



SU VE SAĞLIK

**“Halk Sağlığının Korunmasına Yönelik Su Alanındaki
Mevzuatın Uyumlaştırılması ve Uygulanmasında
Sağlık Bakanlığının Güçlendirilmesi” Eşleştirme Projesi**

TR 04-IB-EN- 04

*Twinning Project for Strengthening the Ministry of Health to
Harmonise and Implement Legislation in the Field of Water for
Public Health Protection*

**“Yüzme Sularından Numune Alımı,
Taşınması ve Analizlerine İlişkin El Kitabı”**

Ankara
2008



SU VE SAĞLIK

**“Yüzme Sularından Numune Alımı,
Taşınması ve Analizlerine İlişkin El Kitabı”**

**Ankara
2008**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	VII
1. BÖLÜM	1
GİRİŞ	1
1. Sudan Kaynaklanan Riskler	1
2. Yüzme Sularıyla İlgili Olarak Dikkate Alınması Gereken Riskler	2
2. BÖLÜM	4
NUMUNE ALIMI	4
1. NUMUNE ALIMININ ÖNEMİ	4
1.1.1. Analizlerin amaçları	5
1.1.2. Numune alımı	5
1.1.3. Numune alım yeri	5
1.1.4. Numune şişelerinin önemi	5
1.1.5. Numunelerin saklanması	6
1.1.6. Alanda yapılması zorunlu olan analizler	6
1.1.7. Sonuç	6
2. MİKROBİYOLOJİ VE FİZİKO-KİMYA ANALİZLERİNE YÖNELİK NUMUNE ALIMLARI	6
2.1. Numune alımı neden düzgün olmalıdır ?	6
2.2. İyi bir numune alımının önemi	7
2.3. Numune alım noktasının seçilmesi	7
2.4. Yüzme suyundan numune alma teknikleri	8
2.4.1. Numune alımından sorumlu kişi	8
2.4.2. Numune alma	8
2.4.3. Numunelerin taşınması	9
2.4.4. Numunelerin laboratuvara teslim edilmesi	10
2.4.5. Numunelere yönelik laboratuvarında yapılan işlemler	10
3. BÖLÜM	11
MİKROBİYOLOJİK ANALİZ	11
1. SUDA YAŞAYAN PATOJENLERE İLİŞKİN BİLGİLER	11
2. FEKAL KİRLİLİK GÖSTERGESİ OLAN BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI	12
2.1. <i>Escherichia coli</i> ve koliform bakterilerin araştırılması ve sayımı – Bölüm 1: Membran filtreleme yöntemi (TS EN ISO 9308-1)	12
2.1.1. Amaç	12
2.1.2. Kapsam	12
2.1.3. Standartlar	12
2.1.4. Prensipler	12
2.1.5. Kalite uygulaması: YÖNTEM ŞEKLİ	13
2.1.6. Analizin maliyeti	17
2.2. Yüzey ve atık sularda <i>Escherichia coli</i> ve koliform bakterilerin araştırılması ve sayımı - Bölüm 3: Sıvı ortama ekim (TS EN ISO 9308-3) ile küçültme yöntemi (<i>En Muhtemel Sayı</i>)	17
2.2.1. Amaç	17
2.2.2. Kapsam	17
2.2.3. Standartlar	17
2.2.4. Prensipler	17

2.2.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	18
2.2.6. Analizin maliyeti:	21
2.3. Bağırsak enterokoklarının araştırılması ve sayımı Bölüm 2: Membran filtreleme yöntemi (TS EN ISO 7899-2).....	21
2.3.1. Amaç.....	21
2.3.2. Kapsam	21
2.3.3. Standartlar.....	21
2.3.4. Prensip.....	21
2.3.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	22
2.3.6. Analizin maliyeti	24
2.4. Yüzey ve atık sularda bağırsak enterokoklarının araştırılması ve sayımı - Bölüm 1: Sıvı ortama ekim ile küçültme yöntemi (En Muhtemel Sayı) (TS EN ISO 7899-1).....	24
2.4.1. Amaç.....	24
2.4.2. Kapsam	25
2.4.3 Standartlar	25
2.4.4. Prensip.....	25
2.4.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	25
2.4.6. Analizin maliyeti:	29
3. PATOJEN ETKEN ARAŞTIRMASI	29
3.1. <i>Salmonella</i> araştırması (TS ISO 6340)	29
3.1.1. Amaç.....	29
3.1.2. Kapsam	29
3.1.3. Standartlar.....	29
3.1.4. Prensip.....	29
3.1.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	30
3.1.6. Analizin maliyeti	35
3.2. Patojen stafilokok araştırması ve sayımı membran filtreleme yöntemi (XP T 90-412 ve NF T 90-421).....	35
3.2.1. Amaç.....	35
3.2.2. Kapsam	35
3.2.3. Standartlar.....	36
3.2.4. Prensip.....	36
3.2.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	36
3.2.6. ANALİZİN MALİYETİ	39
3.3. Enterovirüslerin araştırılması	40
3.3.1. Amaç.....	40
3.3.2. Kapsam	40
3.3.3. Standartlar.....	40
3.3.4. Prensip.....	40
3.3.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	41
3.3.6. Analizin maliyeti	48
4. BÖLÜM	49
KİMYASAL ANALİZ.....	49
1. DENİZ SULARININ ÖZELLİKLERİ.....	49
2. TAYİN EDİLECEK ELEMENTLER.....	49

2.1. Çözünmüş florür, klorür, nitrit, ortofosfat, bromür, nitrat ve sülfat iyonlarının sıvı iyon kromatografisi ile tayini (TS ISO 10304-1: Az kirlenmiş sular için metot)	49
2.1.1. Amaç.....	49
2.1.2. Kapsam	50
2.1.3. Standartlar.....	50
2.1.4. Prensipt.....	50
2.1.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	51
2.1.6. Analiz Maliyeti	53
2.2. Fenol İndeksinin Tayini	53
2.2.1. Amaç.....	53
2.2.2. Kapsam	54
2.2.3. Standartlar.....	54
2.2.4. Prensipt.....	54
2.2.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	55
2.2.6. Analiz Maliyeti	57
2.3. Civa Tayini.....	57
2.3.1. Amaç.....	57
2.3.2. Kapsam	57
2.3.3. Standartlar.....	57
2.3.4. Prensipt.....	58
2.3.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	59
2.3.6. Analiz Maliyeti	61
2.4 Yüksek Derecede Uçucu Halojenli Hidrokarbonların Tayini	61
(Gaz kromatografisi metodu ISO 10301 / TS 9266: Headspace Gaz Kromatografisi Metodu).....	61
2.4.1. Amaç.....	61
2.4.2. Kapsam	62
2.4.3. Standartlar.....	62
2.4.4. Prensipt.....	62
2.4.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	64
2.4.6. Analiz Maliyeti	67
2.5. Hidrokarbonların Tayini	67
2.5.1. Amaç.....	67
2.5.2. Kapsam.....	67
2.5.3. Standartlar.....	67
2.5.4. Prensipt.....	67
2.5.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	68
2.5.6. Analiz Maliyeti	71
2.6. Mikrosistinlerin Tayini	71
2.6.1. Amaç.....	71
2.6.2. Kapsam	71
2.6.3. Standartlar.....	72
2.6.4. Prensipt.....	72
2.6.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ	73
2.6.6. Analiz Maliyeti	75
3. DİĞER ELEMENTLER.....	75

5. BÖLÜM.....	76
KALİTE UYGULAMASI / AKREDİTASYON	76
1. NEDEN	76
2. ÖNEM	76
3. TS EN ISO 17025 STANDARDININ ŞARTLARI	79
3.1. Yönetime İlişkin Şartlar.....	79
3.2. Teknik Şartlar	83
3.2.1. Yerleşim ve Çevre Şartları	84
3.2.2. Cihazlara İlişkin Tavsiyeler	84
3.2.3. Kullanılan Malzeme ve Reaktiflere İlişkin Tavsiyeler	87
3.2.4. Yöntem (Metod) Talimatları.....	88
4. KALİTE GÜVENCESİNİN MALİYETİ	89
BIBLIOGRAPHIE.....	101

ÖNSÖZ

Halk Sağlığının Korunması Amacıyla Su Alanındaki Mevzuatın Uyumlaştırılması ve Uygulanması İçin Sağlık Bakanlığı'nın Güçlendirilmesi

Su ve Sağlıkla İlgili 3 AB Direktifinin Uygulanması

TR 04-IB-EN- 04

Bu Proje Avrupa Birliği Katılım Öncesi Ekonomik Programı Tarafından Finanse Edilmiştir.

Projenin Özeti

Eşleştirme Projesi

Eşleştirme projeleri ortak Avrupa mevzuatının tümü olan, "Topluluk Müktesabati"nin yürütülmesi için gerekli olan kurumların yapılıp yapılmasında aday ülkelere yardımcı olan araçlardır. Eşleştirme projeleri yoluyla Avrupa Komisyonu, Avrupa Birliği Üye Ülkelerinden gelen uzun dönem bir uzman (Yerleşik Eşleştirme Danışmanı -RTA-) ile kısa dönem uzmanların (STE) kendi uzmanlık ve deneyimlerini, faydalanıcı ülkelerin kurumları ile paylaşarak bu ülkelerin çeşitli konulardaki spesifik Avrupa mevzuatlarını düzgün bir şekilde uygulamalarına yardımcı olunduğu projelerin finansmanı için fon sağlar.

Projenin Amacı

Projenin ana amacı Avrupa Birliğine katılım aşamasında İçme Suyu, Yüzme Suyu ve Mineralli Sular konusunda Türkiye'nin hazırlanmasıdır. Bununla birlikte, Türk Hükümetinin çevre ve halk sağlığı alanındaki yasal, kurumsal, teknik ve yatırım konularındaki mevcut kapasitesinin uyumlaştırılma aşamasında güçlendirilmesini de kapsamaktadır.

Katılım sürecinde, AB Çevre Mevzuatına uyumu sağlama Türkiye'nin karşılaşılabileceği en büyük zorluktan biri olacaktır. Türkiye'nin rolü ve sorumlulukları 2003'deki Katılım ortaklığında, son olarak gözden geçirilen 23 Ocak 2006 Konsey kararı prensiplerinde, önceliklerinde ve Türkiye için Katılım ortaklığı(2006/35/EC) koşulları kapsamında ana kilometre taşları olarak dizilmişlerdir.

Proje süresinde Fransız uzmanlar Türk uzmanlar ile birlikte; Avrupa Birliği müktesabati doğrultusunda ulusal mevzuat taslağının hazırlanması, stratejilerin geliştirilmesi, Avrupa Birliğinin eski (76/160/EEC) ve yeni (2006/7/EC) Yüzme Suları Direktifi, İçme Suları Direktifi (98/83/EC) ve Mineralli Sular Direktifi (80/777/EEC) çerçevesinde öngörmekte olduğu gerekliliklere uyulmasını sağlayıcı faaliyet planlarının, programların uygulanması, yönetmelik, rapor, rehber kitap ve el kitapçıklarının hazırlanması alanlarında çalışmışlardır.

Proje süresince, yukarıda bahsedilen geçen hedeflere ulaşmak için, Eşleştirme Projesi boyunca uluslararası uzmanlık yardımının alındığı çok yönlü bir yaklaşım benimsenmiştir.

Sonuç olarak bu proje, Türkiye'nin AB pazarında daha uygun İnsan Sağlığı Korunması ve çevrenin Su ve Sağlık alanında daha fonksiyonel olmasını yönlendirecektir.

Projeyle elde edilmek istenen temel sonuç ise; Su ve Sağlık alanında İnsan Sağlığı ve Çevrenin daha iyi bir şekilde korunmasının sağlanması ve Türkiye'nin genişlemekte olan AB pazarına daha iyi uyum sağlayarak çalışmalarını yürütmesidir.

Eşleştirme Projesi Ortakları

Türk Tarafı Ortakları: Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Çevre Sağlığı Daire Başkanlığı

Fransız Tarafı Ortakları: Ekoloji ve Sürdürülebilir Kalkınma Bakanlığı, Sağlık ve Dayanışma Bakanlığı, Paris'teki Uluslararası Su Ofisi

3 Direktif

Yüzme Suyu Direktifi 76/160/EEC ve 2006/7/EC

Yüzme sularının kaliteleri ile ilgili olan bu direktiflerin (76/160/EEC ve 2006/7/EC) amacı, insan sağlığının yüzme sularının ve rekreasyonel amaçlı olarak kullanılan suların kontamine olması sonucu ortaya çıkabilecek yan etkilerden korunmasının sağlanmasıdır.

İçme Suyu Direktifi 98/83/EC

İnsani tüketim amaçlı suların kalitesi ile ilgili olan bu direktifin (98/83/EC) amacı insani tüketim amaçlı suların "sağlıklı ve temiz" olduklarının güvence altına alınması böylelikle insan sağlığının söz konusu sularda oluşabilecek kontaminasyonların yan etkilerinden korunabilmesidir. Kamu su dağıtım şebekelerinden verilmekte olan sular ile şişelenmiş sularda uygulanan bir direktiftir.

Mineralli Sular Direktifi 80/777/EEC

Doğal mineralli suların işletimi ve pazarlanması ile ilgili olan bu direktifin amacı (80/777/EC) söz konusu suların pazarda "doğal mineralli su" olarak satılabilmesi için uyması gereken kalite standartları ve ilgili diğer koşulların tanımlanmasıdır. Bu standart ve koşullara göre doğal mineralli sular 98/83/EC direktifindeki tanım içerisine girmese dahi halk sağlığı korunmalıdır.

Mevcut Dökümanın Özeti

Mevcut döküman Yüzme Suyu numunesi alımı, numunelerin korunması, numunelerin taşınması ve analizlerine ilişkin Türk protokollerinin değerlendirilmesi amacıyla Fransız Kısa Dönem Uzmanları ile Türk tarafı uzmanlarının yapmış oldukları grup çalışmalarının bir ürünüdür.

5 bölümden oluşmaktadır:

İlk bölüm suyla taşınan riskleri,

İkinci bölüm numune alımına ilişkin tavsiyeleri,

Üçüncü bölüm mikrobiyoloji analiz protokollerini,

Dördüncü bölüm kimya analiz protokollerini,

Beşinci bölüm kalite yönetimini kapsamaktadır.

Dökümanın hazırlanmasındaki temel amaç; Sağlık Bakanlığı'na bağlı tüm laboratuvarların benimsedikleri yaklaşımların ve elde ettikleri sonuçların karşılaştırılabilir olması amacıyla ortak bir dökümandan faydalanmalarını ve böylelikle uymaları gereken Normları benimsemelerini sağlamaktır.

Bu döküman hazırlanırken, özellikle metnin gözden geçirilmesi aşamasında eşleştirme projesi ekibine yardımcı olan uzmanlar şunlardır:

Fransız Uzmanlar;

Ms Benedicte WELTE (Eau de Paris), MM Andre-François BOSCHET (RTA), Pr Alain COUTE (MHN Paris, Doğal Tarih Müzesi) Benoit GASSILLOUD (AFSSA Fransız Gıda Güvenliği Ajansı), Bernard HUGUES (Nice Laboratuvarı), Roger JEANNOT (BRGM, Coğrafi İzleme Ajansı), Antoine MONTIEL (Eau de Paris), Jean-Francois MUNOZ (AFSSA Fransız Gıda Güvenliği Ajansı), Christophe ROSIN (AFSSA Fransız Gıda Güvenliği Ajansı)

Türk Uzmanları;

Serdar Alp SUBAŞI (Bil.Uzm.Gıda Müh.), Selma YILDIZ (Kimya Yük.Müh.), Meral YENİOVA (Dr.Kimya Yük.Müh.), Selçuk BODRURLU (Mikrobiyoloji Uzm.) Umut BERBEROĞLU (Mikrobiyoloji Uzm.), Yurdanur ŞENTÜRK (Mikrobiyoloji Uzm.), Sibel ATBAŞ (Bil.Uzm.Kimy.), Tahsin ÇANLI (Dr.Zir.Yük.Müh.) Pınar ÜNAL (Bil.Uzm.Gıda Müh.), Oya POYRAZOĞLU (Zir.Yük.Müh.), Ayşenur ÇULHA (Bil.Uzm.Kimy.), Sevil BAŞPINAR (Dr.Zir.Yük.Müh.).

Söz konusu döküman eşleştirme projesi boyunca hazırlanmış olan 8 dökümandan biridir. Diğer dökümanlar ise şunlardır:

Yüzme Suları alanında: Yüzme Suları Rehber Kitapçığı (Aktivite başlığı; A14, B16, D14) ve Yüzme Sularından numune alımı, saklanması, taşınması ve analizine ilişkin el kitapçığı (Aktivite başlığı; C15).

İçme Suları alanında: İçme Suları Rehber Kitapçığı (Aktivite başlığı; A24), İçme Sularından numune alımı, saklanması, taşınması ve analizine ilişkin el kitapçığı (Aktivite başlığı; C25), Bilgilendirme El Kitabı (Aktivite başlığı; B26), Kalite kazalarının yönetimi rehber kitapçığı (Aktivite başlığı; D23).

Mineralli Sular alanında: Su kaynağının izlenmesi, su kaynağından numune alımı ve analiz metodlarına ilişkin rehber kitapçık (Aktivite başlığı; A34), Şişeleme ve etiketleme yükümlülüklerine ilişkin rehber kitapçık (Aktivite başlığı; A35).

Mevcut metin eşleştirme projesi ekibi tarafından Aralık 2007'de hazırlanmıştır. Bu metnin içeriği Avrupa Birliği'nin resmi pozisyonunu temsil etmez.

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Her kullanıma uygun su yoktur. Her kullanıma yönelik olarak uyulması gereken ayrı kriterler veya standartlar mevcuttur.

Bu sebepten dolayı uygulanacak olan standartlar doğrudan söz konusu suyun kullanım alanına bağlı olarak değişmektedir.

Bu standartlar uygulanırken dikkat edilmesi gereken nokta, kullanılan suyun doğrudan ya da dolaylı olarak insan sağlığı açısından herhangi bir risk teşkil etmemesi ve çeşitli hastalıklara yol açmamasıdır.

Bu alandaki yeni yükümlülükler 1992 yılı direktiflerinin oluşturulmasıyla birlikte Dünya Sağlık Örgütü tarafından son derece büyük bir dikkatle göz önünde bulundurulmaya başlanmıştır.

Suyun birçok farklı kullanım alanı mevcuttur. Bu alanlardan yüzme suları üzerine yoğunlaşılacak olunursa, bu sular kullanılırken; belli başlı risklerin saptanması ve bu suların yol açtığı kimi risklerin değerlendirilmesi gerekmektedir.

Yüzme Suları Açısından Belli Başlı Riskler Şunlardır:

- suyun yutulması ile oluşan riskler;
- suyla temas ile oluşan riskler;
- suyun inhalasyonu yoluyla oluşan riskler.

1. Sudan Kaynaklanan Riskler

Bu tür riskler, sudan kaynaklanması söz konusu olabilecek bir tehlikeyle karşı karşıya kalma olasılığından gelmektedir; tehlikenin insan üzerindeki etkisi ne kadar büyük olursa risk de o kadar büyük olur: son derece ağır hastalıkların oluşması, iyileştirilmesi zor hastalıkların oluşması, ciddi travmalara sebebiyet vermesi söz konusu olabilir.

Riskler şunlar olabilir:

- Fiziksel riskler: Sıcaklık, radyasyona maruz kalma...
- Kimyasal riskler: toksik mineraller, organik maddeler, toksinler...
- Mikrobiyolojik riskler: patojenler: virüsler, bakteriler, parazitler...

Tüm bu risklerle ilgili olarak dikkate alınması gereken nokta risklerin önemlerine göre bir sıralamaya sokulmalarıdır, böylelikle konuya rahatça odaklanılarak gerek su kalitesinin yönetiminin daha iyi bir şekilde yapılması sağlanabilir gerekse de su kalitesi açısından tehdit oluşturabilecek kritik öğeler saptanabilir.

Bu amaçla şu şekilde bir ayırım yapılabilir:

- ✓ **Kısa vadeli riskler;** sadece tek bir “bardak” lık miktara denk gelen ölçüde su yutulması veya suyla tek bir defa temas edilmesinden kaynaklanan risklerdir.
- ✓ **Orta vadeli riskler;** yüzme suyuyla bir yıl veya bir yıldan daha uzun bir süre zarfı boyunca tekrarlanan şekillerde temas edilmesi sonucu oluşan risklerdir.
- ✓ **Uzun vadeli riskler;** çok uzun bir süre zarfı boyunca yüzme suyuna temas edilmesi yoluyla oluşan risklerdir.

2. Yüzme Sularıyla İlgili Olarak Dikkate Alınması Gereken Riskler

- Yüzme suyu olarak adlandırılan sular yüzme faaliyetlerinin veya suyla yapılan aktivitelerin gerçekleştirildiği sulardır.
- Kısa vadeli riskler özellikle mikrobiyolojik açıdan oluşan risklerle ilgilidir.

Kısa vadeli kimyasal risklerin oluşmasına son derece az rastlanmakla birlikte bu gibi riskler yalnızca toksin maddeler içeren algların veya su yüzeyinde hidrokarbürlerin bulunması gibi spesifik durumları kapsamaktadır.

Bu durumların yanısıra siyanobakteri kökenli derma-toksinler gibi çeşitli cilt allerjenleri içeren sularla temas edilmesi sonucu oluşan allerji vakaları da mevcuttur.

Kısa vadeli riskler arasında mikrobiyolojik kökenli olanlar bu tür risklerin ciddi ve iyileştirilmesi en zor olanlarıdır.

Bu sebepten ötürü suların mikrobiyolojik kaliteleri sıkça yapılan kontrollerle güvence altına alınmalıdır.

Bu kontroller gerek doğrudan yapılan patojen araştırmaları ile (ancak bu araştırmalar son derece nadir olarak yapılır ve kimi durumlarda da yapılması imkansızdır) gerekse de fekal kontaminasyon göstergelerinin araştırılması ile gerçekleştirilebilir.

Spesifik olarak araştırılması mümkün olan patojenler arasından legionella ve amibler (*Neagleria fowleri*) den bahsedilebilir. Bu iki patojen bilhassa sıcaklıkları genellikle 30°C üzerindeki sıcak sularda bulunmaktadır.

Legionellalar yüzme aktivitesi veya su sporları sırasında yutulan az miktardaki sulardan kaynaklanmakta olup; özellikle sıcaklıkları 30°C üzerindeki sıcak veya durgun sularda üremektedirler.

- **Orta vadeli riskler**, mikrobiyolojiyle ilgili riskleri içermemektedir. Bu riskler özellikle kimyasal toksinleri kapsamaktadır. Yüzme sularında bu risk göz önünde bulundurulmamaktadır.
- **Uzun vadeli riskler**, uzun yıllar boyunca suyun yutulmasıyla ortaya çıkmaktadır. Yüzme suyuyla ilgili olarak bu riskler göz önünde bulundurulmamaktadır.

Mikrobiyolojik riskler gelecekte çok daha fazla önem kazanacak riskler olacaktır:

- ✓ Kişiler doğal bağışıklıkları giderek azalacaktır;
- ✓ Yaşam süresi giderek artan nüfusun bağışıklık sistemleri nüfusun artan yaş düzeyi ile azalacaktır.

2. BÖLÜM

NUMUNE ALIMI

1. NUMUNE ALIMININ ÖNEMİ

Bir kalite sisteminin güvenilirliği sistemdeki en zayıf halkaya bağlıdır. Suyun kalitesinin sağlanması açısından bu en zayıf halkayı numune alımları oluşturmaktadır.

Gerçekten de en iyi ekipmanların kullanıldığı laboratuvar metodları da dahil olmak üzere, numune alımları sırasında yapılan hataları düzeltebilecek bir laboratuvar metodu mevcut değildir.

Numune alımları sırasında yapılan hatalar, analiz hatalarının %80ini açıklamaktadır; bu hatalı sonuçlar yanlış yorumlamalara yol açmaktadır.

Su analizi kendi başına bir işlemin sonu değildir, yalnızca karar verilmesine yardımcı olan bir araçtır. Analiz sonrası verilen kararlar hatalı ise, bu hatalar sağlık, ekonomik ve medyatik bağlamda bir çok ciddi sonuç doğurabilir.

Dolayısıyla analizlerin ne amaçla talep edildiklerinin bilinmesi zorunludur.

Numune alımları sırasında bir çok parametre göz önünde bulundurulmalıdır, bunlar:

- Numune alım yeri;
- Numune alım saati;
- Numune alım biçimi;
- Alanda yapılan hazırlık çalışmaları;
- Alanda yapılan analizler;
- Seçilen şişenin tipi;
- Numune olarak alınan su miktarı;
- Laboratuvara gönderilmeden önce numunelerin saklanma koşulları;
- Laboratuvara gönderilmeden önce numunelerin saklanma süresi.

1.1.1. Analizlerin amaçları

Analizlerin amaçları; sonuçların kantitatif standartlara uygun olmasının sağlanmasıdır.

1.1.2. Numune alımı

Bir numune alımı;

- Herhangi biri tarafından yapılamaz;
- Herhangi bir zamanda yapılamaz;
- Herhangi bir Şişe kullanılamaz;
- Herhangi bir miktarda alınamaz.

Bir numune;

- Herhangi bir yerde saklanamaz;
- Herhangi bir Şekilde saklanamaz;
- Herhangi bir süre boyunca saklanamaz.

1.1.3. Numune alım yeri

Yüzme sularında numuneler 1m'lik derinlikten ve su yüzeyinin 30 cm aşağısından alınmalıdır.

Her halükarda alınan numunenin daha sonrasında analizi yapılacak olanı temsil edecek nitelikte olduğunun teyit edilmesi gerekmektedir.

1.1.4. Numune Şişelerinin nemi

Şişeleme sırasında 3 etken göz önünde bulundurulmalıdır, bunlar:

- Şişenin cinsi;
- Şişenin ağzının kapatılma biçimi;
- Şişe tekrardan kullanılabilen bir Şişe ise yıkanma biçimi.

Şişenin cinsi seçilirken Şunlar göz önünde bulundurulmalıdır:

- Kullanılacak materyalin, analizi yapılacak suyun kalitesi üzerindeki etkisi;
- Miktar tayini yapılacak elementin: ıŐıėa karşı duyarlılığı;

Tek kullanımlık Şişe seçilmesinin maliyeti.

Genellikle göz önünde bulundurulanlar:

- Mikrobiyolojik analizler için steril Şişelerin kullanılması gerekir. Tekrardan kullanılabilir Şişeler genellikle cam olup, irradasyon yoluyla sterilize edilen tek kullanımlıklar ise genellikle polietilendir.

1.1.5. Numunelerin saklanması

Buradaki amaç numunelerin en iyi koşullarda saklanmasının sağlanmasıdır.

Analiz sonuçlarının yorumlanması sırasında herhangi bir soruna yol açmayacak şekilde şişelerin ne kadar süre boyunca saklanabileceği bilinmelidir.

Numunede ortaya çıkabilecek kayıplar gerek çeper üzerindeki adsorpsiyondan gerekse de çökeltmeden kaynaklanabilir.

1.1.6. Alanda yapılması zorunlu olan analizler

Şunları kapsar:

- Sıcaklık
- Görünüm
- Koku ve tat
- pH

Kimi ön arıtlar da zorunlu olarak alanda yapılmalıdır, bunlar:

- yüksek hacimli su numunelerinin filtrasyonları (virüsler, salmonella)

1.1.7. Sonuç

Numune alım işleminin düzgün yapılması daha sonraki aşamalarda yapılacak kalite analizleri için son derece önemlidir.

Numune alımından sorumlu kişiler laboratuvar teknisyenleri düzeyinde bir teknik bilgi düzeyine sahip olmalıdır.

Numune alımından sorumlu kişiler analizlerin hangi amaçlarla talep edildiğini ve analizler sırasında hangi parametrelere bakılacağını bilmelidirler.

Bu bilgiler olmaksızın yapılan işlemlerde çeşitli hataların oluşması muhtemeldir.

2. MİKROBİYOLOJİ VE FİZİKO-KİMYA ANALİZLERİNE YÖNELİK NUMUNE ALIMLARI

2.1. Numune alımı neden düzgün olmalıdır ?

Kalite Güvencesine sahip bir laboratuvar analizlerinin kalitelerini garanti altına almak için numune alımlarının düzgün bir şekilde yapıldığını güvence altına almalıdır.

Kötü koşullarda alınmış olan bir numunenin « analizinin iyi yapılması » bir anlam ifade etmez.

Analiz sonuçlarını etkileyen bir çok etken vardır, bunlar: şişenin tipi, numunenin taşınma biçimi ve laboratuvara teslim edilme süresi, vsr...

Laboratuvar yalnızca numune alımında kullanılacak şişeyi kendisi verdiğinde kullanılan şişenin uygunluğundan emin olabilir.

Kullanılacak şişenin cinsi ve hacmine, camdan veya steril plastikten olmasına yapılacak olan analizlere göre karar verilmelidir (örn: virüs 100 L.).

Su zamana ve çevre koşullarına göre değişebilen bir ortamdır, bu koşullar: sıcaklık, güneş, depolama biçimidir. Mikrobiyolojik analizler için alınan numuneler analizden önce soğuk bir yerde muhafaza edilmelidir.

2.2. İyi bir numune alımının önemi

Su numunesi alımı, daha sonrasında laboratuvar tarafından yapılacak su analizlerinin temsili olabilmesi ve geçerli sayılmasını mümkün kılan temel işlemdir.

Numune alımı « belirli bir zamana ait olan » su numunesinin kalitesi hakkında fikir vermektedir.

Belirli bir numune alım noktasından, zaman içerisinde birden çok numune alımı gerçekleştiriliyorsa, buradaki su kalitesinin zaman içerisinde değişimi hakkında bilgi edilebilir: daha önceki tarihlerde elde edilen sonuçlar olası mikrobiyolojik kontaminasyon risklerinin saptanmasını mümkün kılar.

2.3. Numune alım noktasının seçilmesi

Sağlık izlemeleri yalnızca analiz amaçlı yapılan belirli sayıdaki numune alım işleminin yürütülmesinden ibaret değildir. Bu izlemelerin etkili olabilmesi için yüzme alanlarının ve çevresinin detaylı şekilde incelenmesi gerekmektedir (alanın fiziki özelliklerinin, alanda veya alandaki suların akış yönünde atık olup olmadığının incelenmesi, vs.). Bu bilgiler gerek yüzme alanı genişliğinin gerekse de numune alım noktalarının saptanmasını sağlamaktadır.

Kavramsal açıdan yüzme alanının kalitesi “temsili nokta” olarak adlandırılan ve belirli bir noktadan tek bir defa alınan numuneler ile temsil edilir. Alan koşulları kayda değer ölçüde değişmedikçe bu nokta sabit kalır. Bu nokta öncelikle maksimum yüzücü sayısının olduğu bölgeye göre seçilir. Çevresel yapısı itibarıyla yüzme alanının, sağlık kontrollerinin öngördüğü zorunluluklara uygun olarak homojen bir yapıda olduğu varsayılır.

2.4. Yüzme suyundan numune alma teknikleri

2.4.1. Numune alımından sorumlu kişi

- Numune alımından sorumlu kişi numune alımını yapacağı noktaları düzgün bir şekilde saptamış olmalıdır.
- Yeterli bilgiye sahip olmalıdır ve alanı iyi tanımalıdır (gerekli görüldüğü takdirde numune alımı öncesi alan ziyaret edilmelidir).
- Numune alımını yapan kişinin elleri temiz olmalıdır. Ellerini bir deri dezenfektanı ile ya da dezenfektan bir mendil ile temizleyip dezenfekte ederek numunenin her türlü kontaminasyonunu önlemelidir.
- Numune alımı sırasında, numune alımını yapan kişi alandaki diğer kişilerden ayırt edilebilir olmalıdır, bunun için özel bir giysi veya spesifik bir uniforma giymelidir.

2.4.2. Numune alma

Numune alım işlemlerinin izlenebilirliği

Numune alımından itibaren, numune alımında kullanılan tüm şişeler ayırtedilebilir olmalıdır.

Numune alımından sorumlu kişi numune alım işlemlerinin izlenebilirliğinin sağlanabilmesi için bir numune alım fişi kullanmalı ve şu bilgileri kaydetmelidir:

- Numune alım tarih ve saati;
- Numune alımını yapan kişinin kimliği;
- Numune alım yerinin tanımı (adresi veya referans kodu);
- Numune alım yeri üzerindeki numune alım noktasının ayrıntılı tanımı;
- Numune alım noktasının tipi;
- Numune başına alınan kullanılan şişe sayısı;
- Alanda yapılan ölçümlerde kullanılan araç gereçlerin referansları;
- Alanda yapılan ölçümlerin sonuçları (Sıcaklık, çözülmüş oksijen, tuzluluk, vsr...);
- Yapılmış olan diğer kontrol sonuçlarının halka duyurulması için afişlerin konmuş olduğunun teyidi;
- Numune alımı sırasında yüzme alanında bulunan yüzücülerin yaklaşık sayısı;
- Yüzme alanında veya su yüzeyinde görülen her türlü anormallik (yüzey aktif maddesi, suyun görünümüne ilişkin anormallikler, vsr...).

Numune alım modelleri

Numune alım yeri

- Numune alımları yüzme alanı sınırları içerisinde yapılmalıdır. Numune alımından sorumlu kişi tıpkı bir yüzücü gibi kalçasına kadar suya yürüyerek girmelidir. Numune alımından sorumlu kişi en az 1m derinlikteki bir sudan, su yüzeyinin 30 cm aşağısından numune almalıdır.

Numune alım teknikleri

- Numune alımları gerek manuel metotlarla gerekse de bir numune alım çubuğu aracılığıyla gerçekleştirilebilir.
- Mikrobiyoloji analizleri için yapılan numune alımlarında steril şişe kullanılmalıdır.
- Numune şişeden taşırılmamalıdır.
- Şişenin yaklaşık 1/10'u oranında bir hava payı bırakılmalıdır.
- Şişenin ağzının ve kapağının iç bölümünün elle tutulmamasına özen gösterilmelidir.
- Şişe çıkmayan bir tükenmez kalemle işaretlenerek tanımlanmalıdır.
- Fiziko-kimyasal analizlerin zorunlu olduğu durumlarda şişe su yüzeyinin 30 cm aşağısından, şişenin iç bölümü, kapağı ve ağzının tutulmamasına dikkat edilerek doldurulmalıdır.
- Su yüzeyinden hidrokarbür film mevcudiyeti durumunda, numune alımı hidrokarbür film numunesinin de alınabilmesine olanak tanıyabilecek ve böylelikle mevcut hidrokarbür çeşidinin laboratuvar tarafından saptanmasına olanak tanınacak bir şekilde su yüzeyinden alınmalıdır.
- Fiziko-kimyasal analizlerin yapılması halinde, şişe tipi; TS 5106 ISO 5667-3 standardının öngördüğü noktalar referans alınarak analiz edilecek parametreye göre seçilir.

Alanda yapılan ölçümler

- Numune alımından sorumlu kişi yüzme alanının kirli olması halinde alanda şu fiziko-kimyasal parametreleri ölçmeli ve değerlendirmelidir:
 - * renk
 - * mineral yağlar,
 - * yüzey aktif maddeler (köpük),
 - * fenoller (koku),
 - * görünüş
- Numune alımından sorumlu kişi sağlık kontrolü sonuçlarının alana düzgün bir şekilde asıldığını (görünür bir şekilde ve güncel olarak) teyit etmelidir.
- Numune alımından sorumlu kişi sonuçların yorumlanmasını kolaylaştırıcı göstergeleri not etmelidir:
 - * meteorolojik koşullar,
 - * saat,
 - * yüzücü sayısı,
 - * yüzme alanı etrafında oluşan önemli değişiklikler.

2.4.3. Numunelerin taşınması

Şişeler laboratuvara mümkün olan en kısa sürede götürülmelidir.

Numunelerin maksimum taşınma süreleri numune alımından sorumlu birim ile analizlerden sorumlu kurum arasında yapılacak bir anlaşma ile belirlenmelidir.

Numune alımı ile analiz arasındaki numunelerin maksimum saklanma süreleri yürürlükte olan analitik standartlarda belirtilen maddelere uygun olmalıdır.

Taşıma süresi 4 saatten az ise; şişeler numunelerin $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de saklanabildiği izotermik kaplarda taşınmalıdır.

Taşıma süresi 4 saatten fazla ise; numuneler izotermik kaplar yerine bir soğutucuya konmalıdır.

Taşıma süresi 8 saatten fazla ise; soğutucuda bulunan kapların sıcaklık kontrolünün yapılması gerekmektedir.

2.4.4 Numunelerin laboratuvara teslim edilmesi

Laboratuvara getirilen numunelerin, laboratuvarın kabuledilebilirlik kriterlerine göre denetlenmesi (şişelerin iyi durumda oldukları, dış görünümünün tatminkar olduğu, alınmış su miktarlarının analizleri yapmaya yeterli düzeyde olduğu, su numunesi sıcaklığının uygun olduğu, vsr...) ve böylelikle bu kriterlere göre laboratuvar tarafından teslim alınmaya uygun olduklarının saptanması gerekmektedir.

Şişeler kabul edilebilirlik kriterlerine uygun değilse, laboratuvar numuneleri teslim almayı kabul etmez, bu durumda laboratuvar numuneyi alan kurum ile temasa geçerek kurumu durumdan haberdar etmelidir.

2.4.5. Numunelere yönelik laboratuvarda yapılan işlemler

Analizler numunelerin alındığı gün, mümkün olduğunca kısa sürede yapılmalıdır. Mikrobiyolojik analizler maksimum 24 saat içerisinde yapılmalıyken, fiziko-kimya parametrelerine ilişkin analizler TS 5106 ISO 5667-3 standardında belirtilen maksimum süre zarfını geçmeyecek şekilde yapılmalıdır. Söz konusu standarta göre numuneler $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklarında saklanmalıdır.

3. BÖLÜM

MİKROBİYOLOJİK ANALİZ

1. SUDA YAŞAYAN PATOJENLERE İLİŞKİN BİLGİLER

Özellikle ılıman bölgelerde normalde suda bulunan patojenler yoktur, bunların neredeyse tamamı su tarafından taşınarak gelen patojenlerdir.

Patojenler üzerindeki araştırmalar 1880'den bu yana çok büyük ilerleme göstermiştir. Bu tarih suya bağlı hastalıkların çoğunun mikrobiyolojik orijinli olmalarından şüphelenilmeye başlandığı tarihtir.

1800'lerin sonuna, 1900'lerin başına doğru suya bağlı epidemilerde patojenlerin özellikle suda aranmasına karar verilmiştir; tifo, kolera, vb.

Kısa bir sürenin ardından aşağıdakilere karar verilmiştir:

- Analitik cevaplar çok uzun sürede elde edildiği için, suya bağlı risklerin yönetimine ve önleyici tedbirlerin alınmasına uygunsuzdu,
- Analiz edilen suların az miktarda oluşu, bu bakterilerin sularda seyrek oluşu ve su kütlelerindeki dağılımlarının homojen olmayışından dolayı bir analiz sonucundan suyun toplam kütlesi için bir anlam çıkarmak mümkün olmuyordu,
- Patojenin insan vücudu içerisinde çoğalması mümkün olduğundan sıfır risk elde etmek için kabul edilebilir mevcut patojen seviyesini belirlemek mümkün değildi.

20. yüzyılın başından itibaren patojenleri suda aramak yerine suda olmadıklarını tespit etmek için dolaylı yolların kullanılmasına karar verilmiştir.

Bu dolaylı yol birçok hipoteze dayandırılmıştı. Bunlar:

1. Suyla aktarılan patojenler sindirim sisteminde kendi kendilerine çoğalan patojenlerdir. Bu yüzden bu patojenlerin orijini suyla taşınan sıcakkanlı hayvan dışkılarından başkası olamaz. Bu patojenler ılıman bölgelerde doğal ortamlarda çoğalmazlar.
2. Suyun içindeki fekal maddelerde bulunan bakteriler fekal kontaminasyonun kanıtı olarak düşünülebilir

Bu yüzden suların mikrobiyolojik bakımdan kalitesini değerlendirmek için suyla aktarılan patojenleri araştırmak yerine sadece fekal kontaminasyonu kanıtlayan bakterilerin mevcudiyetini araştırma önerisi yapılmıştır (*Escherichia coli* ve *bağırsak* enterokokları (Fekal Streptokoklar)). Bu araştırmalar suların iki kategoriye ayrılmasını mümkün kılmıştır: kontamine su ve kontamine olmayan su.

Sulardaki bu iki parametrenin araştırılması yüzme sularının bakteriyolojik kalitesi açısından iyi bir güvence oluşturur.

2. FEKAL KİRLİLİK GÖSTERGESİ OLAN BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI

2.1. *Escherichia coli* ve koliform bakterilerin araştırılması ve sayımı – Bölüm 1: Membran filtreleme yöntemi (TS EN ISO 9308-1)

2.1.1. Amaç

E.coli her zaman fekal kökenli olan yegane bakteridir. Bu bağlamda, bir fekal kirlenmeyi gösteren spesifik gösterge organizması olarak kabul edilmektedir. Su içerisinde *E.coli* tanısının yapılması, enterik patojen organizmaların olası varlıklarını yansıttığı şeklinde algılanmalıdır.

2.1.2. Kapsam

E.coli'ler işlenmemiş doğal su içerisinde üç aya kadar yaşayabilirler. Klorla karşı çok hassastırlar. Litre başına 0,2 oranında serbest klor konsantrasyonu ile inaktif hale gelirler. Klorlama ile inaktif hale dönüşmemiş bakteriler dağıtım şebekesi içerisinde hiç üremeden birkaç gün yaşayabilirler.

2.1.3. Standartlar

Escherichia coli ve koliform bakterilerin araştırılması ve sayımı

Bölüm 1: Membran filtreleme yöntemi (TS EN ISO 9308-1)

2.1.4. Prensip

- Su numunesinin belirli bir hacmi membran filtreden geçirilir; membran filtre bir seçici besiyerine konulur;
- $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 21saat \pm 3saat ve 44saat \pm 4saat inkübe edilir;
- Laktoz Pozitif olarak tanımlanmış olan tipik koloniler okunur ve sayılır;
- Koliform veya *Escherichia coli* olarak doğrulanmış tipik koloniler sayılır.

Koliform bakteriler:

21saat \pm 3saat ve 44saat \pm 4saat içerisinde $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta seçici kültür ortamında laktozdan asit oluşturan, fakültatif anaerob ve oksidaz negatif bakterilerdir.

Escherichia coli

44°C ± 1°C sıcaklıkta 21saat ± 3saat ve 44saat ± 4saat içerisinde triptofandan indol oluşturan koliform bakterilerdir.

2.1.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

o Değişiklikler

Değişiklik: *Okuma* => Ekimi yapılacak tipik kolonilerin yapısına ilişkin kesin bilgiler.

1 Yöntem

<u>Uygulama Alanı</u> Süspansiyon halindeki maddelerin veya istenmeyen floranın çok miktarda olduğu sular hariç bütün su çeşitleri	<u>Referans standart</u> TS EN ISO 9308-1 (Nisan 2004) - Standart deney -
<u>Muhafaza</u> Steril cam veya polietilen numune şişeleri (dezenfekte edilmiş su için Na tiosülfatlı)	<u>Analizden önce muhafaza süresi</u> 24 saat
<u>Muhafaza sıcaklığı</u> Taşıma esnasında: ≤ 10°C sıcaklıkta buzdolabı veya buz akülü izoterm kap İlk 6 saat tolerans: ortam sıcaklığı (<25°C) Laboratuvara getirilmesinden analize kadar: soğuk oda 5°C ± 3°C	
<u>Tespit Sınırı</u> 1 CFU	<u>Sonuçların ifade edilmesi</u> CFU/100ml

2 Güvenlik

<u>GÜVENLİK VE ÖNLEMLER</u>	İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARINA UYULMASI
<u>ATIKLAR</u>	BU KULLANIMA AYRILMIŞ ATIK KUTULARINA ATILMALARI

3 Prensipten (yukarı bkz.)

4 Materyal, kültür ortamları

Materyal

- Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan malzeme (steril pipetler, Petri kutuları, inkübatörler...)

Seyreltici

- Tuzlu peptonlu su: TPS

Seçici kültür ortamı

- Tergitol TTC laktozlu agar:

Doğrulayıcı kültür ortamı ve reaktifler

- Seçici olmayan agar: (Tryptofan Soy Agar (TSA) gibi)
- Tryptofan buyyonu:
- Oksidaz reaktifi
- Kovacs reaktifi

5 İşlem şekli

Filtreleme

- İncelenecek numune çalkalanarak homojenleştirilir;
- Laboratuvar içerisinde hazırlanan Talimat doğrultusunda numunenin 100 ml'si membran filtreden geçirilir ve membran filtre altta hiçbir hava kabarcığı kalmayacak şekilde TTC-Tergitol laktozlu agar besiyeri üzerine yerleştirilir;
- İşlem, istenmeyen üremenin engellenmesi amacıyla 44°C'de inkübe edilecek diğer petri için ikinci kere tekrarlanır.

İnkübasyon

- Bu şekilde hazırlanmış petrilere biri 21saat \pm 3saat boyunca 36°C \pm 2°C sıcaklıkta inkübe edilir. Deneyin hassasiyetini arttırmak için süre 44saat \pm 4saate uzatılıp ikinci okuma işlemi gerçekleştirilir.
- Diğer petri 21saat \pm 3saat boyunca 44°C \pm 1°C sıcaklıkta inkübe edilir. Süre 44saat \pm 4saate uzatılıp ikinci okuma işlemi gerçekleştirilir.

Okuma

- Genellikle koliformlar, membranın altından görülebilen sarı bir hale içerisinde sarı veya turuncu renkte koloniler oluştururlar. *Escherichia coli* ve *Enterobacter aerogenes* kolonileri, en sarı renkteki kolonilerdir. Bazı koliform bakteriler yeşilimtrak veya pembe koloniler de oluşturabilir.
- Az bile olsa, sarı bir halenin olması, doğrulaması yapılacak şüpheli kolonileri işaret etmektedir.
- Ancak, her ne kadar ikincil bir gösterge oluşturuyor olsa da, doğrulaması yapılacak kolonilerin rengi dikkate alınmalıdır. Böylece, sarı bir halenin olması halinde, doğrulanan koloniler öncelikli olarak sarı (ortasında pas olan veya olmayan) ve kırmızı-turuncu kolonilerdir; daha az temsil edilen yeşilimtrak veya pembe koloniler de doğrulanmalıdır.

Doğrulama ve sayım

- Aşağıdaki durumlar hariç, ileri ekimler öncelikli olarak 36°C \pm 2°C sıcaklıkta inkübe edilmiş petrilere yapılmaktadır:

- * Eğer $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübe edilmiş petri üzerinde daha fazla sayıda tipik koloni var ise: bu durumda, $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübe edilmiş petrilerin tipik kolonileri doğrulanır,
 - * Eğer 36°C sıcaklıkta inkübe edilmiş petri istenmeyen flora ile kaplanmış ise (100–150'den fazla karakteristik olmayan koloni): bu durumda, sadece 44°C sıcaklıktaki petride bulunan koloniler doğrulanır
- İleri ekimler $44\text{saat} \pm 4\text{saatlik}$ inkübasyondan sonra yapılmaktadır. Eğer $21\text{saat} \pm 3\text{saat}$ inkübasyondan sonra membranlar çok sayıda tipik olmayan koloni içeriyor ise, ekimler bu safhada yapılmaktadır.
 - İleri ekimler mutlaka ortaya çıkarılmış bütün tipik koloniler üzerinde yapılmamaktadır.

Ekimi yapılacak kolonilerin sayısı aşağıdaki şekilde belirlenmektedir:

Eğer N tipik koloni sayısı ise, X aşılacak koloni sayısıdır:

Eğer	$1 \leq N \leq 10$	$X = N$
	$10 < N$	$X = 10$

Eğer tipik koloniler izole halde değil ise, TTC-Tergitol laktozlu agardan başka TTC-Tergitol laktozlu agara pasaj ile yeniden bir izolasyon işlemi gerçekleştirilir.

İleri ekimler TPS'de bakterilerin süspansiyon haline getirilmesiyle gerçekleştirilir.

Ekimi yapılan her koloni üzerinde gerçekleştirilen identifikasyon testleri aşağıdakilerdir:

* **Oksidaz**

- TSA üzerine ekim yapılır ve $21\text{saat} \pm 2\text{saat}$ boyunca $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübe edilir;
- İki-üç damla taze hazırlanmış oksidaz reaktifi bir süzgeç kağıdı üzerine damlatılır.
- Cam, tahta, plastik veya platin (nikel krom olmayan) öze ile TSA'da oluşan koloninin bir kısmı hazırlanan süzgeç kağıdı üzerine sürülür.
- 30 sn içerisinde koyu mavi-mor rengin oluşması pozitif reaksiyon olarak kabul edilir. Koliform bakteriler oksidaz negatiftir: Kağıt üzerinde renklenme gerçekleşmez.

* **İndol üretimi**

- Triptofan buyyon tüpüne ekim yapılır ve $21\text{saat} \pm 3\text{saat}$ boyunca $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübe edilir;
- 0,2 - 0,3 ml Kovacs reaktifi konarak indol üretimi kontrol edilir.

Buyyonun yüzeyinde kırmızı rengin oluşumu indol üretimini doğrular.

Bu durumda, bir koliformun ve *Escherichia coli*'nin identifikasyonu aşağıdaki şekilde yapılmaktadır:

Oksidaz	+	-	
İndol	/	-	+
Sonuçlar	o	Koliform	<i>E. coli</i>

Açıklama:

24 veya 48 saatlik kültürden sonra, membran çok sayıda şüpheli koloni içeriyor ise ve/veya koliformlara ilişkin yapılan araştırmalarda engel teşkil edebilecek başka koloniler içerir ise, numune aşağıdaki değerlendirmelere göre ikinci kere kültüre alınmaktadır:

S = şüpheli koloniler

A = diğer koloniler

24 saat veya 48 saatlik kültürden sonra petrilerin yapısı	Numunenin tekrar kültüre alınması - Yöntemler
A > 300 ve S > 10	Seyreltme ve membran filtreleme
A < 100 ve S > 100	Seyreltme ve membran filtreleme

Ancak numunenin alındığı zaman ile tekrar kültüre alındığı zaman arasında geçen süre 30 saati aşmıyor ise sonuçlara akreditasyon kapsamında cevap verilmektedir.

6 Kontrol

Uygulanan kontroller “Membran filtrelemenin genel metodu” adlı laboratuvar tarafından hazırlanan kullanma talimatında açıklanmaktadır (Membran filtrenin sterilite kontrolü, kullanılan besiyeri kontrolü vs)

7 Hesaplama

Her koloninin tek bir mikroorganizmadan oluştuğu kabul edilmektedir ve sayısı, Koloni Üreten Üniteler veya Koloni Oluşturan Üniteler (CFU) olarak ifade edilebilmektedir.

Sonuç aşağıdaki gibi yazılır:

Toplam koliform	n CFU/ 100ml
<i>Escherichia coli</i>	n CFU/ 100ml
➤ n = 0	0 CFU/ 100ml
➤ 1 < n < 100	n CFU/ 100ml
➤ n > 100	100 CFU/ veya seyreltme sonuçları

Eğer seyreltmeler yapılmış ise, elde edilen n sayısının toplam seyreltme oranının tersi ile çarpılması gerekmektedir.

Sonuçlar (okumalar, seyreltme, ekim) laboratuvarında hazırlanmış belgeler üzerinde belirtilmektedir.

8 Standarta kıyasla farklılık

Standardın talimatı	Laboratuvarında gerçekleştirilen	Doğrulama
44°C ± 0.5°C arası inkübasyon	44°C ± 1°C arası inkübasyon	Kullanılan programın spesifik gereklilik toleransı doğrultusunda ± 0.5°C oranında kesinlik elde edilmesini sağlayan inkübasyon malzemesi

2.1.6. Analizin maliyeti

9,00 - 42,10 € arası

2.2. Yüze ve atık sularda *Escherichia coli* ve koliform bakterilerin araştırılması ve sayımı - Bölüm 3: Sıvı ortama ekim (TS EN ISO 9308-3) ile küçültme yöntemi (*En Muhtemel Sayı*)

2.2.1. Amaç

E.coli her zaman fekal kökenli yegane bakteridir. Bu bağlamda, bir fekal kirlenmeyi gösteren spesifik gösterge organizması olarak kabul edilmektedir. Su içerisinde *E.coli* tanısının yapılması enterik patojenlerin olası varlıklarını yansıttığı şeklinde algılanmalıdır.

2.2.2. Kapsam

E.coli'ler işlenmemiş doğal su içerisinde üç aya kadar yaşayabilirler. Klor karşı çok hassastırlar. Litre başına 0,2 oranında serbest klor konsantrasyonuyla inaktif hale gelirler. Klorlama ile inaktif hale dönüşmemiş bakteriler dağıtım şebekesi içerisinde hiç üremeden birkaç gün yaşayabilirler

2.2.3. Standartlar

Yüze ve atık sularda *Escherichia coli* ve koliform bakterilerin araştırılması ve sayımı

Bölüm 3: Sıvı ortama ekim ile küçültme yöntemi (*En Muhtemel Sayı*) (TS EN ISO 9308-3)

2.2.4. Prensip

- Dehidrate kültür ortamı ihtiva eden mikropalak kuyucukları içerisinde sulandırılmış numune ekilir;
- 44°C ± 1°C sıcaklıkta en az 36 saat boyunca inkübe edilir;
- Mikropalak karanlıkta 366 nm UV ışın altında incelenir: *E.coli* mevcudiyeti MUG'un hidrolizinden kaynaklanan floresanla tespit edilir;
- Mavi floresan özelliğe sahip kuyucuklar sayılır.

Escherichia coli

Sıvı besiyerinde 44°C ± 1°C sıcaklıkta aerob ortamda üreyebilen ve β-D glukuronidaz sayesinde 4-metil-umbelliferyl β-D glukuronit'i (MUG) hidroliz eden mikroorganizmalardır.

2.2.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

o Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazılım

1 Yöntem

<u>Uygulama alanı</u> Yüzey suları, yüzme suları, atık sular, deniz suları	<u>Referans standart</u> TS EN ISO 9308-3 (Nisan 1999):
<u>Muhafaza</u> Steril cam veya polietilen numune şişeleri	<u>Analiz öncesi muhafaza süresi</u> 24 saat
<u>Muhafaza sıcaklığı</u> Taşıma esnasında: ≤ 10°C sıcaklıkta buzdolabı veya buz akülü izoterm kap İlk 6 saat tolerans: ortam sıcaklığı (<25°C) Laboratuvara getirilmesinden analize kadar: soğuk oda 5°C ± 3°C	
<u>Tespit Sınırı</u> Her bir seyreltme için seyreltmeler ve ekilmiş kuyucuk sayısına göre değişken	<u>Sonuçların ifade edilmesi</u> EMS/100ml

2 Güvenlik

<u>GÜVENLİK VE ÖNLEMLER</u>	İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARINA UYULMASI
<u>ATIKLAR</u>	BU KULLANIMA AYRILMIŞ ATIK KUTULARINA ATILMALARI

3 Prensipten (yukarı bkz.)

4. Materyal, kültür ortamları

Materyal

- Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan malzeme (steril pipetler, Petri kutuları, inkübatörler...)

Seyrelticiler

- mikroplaklar için özel seyreltici:
- Demineralize veya distile su

Seçici kültür ortamı (kullanıma hazır sistem)

- *Escherichia coli* için mikropalakalar

5 İşlem şekli

Seyreltme şekli seçimi

Ekimi yapılacak seyreltme sayısı analiz edilecek numunenin kontaminasyon düzeyine bağlı olarak değişkenlik arz etmektedir.

NUMUNENİN KAYNAĞI	Seyreltme SAYISI	Seyreltme Oranı / Kuyucuk Sayısı	Ölçüm Aralığı: bakteri/100 ml
Yüzme suyu Deniz suyu	2	1/2 / 64 kuyucuk 1/20 / 32 kuyucuk	15 - 3,5.10 ⁴ arası

Seyreltilerin hazırlanması

Deniz suları

- Bir taşıyıcı üzerine yapılacak iki seyreltme için iki adet tüp konur. ½'lik seyreltme için kullanılacak tüpe 9ml steril demineralize su, 1/20'lik ikinci seyreltme için kullanılacak tüpe ise 9 ml özel seyreltici konur (1/2'lik birinci seyreltme için 20/200 mm'lik tüp ve sonraki seyreltme için 16/160 mm'lik tüp kullanılır);
- Mikroorganizmaların homojen dağılımını sağlamak için numune çalkalanır;
- 10 ml'lik steril bir pipet ve pipetör ile homojen numunenin 9 ml'si derhal 9 ml steril demineralize su ihtiva eden tüpe (1/2'lik) eklenir.
- Homojenleştirilmiş ilk seyreltmenin 1 ml'si ikinci tüpe transfer edilir (1/20'lik).

Ekim

Ekim işlemleri bu işlemler için ayrılmış bir laboratuvarında gerçekleştirilir.

- Birinci seyreltme tüpü, 90 mm çapındaki petri kabına transfer edilir;
- Bu ilk seyreltmeye tekabül eden kuyucukların her birine, üzerinde steril pipet ucu bulunan çok kanallı pipet aracılığıyla 200 µl oranında dağıtım yapılır (8 kanallı pipet kullanılabilir);
- 1/20'lik seyreltme için, steril Petri kabı ve pipet uçları değiştirilerek aynı şekilde işlem yapılır;
- Ekimden sonra, mikropalak bu amaçla için öngörölmüş steril yapışkan bantla kaplanır.

Açıklama: Mikropalak kuyucuklarının ekimi esnasında, herhangi bir kontaminasyonun engellenmesi için taşırılmamalıdır.

İnkübasyon

- Mikropalak en az 36 saat boyunca 44°C ± 1°C inkübe edilmektedir, floresan özellik zaman içerisinde değişmediğinden dolayı, 36 saatten uzun bir inkübasyonun yapılması mümkündür (azami 72 saat).

Açıklama: Mikroplaklar dikkatli bir şekilde sarsılmadan taşınmalıdır.

Mikroplakların okunması

- Her mikroplak UV gözlem odasına konulmaktadır: bulanıklık ve mavi bir floresan gösteren kuyucuklar pozitif olarak kabul edilir.
- Brüt sonuçlar laboratuvarında hazırlanmış olan belgelerde belirtilmektedir.:

Yüzme suyu için (2 seyreltme)

6 Hesaplama

İki seyreltme durumunda (1/2 - 64 kuyucuk ve 1/20 - 32 kuyucuk), her seyreltme için pozitif kuyucuk sayısının yazılıp, En Muhtemel Sayının (EMS) tespit edilmesi için mikroplaklarla üretici firma tarafından sağlanan “Deniz suyu – Tatlı yüzey suları” istatistik tablosuna bakılmaktadır. Sonuçlar **EMS/100 ml** olarak belirtilmektedir.

Örnek: 1/2 32 (+) 64'de
1/20 5 (+) 32'de

Bu durumda temel alınacak karakteristik sayı (KS): 32/5

İstatistik tablodan 7,56 *E.coli*/ml değeri ortaya çıkar (Güven Aralığı 5,42-10,54) Nihai sonuç ise; 756/100ml (542-1054)'dir

Sayımların nihai sonuçları numune analiz defterinde belirtilmektedir.

Hiçbir pozitifliğin olmadığı veya bütün kuyucukların pozitif olduğu durumlardaki sonuçların ifade edilmesi aşağıdaki tabloda verilmiştir.

	eğer bütün kuyucuklar (-) ise	eğer bütün kuyucuklar (+) ise
2 seyreltme 1/2, 1/20 seyreltme 64 / 32 kuyucuk	< 15 / 100 ml	> 34 659 / 100 ml

6 Standarta kıyasla farklılık

Standardın talimatı	Laboratuvarında gerçekleştirilen	Doğrulama
44°C ± 0.5°C'de inkübasyon	44°C ± 1°C'de inkübasyon	Kullanılan programın spesifik gereklilik toleransı doğrultusunda ± 0.5°C oranında kesinlik elde edilmesini sağlamayan inkübasyon malzemesi

2.2.6. Analizin maliyeti:

10.00 - 42,10 € arası

2.3. Bağırsak enterokoklarının araştırılması ve sayımı Bölüm 2: Membran filtreleme yöntemi (TS EN ISO 7899–2)

2.3.1. Amaç

Enterokokların su içerisindeki dayanıklılıkları diğer gösterge organizmalara kıyasla daha yüksektir. Özellikle dezenfektan ajanlara karşı dirençlerinden dolayı, suyun işlenmesindeki etkinliğin değerlendirilmesinde ayrıcalıklı gösterge organizmalardır.

Ayrıca, kurutmaya karşı olan dirençleri enterokokları kurutma gerektiren şebekelerin onarılması esnasındaki kontrol için gösterge organizma yapmaktadır

2.3.2. Kapsam

Genellikle, enterokoklar dağıtım şebekesinde üremediklerinden dolayı, tayinleri yakın bir zamanda meydana gelmiş olan fekal bir kirlenmeyi göstermektedir.

Enterokokların araştırılmasının önemi, *E.coli*'lerden farklı olarak, zor çevresel koşullara daha dayanıklı olmalarından ve su içerisinde daha uzun yaşamalarından ileri gelmektedir.

2.3.3. Standartlar

Bağırsak enterokoklarının araştırılması ve sayımı

Bölüm 2: Membran filtreleme yöntemi (TS EN ISO 7899–2)

2.3.4. Prensip

Filtreleme, inkübasyon ve sayım

Bağırsak enterokokların sayımı 100ml'lik suyun membran filtre aracılığıyla filtrelenmesine dayanmaktadır. Membran filtre, Gram-negatif bakterilerin çoğalmasını engelleyen sodyum azit ve bağırsak enterokokları tarafından kırmızı formazan'a indirgenen renksiz bir boya olan 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorür ihtiva eden katı seçici bir kültür ortamı üzerine yerleştirilir. Tipik koloniler koloninin ortasında veya tamamında kahverengi-kırmızı veya pembe bir renkle ortaya çıkarlar.

Doğrulama

Tipik kolonilerin gözlenmesi halinde membran filtrenin, üzerindeki bütün koloniler ile birlikte 44°C sıcaklıkta önceden ısıtılmış safra eskulin azid agara transfer edilerek bir doğrulama yapılması gerekmektedir. Bağırsak enterokokları bu besiyerinde eskulini iki saat içerisinde

hidroliz ederler. Son ürün olan 6,7-dihidroksikumarin demir iyonlarıyla birleşerek, ortamda yayılan kahverengi-siyah bir bileşen ortaya çıkarır.

Bağırsak enterokokları:

Slanetz-Bartley ve safra eskulin azid agar besiyerinde 44°C'de 2,3,5-trifenil-tetrazolyum klorürü formazana indirgeyebilen ve eskulini hidroliz edebilen bakterilerdir.

2.3.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

o Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazılım

1 Yöntem

<u>Uygulama Alanı</u> Süspansiyon halindeki maddelerin veya istenmeyen floranın çok miktarda olduğu sular hariç bütün su çeşitleri	<u>Referans standart</u> TS EN ISO 7899-2 (Nisan 2002)
<u>Muhafaza</u> Steril cam veya polietilen numune şişeleri (dezenfekte edilmiş su için Na tiosülfatlı)	<u>Analizden önce muhafaza süresi</u> 24 saat
<u>Muhafaza sıcaklığı</u> Taşıma esnasında: $\leq 10^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta buzdolabı veya buz akülü izoterm kap İlk 6 saat tolerans: ortam sıcaklığı ($<25^{\circ}\text{C}$) Laboratuvara getirilmesinden analize kadar: soğuk oda $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$	
<u>Tespit Sınırı</u> 1 CFU	<u>Sonuçların ifade edilmesi</u> CFU/100ml

2 Güvenlik

<u>GÜVENLİK VE ÖNLEMLER</u>	İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARINA UYULMASI
<u>ATIKLAR</u>	BU KULLANIMA AYRILMIŞ ATIK KUTULARINA ATILMALARI

3 Prensipten (yukarıya bkz.)

4 Materyal, kültür ortamı

Materyal

- Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan malzeme (steril pipetler, Petri kutuları, inkübatörler...)

Seyreltici

- Tuzlu peptonlu su: TPS

Seçici kültür ortamı

- Slanetz - Bartley Agar (Azid Besiyeri, Na-Azid Besiyeri vb.)

Doğrulayıcı kültür ortamı

- Safra Eskülin Azid Agar:

5 İşlem Şekli

Filtreleme

- Analiz edilecek numune çalkalanarak homojenleştirilir;
- Laboratuvarda hazırlanan kullanma talimatı doğrultusunda numunenin 100ml'sinin membran filtreleme işlemi yapılır ve membran filtre altta hiçbir hava kabarcığı kalmayacak şekilde bir Slanetz - Bartley agar petrisi üzerine yerleştirilir.

İnkübasyon

- Bu şekilde hazırlanmış petriler 44saat \pm 4saat boyunca 36°C \pm 2°C sıcaklıkta inkübe edilir.

Okuma

- Merkezi veya etrafı kırmızı, kahverengi veya pembe renkte olan bütün bombeli koloniler olası enterokok olarak kabul edilir.

Doğrulama ve sayım

- Eğer tipik koloniler var ise, pens yardımı ile membran filtre ters çevrilmeden Safra Eskülin Azid Agar (1 saat boyunca 44°C \pm 1°C sıcaklıkta önceden ısıtılmış) üzerine transfer edilir. ve 2 saat boyunca 44°C \pm 1°C sıcaklıkta inkübe edilir;
- Çevreleyen ortamda siyah bir hale'ye sahip bütün tipik kolonilerin pozitif olduğu kabul edilir ve bunlar bağırsak enterokokları olarak sayılır.

6 Kontrol

Uygulanan kontroller “Membran filtrelemenin genel metodu” adlı laboratuvar tarafından hazırlanan kullanma talimatında açıklanmaktadır (Membran filtrenin sterilite kontrolü, kullanılan besiyeri kontrolü vs).

7 Hesaplama

Her koloninin tek bir mikroorganizmadan oluştuğu kabul edilmektedir ve sayı Koloni Üreten Üniteler veya Koloni Oluşturan Üniteler (CFU) olarak ifade edilebilmektedir.

Sonuç aşağıdaki gibi yazılır:

Enterokoklar	n CFU/ 100ml
n = 0	0 CFU/ 100ml
1 < n < 100	n CFU/ 100ml
n > 100	100 CFU/ 100ml veya seyreltmelerin sonuçları

Eğer seyreltmeler yapılmış ise, elde edilen n sayısının seyreltme oranının tersi ile çarpılması gerekmektedir.

Sonuçlar (okumalar, seyreltme, ekim) laboratuvarında hazırlanmış belgeler üzerinde belirtilmektedir

8 Standarta kıyasla farklılık

Standardın talimatı	Laboratuvarında gerçekleştirilen	Doğrulama
44°C ± 0.5°C arası inkübasyon	44°C ± 1°C arası inkübasyon	Kullanılan Programın spesifik gereklilik toleransı doğrultusunda ± 0.5°C oranında kesinlik elde edilmesini sağlamayan inkübasyon malzemesi

2.3.6. Analizin maliyeti

9,00 ile 33,40 € arası

2.4. Yüzey ve atık sularda bağırsak enterokoklarının araştırılması ve sayımı - Bölüm 1: Sıvı ortama ekim ile küçültme yöntemi (En Muhtemel Sayı) (TS EN ISO 7899-1)

2.4.1. Amaç

Enterokokların su içerisindeki dayanıklılıkları diğer gösterge organizmalarından daha yüksektir. Özellikle dezenfektan ajanlarına karşı olan dirençlerinden dolayı, suyun işlenmesindeki etkinliğinin değerlendirilmesi için ayrılacıklı gösterge organizmalarıdır.

Ayrıca, kurutulmaya karşı olan dayanıklılıkları, enterokokları kurutma gerektiren şebeke onarımları esnasındaki kontroller için gösterge organizma yapmaktadır.

2.4.2. Kapsam

Genelde, enterokoklar bir dağıtım şebekesinde üremedikleri için, tayinleri genellikle yakın geçmişte meydana gelmiş fekal kirlenmeyi göstermektedir.

Enterokoklara ilişkin gerçekleştirilen araştırmanın önemi, *E.coli*'lerden farklı olarak, zor çevre koşullarına daha dayanıklı olmaları ve su içerisinde daha uzun süre yaşamalarıdır.

2.4.3 Standartlar

Yüzey ve atık sularda bağırsak enterokoklarının araştırılması ve sayımı

Bölüm 1: Sıvı ortama ekim ile küçültme yöntemi (En Muhtemel Sayı) (TS EN ISO 7899-1)

2.4.4. Prensip

- Dehidrate kültür ortamı ihtiva eden mikroplak kuyucukları içerisine sulandırılmış numune ekilir;
- 44°C ± 1°C sıcaklıkta en az 36 saat inkübe edilir;
- Mikroplaklar karanlıkta 366 nm UV altında incelenir; enterokokların mevcudiyeti MUD'un hidrolizinden kaynaklanan floresanla tespit edilir.
- Sonuçlar En Muhtemel Sayı (EMS)/100ml olarak ifade edilir.

Enterokoklar:

Sıvı besiyerinde Talyum asetat, nalidiksik asit ve 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorür (TTC) varlığında, 44°C ± 1°C sıcaklıkta aerob koşullarda üreyebilen ve β-D glukosidaz sayesinde 4-metil-umbelliferyl β-D glukosit'i (MUD) hidroliz edebilen mikroorganizmalar.

2.4.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

o Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazılım.

1 Yöntem

Uygulama alanı Yüzey suları, yüzme suları, atık sular, deniz suları	Referans standart TS EN ISO 7899-1 (Nisan 2002)
Muhafaza Steril cam veya polietilen numune şişeleri	Analiz öncesi muhafaza süresi 24 saat

Muhafaza sıcaklığı	
Taşıma esnasında: $\leq 10^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta buzdolabı veya buz akülü izoterm kap İlk 6 saat tolerans: ortam sıcaklığı ($<25^{\circ}\text{C}$) Laboratuvara getirilmesinden analize kadar: soğuk oda $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$	
Tespit Sınırı	Sonuçların ifade edilmesi
Her bir seyreltme için seyreltme ve ekilmiş kuyucuk sayısına göre değişken	EMS/100ml

2 Güvenlik

GÜVENLİK VE ÖNLEMLER	İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARINA UYULMASI
ATIKLAR	BU KULLANIMA AYRILMIŞ ATIK KUTULARINA ATILMALARI

3. Prensi (yukarıya bkz.)

4. Materyal, kültür ortamları

Materyal

- Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan materyal (steril pipetler, Petri kutuları, inkübatörler...)

Seyreltrici

- Mikroplaklar için özel seyreltici
- Demineralize veya distile su

Seçici kültür ortamı (kullanıma hazır sistem)

- Enterokoklar için mikroplaklar

5. İşlem şekli

Seyreltme şekli seçimi

Ekimi yapılacak seyreltme sayısı analiz edilecek numunenin kontaminasyon düzeyine bağlı olarak değişkenlik arz etmektedir.

NUMUNENİN KAYNAĞI	SEYRELTME SAYISI	SEYRELTME SAYISI/ KUYUCUK SAYISI	ölçüm aralığı bakteri/100ml
Yüzme suyu Deniz suyu	2	1/2'de 64 kuyucuk 1/20'de 32 kuyucuk	15 - $3,5 \times 10^4$ Arası

Seyreltilerin hazırlanması

Deniz suları

- Bir taşıyıcı üzerine yapılacak iki seyreltme için iki adet tüp konur. ½'lik seyreltme için kullanılacak tüpe 9ml steril demineralize su, 1/20'lik ikinci seyreltme için kullanılacak tüpe ise 9 ml özel seyreltici konur (1/2'lik birinci seyreltme için 20/200 mm'lik tüp ve sonraki seyreltme için 16/160 mm'lik tüp);
- Mikroorganizmaların homojen dağılımını sağlamak için numune çalkalanır;
- 10 ml'lik steril bir pipet ve pipetör ile homojen numunenin 9 ml'si derhal 9 ml steril demineralize su ihtiva eden tüpe (1/2'lik) eklenir.
- Homojenleştirilmiş ilk seyreltmenin 1 ml'si ikinci tüpe transfer edilir (1/20'lik)

Ekim

Ekim işlemleri bu işlemler için ayrılmış özel bir laboratuvarında gerçekleştirilmektedir.

Açıklama1:

Mikroplakların ekimi esnasında başka hiçbir eylemde bulunulmamalıdır.

Açıklama 2:

Atık suların daha düşük oranda kontamine oldukları düşünülen diğer numunelerle aynı zamanda analiz edilmesi gerektiğinde ekim işlemleri mutlaka diğer numunelerin kültüre alınmalarından sonra gerçekleştirilmelidir.

- Birinci seyreltme tüpü, 90 mm çapındaki petri kabı transfer edilir;
- Bu ilk seyreltmeye tekabül eden kuyucukların her birine, üzerinde steril pipet ucu bulunan çok kanallı pipet aracılığıyla 200 µl oranında dağıtım yapılır (8 kanallı pipet kullanılabilir);
- 1/20'lik seyreltme için, steril petri kabı ve pipet uçları değiştirilerek aynı şekilde işlem yapılır;
- Ekimden sonra, mikroplak bu amaçla için öngörölmüş steril yapışkan bantla kaplanır.

Açıklama: *Kuyucukların ekimi esnasında, herhangi bir kontaminasyonun engellenmesi için taşırılmamalıdır.*

İnkübasyon

- Mikroplak en az 36 saat boyunca 44°C ± 1°C'de inkübe edilir, floresan özellik zaman içerisinde değişmediğinden dolayı, 36 saatten uzun bir inkübasyonun yapılması mümkündür (azami 72 saat).

Açıklama:

Mikroplaklar dikkatlice eğmeden taşınmalıdır

Mikroplakların okunması

- Her mikroplak UV ışın altında incelenir. Bulanıklık ve mavi bir floresan veren kuyucuklar pozitif olarak kabul edilir.
- Brüt sonuçlar laboratuvarında hazırlanan belgelerde belirtilmektedir:

Yüzme suyu için (2 seyreltme)

6. Hesaplama

İki seyreltme durumunda (1/2-64 kuyucuk ve 1/20-32 kuyucuk), her seyreltme için pozitif kuyucuk sayısının yazılıp, En Muhtemel Sayının (EMS) tespit edilmesi için mikroplaklarla üretici firma tarafından sağlanan «Deniz suyu – Tatlı yüzey suları» istatistik tablosuna bakılmaktadır.

Sonuçlar **EMS/100 ml** olarak belirtilmektedir.

Örnek: 1/2 32 (+) 64'de
1/20 5 (+) 32'de

Bu durumda temel alınacak karakteristik sayı (KS): 32/5

İstatistik tablodan 7,56 Enterokok/ml değeri ortaya çıkar (Güven Aralığı 5,42-10,54) Nihai sonuç ise; 756/100ml (542-1054)'dir

Sayımların nihai sonuçları numune analiz defterinde belirtilmektedir.

Hiçbir pozitifliğin olmadığı veya bütün kuyucukların pozitif olduğu durumlardaki sonuçların ifade edilmesi aşağıdaki tabloda verilmiştir.

	eğer bütün kuyucuklar (-) ise	eğer bütün kuyucuklar (+) ise
2 seyreltme 1/2, 1/20 seyreltme 64 / 32 kuyucuk	< 15 / 100 ml	> 34 659 / 100 ml

7. Standarta kıyasla farklılık

Standardın talimatı	Laboratuvarında gerçekleştirilen	Doğrulama
44°C ± 0.5°C'de inkübasyon	44°C ± 1°C'de inkübasyon	Kullanılan programın spesifik gereklilik toleransı doğrultusunda ± 0.5°C oranında kesinlik elde edilmesini sağlamayan inkübasyon malzemesi

2.4.6. Analizin maliyeti:

13,80 - 33,40 € arası

3. PATOJEN ETKEN ARAŞTIRMASI

3.1. *Salmonella* araştırması (TS ISO 6340)

3.1.1. Amaç

Her ne kadar virülansları ve patojeniteleri aşırı değişken olsa da, *Salmonella*'lar genellikle patojen olarak kabul edilir.

Salmonella'ların doğal konakları insanlar, büyük baş hayvanlar, kuşlar da dahil olmak üzere evcil ve yabani hayvanlardır.

İnsanlar ve hayvanlar asemptomatik taşıyıcı olarak dışkıları ile etrafa *salmonella* saçabilmektedir.

Dolayısıyla, onların çevrede ve özellikle su içerisinde bulunmaları mümkündür.

3.1.2. Kapsam

Salmonella'lar suda bulunduğu için, varlıklarının veya yokluklarının kontrol edilmesi uygun olur. Sudaki *Salmonella*'ların araştırılması bir konsantrasyon aşaması gerektirmektedir çünkü mukozalı çevre içerisinde değişime uğrayabilmektedirler. *E.coli* genellikle *Salmonella*'nın varlığını düşündürmek için iyi bir göstergedir.

3.1.3. Standartlar

Salmonella araştırması (TS ISO 6340)

3.1.4. Prensip

Lağım suları hariç, sulardaki *Salmonella* araştırması 4 aşama gerektirir:

1. Seçici olmayan sıvı ortamda ön zenginleştirme

- Numune (> 10 ml) membran filtreden geçirilir ve membran filtre tek kuvvet steril tamponlanmış peptonlu su içerisinde 16-20 saat boyunca 36°C ± 2°C sıcaklıkta inkübe edilir;

2. Seçici sıvı besiyerinde zenginleştirme

- Ön-zenginleştirme ortamından alınan kültür zenginleştirme buyyonuna transfer edilir;
- 18-24 saat boyunca 42°C ± 1°C sıcaklıkta inkübe edilir (birinci inkübasyon);

- Fazladan 18-24 saat boyunca inkübasyon sürdürülür (ikinci inkübasyon).

3. İzole etme ve identifikasyon

- Birinci inkübasyon ve gerekliyse ikinci inkübasyonun ardından, zenginleştirmeden kaynaklanan kültürle, iki katı seçici besiyerine ekim yapılır;
- 24 saat boyunca 36°C ± 2°C sıcaklıkta inkübe edilir.

4. Doğrulama

- Katı seçici besiyerinde oluşan şüpheli *Salmonella* kolonileri pasajlanır ve uygun biokimyasal ve serolojik deneyler aracılığıyla doğrulanır.

Açıklama:

Ayrıca uygulama esnasında analiz koşullarının geçerliliğinin sağlanması amacıyla, kullanılan katı ve sıvı kültür ortamlarının güvenilirliğinin kontrol edilmesi ve teyit edilmesi için (özellikle fertilité), önemli ölçüde istenmeyen flora olduğunda dahil (ön-zenginleştirme buyyonunun 50 ml'si içerisinde yaklaşık 1.10⁸ E. coli), bir kalitatif kontrol uygulanacaktır (kullanılan ortamların ve reaktiflerin lotları).

Salmonella

Seçici katı besiyerinde 2-4 mm çaplı koloniler oluşturan, Gram (-) oksidaz (-), spor oluşturmeyen, çubuk şeklinde fakültatif anaerob bakterilerdir.

Salmonella'ların biokimyasal özellikler aşağıdaki şekilde tanımlanmaktadır:

İki şekerli demir agarda *Salmonella*'lar H₂S üreten, laktoz negatif, glukoz pozitif bakterilerdir. Ayrıca, *Salmonella*'lar L-Lizini dekarboksilaz enzimi ile hidrolize edebilmektedirler.

Serolojik özellikler aşağıdaki şekilde tanımlanmaktadır:

Nutrient agarda izole edilmiş saf koloniler uygun serumlarla test edildiklerinde aglütinasyon oluşturmaktadır.

3.1.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

o Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazılım

1. Yöntem

<u>Uygulama alanı</u>	<u>Referans standart</u>
Lağım suları hariç bütün su çeşitleri	TS ISO 6340 (Nisan 1999)

<u>Analizden önce muhafaza süresi</u> 24 saat içerisinde mümkün olduğunca çabuk analiz edilir Numune alımından sonra en fazla 24 saat	<u>Muhafaza sıcaklığı</u> 5°C ± 3°C
<u>Tespit Sınırı</u>	<u>Sonuçların ifade edilmesi</u> Yok / Analiz edilen hacim Var / Analiz edilen hacim

2. Güvenlik

<u>GÜVENLİK VE ÖNLEMLER</u>	İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARINA UYULMASI
<u>ATIKLAR</u>	BU KULLANIMA AYRILMIŞ ATIK KUTULARINA ATILMALARI

3. Prensi (yukarıya bkz.)

4. Materyal, kültür ortamları

Materyal

- Laboratuvarında sıklıkla kullanılan malzeme (steril pipetler, Petri kutuları, inkübatörler...)

Referans materyal

- Referans suş (*Salmonella typhimurium*)

Seyreltici

- Tuz çözeltisi (%0,85'lik)

Seçici olmayan sıvı kültür ortamı

- Tek kuvvet tamponlanmış peptonlu su

Seçici sıvı kültür ortamı

- Malaşit Yeşili/magnezyum klorür (Modifiye edilmiş Rappaport-Vassiliadis) besiyeri

Seçici katı kültür ortamları

- Brillant yeşili/fenol kırmızısı laktoz agar (Edel ve Kampelmacher'e göre):

EK

- Ksiloz Lizin Deoksikolat Agar: XLD
- Bizmut Sülfat Agar (Wilson ve Blair'e göre)

Katı besiyerlerinin en az ikisi kullanılır.

Doğrulayıcı kültür ortamları

- Nutrient agar
- Kligler Iron agar
- Üre agar (Christensen'e göre)
- L-Lizin dekarboksilaz besiyeri (Falkow'a göre)
- O Antijenlerine karşı üretilmiş anti-Salmonella serumları

5. İşlem Şekli

Filtreleme

- Analiz edilecek numune çalkalanarak homojen hale getirilir;
- Laboratuvarda hazırlanan Kullanım Talimatı doğrultusunda 0,45 µm poroziteli selüloz ester membran üzerinde 1L ile 5L arası numune filtre edilir;
- Akabinde membran 50 ml'lik tek kuvvet tamponlanmış peptonlu su içerisine yerleştirilir;
- Hafifçe çalkalanır.

Ön zenginleştirme

- Bu şekilde ekimin ardından 36°C ± 2°C sıcaklıkta 16-20 saat boyunca inkübe edilir.

Zenginleştirme

- Bir pipet aracılığıyla ön-zenginleştirmenin 0,1 ml'si 150 mmX16 mm boyutunda bir tüp içerisindeki 10 ml Rappaport-Vassiliadis buyyonuna transfer edilir;

Açıklama:

Rappaport-Vassiliadis buyyonu, ön-zenginleştirme buyyonundan ekim öncesi 42°C ± 1°C sıcaklıkta bir inkübatör içerisinde en az ½ saat inkübe edilmelidir.

Ayrıca, ekim ile 42°C ± 1°C'lik inkübatöre geri koyma arasında geçen süre mümkün olduğu kadar kısa olmalıdır;

- 18-24 saatlik inkübasyondan sonra birinci ekim gerçekleştirilerek 42-48 saat boyunca 42°C ± 1°C sıcaklıkta inkübasyon devam ettirilir ve akabinde 48 saat sonra ikinci ekim yapılır.

İzolasyon

Kullanımdan hemen önce, agarlı petriyerler 30 dakikalık kurutma süresi aşılmadan bir inkübatör içerisinde kurutulur.

- Zenginleştirmenin ardından, 18-24 saat sonra EK agar besiyeri, XLD agar besiyeri ve Bizmut Sülfid Agar (kullanımı tercihe bağlı) Petrilerine bir öze ile birinci ekim gerçekleştirilir. 20-24 saat boyunca $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübe edilir;
- Zenginleştirme safhasının inkübasyon döneminin bitiminde (48 saat) işlem tekrarlanır.

İdentifikasyon

- Tercihen ilk 24 saatlik zenginleştirme safhasının bitiminde gerçekleştirilen ekimler kullanılır. 48 saatlik zenginleştirme safhasının bitiminde gerçekleştirilen ekimler sadece ilk ekimler üzerinde karakteristik koloni olmaması halinde kullanılır. Zenginleştirmeden sonra gerçekleştirilen bütün ekimler analiz sonuna kadar soğukta muhafaza edilir;
- Karakteristik *Salmonella* kolonilerinin varlığının araştırılması için 20-24 saatlik inkübasyondan sonra EK, XLD ve Bizmut Sülfid agar (48 Saat) petrilere incelenir:
 - EK besiyerinde, *Salmonella* kolonileri kırmızı veya açık pembe ve kırmızı kenarlıdır.
 - XLD besiyerinde, *Salmonella* kolonileri siyah merkezli renksiz ama pembe-kırmızı görünümlüdür.
 - Bizmut Sülfid agar besiyerinde, *Salmonella* kolonileri parlak metalik çevreli siyah renktedir.

Açıklama:

Kolonilerin yapısına ilişkin ayrıntılı bir tanım için ilgili besiyerinin teknik belgelerine bakılır. Karakteristik veya şüpheli olan her koloni doğrulamaya alınır.

Gerçekten, *Salmonella* kolonilerinin tanınması büyük ölçüde deneyime bağlıdır ve görünüm bazen bir türden diğerine farklılık arz edebilir.

Doğrulama

İzolasyon

Kullanımdan hemen önce, agarlı petrilere 30 dakikalık kurutma süresi aşılmadan bir inkübatör içerisinde kurutulur.

- ✓ Eğer XLD veya EK'daki şüpheli koloniler istenmeyen flora kolonileriyle temas halindeyse, nütrient agar üzerinde nihai izolasyon gerçekleştirilmeden önce, orijinal seçici besiyerinde bir izolasyon gerçekleştirilir.
- ✓ Doğrulama için, karakteristik veya şüpheli kolonilerin tamamı (veya en az 5) her bir XLD agar, EK agar veya Bizmut Sülfid agar petrilere alınır.
- ✓ Seçilen koloni (veya koloniler) steril Distile su içerisinde süspanse hale getirilir. Bu süspansiyondan Nutrient agara ekim yapılır ve $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 18 - 24 saat inkübe edilir.

- Aynı zamanda, aynı süspansiyondan bir Kligler agara ekim yapılır ve 24 saat boyunca $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübe edilir.

❖ **Biyokimyasal Doğrulama**

Tanımlanacak kültürün Nütrient Agardaki tek kolonileri biyokimyasal deney besiyelerine ekim için kullanılır. Tanımlanacak her kültür için bu işlem tekrarlanır.

Kligler Agar (İki Şekerli Demir Agar): Tipik *Salmonella* kültürleri, gaz oluşumuyla birlikte kırmızı bir üst kısım ve siyahlaşmayla birlikte sarı bir dip kısma sahiptirler.

Üre Agar: Nütrient Agar üzerinde çok iyi izole edilmiş bir koloni Üre agar tüpü içerisine ekilir ve, 24 saat boyunca $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, inkübe edilir.

Üreaz negatif olan *Salmonella*'lar üre agarda alkalinizasyonuna yol açmaz ve renk değiştirmez (giderek kiraz kırmızısına dönüşen gül pembesi renk oluşmaz).

L-Lizin Dekarboksilaz Besiyeri: Nütrient Agar üzerinde çok iyi izole edilmiş bir koloni besiyerine ekilir ve besiyeri steril sıvı parafin veya yağ ile örtülür. 24 saat boyunca $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, inkübe edilir. Tipik *Salmonella* kolonileri menekşe renk oluşturur.

❖ **Serolojik Doğrulama**

- Biyokimyasal sonuçlar *Salmonella* şüphesine yol açar ise, serolojik doğrulama testleri gerçekleştirilir:
- Otoaglutinasyon oluşturan suşların tespiti
 - İyice temizlenmiş bir cam lam üzerine bir damla tuzlu su konulur ve bunun içerisine homojen ve bulanık bir süspansiyon elde edecek şekilde test edilecek koloninin bir bölümü dağıtılır;
 - Lam 30-60 saniye boyunca aşağı yukarı sallanır.;
 - Tercihen siyah bir zemin üzerinde büyüteçle gözlem yapılır.

Eğer bakteriler büyük kümeler şeklinde biraraya gelmişler ise, suşun otoaglutinasyon yaptığına karar verilir ve daha ileri serolojik deneylere tabi tutulmaz.

- Somatik O antijen'lerinin tespiti için otoaglutinasyon yapmadığı bilinen tek koloni bir damla anti-O Serumuna içerisine yayılır ve lam 30-60 sn boyunca aşağı yukarı çevrilir. Aglutinasyon pozitif reaksiyonu göstermektedir.
- Polivalan ve monovalan serumlar sırayla kullanılır

❖ **Serotipin kesin doğrulaması**

Salmonella oldukları veya olabilecekleri kabul edilen suşlar kesin doğrulama için bir referans laboratuvarına gönderilebilmektedirler. Suşlar gönderilirken, beraberinde yapılanlarla ilgili bütün bilgiler de yer almalıdır:

R.S Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı,
Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü
Ulusal Entero-Patojenler Referans
Laboratuvarı,
Cemal Gürsel Cad.
Sıhhiye/ANKARA

6. Sonuçların ifade edilmesi

İncelenen numunedeki *Salmonella* varlığı veya yokluğu analiz raporunda bildirilecektir.

Talep üzerine brüt sonuçların tebliğ edilmesi olanağı da aşağıdaki cümleyle ilgili analiz raporlarında belirtilecektir:

«*Salmonella*'ların araştırılması için gerçekleştirilen biyokimyasal reaksiyonların ve deneylerin sonuçları talep üzerine sağlanmaktadır»

7. Standarda kıyasla farklılık

Standardın Talimatı	Laboratuvarda gerçekleştirilen	Doğrulama
42°C ± 0.5°C'de inkübasyon	42°C ± 1°C'de inkübasyon	Kullanılan programın spesifik gereklilik toleransı doğrultusunda ± 0.5°C oranında kesinlik elde edilmesini sağlamayan inkübasyon malzemesi

3.1.6. Analizin maliyeti

33,90 - 61,50 € arası

3.2. Patojen stafilokok araştırması ve sayımı membran filtreleme yöntemi (XP T 90-412 ve NF T 90-421)

3.2.1. Amaç

S. aureus derinin mikroflorasının ve insanların rhinopharynx'inin doğal bir bakterisidir. Dokularda çoğalma ve toksin üretme kapasitesi olmak üzere iki farklı mekanizma ile hastalık oluşturmaktadır.

3.2.2. Kapsam

S.aureus çevrede oldukça yaygındır. Havuz suyu, SPA'lar ve genel olarak eğlence amaçlı kullanılan sulara temas yoluyla insanlara bulaşmaktadır. Aktif klora *E.coli*'den daha dayanıklı oldukları için .dağıtım sularında da tespit edilmiştir.

E.coli S. aureus'un varlığını veya yokluğunu ortaya koymak için iyi bir gösterge değildir. Bunlara özellikle havuz sularında bakılır.

3.2.3. Standartlar

Patojen stafilokok araştırması ve sayımı

Membran filtreleme yöntemi (XP T 90-412 ve NF T 90-421)

3.2.4. Prensip

- Su numunesinin belli bir hacmi membran filtreden geçirilir ve membran filtre seçici besiyerine konulur;
- $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 44saat \pm 4saat inkübe edilir;
- Tanımlanan tipik koloniler tespit edilir ve doğrulanır;
- Doğrulanmış tipik koloniler sayılır.

Patojen stafilokoklar

Mannitollü Chapman seçici besiyerinde 36°C sıcaklıkta ve 44 saatte tipik görünümlü koloniler oluşturan, tavşan plazması için bir koagülaza sahip ve mikroskopik incelemede Gram (+) kok olarak görülen bakteriler, patojen stafilokok olarak kabul edilmektedir.

3.2.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

o. Değişiklikler:

- Yöntem (uygulama alanı, muhafaza sıcaklığı ve süresi)
- İnkübasyon sıcaklığının $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de harmonizasyonu
- Okuma ve sayım: beyaz, sarı ve turuncu renkteki tipik kolonilerin dikkate alınması
- Doğrulama ve sayım: koagülaz testi için negatif kontrolün gerçekleştirilmesi ve ekilecek tipik koloni sayısı hakkında ayrıntılı bilgi

1. Yöntem

<u>Uygulama alanı</u> Filtrelenebilir bütün su çeşitleri, özellikle havuz suları, insani tüketim amaçlı sular, sağlık kuruluşları binalarının suları ...	<u>Referans standart</u> XP T 90-412 Haziran 2006 NF T 90-421 Ağustos 2006
<u>Muhafaza</u> Cam veya polietilen numune şişeleri	<u>Analiz öncesi muhafaza süresi</u> Mutlaka numunenin alındığı gün ve en kısa sürede analiz yapılır
<u>Muhafaza sıcaklığı</u> Numunenin alınmasından analiz edilmesine kadar: $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$	
<u>Tespit Sınırı</u> 1 CFU	<u>Sonuçların ifade edilmesi</u> CFU/100ml

2. Güvenlik

GÜVENLİK VE ÖNLEMLER	İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARINA UYULMASI
ATIKLAR	BU KULLANIMA AYRILMIŞ ATIK KUTULARINA ATILMALARI

3. Prensi (yukarıya bkz.)

4. Materyal, kültür ortamları

Materyal

- Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan malzeme (steril pipetler, Petri kutuları, inkübatörler...)

Seyreltici

- Tuzlu peptone su: TPS

Seçici kültür ortamı

- Chapman Agar:

Doğrulayıcı kültür ortamları

- Glukozsuz PCA Agar veya Nutrient Agar
- Brain-heart buyyonu:
- Tavşan plazması:

5. İşlem şekli

Filtreleme

- Analiz edilecek numune çalkalanarak homojenleştirilir;
- Laboratuvarda hazırlanan Kullanım Talimatı doğrultusunda numunenin 100 ml'si membran filtreden geçirilir;
- Membran filtre, altta hiçbir hava kabarcığı kalmayacak şekilde manitolü Chapman besiyeri üzerine yerleştirilir.

İnkübasyon

- Bu şekilde hazırlanmış petriyerler 36°C ± 2°C sıcaklıkta 44saat ± 4saat inkübe edilir.

Okuma ve sayım

- Bacillus cinsinden bakterilere tekabül eden mukozalı iri kolonileri ayırarak, sarı bir hale ile çevrelenmiş farklı tiplerdeki beyaz, sarı veya turuncu koloniler karakteristik koloni olarak kabul edilir.

- Her türdeki karakteristik koloni için, kullanım talimatı gereğince Gram boyaması yapılır ve kok şeklindeki bütün koloniler şüpheli olarak kabul edilir.

Patojen stafilokokların doğrulaması ve sayımı

Ekimler mutlaka tespit edilmiş bütün şüpheli koloniler üzerinde yapılmamaktadır.

Ekimi yapılacak kolonilerin sayısı aşağıdaki şekilde belirlenmektedir:

Eğer N şüpheli koloni sayısı ise, X ekilecek koloni sayısıdır (her tür koloni için):

$1 \leq N \leq 5$	$X = N$
$5 < N \leq 25$	$X = 5$
$25 < N$	$X = \sqrt{N}$ üst tam sayıya yuvarlayarak

Ekimler kolonilerin TPSde süspanse hale getirilmesiyle gerçekleştirilmektedir.

- Kok olarak tanımlanmış şüpheli her koloni Brain-heart buyyonu'na ekilir ve 21saat \pm 3saat boyunca $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübe edilir;
- Hemoliz tüpü içerisinde, 0,5 ml tavşan plazmasına 0,5 ml Brain-heart buyyon kültürü eklenir. Karışım $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübe edilir.
- *Staphylococcus aureus* suşları plazmanın 4-24 saat arası değişen bir süre içerisinde koagülasyonuna neden olur. 4 saat ve 24 saatlik inkübasyondan sonra okuma işlemi gerçekleştirilir;
- Coagulum başlangıçta sıvının oluşturduğu hacmin $\frac{3}{4}$ 'ünden fazlasını kapsıyor ise, koagülasyon gösterilen tüpler pozitif olarak kabul edilir. Reaksiyon 4 saatlik inkübasyondan sonra pozitif ise, işlem sürdürülmez;
- Kok olarak tanımlanan ve tavşan plazması için bir koagülaz içeren koloniler, patojen stafilokok olarak kabul edilir.

Bir negatif koagülasyon kontrolünün yapılması (her bir doğrulama dizisi için bir kontrol)

- Hemoliz tüpü içerisinde, 0,5 ml tavşan plazmasına 0,5 ml steril Brain-heart buyyonu eklenir;
- Karışım $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübe edilir. Kontrol tübünde koagülasyon belirtisi görülmemelidir.

Bir pozitif koagülasyon kontrolünün yapılması (haftalık kontrol)

Pozitif kontrol haftalık kalite kontrolü kapsamında, izole edilen *Staphylococcus aureus* kolonisi üzerinde gerçekleştirilen koagülasyon deneyinden oluşmaktadır.

Sonuçların yorumlanması:

Gram	+		-
Koagülaz	+	-	
Sonuçlar	Patojen Stafilokok	Patojen Olmayan Stafilokok	0

6. Kontrol

Uygulanan kontroller “Membran filtrelemenin genel metodu” adlı laboratuvar tarafından hazırlanan kullanma talimatında açıklanmaktadır (Membran filtrenin sterilite kontrolü, kullanılan besiyeri kontrolü vs).

7. Hesaplama

Her koloninin tek bir mikroorganizmadan oluştuğu kabul edilmekte ve, sayı, Koloni Üreten Üniteler veya Koloni Oluşturan Üniteler (CFU) şeklinde ifade edilebilmektedir.

Sonuç aşağıdaki gibi yazılır:

Patojen Stafilokok n CFU / 100ml

ve sadece talep üzerine:

Patojen Olmayan Stafilokok n CFU / 100ml

Sonuç aşağıdaki şekilde hesaplanmaktadır:

$$N = ((ni.ci) / ri)$$

ni: membran üzerindeki **tipik şüpheli** koloni sayısı;

ci: ekimi yapılmış ve **doğrulanmış tipik koloni** sayısı;

ri ekimi yapılmış **tipik** koloni sayısı.

Sonuçlar (okumalar, seyreltme, ekim) laboratuvarında hazırlanmış belgeler üzerinde belirtilmektedir

8. Standarta kıyasla farklılık

Standardın talimatı	Laboratuvarında gerçekleştirilen	Doğrulama
YOK	YOK	YOK

3.2.6. ANALİZİN MALİYETİ

9,00 - 23,90 € arası

3.3. Enterovirüslerin araştırılması

Cam yünü üzerinde konsantrasyon ve hücrel kültürle tayin yöntemi

(XP T 90-451)

3.3.1. Amaç

Enterovirüsler çok kısa bir inkübasyon döneminin ardından, miyokardit, menenjit, poliomiyelit vb. gibi çok sayıda ağır hastalıklara sebep olmaktadır. Enterovirüsler enfekte olmuş bireyler tarafından gaita ile dışkılanmaktadır. Kaynak sularında, yüzey sularında ve bazen de insani tüketim amaçlı sularda bulunmaktadır.

3.3.2. Kapsam

Halk Sağlığı açısından, enterovirüsler insan sağlığı üzerinde risk teşkil etmektedir. Sadece enfeksiyona sebep olan virüsler dikkate alınmaktadır. Bir virüsün enfeksiyona yol açabilmesinin kanıtı hayvanlarda veya hücrel kültürdeki çoğalma yetisine dayanmaktadır. Su örneklerinden hücre kültürü yöntemiyle kolayca tespit edilebilecek üç virüs ailesi: Adenoviridea'lar, enterovirüs türüyle sınırlandırılmış Picornaviridea'lar ve Reoviridea'lardır.

Çoğu vakalarda tayinleri bir konsantrasyon safhasını gerektirmektedir. Enterovirüsler dezenfeksiyona karşı fazlasıyla dirençli olduklarından, *E.coli* yokluklarını veya varlıklarını göstermek için iyi bir gösterge değildir.

3.3.3. Standartlar

Enterovirüslerin araştırılması

Cam yünü üzerinde konsantrasyon ve hücrel kültürle tayin yöntemi

(XP T 90-451)

3.3.4. Prensiptir

Sulardaki virüslerin araştırılması, aşağıda belirtilen iki aşamadan oluşmaktadır:

- virüslerin konsantrasyonu,
- izole edilmiş virüslerin tayini, sayımı ve karakterizasyonu

Su numunesindeki virüslerin konsantrasyonu

- Sodyum-Kalsiyum ihtiva eden cam yünü aracılığıyla su numunesinin filtrelenmesi;
- Protein içeren bazik pH'lı, solüsyonla virüslerin desorbsiyonu ve bu işlemi müteakiben asit pH'lı organik flokülasyonla tekrar konsantrasyon;
- Santrifügasyondan sonra, çökelti sodyum monohidrogenofosfat solüsyonu içerisinde tekrar süspanse edilir;

- Nihai konsantrenin dekontamine edilmesi için önceden hazırlanan membranla filtreleme.

İzole edilmiş virüslerin sayımı

- En az 40 inokulum kullanan EMS yöntemiyle sayımın gerçekleştirilmesi;
- Konsantrenin mikroplaklarda yeni üretilmiş BGM hücrelerine inokülasyonu;
- 5 gün boyunca 37°±1°C sıcaklıkta inkübasyondan sonra (1inci pasaj), her bir besiyerinin içeriğinden bir fraksiyonun ardışık şekilde iki pasajının yeni mikroplaklar üzerinde gerçekleştirilmesi;
- 5 günlük 3.üncü inkübasyondan sonra doğrulanmış kuyucukların sayımı.

İzole edilmiş viral partiküllerin karakterizasyonu

- 37°C±1°C Sıcaklıkta tek tabaka (monolayer) kültürü hazırlanmış BGM hücrelerine her bir pozitif besiyerinin içeriğinden bir fraksiyonun inokülasyonu;
- Bir sitopatik etki net bir şekilde görüldüğünde, enfekte olmuş hücrelerin metanolla sabitlenmesi ve enfekte olmuş hücrelerin Hemalum ve eozin ile boyanması;
- Bir enterovirüsün varlığını gösteren sitopatik etkilerin mikroskopta gözlemlenmesi.

Kültürü yapılabilecek enterovirüsler

Seçilen hücre serisi dikkate alınarak (BGM hücresi), kültürü yapılabilecek enterovirüsler aşağıdakileri içermektedir:

- Poliomyelit virüs türlerinin tamamı;
- Bütün Coxsackievirus B'ler (6 serotip) ve Coxsackievirus A 9 ve 16 serotipleri;
- Echovirüs türünde, 4 -5 - 7 - 11 - 12 -13 14 - 15 -16 - 17 - 19 -21 - 22- 23 - 24 - 25 ve 27 serotipleri.

3.3.5. Kalite uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

0. Değişiklikler

Değişiklik: basitleştirilmiş yazılım

1. Yöntem

<p><u>Uygulama alanı</u> Bütün su çeşitleri. Analiz edilebilen hacimler: - Tüketim suyu: ≥100 l - Yüzey suları ve deniz suyu: 10 l'den 100 l'ye - Atık su: 5 l'den 20 l'ye</p>	<p><u>Referans standart</u> XP T 90-451: Mart 1996 (T90-451) - Standart deney -</p>
<p><u>Muhafaza</u> - Steril polietilenli bidon (Jerrican) (dezenfekte edilmiş su için Na tiosülfat ile) - Alanda (<i>in situ</i>) numune alma</p>	<p><u>Analizden önce muhafaza süresi</u> 24 saat Şişelenmiş sular için 12 saat</p>

Muhafaza sıcaklığı	
Taşıma esnasında: $\leq 10^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta buzdolabı veya buz akülü izoterm kap İlk 6 saat tolerans: ortam sıcaklığı ($<25^{\circ}\text{C}$) Laboratuvara getirilmesinden analize kadar: soğuk oda $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$	
Tespit sınırı	Sonuçların ifade edilmesi
Ekilen besiyeri sayısına göre	MPNCU / l (MPNCU veya EMSÜS: most probable number of cytopathic units:: en muhtemel sitopatik ünite sayısı)

2. Güvenlik

GÜVENLİK VE ÖNLEMLER	İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARINA UYULMASI
ATIKLAR	BU KULLANIMA AYRILMIŞ ATIK KUTULARINA ATILMALARI

3. Prensi (yukarıya bkz.)

4. Materyal, reaktifler

4.1. Virüslerin cam yünü üzerinde konsantre edilmeleri için materyal ve reaktifler

Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan materyal:

Özellikle:

- Rantigny 725 referanslı ve Saint-Gobain-Isover-Orgel: BP 19 – 60290 Rantigny tarafından dağıtımı yapılan sodyum-calcium'dan oluşan cam yünü
- İç çapı 42 mm ve asgari yüksekliği 100 mm olan paslanmaz çelikten filtreleme karter'leri
- Sterilize edilebilir bir pompa, bir debimetre, borular, hızlı tip bağlantılar
- Yüksek kapasiteli santrifüj $40\ 000\ \text{ms}^{-2}$
- Plastik maddeden yapılmış 10-25 l arası kapasiteli steril numune alma bidonu, kabı (jerricans)
- $0,2\ \mu\text{m}$ çapında poroziteye sahip selüloz asetat membran steril filtreleme ünitesi

Reaktifler:

- 1 mol/l glisin solüsyonu
- %30 oranında beef extract (sığır özütü) solüsyonu
- Elüsyon solüsyonu
- Antibiyotik ve antimantar solüsyonu
- Sodyum monohidrogenofosfat 0,15 M solüsyonu
- Steril dana serumu solüsyonu

4.2. Virüslerin tayini, sayımı ve karakterizasyonu için materyal ve reaktifler

Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan materyal:

Özellikle:

- İvert (Ters) mikroskop
- Laminer akımlı kabin
- Steril mikroplak
- 0,2µm çapında poroziteye sahip selüloz asetat membran steril filtreleme ünitesi
- Leighton veya eşdeğer tüpler

Reaktifler:

- BGM devamlı (continous) hücre serisi (Buffalo Green Monkey Kidney)
- Steril antibiyotik solüsyonu
- Üretme (growth) vasatı
- İdame vasatı
- Sayım için ortam
- Steril tripsin solüsyonu EDTA
- Fosfatla tamponlanmış tuzlu solüsyon
- Mayer yöntemiyle solüsyonda Hemalum
- Eozin solüsyonu
- Metanol
- Mutlak Etanol
- 96% Etanol
- 80% Etanol
- Kloridik alkol solüsyonu
- Toluen

5. İşlem şekli

5.1. Virüslerin cam yünü üzerindeki konsantrasyonu

5.1.1. Cam yününün yoğunlaştırılması

- 50 gram cam yünü tartılır ve 3 eşit parçaya ayrılır;
- 3 parça ayrı ayrı distile suyun içerisine yerleştirilir;
- 1.inci parça 42 mm çapındaki kartere yerleştirilir ve 0,5g/cm³ oranında yoğunlaştırılır;
- Kalan iki parça için aynı işlem tekrarlanır.

5.1.2. Cam yününden oluşan filtrenin sterilizasyonu

- 200 ml HCl solüsyonu 1 mol/l yapılarak cam yünü filtresinin sterilizasyonu.
- 500 ml distile suyla duruluma.
- Daha sonra 400 ml NaOH'ın 1 mol/l yapılması.
- Nötr bir yapı elde edilene kadar steril distile suyla durulanması.

5.1.3. Cam yünü üzerinde konsantrasyon

- Cam yünü kartuşunun dikey olarak bırakılması.

- 100 l/saat debili basınçla su numunesi filtrelemesi.

Açıklama:

Konsantrasyon safhasından sonra, cam yünü filtresi kuru bırakılmamalıdır . Cam yünü hacmine eşit veya daha fazla hacimde analiz edilmiş su numunesinin kartuşun içerisinde muhafaza edilmesine özen gösterilir.

5.1.4 Virüslerin elüsyonu

Elüsyona başlamadan önce:

- Cam yünü filtresi kurutulmadan kartuşun içerisindeki atık su hacmi elimine edilir;
- Cam yünü kartuşunun üzerine dik şekilde elüsyon solüsyonundan 300 ml ihtiva eden bir kap yerleştirilir;
- Konsantreyi almak için cam yünü kartuşunun altına steril bir toplama şişesi yerleştirilir;
- Alta yerleştirilen toplama şişesindeki eluatın üçte birini alacak şekilde, elüsyon solüsyonu yer çekimiyle yavaşça akıtılır. Elüsyon solüsyonunun cam yünü filtresinden geçişinin başlamasıyla birlikte, özellikle renkli olmayan ilk ml'ler olmak üzere, kartuştan akan sıvının tamamı alınır. Enjeksiyon durdurulur ve bir dakikalık durma süresince gözlem yapılır.
- Elüsyon solüsyonunun 2.inci çeyreği için işlem tekrarlanır. Son fraksiyon cam yünü filtresinden hızlıca geçmiştir.

Açıklama:

Elde edilen eluatın (1.inci konsantre) muhafaza edilmesi için manyetik karıştırıcı üzerinde, 3 mol/l HCl ile 7,2±0,1 pH oranıyla nötralize edilir

5.1.5. İkincil konsantrasyon

- Manyetik karıştırıcı üzerinde 3 mol/l HCl ile 3,5±0,1 pH oranıyla 1.inci konsantre asitlenir.
- Bir saat boyunca ortam sıcaklığında tepkimeye bırakılır.
- 45 dakika boyunca 4°C 35 000 ms⁻² 'de santrifüje edilir: yüzeydekiler elimine edilir ve çökelti asgari hacmi 1.inci konsantrenin başlangıç hacminin 1/50'sine tekabül eden sodyum monohidrogenofosfat solüsyonuyla alınır;
- pH dengesi 1 mol/l HCl veya 1 mol/l NaOH ile, 7,2 ± 0,1 oranına getirilir.

5.1.6. Bakteri ve mantarların dekontaminasyonu

- 2 ml'lik steril bovine serum (dana serumu) solüsyonu ile 0,2 µm'lik selüloz asetat membrandan nötralize edilmiş konsantre filtre edilir.

5.1.7. Konsantrelerin muhafaza edilmesi

- Birincil konsantre ile ikincil konsantre, inokülasyondan önce $4^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta en fazla 48 saat boyunca muhafaza edilebilir veya -20°C derecede bir ay boyunca dondurulabilirler;
- Dondurulmuş olan her bir konsantrenin, çözümlerinden en fazla 4 saat içerisinde hücrelere inokülasyonlarının yapılması gerekmektedir.

5.2. Virüslerin tayini, sayımı ve karakterizasyonu

5.2.1. İnokülasyon

- Eagle temel ortamından (MEM) en az %10'luk bir ölçü son konsantreye eklenir;
- Son konsantrasyonun karışımı 25 µl/kuyucuk olacak şekilde mikropolanın en az 40 kuyucuğa dağıtılır;
- 175 µl/kuyucuk oranında BGM hücre süspansiyonu konsantreyi içeren kuyucuklara dağıtılır;
- Hücresel tabakanın (monolayer) durumuna göre, mikropolar 5-8 gün boyunca $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübasyona bırakılır;
- İnübasyon dönemi boyunca mikropolar her gün gözlemlenir ve sitopatik etki gösteren besiyerleri tespit edilir.

Açıklama:

Eğer ekilen bütün kuyucuklar pozitif ise, 5-8 günden önce inkübasyon durdurulmalıdır.

5.2.2. Pasajlama

- İnübasyondan sonra, mikropolar 3 kere -20° derecede dondurulup 3 kere çözdürülürler;
- Her kuyucuk içeriğinin 25 µl'si steril bir şekilde yeni mikropolarla transfer edilir;
- Kuyucukların her birine hücre süspansiyonundan 175µl dağıtılır;
- 7 gün boyunca $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta inkübasyona bırakılır;
- Mikropolar günlük olarak gözlemlenir ve sitopatik etki gösteren kuyucuklar tespit edilir;
- İkinci pasajın inkübasyonundan sonra aynı işlem tekrarlanır.

Açıklama.:

Bu ekimin amacı aşağıdaki şekildedir:

- 1.inci ve 2.inci pasaj esnasında ortaya çıkan sitopatik etkiler konfirme edilir;
- Muhtemel toksik etki azaltılır (viral olmayan sebepten kaynaklanan lezyonların hücre tabakasında ortaya çıkması);
- Yavaş çoğalan, 1.inci inokülasyon ve 1.inci pasajlama esnasında gözle görülür sitopatik etki yaratmamış olan viral partiküllerin ortaya çıkarılması sağlanır.

5.2.3. Virüslerin sayımı

- Mikroplakanın inkübasyonundan sonra (3.üncü pasaj 2.inci ekim), inoküle edilmiş kuyucukların sayı sıcaklıkna konfirme edilmiş pozitif kuyucukların sayısı oranlanır.

5.2.4. İzole edilmiş virüslerin karakterizasyonu

5.2.4.1. Lamelli tüplere geçiş

- BGM hücreleri deney günü konflüan bir örtü elde edecek şekilde Leighton tüpleri içinde cam lameller üzerinde üretilir;
- Üretme vasatı dökülür;
- Her pozitif kuyucuktan 100 µl/tube oranında inoküle edilir;
- 90 dakika boyunca 37°C±1°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılır;
- İdame ortamından 1 ml eklenir;
- 37°C±1°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılır;
- Sitopatik etkilerin ortaya çıkması mikroskopla günlük olarak gözlemlenir.

5.2.4.2. Hücrelerin sabitlenmesi

- Bir sitopatik etki yeteri kadar gelişmiş ise, hücresel tabaka kültürünün yüzeyindeki maddeler elimine edilip, PBS ile durulanır;
- 30 dakika boyunca metanol ile sabitlenir, derhal boyanır veya olmaması halinde %80'lik etanol içerisinde muhafaza edilir.

5.2.4.3 Hücrelerin boyanması

Hücresel tabaka sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçmektedir:

- Akan suda 5 kere ve daha sonra distile suda bir kere yıkanılırlar;
- 20 dakika boyunca hemalum banyosuna batırılıp daha sonra durulanırlar;
- pembe renk elde edilene kadar klorhidrik alkol ile farklılaştırılırlar;
- musluk suyuyla 4 kere durulanırlar ve preparat mavi renk olana kadar yaklaşık 30 dakika boyunca ortam sıcaklığında bırakılırlar;
- 10 dakika boyunca eozin banyosuna batırılır ve hızlıca distile su içerisinde yıkanılırlar;
- Ardışık olarak 2'şer dakika boyunca, %80, %90 oranında metanollü banyo, mutlak etanol banyosu ve son olarak toluen banyosu içerisinde batırılırlar;
- ortam sıcaklığında kurutulurlar.

Boyanmadan sonra, sitopatik lezyonların mikroskopla incelenmesi tespit edilen virüslerin ailesinin belirlenmesini sağlamaktadır.

Bir enterovirüsün in vitro hücresel kültürler üzerindeki sitopatik etkisi, hücreler düzeyinde çekirdeği sıkıştıran sitoplasmik eozinofil inklüzyonla karakterize edilmektedirler.

5.3. Enterovirüslerin sayımı

Karakterizasyondan sonra, inoküle edilmiş kuyucukların sayısına konfirme edilmiş (enterovirüslerin karakteristik sitopatik etki yaratan) pozitif kuyucukların sayısı oranlanır

6. Hesaplama

6.1. İzole edilmiş virüslerin sayımı

XP T 90-451 Standardının ekinde verilen yazılım (program) aracılığıyla, ml olarak, ekilmiş toplam hacim için En Muhtemel Sitopatik Ünite Sayısı (MPNCU) hesaplanır.

6.1.1. 1.inci konsantrenin bir fraksiyonunun alınmasıyla virüslerin sayılması

1.inci konsantrenin MPNCU'sü MPNCU₁ ve 2. inci konsantrenin MPNCU'sü de MPNCU₂.

Sonuçlar aşağıda belirtilen durumlara göre ifade edilmelidir:

$$* MPNCU_2 \geq MPNCU_1$$

Sonuç orijinalde litre olan su numunesinin hacminde bulunan sitopatik ünite sayısı olarak ifade edilmektedir (yani MPNCU₂).

$$* MPNCU_1 \geq MPNCU_2$$

Sonuç orijinalde litre olan su numunesinin hacminde bulunan sitopatik ünite sayısı olarak ifade edilmektedir (yani MPNCU₁).

6.1.2. 1.inci konsantrenin bir fraksiyonunun alınmadan virüslerin sayılması

Sonuç orijinalde litre olan su numunesinin hacminde bulunan sitopatik ünite sayısı olarak ifade edilmektedir (yani MPNCU₂).

6.2. İzole edilmiş enterovirüslerin sayımı

Yazılım aracılığıyla, ekilmiş konsantrenin tamamı için, ml olarak MPNCU'sü hesaplanır; yapılan hesapta sadece enterovirüslere tekabül eden MPNCU'lerin muhasebesi yapılır.

Sonuçlar orijinal su numunesinin hacminde bulunan litre olarak sitopatik ünite sayısı olarak ifade edilmektedir

7. Kontrol

Uygulanan kontroller aşağıda yer almaktadır ve talimatlarla açıklanmalıdır:

“Kullanılacak beef extract (sığır özütü) konsantrasyonunun kontrolü”

“Hücre süspansiyonunun konsantrasyonunun kontrolü (BGM) “

“Numune alma materyali dekontaminasyonunun kontrolü”

8 Standarta kıyasla farklılık

Standardın talimatı	Laboratuvarda gerçekleştirilen	Doğrulama
	YOK	

3.3.6. Analizin maliyeti

150 - 200 € arası

4. BÖLÜM

KİMYASAL ANALİZ

1. DENİZ SULARININ ÖZELLİKLERİ

Yüksek düzeyde mineralli sulardaki (> 5 g/L) mikro-kirleticilerin analiz edilmesi özellikle matris etkisi ve analiz performansının azalması nedeniyle oldukça zordur.

Bunun dışında kimi parametrelerin analizi (ilgili tüzüklerde daha yüksek değerlerde belirtilmiş olan parametreler için) ve özellikle hassas olarak nitelendirilebilen kimi teknikler sırasında (ICP-MS) numunelerin seyreltilmesinin dışında, farklı ön arıtımların da uygulanması gerekir.

Yapılacak ön yoğunlaştırma işlemi şelat oluşturuvcu bir reçine kolonundan geçirilerek gerçekleştirilir. Bu ön arıtım aşamasında, zorunlu olarak kalibrasyon ve kör analiz yapılarak kontroller yapılmalıdır.

Polarografi gibi standartlaştırılmış alternatif metotlara başvurulması öngörülebilir, bu yolla numunelerin tuzluluğuna bağlı (DIN standardı) matris etkileri ortadan kaldırılabilir.

2. TAYİN EDİLECEK ELEMENTLER

2.1. Çözünmüş florür, klorür, nitrit, ortofosfat, bromür, nitrat ve sülfat iyonlarının sıvı iyon kromatografisi ile tayini (TS ISO 10304-1: Az kirlenmiş sular için metot)

2.1.1. Amaç

Bu kimyasal parametreler suların jeokimyasal açıdan tanımlanmasına ve bazı zirai ya da evsel kirliliklerin kaynağının araştırılmasına yardımcı olmaktadır. Miktarı yüksek bu anyonların araştırılması suların kimyasal yapılarına ilişkin bilgilerin toplanmasına ve insani tüketim amaçlı suların içilebilirlikleri açısından standartlara uygunluğunu denetlenmesini amaçlamaktadır.

2.1.2. Kapsam

Halk sağlığı açısından bu anyonların kullanım sularında var olması sakınca teşkil etmemektedir. İnsani tüketim amaçlı sulardaki iyonlardan florür için 1.5 mg/L, nitrat için 50 mg/L, nitrit için 0.1 mg/L, sülfat için 250 mg/L değerlerini aşmamalıdır.

Bu iyonlar ile ilgili araştırmalar, zararlı ot ve haşereleri imha eden ilaçların neden olduğu sulardaki jeokimyasal kaynağı ve özellikle nitratların neden olduğu enfeksiyon kaynaklarını belirlemeye ve bu bileşenleri imha ederek ya da koruma önlemleri olarak kirliliğin önüne geçmeyi amaçlamaktadır.

2.1.3. Standartlar

Çözünmüş florür, klorür, nitrit, ortofosfat, bromür, nitrat ve sülfat iyonlarının sıvı iyon kromatografisi ile tayini (TS ISO 10304-1: Az kirlenmiş sular için metot)

2.1.4. Prensiş

İyonların ayırımı sıvı kromatografi yöntemi ile ayırma kolonları kullanılarak yapılır. Durgun faz olarak düşük kapasiteli anyon değiştrici ve eluent olarak zayıf monobazik ve dibazik asitlerin tuzlarının sulu çözeltileri kullanılır. Tespit işleminin yaygın olarak kullanılan iletkenlik dedektörü ile yapılır.

Numune alma ve hazırlanması

Numuneler, polietilen kaplı ya da deiyonize suyla çalkalanmış PTFE kaplı şişelere alınır.

Numune analize kadar 4 °C - 6 °C'ye soğutulmuş kapalı bir alanda ışıktan uzak olarak bekletilir. Numune laboratuvara geldikten sonra membran filtreden (göz açıklığı 0.45 µm) süzülerek anyonların partikül madde üzerinde adsorpsiyonu veya bakteriyel gelişme nedeniyle anyonların dönüşümü önlenir. Membran kullanıldığında numunenin kirlenme riskini önlemek için numune süzüntüsünün ilk kısmı atılır. Eğer nitrit tayini yapılacak ise şişeler tamamen doldurulur.

Kalibrasyon ve doğrulama

- Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması:

Florür, nitrit, ortofosfat, bromür, nitrat, klorür ve sülfat iyonlarının tayini için 1000 mg/L ana stok çözeltilerinden florür, nitrit, ortofosfat ve bromür iyonları için 0.1 mg/L – 1 mg/L aralığında, nitrat, klorür ve sülfat iyonları için 1 mg/L – 10 mg/L aralığında kalibrasyon çözeltileri hazırlanır.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

İçerisinde kör, kalibrasyon çözeltilerinin, kontrol çözeltilerinin, numunelerin ve her 10 numune için kontrol noktalarını içeren ölçümlerin yapıldığı bir analiz serisi hazırlanır. Her

anyonun miktar tayini için hazırlanan standart serinin konsantrasyonlarına karşılık gelen okumalardan anyonların miktarı belirlenir.

Analiz

- Standartların ve numunelerin enjekte edilmesi
- İyon kromatografisi ile iyonların ayrıştırılması
- İletkenlik dedektörü ile tarama
- Analitik ayırımı gerçekleştirme: kalibrasyon, kör, kontrol noktaları, numune

Bileşenlerin tanımlanması

İyonlar kolonda alıkonma sürelerine göre tanımlanır.

Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar mg/L olarak ifade edilir.

2.1.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

0. Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

1. Yöntem

Uygulama alanı Yöntem, yer altı sularında ve insani tüketim amaçlı sularda bulunan bu anyonların tayininde kullanılır.	Referans standartları -ISO 10304-1, TS EN ISO 10304-1 Diğer yöntemler: -Nitrat/ nitrit: EN ISO 13365 (sürekli akış) -Nitrat: ISO 7890-3 (Spektrometrik yöntem) -Sülfat: ISO 22743 (sürekli akış) -Klorür: EN ISO 15682 (sürekli akış)
Muhafaza - Polietilen ya da PTFE kaplı şişeler kullanılır. -Göz açıklığı 0.45 µm olan membran filtreden süzülür.	Analizden önce muhafaza süresi -Numune alımından sonra mümkün olan en kısa sürede analiz edilir. -4° C – 6 °C arasındaki sıcaklıkta muhafaza edilir. -Kör hazırlanır. -Periyodik olarak şişenin kontaminasyonu kör ile kontrol edilir.
Muhafaza sıcaklığı Numuneler soğuk akümülatörlü izoterm konteynirlerle veya ≤ 10°C'deki soğutulmuş araçlarla taşınmalıdır. Laboratuvara getirildikten sonra analiz edilene kadar 5°C ± 3°C veya 4°C-6°C arasındaki sıcaklıktaki soğuk odada muhafaza edilir.	

Ölçüm sınırı 0.05 ile 0.1 mg/L	Sonuçların ifade edilmesi mg/L
--	--

2. Güvenlik

GÜVENLİKÖNLEMLERİ	Standart çözeltileri ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
ATIKLAR	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işleme imha edilmelidir.

3. Amaç (bkz. yukarı)

4. Materyal, reaktifler

Araç ve gereçler

-Pipetler, mikropipetler, etüv, desikatör, balon joje, 0.45 µm' lik membran filtre, polietilen ve PTFE'den yapılmış numune alma şişeleri

-İlekenlik dedektörlü iyon kromatografi cihazı

-Ayrırma kolonu, önkolon

Reaktifler

-0.1 µS / cm altında iletkenliğe sahip deiyonize su

-Gaz: helyum

-1000 mg/L florür, klorür, bromür, nitrit, nitrat, sülfat, ortofosfat içeren ana standart çözeltiler

-Genellikle potasyum karbonat/ potasyumbikarbonat çözeltileri

5. Uygulama

-Numuneler göz açıklığı 0.45 µm olan membran filtre ile süzülür.

-Kromatografi sisteminin kullanım koşulları sağlanır.

- İçerisinde kör, kalibrasyon çözeltilerinin, kontrol çözeltilerinin, analizi yapılacak numunelerin ve her 10 numune için kontrol noktalarını içeren ölçümlerin yapıldığı bir analiz serisi hazırlanır.

-Çalışma aralığına uygun 5 ile 10 tane kalibrasyon çözeltisi, stok çözeltiden veya karışık standart çözeltiler kullanılarak hazırlanır. Her numune için uygun kalibrasyon eğrisi çizilerek ölçüm yapılır.

6. Kontrol

Kalite kontrolleri aşağıda belirtilmiştir:

-Kör analizi yapılır.

-Numunenin çalışma aralığı belirlenir; numunenin belirlenen standart aralığında olduğu kontrol edilir.

-Standart aralığında bir kontrol çözeltisi kullanılır. Korelasyon katsayısının kontrolü yapılır.

-Numune alımı için kullanılan şişelerin serilerinin numaralandırma kontrolü yapılır.

-Kolonda iyon ayrımı denetlenir.

-Yukardaki kriterlere uyulması halinde iyonlar kolonda alıkonma sürelerine göre tanımlanır.

7. Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar mg/L olarak ifade edilir.

8. Standartlara göre ayırım

Standardın Öngördükleri	Laboratuvarın Yaptığı Değişiklikler	Doğrulama
	Yok	

2.1.6 Analiz Maliyeti

30 € ile 60 € arasında

2.2. Fenol İndeksinin Tayini

TS 6227 ISO 6439

2.2.1. Amaç

Sanayi alanlarından veya evlerden çıkan bazı kirleticilere bağlı fenol bileşiklerinin tayini ile insani tüketim amaçlı suların standartlara uygunluğunun denetlenmesi amaçlanmaktadır.

2.2.2. Kapsam

Başka kirlilik parametrelerine bağlı fenol indeksi içeriğinin ölçümü (Kimyasal Oksijen İhtiyacı-COD, Toplam Kjeldahl Azotu-TKN, Askıdaki Katı Madde-AKM) yapılır. Fenol tayini evsel atık sularında bir kirliliğin olup olmadığını ve içme amaçlı kullanılması düşünülen sulara uygulanan işlemlerin etkili olup olmadığını göstermesi açısından önemlidir.

2.2.3. Standartlar

Fenol indeksinin tayini TS 6227 ISO 6439

2.2.4. Prensipte

Fenoller, bakır sülfat, ortofosforik asit (pH < 1.5) ve sodyum klorür varlığında damıtma ile ayrılırlar. Numune, pH 9.1'e getirilir, ardından potasyum ferrisiyanür varlığında amino-4-antipirin ile tepkimeye sokulur.

Kloroformla ekstrakte edilmiş renkli kompleks 460 nm'de spektrofotometre ile ölçülür.

Numune alma ve hazırlanması

Numuneler taşıma süresince 4 °C - 6 °C arasındaki sıcaklıkta soğutulmuş, 1 g/L bakır sülfat varlığında ve fosforik asit (pH < 4) ortamında kapalı bir alanda ışıktan uzak olarak muhafaza edilmelidir.

Kalibrasyon ve doğrulama

0.025 -0.5 mg/L fenol kalibrasyon eğrisine göre ölçüm yapılır.

Analiz

Reaktifler: (Reaktiflerin konsantrasyonu, hazırlanacak kimyasalın formül yapısı ve kullanım süreleri verilmelidir)

- Sodyum klorür (analitik saflıkta)
- Kloroform (analitik saflıkta)
- Minimum % 85'lik fosforik asit
- 100 g/L'de bakır sülfat çözeltisi
- Tampon çözelti: Aşağıdaki kimyasal bileşiklerden ve bileşimden oluşur
- 34g amonyum klorür (analitik saflıkta)
- 200g potasyum sodyum tartarat

-15 mL amonyum hidroksit (analitik saflıkta) 700 mL suda çözünür, 1000 mL'ye tamamlanır ve amonyum hidroksit ilave ederek pH, 9.5'e ayarlanır.

-Potasyum ferrosiyandır, 20 g/L'lik çözeltisi

-Amino-4 antipirin, 20 g/L'lik çözeltisi

Uygulama

500 mL numune alınır ve pH'ı 1.5'e ayarlandıktan sonra 1 mL bakır sülfat ilave edilir ve destilasyon yapılır.

Destile edilmiş numune üzerine

-10 mL, pH 9.5 olan tampon çözelti ilave edilir

-2 mL amino-4 antipirin çözeltisi ilave edilir.

-2 mL potasyum ferrisiyanür ilave edilir

-5 dakika beklenir daha sonra,

Sırasıyla 5 mL, 3 mL ve 2 mL kloroform ilave edilerek çalkalanır.

Bu metotla 0.025 mg/L ile 0.5 mg/L aralığında fenol ölçülebilmektedir. Bu aralıkta bir çalışma standart serisi hazırlanarak aynı işlemler yapılır ve 460 nm'de spektrofotometre ile ölçüm yapılır.

Kör deneyi yapılır.

Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar mg/L olarak ifade edilmektedir.

2.2.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

0. Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

1 Yöntem

Uygulama alanı Bu yöntem, 0,5-0,025 mg/L aralığında fenol tayininde kullanılmaktadır.	Referans standartları - TS 6227 ISO 6439
---	--

<u>Muhafaza</u> -Cam şişede muhafaza edilmelidir. -1g/L bakır sülfat ilave edilir ve asitlik pH < 4 olacak şekilde ayarlanır.	<u>Analizden önce muhafaza süresi</u> -4– 6 °C arasındaki sıcaklıkta muhafaza edilir. -Numune alımından sonra mümkün olan en kısa sürede analiz edilir.
<u>Muhafaza sıcaklığı</u> Numuneler soğuk akümülatörlü izoterm konteynırlarla veya $\leq 10^{\circ}\text{C}$ 'deki soğutulmuş araçlarla taşınır. Laboratuvara getirildikten sonra analiz edilene kadar 4°C - 6°C arasındaki sıcaklıktaki soğuk odada muhafaza edilir.	
<u>Ölçüm sınırı</u> 0.025 mg/L Fenol	<u>Sonuçların ifade edilmesi</u> mg/L

2. Güvenlik

GÜVENLİK ÖNLEMLERİ:	Standart çözeltiler ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
ATIKLAR	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işlemle imha edilmelidir.

3 Prensi (Bkz. yukarı)

4. Malzeme, reaktifler

Araç ve gereçler

- 0.1 mg'lik hassasiyete terazi
- Damıtma cihazı
- Küçük kapaklı şişe
- UV Spektrofotometre
- 10 veya 50 mm'lik kuvars küvet

5. Kontrol

Boş bir deneme yapılır.

Damıtma ile fenollerin düzgün alımının kontrolü sağlanır.

6. Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar mg/L fenol olarak ifade edilir.

7. Standartlara göre ayırım

Standardın Öngördükleri	Laboratuvarın Yaptığı Değişiklikler	Doğrulama
	Yok	

2.2.6. Analiz Maliyeti

10 € ile 20 € arası

2.3. Civa Tayini

2.3.1. Amaç

Sulardaki varlığı 0.1µg/L seviyesinde olup yüzey sularında 0.1'den 1 µg/L'ye kadar civa bulunabilmektedir. Civa ve bileşikleri insan için zehirleyicidir (özellikle de civanın bakteriler ile değişikliğe uğramasından kaynaklanan metil-civa). Bu element sulak ortamda organizmalarda ve besin zinciri boyunca birikir.

2.3.2. Kapsam

Bu metot, sularda bulunan civanın tayinini kapsar.

Avrupa Birliği Değeri: 1µg/L

DSÖ Kılavuz değeri: 1 µg/L

ABD: 2 µg/L

Doğal Mineral Kaynak Suları İçin Avrupa Birliği Sınır Değeri: 1 µg/L

2.3.3. Standartlar

Civanın uçuculuğu ve diğer elementler ile etkileşmesinden dolayı bir çok önlem alınmasını gerektirmektedir. Günümüzde kullanılan çalışma yöntemleri ile kesin ve güvenilir sonuçlar ve analitik değerlendirmeler için numunenin reaktiflerden arındırma, malzemenin temizlenmesi, numunelendirme gibi muhafaza koşulları önemlidir. Civa bileşiklerinin tamamen ayrışması için belli bir süre gerekmektedir. Az miktarda civa içeren numunelerde güvenilir sonuçlar elde etmek için kullanılan reaktiflerin azami saflık derecesinde olmaları çok önemlidir.

Soğuk Buhar ile Atomik Emilim Spektrometresi

EN 1483.

Ölçüm Sınırı: 0,1 µg/L

Dalga Boyu: 253,7 nm.

Standart EN 12338'ye uygun olarak amalgam ile zenginleştirilerek kullanılabilir. Bu yöntem ile çok düşük miktarlarda yani 0.01 µg/L seviyesinde ölçüm yapılabilir. Bir ya da iki değerlikli civa; kalay klorür (SnCl₂) veya asidik ortamda sodyum tetra hidroborat (NaBH₄) reaktifi ile metalik civa formuna indirgenir. Kapalı bir kaptaki toplanan civa oda sıcaklığındaki bir gaz akımı ile atomik absorpsiyon spektrofotometresinin absorpsiyon ölçme hücresine gönderilir ve 253.7 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülür. Deney çözeltisinin absorpsiyon ile civa miktarları bilinen kalibrasyon çözeltilerinin absorpsiyonları karşılaştırılarak numunenin civa konsantrasyonu ölçülür.

İnterferanslar

Plastik malzemelerden civa buharı yayılabildiği için malzeme seçiminde bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. Uçucu organik maddeler UV'de absorplandığı için civa ile karıştırılabilmir. Bu yüzden organik maddeleri indirgemek için potasyum permanganat/potasyum peroksidisülfat kullanılır. Ultrasonik yöntem ile organik maddeleri indirgemek için otoklav veya mikrodalga kullanılır. Yükseltgen fazlası amonyum hidroksi klorür ile indirgenir.

Floresan Atomik Spektrometresi

EN 13506 ve ISO 17582.

Ölçüm Sınırı: 0.01 µg/L

Dalga Boyu: 253.7 nm

2.3.4. Prensip

Deney numunesi brom çözeltisi ile indirgenir. Analizden önce askorbik asit ilave edilerek brom fazlası ortamdaki uzaklaştırılır. Numunede bulunan civa (II), kalay (II) klorür tarafından civa buharına indirgenir ve argon akımı ile çözeltiden sürüklenir. Numunedeki nem sürekli gaz akımı ile uzaklaştırılır. Civa buharları floresan atomik spektrometre ile tespit edilir.

İnterferanslar

Floresan hücresinde su veya aerosol buharı ve çözünmüş gazlar atomik floresans sinyalinin zayıflamasına ve yok olmasına neden olur.

Çözünmüş gazlar indirgenme evresinde su buharı ise gaz vektöründen hidroskopik katman aracılığı ile uzaklaştırılır. Civa ile etkileşen sülfür, iyodür ve bromür anyonları beklenen sinyalin zayıflamasına neden olur. Bunun yanında altın, gümüş ve platin gibi soy metaller civa buharı ile amalgam oluşturarak sinyalin zayıflamasına neden olur.

Floresan atomik spektrometre yönteminde uçucu organik maddeler interferansa yol açmazlar.

Soğuk Buhar ile Atomik Emilim Spektrometresi

İndirgen olarak kalay klorür ve sodyum tetra borat kullanılır. Bir ve iki değerlikli civa asitli ortamda element haline indirgenir. Çözelti halinde olan civa, gaz akımı ile ölçüm hücresine taşınır.

Floresan Atomik Spektrometresi

Deney numunesi brom çözeltisi ile indirgenir. Brom çözeltisi civa ve tüm organik civa türevleri çözücüsü olarak bilinmektedir.

Analizden önce, brom fazlası askorbik asiti ile ortamdan uzaklaştırılır.

Numunede bulunan civa (II), kalay (II) klorür tarafından civa buharına indirgenir ve argon akımı ile çözülden sürüklenir. Numunedeki nem sürekli gaz akımı ile uzaklaştırılır. Civa buharları floresan atomik spektrometre ile tespit edilir.

Numune alma ve hazırlanması

Civa analizi yapılmadan önce numune nitrik asitli ortamda hazırlanan potasyum dikromat çözeltisi ile sabitlenir. Numuneye potasyum dikromat çözeltisinin fazlası ilave edilir. Numunede potasyum dikromat çözeltisinin göstergesi olan sarı turuncu renk belirsiz ise biraz daha ilave edilir.

Kalibrasyon ve doğrulama

Ölçüm limitinden itibaren uygulama sahasında kalibrasyon ve doğrulama yapılır.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Kalibrasyon çözeltileri numunedeki civa konsantrasyonunu de içine alacak şekilde stok çözülden seyreltilerek hazırlanır ve en az beş noktada kalibrasyon eğrisi çizilir.

Analiz

Analizler belli yöntemler kullanılarak uygun aletler ile gerçekleştirilir.

Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar $\mu\text{g/L}$ Hg olarak ifade edilir.

2.3.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

0. Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

1 Yöntem

Uygulama Alanı Yöntem, yeraltı ve insani tüketim amaçlı sularda civa tayininde kullanılır.	Referans standartlar -EN 1483 - EN 13506 ve ISO 17582
Muhafaza Numuneler PE şişelere alındıktan sonra analitik saflıktaki nitrik asit ile asitlendirilerek muhafaza edilir. Nitrik asitin asitliği standarttan standarda değiştiği halde genellikle %0.5 veya %1dir. Numuneler pH < 2 olacak şekilde asitlendirilir.	Analiz öncesi muhafaza süresi 5°C±3°C azami 1 ay -Kör analiz yapılır -Şişede bir kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilir.
Muhafaza sıcaklığı Taşıma ≤ 10°C'de soğutulmuş araç veya soğuk depolamalı izotermik kap ile yapılır. Laboratuvara geldiği andan analize kadar 5°C ± 3°'de soğuk odada muhafaza edilir.	
Ölçüm sınırı 0,01-0,1 µg/L	Sonuçların ifade edilmesi µg/L

2. Güvenlik

GÜVENLİK ÖNLEMLERİ	Standart çözeltiler ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
ATIKLAR	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işleme imha edilmelidir.

3. Prensi (bknz. Yukarı)

4. Malzeme, reaktifler

Malzemeler

Aletler

- Atomik soğuk buhar emilimi spektrometresi (Dalga Boyu: 253.7 nm)
- Floresan atomik spektrometresi (Dalga Boyu: 253.7 nm)

Reaktifler

- Deiyonize su
- Nitrik asit (Analitik saflıkta)
- Potasyum dikromat
- Brom
- Askorbik Asit
- Kalay (II) klorür
- 1g/L Hg ana stok çözeltisi
- Hg ara stok çözeltisi
- Kalibrasyon çözeltileri

5. Uygulama

- ✓ Numuneler, kör ve kontrol çözeltilerini hazırlanır.
- ✓ 10 numunede bir kontrol noktası oluşturulacak şekilde bir seri hazırlanır.

6. Kontrol

Uygulanan kalite kontrollerine aşağıda yer verilmiştir:

- ✓ Kör analiz kontrolü yapılır.
- ✓ Miktar tayin limit sinyalinin kontrolü yapılır.
- ✓ Kalibrasyon eğrisinde bağımsız bir çözelti ile bir kontrol noktası belirlenir.
- ✓ Kalibrasyon eğrisinin eğiminin kontrolü: korelasyon katsayısı.
- ✓ Numune işlemlerinde kullanılan her yeni şişe ön kontrolden geçirilir.

7. Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar $\mu\text{g/L}$ Hg olarak ifade edilir.

8. Standartlara göre ayırım

Standardın Öngördükleri	Laboratuvarın Yaptığı Değişiklikler	Doğrulama
	Yok	

2.3.6. Analiz Maliyeti

5 € ile 15 € arasında

2.4 Yüksek Derecede Uçucu Halojenli Hidrokarbonların Tayini

(Gaz kromatografisi metodu ISO 10301 / TS 9266: Headspace Gaz Kromatografisi Metodu)

2.4.1. Amaç

Yüzey ve yer altı sularında birçok halojenli uçucu hidrokarbon türü organik bileşik bulunmuştur. Su kaynaklarının bazılarında bulunan halojenli hidrokarbonlar sanayi alanında kullanılmakta, kimileri ise evsel atıklardan kaynaklanmakta ya da suların klorlanması sırasında ortaya çıkabilmektedirler.

Bu maddeler insanların çevredeki farklı aktivitelerine bağlı olarak ortaya çıkarlar (atık sular, deşarjlar, su depolarındaki kaçaklar, hava yolu gibi...) Bu analiz, insani tüketim amaçlı sularda ya da bu suların üretilmesi amacıyla kullanılacak sularda halojenli uçucu bileşiklerin olmadığından emin olunması amacıyla yapılır.

2.4.2. Kapsam

Bu bileşenlerden bazıları, muhtemel kanserojen maddeler olarak sınıflandırılırlar: Bromodiklorometan, karbon tetraklorür, kloroform, 1,2-dikloroetan, 1,3- dikloropropen, diklorometan ve tetrakloroetilen sürekli oluşan bazı maddelerdir.

Avrupa yasalarınca, içme sularında; trihametanlar (kloroform + bromoform + dibromoklorometan + bromodiklorometan = 100 µg/L), 1,2- dikloroetan (3 µg/l) ve tetrakloroetilen ve trikloroetilen (10 µg/L) olarak belirlenmiştir.

Bu bileşenler için yapılan araştırma, sularda bulunabilecek zararlı ot ve haşereleri imha eden ilaçların neden olduğu kirlerin kaynaklarını belirlemeyi ve bu bileşenleri elemeyi ya da koruma önlemleri alarak kirliliğin önüne geçmeyi amaçlamaktadır.

2.4.3. Standartlar

Yüksek derecede uçucu halojenli hidrokarbonların tayini

(ISO 10301: gaz kromatografi yöntemi)

2.4.4. Prensiptir

- Birinci yöntem: Sıvı/ sıvı ekstraksiyon ve gaz evreli kromatografi ile analizi

Yüksek derecede halojene edilmiş uçucu hidrokarbonlar organik bir çözücüde çözülür. Daha sonra solüsyon, elektron yakalayan bir dedektör ya da uygun başka bir dedektör yardımı ile gaz kromatografi ile analiz edilir.

- İkinci yöntem: headspaceli gaz kromatografi yöntemi

Numuneler, alınan numunenin miktarı / hava miktarı bilgisi verilmiş mühürlü şişelere alınır. Şişe ısıları, belirlenen denge koşullarında kalması için termostatlı bir sistem içerisinde 50°C ve 80 °C arasında muhafaza edilmelidir.

Numune alma şişelerinde suyla dengeli bulunan gaz kromatografisiyle yapılan analiz, elektron yakalayan bir dedektör ya da uygun başka bir dedektör kullanılarak gerçekleştirilir.

Numune alma ve hazırlanması

Sıvı- sıvı ekstraksiyon yöntemi

- Herhangi bir hava boşluğu bırakmadan, politetrafloroetilen (PTFE) septum donatımlı cam şişeler doldurulmalıdır.
- Oksidan ajan bulunması halinde fazladan bir sodyum tiyosülfat ilave edilir

Headspace yöntemi

Numunler PTFE septumlu sıkıştırma kapak sistemli 15 ml cam şişelere alınır. Doldurma seviyesi işaretlenmelidir ve tüm şişeler için aynı olmalıdır. Tavsiye edilen en düşük miktar 10 ml dir.

- Her nokta için iki numune alınır.
- Oksidan ajan bulunması halinde fazladan bir sodyum tiyosülfat ilave edilir
- Erimiş karbon dioksitli zengin gaz suları olması halinde, sodyum karbonat ilave edilir.

Kalibrasyon ve doğrulama

Aşağıda verilen bilgiler genel ölçüm aralığını yansıtmaktadır. Dolayısıyla her iki yöntem arasında tayin sınırı açısından bir seçim yapılırken daha detaylı bilgi için TS 9266 / ISO 10301'e bakılmalıdır.

Sıvı- sıvı ekstraksiyonu yöntemi

- Ölçüm yöntemi: 0.001 mg/L –0.5 mg/L aralığında
- aseton, pentan ya da heksandaki 0.5 g/L değerindeki stok çözeltiler

Headspace yöntemi

- Ölçüm yöntemi: 0.001 mg/L –0.5 mg/L aralığında
- Aseton, metanol ya da dimetilformamitteki stok çözeltiler
- Referans maddeleri: Diklorometan, kloroform, karbon tetraklorür, dikloro-1,1 etan, dikloro-1,2 etan, trikloro-1,1,1 etan, trikloro-1,1,2 etan, dikloro-1,1 etilen, cis-dikloro-1,2 etilen, trans-dikloro-1,2 etilen, trikloroetilen, tetrakloroetilen, dikloro-1,2 propan, dikloro-1,3 propan, cis+trans-dikloro-1,3 propilen, dibromometan, tribromometan, dibromo-1,2 etan, bromoklorometan, bromodiklorometan, dibromoklorometan, trifloro-1,1,3 etan.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Kalibrasyon alanı aşağıdaki solventlerden birinin içerisindeki yaklaşık 1g/l stok çözeltiden başlanarak hazırlanır: Headspace yöntemi için aseton, metanol ya da dimetilformamit, sıvı- sıvı ekstraksiyon yöntemi için pentan, heksan ya da aseton.

Analiz

- Analitik seri oluşturulurken headspace yöntemi kullanılacaksa 10 mL'lik numune alım şişeleri numune alımından sonra doğrudan alanda kapatılır ya da sıvı – sıvı ekstraksiyon metodu uygulanacaksa numuneler ekstraksiyonda kullanılacak organik solventin içerisine ilave edilir.
- Her bir on numunedan sonra hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinden birisi (kontrol noktası) okutulur.

Bileşenleri tanımlanması

- Bileşenler alıkonma zamanlarına göre belirlenirler ve doğrulukları elektron yakalayan dedektörde olduğu gibi klasik dedektördeki ikinci kolon üzerinde yapılan bir analizle de doğrulanır.
- Bileşenler, kütle spektrometri ile tarama yapılması halinde alıkonma zamanı ve kütle spektrumlarına (3 teşhis iyonu) göre belirlenirler.

Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

İç veya dış standart yöntemine dayanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulduktan sonra kantifikasyon yapılır.

Sonuçlar µg/L olarak ifade edilir.

Çift tarama durumunda, en düşük sonuç seçilir.

2.4.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

o. Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

1. Yöntem

Uygulama alanı 0,1– 100 µg/L değerine kadar en yüksek konsantrasyonlarda kalıntı bırakan suları kapsayan su çeşitlerinin tamamıdır. Yöntem, halojenli hidrokarbonların belirlenmesinde uygulanabilir. İç bir standardın kullanılması tavsiye edilir	Referans standartlar - ISO 10301 Diğer yöntemler: - ISO 15680 (Tasfiye ve ayırma) - ISO 11423-1 (hareketsiz headspace)
Muhafaza - PTFE kaplı su geçirmez tıpalı oturtulmuş kapak sistemli küçük numune alma şişesi ya da oturtulmuş cam tıpalı cam şişeler - Headspace yöntemi için karbon dioksit varlığı halinde potasyum karbonat ilavesi - Kalıntı oksidan varlığı halinde sodyum tiyosülfat ilavesi - Headspace yöntemi için her analiz için 2 numune alınır.	Analizden önceki muhafaza süresi - 5°C±3°C de 2 gün - Su geçirmez şişede 5°C±3°C'de muhafaza edilir - Açık hava numune alımı ön görülür - Kör çalışması yapılmalıdır
Muhafaza sıcaklığı Nakil süresi boyunca: ≤ 10°C soğutulmuş soğuk akümülatörlü eşit sıcaklıkta araba ya da konteynırda taşınmalıdır. Laboratuvarda analiz edilinceye kadar: 5°C ± 3° soğuk oda	

Ölçüm sınırı Elektron yakalayıcı dedektör ile bulunan bileşenlere göre 0.1 µg/L' den 100 µg/L' ye.	Sonuçların ifade edilmesi µg/L
--	--

2. Güvenlik

GÜVENLİK ÖNLEMLERİ:	Standart çözeltileri ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
ATIKLAR :	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işleme imha edilmelidir.

3. Amaç (bkz. yukarı)

4. Malzeme, reaktifler

Malzeme

Araç ve gereçler

Özellikle: Manyetik karıştırıcı, pipetler, tutma maşası, “sıkıştırma” kapaklı 10 ml numune alma şişeleri ya da oturtulmuş tıpalı numune alma şişeleri:

- Termostat mekanizmalı otomatik headspace dozaj sistemi ya da gaz geçirmez ısıtılabilir 2.5 ml ya da 5 ml saymalı kapasiteli enjeksiyon şırınga
- Dedektörlü gaz kromatografi: Elektron yakalayıcı dedektör ya da kütle spektrometresi
- İnce boru kolonları: Örneğin DB5, uzunluk: 30 metre, çap: 0.25 mm, film kalınlığı: 0.25 µm ila 1 µm
- 50 µl ve 100 µl enjeksiyon şırıngaları

Reaktiflerler

- Deiyonize su (Halojenli solventleri içermediğinden emin olunmalıdır)
- Gaz: Azot, helyum
- Standart maddeler
- Kalibrasyon standartların hazırlanmasında kullanılan solventler: Dimetilformamit ya da aseton ya da metanol

5. Uygulama

Sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi:

Ekstraksiyon solventi sıkıştırma kapaklı ya da rodajlı cam şişenin içerisindeki numuneye konabilir.

Cihaz şartları uygun hale getirilir.

Analitik aralığın, standart solüsyonların, ekstraksiyon verimi kontrol noktasının, kontrol solüsyonları ölçüleri, analiz edilecek numunelerde, 10 numunenin tamamından kontrol noktasını kapsayan analitik bir seri hazırlanır.

Her bileşen için iç ya da dış standart modu kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilir ve miktar tayini yapılır.

Headspace yöntemi:

Cihaz şartları sağlanır.

Analitik aralığın, standart solüsyonların, ekstraksiyon verimi kontrol noktasının, kontrol solüsyonları ölçüleri, analiz edilecek numunelerde, 10 numunenin tamamından kontrol noktasını kapsayan analitik bir seri hazırlanır.

Her bileşen için iç ya da dış standart modu kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilir ve miktar tayini yapılır.

6.Kontrol

Geçerli olan kalite kontrolleri aşağıdakilerdir:

- Kontaminasyon mevcudiyetinden emin olunan bir ortamda numune alımı yapılırken, alanda ikinci bir numune daha alınarak kör analizler yapılır böylelikle daha sonra suda saptanabilecek kirleticilerin çevresel koşullardan değil suyun kendisinden kaynaklandığından emin olunmalıdır.
- Şişelerin ve laboratuvar ortamının kontamine olmadığından emin olunmalıdır.
- Ekstraksiyonda kullanılan solventlerin kontamine olmadığından emin olunmalıdır.
- En alt miktar tayin sınırında cihazın doğru çalışabildiğinden emin olunmalıdır.
- Kalibrasyon serisinden ayrı içeriği bilinen bir solüsyon ile okumalar kontrol edilir.
- Kalibrasyon doğrusunun eğiminin denetlenmesi: Stabilite, korelasyon katsayısı

Çıkış zamanlarına göre bileşenler saptanır ve farklı özellikteki ikinci bir kolon üzerinde enjeksiyon yapılarak elektron yakalayıcı dedektör aracılığıyla bileşenlerin çıkış zamanları tekrardan kolon üzerinde teyit edilir.

7. Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Miktar hesabı iç ya da dış standart modu kullanılarak oluşturularak kalibrasyon eğrisinden başlanarak gerçekleştirilir.

Sonuçlar $\mu\text{g/L}$ olarak ifade edilir.

Çift tarama durumunda, en düşük sonuç seçilir.

8. Standartlara göre ayırım

Standardın Öngördükleri	Laboratuvarın Yaptığı Değişiklikler	Doğrulama
	Yok	

2.4.6. Analiz Maliyeti

50 € ile 120 € arasında

2.5. Hidrokarbonların Tayini

Hidrokarbonların belirlenmesi (ISO 9377-2: Hidrokarbonların tayini - Bölüm 2: Solventli ayırışım yöntemi ve gaz evreli kromatografi yöntemi)

2.5.1 Amaç

Hidrokarbon tayini, kromatografik alıkonma zamanına göre C₁₀-C₄₀ aralığında düz zincirli ya da dallara ayrılmış alkanlar belirlenir. Bu yöntem ile yeraltı, yerüstü ve dağıtım sularına bulaşmış olan petroler belirlenmektedir. Hidrokarbonların neden olduğu su kirliliği çeşitli kaynaklara bağlıdır: Depolama, yük taşıma tanklarındaki sızıntılar, yeraltı ve yerüstü suları kirlenmelerinin birçoğu, boru hatlarındaki sızmalar, hidrokarbon ya da yakıt maddelerinin depolama tanklarından, sanayi atıklarının depolanmasından ya da boşaltılmasından kaynaklanmaktadır. Sanayi ve evsel atıklar da kirlilik kaynağı oluşturmaktadır.

2.5.2. Kapsam

Bu bileşenler için yapılan araştırmalar, zararlı ot ve haşereleri imha eden ilaçların neden olduğu su kirliliklerinin kaynağını belirlemeyi ve bu bileşenleri yok etmeyi ya da koruma önlemleri alarak kirliliğin önüne geçmeyi amaçlamaktadır.

98 /83/CE numaralı yönergede bu parametre ile ilgili bir değer bulunmamaktadır.

2.5.3. Standartlar

Hidrokarbonların belirlenmesi (ISO 9377-2: Hidrokarbon tayini - Bölüm 2: Solventli ayırışım yöntemi ve gaz evreli kromatografi)

2.5.4. Prensip

Suda bulunan hidrokarbonlar hekzan, pentan ya da kaynama noktası 36 °C ve 69 °C arasında olan hidrokarbon karışımı ile ayrıştırılır. Ayrımı sağlayan maddeler florosil üzerinde arıtımla ayrıştırılır. Hidrokarbonlar, alev iyonlaştırıcı dedektör bulunduran gaz kromatografi cihazının kolon kısmına enjekte edilir. Nicelendirme, n-dekan ve n-tetrakontan arasındaki yüksekliklerinin toplam yüzölçümünün hesaplanmasıyla ve özellikle iki yağ mineralini içeren iç standartlı katkıyla gerçekleştirilir.

Numune alma ve hazırlanması

Numuneler PTFE kaplı su geçirmez tıpalı 1 litrelik şişelere ya da rodajlı 1L'lik kahverengi cam şişelere alınır. Hidroklorik asitle pH 2'nin altında oluncaya kadar numune asitlendirilir. Nakil süresi boyunca, 5 °C-3°C arasındaki sıcaklıklarda soğutulmuş kapalı bir alanda, ışıktan uzak olarak korunmalıdır. Muhafaza süresi en fazla dört gündür.

Kalibrasyon ve doğrulama

- Ölçüm aralığı: 0.2 mg/mL – 1.0 mg/mL
- Ekstraksiyon için kullanılan solventteki ana stok çözelti (hekzan, pentan ya da kaynama noktası 36 °C ve 69 °C'e arasında olan hidrokarbon karışımı)
- Ekstraksiyon solventi: C10 ve C40 n-alkanları içeren solventler
- Standart maddeler: Standartta belirtilmiş olan iki çeşit mineral yağının karışımı (dizel yakıt + yağlacı yağ)
- n-alkan standart karışımı: C10 - C40 arasında olan n-alkanlar

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Kalibrasyon çözeltileri ana stok çözeltiden başlanarak hazırlanır.

Analiz

- Asitleme ile numunenin ön işlemleri, magnezyum sulfat eklenmesi ve numune alım şişesindeki solventle ekstraksiyon işlemi yapılır.
- Solventin geri alınması
- Ekstre edilmiş maddenin arıtılması ve arıtımı yapılan ekstre edilmiş maddenin konsantre edilmesi
- Alev iyonlaştırıcı dedektör içeren gaz kromatografisi ile tayin yapılır
- Analitik seri hazırlanır: standartlar, kör analizler, kontrol noktaları, numuneler

Bileşenlerin tanımlanması

- C10 ve C40 arasında bulunan n-alkanlar belirlenen analitik koşullarda kolonda alıkonma sürelerine göre tanımlanır.

Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar mg/L olarak ifade edilir.

2.5.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

0. Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

1 Yöntem

Uygulama alanı Yöntem, içme sularına, yer altı sularına ve hidrokarbon değeri 0.1 mg/L olan yüzey sularının tayininde kullanılır. Yöntem, karbon sayısı n-C10-C40 arasında olan hidrokarbonların belirlenmesine kullanılır. Mineral yağlarında hidrokarbonların belirlenmesinde kullanılmaz.	Referans standardı - ISO 9377-2
Muhafaza - PTFE'den yapılmış su geçirmez tıpalı ya da rodajlı 1 litrelik kahverengi cam numune şişelerine alınır.	Muhafaza süresi - Hidroklorik asit ilave edildikten 5°C±3°C'de 1 gün veya en fazla 4 gün kararlıdır. - Kör analiz ile izleme yapılır. - Şişelerden bir bulaşma olup olmadığı izlenmelidir.
Muhafaza sıcaklığı Taşıma ≤ 10°C'de soğutulmuş araç veya soğuk depolamalı izotermik kap ile yapılır. Laboratuvara geldiği andan analize kadar 5°C ± 3°'de soğuk odada muhafaza edilir.	
Ölçüm sınırı 0.1 mg/L	Sonuçların ifade edilmesi mg/ L

2. Güvenlik

GÜVENLİK ÖNLEMLERİ	Standart çözeltiler ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
ATIKLAR	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işleme imha edilmelidir.

3. Prensipten (bkz. yukarı)

4. Malzeme, reaktifler

Araç ve gereçler

Dönerek çalışan buharlaştırıcılar ya da ayarlanmış buharlaştırma sistemleri, yüksek hızda manyetik karıştırıcılar, pipetler, aktarma için ampuller, arıtma kolonları, su geçirmez tıpalı PTFE kaplı numune şişeleri ya da rodajlı kapaklı numune şişeleri:

- Alev iyonlaşmalı dedektör bulunduran gaz kromatografi cihazı
- İnce kolon: Uzunluk: 15 - 30 m, çap: 0.25 mm, film kalınlığı: 0.1 ile 0.25 µm
- C20/C40 arasında alınan sinyallerin ayrılmasını engelleyen enjektör.

Reaktifler

- Deiyonize su
- Gaz: Helyum, hidrojen, hava
- Standart maddeler
- Ayrışım solventleri: Hekzan, pentan, petrol eteri
- Ayrışımın verimini kontrol etme amaçlı su ile karışabilen solventler: aseton
- Aritma için ayrıştırıcılar: Florosil, stearil, stearat

5. Uygulama

PTFE kaplı su geçirmez tıpalı 1 litrelik şişelerde ya da kapağı rodajlı 1L'lik kahverengi cam şişelerde bulunan hekzan, pentan, petrol eteri ayrışım solventi ile gerçekleştirilir.

Florosil bir kolon üzerinde ayrışım solusyonlarının uzaklaştırılması

Ayrışan maddeler 1 mL' ye kadar konsantre edilir.

Kromotografi sisteminin kullanım koşulları sağlanır.

Analitik aralığı: kalibrasyon çözeltileri, analiz edilecek numuneler, 10 numuneden sonra kontrol noktasını kapsayan analitik bir seri hazırlanır.

Her bileşen için kalibrasyon eğrisi çizilir ve nicelendirme yapılır.

6. Kontrol

- - Kör analiz
- - Ekstraksiyon geri kazanım kontrolü
- - Florosilin etkililiğini denetleme
- - Çalışma aralığının belirlenmesi
- -Kontaminasyon mevcudiyetinden emin olunan bir ortamda numune alımı yapılırken, alanda ikinci bir numune daha alınarak kör analizler yapılır böylelikle daha sonra suda saptanabilecek kirleticilerin çevresel koşullardan değil suyun kendisinden kaynaklandığından emin olunmalıdır.
- -Kalibrasyon eğrisi kontrol edilmelidir: Stabilitate, korelasyon katsayısı
- - Numune alımından önce kullanılacak şişelerin temizliklerinin denetlenmesi.

Yukardaki kriterlere uyulması halinde karbon sayısı n-C10/n-C40 olan bileşen var sayılır.

7. Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar mg/L olarak ifade edilir.

8. Standartlara göre ayırım

Standardın Öngördükleri	Laboratuvarın Yaptığı Değişiklikler	Doğrulama
	Yok	

2.5.6. Analiz Maliyeti

50 € ile 100 € arasında

2.6. Mikrosistinlerin Tayini

Sıvı Faz Ekstraksiyonu (SPE) ayırımı yöntemi ve ultra viole (UV) taramayla yüksek performansta sıvı kromatografisi

(ISO 20179: SPE ve HPLC/ UV yöntemi)

2.6.1. Amaç

Son günlerde biyolojik toksinler, araştırma kuruluşlarına bilimsel açıdan konu olmaktadır. Özellikle içme sularında siyanotoksin ya da siyanobakterilerinin toksinlerine bağlı sağlık risklerinin ortaya çıkmasında önem taşımaktadır.

Siyanobakteriler, fazla derin olmayan, ılık, durgun ya da hareketsiz ve temel besin maddeleri bakımından (azot, fosfor, ...) zengin olan sularda gelişirler. Siyano bakteriler, su yüzeyinde maviye çalan yeşil bir ince tabakanın oluşmasıyla tanınır. Hücrelerin çoğalması için uygun ortam olması halinde çok hızlı çoğalabilen mikroorganizmalardır.

Özellikle yaz dönemi siyanobakterilerinin endotoksinlerini (mikrosistinler) serbest bırakmaya elverişli bir ortamdır.

İnsani kullanım amaçlı sularda LR türü (Leucine Argine) mikrosistin işlenmemiş sularda yosunların çoğalmasının bir göstergesi olarak maksimum 1 µg/L olarak belirlenmiştir

Tatlı sularda bulunan bazı mikrosistinler, sinir sistemini ve karaciğeri etkiler.

2.6.2. Kapsam

Bu toksinlerin sağlık riski taşımasından dolayı, bu parametrenin analizi ile suyun işlenmesi sırasında koruyucu önlemler alınmasını gerektirir.

Fransa'nın AFFSSA Enstitüsü, insani kullanım amaçlı sularda LR türü (Leucine Argine) mikrosistin sınır değerini 1 µg/L olan tavsiye etmektedir.

2.6.3. Standartlar

Mikro sistinlerin Tayini: SPE ayırışım yöntemi ve ultra viyole (UV) dedektörlü yüksek performansta sıvı kromatografisi

(ISO 20179: SPE ve HPLC/ UV yöntemi)

2.6.4. Prensip

Siyano bakteri içeren su numuneleri önceden filtre edilmelidir. Biyomas, bir solvent (metanol/su) ile ayırıştırılır. Ayırışım filitrelenir, yoğunluğu azaltılır ve numunenin arıtılması ile katı- sıvı ayırışımı gerçekleştirilir. Süzölen kısım saf su gibi işlenir.

Çeşme suları SPE tekniğı kullanılarak zenginleştirilir. Mikrosistinler, %0.1 oranında trifloroasetik asit içeren metanol/su (90:10) karışımıyla SPE kartuşundan ayrılır.

Mikrosistinlerin miktarı, 239nm'de UV dedektörlü HPLC cihazı kullanılarak belirlenir.

Numune alma ve hazırlanması

Numuneler tamamı doldurulmuş 1000 mL'lik kahverengi cam şişelere alınır. Numuneler, numune alımından sonra en fazla 48 saat içerisinde ve analiz edilmelidir. Nakil süresi boyunca, 5 °C±3°C'de soğutulmuş kapalı bir alanda, ışıktan uzak olarak korunmalıdır.

Kalibrasyon ve doğrulama

- Kalibrasyon aralığı: Metanol/su (20:80) karışımındaki çözeltide 0.2 µg/mL – 3 µg/mL aralığında
- Stok çözelti: Metanol/su (20:80) karışımındaki her bir mikrosistinden (-LR, -YR, -RR) 2.5 µg/mL
- Maddeler: Mikrosistin-LR, -YR, -RR

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

- Ana stok çözeltiden başlayarak kalibrasyon çözeltileri hazırlanır.

Analiz

- Numunenin ön analizi yapılır (0.45 µm'lik filtreden flitre edilmesi ve sodyum tiyosülfat eklenmesi), Filtrasyon işleminden sonra elde edilen parçanın ultrasonik ayırışımı yapılır.
- % 0.1 oranında trifloroasetik asit içeren metanol/su (90:10) karışımıyla ayırışım kartuşu sudan geçirilir.
- 0.45 µm filtrede elde edilen parçanın ayırışımının arıtılması gerçekleştirilir.
- Her bir parçanın UV dedektörlü yüksek performansta sıvı kromatografisi ile analizi yapılır
- Analitik ayırışımı gerçekleştirme: standartlar, kör analizi, kontrol noktaları, numune

Bileşenlerin tanımlanması

- Bileşenler, kolonda alıkonma süreleri dikkate alınarak UV spektrumları belirlenir.
- HPLC/UV yöntemine bir alternatif olarak kütle spektrometrisi-HPLC yöntemi kullanılmaktadır.
- HPLC/UV yöntemine bir alternatif olarak kütle spektrometri ile çift HPLC kullanılmaktadır.

Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar µg/L olarak ifade edilir.

2.6.5. Kalite işlemi: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

0. Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

1. Yöntem

Uygulama alanı Yöntem, içme sularına ve işlenmiş içme sularında mikro sistinlerin tayininde kullanılır.	Referans standartları - ISO 20179 - Diğer yöntem: ISO/DIS 20179: Yüksek performansta sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi ve kütle spektrometri (MS/MS) tarama
Muhafaza - Numune 1000 mL'lik kahverengi cam şişelere tamamen dolacak şekilde alınır.	Analizden önce muhafaza süresi - En fazla 48 saatte analiz edilir. - 5°C±3°C'de karanlıkta muhafaza edilir
Muhafaza sıcaklığı Taşıma ≤ 10°C'de soğutulmuş araç veya soğuk depolamalı izotermik kap ile yapılır. Laboratuvara geldiği andan analize kadar 5°C ± 3°'de soğuk odada muhafaza edilir.	
Ölçüm sınırı 1 µg/L	Sonuçların ifade edilmesi µg/L

2. Güvenlik

GÜVENLİK ÖNLEMLERİ:	Standart çözeltileri ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
ATIKLAR:	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işlemle imha edilmelidir.

3. Amaç (yukarıya bakınız)

4. Malzeme, reaktifler

Araç ve gereçler

Ultrasonik banyo, ayrıştırma kartuşları, boş ya da basınçlı mekanizma, teflon yüzü bir conta takılı vidayla tıpalı kahverengi cam numune alma şişeleri ya da rodaj kapaklı numune alma şişeleri:

- HPLC sıvı evreli kromatografi: UV dedektör ve kütle spektrometresi
- HPLC ayırma kolonu: Örneğin C18 evresi, uzunluk: 250 mm, çap: 2 ile 4 mm, dolurma parçalarının boyu: 3 ila 5 µm
- Enjeksiyon halkası

Reaktifler

- Deiyonize su
- Gaz: helyum
- Standart madde: Mikrosistinler-LR, -YR, -RR
- Elüsyon solventleri: Metanol/su (20:80)
- Bileşimin SPE adsorbent evresi C18 evresi
- Kontrol amacıyla suyla karışabilir solvent: Metanol/su (20:80)

5. Uygulama

Numune göz açıklığı 0.45 µm olan filtreden süzülür.

C18 biçiminde katı emilim halinden sıvı hale ayrıştırılır; daha sonra (20:80) metanol/su karışımı ile yıkama işlemi yapılır.

(75:25) metanol/su karışımıyla 0.45 µm zar üzerinde kalan madde ultrasonlardan alınır ve ayırışım C18 üzerinden SPE ile arıtılır.

Kromatografi sisteminin kullanım koşulları sağlanır.

Analitik aralığı: kalibrasyon çözeltileri, analiz edilecek numuneler, 10 numuneden sonra kontrol noktasını kapsayan analitik bir seri hazırlanır.

Kalibrasyon eğrisi çizilir ve nicelendirme yapılır.

6. Kontrol

Geçerli olan kalite kontrolleri aşağıdakilerdir:

- Kör analiz yapılır
- Ekstraksiyon geri kazanım kontrolü yapılır
- Çalışma aralığı belirlenir
- Kontaminasyon mevcudiyetinden emin olunan bir ortamda numune alımı yapılırken, alanda ikinci bir numune daha alınarak kör analiz yapılır. Böylelikle daha son-

ra suda saptanabilecek kirleticilerin çevresel koşullardan değil suyun kendisinden kaynaklandığından emin olunmalıdır.

- Kalibrasyon eğrisi kontrol edilmelidir: Stabilité, korelasyon katsayısı
- Yukardaki kriterlere uyulması halinde bir bileşik mevcudiyeti var kabul edilir: Bileşikler kolonda alıkonma zamanlarına ve UV spektrumlarına göre saptanır. HPLC/UV yöntemine bir alternatif olarak kütle spektrometrisi-HPLC yöntemi kullanılır.

7. Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar µg/L olarak ifade edilir.

8. Standartlara göre ayırım

Standardın Öngördükleri	Laboratuvarın Yaptığı Değişiklikler	Doğrulama
	Yok	

2.6.6. Analiz Maliyeti

100 € ile 150 € arasında

3. DİĞER ELEMENTLER

15 Şubat 2006 tarihli ve 2006/7/CE no'lu direktifin Ek III adlı bölümünde, kirlilik durumunda «yüzme sularını ve yüzücülerin sağlıklarını etkileyebilecek kirlilik kaynaklarının tespiti ve değerlendirilmesinin” yapılması öngörülmüştür. Bu yüzme sularında her türlü kimyasal elementin aranabileceği şekilde yorumlanabilir. Ancak bununla birlikte, düzenli olarak yapılan hiç bir kimyasal analizin olmadığı Ek I’de belirtilir.

Bu araştırmalara ilişkin bilgiler, İnsani Tüketim Amaçlı Sular El Kitabında bulunmaktadır.

5. BÖLÜM

KALİTE UYGULAMASI / AKREDİTASYON

TS EN ISO 17025 referans standardı uyarınca akreditasyon uygulamasının oluşturulması ve geliştirilmesi

1. NEDEN

1998 tarihli İçme Suları ile ilgili Avrupa Direktifi, her üye devletteki laboratuvarların, zaman zaman Sağlık Bakanlığı tarafından kabul edilmiş bağımsız bir kuruluş tarafından kontrol edilen bir kalite yönetim ve kalite gözetim sistemine sahip olmalarını öngörmektedir.

Fransa'da, Sağlık Bakanlığı sağlık kontrolü analizleri gerçekleştiren laboratuvarların akredite olmaları gerektiğine karar vermiştir.

Akreditasyon, laboratuvarların bazı analizleri gerçekleştirmelerindeki yeterliliklerinin bağımsız harici bir kuruluş tarafından tanınmasıdır.

Fransa'da, COFRAC tanınmış bağımsız bir akreditasyon kuruluşu olup Türkiye'deki dengi "European Accreditation" a da (Avrupa Akreditasyon Birliği) üye olan TÜRKAK'tır.

Bu kuruluşlar devletten bağımsızdır ancak diğer Avrupa kuruluşları ile bu kuruluşların Avrupa çapında tanınmaları için Avrupa Akreditasyon Birliği'ne üye olmaları gerekir.

2. ÖNEM

Akreditasyon uygulamasının gerçekleştirilmesi, laboratuvarın müşterileri nezdinde yetkinliklerinin ve yeterliliklerinin kabul görmesini sağlamaktadır. Bu uygulama laboratuvar sonuçlarının kalitesinin (güvenilirliğinin) sağlanmasında yararlıdır.

Bu uygulama bir kalite yönetimini beraberinde getirmektedir; öncelikli olarak organizasyonel açıdan yönetime ilişkin şartlar ve özellikle laboratuvar tarafından verilen sonuçların güvenilirliğini sağlayan teknik şartları da içermektedir. Akreditasyonun önemi: laboratuvarın etkinliğinin arttırılması, personelin sorumluluklarının ve motivasyonunun arttı-

rılması ama aynı zamanda diğer ulusal veya uluslararası laboratuvarlar nezdinde tanınmasıdır.

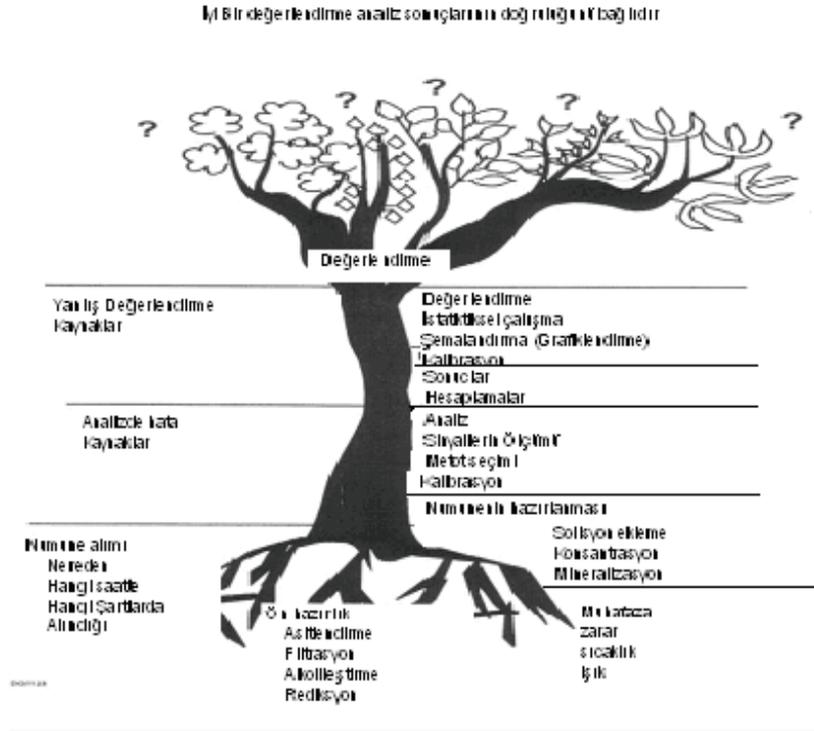
Akredite laboratuvarlar tarafından verilen sonuçlar, üzerinde karşılaştırma ve yorum yapılmasını sağlamaktadır ki bunların yapılması da şarttır (özellikle farklı bölgelerdeki suyun sağlık kalitesi karşılaştırılmak istenildiğinde ve sağlık kontrolü analizlerinde).

Akreditasyon uygulamaları sürekli iyileştirme süreçleri içerisinde olunmasını sağlamaktadır ki bu da laboratuvar uygulamalarının düzenli olarak sorgulanmasına olanak vermektedir.

Laboratuvar sonuçlarına ve sonuçlar üzerindeki hata nedenlerine bakıldığında, hataların çok sayıda olabileceği görülmektedir (*Çizim 1*).

- Numune alma esnasındaki hatalar: numunenin bütünü temsil edebilmesi, numune alma şişeleri, alınacak tedbirler, numunenin sahada hazırlanması,
- Laboratuvar aşamasındaki hatalar: numunenin hazırlanmasındaki hatalar, miktarın/dozun belirlenmesinde yapılan hatalar.

Çizim 1'de görüldüğü üzere, en fazla hata örneklemeden kaynaklanmaktadır. Hedef, analizin amacına uygun temsili bir numune elde edilmesidir.



Çizim 1: Numunenin alınmasından sonuçların teslim edilmesine kadar olabilecek hataların nedenleri

Çizimde örnekleme köklerle gösterilmiştir, bu analitik zincirin bütün temelini oluşturmaktadır. İyi bir değerlendirme analiz sonuçlarının doğruluğuna bağlıdır. Hata kaynakları;

1. Numune alımı (nereden, hangi saatte, hangi şartlarda);

-Ön hazırlık (Asitlendime, filtrasyon, alkalileştirme, redüksiyon)

-Muhafaza (Zaman, sıcaklık, ışık)

2. Analizde hata kaynakları;

-Numunenin hazırlanması (Solüsyon ekleme,kosantrasyon, mineralizasyon)

-Analiz (Metot seçimi,sinyallerin ölçümü,kalibrasyon)

3. Değerlendirme Kaynakları;

-Değerlendirme (İstatistiksel çalışma, grafikleme, korelasyon)

-Sonuçlar (Hesaplamalar)

Dolayısıyla laboratuvarın numunenin, doğru ve hatasız bir sonuç verene kadar bütün döngüsüne hakim olması şarttır. Bunun için, örnekleme ve numune alma işlemlerine hakim olunması gerekmektedir. Laboratuvar teslim aldığı numunenin bütün tarihçesini ve tabi olduğu numune alma koşullarını bilmelidir.

Fransa’da, numuneleri çoğunlukla laboratuvar almaktadır ancak bazı bölgelerde, numune alma işlemlerini bağımsız kuruluşlar yapmaktadır ve bunlar da akredite kuruluşlardır. Akredite olmuş bir kuruluş güven sağlar ve kendi hatalarını kendisi bulabilir.

Bu konuda uluslararası düzeyde referans standart, EN ISO 17025 standardıdır (Ülkemizde de TS tarafından yayınlanmıştır):

« Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının

Yeterliliği için Genel Şartlar”

Bu standart iki şartı kapsamaktadır:

- Yönetim şartları,
- Teknik şartlar.

Kalite güvencesini ve global akreditasyonun oluşturulması için, laboratuvar kendine şu soruları sormalıdır:

- Organizasyonum etkin mi?
- Yerleşim, çevre koşulları ve mekanlar tatmin edici mi?
- Personel yetkin mi?
- Numunelerin teslim alınması, muhafazası ve numunelerin hazırlanması işlemlerine hakim olunuyor mu?
- Kullanılan cihaz, materyaller ve reaktifler yeterli mi?

- Kullanılan yöntemler uygun ve geçerli,onaylanmış (validasyon) yöntemler mi?
- Sonuçlar ne şekilde yorumlanıyor ve nasıl iletiliyor?

3. TS EN ISO 17025 STANDARDININ ŞARTLARI

3.1. Yönetime İlişkin Şartlar

Bu şartlar **ISO 9001 referans standardı** gereği kalite yönetim sistemiyle ilgilidir.

Birinci hedef kendi kendimize – planla, yap, kaydet ve sapmalar veya uygunsuzluklar tespit edildiğinde harekete geç – şeklinde düşünerek «**yaptığını yaz ve yazdığını yap**”tır.

Bu süreçler sürekli iyileşme sürecine dayanmaktadır.

Akreditasyonun şartlarından biri de laboratuvarın tarafsızlığını kanıtlaması ve müşterileriyle olası çıkar çatışması içinde olmadığını ortaya koymasındır.

Kalite yönetim sisteminin en uygun şekilde yürütülmesi için, laboratuvara bir kalite sorumlusu atanmalıdır. Bu kişinin başlıca sorumlulukları şunlardır:

- ✓ Kalite sisteminin genel organizasyonunu yapmak,
- ✓ İzleme, organizasyon ve yazılmış çeşitli dökümanları yayımlamak,
- ✓ Sistemin gelişimi hakkında Yönetime bilgi vermek,
- ✓ Kalite yönetim sistemi konusunda çalışanları eğitmek,
- ✓ TS EN ISO 17025 gereklilikleri doğrultusunda yasal düzenlemeleri izlemek,
- ✓ Gerekliliklerin laboratuvarda uygulanıp uygulanmadıklarını kontrol etmek

Laboratuvarın kalite sorumlusu, kalite yönetim sisteminin oluşturulmasında önemlidir. Çok çalışkan olmalı, yönetim ve bütün personelle iletişim kurabilmelidir, aynı zamanda laboratuvarın organizasyonunu da çok iyi bilmeli ve yapılan değişiklikleri her an izleyebilmelidir.

Dökümanların yapılandırılması, Kurum ve Kalite Sorumlusu tarafından hazırlanan genel dökümanlardan (Prosedürler ve Kalite El Kitabı), uygulayıcılar tarafından hazırlanan çok daha ayrıntılı dökümanlara doğru giden bir döküman piramidi şeklinde organize edilmektedir.

Kalite el kitabının yazımı ve kalite yönetimi sisteminin organizasyonu süresince, çok sayıda dökümanın hazırlanması gerekmektedir (kaliteyle ilgili el kitabında geçen dökümanların listesine bkz.):

Dört çeşit döküman hazırlanmalıdır:

1. «**Yöntem**” içerikli dökümanlar: örneğin; personelin belirli bir yöntemle bir parametreyi inceleyebilecek niteliğe sahip olup olmadığı. Yöntem hakkında bilgi vermeye yönelik olan bazı sorular üzerinde düşünülmelidir: kim, ne yapar, neden, hangi malzemeyle, kayıt nasıl yapılır?

2. **“Metodoloji”** tarzındaki dökümanlar: örneğin; incelemenin gerçekleştirilmesi talimatı veya analiz talimatı;
3. **“Kayıt”** dökümanları; gerçekleştirilen işlemlerin izlenebilirliği hakkında,
4. **Basit kayıt** dökümanları.

Dökümanların yönetimi çok önemlidir. Sistemin ve organizasyonun iyi çalışması amaçlanmalıdır. Her doküman kodlanmalı, dolaşımı belirlenmeli ve imzalanmalıdır. Belgelerin alıcılarının da listede yer alması gerekmektedir.

En genel kapsamlı belge **Kalite El Kitabı**dır. Kalite el kitabı, incelemelerin kalitesinin sağlanmasına yönelik olarak ve laboratuvarların genel ekipmanlar için almış oldukları tedbirler hakkında bilgi verir. Çifte amacı vardır: laboratuvarın genel organizasyonunu tanımlamak, yönetimin genel işleyiş kurallarını sıralamak ve organizasyona ilişkin net bir görüntü sunmaktır.

Kalite el kitabı genelde 10 bölümden oluşmaktadır (Ek 5):

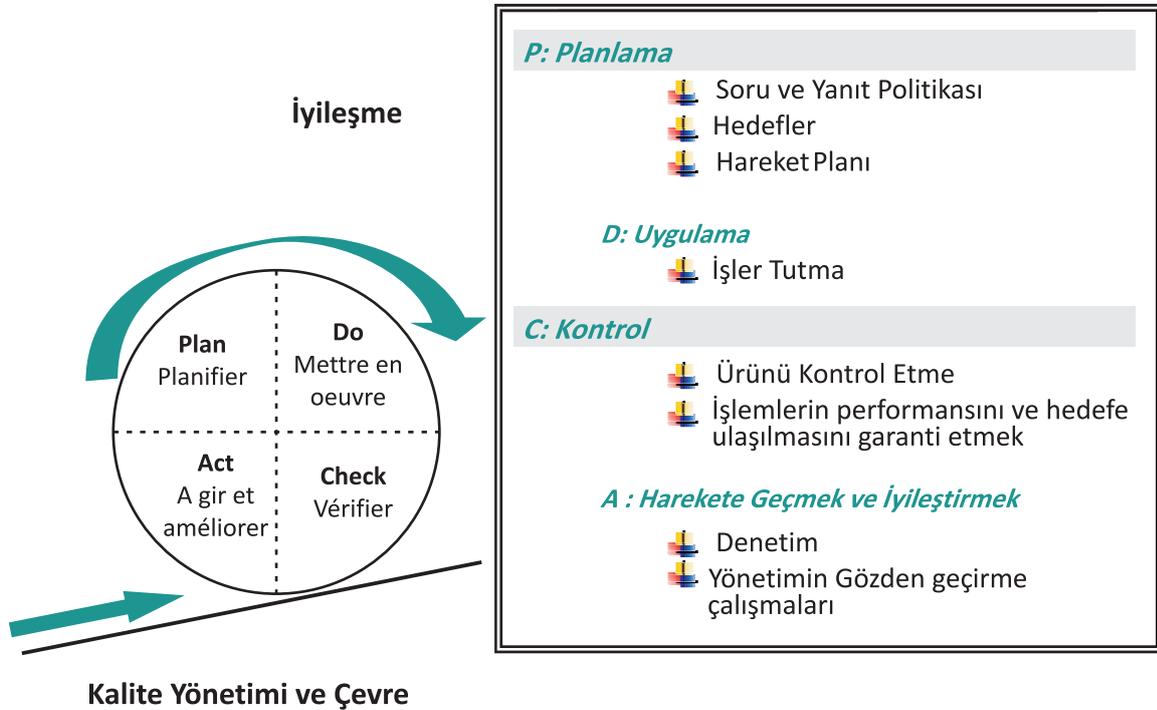
İlk 4 bölüm planlamaya ilişkindir.

Takip eden bölümler personel, satın alma ve malzemeye ilişkindir.

Sonraki 4 bölüm laboratuvarında numunenin işlenmesi ve yerleşik yöntemler ile ilgilidir.

Son bölümler ise uygunsuzlukların giderilmesine, denetim yöntemlerine ve yönetimin kontrolüne ayrılmıştır.

Çizimde gösterildiği gibi, Kalite el kitabı “Demming” Çemberine göre organize edilmektedir.



Çizim: **Demming Çemberi**

Bölüm 1'de laboratuvarın tanıtımı yer almakta olup, organizasyon şemasını, çalışanların görev tanımlarını ve kalite el kitabının yapısını ve uygulama alanlarını tanımlamaktadır.

Bu bölümde yönetimin onayıyla yayınlanan laboratuvarın kalite politikasının beyanatının olması gerekmektedir. Yönetimin doğru mesleki uygulamaların mevcudiyetini ve müşterilerine sunduğu deneylerin kalitesine ilişkin taahhüdünü içermelidir. Laboratuvar yönetiminin sağladığı hizmet ile ilgili olarak, kalibrasyon ve diğer aktiviteleri uygulayan personelin, yönetimin kalite politikasına uyma bilinci ile hareket ettiğini ve yönetimin TS EN ISO 17025 standardına uyacağını içeren bir beyanat olmalıdır.

Bölüm 2, laboratuvarın müşterilerine yönelik taahhüdünü tanımlamaktadır. Bu belge laboratuvarın taahhütlerine ilişkin kontrat olarak kabul edilmelidir. Su inceleme laboratuvarlarının onaylama referansına göre düzenlenmelidir. Örneğin, Fransa'da bu programlar 100-1, 100-2 ve 100-3 inceleme yöntemlerini ve özel şartları tanımlamaktadır.

Bu dökümanda, numunelerin incelemeye alınmasına ve sonuçların verilmesine ilişkin kavramlar yer almalıdır. Bu döküman çok önemlidir, çünkü sağlık kontrolü için burada müşteri devlettir ve inceleme kriterlerini, hangi sıklıkla yapılması gerektiğini, inceleme yöntemlerini ve en önemlisi numunelere ilişkin uyulması gereken şartları çok net bir şekilde belirtmiştir.

Numunenin alınmasına ilişkin bir yöntem olmalı ve burada numune alımının şartları ve koşulları yer almalıdır. Laboratuvar tarafından sağlanan numune kabı ve numune alma yöntemi hakkında bilgiye de burada yer verilmelidir. Bu nokta son derece önemlidir çünkü kontrat laboratuvar ve müşterisi için kabul edilebilir olmalıdır. Laboratuvarın numune alma işlemine ilişkin gerekli tedbirleri almış olması çok önemlidir, özellikle kullanılacak şişeleme türü, taşıma süreleri ile ilgili sınırlamalar kendisinin iyi bir inceleme sonucu almasını sağlar. Bu noktalar son derece önemli olup detaylandırılmalı ve numune alma işlemini gerçekleştiren kişiler ile belirlenmelidir.

Bölüm 4 personele ilişkindir. Personel belirli bir niteliklere sahip olmalı ve kalite el kitabında personelin niteliğinin belirlenmesine ilişkin yöntemler tanımlanmış olmalıdır. Farklı görevler için detaylı bir tanımın yapılması gereklidir.

Her personel görevlerinin tam listesini, sorumluluklarını ve niteliklerini bilmelidir. Her bir personel için yeterlilikler, eğitim ve sorumluluk derecelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Yetkinlikler kişilerin yeteneklerine göre belirlenmeli ve her süreç için yetkilendirilmiş olan personelin listesinin bilinmesi gerekmektedir (numunelerin alımı, farklı analitik tekniklerin uygulanması, yıkama, sonuçların toplanması ve onaylanması, malzeme ve reaktiflerin siparişi, imza sirkülerinin yayımlanması gibi)

Yetkinlik ile hiyerarşi arasında bağlantı yoktur, çünkü yönetimde yer alan kişiler personelin gerçekleştirdiği tüm işlemleri bilmeli ve böylelikle hataları tespit edebilmeli ve laboratuvarında aynı iş için birden fazla yetkilendirilmiş personelinin olması, laboratuvarın normal bir işleyiş içerisinde olabilmelerini temin eder.

Laboratuvara alınan her yeni personel yetkin olmalı ve yetkin kılma yönteminin de yazılı olarak düzenlenmiş olması gerekir: göreve alınan kişinin adı, kendisini kimin eğiteceği ve yetkinlik programının belirlenmesi (örneğin: incelemenin yetkilendirilmiş birisi ile ikili olarak

yapılması), yetkinlik çalışmasında alınacak kararlara esas teşkil edecek kriterler kayıt edilmedir.

Farklı yetkinlik işlemlerinin kayıtlarının tutulması, eğitimi gerçekleştiren ve yetkin kılınan kişi tarafından imzalanması gerekmektedir.

Laboratuvar personeli sürekli olarak eğitilmeli ve becerilerinin tekrar gözden geçirilmesi ve laboratuvarlar arasında deneylere katılması kesinlikle şarttır.

Laboratuvarlar arası karşılaştırma testlerinin ulusal düzeyde organize edilmesi gerekir. Bu deneyler bağımsız bir kuruluş tarafından gerçekleştirilmelidir. Laboratuvarlara numunelerin gönderilmesi ve sonuçların değerlendirileceği istatistikî sonuçların iletimliyle de bu kuruluş sorumludur.

Takip eden bölümler satın alma ile ilgilidir. Tedarikçilerin seçimi ile ilgili yöntemler tanımlanmış olmalıdır. Teknik özelliklerin belirtilmesi ve özellikle de bazı malzemelere ilişkin koşullar (tüpler, teraziler...) ve reaktiflerin saflık dereceleri açık ve ayrıntılı şekilde belirtilmelidir. Malzemeleri sağlayan tedarikçiler de değerlendirilmelidir.

Satın alımları kimin gerçekleştirdiği, hangi kriterleri dikkate alarak alımı gerçekleştirdiği, malzemeleri kimin karşıladığı ve kimin stok yönetiminden sorumlu olduğu ve reaktif takibini yapıp almaya karar verdiği prosedürde belirtilmelidir.

Bu bölümde numune alımlarına ilişkin şişelemeye de değinilmelidir.

Bölüm 8 ise, numune alımı ve inceleme yöntemi ile ilgilidir. Su incelemelerini gerçekleştiren laboratuvarın onaylanmış (Akreditasyon Kurumu tarafından) programı mutlaka olmalı ve uygulanacak olan yöntemlere ilişkin teknik inceleme şartlarını, yapılması gereken sağlık kontrollerinin kriterleri belirtmelidir.

Örneğin Fransa’da, konu ile ilgili detaylı iki programa yer verilmiştir:

1. Fiziksel - kimyasal analizler ile ilgili 100–1 sayılı program,
2. Suların biyolojik ve mikrobiyolojik analizi ile ilgili 100–2 sayılı program ve sulak ortamların biyolojik incelemesi ile ilgili 100–3 sayılı program (Bkz. “Kaynakça”).

Bu şartlar son derece önemlidir ve laboratuvar seviyesinde ve uygulamaları gereken normlara bir eşik getirmektedir. Örneğin, kurumda standardizasyona ilişkin yönergenin yayımlanmasını takip eden 9 ay içinde standardize olan tüm yöntemlere uygulanmalıdır. Laboratuvarın kalite sorumlusunun normlara ilişkin gelişimleri takip etmesi gerekir.

Kalite el kitabının 9’uncu bölümü uygunsuzlukların tespiti ve bunlara yönelik önleyici ve düzeltici yöntemler ile ilgilidir. Bu bölümde, uygunsuzluk veya müşterinin iade talebi (örneğin: analiz süresine uyulmaması, sonuçlara itiraz edilmesi) teriminin tanımlanması gerekir. Prosedürde, hangi koşullarda uygunsuzluk talebi yapılması gerektiği, talebi kimin yapacağı ve kayıt edeceği, talebi kimin kabul edeceği, söz konusu uygunsuzluğa ilişkin alınabilecek önleyici ve düzeltici faaliyetlere değinilmelidir.

Laboratuvar içerisinde gelişmelere ilişkin bazı göstergelerin yer alması gerekmektedir. Bu göstergeler örneğin: iade talebi adedi, uygunsuzluk adedi, arızalanan makine sayısı, vb. olabilir.

Son bölüm, denetim ve yönetim ile ilgilidir. Yönetimin gözden geçirilmesi yıllık olarak yapılmalı ve kalite yönetim sorumlusu ile laboratuvar yöneticileri tarafından gerçekleştirilmelidir. Yönetime yeni eğilimlere yönelmeyi ve uygulanmakta olan yöntemlerde iyileştirme olanlığının olup olmadığını değerlendirmesine ve kurallara ne derecede uyulduğuna bakılmasına olanak tanımaktadır.

İç denetimler kalite sisteminin sağlıklı çalıştığının kontrol edilmesi ve hazırlanmış olan dökümanlara ne ölçüde uyulduğunun tespiti için son derece önemlidir. Prosedürde, kimin denetimi yapacağı, nasıl yapılacağı, hangi dökümanlara dayanması gerektiği ve denetim esnasında yapılması gereken işlemler (uygunsuzlukların tespiti vb.) belirlenmelidir.

Önleyici faaliyetler iyileştirme için gerekli olup, uygunsuz işlemlerin tekrarlanmamasını hedeflemektedir (ister teknik düzeyde, ister kalite yönetimine ilişkin olsun). Tüm bu yöntemler için kayıtlar yapılmalıdır (numune ve kimyasal madde kimlik bilgileri, stoklama, muhafaza ile imha teknikleri ve kalite yönetimi).

Kalite yönetimine ilişkin kayıtlar denetçi raporlarını, yönetim incelemelerini ve gerekli önlem girişimlerini içermektedir.

Laboratuvar, gözlem ve ölçümlere ilişkin kayıtların asıllarını saklamalıdır. Teknik gözlemler için, kalibrasyonların, personelin, kalibrasyon cihazlarının kayıtları sayılabilir. Bu kayıtların üzerinde numune alma işinden sorumlu olan kişinin adı ve soyadı, incelemeyi yapan kişinin adı ve soyadı, kalibrasyondan sorumlu kişinin adı ve soyadı ve analizlerin gözlem ve denetiminden sorumlu kişinin adı ve soyadı yer almalıdır.

Son olarak, kalite el kitabında, sonuçların raporlanmasına ilişkin yöntemler de olmalıdır.

Raporlama aşağıda belirtilenleri içermelidir:

- Laboratuvarın ismi ve adresi,
- Müşterinin isim ve adresi,
- Kullanılan yönteme atıfta bulunulma,
- Numunenin tanımı,
- Numune alım tarihi,
- İncelemelerin yapıldığı tarih ve yer,
- Ölçüm belirsizliği ile birlikte sonuçlar,
- Raporu imzalayan kişinin isim ve unvanı.

3.2. Teknik Şartlar

İlgili öneriler:

3.2.1. Yerleşim ve Çevre Şartları

Laboratuvar yaptığı işin özelliğine göre uygun fiziki ortama sahip olmalıdır: odalar belirli aktivitelere atıf edilmelidir.

Mikrobiyoloji analizlerinde; bulaşmayı engellemek için özellik arz eden tedbirler alınmalıdır:

- Mikrobiyolojik ekim faaliyetinin yapıldığı odaların temiz suyun tütülenmesinin yapıldığı odalardan ayrılması,
- Laboratuvarın düzenlemesiyle çapraz bulaşmalar kontrol altına alınmalı, temiz suların tütülenmelerinin kullanılmış sulardan ayrıştırılması,
- Normların ve standartların doğru uygulanmasına çevre koşullarının engel teşkil etmemesi gerekir.

Kimyasal analizlerde, çapraz kontaminasyonların engellenmesi için önlem alınması gerekmektedir (dozajlar ve çözelti ayarlamasının iki farklı odada yapılması). Numunelerin kaydı için bir oda tahsis edilmiş olması gerekir.

Laboratuvarda her oda tanımlı, girişleri sınırlandırılmış olmalı ve bu uygulamalar kurallara tabi olmalıdır. Elektrik kaynakları ve oda ısısı ile ilgili olarak özellik arz eden tedbirlerin alınmış olması gerekir. Enerji kaynaklarının güvenilir olması da son derece önemli bir husustur ve sıcaklığın sabit tutulması için akım kesintisiz olmalıdır. Örneğin, etüvler için arıza halinde bunun kaydedilmesi ve inceleme sırasında göz önünde bulundurulması gerekir. Aynı şekilde laboratuvar sıcaklık değişimleri önemli boyutta olmamalıdır.

- Temizlik koşulları: bir talimatla tanımlanmalı ve anlatılmalıdır. Laboratuvar, malzeme ve aletlerin temizliği teknik personelin sorumluluğunda gerçekleştirilmeli;
- Özellikle mikrobiyolojide iç kalite kontrollerinin tesis edilmiş olması gerekmektedir. Söz konusu kontroller laboratuvar hava ve yüzeylerinin kontrolünü de kapsamalıdır.

3.2.2. Cihazlara İlişkin Tavsiyeler

Tüm ölçüm cihazlarının etiketi olmalı ve tanımlanabilir olmalıdır. Laboratuvarda kullanılan malzeme gerçekleştirilecek olan çeşitli incelemelere uyarlanabilir olmalıdır. Laboratuvarda tam bir cihaz ve ekipman listesi bulunmalı ve net bir şekilde nerede bulduklarına da yer vermelidir. Her cihaz ve ekipman üzerinde, son kalibrasyon tarihi yer almalı ve bir sonraki kalibrasyon tarihi de belirtilmelidir.

Eğer cihazlar birden fazla parça içeriyor ise her parçanın ayrı bir numarasının bulunması gerekir. Cihazlar 4 ayrı süreçte onaylanmalıdır:

- I. Cihazın teknik özelliklerinin kontrolü, laboratuvarın teknik özellik arz eden kontrollerine uyup uymadığı kontrol edilmeli,
- II. Kurulum sırasında niteliğinin ve kurulum parametrelerinin onayı,
- III. Operasyonel açıdan niteliğinin ve doğru işlediğinin kontrolü,
- IV. Performans niteliğinin laboratuvar kullanım koşullarında kontrol edilmesi gerekir.

Her cihazın bir dosyasının bulunması ve içeriğinde de en az iki kayıttan oluşan bilgilerin yer alması gerekmektedir:

- Cihazın tanıtımını ve anlatımını içeren kart (*Ek 1*), cihaz ismini, tedarikçisini, alım tarihini, içerecek şekilde...
- Cihazın takip kartı (*Ek 2*), cihazın geçirmiş olduğu tüm bakım ve onarım tarihçesini içerir şekilde,
- Her cihaz için tedbir olarak bakım planı olmalı,
- Laboratuvar cihaz listesinin yapılması ve sorumlusunun atanmış olması,
- Cihazın iyi çalışır olduğuna ilişkin göstergeler seçilmeli, tespit edilmeli ve kayıt edilmelidir,
- Cihazların periyodik kontrolünün yapılması gerekir,
- Kontrollerin kayıtları tutulmalı ve saklanmalı,
- Eğer bir incelemenin gerçekleştirilebilmesi için laboratuvarda birden fazla cihaz varsa kayıta hangi cihazın kullanıldığının belirtilmesi gerekir. (örneğin, spektrofotometre, terazi...)

Bazı cihazlar metrolojik aktivitelerin tesis edilmesini gerektirmektedir. Bu aktivite ısı, hacim ve ölçüm cihazlarının kontrolü için şarttır.

“Metroloji” terimi yunanca “**metron**” kelimesinden gelmekte olup, ölçüm bilimi anlamına gelmektedir. Temelinde bu kelime fiziksel ölçümler için kullanılmaktaydı ve buna bağlı olarak çeşitli referans standartlar benimsenmişti (hacim, uzunluk...).

Daha sonra bu ifade kimyasal fiziğe (iyonik güç, sürekli denge), kimyaya (sıvı veya gaz haldeki maddelerin katı haldeki türlerinin bileşikleri) ve biyolojiye de (bakterilerin sayımı) yayılmıştır.

Fiziki bir ölçümün izlenebilirliği (1) ve kimyasal ölçümü (2): (1) Birincisi için basit olaylar zincirine bağlıdır, (2) ikincisi için daha karmaşık olaylara bağlıdır.

Niceliksel ölçümlerde kullanılan bir cihazın performansını ve sürekli kontrolünü belirlemek için metroloji kullanılan bir süreçtir (hacimlerin, ısının belirlenmesi).

Her ölçüm belirsizliğini de belirtmelidir.

Uluslararası tanımlar aşağıdaki şekildedir:

“Kesinlilik bir ölçümün ölçme kapasitesini ölçer ve tam bir değer verir.

Belirsizlik, beklenen sonuç ile elde edilen sonuç arasındaki farktır.

Bu da güvenilirlik sapmasına tekabül etmektedir.

Tolerans belirli bir test için kabul edilebilir sapmanın ölçülmesidir.”

Metrolojinin 10 koşulu aşağıda belirtilmiştir:

1. Ölçüm cihazlarının tespit edilmesi,
2. Bir kontrol kartının düzenlenmesi,
3. Kalibrasyon için asgari koşulların belirlenmesi,
4. Kalibrasyonun sürelerinin belirlenmesi,
5. Ulusal ve uluslararası kalibrasyon referans standartlarının belirlenmesi,
6. Çevresel koşulların belirlenmesi,
7. Cihaz ve ekipmanın kalibrasyonu (sonuçlar kontrol kartlarında),
8. Cihaz ve ekipmanın kapasitesinin garanti edilmesi,
9. Cihaz ve ekipmanın korunması ve yeniden ayar yapılmasından kaçınılması,
10. Cihaz ve ekipmanın kullanım dışı olacağı durumların belirlenmesi.

Kalibrasyon gerektiren veya kontrol gerektiren her bir cihaz için, kalibrasyonun kalibre materyal ile yapıldığı durumlarda ölçüm yapılmakta, kontroller için liste yapılmakta ve elde edilen sonuç beklenen sonuçla karşılaştırılmaktadır.

Eğer sonuç beklenen doğrultuda ise, cihaz yeniden kullanıma dahil edilir ve sonuç kontrol raporu ile cihazın dosyasında yer almalıdır.

Eğer sonuç beklenenden farklı ise, cihaz kullanım dışına alınır veya diskalifiye edilir ve yeniden kalibre edilir veya tamire gönderilir. Sorumlu kişi tarafından alınan karar kayıt edilmeli ve cihazın dosyasında saklanmalıdır. Bu durumda cihazın üzerine kullanım dışı olduğunu belli edecek bir etiket yapıştırılmalı ve uygun çalışmadığı böylece belirtilmelidir.

Metroloji sorumlusu her laboratuvarında belirlenmiş olmalı ve fiziki ölçümlere ilişkin kontrol talimatlarını vermeli (hacim, ısı, yoğunluk) ve cihazların izlenebilirliği açısından belli bir sistem ve sürecin tesisini sağlamalıdır (belirsizliklerin izlenebilirliği, cihazların kontrol kartı).

Metrolojik kalibrelere bağlı cihazlar için, kalibrasyon sertifikaları ve kontrol raporları cihazın en iyi seviyede olduğuna emin olmaya yarar.

Isı

Isıların kaydının sürekli olarak ve özellikle de etüvlerde yapılması gerekmektedir. Isı ile ilgili kesinlik belirtilmeli ve iç kalite kontrolü ve durumun kontrol altında olduğunun kanıtlanması (kayıt tutularak ve saklanarak) gerekir.

Isı kontrolünde kullanılan termometrelerin kalibrasyonu, ulusal veya uluslararası kalibrelere bağlı bir referans ile yapılmış olmalıdır.

Etüvlerdeki ısının homojenliği kayıt altına alınmalıdır. Isı kontrolü gereken titizlik ile yapılmalı ve yöntemlerinin açıklanması gerekmektedir (kim, ne, ne zaman, nasıl).

Mikrobiyolojide otoklavlar için kontroller günlük yapılmalıdır (örneğin: steril özelliğin kontrolü, basınç ve ısının kontrolü). Yılda bir kez dışarıdan bağımsız bir kuruluş tarafından kontrol yapılmalıdır.

Kütle

Teraziler kontrol edilmeli, ulusal ve uluslararası sertifikalı referans kalibre maddelerle değerlerine göre kalibre edilmelidir.

Birden fazla kontrol gerçekleştirilmelidir:

- Uluslararası sertifikalı kalibreler ile kalibrasyonun kontrolüne yönelik yıllık iç ve dış denetimler yapılır.
- Terazinin doğru çalıştığına ilişkin günlük iç kontrol yapılmalı ve kontroller kartlarda kayıt altına alınmalıdır (Ek 3).

Hacimler

Kalite el kitabında, camların özelliklerine genel olarak değinilmelidir.

Ancak, üç ayda bir mikropipetlerin kontrolü yapılmalıdır (10 tekrar). Aynı şekilde, otomatik sulandırma kullanılıyor ise, yapılan sulandırma sık sık ve düzenli olarak kontrol edilmelidir.

3.2.3. Kullanılan Malzeme ve Reaktiflere İlişkin Tavsiyeler

Reaktiflerin kalitesinin ve laboratuvar malzemelerinin iyi yönetilmesi büyük önem taşımaktadır.

Saflık önerileri satın alma özellik şartlarında belirtilmektedir ancak herhangi bir riski bertaraf etmek amacıyla, yıkama ve şişelemeye ilişkin özel tedbirlerin alınması gerekmektedir.

Şişelerin hangi yöntemle yıkandıkları incelenecek olan parametrelere göre yıkama esaslarına tabi tutulmalıdır ve bu işlem ayrıntılı bir şekilde açıklanmalıdır.

Söz konusu kontroller tüm süreç üzerinde gerçekleştirilmelidir:

- Şişelerin ve mikrobiyolojide kullanılan malzemenin sterilizasyon durumları kontrol edilmelidir,
- Kimyasal incelemeler için reaktifler, cam malzeme ve şişeler kontrol edilmelidir.

Laboratuvarın şişelerin yönetime önem vermesi gerekir. Şişelerin etkin ve en iyi şekilde yönetilmesi numune alma işleminde oluşabilecek hatalara engel olabilmektedir.

Reaktifler ve sarf malzemeleri için laboratuvarında yetkili ve sorumlu birisinin olması gerekir ve bu kişinin siparişleri idare etmesi, sevkiyatı kabul etmesi ve anılan reaktiflerin saklama sürelerini yönetmesi gerekmektedir.

Muhafaza süreleri ve ortamları da belirtilerek reaktiflerin bir listesi düzenlenmelidir.

Özellikle mikrobiyolojide, kültür ortamlarının seçimi ve hazırlanması için başka kontrollerin de yapılması gerekmektedir.

Özet olarak, reaktifler, kültür ortamları ve şişelemeye ilişkin iki tip kontrol gerçekleştirilmektedir:

- Kontaminasyon yokluğu için şahit (kör) kullanımı (steril, mikro kirleticiler),
- Özellikle mikrobiyolojide kültür ortamlarının hazırlanmasının ve seçilmesinin kontrolü

Kimyasal incelemeler için, kontrol kartları süreçte olan incelemenin işleyişinin iyi çalışırılığının kontrolünü sağlamaktadır.

3.2.4. Yöntem (Metod) Talimatları

Laboratuvardaki inceleme yöntemlerine ilişkin bir liste olmalıdır. Suyun sağlık açısından kontrolü için, Avrupa Direktifi son derece açıktır: Standartlaştırılmış yöntemler uygulanmaktadır.

Genelde iki tip yöntem kullanılmaktadır:

- Bir elementi inceleyen yöntemler. Bu parametreler için, farklı yöntemler kullanılabilir ve bu durumda yöntemlerin aynı sonuca vardırması gerekir;
- Bir indeksin belirlenmesine yönelik yöntemler (örneğin, tüm klasik mikrobiyoloji yöntemleri), bu durumda yöntemin kesin protokolü izlenmelidir.

TS EN ISO 17025 standardı validasyonu, laboratuvarlarda kullanılan yöntemler açısından en az aşağıdaki nedenlerden dolayı gerekli kılmaktadır:

- ❖ Doğrusallık,
- ❖ Tekrarlanabilirlik,
- ❖ Yeniden üretilebilirlik,
- ❖ Miktarla ilişkin sınırların belirlenmesi ve tespiti,
- ❖ Belirsizliğin tespiti.

Fransız XP T 90–210 ve XP T 90–220 standartları (Bkz. kaynakça), yöntemlerin nitelik açısından nasıl değerlendirilebileceklerini ve nicelik için tayin sınırlarını belirlemektedir.

Proje uluslararası standartlara göre olacak ise, ISO 13530 “*Suyun kalitesi – Analitik İnceleme ve Kontrol Direktifleri*”, belirsizliğin nasıl değerlendirileceğine ilişkin bilgi vermektedir.

Laboratuvarlar arasındaki karşılaştırma deneylerine katılım, belirsizliğin tespit edilmesinde ve hesaplamaların yapılmasında yardımcı olmaktadır. NIST (Ulusal Standart ve Teknoloji Enstitüsü), BCR (Topluluk Referans Bürosu) tarafından sertifikalı kalibrelerin kullanımı da doğruluğu saptama ve yöntemleri onaylamakta kullanılabilir.

Her yöntem (metod) için, sorumlu bir kişinin tespit edilmesi ve yönteme (metoda) ilişkin basitleştirilmiş talimatın yetkilendirilmiş olan bu kişi tarafından yazılması gerekmektedir (Ek 4) (Bkz. Basitleştirilmiş talimat örneği).

Talimatta yöntemin(methodun) prensibi, kapsamı, kullanılan malzeme ve kimyasallar,uygulama, hesaplamalar, ölçüm birimleri, kalite kontrolleri ve yıkama için alınması gereken önlemler belirtilmelidir.

Bu süreçte uygulanan yöntemin özelliği ve yöntemlerin toplamda nasıl yönetileceği tarif edilmelidir (kim basitleşmiş talimatı yazacak, yöntemin özelliği nedir ve kim talimatı onaylayacak).

4. KALİTE GÜVENCESİNİN MALİYETİ

Kalite güvencesinin sağlanması laboratuvara % 20 ek maliyet getirmektedir.

Kalite güvencesinin yarattığı maliyet artışında aşağıdakiler göz önünde bulundurulmalıdır:

- ✓ Personel eğitim masrafları,
- ✓ Belgelerin yazımına ayrılan zaman,
- ✓ **Kalibrasyon** maliyetleri ve ulusal veya uluslararası kalibreler ile belgelendirme,
- ✓ Çevre şartlarında ve donanımlarda değişiklik,
- ✓ Ulusal ve uluslararası standartların satın alınması,
- ✓ Akreditasyonun maliyeti (denetim, denetçiler).

Sonuç olarak akreditasyon bir laboratuvarın sonuçlarını garanti etmektedir.

Laboratuvar numune alımı ve numune taşınmasına ilişkin kriterleri belirlemelidir. Bunun için, yıkama ve numune alma koşullarına ilişkin kalitenin yönetimi için bir sistem geliştirilmiş olmalı ve işlemlerin izlenebilirliğinin çok iyi olması gerekmektedir. İşini planlayabilmek amacıyla, numune alan kişiler ile sözleşme düzenlemelidir.

Malzeme ve cihazların tanım kartlarının bulunması ve bakım onarım bilgilerinin de eksiksiz olarak belirtilmesi gerekmektedir. Paralel bir şekilde, laboratuvarın uluslararası düzeyde kabul görmüş yöntemleri (metodları) kullanması da çok önemlidir.

Akreditasyon çok uzun bir süreçtir, ancak alındıktan sonra laboratuvarın daha iyi çalışmasına ve iyiyeye gitmesini sağlar. Personelin sorumluluk almasını teşvik eden bir sistemdir.

Düzenlenecek Dökümanların Listesi

Kalite El Kitabı

Bölüm	Döküman kodu	Döküman adı
0	XXX-M-00-00	Kalite el kitabı özeti Kısaltmalar, tanımlar Kalite el kitabı yayınlarının listesi Organizasyonel talimatlar
4	XXX-M-04-01 XXX-M-04-02 XXX-M-04-03 XXX-M-04-04 XXX-M-04-05 XXX-M-04-06 XXX-M-04-07 XXX-M-04-08 XXX-M-04-09 XXX-M-04-10 XXX-M-04-11 XXX-M-04-12 XXX-M-04-13 XXX-M-04-14 XXX-M-04-15	Laboratuvarın organizasyonu Laboratuvarın teşkilat şeması Kalite politikası ve yönetimin taahhüdü Kalite sistemi Dökümanların kontrolü ve hazırlanması Sözleşme ve müşteriler nezdinde taahhüt Materyal ve malzemelerin alımlarının öngörülmesi ve organize edilmesi Uygunsuzluk şikâyetleri Düzeltilici faaliyetler Önleyici faaliyetler Kayıtların kontrol altında tutulması İç denetimler Yönetimin gözden geçirme çalışmaları
5	XXX-M-05-00 XXX-M-05-01 XXX-M-05-02 XXX-M-05-03 XXX-M-05-04 XXX-M-05-05 XXX-M-05-06 XXX-M-05-07 XXX-M-05-08	Teknik talimatlar Personel – İnsan kaynakları Kurulumlar ve ortam koşulları Kalibrasyon yöntemleri ve yöntemlerin doğrulanması (validasyon) Cihaz ve ekipmanlar Ölçümün izlenebilirliği Numunelerin teslim alınmasına ve numune alma işlemlerine ilişkin koşullar Deneysel sonuçların kalite güvencesi Sonuçlara ilişkin rapor

Düzenlenecek Dökümanların Listesi

Prosedürler

Bölüm	Döküman kodu	Döküman adı
2	XXX-P-02-01	Personel yönetim prosedürü
4	XXX-P-04-01 XXX-P-04-02 XXX-P-04-03 XXX-P-04-04 XXX-P-04-05 XXX-P-04-06 XXX-P-04-07	Düzeltilici ve önleyici faaliyetler prosedürü Kalite kayıtlarının kontrolü prosedürü İç denetim prosedürü Kalite sistemi yapısını tanımlayan prosedür Yönetimi gözden geçirme prosedürü Müşteri memnuniyeti ölçme prosedürü Döküman hazırlama ve kontrol prosedürü
5	XXX-P-05-01 XXX-P-05-02 XXX-P-05-03 XXX-P-05-04 XXX-P-05-05 XXX-P-05-06 XXX-P-05-07 XXX-P-05-08 XXX-P-05-09 XXX-P-05-10 XXX-P-05-11	Personelin eğitimi ve niteliği prosedürü İade kayıtlarına ilişkin yöntem ve işleyiş Sonuç raporu formatının tanımlanması prosedürü Yöntemlerin karakterizasyonu prosedürü Standart kapsamında yer almayan yöntemlerin validasyonu prosedürü Belirsizliklerin hesaplanması prosedürü Cihaz ve ekipmanların bakımı prosedürü Materyallerin ve sarf maddelerin yönetimi prosedürü Steril özelliğin kontrol edilmesi prosedürü Yıkama koşullarının kontrol edilmesi prosedürü Numune kabul prosedürü

Düzenlenecek Dökümanların Listesi (ayrıntılı bir liste değildir)

Talimatlar

Bölüm	Döküman kodu	Döküman adı
4	XXX-I-04-01	Personel nitelik talimatı
5	XXX-I-05-01	Terazi kontrol talimatı
	XXX-I-05-02	Derece kontrol talimatı
	XXX-I-05-03	Cam malzeme temizleme talimatı
	XXX-I-05-04	Tezgah temizleme talimatı
	XXX-I-05-05	Numune alma şişeleri temizleme talimatı

Düzenlenecek Dökümanların Listesi (ayrıntılı bir liste değildir)

Kayıtlar

Bölüm	Döküman kodu	Döküman adı
4	XXX-E-04-01	İç denetim raporu
	XXX-E-04-02	Uygunsuzluk kaydı
	XXX-E-04-03	Düzeltilici faaliyetler kaydı
	XXX-E-04-04	Personel görev tanımı
	XXX-E-04-05	Eğitimlerin kayıtları
	XXX-E-04-06	Eğitim planı
	XXX-E-04-07	Personel nitelik kayıtları
	XXX-E-05-01	Derecelerin kontrolü kayıtları
5	XXX-E-05-02	Temizleme prosedürleri kaydı
	XXX-E-05-03	Cihaz bakım kayıtları
	XXX-E-05-04	Kontrol kartları kayıtları
	XXX-E-05-05	Numune kabul kayıtları

Ek 1

Cihaz Kartı Örneği

	CİHAZ KARTI	N°
	CİHAZ ADI	Rev.
		Sayfa 1/1
MARKA :		
MODEL :		
SERİ NUMARASI		
TEDARİKÇİ ADI	TEDARİKÇİ ADRESİ	
SATIN ALMA TARİHİ	SERVİSE GİRİŞ TARİHİ	
Garanti Süresi		
YEREL :		
SORUMLU :	YEDEK	
Şirket adı		
Adres :		
Dosya		
S.A.V.(Videonik Ses Frekans Sistemleri):		
MALZEMENİN ÖZELLİKLERİ		
Ölçüleri :	- Genişlik:	- YükseklikYükseklik
	- Derinlik:	
Kaynak :		
Ağırlık	İtiyaçlar:	
ÖZELLİKLER		
Birim	Ölçekler	
Ölçü Hücresi:		
Gözlem		

EK 2

Cihaz Takip Kartı Örneği

<i>CİHAZ KARTI TANIMLAMA</i>			<i>No. Rev. Sayfa 1/1</i>
KALİBRASYONLAR – KONTROLLER			
TARİH	ARACI ONAY	SONUÇLAR	BİR SONRAKİ KALİBRASYON KONTROL

Ek 3

Günlük Terazi Kontrolünün Sağlanması

<u>Terazinin Günlük Takibi</u>	<u>Referans:</u>
	Sürüm No: _____ Sayfa: _____
	<u>TALİMAT</u>
Amaç:	
	KULLANIM_ÖNCESİ TERAZİNİN GÜNLÜK KONTROLÜ
UYGULAYICILAR:	
	GÜNÜN İLK KULLANICISI
BELGE VE/VEYA BİLGİ VEYA GEREKLİ MALZEME	
<u>Gerekli Bilgi veya Belge listesi:</u>	<u>Hangi belgeyle birlikte:</u>
* Terazinin Kullanım Şekli	* Terazi Yanında
* Kontrol Kartı	* Terazi Yanında
* Kütle Kontrolü	* Terazi Yanında
UYULMASI GEREKEN KOŞULLAR VE/VEYA KISITLAMALAR	
* Kullanım Öncesi, en az 30 dakika boyunca kaynağa bağlanması	
* Terazinin yataylığının kontrol edilmesi (su terazisinin)	
* Oda ısısının 15°C dereceden fazla olması	
İLETİLMESİ GEREKEN BELGELER VEYA BİLGİLER	
<u>Sorunlar:</u>	<u>Uyulması Gereken Davranış</u>
* Uymayan Değer	Terazinin üzerine "HS" (Uyumlaştırılmış Sistem" ibaresi taşıyan kırmızı bir etiket yapıştırılması
	Metroloji Yetkilisine Bilgi Verilmesi

İlgili Belgeler:	Terazi Kontrol Kartı
Tarihçe:	
Rev	Kimlik değişikliği yapılması
Rev	
Hazırlayan:Tarih:	Kontrol:Tarih: Onay:Tarih

EK 4

Basitleştirilmiş Talimat: mikrobiyoloji analiz yöntemi	LQ Ölçümü
	0,40
Bağırsak enterokokları araştırılması ve sayımı.	0,40
Membran filtreleme metodu.	0,40
0 Değişiklikler	0,47
	0,48
	0,46
Değişiklik: basitleştirilmiş yazım	0,41
	0,50
1 Yöntem	0,41
	0,48

<u>Uygulama alanı</u>	<u>Referans standart</u>
Askıda maddelerin veya partiküllerin çok miktarda olduğu sular hariç bütün su çeşitleri	NF EN ISO 7899-2 (Ağustos 2000)
<u>Muhafaza</u>	<u>Analiz öncesi muhafaza süresi</u>
Cam veya polietilen numune alma şişeleri	24 saat
	Şişelenmiş sular için 12 saat
<u>Muhafaza ısısı</u>	
Taşıma esnasında: $\leq 10^{\circ}\text{C}$ ısıda soğutulmuş araba veya soğuk akümülatörlü izoterm akümülatör	
İlk 6 saat tolerans: ortam ısısı ($<25^{\circ}\text{C}$)	
Laboratuvara getirilmesinden analize kadar: soğuk oda $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$	
<u>Tayin limiti</u>	<u>Sonuçların ifade edilmesi</u>
0 UFC	UFC/100ml veya UFC/250ml

2 Güvenlik

<u>GÜVENLİK VE ÖNLEMLER</u>	İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARINA (GLP) UYULMASI
<u>ATIKLAR</u>	Bu amaçla kullanıma ayrılmış çöp kutularına atılmaları

3 İlke (Metodun/Yöntemin Prensipleri)

Daha sonra sodyum azotür ve 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorürü ihtiva eden katı selektif ortam üzerine yerleştirilen membran filtreleme ile suyun filtrelenmesi (100/ml)

Tipik koloniler ya ortada veya koloninin tamamında kahverengi-kırmızı veya pembe bir renkle bombeleşmiştir.

Konfirmasyon 44°C ısıda önceden ısıtılmış safra, eskulin ve azotür jelozu üzerindeki bütün koloniler ile birlikte membran transferinin yapılmasıyla gerçekleştirilir.

4 Materyal, kültür ortamları

Materyal

- Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan malzeme (steril pipetler, Petri kutuları, inkübatörler...)

Dilüsyon sağlayıcı

- Tuzlu peptone su: EPS (MR 15-00)

Selektif kültür ortamı

- Enterokoklar için jeloz: Slanetz ve Bartley (MR 25-00)

Konfirmatif kültür ortamı

- İki yönlü olarak eskulin ve azotüre bağlı jeloz: BEA (MR 04-00).

5 İşlem şekli

Filtreleme

- Analiz edilecek numunenin ardışık çevirme hareketleriyle homojenleştirilmesi;
- Membran filtre kullanma talimatı INS/LC/502 doğrultusunda numunenin 20 ve 25ml arasında membran filtreleme işleminin yapılması (numunenin yapısına göre) ve membranın bir Slanetz ve Bartley jeloz kutusunun üzerine yerleştirilmesi.

İnkübasyon

- Bu şekilde hazırlanmış kutular ters çevrilip 44saat ± 4saat boyunca 36°C ± 2°C ısıda inkübatöre yerleştirilmektedir.

Okuma

- Merkezde veya etrafında kırmızı, kahverengi veya pembe renkte olan bütün bombeli kolonilerin varsayılan enterokoklar olarak kabul edilmesi.

Konfirmasyon ve sayım

- Eğer tipik koloniler var ise, ikili olarak eskulin ve azotüre bağlı jeloz kutusunun üzerine penslerle tutturularak membranın çevrilmeden transfer edilmesi (1 saat boyunca 44°C ± 1°C ısıda önceden ısıtılmış) ve 2 saat boyunca 44°C ± 1°C ısıya konulur;
- Çevreleyen ortamda siyah bir halo'ya sahip bütün tipik kolonilerin pozitif tepkime gösterdiklerinin kabul edilmesi ve bunların bağırsak enterokokları olarak sayılması.

6 Kontrol

Uygulanan kontroller “Membran filtrelemenin genel metodu” INS/LC/502 kullanma talimatında açıklanmıştır.

7 Hesaplama

Her koloninin tek bir mikroorganizmadan oluştuğu kabul edilmektedir ve Koloni Üreten Ünitelerin veya Koloni Oluşturan Ünitelerin (UFC) sayısı olarak ifade edilir.

Sonuç aşağıdaki gibi ifade edilmektedir:

Enterokoklar

$n = 0$

$1 < n < 100$

$n > 100$

n UFC/ 250ml

0 UFC/ 250ml

n UFC/ 250ml

100 UFC/ 250ml

veya dilüsyonların sonuçları

Eğer dilüsyonlar yapılmış ise, elde edilen n sayısının dilüsyon oranının tersi ile çarpılması.

Sonuçlar (okumalar, dilüsyonlar, aşılamlar) E/LC/500, E/LC/502 veya E/LC/508 sayılı formlarda bildirilmektedir.

8 Referans standart metoda kıyasla farklılık

Referans standart metodun şartı	Laboratuvar gerçekleştirilmesi	Doğrulama
44°C ± 0.5°C arası inkübasyon	44°C ± 1°C arası inkübasyon	Program 100.2 spesifik gereklilik toleransı doğrultusunda ± 0.5°C oranında kesinlik elde edilmesini sağlamayan inkübasyon malzemesi.

EK 5: Kalite El Kitabı İçeriği

P
L
A
N
L
A

U
Y
G
U
L
A

K
O
N
T
R
O
L

Ö
N
L
E
M
A
L

- 1- Genel (laboratuvar tanıtımı, terimler, kısaltmalar, kitabın kullanımı, amacı ve uygulama alanları)
- 2- Kalite politikası, hedef ve genel organizasyon şeması
- 3- Kalite sistemi dökümanlarının yönetimi
- 4- Personel
- 5- Yerleşim ve binalar
- 6- Alet – Ekipman
- 7- Reaktifler ve sarf malzemeleri
- 8- Analiz talimatları
- 9- Uygunsuzluklar, düzeltici ve önleyici faaliyetler
- 10- İç kontrol (i tetkik)

BIBLIOGRAPHIE

First of all regulation and international standardization survey should be carried out.

Reference laboratory should be regularly informed about standardization work by the TSE, particularly in case of publication of a new European standard method. If possible it should be involved in TSE working group (example: proposition of the translated French document FD T 90521).

Regular exchanges between Ministry of Health and TURKAK are recommended (accreditation).

Bibliography reviews should be carried out concerning:

- all published analytical methods,
- publications in scientific journals relevant of the field of bathing water quality.

1. Regulation documents

- Directive 2006/7/EC of European Parliament and of the Council of 15th February 2006 concerning the management bathing water quality and repealing
- Council Directive 76/160/EEC of 8 December 1975 concerning the quality of bathing water
- Circulaire DGS-SD7 A 2004-364 du 28 juillet 2004 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans les eaux de zones de baignades et de loisirs nautiques

2. Recommended standards

2.1. Quality assurance

- ISO 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- XP ENV 13 530: Water quality – Guide to analytical quality control for water analysis
- XP T 90 210: Protocol for method validation (French standardized method)
- XPT 90 220: Protocol for estimating uncertainty measurements (French standardized method)
- ISO 8466-Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics
- ISO 5725: Accuracy of measurement methods and results
- Program 100-1 COFRAC: Technical requirements for analysing physico chemical parameters in water
- Program 100-2 COFRAC: Technical requirements for analysing microbiological parameters in water
- ISO 7704- Water quality—Evaluation of membrane filters used for microbiological analysis
- ISO/TR 13843 – Water quality – Guidance on validation of microbiological methods
- PR/NF T 90461- Water quality – Microbiology- quality control of culture media
- NF X 06-031-0 – Application of statistics- Control charts- Part 0: General principles

2.2.Sampling

- ISO 5667-1: Water quality -- Sampling -- Part 1: Water Quality Sampling: Part 1 Guidance on the design sampling programs and sampling techniques.
- ISO 5667-3 Water quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples
- ISO 5667-4 Water quality -- Sampling -- Part 4: Guidance on sampling from lakes, natural and man-made
- ISO 5667-6 Water quality -- Sampling -- Part 6: Guidance on sampling of rivers and streams
- ISO 5667-9 Water quality -- Sampling -- Part 9: Guidance on sampling from marine waters
- ISO 5667-14 Water quality -- Sampling -- Part 14: Guidance on quality assurance of environmental water sampling and handling
- ISO 5667-16 Water quality -Sampling - Part 16: Guidance on biotesting of samples
- AFNOR FD T 90 521: Water Quality – Sampling technical guide for the health monitoring of swimming pools and bathing water in compliance with Public Health Code
- ISO 19458 Water quality -- Sampling for microbiological analysis
- Manuel de prélèvements - Charte de qualité- Qui, comment, quand et avec quels outils doit-on procéder à un prélèvement ? Directions Régionale et Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales de Rhône-Alpes

2.3.Analytical methods

2.3.1.Microbiology

- ISO 6222: Water quality -- Enumeration of culturable microorganisms – colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium
- ISO 9308-1: Water Quality: Detection and enumeration of E coli and coliform bacteria– part 1: membrane filtration method
- ISO 9308-3: Water Quality: Detection and enumeration of E coli and coliform bacteria in surface and waste water – part 3: miniaturized method (most probable number) by inoculation in liquid medium.
- ISO 7899-1: Water quality: Detection and enumeration of intestinal enterococci in surface and waste water.part 1: miniaturized method (most probable number) by inoculation in liquid medium.
- ISO 7899-2: Water quality: Detection and enumeration of intestinal enterococci part 2: membrane filtration method

2.3.2.Inorganic chemistry parameters

- ISO 5813 Water quality -- Determination of dissolved oxygen -- Iodometric method
- ISO 5814 Water quality -- Determination of dissolved oxygen -- Electrochemical probe method
- EN 27888: Water quality determination of electrical conductivity.
- ISO 5961 Water quality -- Determination of cadmium by atomic absorption spectrometry

- ISO 6777 Water quality -- Determination of nitrite -- Molecular absorption spectrometric method
- ISO 6878 Water quality -- Determination of phosphorus -- Ammonium molybdate spectrometric method
- ISO 7027 Water quality -- Determination of turbidity
- ISO 7150-1 Water quality -- Determination of ammonium -- Part 1: Manual spectrometric method
- ISO 7887 Water quality -- Examination and determination of colour
- ISO 7888 Water quality -- Determination of electrical conductivity
- ISO 8288 Water quality -- Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead -- Flame atomic absorption spectrometric method
- ISO 9965 Water quality -- Determination of selenium -- Atomic absorption spectrometric method (hydride technique)
- ISO 10523 Water quality -- Determination of pH
- ISO 11732 Water quality -- Determination of ammonium nitrogen -- Method by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric method
- ISO 11885 Water quality -- Determination of 33 elements by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
- ISO 11923 Water quality -- Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters
- ISO 11969 Water quality -- Determination of arsenic -- Atomic absorption spectrometric method (hydride technique)
- ISO 13395 Water quality -- Determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection
- ISO 15586 Water quality -- Determination of trace elements using atomic absorption spectrometry with graphite furnace
- ISO 15681-1 Water quality -- Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) -- Part 1: Method by flow injection analysis (FIA)
- ISO 15681-2 Water quality -- Determination of orthophosphate and total phosphorus contents by flow analysis (FIA and CFA) -- Part 2: Method by continuous flow analysis (CFA)
- ISO 17294 Water quality -- Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)
- ISO 17852 Water quality -- Determination of mercury -- Method using atomic fluorescence spectrometry
- ISO CD 23914 – 2: Water Quality – determination of antimony part 2 method using hydride generation atomic absorption spectrometry (HG AAS)
- NF EN 1483: Water quality: determination of mercury.
- NF EN 25663: Determination of Kjeldahl nitrogen – Method after mineralization with selenium.
- NF EN 1622: Water analysis: determination of threshold odour number (TON) and threshold flavor number (TFN)
- Manuel des analyses chimiques en milieu marin, Alain Aminot, Marcel Chaussepied CNEXO Brest (F) (1983) 395 p.
- Methods of seawater analysis, K.Grasshoff, K.Kremling, M.Erhardt, Willey VCH, Third Edition 624 p.

2.3.3.Organic chemistry parameters

- ISO 6439 Water quality -- Determination of phenol index -- 4-Aminoantipyrine spectrometric methods after distillation
- ISO 6468 Water quality -- Determination of certain organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls and chlorobenzenes – Gas chromatographic method after liquid-liquid extraction
- ISO 7875-1 Water quality -- Determination of surfactants -- Part 1: Determination of anionic surfactants by measurement of the methylene blue index (MBAS)
- ISO 8245 Water quality -- Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon
- ISO 9377-2 Water quality -- Determination of hydrocarbon oil index -- Part 2: Method using solvent extraction and gas chromatography
- ISO 10301 Water quality -- Determination of highly volatile halogenated hydrocarbons -- Gas-chromatographic methods
- ISO 10695 Water quality -- Determination of selected organic nitrogen and phosphorus compounds -- Gas chromatographic
- ISO 11369 Water quality -- Determination of selected plant treatment agents -- Method using high performance liquid chromatography with UV detection after solid-liquid extraction
- ISO 11423-1 Water quality -- Determination of benzene and some derivatives -- Part 1: Head-space gas chromatographic
- ISO 11423-2 Water quality -- Determination of benzene and some derivatives -- Part 2: Method using extraction and gas chromatography
- ISO 15680 Water quality -- Gas-chromatographic determination of a number of monocyclic aromatic hydrocarbons, naphthalene and several chlorinated compounds using purge-and-trap and thermal desorption
- ISO 15913 Water quality -- Determination of selected phenoxyalkanoic herbicides, including bentazones and hydroxybenzotrioles by gas chromatography and mass spectrometry after solid phase extraction and derivatization
- ISO 17993 Water quality -- Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water by HPLC with fluorescence detection after liquid-liquid extraction
- ISO 20179 Water quality -- Determination of microcystins -- Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection
- EN 12918: Water quality: determination of parathion, parathion methyl and some organophosphorous compounds in water by dichloromethane extraction and gas chromatographic analysis
- ISO TC 147/SC 2 N 0840: Water quality: determination of cyanobacterial toxins-method with High performance Liquid Chromatography (HPLC) and mass spectrometry detection (MS/MS)

3. Other publications

Développement durable, Environnement et Parcs Québec –Direction Générale des Politiques – Cyanobactéries et cyanotoxines au Québec: suivi à six stations de production d'eau potable (2001-2003) (mars 2005)

- AFSSA - Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives (juillet 2006).
- L.Spoof, P.Vestervik, T.Lindholm, J.Meriluoto, J.Chromatogr.A 1020 (2003) 105-119
- M.Barco, L.A.Lawton, J.Rivera, J.Caixach, J.Chromatogr.A 1074 (2005) 23-30
- C.W.Diehnelt, S.M.Peterman, W.L.Budde, Trends in Analytical Chemistry Vol.24, No. 7 (2005) 622-634
- L.Zhang, X.Ping, Z.Yang, Talanta 62 (2004) 193-200
- E.C.Aguete, A.Gago-Martinez, J.M. Leao, J.A. Rodriguez-Vasquez, C.Menard, J.F.Lawrence, Talanta 59 (2003) 697-705
- K-I.Harada, F.Kondo, K.Tsuji, J.AOAC Int. 84 (2001) 1636-1642
- L.Lawton, C.Edwards, G.A.Good, Analyst 119 (1994) 1525-1530

Text prepared in April 2008 by the Twinning team. These documents have been produced with the financial assistance of the European Union. The contents of these documents are the sole responsibility of International Office of Water (IOW) and can under no circumstances be regarded as a reflecting the position of the European Union.

Metin Nisan 2008 tarihinde Eşleştirme ekibince hazırlanmıştır. Bu dokümanlar Avrupa Birliğinin mali yardımı ile geliştirilmiştir. Bu dokümanların içeriği sadece Uluslararası Su Ofisi sorumluluğundadır ve hiçbir şekilde Avrupa Birliği'nin konumunu yansıtmamaktadır

