

**STERİL OLMA ZORUNLULUĞU BULUNMAYAN
FARMASÖTİK
VE KOZMETİK ÜRÜNLERİN MİKROBİYOLOJİK YÖNDEN
İNCELENMESİ : II. ŞAMPUANLARDA MİKOLOJİK
KONTAMİNASYONUN SAPTANMASI**

**MICROBIAL INVESTIGATIONS IN NON - STERILE
PHARMACEUTICAL AND COSMETIC PRODUCTS II. THE
DETECTION OF MYCOTIC CONTAMINATION IN
SHAMPOOS**

O. ÖZYARAL* - A. ÇEVİKBAŞ** - Ö. TARKAN*** - S. MALCANLI***

SUMMARY

In this investigation we analyzed the shampoos which are non - sterile pharmaceutical products and also cosmetics. The mycologic sites of microbial flora of the samples, which were marketed in different packages and containers, and have different structural characteristics, were detected. For mycological analyses 72 samples were collected. A 37 of them were trade mark and 5 of them not. Also, 24 samples which have been specially produced for hotels and were in their special containers, some of which were sealed and some were not. The original 27 samples were got from foreign countries. The 20 of them, which were bought from Arizona, England, France and Holland were found mycologically clean. The 7 samples were bought from the markets of Istanbul which were Bulgarian and Romanian origine. were found mycologically contaminated The mycological analyses have been on 96 shampoo samples. The 72.9 % of the hole shampoos collected from homes and 37.5 % of them were taken special hotel products, were found mycologically dirty.. In one mL of shampoos live mould spores were calculated 200 cfu / mL (min.) to 1100 cfu / mL (max.). The mould strains which were isolated from the samples as *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. glaucus* group specises are known the influence of allergy. As a result of high potential of microorganisms in the shampoos shows that, during the producing the process of sanitation wasn't enough and the rules of hygiene wasn't used perfectly. As a consequence of this study the importance of pharmaceutical microbiology, the techniques of sanitation and the training of the personnel, were shown.

* Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haydarpaşa - İSTANBUL.

** Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Haydarpaşa - İSTANBUL.

*** Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi 8. sönestre öğrencisi, Haydarpaşa - İSTANBUL.

ÖZET

Araştırmamızda steril olma zorunluluğu bulunmayan preparatlar olan kozmetiklerden şampuanlar üzerinde çalışılmıştır. Farklı yapısal özelliklere sahip ve değişik tipte ambalaj içerisinde piyasaya sunulmuş örneklerin mikolojik açıdan mikrobiyal yükü saptanmıştır. Analiz için 72 evden şampuan örneği toplanmıştır. Örnekler 37 marka ve 5 adet fason üretici firmaya aittir. Ayrıca oteller için özel üretilen kendi özel kapları içerisinde bir kısmı kapatılmış, bir kısmı ise ağızları açık - kapatılmamış olmak üzere 24 adet örnek üzerinde çalışılmıştır. Örneklerden 27 adedi orijinal ambalajları içerisinde yurt dışından sağlanmıştır. Arizona, İngiltere, Fransa ve Hollanda'dan gelen 20 örnek mikolojik açıdan temiz, Romanya ve Bulgaristan orijinli olup İstanbul piyasasından alınan fason 7 örnek ise mikolojik olarak kirli bulunmuştur. Çalışmamızda toplam 96 adet şampuan örneği üzerinde mikolojik analizler yapılmıştır. Evlerden toplanmış örneklerin % 84.7'si, oteller için üretilen özel ürünlerin % 37.5 'u, toplamda şampuan örneklerinin % 72.9'unun mikolojik açıdan kirli olduğu saptanmıştır. Örneklerin mL'sindeki canlı küf sporu en az 200 kob (1) /ml, en fazla 1100 kob / ml olarak saptanmıştır. Örneklerden ayırımı yapılan küf suşlarından *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. glaucus* grubuna ait türler, *cladosporium* türleri ve *Penicillium paraherquei* ile *phoma*'nın allerjen etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Ürünlerdeki bu mikrobiyal içeriğin fazla olması üretim sürecindeki sanitasyon işlemlerinin yetersizliğini ve hijyen kurallarına uyulmadığını göstermektedir. Bulgularımız üretim zincirindeki bazı kademelerde sanitasyon işlemlerinin hatalı ve / veya eksik yapıldığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak; çalışmamızda daha kaliteli üretim ve sağlıklı ürün için, farmasötik mikrobiyolojinin, sanitasyonunun ve hizmet için eğitiminin önemi birkez daha vurgulanmıştır.

GİRİŞ

Saç için hazırlanmış preparatların saça uygulanması esnasında, saçlı deriye ve saçın kendisine zarar vermemesi gerekir. Şampuan saç kozmetikleri arasında en çok ve sıklıkla kullanılanıdır. Genelde hazırlanmaları esnasında kullanılan suyun farmasötik amaçlı olmaması ve hijyen koşullarına uyulmamasından dolayı şampuanlar su kaynaklı Gram - negatif bakteriler tarafından kontamine olurlar (1). Ortaya istenmeyen bir görüntü, bulanıklık, dipte çamurumsu bir çözelti, ağımsı bir yapılanma, renkte değişim ve koku gibi bozulmalar çıkar (2,3). Tıbbi şampuanlar içeriklerinde bulunan antimikrobiyal maddelerin dar spektrumlu olması nedeniyle zaman zaman mikrobiyal bir istilayı, dolayısıyla mikroplarla kirlenmeyi engelleyemez (3). Kullanım süresi içerisinde bir şampuanı gözlerden uzak tutmak imkansızdır. Mikroplarla kirlenmiş bir saç kozmetiği uygulanması, özellikle saçın yıkanması esnasında kolaylıkla gözlerle temas eder. Ürünün kalitesini düşüren mikrobiyal kirlenme saça ve saçlı deriye dolaylı olarak da gözlere zarar verecek konumdadır.

(1) Kob : Koloni oluşturan birim

Çalışmamızda steril olma zorunluluğu bulunmayan preparatlar arasına giren kozmetik ürünlerden şampuanlar üzerinde çalışılmıştır. Kozmetik endüstrisinde mikolojik kirlilik problemlerinin kaynağının saptanması ve buna bağlı alınan önlemler steril olma zorunluluğu bulunmayan bu tip preparatların mikrobiyal içeriğini azaltmakta ve kabul edilebilir düzeylere indirmektedir. Sıklıkla kullanılan şampuanlardaki mikolojik kirliliğin kaynakları ortadan kaldırılarak kullanılan kişiye zarar vermeyerek, sanitasyon ve asepsi kurallarına uygun preparatlar piyasaya sunulacaktır. Bu çalışmamızda üretici firmalara ait şampuan üretim programlarındaki bazı ortak aksaklıklardan kaynaklanan mikolojik kirlenmeye dayalı problemlerin ortaya çıkarılması ve bu sorunları yok edici önlemlerin gösterilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmamızda evlerde kullanılmakta olan değişik tip ve özelliklere sahip şampuan örneklerinin mikolojik analizleri yapılmak üzere toplanmıştır. Örnekler 37 marka ve 5 adet fason üretici firmaya ait olmak üzere herbirisi ayrı bir evden 72 örnek alınmıştır. Ayrıca oteller için özel üretilen kendi özel kapları içerisinde ağızları açık ve mühürlenmemiş 12 ağızları mühürlenmiş özel olarak kapatılmış 12, olmak üzere toplam 24 adet örnek üzerinde çalışılmıştır. Örneklerin 27 adedi kendi özel ambalajları içerisindeki yabancı patentli şampuanlardır. Bu şampuanların 20 adedi ABD, İngiltere, Fransa ve Hollanda'daki oteller için üretilmiş özel ambalajları içerisindeki örneklerdir. Diğer 7 örnek ise İstanbul piyasasında satılmakta olan Romen ve Bulgar malı şampuanlardır. Bu araştırmada toplam 96 adet şampuan örneği mikolojik yönden analiz edilmiştir. Çalışmalarımızda kullanılan şampuanların kaynakları tablo 1'de gösterilmiştir.

Şampuan örnekleri en az 10 mL olmak kaydı ile kendi özel kaplarında veya aseptik şartlar altında steril tüp veya erlenmayerlere alınarak en kısa süre içerisinde laboratuvarlarımıza getirilmiştir (4).

Örnek miktarı 20 mL'nin altındaki şampuanların yarısı, 20 mL ve üzerindeki muhteviyatın ise % 10 'u alınarak pH : 7 fosfat tamponu içerisinde sulandırılmaları yapılmıştır (4). Mikolojik analizler için Sabourand dekstroz agar, mısır unlu ve yulaf unlu agar besiyerleri ile şeker ve tuz konsantrasyonları arttırılmış modifiye şekilleri hazırlanmıştır (5,6,7). Ayrıca mısır unu agarı besiyerinin bir serisine % 0.5 Rose Bengal

ilavesi yapılmış şekli kullanılmıştır (8). Şampuanlarda bulunan floraya ait bakterilerin gelişimini engellemek amacıyla da besiyerlerine antibiyotik ilavesi yapılmıştır. Petri kutusundaki besiyerlerindeki son konsantrasyonu 30 ppm olmak üzere streptomisin sterilizasyondan sonra veya 50 ppm olmak üzere kloramfenikol sterilizasyondan önce ilave edilmiştir (5).

Dilasyonları hazırlanan şampuanların mikolojik amaçlı besiyerlerine yapılan ekimlerini takiben 22°C'lik etüvlerde küf mantarlarının gelişimi için 7 - 14 gün süreyle bekletilmişlerdir. Gelişimlerini tamamlayan küf mantarlarının deuteromycetes (tam olmayan üreme gösteren) veya ascomycetes (seksüel üreme gösteren) sınıfından küfler olduklarını saptamak için saf kültürleri hazırlanmıştır. Ayırımı yapılan ve saf kültür olarak üretilen küflerin tanılarını koymak amacıyla, laktofenol - pamuk mavisi ile hazırlanan lam - lamel arası preparasyonları Olympus HB marka ışık mikroskopunda 10X, 40X'lık objektiflerde incelenmiş ve resimleri çekilmiştir. Küflerin konidyal yapı özellikleri ise aynı mikroskopun immersiyon objektifinde daha önceden hazırlanan lam - lamel arası preparatların etrafı oje yardımıyla kapatıldıktan sonra incelenmiştir.

Ayırımı yapılan suşların, küf mantarların türlerine özel organları ile gelişim şekilleri ve petri kutularındaki morfolojik özelliklerine dayanılarak, literatürün ışığında tanıları konulmuştur (6,7,9 - 11).

Mikolojik amaçlı besiyerlerinde üreyen küf kolonilerinin sayımları yapılmıştır (12). Ayrıca şampuan örneklerinin pH'ları ölçülmüştür.

BULGULAR

Şampuan örneklerinden 162 adet mantar suşunun ayırımı yapılmıştır. Ayırımı yapılan ve tanısı konulan 143 adet küf mantarı ile 19 adet maya suşunun türlere göre dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir. Şampuanlarda fungal kirlilik olarak 26 türe ait küf türünün tanısı konulmuştur. Tanısı konulan suşların 86 adedi aspergillus cinsi ve ascomycetes sınıfından yakın akrabalarına aittir. Bunu 32 suşla cladosporium cinsi ve 17 suşla penicillium cinsi ile yakın akrabaları izlenmiştir. Tablo 3'de şampuanlardan ayırımı yapılan baskın küf florasının dağılımı verilmiştir. Şampuan örneklerinden ayırımı yapılan 143 suş içerisinde baskın küf mantarı olarak 32 suş ile % 22.4 oranında *A. niger* birinci, 31 suş ve % 21.7'lik bulunma sıklığı ile cladosporium cinsine ait suşlar ikinci sırada görülmüştür Tablo 3. Uzun dallı kondiyoforları, makro ve mikro ko-

nidyası ile karakterize olan cladosporiumlar Resim 2'de görülmektedir. Anamorfik ve teleomorfik karakterli aspergillus cinsine ait türler 11 adettir. Deuteromycetes sınıfına ait aspergilluslar *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* olmak üzere 4 tür ve bu türlere ait 62 suş olarak bulunmuştur. Tam üreme gösteren teleomorfik karakterli ascomycetes sınıfına ait aspergilluslar *A. glaucus* cins grubu içerisinde yer almışlardır. *A. glaucus* grubuna ait 24 adet suşun 7 türe ait olduğu saptanmıştır. Bu gruba ait suşlar içerisinde ask keselerinin taşındığı kleistotesyası ile karakterliktir. Resim 1'de *A. glaucus*'a ait bir kleistotesyum ile konidyal başlar ve konidyası görülmektedir.

Analizleri yapılan 96 şampuan örneğinin 26 (% 27,1) adedi mikolojik açıdan temiz bulunmuştur. Örneklerin 70'inde (% 72,9) mikolojik kirlilik saptanmıştır. Yurt dışındaki firmalarda üretilmiş 27 örneğin Amerika, İngiltere, Fransa ve Hollanda'dan gelenleri mikolojik açıdan temiz bulunmuştur. İstanbul'daki açık marketlerden alınan Romen ve Bulgar malı 7 örneğin küf mantarları ile kirlenmiş olduğu görülmüştür. Yerli üretici firmalara ait 69 örnekten, evlerden toplanmış 57 örneğin (% 5,27), oteller için özel üretilmiş 12 örneğin (% 25) ile yabancı firmalara ait 27 örneğin evlerden toplanmış 5 adedi (% 53,3) ve oteller için kapalı ambalajındaki özel ürünlerin (% 100) mikolojik açıdan temiz bulunmuştur.

Oteller için üretilmiş özel, kapalı ambalajları içerisindeki şampuan örneklerinin tamamında herhangi bir mikolojik kirlilik saptanmamıştır.

Şampuan örneklerinden ayırım yapılan küfler arasında *Aspergillus niger* 32 örnekte saptanarak % 33,3'lük bulunma sıklığı ile birinci, 31 örnekte görülen % 32,3'lük bulunma sıklığına sahip *cladosporium* türleri ise ikinci sırayı almışlardır, sonuçlar Tablo 4'de izlenmektedir. *Cladosporium*ların makro ve mikro konidyal yapıları Resim 2'de görülmektedir.

Besiyerlerinde gelişimlerini tamamlayan küf kolonilerinin sayımı yapılmış ve örneklerde en az 200 kob / ml en fazla 1100 kob / ml küf sporu sayılmıştır. Örneklerin pH'sı 6.5 ile 8.7 arasında değişkenlik göstermiştir. Mikolojik açıdan temiz bulunan örneklerin pH'sı 7.7 ile 8.7 arasında değişmektedir.

Tablo 1 : Mikolojik analizlerde kullanılan şampuan örneklerinin alındığı ve üretim yapıldığı kaynaklar ile örnek sayıları

Şampuan örnekleri	Yerli Üretim	Yabancı Üretim	Ara Toplam
Evlerden alınan şampuanlar	57	15	72
Oteller için özel üretilmiş şampuanlar	12	12	24
Toplam	69	27	96

Tablo 2 : Şampuanlardan ayırımı ve tanısı yapılan mantarlar

Ayırımı yapılan mantar suşları	Toplam	
Aspergillus glaucus grubu (Asc)*		24
A.amstelodami	6	
A.chevalieri var. intermedius	2	
A.echinulatus	2	
A.repens (Eurotium herbarium)	2	
A.ruber	8	
A.pseudoglaucus	2	
A.tonophilus	2	
Aspergillus türleri (Deu)**		62
A.flavus	17	
A.fumigatus	10	
A.niger	32	
A.terreus	3	
Cladosporium türleri (Deu)		31
Cla.cladosporides	10	
Cla.cucumerinum	1	
Cla.echinulatum	2	
Cla.herbarium	3	
Cla.macrocarpum	6	
Cla.sphaerospermum	9	
Penicillium türleri (Deu)		11
P.chrysogenum	5	
P.frequentans	2	
P.paraherquei	3	
P.verrucosum var. cyclopium	1	
Penicillium akrabaları (Asc)		6
Eupenicillium lapidosum	1	
Talaromyces flavus	2	
T.helicus var. flavus	3	
Diğer türler (Deu)		9
Phoma	1	
Wallemia sebi	8	
ARA TOPLAM	143	143
Maya		19
Toplam		162

(*) : Asc: Ascomycetes sınıfı; eşeyli üreme gösteren küf mantarları

(**) : Deu: Deuteromycetes sınıfı; tam olmayan, Fungi Imperfecti, aseksüel üreme gösteren suşlar

Tablo 3 : Şampuanlardan ayırımı yapılan baskın küf florasının dağılımı

Florada ayırımı yapılan baskın küf cinsleri	Bulunma Sıklığı	
	Suş Sayısı	%
Aspergillus cinsi ve yakın akrabalar	86	60.1
Penicillium cinsi ve yakın akrabalar	17	11.9
Cladosporium cinsi	31	21.7
Diğerleri	9	6.3
Toplam	143	100

Tablo 4 : Şampuanlardaki kirlilik nedeni baskın küf suşlarının örneklerde bulunma sıklığı

Baskın Küf suşları	Bulunma Sıklığı	
	Örnek Sayısı	%
A. glaucus	24	25
A. fumigatus	10	10.4
A. niger	32	33.3
A. flavus	17	17.7
Cladosporium türleri	31	32.3

Tablo 5 : Mikolojik analizleri yapılan şampuan örneklerinin alındıkları kaynaklarına ve üretim yerlerine göre elde edilen sonuçlar ve istatistik değerlendirilmesi

Şampuan örneklerinin kaynakları	Mikolojik Analiz Sonuçları								Mikolojik Analizleri Yapılan Örnek Sayısı
	Üretim Kaynağı						Ara Toplam		
	Yerli Üretim			Yabancı Üretim			Örnek Sayısı		
	T*	K**	A.Top	T	K	A.Top	T	K	
Evlerden alınan şampuanlar	3 (5.27)	54 (94.73)	57 (100)	8 (53.3)	7 (46.7)	15 (100)	11 (15.3)	61 (84.7)	72
Oteller için özel üretilmiş şampuanlar	3 (25)	9 (75)	12 (100)	12 (100)	0 (0)	12 (100)	15 (62.5)	9 (37.5)	24
TOPLAM	6 (8.7) [6.3]	63 (91.3) [65.6]	69 (100) 0	20 (74.1) [20.8]	7 (25.9) [7.3]	27 (100) 0	26 (27.1)	70 (72.9)	96

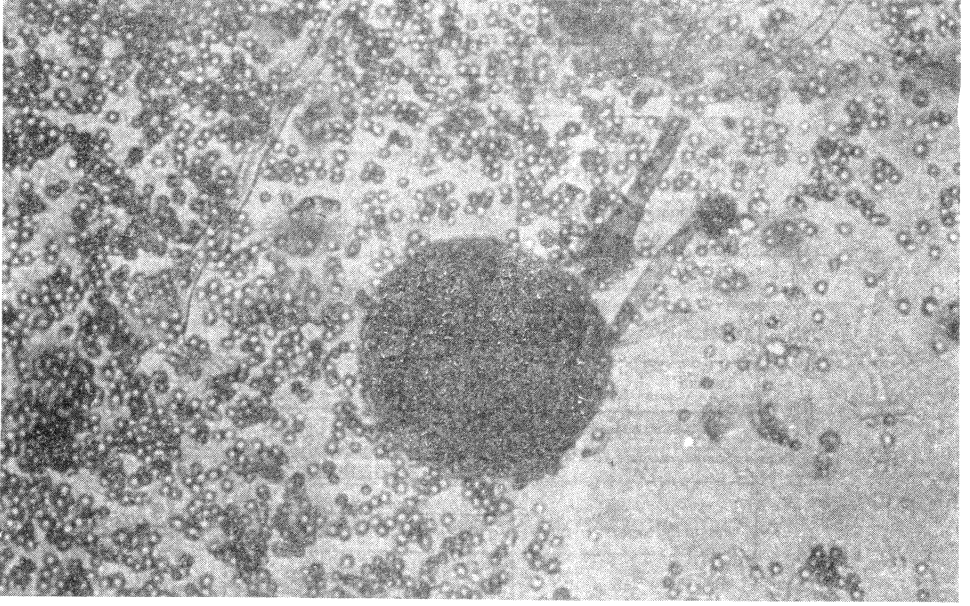
(*) T : Mikolojik açıdan temiz bulunmuş örnekler

(**) K : Mikolojik açıdan kirlili bulunmuş örnekler

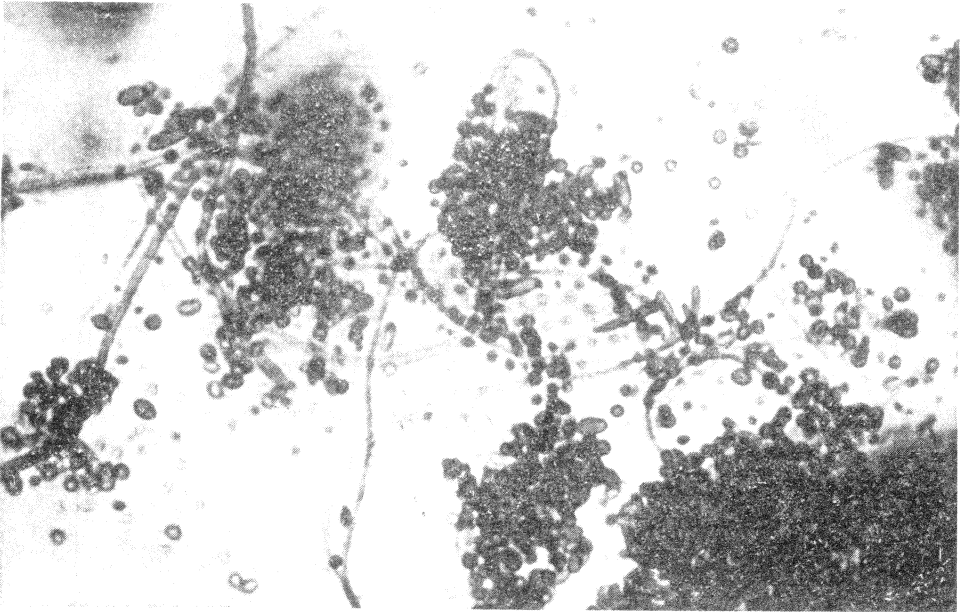
() : İçerisindeki değerler, verilerin kendi grupları içerisindeki % değerleridir.

[] : Sonuçların ürünlerin tamamı içerisindeki % değerleridir.

A.Top. : Kendi grupları içerisindeki sorunların ara toplamı



Resim - 1 : *Aspergillus glaucus* grubu mantarlara ait bir özellik olan ask keselerini içersinde taşıyan bir kleistotesyum ile iki adet iri konidyal baş ve konidyasının ışık mikroskobu (10 x büyütme) fotoğraf



Resim - 2 : *Cladosporium* türlerine özel uzun dalı konidyoforları ile maro ve mikro konidyasının ışık mikroskobu (10 x büyütme) fotoğrafı.

TARTIŞMA

Küf mantarların başlıca hava ve toprak kaynaklı olanları dünya dominantı olma özellikleriyle hemen her yerde ve her tip malzemenin üzerinde bulunur ve yaşamlarını sürdürürler. Özellikle yüksek ısıya dayanıklı termofilik ve kuruluğa dirençli kserofilik suşlarla, bu tip ortamlara uyum gösteren termotolerant ve kserotolerant küfler hemen her tip materyalden ayrılarak tanımlanmıştır (6,7,10,11). Şampuan üretiminde en önemli kontaminasyon kaynaklarından birisi olarak endüstride kullanılan temizlik amaçlı su ile imallatta kullanılan ham su gösterilebilir (12). İmalatta filtre edilmeyen, arıtılmadan kullanılan ve üzerinde sanitasyon işlemleri uygulanmayan suyun kullanımı her zaman kötü sonuçlar doğurur. Bu yüzden kozmetik endüstride kullanılacak suyun farmasötik amaçlı olması gerekmektedir (13). Endüstriyel üretim için şehir şebekesinden sağlanan su, önce depolanmalı ve daha sonra sırasıyla kum filtreler, por çapı 10 µm olan ön filtreler, iyon değiştirici reçineler bunu takiben, por çapı 0,45 -0,8 µm olan filtrelerden oluşan bir arıtıcı sistemler zincirinden süzülmesi ve ara bekleme tanklarında 8 saatten fazla bekletilmemelidir. Bekleme süresinde havalandırma yapılmalı ve sisteme hava 0,45 µm por çaplı filtrelerden süzülerek verilmelidir. Ara bekleme yapılmadan kullanılacak durumlarda filtre edilen su distillenmeli ve tekrar dinlenme tankına alınmalıdır. Bu esnada yukarıdaki kurallar aynen geçerlidir. Bu su en geç 8 saat üzerinde tüketilecek şekilde kullanılmalıdır (13).

Kozmetik endüstrisinde imalat ortamının havası, daima kontrol edilmelidir. İşlemlerin yürütüldüğü, alanlara havanın filtre edilerek verilmesi sanitasyonu olumlu yönde etkileyecektir. Bilindiği gibi hava içerdiği toz partikülleri üzerinde çeşitli mikroorganizmalar taşır. Dolayısıyla havanın kendisi mikrobiyal kontaminasyon kaynaklarından birisidir (14). Hava kaynaklı mikroorganizmalar arasında ilk sırayı küf mantarları almaktadır. Hava ile taşınan küfler daha çok konidyal mantarlar olarak bilinmektedir. Konidyal yapılar uygun koşullarda üzerinde buldukları materyalde gelişimlerini tamamlar. Daha sonra ürünün tamamını kullanılamaz bir hale getirirler. Çeşitli farmasötik ve kozmetik ürünler için katkı maddesi olarak kullanılan değişik tip ham maddeler bu küf mantarları tarafından istila edilirler (2,15 - 17). Küf mantarları istila ettikleri ürünler üzerinde zaman zaman sekonder metabolitleri olan mikrotoksinlerini üretirler (8). Bu nedenle çalışılan ortamın havası

mikrobiyolojik olarak kontrol edilmelidir. Gerekli görülen hallerde havanın bir gaz ile dezenfekte edilmesi sağlanmalıdır (18). İmalat alanının girişi ve çıkışları çift düzenekli kapılarla olmalı, dış ortamın havası doğrudan imalat bölümüne girmemelidir. Ayrıca yerlerin devamlı olarak temizliği sağlanmalıdır. Bunun için ıslak temizlik uygulanmalıdır. Temizlik malzemeleri ve aletleri ayrı bir yerde ve kapalı bölmelerde saklanmalıdır. Islak temizlik uygulanırken temizlik suyuna bir dezenfektan katılması şiddetle tavsiye edilir(14 - 18).

Şampuanlarda diğer kozmetikler gibi sağlıklı ve normal bir kişinin saçına uygulanmakta, dolayısıyla da saçlı deri bu ürünlerle doğrudan temas etmektedir. Çok zayıf bir ihtimal olsa bile, çevremizdeki alışılmış mikrobiyal kirlilikler bu çember içerisinde herhangi bir hastalığın nedeni olarak karşımıza çıkabilirler.

Değişik ham ve ana madde içeren şampuanlar, hazırlanışları esnasında bu maddelerin mikrobiyal içeriğinden etkilenirler. Sonradan ilave edilen koruyucular kısmen mikroorganizmaların gelişimini inhibe etseler bile sidal etki gösteremezler.

Topik uygulanan ve deriye zarar vermeyen ilaçlar ve kozmetikler farmasötik ürünlerin mikrobiyolojik içerikleri açısından değerlendirildiklerinde 3. kategoriye girerler. Gay (19)'a göre 3. kategorideki bir son ürünün gramında < 10.000 aerop bakteri, < 100 küf ve maya bulunmasına izin verilirken enterobacteriaceae'ye ait türlerin ve toksin üreten veya halk sağlığı açısından önemi bulunan pseudomonas gibi mikroorganizmaların bulunması istenmez. Bu nedenle üretim süreci içerisinde imalatın tipine bağlı olarak kesikli üretim yapılıyorsa periyodik olarak her işlem bitiminde, sürekli üretim yapılıyorsa düzenli bir şekilde belirli aralıklarla örnek alınarak germ sayımı ve cins tanısı yapılmalıdır (12, 15, 19).

Farmasötik ve kozmetik ürünlerin gramında veya 10 ml'sinde < 100 küf mantarı veya maya bulunmasına izin verilmektedir (14,19). Bu normlar 70'li yıllarda konulmuştur. Özellikle mikoloji alanında, küflerin toksinleri, allerjik etkileri üzerindeki çalışmalar 70'li yıllardan sonra hızla artış göstermiştir. Bugün artık küflerin saprofit olmaktan uzak olduklarını ve büyük bir çoğunluğunun fırsatçı, bir kısmında patojen olduğunu biliyoruz (6,7,15,20). Bu durumda hangi küf mantarların hangi miktarda bulunması ve ayrıca mayalar içinde aynı varsayımlardan hareketle han-

gilerinin bulunmaması gerektiğine dair yeni standartların hazırlanması şarttır. Türk Standartları Enstitüsü kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik analizleri için hazırladığı normda patojen bakterilerin saptanabilmesi için testler ve canlı mikroorganizma sayımını önermektedir (21). Mantarlar için sayım yapılmasını ve *C. albicans* tanısını istemektedir. Diğer birçok mayanında en az *C. albicans* kadar ürünlerde bulunması hem ürün-deki kirlilik nedeni hem de kullanan kişinin sağlığı açısından önemlidir ve bulunmaları istenmez. TSE bu konuda herhangi bir yaptırım getirmemiştir. Ayrıca küf mantarı sayımı istenmesine rağmen, sayıları hakkında bir sınır yoktur. Küfler hakkında son derece geniş bilgilere sahip olduğumuz bugün artık ülkemiz standartları içerisinde küfler için yeni normların hazırlanması şarttır. Yapılan bir çalışmada şampuan örneklerindeki fungal kontaminasyonun örneklerin ml'sinde 100 'den az olduğu saptanmıştır. Buna neden olarak, şampuanların 7.2 ile 9 arasında alkali bir pH'ya sahip olmalarından dolayı mantar kontaminasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir (22). Ergun ve ark. ları (23) yaptıkları bir çalışmada ise şampuan örneklerinden enterobacter, *E. coli*, *P. aeurogenosa* ve *S. aureus* gibi patojen bakteriler ayırmışlardır, bu çalışmada mikolojik kirlilik incelenmemiştir.

Şampuanların bir kısmı, bitki özü gibi doğal katkıları içermektedir. Ürüne bu tip katkıları ilave edilirken sanitasyon kurallarına çok dikkat etmek gerekir. Aksi taktirde mikroorganizmalar bu tip ürünlere bulaşarak ürünün tamamını istila eder ve kullanılmaz bir hale getirirler.

Kozmetik ürünlerin içerlerine konuldukları ambalaj materyalinin de dezenfekte edilmesi ve kullanım süreci içerisinde dış ortamdan herhangi bir kirliliği içine sızdırmaması şartı aranmalıdır.

Şampuan gibi büyük kazanlarda ve çok fazla miktarlarda üretilen ürünlerin, üretim süreci içerisinde kontamine olmasını engellemek için kullanılan suyun kalitesi ve çalışma ortamının havasının kontrolünün yanı sıra, çalışan personelin eğitimi ve kullanılan aletlerin temizliği çok önemlidir. Üretim sürecinde kullanılan aletlerin özellikle paslanmaz çelikten yapılmış yekpare kazanlar olması ve diğer malzemenin aynı yapısal özelliklere sahip olması şartı aranmalıdır. Bu aletler zaman zaman temizlenmeli ve herhangi bir mikrobiyal kirlenme riskine karşı dezenfekte edilmelidir.

Üretim sürecinde çalışan personelin ürünü kontamine etme riskini

ortadan kaldırmak için, hizmet içi eğitim programları hazırlanmalı ve personel bu konuda bilinçlendirilmelidir. Personelin kullandığı dış giysilerin özellikle ayakkabıların üretim alanında kullanılmasının mikrobiyal kontaminasyonu artıran önemli birer faktör oldukları gösterilmiştir (15).

Çalışmamızda ürünlerin % 72.9 'unda küf mantarı kontaminasyonu saptanmıştır. Tablo 5'de evlerden alınan yerli üretim örneklerinin % 94.73 'ünün, oteller için üretilen şampuanların % 75'inin, yabancı ürünlerin sadece evlerden toplananlarının % 46.7 'sinin küflerle kirlenmiş olduğu görülmektedir. Bu oldukça yüksek bir kirlilik oranıdır. Mikolojik açıdan bir kirlilik saptanmamış örneklerin pH'larının 7.7 ile 8.7 arasında değiştiği görülmüştür. Alkali pH'larda küf mantarı gelişiminin inhibe olduğu düşünülmektedir. Küf mantarları tarafından tamamen kontamine olmuş ürünlerin pH'sının 6.7 - 7.7 arasında bulunduğu, bu aralıkta küf gelişimini engellemediği görülmüştür. Yurtdışından sağlanan ve oteller için özel üretilmiş ağızları kapalı ürünlerin mikolojik açıdan temiz bulunmuş olanlarının pH'sının alkali oldukları saptanmıştır. Kirli bulunan Bulgar ve Romen malı ürünlerin pH'ları 6.5 civarındadır. Fassihi (24), ilaç ve kozmetik ürünlerdeki pH aralığının 4 - 9 arasında değişmesine rağmen mikroorganizmaların gelişimlerini sürdürmeye devam ettiklerini veya canlı kalabildiklerini bildirmiştir. Ayrıca çalışmamızda mantarlarla aşırı kirlenmiş bulunan bu ürünlerin fason mallar olduğu ve ambalajlarının açık olduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda ayırımı ve tanısı yapılan Deuteromycetes sınıfının birer üyesi olan *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* ve *A. terreus* türleri ile Ascomycetes sınıfına ait olan *A. glaucus* cins grubuna ait suşların fırsatçı patojen suşlar oldukları ve insanda çeşitli tipte allejilerin nedeni oldukları bilinmektedir (6,7,25). Bizim çalışmamızda bu Aspergilluslara ait toplam 86 suş izole edilmiştir. Bu suşların ayırımı yapılan floradaki bulunma sıklığı % 60.1 'dir. Tanımlanan suşlar içerisinde baskın flora olarak saptanan aspergillus cinsleri içerisinde baskın tür olarak, örneklerin % 33.3 'ünde görülmesiyle *A. niger* birinci sırayı almıştır. Hava kaynaklı küf mantarları arasında dünyanın hemen her yerinde bulunması ile tanıma aspergillus ve penicillum cinslerinin hemen yanısıra cladosporium cinsine ait türleri görmekteyiz. Dünya dominantı olarak bilinen cladosporium'lar taksonomik olarak değerlendirmede deuteromycetes sınıfı içinde yer alırlar. Bu küfler bir renk maddesi olan ve virulans faktörü olarak gösterilen melanin maddesi üreticisidirler (26). Ürettikleri koyu nefli ye-

şil, koyu kahve, yağlı yeşil kahve, siyahi kahve ve siyah renklerinden dolayı bu küfler ayrıca dematiaceous küfler arasında değerlendirilirler. Çalışılan ortamda bu dematiaceous'lara ait küflerin bulunmasının gecikmiş tipte aşırı duyarlılığa sebep olduğu gösterilmiştir (26). Bizim, araştırmamızda şampuanların mikotik florası içerisinde dematiaceous mantarlarından, 31 adet cladosporium türleri ile phoma cinsine ait 1 tür saptanmıştır. Bu tip suşların örneklerde bulunma yüzdesi 33.3 'dür. Bu veri bize çalışma ortamının hava ve toprak kaynaklı olan bu mantarlarla yoğun bir kirlilik içerisinde olduğunu göstermektedir.

Haricen kullanılan ve deriye zarar vermeyen 3. kategori içersine alınan farmasötik ve kozmetik preparatlarda steril olma şartı aranmaktadır. Bu nedenle birçok araştırmacı yaptıkları çalışmalarda farmasötik ve kozmetik ürünlerdeki mikrobiyal kirliliğin kaynaklarını göstermişlerdir (1,2,12,16,27). Üretimde kullanılan ham maddelerin ve üretimden çıkan steril olma zorunluluğu bulunmayan preparatlar insan sağlığı için zarar vermeyecek bir sınırdaki saprofit mikroorganizma içermesine izin verilir. Ham maddeler üretim süreci içerisinde kullanılan alet - edavat, su ve paketlenme materyalinin yanı sıra ortamın havası ve çalışan personelden etkilenmekte ve kolayca kontamine olabilmektedir. Ürünlerin içersine kondukları ambalaj malzemesinin mikrobiyolojik açıdan kalitesi oldukça önemlidir. Kullanılan ambalajların herhangi bir mikrobiyal kirlilik taşımaması istenir. Ayrıca bu tip malzemelerinde depolama ve kullanma süreçleri içerisinde kontamine olabilecekleri gözönünde bulundurulmalı ve seçimler bu doğrultuda yapılmalıdır (28). Ürünlerde asla bulunması istenmeyen zararlı mikroorganizmalar USP XX ' de bir liste halinde verilmiştir. Sonuç olarak, bugüne kadar yapılmış olan çalışmalarda her bir üreticinin ürettiği ürünün tipine ve üretim şekline uygun olarak ürünlerdeki mikrobiyal yükü azaltıcı ve kontrol edici yöntemleri geliştirmesi, sanitasyon ve hijyen kurallarına uyulması için hizmetiçi eğitimi vermesi ve bazı yaptırımlar koymaları gerektiği bildirilmiştir (1,3,14,18,27).

Yalnız unutulmaması gereken bir konuda tüketicinin de ürünü kullanma süreci içerisinde mikrobiyal açıdan kirletmesidir. Ürünleri kullanan kişiler elleriyle, ürünü temas ettirdiği diğer yüzeylerle, ürünün ağzının açık bırakılmasıyla veya özel saklanması gereken durumlarda bu kurallara dikkat etmemesi durumunda son ürün içerisindeki koruyuculara rağmen derhal mikroorganizmalar tarafından işgal edilir ve kulla-

nılmazbir hale gelir. Bu şartlar altında üretilen bütün ürünlerin steril hazırlanması ve son ürününde steril olması gerekmez. İnsan doğası kendine özgü bir mikroflora içermekte ve yaşadığı ortamdan bu flora etkilenmektedir. Bu etkileşim içerisinde önemli olan üretilen ve tüketime sunulan ürünlerin insan sağlığını tehdit etmemesidir.

KAYNAKLAR

1. Baird, R. M., Crowden, C. A., O. Farrel, S. M., Shooter, R. A. : *J. Hyg.*, **83** (2), 277 (1979).
2. Butler, N.J. : In, *Biodeteriation of Materials*, Walters A. H., Elphich, J. J. (eds). Elsevier Publishing Co. Ltd., London, p. 269 (1968).
3. Smart, R., Spooner, D. F. : *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **23**, 721 (1972).
4. *European Pharmacopoeia (EPI)* 1970, Vol. 2 (1971).
5. Gams, W., van der, Aa, H. A., van der, Plaats - Niternik, A. J., Samson, R. A., Stalpers, J. A. : *CBS Course of Mycology*. 2nd ed. Drukkerij "Erla" Amsterdam - Zuid (1980).
6. Raper, K. B., Fennel, D. I. : *The Genus Apregillus*, Robert E. Krieger Publishing Co. Inc, New York (1980).
7. Samson, R. A., Hoekstra, E.S., van Oorshot, C. A. N. : *Introduction to Food - borne fungi*. CBS, Baarn (1981).
8. Hocking, A. D., Pitt, J. I. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **39** (3), 488 (1980).
9. Samson, R. A., Stolk, A. C., Hadlok, R. : *Revision of the Subsection Fasciculata of Penicillium and Some Allied Species*, CBS Baarn (1976).
10. Stolk, A. C., Samson, R. A. : *The Genus Talaromyces. Studies on Talaromyces and Related Genera II*, CBS, Baarn (1972).
11. Stolk, A. C., Samson, R. A. : *The Ascomycete Genus Eupenicillium and Related Penicillium Anamorphs*, CBS, Baarn (1972).
12. Scott, H. M. G. : *J. Soc. Cosmet. Cem.*, **24**, 65 (1973).
13. Vogt, R. : *Water For Pharmaceutical Use. A Potential Application For Filtration Systems*. Sartorius GmbH, Göttingen, West Germany, January (1988).
14. Bühlman, X : *Pharm. Acta Helv.*, **46**, 385 (1971).
15. Bühlmanh, X., Gray, M., Havert, W., Hecker, W., Sackman, W., Schiller, I : *Pharm - Ind.*, **3**, 582, (1972).
16. Gerald, C. L., Ludson, C. J., James, E. G., Thomas, E : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63** (3), 622 (1980).
17. Van Doorne, H. : *Interactions Between Microorganisms and Some Compenents of Pharmaceutical Preparations*. Drukkerij J. H. Palmans, S. Gravenhage (1977).
18. Sharpell, F., Manowitz : In, *Disinfection, Sterilization and Preservation*, Black, S. S., (ed) 4 th. edition, Lea and Febiger Philadelphia, London, p. 887 (1991).
19. Gay, M. : *Document de Travail Pour Une Séahce à l'oms*. Geneve, Avril (1969).
20. Cole, T. G., Samson, R. A. : In, *Moudy Allergy*, Al - Doory, Y., Domson, F. J. (eds), Lea and Febiger, Philadelphia, p. 67 (1984).
21. Türk Standartları : *Kozmetiklerin Mikrobiyolojik Test Metodları*. Birinci Baskı, UDK 668585:4, TS 4767, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara, 1986.

22. Abdelaziz, A. A., Ashour, M. S., Hefni, H., el - Tayeb, O. M. : *J. Clin. Pharma. Therm.*, **14** (1), 29 (1989).
23. Ergun, H., Tuncer, I., Şengil A. Z., Kırca, N. K. : *Mikrobiyol. Bült.*, **21** (4); 301 (1987).
24. Fassihi, R. A. : In, *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4 th. edition, S. S. Block (ed) Lea and Febiger, Philadelphia, London, p. 871 (1991).
25. Rippon, J. W. : *Medical Mycology*. p. 499, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London. Toronto (1974).
26. Dixon, D. M., Polak - Wyss, A. : *Mycoses*, **34**, 1 (1991).
27. Braid, R. M. : *Pharm. J.*, **234**, 54 (1985).
28. Hughes, R. H. : In, *Biodeteration of materials*, Walters, A. H., Elphick, J. J. (eds), Elsevier Publishing Co. Ltd., London, p. 281 (1968).