

DEFT YÖNTEMİ İLE GIDALARDA MİKROORGANİZMA YÜKÜNÜN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF MICROBIAL LOAD BY DEFT METHOD IN FOODS

Pelin K. YÜCEL*, Hilal B. D. HALKMAN

TAEK Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Ankara

ÖZET: Mikroskopik yöntemler, mikrobiyel hücrelerin varlığının belirlenmesinde çok hızlı yöntemlerdir. Standart kültürel yöntemler ile karşılaştırıldığında canlı ve ölü hücrelerin beraberce sayılması gibi bir dezavantajı bulunmakla beraber, hammaddenin mikrobiyel durumu hakkında bilgi vermesi açısından avantaj da taşımaktadır. DEFT, basit direk mikroskopik sayım yöntemlerinden yaklaşık 100 kat daha duyarlı ve sonuçları kültürel sayım ile kıyaslanabilecek kadar doğru sonuçlar veren bir yöntemdir. DEFT yöntemi canlı ve ölü hücrelerarasındaki ayrımı sağlamaktadır. Fluorochrome işaretli antikorların kullanımı ile belirli mikroorganizmaların tür düzeyinde tespiti de mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Mikroskopik sayım, DEFT, Ab-DEFT

ABSTRACT: Microscopic methods are very rapid methods of detecting the presence of microbial cells. When compared with the standard cultural methods, however microscopy has a disadvantage of counting the live and dead cells together and also has an advantage that it gives information about the microbial load of raw material. DEFT is approximately 100-fold sensitive than other methods of basic direct microscopic counting and gives accurate results in comparison with the cultural counts. DEFT provides the differentiation between the live and dead cells. Also, detection of certain microorganisms is possible by using fluorochrome-labelled antibodies.

Keywords: Microscopic count, DEFT, Ab-DEFT

GİRİŞ

Mikroskop, mikrobiyolojinin temel aletlerinden birisi olup, bilimsel araştırmaların da sembolüdür. Mikroskopun 1674 yılında Antoni van Leeuwenhoek tarafından bulunmasıyla mikrobiyel dünya keşfedilmiştir (Tortorello 1997).

Gıdalarda mikroorganizma yükünün belirlenmesinde esas alınan standart yöntem "kültürel sayım" olmakla beraber, başta mikroskopik sayımlar olmak üzere başka yöntemler üzerinde de yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Mikroskopik sayım yöntemlerinin en önemli üstünlüğü gıdalarda mikrobiyel yükün hızlı olarak belirlenmesidir. Sayım sonucunun alınması için geçen süre kültürel yöntemlerde saatlerle ifade edilirken, mikroskopik yöntemlerde dakikalar ile ifade edilir. Mikroskopik sayımlarda bir diğer üstünlük analiz maliyetidir. Basit boyamaya dayanan sayımların maliyeti hemen hemen sadece lam gideridir. Buna karşın basit mikroskopik sayımlarda canlı ve ölü hücreler beraberce sayılır (Wehr ve Frank 2004, Anonymous 2005).

Canlı ve ölü hücrelerin beraberce sayılması Howard küflü saha sayımında olduğu gibi hammadde kalitesi hakkında fikir verirken, starter kültür gibi zaten tamamına yakın bir çoğunluğu canlı hücre olan örneklerde güvenle kullanılabilir. Mikroskopik yöntemlerde maya sayımında olduğu gibi canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek mümkünse de, bu örnek doğrudan mikroorganizma ile ilişkili olup, bakterilerde basit boyama teknikleri ile canlı ve ölü hücreler ayırt edilemez. Ayrıca maya sayımında da çok güvenilir bir uygulama

* E-posta: pkozat@taek.gov.tr

Howard küflü saha sayım yönteminde olduğu gibi, Breed yöntemi ile çiğ sütlerde bakteri sayımı da hammadde kalitesi hakkında fikir sahibi olmak için başvurulan bir yöntemdir. Giderek gelişen gıda endüstrisinde hammaddenin mikrobiyel kalitesi üzerinde daha fazla durulmaktadır. Bu açıdan bakıldığında mikroskopik sayımların önemi artmaktadır. Buna karşın, gerek Howard küflü saha sayımında gerek Breed yönteminde ve gerek diğer benzeri yöntemlerde başta hammadde ve kullanılan boyadan gelen çeşitli yapılar mikroorganizma ile karıştırılmaktadır. Tersine olarak, kültürel sayım yöntemlerinde tüm canlı hücreler değil, sadece koloni oluşturabilenler sayılabilmektedir. Ayrıca, ısı işlem gibi uygulamalardan geçmiş olan gıdalarda hammaddenin mikrobiyel kalitesi hakkında hiçbir fikir vermemektedir (Wehr ve Frank 2004, Anonymous 2005).

Floresan boyaların mikroskopik analizlerde kullanılması ile mikrobiyolojik analizlerde yeni bir sayfa açılmıştır. Bu şekilde bir yandan sadece mikroorganizmaların görülmesi sağlanırken, diğer yandan canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesi ve floresan antikor sistemi ile doğrudan tür bazında mikroskopik sayım olanağı sağlanmıştır. Mikrokoloni, membran filitasyon vb. tekniklerin de devreye girmesi ile mikrobiyel yükün belirlenmesindeki yaklaşımlar çok değişmiştir (Rapposch ve ark. 2000, Anonymous 2005).

Bu derlemede Direk Epifloresan Filtre Tekniği (Direct Epifluorescent Filter Technique; DEFT) üzerinde bilgi verilmektedir.

DEFT Yöntemi

Kültürel sayım yöntemlerinde çok düşük sayılar belirlenebilirken, mikroskopik sayımlarda sayım bir anlamda mikroskop görüş alanı ile sınırlıdır. Bakteri sayımlarında 100X objektif kullanıma zorunluluğu görüş alanını ve dolayısı ile sayım yapılan hacmi çok küçültmektedir. Örneğin, Breed yöntemi ile sütlerde direkt mikroskopik sayım yapılırken, görüş sahasındaki 1 bakteri yaklaşık olarak sütte 400.000 adet/ml karşılığı olmaktadır. Bundan daha düşük değerlerde, incelenen görüş sahası içinde bakteri görülmeyebilmektedir. Ayrıca lam üzerine pipetlenen 0,01 ml hacmin 1 cm² alana yeknesak bir şekilde yayılması pratik uygulamada sağlıklı olmayabilmektedir (Gürgün ve Halkman 1990, Wehr ve Frank 2004, Anonymous 2005).

DEFT yönteminde birinci üstünlük membran filitre ile kombine kullanımudur. Bu şekilde bir yandan az sayıdaki mikroorganizmanın filitrede konsantrasyonu artmakta, diğer yandan mevcut mikroorganizmalar filitre üzerinde homojen bir şekilde dağılmaktadır. Buna göre, mikroskopik sayımın duyarlılığı çok yükseltilmektedir. Yöntemde ikinci üstünlük floresan boyalar ve floresan mikroskobu kullanımına bağlı olarak sadece mikroorganizmaların boyanmasının sağlanmasıdır. Ayrıca hammadde ya da boya çözeltisinden gelen dokular ve kirlilikler mikroorganizma olarak değerlendirilmemektedir (Pettipher 1986, Kepner ve Pratt 1994).

Yöntem orijinal olarak 1980'lerin başlarında süt örneklerinde bakteri sayımı için önerilmiş ve bu amaca yönelik olarak geliştirilmiştir. Daha sonra dondurulmuş balık, et, kıyım, mayonezli salatalar, krema ve krema benzeri ürünler, peynir altı suyu, domates salçası, şarap, meyve ve sebzeler ile su gibi değişik gıdaların analizine de adapte edilerek yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu uygulama, özellikle kolay filitre edilebilen gıdalar için avantajlı gibi görülse de et ve baharat gibi örneklerle yapılan araştırmalarda standart kültürel yöntem ile sayım sonuçları arasında yüksek düzeyde paralellik olduğu belirlenmiştir. Bu gibi araştırmalar genellikle dışarıdan bakteri kültürü ilavesi ile yapılmaktadır. Bir diğer deyiş ile bu araştırmalarda DEFT yönteminde de ağırlıklı olarak canlı bakteriler sayılmış olmaktadır (Tortorello 1997, Pyle 1999, Çakır ve Doğan 2000).

Floresan boyaların yanında moleküler probalar gibi belirleyiciler kullanılması ile hedef mikroorganizmanın sayımı gerçekleştirilir, ayrıca canlı ve ölü mikroorganizmaların farklı renklerde boyanması sağlanır, gerekirse filitre uygun bir katı besiyeri üzerinde 3-6 saat gibi kısa bir inkübasyondan sonra boyanarak mikrokolonilerin daha belirgin olarak sayılması sağlanır (Tortorello 1997, Pyle 1999, Tağı 2003).

Gıda örnekleri için yöntem, genellikle deterjan ve enzim içeren tamponlar ile analiz edilecek örnek hazırlama, membran filtreden geçirme, fluorokrom boyalar ile boyama ve inceleme ile sayım için epifloresan mikroskop basamaklarını içerir (Pyle 1999).

Epifloresan mikroskoplarda iki adet filitre ile ışık kaynağı olarak yüksek basınçlı bir cıva lambası bulunur. Bu cıva lambaları 366, 405 ve 435 nm'de güçlü bir ışık yayılımı sağlar. Cıva lambasından gelen ışık birinci filtreden geçerek yansıtıcıya gelir ve kondansör gibi görev yapan yansıtıcı optik eksene 45o'lik açı ile ışığı objektif üzerinden preparata yansıtır. Bu yansıtıcının diğer bir özelliği preparattan yansıyan ışığı bir filitre gibi süzerek floresan ışığını geçirirken, istenmeyen diğer ışınları tutmasıdır. İkinci filtrenin görevi ise çok az miktarda da olsa yansıtıcı tarafından tutulamayan ışınları absorbe etmektir (Çakır ve Doğan 2000).

Floresan tümüyle optik bir olaydır. Flurophore olarak bilinen maddeler tarafından ışık enerjisi absorblanır ve absorblanan bu enerji anlık olarak daha uzun dalga boylarında tekrar yayılır. Acridine orange (AO) metachromatic fluorochrome yapısındadır ve 470 nm'de hareketlenir. Oluşan polimerler 650 nm'de kırmızı, monomerler ise 525 nm'de yeşil floresan verir. AO bakterilerde nükleik aside 2 mekanizma ile bağlanır. RNA zincirleri esnek durumda iken, RNA'ya bağlanmış olan AO molekülleri polimerize olur ve kırmızı floresan verir. DNA'ya bağlananlar ise DNA'nın daha stabil yapısı nedeniyle ayrı olarak korunur ve oluşan floresan yeşil renklidir. Bu şekilde aktif ve inaktif mikroorganizmaların ayrımı mümkündür. Aktif mikroorganizmalarda yüksek RNA konsantrasyonu nedeniyle oluşan floresan kırmızı, inaktif mikroorganizmalarda ise düşük RNA konsantrasyonundan ve DNA'dan kaynaklanan floresan ise yeşil renktedir (Raugel 1999).

DEFT Yönteminin Uygulanışı

Yöntemin uygulanışındaki işlem basamakları gıdanın çeşidine, sayılacak mikroorganizmalara ve boyanan hücrelerin veya kolonilerin sayılıp sayılmayacağına bağlı olarak değişiklik gösterir. Gıdanın çeşidine göre farklı enzimler kullanılmaktadır (Turantaş ve Ünlütürk 1998, Pyle 1999).

Buna göre süt ürünlerinin analizi için 10 g örnek 90 ml % 0.1 peptonlu suda homojenize edilir, seyreltilmiş gıda homojenizatı eğer gerekli ise ön filtrasyon amacı ile 5 mm'lik polipropilen filtreden geçirilip, elde edilen filtratın 2 ml'sine 0.5 ml rehirdre tripsin ve 2 ml % 0.5 Triton X-100 ilave edilerek 50 °C'da 10 dakika inkübe edilir. Burada kullanılan Triton X-100 ve tripsinin görevi sırasıyla sütteki yağ globüllerini ve somatik hücreleri parçalayarak filtrenin tıkanmasını engellemektir. Bu yöntem, Amerikan Halk Sağlığı Birliği (APHA) tarafından süt örnekleri için önerilmektedir (Pyle 1999, Çakır ve Doğan 2000).

Esas filtrasyondan önce, filtrasyon düzeneği 50 °C'de 5 ml Triton X-100 ile nemlendirilir. Filtre daha sonra yine 50 °C'de tutulan 5 ml Triton X-100 ile yıkanır. Ön filtrasyon aşamasında elde edilen filtrat 25 mm çaplı, siyah, 0,6 mm gözenek çaplı polikarbonat membran filtreden geçirilerek boyama yapılacak filtre elde edilmektedir (Turantaş ve Ünlütürk 1998, Pyle 1999).

Elde edilen bu filitre kurutulur ve boyanan hücreler epifloresan mikroskop ile incelenir ya da doğrudan sayım yapılır. Boyama yöntemine ve örnek karakteristiklerine göre bakteri sayılarında farklılıklar görülebilmektedir. DEFT yönteminde yaygın olarak AO kullanılmakla beraber, birçok uygulamada 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) gibi alternatifler de vardır. Akriflavin, bisbenzimidazol boyaları, eritrosin ve fluorescein izotiyosiyanat içeren diğer boyalar da çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Duffy ve Sheridan 1998).

AO için ışık filitrelerine sahip floresan mikroskopunda 60X floresan objektifi veya 100X objektif ve objektif mikrometre kullanılarak kalibre edilen oküler ile çalışılır. Bazı standart yöntemler sadece turuncu floresan veren hücrelerin ve mikroorganizma gruplarının sayılmasını önerirken, toplam direk mikroskopik sayımın elde edilmesi için turuncu (canlı) ve yeşil (ölü) hücrelerin sayılması önerilmektedir (Kepner ve Pratt 1994, Pyle 1999).

Orijinal örnekteki hücre sayısı, sayım yapılan mikroskop görüş alanlarındaki ortalama hücre sayısı (A) ile membran filitredeki alan ve mikroskopik görüş alanının fonksiyonu olan Filtre Mikroskop Faktörü (FMF) çarpımının, filitre edilen örnek hacmine (V) bölünmesi ile elde edilir. Buna göre basit olarak ve Breed yöntemindeki formüle benzemek üzere;

Toplam hücre sayısı (mL)= $[A \times FMF / V (ml)]$ şeklinde gösterilir.

Bu formüldeki FMF= [membran filitrenin alanı / mikroskop görüş alanı] olarak hesaplanır (Kepner ve Pratt 1994).

Mikroskop görüş alanı her mikroskobun objektifleri ve okülerleri için değişir. Her objektif ve oküler için objektif mikrometre kullanılarak hesaplama yapıldıktan sonra aynı oküler ve objektif kullanılmak kaydı ile bu faktör sabittir (Tortorello 1997).

Mikroskopta sadece canlı hücrelerin sayılması istendiğinde örnek önce seyreltilmiş besinler ve DNA gyrase inhibisyonuna yol açan nalidixic asit veya benzer bir antibiyotik ile inkübe edilir ve hücre bölünme döngüsünün tamamlanması engellenir. Gelişmekte olan ancak bölünemeyen hücreler uzar ve/veya genişler. Boyamadan sonra, tipik hücre büyüklüğünden 1.5 misli daha büyük olan hücreler "canlı" kabul edilerek mikroskop yardımı ile sayılır (Pyle 1999).

Bakteriyel hücre canlılığını veya metabolik aktiviteyi gösterebilen bir seri floresan boyalar bulunur. Hasar görmemiş plazma membranına sahip canlı bakterileri hasar görmüş membrana sahip ölü bakterilerden ayırmak için kullanılan Canlı/Ölü BacLight canlılık kitleri (Molecular Probes, Eugene, OR) dual boyama kullanımını içermektedir. Membrana sahip hücrelerin belirlenmesinde Rhodamin 123 gibi boyalar kullanılabilir iken, DiBAC4 (Molecular Probes) membrana sahip olmayan hücrelere nüfuz eder. Cyanoditoly tetrazolium klorür (CTC) ise hücre içine alınır ve solunum yapan hücrelerde dehidrogenaz aktivitesi ile hücre içi floresan CTC-formazan kristallerine çevrilir. Aktif hücrede esterez aktivitesi serbest fluorescein oluşturan fluorescein diasetatin parçalanması ile belirlenebilir. AO ile boyama, canlılığın veya fizyolojik aktivitenin belirlenmesinde önerilmiş olmasına rağmen, boyama yöntemlerinin farklı etkilerinden dolayı sonuçların dikkatlice değerlendirilmesi önerilmektedir (Goodridge ve ark. 1999, Kepner ve Pratt 1994, Anonymous 2004a).

DEFT yönteminin Howard lamı ile küf sayımına alternatif olarak kullanımı üzerine yapılan araştırmalar DEFT yönteminin diğerine göre çok daha hassas olduğunu ortaya koymuştur (Turantaş ve Ünlütürk 1998, Tağı 2003).

Mikrokoloni-DEFT

Analiz edilecek gıda örneğinin membran filitreden geçirilip, uygun bir katı besiyerinde inkübe edilmesi, inkübasyon sonrası filitrenin kurutulup, boyanması ve oluşan mikrokolonilerin sayılması esasına dayanmaktadır.

Mikrokoloni-DEFT yöntemi 1970'li yıllarda geliştirilmiştir. Koloni oluşturabilen canlı hücrelerin sayımında kullanılan hızlı bir analiz sistemidir. Ön işlemlerden geçirilmiş gıda homojenizatı membran filitreden geçirilip, uygun bir katı besiyerine yerleştirilerek inkübasyona bırakılır. Mikrokolonilerin oluşması için gerekli inkübasyon süresi Gram negatif bakterilerde 3 saat, Gram pozitiflerde ise 6 saat olarak verilmektedir. Daha sonra bu filitreler AO ile boyanarak oluşan mikrokoloniler mikroskop altında 100X büyütme ile sayılır. Bu teknik kullanılarak 103 kob/g düzeyindeki *Staphylococcus*, *Pseudomonas* veya koliform grup mikroorganizma 8 saat içinde belirlenebilmektedir (Winter ve ark. 1971, Sekin ve Karagözlü 2004, Anonymous 2005).

Antikor Direk Epifloresan Tekniği (Ab-DEFT)

Başta patojenler olmak üzere belirli bakteri türlerinin boyanmasında floresan antikorlar kullanılmaktadır. Çiğ etlerde *Salmonella* ve *Listeria* sayımı için indirek floresan-antikor boyama yöntemi DEFT'e adapte edilmiş ve direk floresan-antikor modifikasyonu olan Antibody-DEFT (Ab-DEFT) süt ve meyve suyunda *Escherichia coli* O157:H7 serotipinin sayımında kullanılmak için geliştirilmiştir (Tortorello ve Stewart 1994).

Ab-DEFT, DEFT'in bir modifikasyonudur. Ab-DEFT'in avantajı kültürel yöntem olmaması ve bu nedenle birçok durumda uygulanabilir olmasıdır. Floresan antikorların kullanımı süt, meyve suyu ve sığır eti gibi bazı gıdalarda *Escherichia coli* O157:H7 gibi belirli bakterilerin hızlı sayılması ve tanımlanması için geliştirilmiş modifiye bir yöntemdir. Ab-DEFT yönteminde örnek homojenize edildikten sonra standart DEFT yönteminde

olduğu gibi tripsin ve Triton X-100 ile muamele edildikten sonra 0,2 mm por çaplı siyah polikarbonat filtreden geçirilir ve filtre doğrudan fluorescein ile işaretlenmiş anti-O157 poliklonal antikoru ile boyandıktan sonra yıkanıp, epifloresans mikroskopta incelenir. Gerekli ise ön filtrasyon uygulanabilir. Ab-DEFT yönteminin duyarlılığı standart yöntemle aynı olup, 16 kob/g düzeyinde *E. coli* O157:H7 varlığında güvenilir bir şekilde kullanılabilir (Restaino ve ark. 1996, Çakır 2000).

Analizin duyarlılığını arttırmak için immunomanyetik ayırma (IMS) yöntemleri ile Ab-DEFT kombine edilmiştir. IMS yöntemleri kullanılarak örnekte 101-102 /ml(g) hücreye kadar olan düşük sayıların belirlenmesi mümkündür (Pyle 1999, Restaino ve ark. 1996).

Ab-DEFT yöntemi ile gıdalarda, suda ve atık suda zenginleştirme basamağı olmadan *E. coli* O157:H7 hücreleri belirlenmiştir. Ayrıca 37°C 'da statik koşullarda seçici olmayan besiyerinde 10 saatlik zenginleştirme uygulanarak bu yöntem ile çiğ sığır etinde 0.1 hücre/g başlangıç konsantrasyonunda olan *E. coli* O157:H7 izole edilmiş ve muhtemel pozitif örneklerin doğrulanmasının IMS kullanılarak 24 saatte tamamlanabileceği belirtilmiştir (Restaino ve ark. 1996).

E. coli O157:H7'nin belirlenmesi üzerinde yapılan bir çalışmada, toplam 5 saat süren Ab-DEFT analiz yöntemi duyarlılığının, 0.1 hücre/g olan standart kültürel yöntemin duyarlılığını geçtiği belirtilmiştir. Bu analiz yönteminin esası, *E. coli* O157:H7'nin seçici olmayan besiyerinde gelişme hızının çok duyarlı bir tespit yöntemi olan Ab-DEFT ile birleştirilmesidir. IMS yönteminin modifiye Tamponlanmış Peptonlu Su besiyerinde uygulanması, yukarıda belirtildiği gibi muhtemel pozitif örneklerin 24 saat içinde doğrulanmasını sağlamaktadır. Ab-DEFT epifloresan inceleme için 0.4 µm filtrenin hazırlanmasında fazla sayıda yıkamayı içeren iki filtrasyon basamağına gerek vardır. Filtrasyonun ve yıkama işleminin otomasyonu ve mikroskop için fluorometer ile yer değiştirmesinin bu yöntemi daha basitleştirebileceği ve hızlandırabileceği öne sürülmektedir (Restaino ve ark. 1997).

Tortorello ve ark. (1997) tarafından yapılan çalışmada, tüketime hazır paketlenmiş salatalarda ve diğer taze sebzelerde dışarıdan inoküle edilen *Listeria monocytogenes* 'in sayımında Ab-DEFT yöntemi poliklonal floresan antikorun gösterdiği çapraz reaksiyonlara rağmen, mikrobiyel hücre sayımında EMS yöntemine göre hızlı bir alternatif olarak değerlendirilmiştir. 10-107 kob/ml hücre konsantrasyonu aralığında Ab-DEFT, *Listeria* 'nın katı besiyeri ve EMS sonuçları ile paralel sonuçlar vermiştir. 5 gün süren EMS yönteminin aksine Ab-DEFT ile sonuç almak 1 saatten daha az sürmektedir.

Otomatik Sistemler

DEFT için çeşitli otomatik sistemler bulunmaktadır. BactoScan (Foss Electric) sisteminde ön işlem, boyama ve tespit ile saatte 80 çiğ süt örneğinde toplam bakteri sayımı yapılabildiği, COBRA (Biocom) sisteminde ise filtrasyon, boyama, yıkama, kurutma ve otomatik mikroskop ve görüntü analizi kullanılarak sayım işlemlerinin otomatikleştirildiği, bu sistem ile saatte 100'den fazla örnek ile çalışılabildiği ve elde edilen sonuçların koloni sayımlarıyla iyi bir şekilde uyum gösterdiği bildirilmektedir (Singh ve ark. 1989, Pettipher ve ark. 1992, Pyle 1999).

Işınlanmış Gıdaların Belirlenmesinde DEFT Kullanımı

DEFT, gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında rutin olarak kullanılacak potansiyel bir analiz yöntemidir. Bunun dışında farklı amaçlarla da başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Işınlanmış gıdanın Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri (TAMB) sayısının aynı örnekteki DEFT sayısı ile kıyaslanması gıdanın ışınlanmış olup, olmadığını gösterebilmektedir. Eğer TAMB sayısı DEFT ile elde edilenden belirgin olarak düşükse gıdanın ışınlanmış olduğunu göstermektedir. Eğer örnekler ışınlanırsa başlangıçta çoğu canlı olan mikroorganizmalar inaktif hale gelir ve DEFT/TAMB oranı artar. İki sayımın kıyaslanması gıdanın ışınlanıp, ışınlanmadığının gösterilmesinde kullanılır. Baharatta ışınlanışının TAMB ve DEFT değerlerinin kıyaslanması ile belirlenmesinin mümkün olduğu deneysel olarak da gösterilmiştir (Rahman 1995).

Türk Standardlar Enstitüsü tarafından TS EN 13783 "Gıda Maddeleri–Doğrudan Epifloresans Süzme Tekniği/Aerobik Plâka Sayımı (DEFT/APC) Kullanarak Işınlanmış Gıdaların Belirlenmesi–Eleme Yöntemi" adlı standart yöntem de DEFT kullanılarak elde edilen sayı ile TAMB sayısının karşılaştırılmasına dayanmaktadır. TAMB ışınlamadan sonra örnekteki canlı mikroorganizmaların sayısını, DEFT ise canlı ve canlı olmayan hücreler de dahil toplam mikroorganizma sayısını vermektedir. 5 kGy ile 10 kGy arasındaki dozlar ile ışınlanmış olan baharatta DEFT sonucu ve TAMB sayısı arasındaki fark genellikle 3-4 log birimi ya da bunun üzerindedir. Isıl işlem gibi mikroorganizmaların ölümüne yol açan diğer uygulamalarda da DEFT ve TAMB sayıları arasındaki benzer farklılıklar görülmektedir (Rahman 1995, Anonymous 2004b).

Betts ve ark. (1988) tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar turuncu floresan veren organizmaların ışınlama sonucu DEFT sayım sonucu ile TAMB sayısının uyum içinde olmadığını göstermiştir. Ancak ışınlama sonrası DEFT sayımı ile ışınlama öncesi TAMB sayımı arasında iyi bir korelasyon bulunmuştur ($R= 0.93$). Işınlama öncesi turuncu floresan veren canlı organizmaların, ışınlama sonrası canlı ya da cansız olmalarına bağlı olmaksızın turuncu floresan vermeye devam ettiği gözlenmiştir. Işınlama öncesi cansız ve yeşil boyanmış organizmalar ise ışınlama sonrasında da yeşil floresan vermeye devam etmiştir.

Buna göre, ışınlama sonrasında DEFT ile elde edilen turuncu floresan veren hücre sayısı iki popülasyonun ölçüsüdür: (a) ışınlama sonrası canlılığını koruyan mikroorganizmalar ve (b) ışınlama öncesi canlı olan ancak ışınlama ile inaktive olan mikroorganizmalar. Eğer DEFT sayısı TAMB sayısından yüksekse, bu gıdaya ışınlama veya ısıl işlem uygulandığı düşünülebilir. Genellikle ısıl işlem görmüş gıdalar işlemin göstergesi olarak görsel değişiklikler gösterir.

Oh ve ark. (2003) Kore 'de ithal edilen ve iç piyasada bulunan baharatın ışınlanmış veya ışınlanmamış olduğunun belirlenmesi için DEFT/TAMB yöntemini kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre toz karabiber ve mercan köşk otu hariç diğer baharatta ≥ 2.5 DEFT/TAMB oranının, baharatın en az 3 kGy veya üstünde ışınlama işleminin göstergesi olabileceği belirtilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anonymous 2004a. Tools for microbiology. http://probes.invitrogen.com/lit/bioprobos_43/4.pdf
- Anonymous 2004b. Gıda Maddeleri – Doğrudan Epifloresans Süzme Tekniği/Aerobik Plâka Sayımı (DEFT/APC) Kullanarak Işınlanmış Gıdaların Belirlenmesi –Eleme Yöntemi, TS EN 13783, Türk Standardları Enstitüsü. Ankara, 16 s.
- Anonymous 2005. Mikroskopik sayımlar. www.mikrobiyoloji.org.
- Betts, R. P., Farr, L., Bankes P. and Stringer, M. F. 1988. The detection of irradiated foods using the direct epifluorescent filter technique, *Journal of Applied Bacteriology*, 64: 329-335.
- Çakır, İ. (2000). *Escherichia coli* O157:H7. Alınmıştır, "Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları" Sayfa: 403-413. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaacılık, Ankara, 522 s.
- Çakır, İ. ve Doğan, H. 2000. Membran filtrasyon uygulamaları. Alınmıştır, "Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları" Sayfa: 497-506. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaacılık, Ankara, 522 s.
- Duffy, G. ve Sheridan J.J. 1998. Viability staining in a direct count rapid method for the determination of total viable counts on processed meats. *J. Microbiol. Methods* 31:167-174.
- Goodridge, L., Chen, J. and Griffiths, M. 1999. Development and characterization of a fluorescent-bacteriophage assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. and Envir. Micr.* 65(4) 1397-1404.
- Gürgün, V. ve Halkman, A.K. 1990. Mikrobiyolojide sayım yöntemleri ; 2. Baskı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 7. San Matbaası, Ankara 146 s.
- Kepner, R.L. ve Pratt, J.R. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol. Rev.* 58: 603-615.
- Oh, K. N., Lee, S. Y., Lee, H. J., Yang, K. E. and Kim, J. S. 2003. Screening of gamma irradiated spices in Korea by using a microbiological method (DEFT/APC), *Food Control*, 14: 489-494.
- Pettipher, G.L. 1986. Review: The direct epifluorescent filter technique. *J. Food Technol.* 21:535-546.
- Pettipher, G.L., Watts Y.B. Langford, S.A. and Kroll, R.G. 1992. Preliminary evaluation of COBRA, an automated DEFT instrument, for the rapid enumeration of microorganisms in cultures, raw milk, meat and fish. *lett. Appl. Microbiol.* 14:206-209.

- Pyle, B. H. 1999. Direct Epifluorescent Filter Techniques. In "Encyclopedia of Food Microbiology; eds. Carl A. Batt, Pradip Patel, Richard K. Robinson". s. 527-529, Academic Press, USA.
- Rahman, R., Haque, A. K. M. and Sumar, S. 1995. Chemical and Biological Methods for the Identification of Irradiated Foodstuffs, Nutrition & Food Science, 1: 4-11.
- Rapposch, S., Zangerl, P. and Ginzinger, W. 2000. Influence of fluorescence of bacteria stained with acridine orange on the enumeration of microorganisms in raw milk. J Dairy Sci. 83(12)2753-2758.
- Raugel, P.J. 1999. Direct Epifluorescent Filter Techniques (DEFT). In "Rapid Food Analysis and Hygiene Monitoring, Kits-Instruments and Systems. Sayfa: 413-414, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 921 s.
- Restaino, L., Castillo, H. J., Stewart, S. D. and Tortorello, M. L. 1996. Antibody-Direct epifluorescent filter technique and immunomagnetic separation for 10-h screening and 24-h confirmation of *E. coli* O157:H7 in beef, Journal of Food Protection, 59(10) 1072-1075.
- Restaino, L., Frampton, E. W., Irbe R. M. and Allison, D. R. K. 1997. A 5-h screening and 24-h confirmation procedure for detecting *E. coli* O157:H7 in beef using direct epifluorescent microscopy and immunomagnetic separation. Letters in Applied Microbiology, 24: 401-104.
- Sekin Y. ve Karagözlü N. 2004. Gıda Mikrobiyolojisi, Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar. Klaus Pichardt'dan çeviri. Literatür Yayıncılık, İstanbul, 358 s.
- Singh, A., Pyle, B.H. ve McFeters, G.A. 1989. Rapid enumeration of viable bacteria by image analysis. J. Microbiol. Methods 10:91-101.
- Tağı, Ş. ve Gürgün, V. 2003. Fungal antijenlere karşı antiserum hazırlanması ve floresan antikor tekniği ile domates ürünlerindeki fungal hiflerin saptanması. OrLab OnLine Mikrobiyoloji Dergisi 01(11)1-16 www.mikrobiyoloji.org/pdf/702031101.pdf.
- Tortorello, M. L. 1997. A new look at an old technique: Application of microscopy to food microbiological analysis. In "Food Microbiological Analysis New Technologies Tortorello & Gendel (Eds.), Sayfa: 45-76, Marcel Decker, Inc., New York, 360 s.
- Tortorello, M. L., Stewart, D. S. 1994. Antibody-Direct epifluorescent filter technique for rapid, direct enumeration of *E. coli* O157:H7 in beef, Applied and Environmental Microbiology, Oct., 3553-3559.
- Tortorello, M. L., Reineke, K., Fand, D. ve Stewart, S. 1997. Comparison of Antibody-Direct epifluorescent filter technique with the most probable number procedure for rapid enumeration of *Listeria* in fresh vegetables, Journal of AOAC International, 80(6) 1208-1214.
- Turantaş, F. ve Ünlütürk, A. 1998. Hızlı Mikrobiyolojik Yöntemler Alınmıştır, "Gıda Mikrobiyolojisi, A. Ünlütürk & F. Turantaş (Eds.)". Sayfa: 551-592, Mengi Tan Basımevi, İzmir, 605 s.
- Wehr, H.M. and Frank, J.F. 2004. Standart methods for the examination of dairy products. 17 th Ed. APHA Washington DC, 570 p.
- Winter E.H., York M.K. and El-Nakhel, I.I. 1971. Quick counting method for estimating the number of viable microbes on food and food processing equipment. Appl. Microbiol 22:89-92.