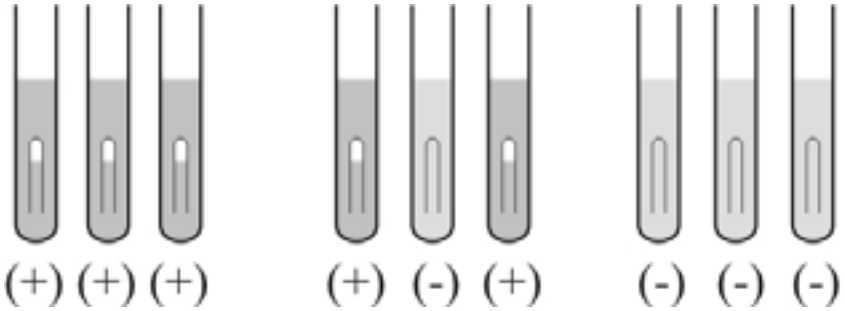
İşlem Aşamaları

Hesaplama:

- 1 adet 3lü pozitif sonuç varsa, 3 pozitif alınan seri ile başlanmalıdır. 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} dilüsyonlardan ekim yapılmış ve 3 2 1 0 şeklinde sonuç alındıysa, 3 2 1 serisi dikkate alınmalıdır.
- 0 adet 3lü pozitif varsa sondaki seri dikkate alınmalıdır. 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} dilüsyonlardan ekim yapılmış ve
- 2 1 1 0 şeklinde sonuç alındıysa, 1 1 0 serisi dikkate alınmalıdır.
- Ancak 1'den fazla 3lü negatif sonuç varsa örneği 2 1 0 0 şeklinde sonuç alındıysa, 2 1 0 serisi dikkate alınmalıdır.

İşlem Aşamaları

Hesaplama:



- Hesaplama kısmında ise elde edilen kodlar uygun EMS tablosundan okunur ardından okunan değer dilüsyon oranına bölünür.

Pozitif tüp ler			Sayı ve kategori	
1 mL	0,1 mL	0,01 mL	EMS	Kategori
0	0	0	< 0,30	-
0	1	0	0,30	2
0	2	0	0,62	3
1	0	0	0,36	1
1	1	0	0,74	1
1	1	1	1,10	3
1	2	0	1,10	2
1	2	1	1,50	3
1	3	0	1,60	3
2	0	0	0,92	1
2	0	1	1,40	2
2	1	0	1,50	1
2	1	1	2,00	2
2	2	0	2,10	1
2	2	1	2,80	3
2	3	0	2,90	3
3	0	0	2,30	1
3	0	1	3,80	2
3	0	2	6,40	3
3	1	0	4,30	1
3	1	1	7,50	1
3	1	2	12,00	3
3	2	0	9,30	1
3	2	1	15,00	1
3	2	2	21,00	2
3	2	3	29,00	3
3	3	0	24,00	1
3	3	1	46,00	1
3	3	2	110,00	1
3	3	3	>110,00	

Tablo 1.2: EMS çizelgesi EMS/g ; EMS/mL (partiden 1 örnek alınması)

İşlem Aşamaları

Hesaplama:

Örnek

Bir meyve suyu numunesinden 10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} seyreltilerden doğrulama testinde 3- 3-2-0 sonucu alınmıştır. Sonuç şu şekilde hesaplanır:

- Tablodan 3-2-0 koduna göre değer okunur: 9,30
- Dilüsyon faktörüne bölünür:

$9{,}30/10^0 = 9{,}30$ EMS/mL olarak sonuç verilir.

Membran Filtrasyon Yöntemi

- Membran filtrasyon sistemi özellikle içme suyu ve berrak meyve suları gibi filtrasyonda sorun çıkarmayan ve çok az sayıda mikroorganizma bulunabilen örnekler için idealdir.
- Benzer şekilde suda tam olarak eriyebilen şeker, tuz gibi gıdaların analizinde de kolaylıkla kullanılmaktadır.

- Membran filtrasyon yöntemi ile sayımın ilkesi de sterilizasyona benzer; analiz edilecek materyaldeki mikroorganizma filtre üzerinde kalır.

Membran Filtrasyon Yöntemi

- Belli hacimdeki sıvı numune veya dilüsyonunun, alanı belli bir filtre yüzeyinden süzülmesi, bu yöntemin prensibini oluşturur.
- Bu yöntemde bakterilerin geçmesine izin vermeyecek ancak bunların içinde bulunduğu su veya dilüenti geçirecek gözenek çaplarına sahip özel membran filtreler kullanılmaktadır.

Membran Filtrasyon Yöntemi

- Membran filtreler gözenek çapları kullanım amacına uygun olarak seçilir:
  - Mayalar için 0,65 µm
  - Bakteriler için 0,45 µm
  - Mikrokoklar için 0,20 µm çapında gözenekli filtreler kullanılır.

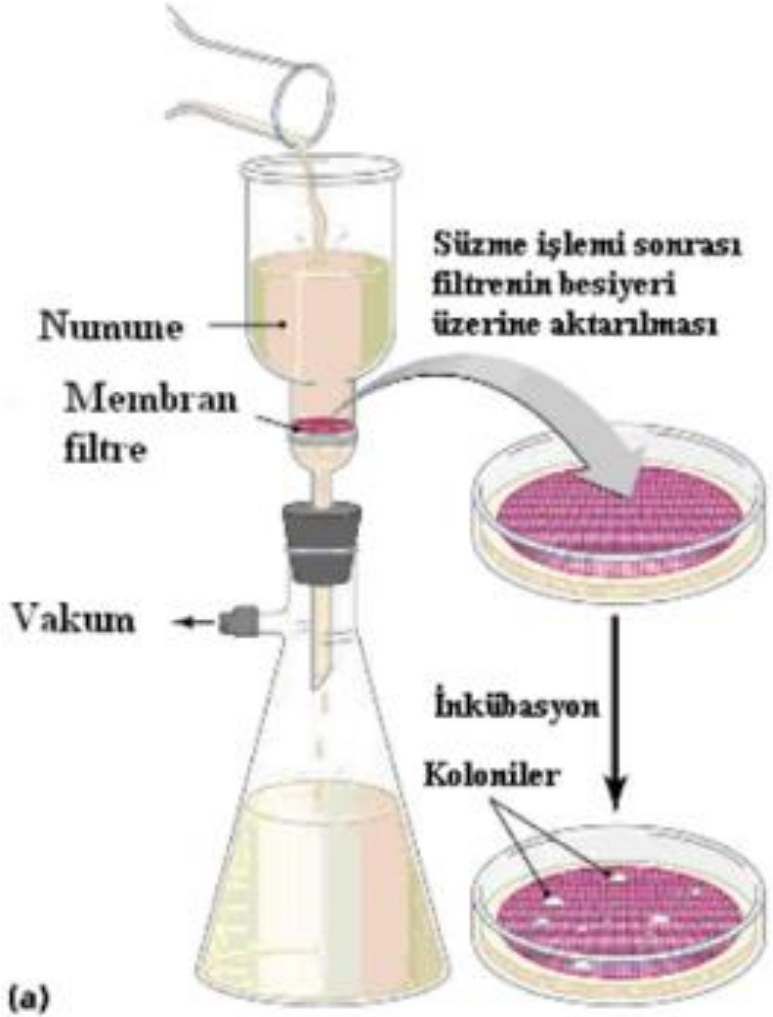
İşlem Aşamaları

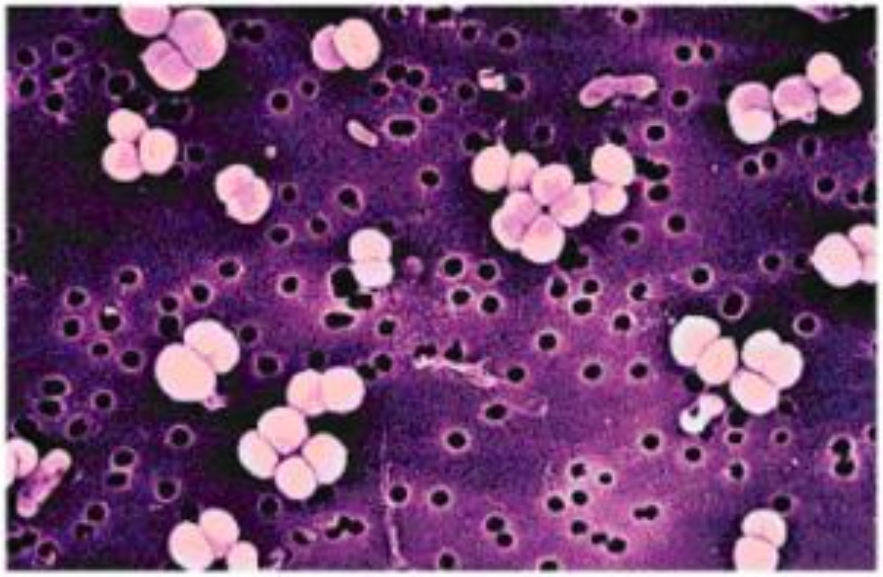
1. Membran filitrasyon uygulamasında bileşimi 2,5 g maya ekstraktı, 5,0 g pepton, 1,0 g glikoz, 15,0 g agar, 1,0 ml Tween 80 ve 1 litre su olan **K** besiyeri kullanılır. Besiyeri bileşenleri iyice eritildikten sonra otoklavda 121^{o}C 'da 15 dakika sterilize edilir.
2. 45^{o}C'a soğutulur, yine otoklavda 121^{o}C 'da 15 dakika sterilize edilmiş %12,5 konsantrasyonlu malik asit çözeltisinden 20 mL/litre olacak şekilde ilave edilir, hafifçe karıştırılıp petri kutularına dökülür. Besiyeri buzdolabında 60 güne kadar depolanabilir.

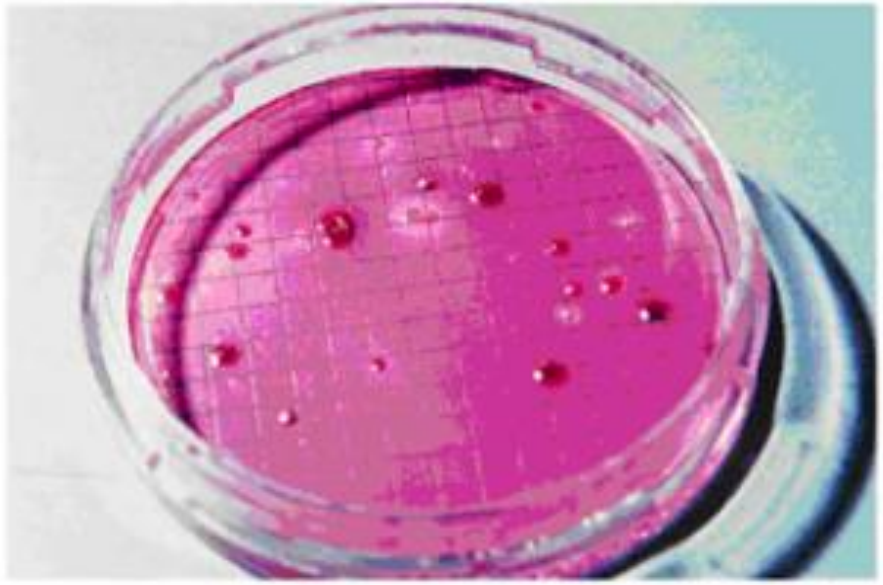
İşlem Aşamaları

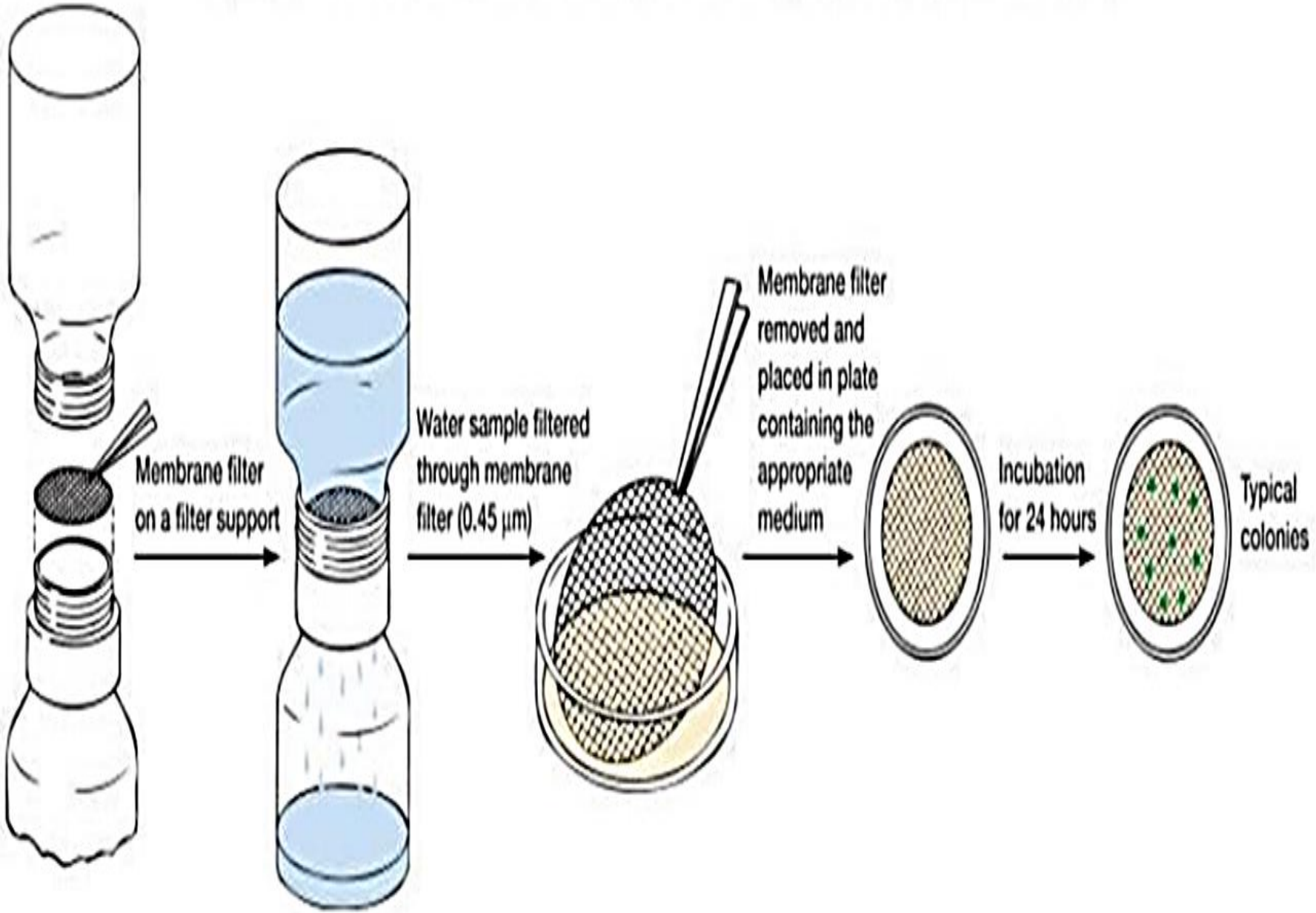
3. Analizi yapılacak olan meyve suyu ya da konsantresinden steril test tüplerine 15 ml alınıp 80^{o}C 'da 13 dakika süre ile pastörize edilip, 0,45 µ porlu membran filitreden geçirilir.
4. Filtre K besiyeri üzerine yerleştirilir, 40^{o}C 'da 3 gün süre ile inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda oluşan koloniler termofilik asidofilik bakteri olarak sayılır.

NOT: Buna alternatif olarak pH 'sı otoklavlama sonrası steril malik asit ile 3,5'e düşürülen triptik soy agar besiyerinde 55^{o}C'de 3 gün inkübasyon ve gelişen kolonilerin sayılması da söz konusudur. Bu şartta besiyerinin kurumaması için inkübatörün nemlendirilmiş olması tavsiye edilir.


Süzme işlemi sonrası
filtrenin besiyeri
üzerine aktarılması
Numune
Membran
filtre
Vakum
İnkübasyon
Koloniler
(a)


(b)
2.5 µm


(c)



Membran filtre yöntemi işlem sırası

Gelişmiş Analiz Yöntemleri

- Analiz edilecek örneğe ısıl işlem uygulanmadan 24 saat süre ile önzenginleştirme uygulanması, santrifüj işleminden sonra analiz kitine aktarılarak 24 saat inkübasyon sonrasında CO_2 dedektöründeki renk değişimi ile *Alicyclobacillus* türlerinin varlığının gösterilmesi şeklinde hazır ticari kitler vardır.
- İzolatların identifikasyonu için DNA-DNA homolojisi ve 16S ribozomal DNA dizilişi gibi genetik analizler uygulanabilmektedir. Benzer şekilde GC-MS analizleri ile izolatın ***guaiacol*** oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi ile de *Alicyclobacillus* olup olmadığı belirlenebilmektedir.

İlgili Örnek Videolar

- Var/yok Testi:Membran Filtrasyon Yöntemi: https://www.youtube.com/watch?v=x3WwPlq2jWU

- EMS Yöntemi: https://www.youtube.com/watch?v=Gh0hXROo2ds

✓EMS Yöntemi: https://youtu.be/9eaoErq6lNc?t=5

✓Membran Filtrasyon Yöntemi: https://www.youtube.com/watch?v=oWSeWl_Qq_Q

- Membran Filtrasyon Yöntemi: https://www.youtube.com/watch?v=a0PpQlxiDt0

Kaynaklar

- http://depo.btu.edu.tr/dosyalar/gida/Dosyalar/2019-2020%20g%C3%BCz%20d.%20g%C4%B1da%20mikrob.%20f%C3%B6y%C3%BC.pdf
- http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210012601.pdf
- http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF05A79F75456518CA
- https://www.youtube.com/watch?v=x3WwPlq2jWU
- https://www.youtube.com/watch?v=Gh0hXROo2ds
- https://youtu.be/9eaoErq6lNc?t=5
- https://www.youtube.com/watch?v=oWSeWl_Qq_Q
- https://www.youtube.com/watch?v=a0PpQlxiDt0