

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* SPOR**
JERMİNASYONUNU ERKEN BELİRLEMEDE FARKLI
YÖNTEMLERİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Gülşah DUMLU

Danışman
Prof. Dr. Duygu PERÇİN

Yüksek Lisans Tezi

Nisan 2016
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* SPOR**
JERMİNASYONUNU ERKEN BELİRLEMEDE FARKLI
YÖNTEMLERİN ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Gülşah DURLU

Danışman
Prof. Dr. Duygu PERÇİN

Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSY-11-3704 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Nisan 2016

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

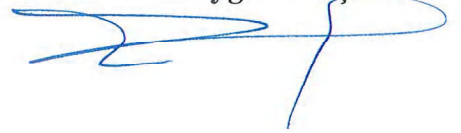
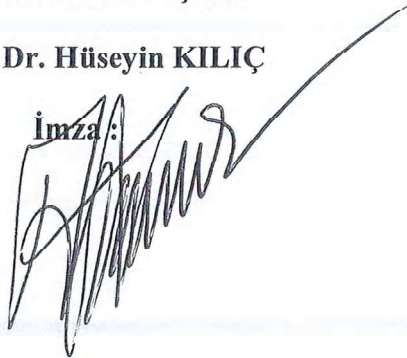
Adı-Soyadı: Gülşah DUMLU

İmza :



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“*Geobacillus stearothermophilus* Spor Jerminasyonunu Erken Belirlemede Farklı Yöntemlerin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan**Gülşah DUMLU****Danışman****Prof. Dr. Duygu PERÇİN****Anabilim Dalı Başkanı****Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ****İmza:**

Prof. Dr. Duygu PERÇİN Danışmanlığında **Gülşah DURLU** tarafından hazırlanan "***Geobacillus stearothermophilus* Spor Jerminasyonunu Erken Belirlemede Farklı Yöntemlerin Araştırılması**" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Mikrobiyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

16 /05/ 2016

JÜRİ

İmza :

Danışman: Prof. Dr. Duygu PERÇİN (Tıbbi Mikrobiyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Murat GÜNAYDIN (İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi)

Üye : Doç. Dr. Esmâ KAYA (Tıbbi Mikrobiyoloji AD)

Esmâ Kaya

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçlanmasında çok büyük desteğini gördüğüm tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Duygu PERÇİN'e, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ'a ve diğer Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi hocalarıma teşekkür ederim.

Tezimin farklı aşamalarında yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Ömür Mustafa PARKAN'a, Arş. Gör. Dr. Demet TİMUR'a, Biyolog Dinçer KOÇ'a, Biyolog Kasım KARACAGİL'e, Biyolog Gonca AYDEMİR'e, Dr. Filiz TEKİNŞEN'e ve Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

TTU-14-5390 no'lu bu tez projesini maddi olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Dualarını benden hiç esirgemeyen ve üzerimde çok büyük emekleri olan anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

**GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS SPOR JERMINASYONUNU
ERKEN BELİRLEMEDE FARKLI YÖNTEMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Gülşah DURLU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Nisan 2016

Danışman: Prof. Dr. Duygu PERÇİN

ÖZET

Amaç: *Geobacillus stearothermophilus* sporları yüksek sıcaklığa dayanabildikleri için buhar sterilizasyonunun biyolojik kontrolünde kullanılmaktadır. Biyolojik indikatörlerde üreme tespit süresi jerminasyon için kullanılan besiyeri içindeki indikatöre ve üreme tespit yöntemine göre 1-48 saat arasında değişiklik gösterir. Bununla birlikte renk değişikliği esasına dayalı indikatörlerde ortalama inkübasyon süresi 24 saattir. Bu çalışmada jerminasyonu daha erken, renk değişikliği ile ve gözle kolayca görünür şekilde gösterebilecek bir besiyerinin oluşturulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Bu çalışma için üç farklı besiyeri formülize edildi. Besiyerine son inokulum 10^6 spor olacak şekilde inokülasyon yapıldı. Bu besiyerleri ile dört farklı çalışma grubu hazırlandı. Gruplardan biri 47°C’de, biri 57°C’de, biri 64°C’de inkübe edildi; dördüncü gruba ise 100°C’de 20 dakika kaynatma ve ardından -20°C’de 20 dakika dondurma sonrası 64°C’de inkübasyon uygulandı. Hazırlanan besiyerleri ile elde edilen spor jerminasyon tespit zamanları standart biyolojik indikatör besiyeri ile karşılaştırıldı. Tüm çalışma grupları iki farklı besiyeri üretim lotu ile üçer kez tekrarlandı.

Bulgular: Standart besiyerinde spor jerminasyon tespit zamanı ortalama 5.5 saat iken whey proteini ve skim milk içeren ve 64°C’de inkübe edilen besiyerinde jerminasyon süresinin dört saate kadar kısaldığı tespit edilmiştir. En uzun jerminasyon süresi 47°C’deki inkübasyonda sekiz saat olarak gözlemlenmiştir. Kaynatma ve dondurma işleminin jerminasyon süresini hızlandırmadığı görülmüştür.

Sonuç: Whey proteini ve skim milk içeren besiyeri formülü jerminasyonun gözle ve hızlı bir şekilde tespitini sağlayabildiğinden biyolojik indikatörlerde ümit vadeden bir alternatif olabilir.

Anahtar Kelimeler: *G.stearothermophilus*, biyolojik indikatör, spor jerminasyonu, jerminasyon besiyeri

EVALUATION OF DIFFERENT METHODS FOR EARLY DETECTION OF *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* SPORE GERMINATION

Gülşah DURLU

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Microbiology

M. Sc. Thesis, April 2016

Supervisor: Prof. Dr. Duygu PERÇİN

ABSTRACT

Objective: *Geobacillus stearothermophilus* spores are used in biological control of steam sterilization as they can survive at high temperatures. The growth detection time of biological indicators depends on the indicator and the germination medium used and varies from 1 to 48 hours. However, the average incubation time for the indicators based on the color change is 24 hours. In this study, we aimed at formulating a new media which is able to detect germination earlier in an easily observable way with color change.

Materials and Methods: For this study, three different media was formulated. Media were inoculated so that the final inoculum was 10^6 spores. Four different study groups were prepared with these media. The first group was incubated at 47°C, the second group at 57 °C, and the third group at 64 °C; while the fourth group was incubated at 64 °C following boiling 20 minutes at 100 °C and freezing in -20°C for 20 minutes. Spore germination times obtained in different groups were recorded and compared with standard medium used for biological indicators. All study groups were repeated in triplicate with two different production lots of media.

Results: When the average germination detection time was 5.5 hours in standard medium, it was found to be shortened to four hours in the medium containing skim milk and whey protein and incubated at 64°C. The longest duration of germination was observed as eight hours at 47 °C. It was seen that the procedure of boiling and freezing had no effect to accelerate the germination time.

Conclusion: The medium containing whey protein and skim milk can provide a promising alternative medium for biological indicators thanks to its ability to detect germination fast and easily observable way.

Keywords: *G. stearothermophilus*, biological indicator, spore germination, germination medium

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	ix
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma:.....	3
2.2.Morfolojisi ve Gram Boyanma Özellikleri	5
2.3. Metabolizması	6
2.4. Bulundukları ortamlar	6
2.5. İdentifikasyon Yöntemleri	6
2.6. <i>G. stearothermophilus</i> 'un Kullanım Alanları	7
2.7. Sterilizasyonun Biyolojik Kontrolü	7
2.8. Buhar Sterilizasyonda Kullanılan Biyolojik İndikatör Çeşitleri	10
2.9. Sporulasyon Besiyeri	11
2.10. Spor Jerminasyon Besiyeri.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Spor Üretimi	13
3.2. Spor Üretiminde Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması	13
3.2.1. Triptik Soy Sıvı Besiyerinin Hazırlanışı.....	13
3.2.2. Nutrient Agar Besiyerinin Hazırlanışı	13
3.2.3. AK Sporulasyon Agar Besiyerinin Hazırlanışı	14
3.3.Sporların Pürifikasyonu	14
3.4. Spor boyama yöntemi	14
3.5. Canlı Spor Sayımı.....	15
3.6. Jerminasyon Besiyerlerinin Hazırlanması.....	17

3.6.1. Birinci Besiyeri Formülü	17
3.6.2. İkinci Besiyeri Formülü	18
3.6.3.Üçüncü Besiyeri Formülü	18
3.6.4.Dördüncü Besiyeri Formülü.....	19
3.7. Besiyerlerinde Jerminasyon Süresini Kısaltmak İçin Kullanılan Yöntemler	20
3.7.1. Birinci Yöntem; Farklı inkübasyon sıcaklıklarının denenmesi.....	20
3.7.2. İkinci Yöntem; Kaynatma ve dondurma işlemlerinin jerminasyon süresine etkisinin incelenmesi	21
4. BULGULAR	22
5 TARTIŞMA VE SONUÇ.....	25
6 KAYNAKLAR.....	30
ÖZ GEÇMİŞ	

KISALTMALAR

NaCl : Sodyum klorür

KCl : Potasyum klorür

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

pH : Power of Hydrogen

Fe : Demir

Mg : Magnezyum

CaCl₂ : Kalsiyum klorür

ATCC : American Type Culture Collection

NaClO₂ : Sodyum klorid

K₂HPO₄ : Di Potasyum Fosfat

MnO₄S : Manganez sülfat

rpm : Revolution per minute

µl : Mikrolitre

CaCO₃ : Kalsiyum karbonat

CFU : Colony Forming Unit

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Aerob, endospor oluşturan yedi familyadan *Bacillaceae* ve *Paenibacillaceae* aileleri, *Firmicutes* aleminde *Bacilli* sınıfında yer alan ve klinik önem arz eden iki ailedir. *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus* cinsine ait bir bakteridir. Isıya dirençli çomak şeklinde, spor oluşturan aerobik, termofilik basillerdir. Genellikle sıcak su kaynakları ve jeotermal bölgelerdeki topraklardan izole edilirler. Bu çevrelerin yanı sıra havadan ve konservelerden de izole edilmektedirler (1).

G. stearothermophilus sporları, yüksek sıcaklığa dayanabildikleri için buhar sterilizasyon yönteminde biyolojik indikatör olarak kullanılmaktadır. Biyolojik indikatörler sterilizasyonun kontrolünde önemli bir basamaktır. İyi tanımlanmış sıcaklık direnci olan standardize sporların kullanımı biyolojik indikatörün kalitesini belirler. Besiyeri içerisindeki agar konsantrasyonu, pH gibi faktörler sıcaklığa direnci artırır (2). *G. stearothermophilus* sporları aynı zamanda süt içindeki antimikrobiyal varlığını tespit etmek için de kullanılır. Antibiyotik varlığında *G. stearothermophilus* sporlarının jermantasyonu gerçekleşmez. Sütteki antibiyotik kalıntısının tespiti için kullanılan jermantasyon besiyerine dextroz, whey proteini, skim milk agar gibi maddelerin eklenmesinin jermantasyonu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (3).

Biyolojik indikatörler üç kuşak halinde gelişmiştir. Birinci kuşak indikatörler sadece kağıt şeritler üzerinde spor süspansiyonu halindedir. Aseptik ortamdaki besiyerine koyulan şeritteki üreme besiyerini bulanıklaştırır. İkinci kuşak indikatörlerde spor

içeren şeritler ve besiyeri aynı tp içerisindedir. Üreme renk değişimi ile gözlemlenir. nc kuşak indikatörler ise hızlı indikatörler olarak bilinir (4, 5).

Mevcut biyolojik indikatörler üremenin türbidimetrik, florimetrik veya spektrofotometrik yöntemlerle ölçümü esasına dayanır. Her üç yöntem için de özel okuyuculu inkübatörler kullanılır (5). Bu çalışmada sporların vejetatif forma geçişini hızlandırabilecek farklı besiyeri formülleri ve farklı sıcaklıklar denenerek spor jermantasyon tespit zamanını kısaltacak ve gözle kolayca görünür hale getirebilecek bir besiyerinin kazanılması amaçlanmıştır.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma:

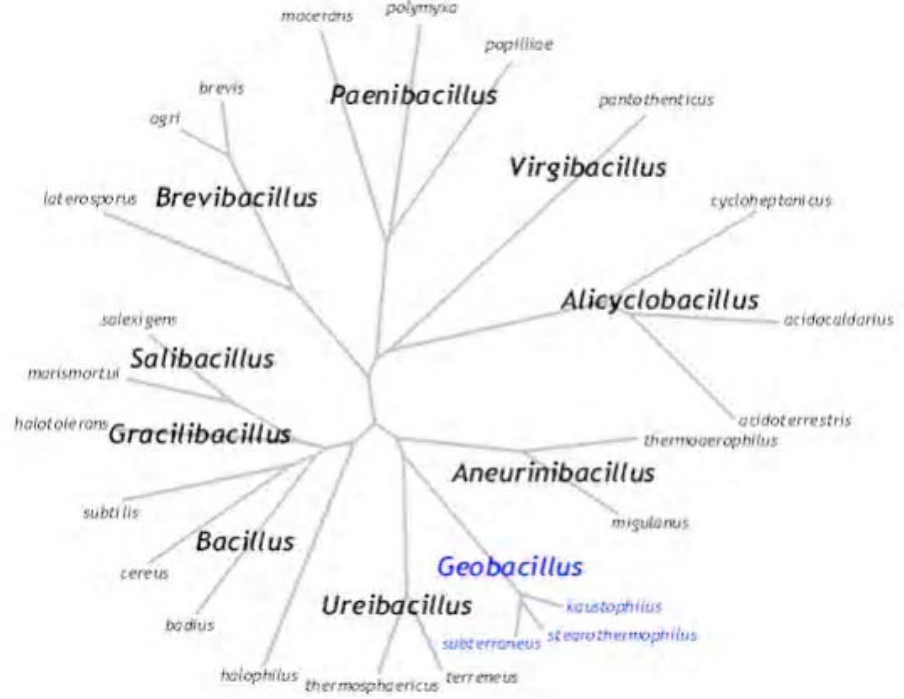
Moleküler sınıflandırma yöntemlerinin aerobik, endosporlu bakterilerin sınıflandırılmasında büyük katkısı olmuştur. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 1986 yılındaki baskısında 40 geçerli *Bacillus* türü yer almıştır. O tarihten itibaren ya *Bacillus* cinsi içinde ya da ondan türemiş cinsler içinde 218 yeni tür daha tanımlanmıştır (6, 7).

Bacillus stearothermophilus ile benzer termofilik türler olan *B. kaustophilus* ve *B. thermoglucosidasius*, Ash ve ark (8) tarafından, grup 5 olarak adlandırılan uzak bir filogenetik gruba dahil edilmiştir.

Bu yeni taksonun *Bacillus* genusundan ayrılıp yeni bir isim alması 10 yıl kadar sürmüştür. Aynı zamanda Rus Bilimler Akademisi bünyesindeki bir grup bilim adamı Kazakistan'da yüksek sıcaklıktaki petrol sahalarında mikrobiyal ekoloji üzerinde çalışma yapmaya başlamışlardır. Bir kilometre derinliğindeki bu sahalardan 55-74°C sıcaklıkta su örnekleri alınmış ve termofilik basillerce zengin olduğu görülmüştür (9).

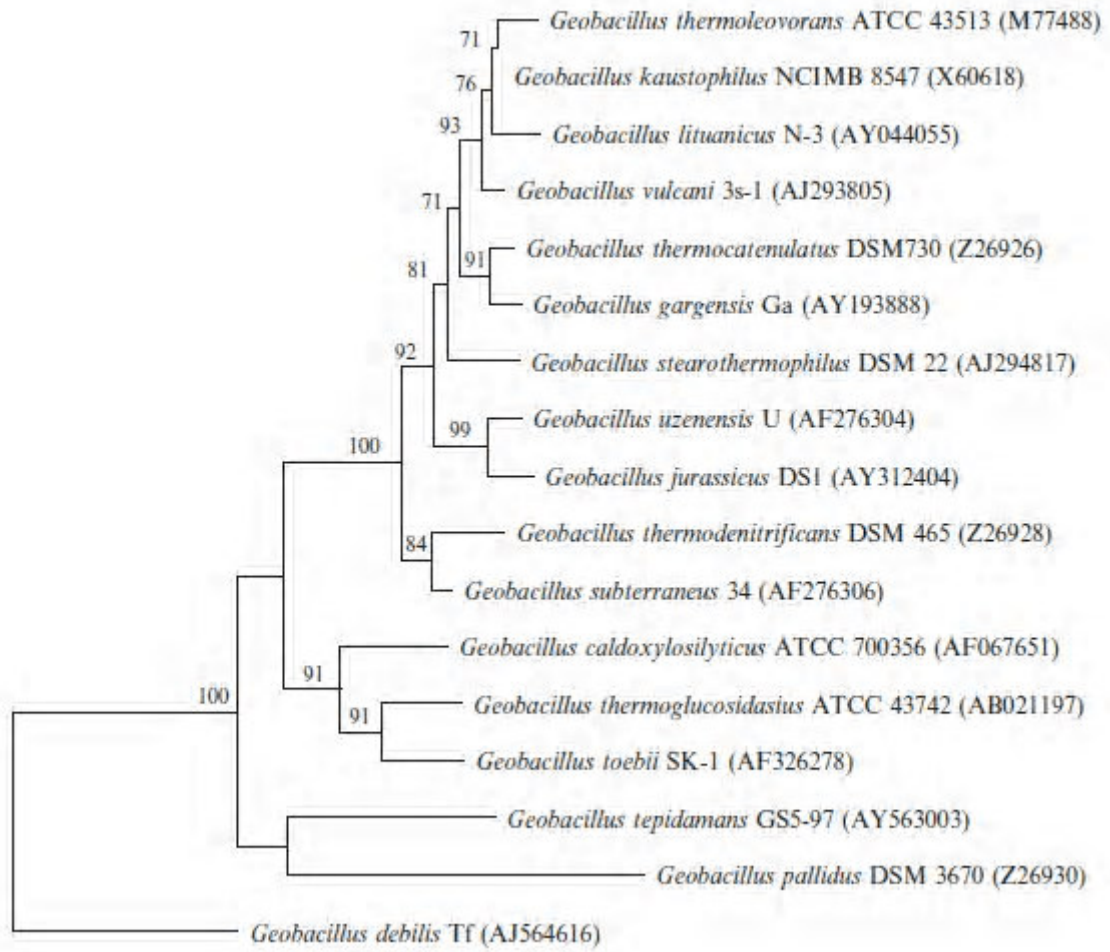
Fizyolojik ve genetik çalışmalar sonucunda bu organizmalar iki gruba ayrılmıştır. Bu mikroorganizmalardan iki tanesi *B. licheniformis* ile benzerlik gösterirken diğerleri ise Ash ve ark (8) tarafından tanımlanan grup 5 mikroorganizmaları ile benzerlik göstermektedir. Nazina ve ark (10) grup 5 izolatları üzerinde polifazik deneyler yapmış ve sonuçları filogenetik olarak uzak, fizyolojik ve morfolojik olarak bağlantılı yeni bir takson olan *Geobacillus* genusunun ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bununla birlikte *B. kaustophilus*, *B. stearothermophilus*, *B. thermocatenulatus*, *B. thermodenitrificans*, *B.*

thermoglucoosidarius ve *B. thermoleovorans* türleri de *Geobacillus* genusuna dahil edilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Bacillus* genusunun filogenetik sınıflandırılması (10)

Geobacillus cinsi altında yer alan türlerin 16SrRNA gen sekanslama yöntemi ile elde edilen filogenetik ağacı Şekil 2.2’de gösterilmiştir. Ancak daha sonra *G. tepidemans*, *Anoxybacillus* cinsine alınmış, *G. pallidus* ve *G. debilis*’in ise *Geobacillus* cinsi ile ilgisi olmadığı anlaşılmıştır (7).



Şekil 2.2. *Geobacillus* cinsi içinde yer alan türlerin 16SrRNA analizine göre filogenetik ağacı (7)

2.2.Morfolojisi ve Gram Boyanma Özellikleri:

G. stearothermophilus, hücre zarı ve kalın bir hücre duvarı ile karakterize olan Gram pozitif hareketli bir bakteridir. Bazı suşlarda aerobik olarak karbonmonoksit oksidasyon yeteneği vardır. *G. stearothermophilus* son derece dayanıklı endosporlar içerir. Sporangî şişmiş, elips şeklinde terminal ya da subterminal formdadır. Hücre duvarı itibarıyla Gram pozitif bir bakteri olmakla birlikte Gram boyamada negatif-pozitif arasında değişen reaksiyonlar gösterebilirler. Koloni morfolojisi değişkendir ve bazı besiyerlerinde pigment oluşturabilirler (7).

2.3. Metabolizması:

G. stearothermophilus, kemoorganotrofik bir mikroorganizmadır. Aeorobik ya da duruma göre fakültatif anaerobik solunum yaparlar. Son elektron alıcısı oksijen olmakla birlikte bazen nitrat da görev alır. *G. stearothermophilus* 30-75°C sıcaklık aralığına dayanıklıdır. İlk alfa-amilaz üretilen termofilik bakteri olarak bilinir. Üreme pH'sı 6,0-8.5 aralığı içindedir. Üreme faktörleri ise vitaminler, NaCl ve KCl'dür (7, 11, 12).

Termofil sporlar genel üretim besiyerlerinin yüzeyinde 4 gün-2 hafta inkübasyon sonrası ortaya çıkar. Ortamda oksijen ve glukoz varlığı hem vejetatif üremenin hızlanmasını hem de sporulasyonu sağlar. Besiyerine tripton ve mangan sülfat eklenmesi yoğun sporulasyona neden olur (13).

Termofil *Geobacillus* türlerinde organizmaya yapısal esneklik ve moleküler stabilite sağlamak üzere enzimatik adaptasyon, ısıya dayanıklı protein sentez mekanizmaları ve membran fosfolipitlerinde adaptasyon söz konusudur. Termofil bakterilerin membran fosfolipitlerindeki yağ asidi kompozisyonu mezofil olanlara göre farklıdır. *G. stearothermophilus* membran fosfolipidlerinin %90'ı fosfatidilgliserol ve kardiyolipinden oluşurken, üreme ısısı yükseldiğinde fosfatidilgliserol miktarının arttığı gözlemlenir. Kardiyolipin ile birlikte uzun zincirli, doymuş, lineer ve iso yağ asidi miktarı da artar. Homovisköz adaptasyon denen bu yolla hücre membranı farklı üreme sıcaklıklarında da sabit membran akışkanlığını sağlayabilir. *G. stearothermophilus*'da aminoasit transferi Na^+ bağımlı bir mekanizma ile gerçekleşir. Bu mekanizma da homovisköz adaptasyon sırasında ihtiyaç duyulan enerjiyi sağlamada önemlidir (7).

2.4. Bulundukları ortamlar:

Doğada yaygın olarak bulunurlar. Genellikle çöl toprağı, sıcak su kaynakları ve okyanus diplerinden üretilirler (7). *G. stearothermophilus* ilk kez bozulmuş fasulye ve mısır konservelerinden izole edilmiştir ve konserve gıdalar ile süt ürünlerinin bozulmasında önemli bakterilerden biridir (14).

2.5. İdentifikasyon Yöntemleri:

Glukoz, fruktoz, maltoz, mannoz ve trehalozu kullanarak asit oluşumu gözlemlenirken; galaktoz, sorbitol, ramnoz ve laktozu fermente edip asit oluşturmazlar. Katalaz testleri pozitif, oksidaz testleri değişken iken, Voges-Proskauer reaksiyonları, fenil alanin ve

indol testleri negatiftir. Jelatin ve nişasta hidrolizi yapabilirler ama üre negatiftir. Nitrat redüksiyonu ve eskülin hidrolizi değişkendir. %2 ve %5 NaCl içeren ortamlarda üreyebilir ancak %7 konsantrasyonda üreyemez (6, 7, 12).

2.6. *G. stearothermophilus*'un Kullanım Alanları:

G. stearothermophilus sporları, yüksek sıcaklık aralığına dayanıklı olduğundan özellikle sterilizasyon yöntemlerinin biyolojik kontrolünde kullanılır. Sterilizasyon hatalarını erken dönemde yakalar, sterilizasyon işleminin biyolojik ölümü gerçekleştirmede yeterli olup olmadığını gösterir. Bu çalışmalarda kullanılan sporlar sterilizasyon işlemi için biyolojik kanıt sunmaktadır (15-18).

Biyolojik indikatör olarak kullanımının yanı sıra biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır. İçerdiği α -amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. Bu enzimler tekstil ve kağıt endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, glikoz, fruktoz şurupları ve tutkal üretiminde, alkol fermantasyonunda kullanılmaktadırlar (10).

Ayrıca antibiyotik varlığında jerminasyon inhibe olduğundan sütteki antibiyotik varlığının kontrolünde kullanılabilmektedir. Süte eklenmiş antibiyotik varlığının tespiti için hazırlanan spor jerminasyon besiyerleri 64°C'de inkübe edildiğinde, inoküle antibiyotiksiz sütlerde jerminasyon besiyeri rengi iki saat içinde mordan sarıya dönmektedir. Bunun sebebi spor jerminasyonu sırasında oluşan dipikolinik asit varlığı ile açıklanmıştır (3).

2.7. Sterilizasyonun Biyolojik Kontrolü

Biyolojik kontrol; sterilizasyon hakkında direkt bilgi vererek, sterilizasyon işleminin biyolojik ölümü gerçekleştirmede yeterli olup olmadığını gösterir (15, 18).

Biyolojik indikatörler içerisinde ilgili sterilizasyon yöntemine en dayanıklı olduğu bilinen bakteri sporları bulunmaktadır. Farklı sterilizasyon yöntemlerinde kullanılan biyolojik indikatörlerdeki bakteri sporları ve uygulama sıklığı Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Farklı sterilizasyon yöntemlerinde kullanılan biyolojik indikatörlerdeki bakteri sporları ve biyolojik indikatör uygulama sıklığı (17)

Sterilizasyon Yöntemi	Bakteri Sporu	Uygulama Sıklığı
Buhar	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	En az haftada bir kez İmplant içeren her yükte
Hidrojen Peroksit Gaz	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	En az günde bir kez
Formaldehit	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Her döngüde
Etilen Oksit	<i>Bacillus atrophaeus</i>	Her döngüde
Kuru Isı	<i>Bacillus atrophaeus</i>	Haftada bir kez

Sterilizasyon sonrası canlı mikroorganizma kalma olasılığı sterilite güvence düzeyi olarak tanımlanır. Tıbbi malzeme sterilizasyonunda bu düzeyin en az 10^{-6} olması istenir. Bu düzeye ulaşıldığının ispatlanması için 10^6 spor içeren biyolojik indikatörler kullanılır.

Biyolojik indikatörler suda ya da kültür ortamında süspansiyon halinde veya plastik, kağıt, alüminyum taşıyıcılarda standart bakteri sporlarının kurutulması ile elde edilmekte olup; ısı, kimyasal ve radyasyon ile yapılan sterilizasyonun denetlenmesinde kullanılır (19).

Biyolojik indikatörler ayrı bir paket içerisine konularak sterilizatörün kapak, köşeler ve vakum drenaj çıkışları gibi sterilizasyon işleminin en zor gerçekleştiği bölgelere yerleştirilir. Sterilizasyon işleminden sonra spor içeren şeritler aseptik koşullarda besiyerine aktararak ya da aynı tüp içindeki besiyeri kırılması suretiyle bir araya getirilerek inkübatöre yerleştirilir. *G. stearothermophilus* içeren biyolojik indikatörler 55°C 'de inkübe edilir (17, 19).

Biyolojik indikatör test paketlerinin, buhar sterilizatörlerinin ilk çevrim montajları sırasında, sterilizatörün tamir gerektiren bir arızasından sonra ayrıca rutin olarak en az haftada bir kullanılması; vücuda implante edilecek cihazların sterilizasyon işlemine ise her yükte biyolojik indikatör kullanılması ve mümkünse bu son durumda biyolojik indikatör test sonuçlarının alınmasına kadar malzemenin kullanılmadan beklenmesi önerilmektedir (17-19). “Centers for Disease Control and Prevention” (18) ise biyolojik indikatörlerin haftalık kullanılmasını, implant sterilizasyonunda ise her yüke konulmasını önermektedir. Düşük sıcaklıktaki sterilizasyon yöntemlerinde ise her çevrimde kullanılması önerilir.

Biyolojik indikatörlerle ilgili olarak kimyasal indikatörlerde olduğu gibi ürünün saklanması, tutulması, kullanımı ve mikrobiyolojik teste tabii tutulması konuları değerlendirilmelidir. Biyolojik indikatörlerin en önemli problemi, sonucun alınması için uzun inkübasyon periyoduna gereksinim göstermesidir. Bu problem, bir saat veya daha kısa sürede floresan vermeyen bir maddeyi floresan verir hale getiren spor enzimlerinden alfa-glikozidaz tayini ile çözülmüştür. Kısa sürede sonucun elde edilmesi, sterilizasyonun denetlenmesinde biyolojik indikatörlerin kullanımını yaygınlaştırmıştır (18).

Biyolojik indikatörlerin sonucunun pozitif olması halinde aşağıdaki muhtemel problemler değerlendirilmelidir (17):

A) Buhar sterilizatörlerinde;

- Yetersiz hava tahliyesi
- Uygun olmayan buhar kalitesi
- Sterilizasyon ısı ve süresinin yetersizliği
- Paketleme materyalinin uygun olmayışı
- Paketleme veya yükleme hataları

B) Diğer sterilizatörlerde;

- Ortam neminin uygun olmaması
- Gaz konsantrasyonunun yetersizliği

- Sterilizasyon ısı ve süresinin yetersizliği
- Paketleme materyalinin uygun olmayışı
- Paketleme veya yükleme hataları

Bu anlamda biyolojik indikatörler, hem sterilizasyonun etkinliğini kontrol etmekte hem de sterilizasyon sürecindeki problemlerin tanımlanmasına ve giderilmesine katkı sağlamaktadır.

2.8. Buhar Sterilizasyonda Kullanılan Biyolojik İndikatör Çeşitleri

Biyolojik indikatörlerde kullanılacak bakteri türü dikkatle seçilmelidir. Bakteri patojen olmamalı, kullanılacak sterilizasyon yöntemine sınır değere kadar dirençli olmalıdır (20-22).

Biyolojik indikatörler birinci, ikinci ve üçüncü kuşak indikatörler olmak üzere üç çeşittir. Birinci kuşak indikatörlerin spor süspansiyonları kağıt şeritler üzerindedir. Şeritler sterilizasyon sonrası aseptik ortamda nütrient sıvı ya da triptik soy besiyeri içerisine konur. Üreme varlığında sıvı besiyeri içerisinde bulanıklık gözlemlenir. Negatif sonuç vermek için 24-168 saat inkübasyon gereklidir. İkinci kuşak indikatörler, spor içeren şeritlerle birlikte besiyeri de içerir. İnokülasyon sırasında kontaminasyon riski taşımaz. Inkübasyon süresi 24-48 saat arasındadır. Üreme olması durumunda pH değişimine bağlı olarak renk değişimi gözlenir. Üçüncü kuşak indikatörler hızlı (rapid read-out) indikatörlerdir. Inkübasyon süresi 1-10 saat arasındadır. Merkezi sterilizasyon ünitesinde karantina süresini kısaltır (4, 5).

Biyolojik indikatörlerde türbidimetrik yöntem, florimetrik yöntem ve spektrofotometrik yöntem olmak üzere üç farklı tespit yöntemi vardır. Türbidimetrik yöntemde gözle görünür gerçek üreme tespiti yapılır. Bunun için 10^6 cfu/ml veya üzeri bakteri sayısı gerekmektedir. Bir spor jermantasyonu için geçen süre iki saattir. Gözle görünür türbidite oluşumu için 20 jenerasyona ihtiyaç vardır. Bu da 600 dakikaya eşdeğerdir. Florimetrik yöntem alfa-glukozidaz veya alfa-galaktozidaz aktivitesi ile floresans veren substratların kullanıldığı ve floresansın otomatik okuyucu tarafından okunduğu yöntemdir (5).

Alfa-glukozidaz aktivitesi logaritmik üreme fazında artar, stasyoner fazda plato çizer. Spektrofotometrik yöntemde ise otomatik okuyucu, enzim aktivitesini veya üremeyi renk veren ya da renk değiştiren substratlar kullanarak ölçer (23).

Sterilizasyon sonrası canlı kalan spor sayısı ile biyolojik indikatör üreme tespit zamanı arasında bir ters ilişki vardır. Canlı spor sayısı azaldıkça üreme tespit zamanı uzar. Perçin ve Durmaz (24) hızlı biyolojik indikatörler içerisine $1-10^6$ arasında spor inoküle ederek üreme tespit zamanını araştırdıkları çalışmada, bir spor içeren indikatörlerde üreme tespit süresinin dokuz saate kadar uzadığını; 10^6 spor içeren indikatörlerde ise iki saat içinde pozitif sonuç alındığını göstermişlerdir.

2.9. Sporulasyon Besiyeri:

Besiyeri, mikroorganizmaların üremeleri, saklanmaları ve transferleri için hazırlanan katı veya sıvı preparasyonlardır. Mikroorganizmaların kültürleri için hazırlanan herhangi bir besiyeri ortamında mikroorganizmanın türüne göre gerekli olan tüm beslenme gereksinimleri bulunmalıdır. Bunlar; karbon kaynağı, su, azot kaynağı, sülfat kaynağı, fosfat kaynağı, Fe^{+2} , Mg^{+2} vb. çeşitli mineraller olarak sıralanabilir. Hazırlanan besiyerinin pH'sı mikroorganizmaların üremesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir (25).

Isı direnç performansı iyi bilinen standart sporlar biyolojik indikatörün kalite garantisidir. Desimal azalma zamanı olarak bilinen D değeri, biyolojik indikatörün en önemli karakteristiğidir ve sporun üretim besiyeri, jermantasyon besiyeri, biyolojik indikatörün paketlenme materyali gibi birçok faktörden etkilenir. İdeal bir biyolojik indikatörde D_{121} değerinin en az 1.5 dakika olması gerekmektedir (20-22, 25).

Sella ve ark (26) soya fasülyesi artıkları ile hazırladıkları besiyerinin *B. atrophaeus* spor jermantasyonunu ve üremesini artırdığını göstermişler; Dlugokenski ve ark (27) ise soya fasülyesi artıkları ile hazırladıkları besiyerinde üretilen *G. stearothermophilus* sporlarında D_{121} değerinin ortalama 2.9 ± 0.5 dk olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada %0.8 maya özütü içeriğinin ısıyla hasarlanmış sporların jermantasyonunu artırdığını göstermişlerdir.

Biyolojik indikatör üretiminde klasik sporulasyon besiyeri kullanılır. Sporulasyon besiyerinin içeriği aşağıda gösterilmiştir:

Sporulasyon besiyeri;

• Jelatin	6 g
• Kazein	4 g
• Maya özütü	3 g
• Et özütü	1 g
• Dekstroz	1 g
• Manganez sülfat	0.3 g
• Agar	15 g

Hazırlanan sporulasyon besiyerinin otoklava girmeden önce mutlaka pH'sı ölçülmelidir. İdeal sporulasyon besiyeri pH'sı 7 olmalıdır. Besiyeri sterilizasyonu otoklavda 121°C'de, 15 dakikada sağlanır. Otoklavdan çıkan besiyeri spor üretimi için uygun olan plaklara dökülüp donduktan sonra kullanıma hazır hale gelir.

2.10. Spor Jerminasyon Besiyeri:

G. stearothermophilus sporları kullanılarak hazırlanan biyolojik indikatörler sterilizasyonun kontrol basamaklarını oluşturmaktadır. Biyolojik indikatörler içerisinde bulunan jerminasyon besiyerinde meydana gelen renk değişimi *G. stearothermophilus* sporlarının vejetatif forma dönüşmesi sonucunda meydana gelmektedir. Bu durum sterilizasyonun başarısız olduğunu gösterir. Birinci kuşak biyolojik indikatörlerde kullanılan jerminasyon besiyerinde triptik soy veya nütrient sıvı besiyeri gibi genel üretim besiyerleri kullanılırken; spektrofotometrik yöntemle üreme tespiti yapan 2. kuşak indikatörlerde nişasta ve CaCl_2 gibi üreme faktörleri ile birlikte pH indikatörü olarak brom krezol moru kullanılmaktadır. Florimetrik yöntem ile üreme tespiti yapan 3. kuşak indikatörlerde ise alfa ve beta-glukozidaz ile tepkimeye girerek floresans veren umbelliferon oluşumunu sağlayan 4-betilumbelliferon substratı kullanılmaktadır (22, 23).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Spor Üretimi

G. stearothermophilus ATCC 7953 sporları, triptik soy besiyeri kullanılarak falkon tüpleri içerisinde, 57°C'de bir gün boyunca bekletilip, vejetatif forma geçip üremesi sağlandı. Bulanıklaşan triptik soy besiyerinden nütrient agar besiyerine pasaj edilerek saf kültür olduğu doğrulandı.

3.2. Spor Üretiminde Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

3.2.1. Triptik Soy Sıvı Besiyerinin Hazırlanışı:

Bir litre distile suya 30 g Tryptic Soy Broth (BD, Fransa) eklenerek hazırlandı. Besiyerinin içerisinde; pankreatik kasein %1.7, soya özütü %0.3, dekstroz %0.25, NaClO₂ %0.5, K₂HPO₄ %0.25 oranında bulunmaktadır. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika sterilize edilip soğumaya bırakıldı.

3.2.2. Nutrient Agar Besiyerinin Hazırlanışı:

Ağzı vidalı, otoklavlanabilen cam şişeler içinde 1 litre distile suya 28 g Nutrient Agar (Himedia, Hindistan) eklenerek hazırlandı. Besiyerinin içerisinde; peptik sindirilmiş hayvan dokusu %0.5, NaClO₂ %0.5, et özütü %0.15, maya özütü %0.15, agar %1.5 oranında bulunmaktadır. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika sterilize olduktan sonra henüz sıcakken her petride 20 ml besiyeri olacak şekilde 90 mm çaplı steril petri plakları içerisine dağıtılarak donmaya bırakıldı.

3.2.3. AK Sporulasyon Agar Besiyerinin Hazırlanışı:

Ağzı vidalı otoklavlanabilen cam şişeler içinde 1 litre distile suya 30.8 g AK Sporulasyon Agar (Himedia, Hindistan) eklenerek hazırlandı. Besiyerinin içerisinde pankreatik jelatin %0.6, kasein enzim hidrolizatı %0.4, maya özütü %0.3, et özütü %0.15, dekstrozu %0.1, $MnSO_4$ %0.03, agar %1.5 oranında bulunmaktadır. Hazırlanan besiyeri 121°C’de 15 dakika sterilize olduktan sonra henüz sıcakken her flaskta 25 ml besiyeri olacak şekilde steril 50 ml’lik hücre kültürü flaskları içerisine dağıtılarak yarı yatık bir şekilde donmaya bırakıldı.

3.3.Sporların Pürifikasyonu

Vejetatif formdaki bakterilerden 0.5 Mc Farland bulanıklığına eşdeğer spor süspansiyonu hazırlanıp sporulasyon besiyeri içeren flasklar içerisine steril eküvyon çubuğu yardımı ile inoküle edildi. Daha sonra 57°C’de 4-5 gün arası inkübasyona bırakıldı. Beş günlük inkübasyon süresi sırasında, belli aralıklarla sporların oluşum süreleri, spor boyama yöntemiyle takip edildi. İnkübasyon süresi dolduktan sonra besiyeri yüzeyinden steril eküvyon çubuğu ile steril distile su içerisinde toplandı. İlk olarak falkon tüpündeki distile su içerisine toplanan sporlar +4°C’deki dolapta bir gün bekletilip vejetatif formdaki bakterilerin parçalanması sağlandı. Bir gün sonra, 100°C’de 20 dakika kaynatıldı. Bu basamakta sporların ısıya olan dayanıklılıklarından faydalanarak vejetatif formdaki basiller yok edildi. En son basamakta ise soğutmalı santrifüj kullanılarak 10.000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendikten sonra üstte kalan sıvı kısım dökülerek pellet alındı ve bu işlem 3 defa tekrarlandı. Elde edilen spor süspansiyonu spor boyama yöntemi kullanılarak incelendi. Bu incelemede, spor süspansiyonunda %90 oranında spor, %10 oranında vejetatif bakteri formu varlığı kabul edilebilir olarak değerlendirildi.

3.4. Spor Boyama Yöntemi

Spor oluşturan mikroorganizmalarda, vejetatif hücre normal boyalarla boyanabilirken, sporun etrafında kalın hücre duvarı olması ve geçirgenliğin zor olması nedeniyle farklı yollar izlenmektedir. Spor boyamada, malaşit yeşili ve safranin ile yapılan Writz-Conklin spor boyama yöntemi kullanıldı.

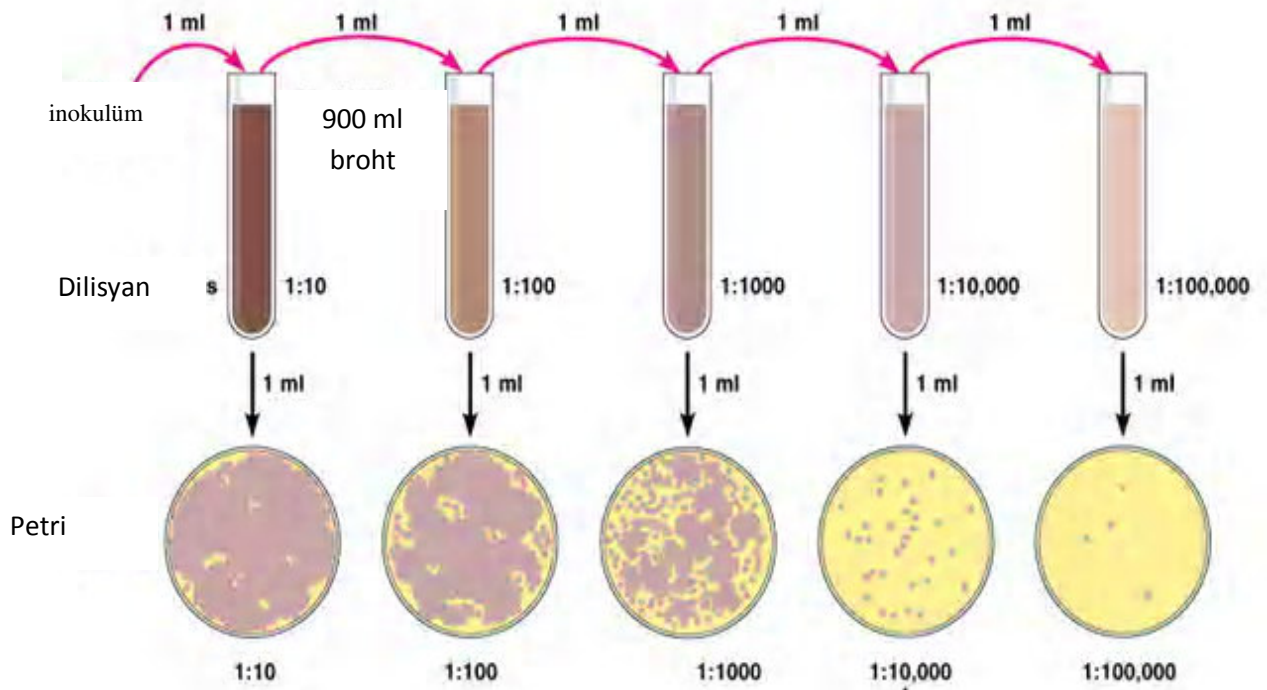
Malaşit yeşili (%5 aköz solüsyonu) kullanılarak yapılan boyama yönteminde önce preparat hazırlandı, kurutuldu ve ateş ile tespiti yapıldı. Lam üzerine aynı boyutta filtre

kağıdı koyularak kağıt, boya ile ıslatıldı. Cam beher kabı içerisinde kaynamakta olan suyun buharı ile ısıtılarak beş dakika boyunca bekletildi. Bu esnada ara ara kağıt, boya ile ıslatılmaya devam edildi. İşlem bittikten sonra filtre kağıdı lamin üzerinden alınıp atıldı. Lam, su ile yıkandıktan sonra safranin (%5) boyasında 30 saniye bekletilip tekrar su ile yıkayıp kurutuldu ve immersiyeon yağı kullanılarak 100'lük büyütmede incelendi. Mikroskop görüntüsünde, sporların yeşil, vejetatif formdaki bakterilerin ise kırmızı renkte boyandığı gözlemlendi.

3.5. Canlı Spor Sayımı

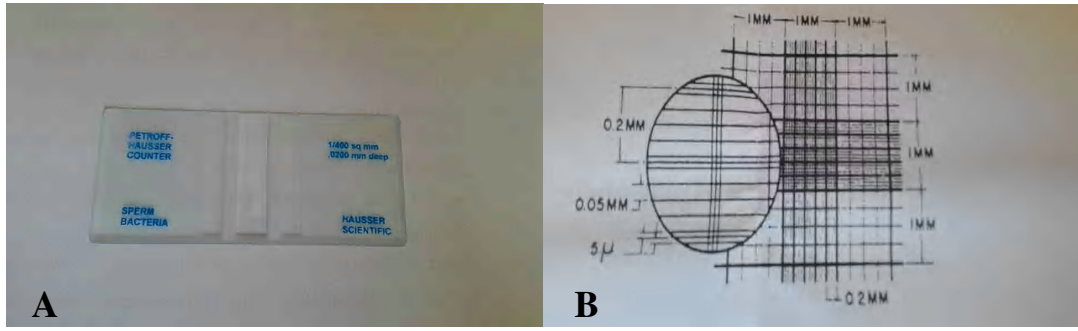
Mikroorganizmalarda canlı spor sayımı yapmak için plak sayım yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için içerisinde 900 µl serum fizyolojik bulunan steril cam tüplerde seri dilüsyon yapıldı. Hazırlanan tüplere 1'den başlayarak son tüpe kadar numaralar verildi. İlk tüpe 100 µl spor süspansiyonundan eklendi ve pipetaj yaparak homojen spor karışımı elde edildi. Bu işleme her bir önceki tüpten 100 µl alınarak son tüpe kadar devam edildi. En son tüpte yapılan pipetajdan sonraki sıvı dışarı atıldı.

İşlem tamamlandıktan sonra yine üzerine 1'den başlanarak numaralar verilen ve içerisinde nütrient agar bulunan petri plaklarına, 100'er µl spor süspansiyonu pipet yardımı ile eklendi. Daha sonra Drigalski spatülü ile petri plaklarının yüzeyine eşit olarak yayıldı. 57°C'de bir gün inkübe edildi. Petrideki koloniler sayıldı ve dilüsyon faktörüne göre mililitredeki CFU sayısı hesaplandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Seri dilisyon yöntemi ile mililitredeki koloni sayısının hesaplanması (28)

Spor sayımı, aynı zamanda Petroff Hausser Lamı kullanılarak doğrulandı (Şekil-3.2). Petroff Hausser Lamı yönteminin esası 0.02 mm^3 hacimde sayım yapılmasıdır. Lamın çukur bir kısmı vardır. Sayımı yapılacak sıvı konup, lamel kapatıldığında bu çukurda 0,02 mm yüksekliğinde bir sıvı kalır. Lamel konduktan sonra üzerine bastırılarak lamın çukuru dışında kalan düz kısmı ile lamel arasında bir sıvı katmanının kalması önlendi. Petroff Hausser Lamında 16 büyük kare ve her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapıldı ve elde edilen sayım sonucu, spor sayısı x dilüsyon x 50.000 formülü ile hesaplandı (Şekil 3.3).



Şekil.3.2. A: Petroff Hausser Lami

B: Petroff Hausser laminanın sayım kareleri

3.6. Jerminasyon Besiyerlerinin Hazırlanması

Spektrofotometrik yöntemde kullanılan klasik biyolojik indikatör besiyerlerinden farklı olarak jerminasyon hızını arttırmak için yeni besiyeri formülleri denendi. Yapılan bu denemelerde besiyeri içeriğinde değişikliğe gidildi ve üç farklı yeni besiyeri ortaya çıktı. Her besiyeri için ayrı ayrı pH ölçümü yapıldı ve pH aralığı 7 olarak ayarlandı. Tüm besiyerleri brom krezol moru içerdiğinden jerminasyon sonunda besiyeri renginin sarıya dönmesi beklendi.

3.6.1. Birinci Besiyeri Formülü:

Renk değişimi esasına dayalı biyolojik indikatörlerde kullanılan, klasik besiyeri olarak bilinen formülün içeriği aşağıdaki gibidir.

• Triptik soy	3 g
• Nişasta	0.1 g
• Brom krezol moru	0.002 g
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.018 g
• Distile su	100 ml

Hazırlanan besiyeri, karıştırıcı yardımıyla homojenize edildikten sonra pH ölçümü yapıldı ve 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

3.6.2. İkinci Besiyeri Formülü:

Bu besiyerinde vejetatif forma geçişi hızlandırmak için besiyerine dekstroz, pepton, et özütü ve skim milk eklendi. Besiyeri aşağıdaki gibi formüle edildi.

• Triptik soy	3 g
• Pepton	0.5 g
• Et özütü	0.3 g
• Brom krezol moru	0.002 g
• Dekstroz	0.25 g
• Skim milk	2 g
• Distile su	100 ml

Hazırlanan besiyeri, karıştırıcı yardımıyla homojenize edildikten sonra pH ölçümü yapıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

3.6.3.Üçüncü Besiyeri Formülü:

Bu besiyerinde vejetatif forma geçişi hızlandırmak için ikinci besiyerine ek olarak maya özütü, CaCO₃, çeşitli aminoasitler ve vitaminler eklendi. Besiyeri aşağıdaki gibi formüle edildi.

• Triptik soy	3 g
• Pepton	0.5 g
• Et özütü	0.3 g
• Maya özütü	0.5 g
• Dekstroz	0.25 g
• CaCO ₃	0.1 g
• Brom krezol moru	0.002 g
• L-alanin	10 mg
• L-asparjin	10 mg
• L-glutamin	40 mg
• L-sistin	10 mg
• L-triptofan	10 mg
• Tiamin	10 mg
• Pirüvat	500 mg
• Distile su	100 ml

Hazırlanan besiyeri, karıştırıcı yardımıyla homojenize edildikten sonra pH ölçümü yapıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

3.6.4.Dördüncü Besiyeri Formülü:

Bu besiyerinde ikinci besiyerinden farklı olarak et özütü, CaCl₂ ve whey proteini eklendi. Besiyeri aşağıdaki gibi formüle edildi.

• Triptik soy	3 g
• Et özütü	0.3 g
• Pepton	0.5 g
• Brom krezol moru	0.002 g
• Skim milk	2 g
• Whey protein karışımı*	8 g
• Maya özütü	0.5 g
• CaCl ₂	0.018 g
• Dekstroz	0.25 g
• Distile su	100 ml

***Whey proteininin (Multipower, Almanya) içeriği:** 2250 gramında; protein (22 g), karbonhidrat (2.5 g), şeker (2.1 g), lif (0.6 g), doymuş yağ (1.2 g), ve sodyumun yanı sıra 100 gram aminoasit [piridoksin (0.1 g), alanin (4.6 mg), arjinin (2.5 g), aspartik asit (11.6 g), sistin (2.0 g), histidin (19.6 g), izolösin (6.1 g), lösin (9.9 g), lizin (8.6 g), metiyonin (2.1 g), fenilalanin (2.6 g), prolin (6.3 g), serin (4.2 g), treonin (7.6 g), triptofan (1.6 g), tirozin (2.3 g), valin (1.6 g)] bulunmaktadır.

Hazırlanan besiyeri, karıştırıcı yardımıyla homojenize edildikten sonra pH ölçümü yapıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

3.7. Besiyerlerinde Jerminasyon Süresini Kısaltmak İçin Kullanılan Yöntemler

Farklı formüller denenerek hazırlanan jerminasyon besiyerlerinde jerminasyon süresini kısaltmak için kaynatma, dondurma ve farklı sıcaklık derecelerinde inkübasyon gibi çeşitli yöntemler uygulandı. Plak sayım yöntemiyle elde edilen canlı spor sayısına göre seri dilüsyon ile 10⁶ cfu/ml olacak şekilde spor süspansiyonu hazırlandı. Her bir yöntem iki farklı besiyeri üretim lotu ile üç kez tekrarlandı.

3.7.1. Birinci Yöntem; Farklı inkübasyon sıcaklıklarının denenmesi

Hazırlanan dört farklı jerminasyon besiyerinin her biri, altı farklı Durham tüpü içerisinde 900 µl olacak şekilde dağıtıldı. Her bir sıcaklık için spor eklenmemiş bir tüp negatif kontrol olarak diğeriyle birlikte etüve kaldırıldı. Her bir altılı setteki tüplerden üçüne 100'er µl spor süspansiyonu eklendi. Bu tüplerden biri 47°C'de, biri 57°C'de, diğeri ise 64°C'de inkübe edildi. Her yarım saatte bir gözle görünür renk değişimi kontrol edilerek jerminasyon süresi değerlendirildi.

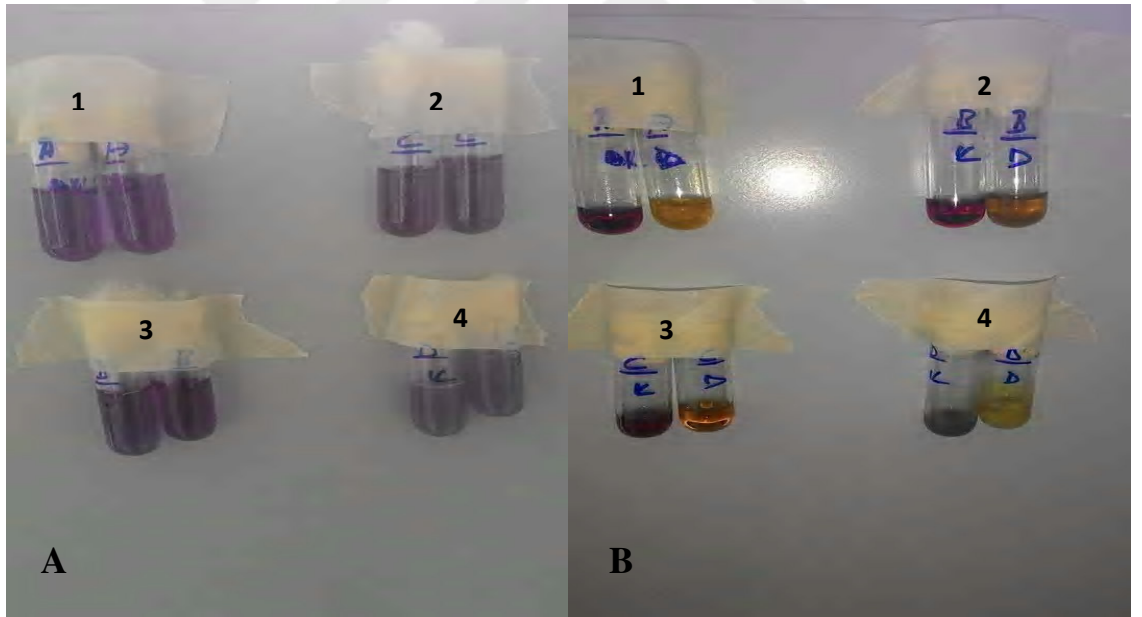
3.7.2. İkinci Yöntem; Kaynatma ve dondurma işlemlerinin jerminasyon süresine etkisinin incelenmesi

Her bir besiyeri için üçer adet steril Durham tüpü içerisine 900 µl jerminasyon besiyeri eklendi. İlk tüp renk kontrolü için spor eklenmeden inkübasyona bırakıldı. İkinci tüp, 100 µl spor süspansiyonu eklendikten sonra inkübasyona bırakıldı. Üçüncü tüp ise 100 µl spor süspansiyonu eklenip, 100°C’de 20 dakika kaynatıldıktan ve -20°C’de 20 dakika bekletildikten sonra, 64°C’de inkübasyona bırakıldı. Her yarım saatte bir gözle görünür renk değişimi kontrol edilerek jerminasyon süresi değerlendirildi.



4. BULGULAR

Besiyerine pH indikatörü olarak brom krezol moru eklendiğinden jermantasyon sonrası pH'nın düşmesi ile besiyeri renginin sarıya dönmesi izlenmiştir. Jermantasyon sonrası besiyerindeki renk değişimi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Jermantasyon Besiyerleri

A: İnkübasyon öncesi besiyeri rengi;

- 1- Klasik besiyeri
- 2- Skim milk içeren besiyeri
- 3- Aminoasit içeren besiyeri

4-Whey proteini ve skim milk içeren besiyeri

B: İnkübasyon sonrası besiyeri rengi;

1- Klasik besiyeri

2- Skim milk içeren besiyeri

3- Aminoasit içeren besiyeri

4-Whey proteini ve skim milk içeren besiyeri

İki farklı besiyeri üretim lotuyla elde edilen jerminasyon süreleri Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Birinci üretim lotu

	A				B				C				D			
BESİYERİ NO	1	2	3	ORT	1	2	3	ORT	1	2	3	ORT	1	2	3	ORT
47°C	>8	>8	>8	8	>8	>8	>8	8	>8	>8	>8	8	>8	>8	>8	8
57°C	5,5	5,5	6	5,5	5,5	6	6	6	6,5	6	6,5	6,5	4,5	5	5,5	5
64°C	5,5	5	5	5	5	5,5	5	5,5	5,5	5,5	6	5,5	4,5	5	4,5	4
64°C+K.D.	5,5	5,5	5,5	5,5	6	5,5	5	5,5	5,5	6	5	5,5	4,5	4	4,5	4,5

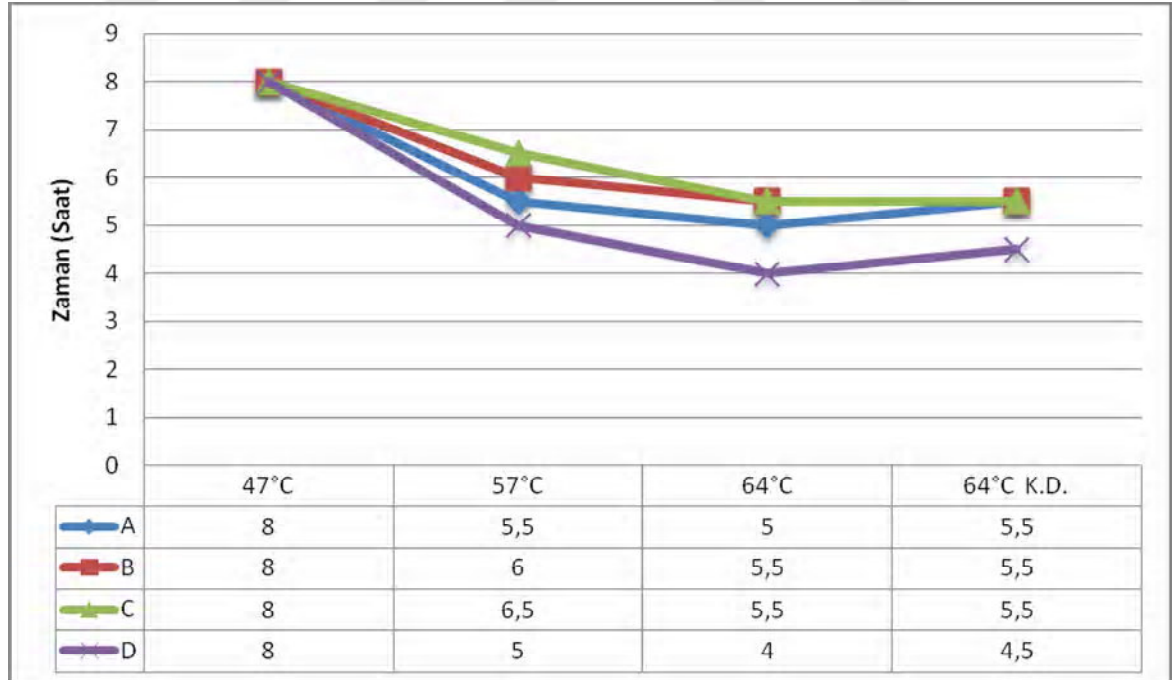
A: Birinci besiyeri; **B:** İkinci besiyeri; **C:**Üçüncü besiyeri; **D:**Dördüncü besiyeri; **K.D.:** Kaynatma ve dondurma

Tablo 4.2. İkinci üretim lotu

	A				B				C				D			
BESİYERİ NO	1	2	3	ORT	1	2	3	ORT	1	2	3	ORT	1	2	3	ORT
47°C	>8	>8	>8	8	>8	>8	>8	8	>8	>8	>8	8	>8	>8	>8	8
57°C	5,5	5,5	6	5,5	5,5	6	6	6	6,5	6	6,5	6,5	4,5	5	5,5	5
64°C	5,5	5	5	5	5	5,5	5	5,5	5,5	5,5	6	5,5	4,5	5	4,5	4
64°C+K.D.	5,5	5,5	5,5	5,5	6	5,5	5	5,5	5,5	6	5	5,5	4,5	4	4,5	4,5

A: Birinci besiyeri; B: İkinci besiyeri; C:Üçüncü besiyeri; D:Dördüncü besiyeri; K.D.: Kaynatma ve dondurma

Tablo 4.1 ve Tablo4.2’de sunulan sonuçların ortalamalarına göre farklı yöntemlerde elde edilen jerminasyon süreleri Grafik 4.1’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre jerminasyon süresinin 64°C’deki inkübasyonda en kısa olduğu belirlenmiştir.

**Şekil 4.2.** Farklı besiyerlerinde elde edilen ortalama jerminasyon süreleri

A: Birinci besiyeri; B: İkinci besiyeri; C:Üçüncü besiyeri; D:Dördüncü besiyeri; K.D.: Kaynatma ve dondurma

5 TARTIŞMA ve SONUÇ

G. stearothermophilus, biyolojik indikatörler içerisinde patojen olmayan ve sterilizasyon yöntemlerinde kullanılacak en dayanıklı sporlara sahip olan bakteri türü olarak seçilmiştir. Biyolojik indikatör olarak kullanılan spor süspansiyonları sterilizasyon aşamasında biyolojik kanıt sunmaktadır. Sterilizasyon yöntemlerinden ilki basınçlı buhar sterilizasyon yöntemidir ve kullanımına 1800'lü yılların sonunda başlanmıştır. Basınçlı buhar sterilizasyonu için zaman, ısı ve doymuş buhar parametrelerinin standardı sağlanmalı ve kontrol edilmelidir (29).

Flaş sterilizasyon yöntemi ile ilgili yapılan bir çalışmada Rutala ve ark (4) paketlenmemiş malzemelerin acil olarak steril edilmesinde üç dakikada sterilizasyon sağlayan flaş sterilizasyon yöntemini kullanmışlardır. Sterilizasyonun etkinliğini değerlendirmek için biyolojik indikatörler 24 saatlik inkübasyon periyodundan sonra değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 60 dakikada sonuç veren yeni bir biyolojik indikatörü, flaş sterilizasyonun monitörizasyonda kullanılan üç konvansiyonel, 24 saatlik biyolojik indikatör ve üç kimyasal indikatör ile kıyaslamışlardır. Test edilen konvansiyonel biyolojik indikatörler Attest 1261, Proof flash, Assert; hızlı okunan biyolojik indikatör Attest 1291 ve kimyasal indikatörler ise Comply, Incheque ve Termolog'dur. Hızlı sonuç veren Attest 1291, *G. stearothermophilus*'un varlığını floresan vermeyen bir substratın enzimatik yıkımı sonucunda oluşan floresan veren ürünleri okuyarak tespit eder. Yer çekimli otoklavda 132°C'deki sağ kalım; konvansiyonel biyolojik indikatör için 56°C'de 24 saat inkübasyon sonunda besiyerindeki renk değişikliği ile, hızlı okunan biyolojik indikatörde 60 dakikadaki floresans ile, kimyasal indikatörlerde ise renk

değişikliği ile ölçülmüştür. İki dakikalık maruziyet sonrası konvansiyonel biyolojik indikatörlerde spor sağ kalımı Attest 1261'de %90, Proof flash'da %48, Assert'te ise %40 olarak tespit edilmiştir. Üç dakikalık maruziyette sırasıyla %23, %3, %0; dört dakikalık maruziyette ise sırasıyla %3, %0, %0 olarak bulunmuştur. Hızlı sonuç veren Attest 1291'in 2, 3 ve 4. dakikadaki enzim aktivitesi sırasıyla %88, %33, %0 olarak bulunmuştur. Kimyasal indikatörler olan Comply, Incheque, Thermolog'da sterilizasyon sonunda sıfıncı dakikada başarısızlık oranı üçünde de %100 olarak bulunmuştur ve birinci dakikada başarısızlık oranı sırasıyla %100, %100, %45; ikinci dakikada %0, %0, %28; üçüncü dakikada %0, %0, %18; beşinci dakikada ise %0, %0, %0 olarak tespit edilmiştir. Hızlı sonuç veren Attest 1291'in duyarlılığı konvansiyonel biyolojik indikatörlerle paralellik göstermiştir.

Bu verilere göre 60 dakikalık hızlı sonuç veren biyolojik indikatörler, 24 saatte sonuç veren biyolojik indikatörlerle eşdeğerdir. Kimyasal indikatörlerin buhar gibi işlem koşullarına çok duyarlı olduğu için sterilizasyon uygunluğunu değerlendirmeye elverişli olmadığı saptanmıştır.

G. stearothermophilus, biyoteknoloji endüstrisinde kullanılmakta ve içerdiği enzimler sayesinde antibiyotik varlığını tespit etmeye yardımcı olmaktadır. Bu olayı deneysel olarak gözlemlemek için yapılan bir çalışmada, Kumar ve ark (3) farklı miktarlarda antibiyotik eklenmiş süt örnekleri ile birlikte dekstroz, whey proteini ve skim milk içeren karışıma aktif sporlar inoküle ederek 64°C'de dört saate kadar inkübe etmişler ve antibiyotiksiz sütlerde jerminasyon besiyeri renginin iki saat içinde mordan sarıya döndüğünü göstermişlerdir. Besiyerinin mordan sarıya dönmesi, spor jerminasyonu sırasında açığa çıkan dipikolinik aside bağlı olup sütte antibiyotik kalıntısı olmadığını göstermiştir. Bu çalışmada sporlarda mikroskopik değerlendirme de yapılmıştır. Endosporun 'core' bölgesinin hidrasyonu ile vejetatif hücrenin belirginleşmesi, bir saatte görülmüş ve sporların tamamen vejetatif forma dönüşü ise 3-4 saatin sonunda gözlemlenmiştir. Yazarlar dormant sporların ortamdaki değişiklikleri hızla algıladığı ve eş zamanlı olarak vejetatif faza girerek sütteki kontaminant varlığına veya yokluğuna göre üredikleri sonucuna varmışlardır. Kullandıkları whey proteini ve skim milk içeren karışımın spor jerminasyonu için seçici bir karışım olduğunu iddia etmişlerdir (3). Çalışmamızda da whey proteini ve skim milk içeren besiyerinin tek başına skim milk ya

da tek başına aminoasit karışımı içeren besiyerine oranla kısa sürede spor jermantasyonuna ortam sağladığını gözlemledik.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *G. stearothermophilus* sporlarının çeşitli çevresel faktörlerden etkilendiği ve bunun da sporların biyolojik indikatör olarak performansını etkilediği anlaşılmıştır. Sporulasyon esnasındaki çevresel faktörler ısı direnci gibi spor özelliklerini etkilemektedir. Bu çevresel faktörler; besiyeri içeriğindeki düşük agar konsantrasyonu, aminoasitler ve başlangıç pH'sıdır (2).

Sporulasyon sırasındaki sıcaklık, pH, besin maddeleri, iyon konsantrasyonu gibi birçok çevresel faktörün D değerini etkilediği bilinmektedir. Yüksek düzeydeki iki değerli katyonlarla spora ait dipikolinik asit şelasyonu ısı direncini artırır. Örneğin yüksek düzeyde kalsiyum iyonları içeren sporlar, manganez ve magnezyum içerenlere göre daha dirençlidir (2).

Guizelini ve ark (27) sporulasyon sırasındaki çevresel faktörlerin ısı direncine katkısını araştırdıkları çalışmada başlangıç pH'sı, besin konsantrasyonu, tripton, pepton, et özütü, maya özütü, manganez sülfat, magnezyum sülfat, kalsiyum klorit ve potasyum fosfatın üç basamaklı değişken optimizasyon yöntemi ile çalışmışlardır. En önemli değişkenin başlangıç pH'sı olduğunu göstermişlerdir. pH'nın 8.5 civarında alkali olduğu, düşük besin konsantrasyonu içeren besiyerinde D_{121} değerinin dört kat arttığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda sporulasyon sırasında optimal çevre koşullarını sağladığı bilinen AK sporulasyon besiyeri bu nedenle tercih edilmiştir.

Rowe ve ark (30) manganez konsantrasyonunun önemli olduğunu 5×10^{-3} M'dan daha yüksek fosfat konsantrasyonunun katı agarda koloni oluşumunu önlediğini göstermişlerdir. Bu tür termofilik bakteriler için glikoz, fruktoz, sükroz, gliserol ve nişastanın üremeyi kolaylaştırdığını; sitrat, alfa ketoglutarat, süksinat, fumarat, malat, asetat ve laktatın ise üremeye bir etkisi olmadığını bildirilmişlerdir. Aminoasit karışımlarının ise oksotrofik mutantların üretilmesi için yararlı olduğu gösterilmiştir. Bu anlamda özellikle glutamat, histidin, izolösin, metionin ve valin varlığının optimal üreme için yararlı olduğu gösterilmiştir (30). Yapılan çalışmaları bizim yaptığımız çalışma ile kıyaslayacak olursak eklediğimiz L-alanin, L-asparjin, L-glutamin, L-sistin, L-triptofan, tiamin ve pirüvat gibi aminoasitler kullanarak hazırladığımız besiyerinin

jerminasyon süresi whey proteini ekleyerek hazırladığımız besiyerinden daha uzun bulunmuştur.

Biyolojik indikatörlerin temel prensibi buhar sterilizasyon süresince yüksek ısı direnci gösteren standart spor populasyonlarının kullanılmasıdır. Bu sporların ölümü ya da canlı kalması sterilizasyon döngüsünün etkinliğini gösteririr (30). Kendinden besiyerli kapalı indikatörlerde kullanılan jerminasyon besiyerinin ısı ile hasar görmüş sporları canlandırmaya uygun olması gereklidir. Aksi takdirde yanlış negatif sonuçlar alınabilir. Hasar görmüş sporlar oksokrofik özellik gösterir. Bu nedenle bu oksokrofik sporların üretilmesi için besiyerine eklenecek üreme faktörleri önemlidir. Tekrarlanabilir bir sterilite güvence düzeyini sağlayabilmek için bu üreme faktörlerinin optimal olması üreticiye yada üretim lotuna göre değişkenlik göstermemesi gerekir (30). Genellikle biyolojik indikatörlerde ticari olarak da temin edilebilen valide edilmiş jerminasyon besiyerinin kullanılması önerilir.

Dulugokanski ve ark (27) soya fasülyesi artıkları ile hazırladıkları besiyerinin spor jerminasyonu ve üremesi için başarılı bir besiyeri olduğunu göstermişlerdir. Soya fasülyesinden etanol distilasyonu sonrası geriye kalan özüt de jerminasyon besiyerinde kullanılabilmektedir. %1.4 soya fasülyesi özütü ve %0.8 maya özütü içeren besiyerinin ısı ile hasar görmüş sporların jerminasyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmaların ışığında çalışmamızda kullandığımız whey proteinin ve skim milk içeren besiyerine benzer oranlarda maya özütü de eklenmiştir.

Shintani ve ark (31) altı farklı üretici firmadan temin ettikleri triptik soy besiyerini test etmek için 10^6 cfu/ml *G. stearothermophilus* sporları içeren biyolojik indikatörleri 121°C 'de 3-5 dakika sterilizasyona maruz bıraktıktan sonra bu besiyerine inokule etmiş ve $55\pm 2^\circ\text{C}$ 'de yedi gün inkübe etmiştir. Ayrıca bu besiyerine glikoz, sodyum pürivat, kalsiyum laktat, kalsiyum karbonat, L-alanin, vitamin karışımı, aminoasit karışımı, maya özütü, nişasta, katalaz ve süt ekleyerek jerminasyona etkisini değerlendirmiştir. Farklı firmalara ait besiyeri ile elde edilen bakteri sayılarında üç dakika %554 beş dakika sterilizasyon sonrası ise %1309 fark olduğu ve bunun da ISO11138'de (22) önerilen oranların çok üstünde olduğu belirtilmiştir. Spor populasyonlarının üretilmesinde besiyerinin önemli olduğu vurgulanmıştır; kalsiyum, glikoz ve aminoasit karışımının bu sporların üremesi için gerekli glikoz oranının %0.5'in üstünde olması

gerektiğini göstermişlerdir. Bu nedenle bu çalışmada hazırlanan tüm formüllere 0.5 g glikoz eklenmiştir.

Biyolojik indikatörler, buhar sterilizasyon yönteminin biyolojik kontrolünde önemli ve gereklidir. İnkübasyon süresi kısaldıkça maliyeti artmaktadır. Bu çalışmada formülize ettiğimiz whey proteini ve skim milk içeren jerminasyon besiyeri, spor jerminasyon süresini standart besiyerine göre yaklaşık bir saat kısaltmış ve dört saate düşürmüştür. Sonucun gözle kolayca okunabilir olması da bir diğer avantajdır. Bu nedenle hazırlanan jerminasyon besiyeri formülü biyolojik indikatörlerde kullanılmak üzere ekonomik bir alternatif olabilir.



6. KAYNAKLAR

- 1 Akkaya SE, Kıvanç M. Termofil Bakteriler; sıcak su kaynaklarında yaşayan Gr (-) basillerin izolasyon ve identifikasyon yöntemleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR 2009; 07: 1-23.
- 2 Belquis PG, Luciana PSV, Sandra BRS, et al. Study of the influence of sporulation condions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development biological indicators for steam sterilization. Arch Microbiol 2012; 194: 991-999.
- 3 Kumar N, Raghu HV, Kumar A, et al. Spore germination based assay for monitoring antibiyotic residues in milk at dairy farm. World J Microbiol Biotechnol 2012; 28: 2559-2566.
- 4 Rutala WA, Gergen MF, Weber DJ. Evaluation of a rapid readout biological indicator for flash sterilization with three biological indicators and three chemical indicators. Infect Control Hosp Epidemiol 1993; 14: 390-394.
- 5 Gillis JR, Mosley GA, Kowalski JB et al, Understanding Biological Indicator Gow-Out Times. Pharmaceutical Technology 2010; 34.
- 6 Niall A L, Alex RH, Sean V S, Kendra ES. *Bacillus* and other Aerobic Endospore-Forming Bacteria. In: Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Vol 1, Versalovic J, Carrol KC, Funke G, Jorgenseb JH, Landry ML, Warnock DW (eds), ASM Press, Washington 2011:381.

- 7 Logan NA, De Vos P, Dinsdale A. Genus *Geobacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes. De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH (eds), Whitman WB Springer, New York, 2009; 144-160.
- 8 Ash, C, Farrow J A, Wallbanks S, et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* 1991; 13: 202-206.
- 9 Nazina TN, Ivanova AE Blagov AV. Microbiological characteristics of oil formations of Mangyshlak Peninsula. *Microbiology* 1993; 62: 216-221.
- 10 Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, et al. Physiological and phylogenetic Diversity of Thermophilic Spore-forming Hydrocarbonoxidizing Bacteria from Oil Fields. *Microbiology* 2000; 69: 96-102.
- 11 Kalaylı E, Beyatlı Y. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA' ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. 2003;01: 24-35.
- 12 Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. From petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermo-catenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 2001; 51: 433-446.
- 13 Thompson PJ, Thames OA. Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Microbiol* 1967; 15: 975-9.
- 14 Kalogridou-Vassiliadu D. Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. *J. Dairy Sci* 1992; 75: 2681–2686.

- 15 ISO 17665. Sterilization of health care products - Moist heat- Part 1: Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices, 2006.
- 16 NEN-EN-ISO 14161. Sterilization of health care products - Biological indicators - Guidance for the selection, use and interpretation of results; 2008.
- 17 Günaydın M, Perçin D, Esen Ş ve ark; Sterilizasyon Dezenfeksiyon Rehberi, Günaydın M, Perçin D, Esen Ş, Zenciroğlu D (eds), Arvin Yayınevi, İstanbul, 2015.
- 18 Rutala WA, Weber DC, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008.
- 19 Antisepsis, Disinfection and Sterilization. McDonnell GE. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington DC, USA 2007.
- 20 United States Pharmacopeia. Biological indicators - resistance and performance tests, 29th edn. The United States Pharmacopeia. Pharmacopeial Convention, Rockville, 2006: 2501–2503
- 21 (2007), Food and Drug Administration–FDA, <http://www.fda.gov/cdrh/ost/guidance/321.html> (22.08.2015)
- 22 ISO 11138. Sterilization of health care products – Biological Indicators, 2006.
- 23 Albert H, Davies DJG, Woodson LP, Soper CJ. Biologic indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biologic utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. J Appl Microbiol 1998; 85: 865-874.
- 24 Percin D, Durmaz S. Evaluation of Detection Times of 3M Attest and Etigam Bright-Cheq Rapid Readout Biological Indicators on a Simulative Model, 12th World Sterilization Congress. 12-15 October 2011, Estoril, Portugal.
- 25 Trumalai RS. Types of Biological Indicators. Microbiology and Sterility Assurance 1992; 27: 2820.

- 26 Sella SRBR, Dlugokenski RE, Guizelini BP, et al. Selection and optimization of *Bacillus atrophaeus* inoculum medium and its effect on spore yield and thermal resistance. Appl Biochem Biotechnol 2008; 151: 380–392.
- 27 Dlugokenski REF, Sella SRBR, Guizelini BP, et al. Use of soybean vinasses as a germinant medium for a *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 sterilization biological indicator. Appl Microbiol Biotechnol 2011; 90: 713-719.
- 28 (2009).<http://closses.midlanstech.edu.tr> (21.01.2016).
- 29 (2007).<http://www.das.org.tr/kitaplar/kitap2007/sunu/ayse.ari-das-2007-sunu.pdf> (21.01.2016).
- 30 Rowe JJ, Goldberg ID, Amelunxen RE. Development of defined and minimal media for the growth of *Bacillus stearothermophilus*. Journal of Bacteriology 1975; 124: 279-284.
- 31 Shintani H. Importance considering increased recovery of injured microorganisms to attain reproducible sterilization validation. Pharmaceut Anal Acta 2013; 4: 1-5.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULUN ADI : ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
 AÇIK ADRES : Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
 TELEFON : 0 352 437 49 10 - 11
 FAKS : 0 352 437 52 05
 E-POSTA : byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI

Geobacillus stearothermophilus spor germinasyonunu erken belirlemede farklı yöntemlerin araştırılması

ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU

KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI
ÜNVANI/ADI/SOYADI

Prof.Dr. Duygu Perçin Renders

KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ
UZMANLIK ALANI

Tıbbi Mikrobiyoloji

KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI

Prof.Dr. Duygu Perçin Renders

KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ
BULUNDUĞU MERKEZ

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı/Kayseri

DESTEKLEYİCİ

DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ

ARAŞTIRMA FAZİ

FAZ 1

FAZ 2

FAZ 3

FAZ 4

ARAŞTIRMANIN TÜRÜ

Yeni Bir Endikasyon

Yüksek Doz Araştırması

Diğer İse Belirtiniz

X

Yüksek Lisans Tezi

ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER

TEKMERKEZ

X

ÇOKMERKEZ

ULUSAL

X

ULUSLARARASI

DEĞERLENDİRİLEN
BELGELER

BELGE ADI

Tarihi

Versiyon Numarası

Dili

ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ

Türkçe

İngilizce

Diğer

BİLGİLENDİRİLMİŞ
GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Türkçe

İngilizce

Diğer

OLGU RAPOR FORMU

Türkçe

İngilizce

Diğer

ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ

Türkçe

İngilizce

Diğer

DEĞERLENDİRİLEN
DİĞER BELGELER

BELGE ADI

Açıklama

TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ

SIGORTA

ARAŞTIRMA BUTÇESİ

BİYOLOJİK MATERYEL
TRANSFER FORMU

HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ

İLAN

YILLIK BİLDİRİM

SONUÇ RAPORU

ASLI GİBİDİR

Bahri YANCAR

Fakülte Şefi



Sayı: 30881949/

Tarih :12.01.2016

Konu: Tez Çalışması

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Prof. Dr. Duygu Perçin'in danışmanlığını yürüttüğü "*Geobacillus stearothermophilus* Spor Jermantasyonunu Erken Belirlemede Farklı Yöntemlerin Araştırılması" başlıklı tez çalışmasının Anabilim Dalımız Laboratuvarlarında yürütülmesinde herhangi bir sakınca bulunmamaktadır.

Gereğini bilgilerinize saygılarımla arz ederim.

Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ
Tıbbi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı Başkanı

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Gülşah DUMLU

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 11 Eylül 1988, Kayseri

Medeni Durumu: Bekar

Tel: +90 0506 7832513

email: gulsahdumlu@gmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 38039

Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	EÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji	2012
Lise	Fevzi Çakmak Lisesi	2006

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2012- Halen	Erciyes Üniversitesi Gülser- Dr.Mustafa GÜNDOĞDU Merkez Laboratuvarı	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce