



TÜRK STANDARDI

TURKISH STANDARD

TS EN ISO 9308-1
Nisan 2004

ICS

SU KALİTESİ - ESCHERİCHİA COLİ VE KOLİFORM BAKTERİLERİN TESPİTİ VE SAYIMI - BÖLÜM 1: MEMBRANLA SÜZME YÖNTEMİ

Water quality- Detection and enumeration of Escherichia coli
and coliform bacteria Part-1 Membran filtration method

TÜRK STANDARDLARI ENSTİTÜSÜ
Necatibey Caddesi No.112 Bakanlıklar/ANKARA

TÜRK STANDARDLARININ YAYIN HAKLARI SAKLIDIR.

- Bugünkü teknik ve uygulamaya dayanılarak hazırlanmış olan bu standardın, zamanla ortaya çıkacak gelişme ve değişikliklere uydurulması mümkün olduğundan ilgililerin yayınları izlemelerini ve standardın uygulanmasında karşılaştıkları aksaklıkları Enstitümüze iletmelerini rica ederiz.
- Bu standardı oluşturan Hazırlık Grubu üyesi değerli uzmanların emeklerini; tasarımlar üzerinde görüşlerini bildirmek suretiyle yardımcı olan bilim, kamu ve özel sektör kuruluşları ile kişilerin değerli katkılarını şükranla anarız.



Kalite Sistem Belgesi

imalât ve hizmet sektörlerinde faaliyet gösteren kuruluşların sistemlerini TS EN ISO 9000 Kalite Standardlarına uygun olarak kurmaları durumunda TSE tarafından verilen belgedir.



Türk Standardlarına Uygunluk Markası (TSE Markası)

TSE Markası, üzerine veya ambalajına konulduğu malların veya hizmetin ilgili Türk Standardına uygun olduğunu ve mamulle veya hizmetle ilgili bir problem ortaya çıktığında Türk Standardları Enstitüsü'nün garantisi altında olduğunu ifade eder.

TSEK

Kalite Uygunluk Markası (TSEK Markası)

TSEK Markası, üzerine veya ambalajına konulduğu malların veya hizmetin henüz Türk Standardı olmadığından ilgili milletlerarası veya diğer ülkelerin standardlarına veya Enstitü tarafından kabul edilen teknik özelliklere uygun olduğunu ve mamulle veya hizmetle ilgili bir problem ortaya çıktığında Türk Standardları Enstitüsü'nün garantisi altında olduğunu ifade eder.

DİKKAT!

TS işareti ve yanında yer alan sayı tek başına iken (TS 4600 gibi), mamulün Türk Standardına uygun üretildiğine dair üreticinin beyanını ifade eder. **Türk Standardları Enstitüsü tarafından herhangi bir garanti söz konusu değildir.**

Standartlar ve standardizasyon konusunda daha geniş bilgi Enstitümüzden sağlanabilir.

TÜRK STANDARDLARININ YAYIN HAKLARI SAKLIDIR.

Ön söz

- Bu Standard, CEN tarafından kabul edilen EN ISO 9308-1(2000) standardı esas alınarak, TSE Çevre Hazırlık Grubu'nca hazırlanmış ve TSE Teknik Kurulu'nun 26 Nisan 2004 tarihli toplantısında Türk Standardı olarak kabul edilerek yayımına karar verilmiştir.

İçindekiler

0	Giriş	1
1	Kapsam	1
2	Atıf yapılan standard ve/veya dokümanlar	1
3	Terimler ve tarifler	2
3.1	Laktoz pozitif bakteriler, (standard deney)	2
3.2	Koliform bakteriler, (standard deney).....	2
3.3	<i>Escherichia coli</i> , (standard deney).....	2
3.4	<i>Escherichia coli</i> , (hızlı deney).....	2
4	Prensip	2
4.1	Yöntemin genel tanımı	2
4.2	Süzme ve inkübasyon.....	2
4.3	Doğrulama ve değerlendirme, (standard deney).....	3
4.4	Doğrulama ve değerlendirme, (hızlı deney)	3
5	Cihazlar ve cam malzeme	3
6	Kültür besiyeri ve reaktifler	4
7	Numune alma	4
8	İşlem	4
8.1	Numunenin hazırlanması	4
8.2	Süzme.....	4
8.3	İnkübasyon ve ayırma.....	4
8.4	İnkübasyon ve ayırma.....	5
9	Sonuçların gösterilmesi	5
10	Deney raporu	5
11	Kalite güvencesi	5
Ek A	(Bilgi için) Koliform bakteriler hakkında daha fazla mikrobiyolojik bilgi	6
Ek B	Kültür besiyerleri ve reaktifler	7
Ek ZA	Bu standardda atıf yapılan uluslar arası standard ve/veya dokümanlara karşılık gelen Avrupa standartları	10
Kaynaklar	11

Su kalitesi - *Escherichia coli* ve koliform bakterilerin tespiti ve sayımı - Bölüm 1: Membranla süzme yöntemi

0 Giriş

Fekal kirliliğin varlığı ve derecesi, bir su kütlesinin kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bir faktördür ve enfeksiyon nedeniyle insan sağlığı için tehlike oluşturur. Su numunelerinin, normalde insan ve diğer sıcak kanlı hayvanların bağırsaklarında yaşayan *Escherichia coli* mevcudiyeti bakımından analiz edilmesi, böyle bir kirliliğin varlığını gösterir. Bazı koliform bakteriler sadece bağırsaklarda değil, toprak içerisinde ve tatlı su yüzeyinde yaşadığından, koliform bakteriler için yapılan analizlerin yorumlanması daha zor olabilir. Bu nedenle koliform bakterilerin varlığı her ne kadar fekal kirliliğin bir kanıtı değilse de arıtma veya dağıtımdaki bir arızanın göstergesi olabilir, izole edilen türlerin tanımlanması bazen bu türlerin orijinleri hakkında bir fikir verebilir.

1 Kapsam

Bu standard, insanların tüketimine verilen suda *Escherichia coli* ve koliform bakterilerin tayini ve sayımı için bir referans yöntemi (standard deney) kapsar. Standard deney, membran süzme işleminden sonra ayırt edici bir agar besiyerinde kültür yapılmasına ve numunedeki hedef organizmaların sayısının hesaplanmasına dayanır.

Standard deney, hasarlı bakterilerin tayinine izin veren düşük bir seçiciliğe sahiptir. Düşük seçiciliği nedeniyle, dezenfekte edilmemiş ve yüksek bir istenmeyen gelişme verimine sahip sığ kuyu suları gibi bazı içme sularında, istenmeyen gelişme, *E.coli* ve koliform bakterilerin gerçek sayısı üzerinde bozucu etkiye sebep olabilir. Bu nedenle bu standard özellikle, dezenfekte edilmiş sular ve bakteri sayısı düşük diğer sular için uygundur.

Bu standard, bilgiye süratle ihtiyaç duyulan özel durumlarda faydalı olabilecek, insan tüketimine verilen suda, yalnızca 24 saat içerisinde *E.coli* tayini için hızlı bir yöntemi de (hızlı deney) ihtiva eder. Hızlı deney, membran süzme işleminden sonra seçici şartlar altında kültür yapılmasına ve numunedeki *E.coli* sayısının hesaplanmasına dayanır.

Bu standarddaki hızlı ve standard deneyler, askıda katı madde veya istenmeyen floranın süzme, kültür ve sayım üzerinde bozucu etki yapmamasının sağlanması kaydıyla diğer çeşit sulara da uygulanabilir.

2 Atıf yapılan standard ve/veya dokümanlar

Bu standardda, tarih belirtilerek veya belirtilmeksizin diğer standard ve/veya dokümanlara atıf yapılmaktadır. Bu atıflar metin içerisinde uygun yerlerde belirtilmiş ve aşağıda liste halinde verilmiştir. Tarih belirtilen atıflarda daha sonra yapılan tadil veya revizyonlar, atıf yapan bu standardda da tadil veya revizyon yapılması şartı ile uygulanır. Atıf yapılan standard ve/veya dokümanın tarihinin belirtilmemesi halinde en son baskısı kullanılır.

EN, ISO IEC vb No	Adı (İngilizce)	TS No ¹⁾	Adı (Türkçe)
ISO/IEC Guide 2	Standardization and related activities	-	-
ISO 3696:1987	Water for analytical laboratory use- Specification and test methods	TS EN ISO 3696	Su - Analitik Laboratuvarında Kullanılan - Özellikler ve Deney Yöntemleri
ISO 5667-1:1980	Water quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes	TS 5089	Su Kalitesi - Numune Alma - Kısım 1: Numune Alma Programlarını Hazırlama Kuralları

TSE Notu : Atıf yapılan standartların TS numarası ve Türkçe adı 3. ve 4. kolonda verilmiştir.

EN, ISO IEC vb No	Adı (İngilizce)	TS No ¹⁾	Adı (Türkçe)
ISO 5667-2:1991	Water quality - Sampling - Part 2: Guidance on sampling techniques	TS 5090	Su Kalitesi - Numune Alma - Kısım 2: Numune Alma Teknikleri
180 5667-3:1994	Water quality - Sampling - Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples	TS5106	Su Kalitesi - Numune Alma Kısım 3 -Numunelerin Muhafaza ve Taşınma Kuralları
ISO 6887-1 :1999	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part: 1 General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.	TS 6235 EN ISO 6887-1	Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi- Deney Numunelerinin Başlangıç Süspansiyonunun ve Ondalık Seyreltilerinin Hazırlanması için Genel Kurallar
ISO 8199:1988	Water quality - General guide to the enumeration of micro-organisms by culture.	TS 9528	Su Kalitesi - Mikroorganizmaların Kültür Yoluyla Sayımı Genel Kurallar

3 Terimler ve tarifler

Bu standardın amaçları bakımından ISO/IEC Guide 2'de verilen terimler ve tariflere ilâve olarak, aşağıdaki terimler ve tarifler uygulanır.

3.1 Laktoz pozitif bakteriler, (standard deney)

Aerobik olarak (36±3) °C'da koloni olu şturabilen, seçici ve ayırmedici laktoz kültür besiyerinde (21 ±3) saat'te asit üretebilen bakteriler.

3.2 Koliform bakteriler, (standard deney)

Madde 3.1 de tanımlandığı gibi laktoz pozitif olan oksidaz negatif bakteriler.

3.3 *Escherichia coli*, (standard deney)

(44,0±0,5 °C'da (21 ±3) saat'te triptofandan indol üreten, Madde 3.2'de tanımlanan koliform bakteriler

3.4 *Escherichia coli*, (hızlı deney)

Safraya dirençli, aynı zamanda (44,0±0,5) °C'da (21 ±3) saat'te triptofandan indol üreten bakteriler.

4 Prensip

4.1 Yöntemin genel tanımı

Yöntem, aşağıda belirtildiği gibi paralel olarak çalışılabilen referans standard deney ve isteğe bağlı hızlı deney olmak üzere iki kısımdan oluşur ve membran süzme tekniğine dayanır. Standard deney, 2-3 gün içerisinde *E.coli* ve koliform bakterilerin tayin edilmesi ve sayılmasına imkan sağlayan membranın seçici besiyeri üzerinde inkübasyonu ile ardından ileri biyokimyasal özellik olarak tipik laktoz pozitif kolonilerin gelişmesini ihtiva eder. Hızlı deney (21±3) saatte *E.coli* nin tayinine ve sayımına izin veren iki inkübasyon basamağından oluşur. Standard deney ve hızlı deneyin her ikisi de paralel şekilde yürütülürse, *E.coli* için nihaî sonuç olarak bu iki deneyin sonuçlarından değeri yüksek olanı alınır.

4.2 Süzme ve inkübasyon

Numunenin deney kısımları bakterileri tutan membranlardan süzülür. Bir membran (standard deney) (36±2) °C'da (21±3) saat inkübe edilmek üzere bir seçici laktoz agar besiyeri üzerine yerleştirilir ve bir membran da (hızlı deney) (36±2) °C'da 4 saat - 5 saat inkübe edilmek üzere bir kazein (triptik özüt) ihtiva eden agar besiyeri üzerine yerleştirilir. Takiben hızlı deneyde kullanılan membran kazein (triptik özüt) ve safra tuzları ihtiva eden bir agar besiyeri üzerinde (44,0±0,5) °C'da 19 saat - 20 saat inkübe edilir.

4.3 Doğrulama ve değerlendirme, (standard deney)

Membran üzerinde laktoz pozitif olan karakteristik koloniler sayılır. *E. Coli* ve koliform bakterilerin doğrulama deneyleri (oksidaz ve indol üretimi) için rasgele seçilen karakteristik kolonilerin alt kültürleri yapılır. Numunenin 100 mL'de olması muhtemel laktoz pozitif *E. Coli* ve koliform bakterilerin adedi sayılır.

4.4 Doğrulama ve değerlendirme, (hızlı deney)

Agar besiyerinden sağlanan triptofandan indol oluşturabilen membran üzerindeki koloniler *E.coli* olarak kabul edilir. Numunenin 100 mL'de olması muhtemel *E. coli* adedi sayılır.

5 Cihazlar ve cam malzeme

Genel mikrobiyoloji lâboratuvar donanımı ve özellikle aşağıda verilenler;

5.1 Buhar yoluyla sterilizasyon için alet (otoklav)

Steril olmayan cam malzeme ve aletleri, ISO 8199'da verilen talimatlara uygun olarak steril edebilen.

5.2 Şu banyosu ve/veya inkübatör

(36±2) °C'da termostatla kontrol edilen.

5.3 Su banyosu ve/veya inkübatör

(44,0±0,5) °C'da termostatla kontrol edilen.

Not - Hızlı deney için, Madde 5.2 ve Madde 5.3 deki inkübatörlerin yerine, (36±2) °C ve (44,0±0,5) °C'da çift ayarlı bir programlanabilir inkübatör kullanılabilir.

5.4 pH metre

(±0,1) doğrulukla ölçen.

5.5 Membran süzme donanımı

ISO 8199 ile uyumlu olan.

5.6 Membran süzgeçler

Selüloz esterlerinden oluşan, genellikle 47 mm veya 50 mm çapında, tercihan kare şeklinde bölünmüş ve göz açıklığı anma çapı 0,45 µm oranına eşdeğer bir süzme özelliği olan.

Süzgeçler, bakteri gelişmesini engelleyen veya bakteri gelişmesini teşvik eden özelliklerden arı olmalı ve kare şeklinde bölmeler için kullanılan mürekkep bakterilerin gelişmesine tesir etmemelidir. Süzgeçler steril değilse, imalatçının talimatlarına uygun olarak steril edilmelidir. Özellikle farklı süzgeç markaları kullanıldığında farklı renkler gelişebileceğinden, membranların her partisi ISO 7704'e uygun olarak, deneye uygunluk açısından denenmelidir.

Not - Renk gelişmesinin daha iyi şekilde tayini için hızlı deney kullanıldığı zaman yeşil membran süzgeçler faydalı olabilir.

5.7 Uçları yuvarlak pensler

Süzgeçlerin tutulması taşınması ve yerleştirilmesi için.

5.8 Ultraviyole lambası

254 nm dalga boyunda (düşük basınçlı cıva lambası) olan.

UYARI - UV ışını gözlerde ve deride tahrişe neden olur. Koruyucu gözlük ve eldivenler kullanılmalıdır.

5.9 Süzgeç pedleri

Çapı en az 47 mm olan.

6 Kültür besiyeri ve reaktifler

Kültür besiyeri ve reaktifleri hazırlamak için benzer kalitede olan bileşenler ve analitik saflıkta olan kimyasal maddeler (Not) kullanılmalı, Ek B'de verilen talimatlar takip edilmelidir. Alternatif olarak, ticarî olarak mevcut, Ek B'de verilen terkipler ile uyumlu kültür besiyerleri ve reaktifler kullanılmalı ve imalâtçının talimatları titizlikle takip edilmelidir.

Not - Deneylerde eşdeğer performans göstermelerinin sağlanması şartıyla, farklı saflıkta kimyasal maddelerin kullanılması mümkündür.

Kültür besiyeri hazırlamak için, ISO 3696'ya uygun, deney şartları altında bakteriyel gelişmeyi engelleyebilecek maddelerden arındırılmış cam malzemede damıtılmış su veya deiyonize su kullanılmalıdır.

Aksi belirtilmedikçe, hazırlanan besiyeri (5±3) °C'da karanlıkta muhafaza edilirse ve buharlaşmaya karşı korunursa en fazla bir ay süreyle kararlı kalır.

7 Numune alma

Numuneler, ISO 5667-1, ISO 5667-2 ve ISO 5667-3'e uygun olarak alınır ve lâboratuvar'a teslim edilir.

8 İşlem

8.1 Numunenin hazırlanması

Numunenin hazırlanması için, süzme ve izolasyon besiyerine aşılama, ISO 8199 ve ISO 6887-1'de verilen talimatlar takip edilerek yapılmalıdır. Deneye, tercihen numune alınmasından hemen sonra başlanmalıdır. Numuneler besiyeri sıcaklığında (karanlıkta, 25°C'ya eşmayan sıcaklıkta) korunursa numune alındıktan sonra 6 saat içerisinde deneye başlanmalıdır. Olağanüstü şartlar altında numuneler, deneyden 24 saat öncesine kadar (5±3) °C'da korunabilir.

8.2 Süzme

Çalışılacak numunenin 100 mL'si (veya daha fazla hacimlerde, örneğin şişelenmiş su için 250 mL) bir membran süzgeç (Madde 5.6) kullanılarak süzülür. Membran süzgeç Madde 8.3 ve Madde 8.4'de belirtilen kendi agar besiyerleri üzerine, süzgeç ile agar besiyeri arasında hava kalmadığından emin olacak şekilde yerleştirilir.

8.3 İnkübasyon ve ayırma, (standard deney)

Süzmeden (Madde 8.2) sonra membran süzgeç Laktoz TTC agar plâğı üzerine yerleştirilir ve (36±2)°C'da (21±3) saat inkübe edilir.

Not 1 - inkübasyon süresinin 44±4 saat uzatılması deneyin hassasiyetini artırabilir ve özellikle (21±3) saat sonunda tipik koloniler görülmeyen plâklar için faydalıdır.

Not 2 - 44 °C'da inkübasyon için ilâve bir membran süzgeç kullanılması, istenmeyen gelişme probleminin üstesinden gelebilir.

Membran süzgeçler incelenir ve membran süzgeç altındaki besiyerinde sarı bir renk gelişimi gösteren bütün karakteristik koloniler, boyutlarına bakılmaksızın laktoz pozitif bakteriler olarak sayılır. Oksidaz ve Indol deneyleri için tercihan alt kültürlerin hepsi veya sırasıyla triptofan sıvı besiyeri (Madde B.2) veya seçici olmayan agar (Madde B.3) üzerinden elde edilen karakteristik kolonilerin temsili bir sayısı (en az on tane) alınır.

Seçici olmayan agar (36±2) °C'da (21±2) saat süreyle inkübe edilmeli ve oksidaz deneyi aşağıdaki şekilde yapılmalıdır.

iki - üç damla taze hazırlanmış oksidaz reaktifi (Madde B.5.3) bir süzgeç kağıdı üzerine damlatılır.

Cam çubuk, tahta çubuk, plâstik veya platin (nikel krom olmayan) tel öze ile koloninin bir kısmı hazırlanan süzgeç kağıdı üzerine sürülür.

30 saniye içerisinde koyu mavi - mor rengin ortaya çıktığının görülmesi, pozitif reaksiyon olarak kabul edilir.

Triptofan sıvı besiyeri bulunan (Madde B.2) cam tüp (44,0±0,5)°C'da (21±3) saat inkübe edilir ve içeri sine 0,2 mL - 0,3 mL Kovacs reaktifi ilâve edilmek suretiyle indol üretimi incelenir. Sıvı besiyeri yüzeyinde kiraz kırmızısı bir rengin oluşması indol üretimini doğrular.

Oksidaz negatif reaksiyon veren bütün koloniler **koliform bakteri** olarak sayılır

Oksidaz negatif ve indol pozitif reaksiyon veren bütün koloniler **E.coli** olarak sayılır.

Not 3 - Fekal ve su/toprak kökenli türlerin ayrımı gibi özel durumlarda, koliform bakterilerin teşhisine ihtiyaç duyulabilir.

8.4 İnkübasyon ve ayırma, (hızlı deney)

Süzmeden (Madde 8.2) sonra Membran süzgeç TSA besiyeri (Madde B.3) üzerine yerleştirilir ve (36±2) °C'da 4 saat - 5saat inkübe edilir. Daha sonra membran süzgeç TBA besiyeri (Madde B.4) üzerine yerleştirilir ve (44,0±0,5) °C'da 19 saat - 20 saat inkübe edilir.

İstenirse iki agar besiyeri, ikiye ayrılmış bir plâk içerisinde birlikte kullanılabilir (Madde B.4). Bu durumda membran süzgeç, taze hazırlanmış TBA (Madde B.4) ve TSA (Madde B.3)'den oluşan ikiye ayrılmış plâk üzerine yerleştirilir ve (36±2) °C'da 4 saat - 5 saat, takiben (44,0±0,5) °C'da 19 saat - 20 saat inkübe edilir.

İnkübasyondan sonra membran süzgeç, indol reaktifi (Madde B.5.2) ile doyurulmuş bir süzgeç yastık (Madde 5.9) üzerine yerleştirilir ve renk gelişimine bağlı olarak 10 dakika - 30 dakika ultraviyole lambası ile UV ışımaya maruz bırakılır. Membran süzgeç üzerindeki bütün kırmızı koloniler **E.coli** olarak sayılır.

Not 1 - Ticarî olarak bulunan, su bazlı reaktifler UV ışımaya ihtiyaç olmadan hızlı ve kesin sonuçlar verebilir.

Not 2 - Kolonilerin düzensiz dağılımı veya yüksek oranda istenmeyen gelişmenin mevcut olması, yakın kolonilerin renk yayılması nedeniyle indol pozitif kolonilerin ayrımı ve sayımında bozucu etki yapabilir.

9 Sonuçların gösterilmesi

Membran süzgeç üzerindeki sayılan karakteristik kolonilerin sayılarından (Madde 8.3) ve yapılan doğrulama deney sonuçlarının dikkate alınmasından sonra ISO 8199'a uygun olarak numunenin 100 mL sinde mevcut E.coli, koliform bakteri ve gerekiyorsa laktoz pozitif bakterilerin sayıları hesaplanır. E.coli tanımlanması için her iki deneyin (standard deney ve hızlı deney) paralel olarak kullanılması durumunda, nihai sonuç olarak bu iki deneyin sonuçlarından değeri yüksek olanı alınır.

10 Deney raporu²⁾

Deney raporu en azından aşağıdaki bilgileri içermelidir.

- Bu standarda atf,
- Numunenin tam bir tanıtımı için gerekli bütün ayrıntılar,
- Madde 9'a uygun olarak sonuçların ifade edilmesi,
- Analizlerin yürütülmesi esnasında gözlenen herhangi bir özel oluşum/oluşumlar ve sonuçları etkileyebilecek bu yöntemde belirtilmeyen herhangi bir işlem/işlemler.

11 Kalite güvencesi

Deney için uygun malzemelere, reaktiflere ve tekniklere sahip olduğundan emin olunmasını sağlayacak şekilde, kalite kontrol sistemi açıkça tanımlanmış bir lâboratuvar kullanılmalıdır.

²⁾ **TSE Notu** : Deney raporu, burada istenilen bilgilere ilâveten, TS EN ISO/IEC 17025'de verilen bilgileri de ihtiva edecek şekilde düzenlenebilir.

Ek A (Bilgi için)

Koliform bakteriler hakkında daha fazla mikrobiyolojik bilgi

Koliform bakteriler, Gram negatif, sporsuz, oksidaz negatif, çubuk şeklinde, aerobik olarak ve besiyerinde safra tuzları (veya benzer gelişme engelleyici diğer yüzey aktif maddeler) mevcut olduğunda fakültatif anaerob olarak gelişme yeteneğinde olan ve normal olarak (36±2) °C sıcaklıkta inkübe edildiğinde 48 saat içerisinde asit ve aldehit üretmek suretiyle laktozu fermente edebilen bakterilerdir. Bu bakteriler aynı zamanda B-galaktosidaz enzimine sahiptir.

E.coli (44±0,5) °C'da ve (21±3) saatte triptofandan indol üretebilen koliform bakterilerdir. Aynı zamanda 3-glukuronidaz enzimine sahip, metil kırmızısı deneyinde pozitif reaksiyon veren ve dekarboksilat L-glutamik asit üretebilen ancak asetil metil karbinol üretemeyen, karbon kaynağı olarak sadece sitratı kullanan veya KCN sıvı besiyerinde büyüyen bakterilerdir.

EkB**Kültür besiyerleri ve reaktifler B.1****Sodyum heptadesilsülfatlı laktoz TTC agar****B.1.1 Bazal besiyeri**

Laktoz	20 g
Pepton	10 g
Maya özütü	6 g
Et özütü	5 g
Bromtimol mavisi	0,05 g
Agar (toz halinde veya pul şeklinde)	15 g - 25 g ³⁾
Damıtık su	1000 mL

Bileşenler sıcak su içerisinde çözülür. Gerekirse sterilizasyondan sonra 25 °C'da 7,2±0,1'a karşılık gelen bir değere sahip olacak şekilde pH ayarlanmalıdır. Besiyeri en fazla 250 mL hacimlerde olan şişeler içerisinde dağıtılır ve otoklavda (121±3) °C'da 15 dakika süreyle steril edilir.

B.1.2 TTC çözeltisi

2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorür (TTC)	0,05 g
Damıtık su	100 mL

TTC, bir miktar su içerisinde çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır. Anma göz açıklığı 0,2 µm olan membrandan geçirilerek süzme yoluyla steril edilir.

B.1.3 Sodyum heptadesilsülfat çözeltisi

Sodyum heptadesilsülfat (Tergitol ⁴⁾ 7)	0,2 g
Damıtık su	100 mL

Sodyum heptadesilsülfat bir miktar su içerisinde çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır. Otoklavda (121±3) °C'da 15 dakika süreyle steril edilir.

B.1.4 Tam besiyeri

Bazal besiyeri (Madde B. 1.1)	100 mL
TTC çözeltisi (Madde B. 1.2)	5 mL
Sodyum heptadesilsülfat çözeltisi (Madde B.1.3)	5 mL

Bazal besiyeri eritilir ve (50±5) °C'a soğutulur ve sodyum heptadesilsülfat çözeltisi aseptik şartlarda ve her bir ilâveden sonra kabarcık oluşumundan kaçınılarak tamamen karıştırılır. En az 5 mm derinlikte olacak şekilde Petri kaplarına dağıtılır. Hemen kullanılmayacaksa karanlıkta, (5±3) °C'da, 10 günden fazla olmayan sürede muhafaza edilir.

Agarın jelleşme gücüne bağlıdır.

Tergitol ticarî olarak mevcut olan uygun bir ürüne örnektir. Bu bilgi bu standardın kullanıcılarına kolaylık amacıyla verilmiştir ve bu ürünün ISO tarafından onaylandığı anlamına gelmez.

B.2 Triptofan sıvı besiyeri

Triptik kazein özü	10 g
L- Triptofan	1 g
Sodyum klorür	5 g
Damıtık su	1000 mL

Katkılar su içerisinde ısıtılarak çözülür. Her deney tüpüne 3 mL olacak şekilde dağıtılır. Tüpler pamuk tıkaçlar, plâstik veya metal kapaklar ile kapatılır. Tüpler (121±3) °C'da 15 dakika süreyle otoklavlanır. Kullanıma hazır besiyerinin pH'sı 25 °C'da 7,5±0,1 olmalıdır.

Not - Triptik kazein özü içerisinde yeterli bir miktarda triptofan mevcutsa, L-triptofan ilâve edilmez, yerine 10 g daha triptik kazein özü ilâve edilir.

B.3 Triptofan soy agar (TSA)

Triptik kazein özü	15 g
Soy pepton	5 g
Sodyum klorür	5 g
Agar (toz halinde veya pul şeklinde)	15 g - 25 g ³⁾
Damıtık su	1000 mL

Katkılar su içerisinde ısıtılarak çözülür. Sterilizasyondan sonra 25 °C'da 7,2±0,1'e karşılık gelen bir değere sahip olacak şekilde pH ayarlanmalıdır. Besiyeri en fazla 250 mL hacimlerde olan şişe veya tüpler içerisine dağıtılır ve (121±3) °C'da 15 dakika süreyle steril edilir. (50±5) °C'a soğumaya bırakılır ve derinliği en az 5 mm olacak şekilde petri kaplarına dağıtılır.

Not - Oksidaz deneyi için, bu deney üzerinde bozucu etkisi olmayan (düşük fermente olabilen karbonhidrat muhtevalı) herhangi bir seçiciliği olmayan agar (TSA'nın yerine) kullanılabilir.

B.4 Tripton bile (safra) agar (TBA)

Tripton	20 g
Safra tuzları	1,5 g
Agar (toz halinde veya pul şeklinde)	15 g - 25 g ³⁾
Damıtık su	1000 mL

Katkılar su içerisinde ısıtılarak çözülür. Sterilizasyondan sonra 25 °C'da 7,2±0,1'e karşılık gelen bir değere sahip olacak şekilde pH ayarlanmalıdır. Besiyeri en fazla 250 mL hacimlerde olan şişe veya tüpler içerisine dağıtılır ve (121±3)°C'da 15 dakika süreyle steril edilir. (50±5) °C'a soğumaya bırakılır ve derinliği en az 5 mm olacak şekilde petri kaplarına dağıtılır.

İki bölmeli plâklar, bir bölmeye sıcak (50±5) °C TSA (Madde B.3), diğer bölmeye de TBA (Madde B.4) dökülmek suretiyle hazırlanır. Oda sıcaklığına kadar soğutulur.

TSA besiyeri miktarı petri plâğı içerisinde yaklaşık 1 mm tabaka kalınlığını vermeye yetecek kadar (meselâ: 55 mm çaplı bir petri kabı içerisine 2,5 mL TSA besiyeri dökülerek) olmalıdır. Bir inkübatör içerisinde (36±2) °C'da gerekirse ters çevrilerek katıla şmaya ve kurumaya bırakılmalıdır.

Çift bölmeli plâklar her analiz için taze hazırlanmalıdır (Membran süzgeçler agar plâğı üzerine yerleştirilmeden 30 dakika - 60 dakika önce).

¹ Agarın jelleşme gücüne bağlıdır.

B.5 Reaktifler

B.5.1 İndol deneyi için Kovacs reaktifi, (standard deney)

p-Dimetilaminobenzaldehit	5 g
Amil veya bütil alkol (alkali organik maddelerden arı)	75 mL
Hidroklorik asit ($\rho = 1,18 \text{ g/mL}$)	25 mL

Aldehit, alkol içerisinde çözülür. Derişik asit dikkatlice ilâve edilir. Işıktan korunarak (5 ± 3) °C'da muhafaza edilmelidir.

Not - Reaktifin rengi, açık sarıdan açık kahverengiye kadar bir renk olmalıdır. Amil alkolün bazı örnekleri uygun değildir ve aldehit ile koyu bir renk verir.

UYARI - Reaktif, bir çeker ocakta çalışılarak hazırlanmalıdır. Koruyucu eldiven kullanılmalı ve p-dimetilaminobenzaldehit ile derinin temasından kaçınılmalıdır. Amil alkol, mukoza zarını tahriş edebilir ve baş dönmesi yapabilir.

B.5.2 İndol reaktifi, (hızlı deney)

p-Dimetilaminobenzaldehit	0,5 g
Hidroklorik asit, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$	100 mL

p-Dimetilaminobenzaldehit, hidroklorik asit içerisinde çözülür. (UYARI Madde B.5.1)

Reaktif saydam olmayan bir balon içerisinde (5 ± 3) °C'da muhafaza edilir. Reaktif açık sarı bir renkte olmalı ve renk kahverengimsi sarı olursa kullanılmamalıdır.

B.5.3 Oksidaz reaktifi

Tetrametil p-fenilendiamin hidroklorür	0,1 g
Damıtık su	10 mL

Reaktif kararlı değildir ve gerekli olduğu zaman daima taze hazırlanmalıdır.

UYARI - Tetrametil p-fenilendiamin kanserojendir. Bir çeker ocakda çalışılarak hazırlanmalı, koruyucu eldiven kullanılmalı, deri ile temasından kaçınılmalıdır.

Ek ZA

Bu standardda atıf yapılan uluslar arası standard ve/veya dokümanlara karşılık gelen Avrupa standartları

Bu standardda tarih belirtilerek veya belirtilmeksizin diğer standard ve/veya dokümanlara atıf yapılmaktadır. Bu atıflar metin içerisinde uygun yerlerde belirtilmiş ve aşağıda liste halinde verilmiştir. Tarih belirtilen atıflarda, daha sonra yapılan tadil veya revizyonlar, atıf yapan bu standardda da tadil veya revizyon yapılması şartı ile uygulanır. Atıf yapılan standard ve/veya dokümanın tarihinin belirtilmemesi halinde en son baskısı kullanılır.

<u>ISO yayını</u>	<u>Tarih</u>	<u>Baslık</u>	<u>EN</u>	<u>Tarih</u>
ISO 3696	1987	Water for analytical laboratory use - Spesification and test methods	EN ISO 3696	1995
ISO 5667-1	1980	Water quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes	EN 25667-1	1993
ISO 5667-2	1991	Water quality - Sampling - Part 2: Guidance on sampling techniques	EN 25667-2	1993
ISO 5667-3	1994	Water quality - Sampling - Part 3: Guidance On the preservation and handling of samples	EN ISO 5667-3	1995
ISO 6887-1	1999	Microbiology of food and animal feeding stuffs- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of initial suspension and decimal dilutions		

Kaynaklar

- [1] BARREL, R.A.E. (1992). A Comparison Between Tryptone Bile agar and Membrane Lauryl Sulphate Broth for the Enumeration of Presumptive *Escherichia coli* in Water. *Water Res.* 26: 677-681.
- [2] HAVELAAR, A.H. and DURING, M. (1988). Evaluation of the Anderson Baird-Parker Direct Plating Method for Enumerating *Escherichia coli* in Water. *J. Appl. Bacteriol.* 64: 89-98.
- [3] SCHETS, F.M. and HAVELAAR, A.H. (1991). Comparison of Indole Production and p-Glucuronidase Activity for the Detection of *Escherichia coli* in a Membrane Filtration Method. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 272-274.
- [4] SCHETS, F.M., MEDEMA, G.J. and HAVELAAR, A.H. (1993). Comparison of Colilert with Dutch Standard Enumeration for *Escherichia coli* and Total coliforms in Water. *Lett. Appl. Microbiol.* 17:17-19.