



*Bu proje Avrupa Birliği ve Türkiye Cumhuriyeti tarafından ortaklaşa finanse edilmiştir.*

## **“YÜZME SUYUNUN İZLENMESİNDE UYUM” Avrupa Birliği Eşleştirme Projesi**

**TR10 / IB / EN / 02**

### **YÜZME SUYU ANALİZLERİ EL KİTABI (2006/7/EC)**



*Bu bir Fransa, İtalya ve Türkiye işbirliğidir.*



**2014**



# İÇİNDEKİLER

## I. BÖLÜM

<b>GİRİŞ</b> .....	1
<b>1. SUDAN KAYNAKLANAN RİSKLER</b> .....	1
<b>2. YÜZME SULARIYLA İLGİLİ OLARAK DİKKATE ALINMASI GEREKEN RİSKLER</b> .....	2

## II. BÖLÜM

<b>NUMUNE ALIMI</b> .....	3
---------------------------	---

<b>1. NUMUNE ALIMININ ÖNEMİ</b> .....	3
---------------------------------------	---

1.1. Analizlerin Amaçları .....	3
1.2. Numune Alımı .....	3
1.3. Alan Üzerinde Numunelere Yapılacak İşlemler .....	4
1.4. Numune Alım Yeri .....	4
1.5. Numune Şişelerinin Önemi .....	4
1.6. Numunelerin Saklanması .....	5
1.7. Sahada Numunelere Uygulanan İşlemler .....	5
1.8. Sahada Yapılması Zorunlu Olan Analizler .....	6
1.9. Sonuç .....	6

<b>2. MİKROBİYOLOJİ VE FİZİKO-KİMYA ANALİZLERİNE YÖNELİK NUMUNE ALIMLARI</b> .....	7
------------------------------------------------------------------------------------	---

2.1. Numune Alımı Neden Düzgün Olmalıdır ? .....	7
2.2. İyi Bir Numune Alımının Önemi .....	7
2.3. Numune Alım Noktasının Seçilmesi .....	7
2.4. Yüzme Suyundan Numune Alma Teknikleri .....	7
2.4.1. Numune Alımından Sorumlu Kişi .....	7
2.4.2. Numune Alma .....	8
2.4.3. Numunelerin Taşınması .....	9
2.4.4. Numunelerin Laboratuvara Teslim Edilmesi .....	9
2.4.5. Numunelere Yönelik Laboratuvarda Yapılan İşlemler .....	9

## III. BÖLÜM

<b>MİKROBİYOLOJİK ANALİZ</b> .....	11
------------------------------------	----

<b>1. SUDA YAŞAYAN PATOJENLERE İLİŞKİN BİLGİLER</b> .....	11
-----------------------------------------------------------	----

<b>2. FEKAL KİRLİLİK GÖSTERGESİ OLAN BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI</b> .....	12
---------------------------------------------------------------------------	----

2.1. Escherichia Coli ve Koliform Bakterilerin Araştırılması ve Sayımı .....	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: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ.....	12
2.1.6. Analizin Maliyeti .....	15
2.2. En Muhtemel Sayı ile E.coli'nin Sayılması .....	16
2.2.1. Amaç.....	16
2.2.2. Kapsam.....	16
2.2.3. Standartlar .....	16
2.2.4. Prensipler.....	16
2.2.5. Kalite Uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ.....	16
2.2.6. Analizin Maliyeti .....	18
2.3. Bağırsak Enterokoklarının Araştırılması ve Sayımı .....	19
2.3.1. Amaç.....	19
2.3.2. Kapsam.....	19
2.3.3. Standartlar .....	19
2.3.4. Prensipler.....	19
2.3.5. Kalite Uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ.....	19
2.3.6. Analizin Maliyeti .....	22
2.4. Yüzey ve Atık Sularda Bağırsak Enterokoklarının Araştırılması ve sayımı.....	22
2.4.1. Amaç.....	22
2.4.2. Kapsam.....	22
2.4.3. Standartlar .....	22
2.4.4. Prensipler.....	22
2.4.5. Kalite Uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ.....	23
2.4.6. Analizin Maliyeti .....	25
2.5. En Muhtemel Sayı Yöntemiyle İntestinal Enterococcilerin Sayılması .....	25
2.5.1. Neden Böylesi Bir Araştırma?.....	25
2.5.2. Bu Araştırmanın Amacı .....	25

2.5.3. Normlar .....	26
2.5.4. Prensipler.....	26
2.5.5. Kalitenin Sağlanması: Metodun Prosedürü .....	26
2.5.6. Analiz Maliyeti .....	29
2.6. ENTEROLERT-E Tarafından Enterococcilerin Sayılması.....	29
2.6.1. Neden Bu Araştırma? .....	29
2.6.2. Bu Araştırmanın Amacı .....	29
2.6.3. Normlar .....	29
2.6.4. Prensipler.....	29
2.6.5. Kalite Girişimi: Metod Prosedürü.....	29
2.6.6. Analizin Maliyeti .....	31
2.7. Bağırsak Enterokoklarının Tespit ve Sayımı, Membran Filtrasyon Yöntemi (TS EN ISO 7899-2).....	31
2.7.1. Neden Bu Araştırma .....	31
2.7.2. Bu Araştırmanın Amacı .....	31
2.7.3. Normlar .....	31
2.7.4. Metodun Prosedürü.....	31
2.7.5. Numune Kabul .....	31
2.7.6. Filtrasyon .....	31
2.7.7. İnkübasyon .....	31
2.7.8. Petrilerin Değerlendirilmesi .....	32
2.7.9. Sonucun Verilmesi .....	32
<b>3. PATOJEN ETKEN ARAŞTIRMASI.....</b>	<b>32</b>
3.1. Salmonella Araştırması (TS EN ISO 19250:2013) .....	32
3.1.1. Amaç.....	32
3.1.2. Kapsam.....	32
3.1.3. Standartlar .....	32
3.1.4. Prensipler.....	32
3.1.5. Kalite Uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ.....	33
3.1.6. Analizin Maliyeti .....	37
3.2. Patojen Stafilokok Araştırması ve Sayımı Membran Filtreleme Yöntemi (XP T 90-412 ve NF T 90-421) .....	37

3.2.1. Amaç.....	24
3.2.2. Kapsam.....	37
3.2.3. Standartlar .....	37
3.2.4. Prensipler.....	37
3.2.5. Kalite Uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ.....	37
3.2.6. ANALİZİN MALİYETİ .....	40
3.3. Enterovirüslerin Araştırılması Cam Yünü Üzerinde Konsantrasyon ve Hücre Kültürle Tayin Yöntemi (XP T 90-451) .....	40
3.3.1. Amaç.....	40
3.3.2. Kapsam.....	40
3.3.3. Standartlar .....	41
3.3.4. Prensipler.....	41
3.3.5. Kalite Uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ.....	41
3.3.6. Analizin Maliyeti .....	46
<b>IV. BÖLÜM</b>	
<b>KİMYASAL ANALİZ.....</b>	<b>47</b>
<b>1. DENİZ SULARININ ÖZELLİKLERİ.....</b>	<b>47</b>
<b>2. TAYİN EDİLECEK ELEMENTLER .....</b>	<b>47</b>
2.1. İyon Kromatografisi ile Dozaj .....	47
2.1.1. Amaç.....	47
2.1.2. Kapsam.....	47
2.1.3. Standartlar .....	47
2.1.4. Kalite işlemi: Yöntemin İşleyişi.....	48
2.1.5. Analiz Maliyeti .....	49
2.2. Fenol İndeksinin Tayini .....	50
2.2.1. Amaç.....	50
2.2.2. Kapsam.....	50
2.2.3. Standartlar .....	50
2.2.4. Kalite işlemi: Yöntemin İşleyişi.....	51
2.2.5. Analiz Maliyeti .....	51
2.3. Civa Tayini.....	53
2.3.1. Amaç.....	53

2.3.2. Kapsam.....	53
2.3.3. Standartlar .....	53
2.3.4. Numune Alımı ve Numunelerin Hazırlanması.....	55
2.3.5. Kalibrasyon ve Doğrulama.....	55
2.3.6. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	55
2.3.7. Analiz .....	55
2.3.8. Özet ve Sonuçların İfadesi .....	56
2.3.9. Kalite Uygulaması: METODUN PROSEDÜRÜ .....	56
2.3.10. Analiz Maliyeti .....	57
2.4. Yüksek Derecede Uçucu Halojenli Hidrokarbonların Tayini.....	57
2.4.1. Amaç.....	57
2.4.2. Kapsam.....	57
2.4.3. Standartlar .....	57
2.4.4. Prensip.....	58
2.4.5. Numune Alma ve Hazırlanması.....	58
2.4.6. Kalibrasyon ve Doğrulama.....	59
2.4.7. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	59
2.4.8. Analiz .....	59
2.4.9. Bileşenleri Tanımlanması .....	60
2.4.10. Hesaplama ve Sonuçların İfade Edilmesi .....	60
2.4.11. Kalite İşlemi: Yöntemin İşleyişi.....	60
2.4.12. Analiz Maliyeti .....	62
2.5. Hidrokarbonların Tayini.....	62
2.5.1. Amaç.....	62
2.5.2. Kapsam.....	62
2.5.3. Standartlar .....	63
2.5.4. Prensip.....	63
2.5.5. Numune Alma ve Hazırlanması.....	63
2.5.6. Kalibrasyon ve Doğrulama.....	63
2.5.7. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	63
2.5.8. Analiz .....	63

2.5.9. Bileşenlerin Tanımlanması .....	63
2.5.10. Hesaplama ve Sonuçların İfade Edilmesi .....	63
2.5.11. Kalite İşlemi: Yöntemin İşleyişi.....	63
2.5.12. Analiz Maliyeti .....	65
2.6. Mikrosistinlerin Tayini .....	65
2.6.1. Amaç.....	65
2.6.2. Kapsam.....	66
2.6.3. Standartlar .....	66
2.6.4. Prensip.....	66
2.6.5. Numune Alma ve Hazırlanması.....	67
2.6.6. Kalibrasyon ve Doğrulama.....	67
2.6.7. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması.....	67
2.6.8. Analiz .....	68
2.6.9. Bileşenlerin Tanımlanması .....	68
2.6.10. Hesaplama ve Sonuçların İfade Edilmesi .....	68
2.6.11. Kalite İşlemi: Yöntemin İşleyişi.....	68
2.6.12. Analiz Maliyeti .....	70
<b>3. DİĞER ELEMENTLER .....</b>	<b>70</b>
<b>V. BÖLÜM</b>	
<b>KALİTE UYGULAMASI / AKREDİTASYON.....</b>	<b>71</b>
<b>1. 17025 STANDARDI: GENEL ÖZELLİKLER .....</b>	<b>71</b>
1.1. Neden .....	71
1.2. Önem .....	71
1.3. 17025 Standardının Farklı Şartları .....	73
1.3.1. Organizasyonla İlgili Şartları.....	73
1.3.2. Teknik Şartlar .....	77
1.4 Kalite Güvencesinin Maliyeti.....	81
2.1.Yönetime İlişkin Talimatlar .....	81
2.2.Teknik Talimat .....	85
<b>3. EKLER .....</b>	<b>90</b>



## Yüzme Suyunun İzlenmesinde Uyum, Avrupa Birliği Eşleştirme Projesi

TR/10/IB/EN/02

**Bu bir Fransa, İtalya ve Türkiye işbirliğidir.**

### Projenin kısa tanıtımı

#### Eşleştirme

Katılım öncesi Kurumsal Yapılanmaya destek sağlamanın temel aracı olan Eşleştirme, aday ülkelerin Topluluk Müktesebatının Üye Ülkelerle aynı standartlarda yürütmeleri için gerekli olan yapılar, insan kaynakları ve yönetim becerileri ile kendi modern ve verimli idarelerini ve organizasyonlarını geliştirmede yardımcı olmayı amaçlamaktadır. Topluluk Müktesebatı, bütün Üye Ülkelerin uyması zorunlu olan ortak hak ve zorunluluklar yapısıdır.

Eşleştirme, Faydalanıcı Ülkelerdeki İdari makamlar ve yarı kamu kuruluşları için Üye Devletlerdeki ortaklarıyla birlikte çalışmanın çerçevesini sağlamaktadır. Topluluk Müktesebatının belirli bir kısmının aktarılması, yürütülmesi ve uygulanmasını hedefleyen bir projeyi ortaklaşa geliştirir ve yürütürler.

#### Yüzme Suyu Direktifi 2006/7/EC

76/160/EEC Direktifini yürürlükten kaldıran ve yüzme suyu kalitesinin yönetimi hakkındaki yeni AB Direktifi olan 2006/7/EC 15 Şubat 2006 tarihinde yayımlanmıştır. AB direktifinin uygulanması için Üye Ülkelere 31 Aralık 2014 tarihine kadar süre tanınmıştır. 24 Mart 2008 tarihi itibarıyla de Üye Ülkeler Direktifin uyumuna yönelik kanunları, yönetmelikleri ve idari hükümleri yürürlüğe koymuşlardır.

2006/7/EC Direktifinin amacı, yüzme suyu kalitesinin yönetimi için altı ana prensibe dayanan genel bir strateji oluşturmaktır:

Intestinal enterococci ve Escherichia coli izleme sonuçlarını esas alan, yüzücülere yönelik mikrobiyolojik risklere ve sezona dayalı yüzme suyu izlemesi,

1. Yüzücüleri korumak ve bilgilendirmek üzere, birden fazla yıl esas alınarak yüzme suyu kalitesinin belirlenmesi,
2. Kirliliğin niteliklerinin, halk sağlığına tehdit oluşturan unsurların ve uygulanacak yönetim önlemlerinin belirlenmesi için yüzme suyu profillerinin oluşturulması,
3. Yüzücülerin sağlığı için risk oluşturabilecek beklenmeyen durumlar meydana geldiğinde, özellikle Siyanobakteri kirliliği durumunda, istisnai önlemlerin alınması,
4. Bir nehir havzası birden çok ülke toprağı üzerinde uzayıp gidiyor ise, sınırı aşan sular için bilgi alışverişinde bulunmak ve ortak hareket etmek,
5. Halkın bilgilendirilmesini ve su kalitesi yönetimine katılımını sağlamak, halka doğru tavsiyelerde bulunmak için yüzme suyu kalitesi hakkında yeterli bilgi vermek.

## Proje

Projenin temel amacı yeni yüzme suyu Direktifi (2006/7/EC) nin uyumlaştırılarak ulusal mevzuata aktarılması ve bu yeni direktif doğrultusunda Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun yüzme suyu izleme sisteminin güçlendirilmesidir.

Proje geniş anlamda halk sağlığı risklerinin azaltılmasına katkıda bulunmayı, yüzme suyu konusunda kurum ve kuruluşlar arasında veri paylaşımını, işbirliğini ve koordinasyonu sağlamayı amaçlamaktadır.

Proje 6 hedef üzerine kurulmuştur.

**Hedef 1:** Yeni yüzme suyu direktifi 2006/7/EC nin uyumlaştırılması.

**Hedef 2:** Yüzme suyunun sınıflandırılması ve kalite değerlendirmesine yönelik 76/160/EEC direktifinden 2006/7/EC Direktifine geçişin aşamalı olarak pilot uygulamalarla başlatılması, daha sonra bu uygulamaların ülke genelinde tüm yüzme alanlarına yaygınlaştırılması.

**Hedef 3:** Yüzme suyu profilleri ilk olarak pilot illerin seçili alanlarında başlatılması, daha sonra aşamalı olarak tüm yüzme alanlarına yaygınlaştırılması.

**Hedef 4:** Yüzme suyu kalite veri setleri oluşturulması.

**Hedef 5:** Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu yüzme suyu kalitesini izleme sisteminin geliştirilmesi.

**Hedef 6:** Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Halk Sağlığı Laboratuvarlarının teknik kapasitesinin yeni yüzme suyu direktifi doğrultusunda analizleri gerçekleştirmesine yönelik olarak güçlendirilmesi.

## Bu rehber kitap ile ilgili kısa bilgi

Bu rehber kitap 6. Hedef kapsamında Türkiye Halk Sağlığı Kurumunun Halk Sağlığı Laboratuvarlarının yeni yüzme suyu direktifi 2006/7/EC gereklilikleri doğrultusunda yüzme suyu analizlerini gerçekleştirme teknik destek sağlamak amacıyla hazırlanmıştır.

Bu dokümanın hazırlanmasında ve redaksiyonunda yer alan Fransız ve İtalyan uzmanlar aşağıdaki gibidir:

Veneto Bölgesi Çevresel Önleme ve Koruma Ajansından (ARPAV) Dr. Emilia Aimo, Fransız Akreditasyon Komitesinden Üst Düzey Danışman Dr. Bernard Hugues, Fransız Gıda, Çevre ve Çalışma Sağlığı Güvenliği Ulusal Ajansından (ANSES) Dr. Benoit Gassiloud, ANSES'ten Christophe Rsoin, ARPAV'dan Teknik Uzman Gianluca Girardi.

Bu dokümanın redaksiyonunda yer alan Türk uzmanlar aşağıdaki gibidir:

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Halk Sağlığı Laboratuvarları Daire Başkanlığı; Daire Başkanı Dr. Edibe Nurzen Bozkurt, Kimyager Nesrin Gevrek, Gıda Yük. Müh. Zehra Baloğlu, Ziraat Yük. Müh. Oya Poyrazoğlu, Gıda Müh. Göktuğ Bayram, İzmir Halk Sağlığı Laboratuvarı Gıda Yük. Müh. Ayperi Yüce.

## FOREWORD

### **Alignment in bathing water monitoring, European Union Twinning Project**

**TR/10/IB/EN/02**

**This is a twinning partnership between France, Italy and Turkey.**

### **The Project in a Nutshell**

#### **Twinning**

Twinning, the principal instrument for pre-accession assistance for Institution Building, aims to help candidate countries in their development of modern and efficient administrations and organisations, with the structures, human resources and management skills needed to implement the Acquis Communautaire to the same standards as Member States (MS). The Acquis Communautaire is the body of common rights and obligations which bind all the Member States.

Twinning provides the framework for administrations and semi-public organisations in the beneficiary countries (BC) to work with their counterparts in Member States. They jointly develop and implement a project that targets the transposition, enforcement and implementation of a specific part of the Acquis Communautaire.

#### **The Bathing Water Directive 2006/7/EC**

The second and the new European Directive 2006/7/EC concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC was published on 15 February 2006. A period until 31 December 2014 was given to the Member States for the implementation of it. However the Member States have brought into force the laws, regulations and administrative provisions in order to comply with this Directive by 24 March 2008.

The objective of the 2006/7/EC Directive is to introduce a global strategy for the management of bathing water quality, which lies on six main principles:

1. Monitoring of bathing water, adapted to season and to the microbiological risk for the bathers, based on the results of the monitoring of intestinal Enterococci and Escherichia coli,
2. Determining bathing water quality, on a pluri-annual basis, to protect and inform bathers,
3. Establishing bathing water profiles, to determine the nature of the pollution, the threat to public health and the management measures to put into place,
4. Adopting exceptional measures when unexpected situations occur, representing a risk to bather's health, especially in the case of pollution by cyanobacteria,
5. Exchanging information and taking joint action for transboundary waters, if a river basin extends over several territories,
6. Enabling the public to obtain information and to participate in water quality management and ensuring that adequate information on bathing water quality is disseminated in order to give proper advice to the population.

## The Project

The main purpose of the project is to transpose the new bathing water Directive 2006/7/EC into the Turkish National legislation and strengthening the bathing water quality monitoring system of Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey within the framework of the new Directive.

In the broader sense the project aims to contribute to the reduction of public health risks and to ensure coordination, cooperation and data sharing between institutions and organisations in bathing waters.

The project was established on the 6 main target.

**Result 1:** The alignment of the new bathing water Directive 2006/7/EC will be done.

**Result 2:** Transition from 76/160/EEC to 2006/7/EC Directive regarding the classification and quality assessment of bathing water will be gradually ensured starting with the pilot applications and then disseminating to the whole bathing areas.

**Result 3:** The bathing water profiles will be gradually established starting first in the selected areas of the pilot Provinces and then disseminating to the whole bathing areas.

**Result 4:** Sets of bathing water quality data will be compiled.

**Result 5:** The bathing water quality monitoring system of the Ministry of Health, Public Health Institution of Turkey will be improved

**Result 6:** The technical capacity of the Public Health Institution of Turkey, Public Health laboratories to perform analysis according to the new bathing water directive will be improved.

## This Guidance Booklet in Short

This Guidance Booklet was prepared within the scope of Result 6 to provide technical support to the Public Health laboratories of the Public Health Institution of Turkey to analyse the bathing water according to the requirements of the new bathing water Directive 2006/7/EC.

The following French and Italian experts have participated to the preparation and redaction of this document: Dr Emilia Aimo from the Veneto Regional Environmental Prevention and Protection Agency, (ARPAV), Dr Bernard Hughes, Senior Adviser at the Comité Français d'Accreditation (COFRAC) , Dr Benoit Gassiloud, from the French Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), Dr Christophe Rosin, from ANSES, Gianluca Girardi, technical expert from ARPAV

The following Turkish experts have participated to the redaction of this document:

Public Health Institution of Turkey, Public Health Laboratories Department; Department Head Dr. Edibe Nurzen Bozkurt, Chemist Nesrin Gevrek, Food Eng. Zehra Baloğlu, Agricultural Eng. (M.S.) Oya Poyrazoğlu, Food Eng. Gökтуđ Bayram, İzmir Public Health Laboratories Food Eng. (M.S.) Ayperı Yüce.

## 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 olursa, bu sular kullanılırken; belli başlı risklerin saptanması ve bu suların yol açtığı kimi risklerin değerlendirilmesi gerekmektedir.

### **Suya dayalı faaliyetlerin yapıldığı alanlar özellikle 2 kategoriye ayrılır:**

Bunlardan biri mikrobiyolojik kalitenin sağlanması için suyun arıtıldığı ve özellikle dezenfekte edildiği havuzlardır; diğer yandan ise kimi zaman halkın ağırlanması için özel bir düzenlemeye konu olan ancak içlerindeki suyun arıtılmamış olduğu doğal alanlardır. Doğal yüzme alanları, dere suları veya evcil ya da vahşi hayvanların dışkıları gibi noktasal veya geçici kirlilik kaynakları tarafından, bireysel veya sanayi kökenli olarak az çok arıtılmış atık sular tarafından, kirletilebilmiş olabilir.

Bu kirliliklere bağlı olan riskler temelde mikrobiyolojiktir, yani suda mikro-organizmaların varlığına bağlıdır. Bu bahsi geçenler, yani bakteri ve virüsler, yutma veya deri ve mukoza ile doğrudan temas sonrasında, gastro-enterit veya solunum yolu hastalıkları ile cilt hastalıkları gibi hastalıklara neden olabilirler. Yüzme suyunun kimyasal kalitesi genellikle durumdur. Yalnızca isitinsai durumlar haricinde, (örneğin kazara meydana gelen akıntılarla oluşan kirlilik gibi) yüzme suyunun kullanımı sırasında sağlık açısından bir risk içermez.

#### ***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 RİSKLER**

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 dönemli riskler su ile doğrudan temasa bağlıdır.
- Dolayısıyla bu risklere karşı korunmanın 24 saat/24 saat, 365 gün/ 365 gün sürekli olması gerektiğini hatırlatmaya gerek yoktur.
- Orta ve uzun vadeli riskler ise bir yıl veya daha fazla bir sürede aylar boyunca yinelenir şekilde su ile teması gerektirir.

## **2. YÜZME SULARIYLA İLGİLİ OLARAK DİKKATE ALINMASI GEREKEN RİSKLER**

- 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 (*Neogleria 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.

## 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 %80'ini 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. Analizlerin Amaçları

Analizlerin amaçları; sonuçların miktarsal standartlara uygun olmasının sağlanmasıdır.

#### 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.

**Genellikle numuneler noktasaldır, belirli bir alana ilişkin olarak tesadüfi veya sistemli olarak alınabilirler.**

Alanda yapılan bütün analizlerin sonuçları analiz bülteni üzerine rapor edilmelidir.

Numune alım operasyonu analiz edilecek olan suyun kontaminasyon kaynağı olmamalıdır.

### **1.3. Alan Üzerinde Numunelere Yapılacak İşlemler**

Mikrobiyoloji için, biyosid ürünlerinin nötralize edilmesi zorunludur: bakiye klor, klor biyoksit veya ozonun.

Nötralizasyon reaktifleri sterilizasyondan önce şişelere konmalıdır.

Mineralli kirleticiler için birçok işlem öngörülmektedir: çözünemez formlardan çözünebilir formları ayırmak için filtreleme, bunların çökmesini önlemek için asitleme veya kimi durumlarda uçuculuklarını azaltmak için alkalikleme.

Numunelerin filtrelenmesine ilişkin olarak, membranın katkısını gözardı edilebilmek için numunenin en az 150 ml'de filtrelenmesi zorunludur.

Asit ve bazlarla ilişkili olarak, bunlar analiz ile uyumlu olacak şekilde saf olmalıdırlar.

Bununla birlikte kimi öğeler alan üzerinde dozlanmalıdır: serbest ve toplam klor, klor biyoksit, ozon ve aynı zamanda ferrik demir.

Bakiye oksitleyicilerin elimine edilmesi yalnızca mikrobiyolojik analiz için gerekli değildir, oksitlere bağlı sekonder ürünlerin analizi için de zorunludur: klor, ozon, klor biyoksit.

Dikkat: Oksitleyicilere, özellikle de oksitleyicilerin sekonder reaksiyonlarına ilişkin olarak, eklenecek olan reaktifler farklı olabilir. Bu nedenle numuneyi alan kişinin yapılacak analizlerin neler olduğunu bilmesi zorunludur. Dikkat edilmelidir ki, kimi reaktiflerin kendileri enterferan olabilirler, bu nitroze bileşenlerdeki klor tarafından oluşmuş kloropisrini parçalayan kloru nötralize etmek için kullanılan sulfidlerde söz konusudur.

### **1.4. Numune Alım Yeri**

Yüzme sularında, numune alım yeri son derece önemlidir. Örneğin 2 zit alan üzerinden yapılmış olan numune alımlarında aynı sonuçları elde edilmeyebilir. Genel itibarıyla, kıyının kalitesini ve yüzeyden 30 cm derinliğini bilmek gereklidir. Her halükarda, numunenin teyit edilmek üzere araştırılanın temsilcisi olması gereklidir.

### **1.5. Numune Şişelerinin Önemi**

**Şişeleme sırasında 3 etken göz önünde bulundurulmalıdır, bunlar:**

- şişenin cinsi;
- şişenin ağzının kapatılma biçimi;
- şişe tekrardan kullanılabilen bir şişe ise yıkanma biçimi.

**Materyal seçimi için aşağıdakilerin dikkate alınması gereklidir:**

- Analiz edilecek suyun kalitesi üzerine materyalin etkisi: kirlilikler veya kayıplar;
- Dozu ayarlanacak öğeler: ışığa karşı hassasiyet, emilebilirlik, uçuculuk;
- Tek seferlik kullanma seçeneği, dolayısıyla fiyatı.



**Genellikle göz önünde bulunduranlar:**

**Belli başlı mineral elementlerin dozlarının ayarlanması için ya polietilenden ya da laboratuvarında kullanılan özel camdan şişeler kullanılacaktır:**

- Eser mineral elementlerin dozlarının ayarlanması için ya polietilen ya da borosilikatlı cam kullanılır, ancak elbette bor eser elementlerinin dozlarının ayarlanmasında borosilikatlı cam kullanılmaz;
- Eser element durumundaki organik elementlerin dozlarının ayarlanmasında ya laboratuvarında kullanılan cam kalitesinde cam kullanılır ya da metal şişeler kullanılır, plastikten yapılmış şişelerin kullanımı ise daha fazla hidrofobik elementlerin emilim yoluyla kaybına neden olabilir.
- Mikrobiyolojik analizler için, şişelerin steril olması gereklidir. En çok kullanılan materyaller şişeler için tekrardan kullanılan ve gerekse de irradiasyon yoluyla otoklavda sterilize edilen tek kullanımlık polietilen camdır.

### **1.6. Numunelerin Saklanması**

Burada amaç numunelerin laboratuvara götürülmek veya laboratuvarında herhangi bir bilgi kaybı olmaksızın analizlerin programlanması için numunelerin saklanmasıdır.

Burada bilinmeyen nokta, analiz sonuçlarının yorumlanması bakımından bir risk olmaksızın şişelerin ne kadar süre boyunca saklanabileceğini bilmektedir.

Burada kayıplar, çeper üzerinde emilim, çökme, uçuculuk ya da fiziko-kimyasal ya da biyolojik bozulma sonucu meydana gelmektedir.

**Emilim veya çökme-aynı anda çökme şunlara dayanmaktadır:**

- dozu ayarlanacak olan elementlere ve analiz edilecek suda mevcut bulunan diğer elementlere;
- şişenin kendisine veya özellikle materyaline;
- dozu ayarlanacak olan elementin konsantrasyonuna;
- depolama ısısına;
- numunelerin pH'ına;
- Saklanacak olan suyun redoks potansiyeline.

**Uçuculuk ise aşağıdakilere dayanmaktadır:**

- Materyale, şişeye ve şişenin kapatılış biçimine;
- Dozu ayarlanmış olan elemente;
- Her halükarda 2 etkenin dikkate alınması gerekmektedir; pH ve redoks potansiyeli.
- Numuneleri saklayabilmek için alan üzerinde çeşitli işlemlerin yapılması zorunludur.

### **1.7. Sahada Numunelere Uygulanan İşlemler**

Sahada yapılan işlemler kimi bilgilerin tutulmasını hedeflemektedir.

**Bu işlemlerin amacı aşağıdakilerin önlenmesidir :**

- emilim;
- çökeltme-aynı anda çökme ;
- kimi mineral türlerin uçuculuğu ;
- hidroliz ;
- biyosid etkisi ;
- kimi oksidanlar ile ;klor, ozon, ikincil reaksiyonlar ;

Doz ayarlaması yapılacak her bir element için, laboratuvarda elde edilen analiz sonuçlarının numune alımı sırasında suda bulunanlara denk gelmesi bakımından bu noktalar dikkate alınmalıdır.

Bu işlemlere rağmen, kimi analiz süreleri son derece kısadır.

**Bu süreler aşağıdakilere bağlıdır:**

- Doz ayarlaması yapılacak olan elemente ;
- Doz ayarlaması yapılacak olan elementin konsantrasyonuna ;
- Analiz edilecek olan suyun mineral, organik, yüzeyde asılı maddeler yüküne ;
- pH'ına;
- Depolama ısısına ve özellikle ışık gibi depolama koşullarına.

Kimi durumlarda tüm bu işlemlere rağmen element laboratuvarda dozlanamaz.

Gerçekten de değerlendirilecek numune üzerinde sahada yapılan daha az netlikteki bir dozaj, laboratuvarda yapılan bir dozaja göre çok daha iyi sonuçlar verebilir;

Bu örneğin klor, çözülmüş oksijenin dozajı için söz konusudur.

## 1.8. Sahada Yapılması Zorunlu Olan Analizler

**Bu analizler şunları içermektedir;**

- Suyun ısısı;
- Görünüm;
- Koku;
- pH;
- çözülmüş oksijen;
- biyosid olarak kullanılan çökelti oksidanlar (rezidual oksidanlar);
- serbest karbon gazı.

**Bu ön-işlemler zorunlu olarak sahada gerçekleştirilmektedir:**

- Numunelerin asitleşmesi;
- Numunelerin filtrelemesi;
- Alkalileştirme;
- Yakalama: örneğin çözülmüş oksijen için.

Kimi durumlarda özel etütler için kimi dozlamalar saha üzerinde yapılabilir.

Suyun agresifliği veya iletkenliği için geçerli olup, alkalimetrik ölçüm ve tam alkalimetri ölçüm, hidrometrik ölçüm ve bulanıklık alan üzerinde belirlenmelidir.

## 1.9. 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 verdiği için 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 adı soyadı;
- Numune alım yerinin tanımı (adresi veya referans kodu);
- Numune alım yeri üzerindeki numune alım noktasının ayrıntılı tanımı;
- Numune alım noktasının özellikleri;
- Numune başına kullanılan numune kabı 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, vb.).

## **Numune Alım Modelleri**

### ***Numune alım yeri***

- Numune alımları yüzme alanı sınırları içerisinde yapılmalıdır. Numune alımından sorumlu kişi tıpkı bir yüzücü gibi beline 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 ön gördüğü noktalar referans alınarak analiz edilecek parametreye göre seçilir.

### ***Alanda yapılan ölçümler***

- Numune alımından sorumlu kişi yüzme alanının kirli olması halinde alanda aşağıdaki 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 görünüşlerinin 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 numune kabul, 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 İşlemler**

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.



## 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

#### 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. Klor karşı çok hassastırlar. Litre başına 0,2 oranında serbest klor konsantrasyonu ile inaktif hale gelirler. Klora karşı 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 konular;
- 36°C ± 2°C ve 44°C ± 1°C sıcaklıkta 21saat ± 3saat ve 44saat ± 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 ± 3saat ve 44saat ± 4saat içerisinde 36°C ± 2°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

#### 0 Değişiklikler

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

#### 1 Yöntem

Uygulama Alanı	Referans standart
Süspansiyon halindeki maddelerin veya istenmeyen floranın çok miktarda olduğu sular hariç bütün su çeşitleri	TS EN ISO 9308-1 (Nisan 2004) AC: Mart 2011 - Standart deney -
Muhafaza	Analizden önce muhafaza süresi
Steril cam veya polietilen numune şişeleri (dezenfekte edilmiş su için Na tiosülfatlı)	24 saat
Muhafaza sıcaklığı	
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	
Tespit Sınırı	Sonuçların ifade edilmesi
1 CFU	CFU/100ml



## 2 Güvenlik

Güvenlik ve Önlemler	İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyulması
Atıklar	Bu Kullanıma Ayrılmış Atık Kutularına Atılmaları

### 3 Prensip (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:

#### Doğrulamaya kültür ortamı ve reaktifler

- Seçici olmayan agar: (Tryptofan Soy Agar (TSA) gibi)
- Tryptofan buyyonu: Glukoronidaz aktivitesi için MUG'lu bir besiyeri
- 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 ± 3saat boyunca 36°C ± 2°C sıcaklıkta inkübe edilir. Deneyin hassasiyetini arttırmak için süre 44saat ± 4saate uzatılıp ikinci okuma işlemi gerçekleştirilir.
- Diğer petri 21saat ± 3saat boyunca 44°C ± 1°C sıcaklıkta inkübe edilir. Süre 44saat ± 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, doğrulanacak 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  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  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 petrilere tipik kolonileri doğrulanır,
- Eğer  $36^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübe edilmiş petri istenmeyen flora ile kaplanmış ise (100–150'den fazla karakteristik olmayan koloni): bu durumda, sadece  $44^{\circ}\text{C}$  sıcaklıktaki petride bulunan koloniler doğrulanır
- İleri ekimler 44saat  $\pm$  4saatlik inkübasyondan sonra yapılmaktadır. Eğer 21saat  $\pm$  3saat 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 21saat  $\pm$  2saat 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 saat  $\pm$  3saat 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:

### E.coli Analizi

- \*  $\beta$ -Glukuronidaz testi (Ayrı olarak veya birlikte aynı besiyerinde test edilebilir.)
- TSA üzerine oksidaz (-) olan kolonilerden MUG ve Triptofan içeren broth besiyer(ler)ine ekim yapılır ve  $21 \pm 3$  saat boyunca  $44 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübe edilir.
- İnkübasyonun ardından öncelikle tüp 366 nm dalga boyuna ayarlı UV lamba altında incelenir ve mavi floresan veren tüpler işaretlenir. Floresan vermeyen tüpler değerlendirmeye alınmaz.

Oksidaz	+	-	
İndol	T.edilmez	-	+
$\beta$ -Glukuronidaz testi	T.edilmez	-	+
Sonuçlar	0	Koliform	E. coli

### 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 yöntemleri
A > 100 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 Birim (kob) olarak ifade edilebilmektedir.

Sonuç aşağıdaki gibi yazılır:

<b>Toplam koliform</b>	<b>n kob/ 100ml</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>	<i>n kob/ 100ml</i>
» n = 0	0 kob/ 100ml
» 1 < n < 100	n kob/ 100ml
» n > 100	>100 kob/100 ml

veya seyreltme sonuçları

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

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

### 8 Standarta kıyasla farklılık

Standardın talimatı	Laboratuvarda 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

### 2.1.6. Analizin Maliyeti

9,00 - 42,10 € arası

## 2.2. En Muhtemel Sayı ile E.coli'nin Sayılması

### Yüzey ve Atık Sularda Escherichia Coli ve Koliform Bakterilerin Araştırılması ve Sayımı

#### 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 şekilde algılanmalıdır.

#### 2.2.2. Kapsam

*E.coli*'ler işlenmemiş doğal su içerisinde üç aya kadar yaşayabilirler. Klorla 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

##### Yüzey ve atık sularda Escherichia coli ve koliform bakterilerin araştırılması ve sayımı

#### 2.2.4. Prensiptir

- 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

##### 0 Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazılım

##### 1 Yöntem

Uygulama alanı	Referans standart
Yüzey suları, yüzme suları, atık sular, deniz suları	TS EN ISO 9308-3 (Nisan 1999):
Muhafaza	Analiz öncesi muhafaza süresi
Steril cam veya polietilen numune şişeleri	24 saat
Muhafaza sıcaklığı	
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	
Tespit Sınırı	Sonuçların ifade edilmesi
Her bir seyreltme için seyreltmeler ve ekilmiş kuyucuk sayısına göre değişken	EMS/100ml

## 2 Güvenlik

Güvenlik ve Önlemler	İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyulması
Atıklar	Bu Kullanıma Ayrılmış Atık Kutularına Atılmaları

## 3 Prensiptir (yukarı bkz.)

## 4. Materyal, kültür ortamları

### Materyal

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

### Seyrelticiler

- mikropalaklar 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.

Numunenin Kaynağı	Seyreltme Sayısı	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 <sup>4</sup> arası

### Seyreltilerin hazırlanması

#### Deniz suları

- Bir taşıyıcı üzerine yapılacak iki seyreltme için iki adet tüp konur. 1/2'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:** Mikroplak kuyucuklarının ekimi esnasında, herhangi bir kontaminasyonun engellenmesi için taşırılmamalıdır.

### İnkübasyon

- Mikroplak en az 36 saat boyunca  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  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
<b>2 seyreltme</b> 1/2, 1/20 seyreltme 64 / 32 kuyucuk	< 15 / 100 ml	> 34 659 / 100 ml

### 7 Standarta kıyasla farklılık

Standardın talimatı	Laboratuvarında gerçekleştirilen	Doğrulama
$44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyon	$44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyon	Kullanılan programın spesifik gereklilik toleransı doğrultusunda $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ oranında kesinlik elde edilmesini sağlamayan inkübasyon malzemesi

### 2.2.6. Analizin Maliyeti

10.00 - 42,10 € arası

## 2.3. En Muhtemel Sayı ile E.coli'nin Sayılması

### 2.3.1. Amaç

Yüzme suları kapsamında analiz edilecek 2 parametreden biri E.coli'dir. (2006/7/EC Direktifi)

### 2.3.2. Kapsam

Bakınız paragraf 2.2.2

### 2.3.3. Standartlar

ISO 9308-2:2002 Standardı: E.coli ve koliform bakterisi sayımı. En muhtemel sayı metodu.

### 2.3.4. Prensip

Metot en muhtemel sayı tekniğinin kullanılmasını öngörmektedir.

Metotta önceden dozlanmış Colilert 18 kanalları ile uygulanan bir teknoloji kullanılmaktadır.

Ürün, numunenin aşılması için tam bir kit biçiminde piyasada bulunmaktadır. Bu amaçla tek kullanımlık önceden dozlanmış çoklu çukurların bulunduğu plakalar kullanılmaktadır.

İnkübasyon sonrasında sonuçların okunması UV (366nm) lambası altında yapılmaktadır: çukurlar içerisinde E.coli hidronize edilmiş floresanas üreten 4 metil umbelliferin Beta D-glukuronid'e sahiptir.

Sonuçlar 100 ml'lik numune tarafından en muhtemel sayı yoluyla ifade edilmektedir.

### 2.3.5. Kalite Uygulaması: YÖNTEMİN İŞLEYİŞİ

#### 0 Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazılım

#### 1 Yöntem

Uygulama Alanı	Referans standart
Yüzey suları, yüzme suları, bakiye sular, deniz suları	TS EN ISO 9308-2: Haziran 2013
Muhafaza	Analizden önce muhafaza süresi
Camdan veya streil polietilenden şişeler	24 saat
Muhafaza sıcaklığı	
Taşına esnasında numune +4°C'de soğutulmuş, gün ışığından uzakta bulunan kaplar içerisinde muhafaza edilmektedir. Tolerans: ilk 6 saat, oda sıcaklığı 25°C'nin altında. Depolama sıcaklığı: 4°C +/- 3°C	
Tespit Sınırı	Sonuçların ifade edilmesi
Ekimi yapılmış çukur sayısına göre değişmektedir.	100ml en muhtemel sayı

#### 2 Güvenlik

Güvenlik ve Önlemler	İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyulması
Atıklar	Bu Kullanıma Ayrılmış Atık Kutularına Atılmaları

### **3 Prensiip (yukarıya bkz.)**

### **4 Materyal, kültür ortamı**

#### **Materyal**

Güncel olarak mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan materyel,

44°C +/- 1°C'de inkübatör

36 °C +/- 1°C'de inkübatör

#### **Ekipman**

Çoklu çukurlu Quanti-Tray TM plakası

Çoklu çukurlu plakları mühürlemeye yarayan mühür

366 nm'de inceleme için ultraviyole lamba

Köpük olumuşunu engelleyen steril plastikten 100ml'lik şişeler

#### **Tek kullanımlık ürünler**

COLILERT 18 : 100ml'lik numuneyi ya da onun çözeltisini incelemek için önceden dozlanmış şişeler içerisindeki dehidrate ortam.

#### **Kıyaslayıcı**

### **5 İşlem Şekli**

#### **Filtreleme**

#### **Numunenin özelliklerine göre Quanti-Tray plakasının belirlenmesi.**

Tüm sular için, analiz edilecek numunenin hacmi, numune ne numunesi olursa olsun (artılmış, artılmamış) veya bir çözelti olsun 100ml'ye eşittir. Deniz suyu için 1/10 oranında seyreltilmiş steril su gereklidir.

#### **Total koliform veya E.coli'nin varlığının veya yokluğunun araştırılması**

Aşama 1:

Köpük oluşumunu önleyici şişenin içerisine 100ml'lik numune veya çözelti ile dehidrate COLILERT konur.

Numune şişesi kapatılır ve karıştırılır.

Köpük oluşumunu önleyici çözelti içerisinde bekletilir ve ardından şişenin içindeki, çoklu çukurlu Quanti-Tray TM içerisine boşaltılır.

Quanti-Plakası mühürleyicisi ile mühürlenir.

20 dk. boyunca 44,5°C'deki ben mari içerisine plaka konur.

Quanti-Plaka mühürleyicisi ile mühürlenir.

Plaka 20 dk. boyunca 44,5°C'deki ben mari içerisine bekletilir.

18 ila 22 saat boyunca 36 +/- 2°C'de inkübe edilir.

Aşama 2 :

Kit içerisinde bulunan kıyaslayıcı ile numuneler kıyaslanarak sonuçlar okunur :

Renksiz = negatif

Sarı = Toplam koliform

Sarı + floresan = E coli



## **Total koliformlerin ve E.colinin sayılması**

Aşama 1:

100ml'lik numune veya çözeltisi ile köpük oluşumunu öncelyici şişe içerisine dehidrate COLİLERT 18 ortamı konur.

Şişe kapanır ve karıştırılır.

Aşama 2 :

Köpük oluşumunu önleyici çözelti bekletilir ve şişenin içindekiler, çoklu kanallı Quanti-Tray/200 içerisine (1'den 200'e bakteriler) veya Quanty-Trat/2000 (bakteriler 1'den 2419'a) dökülür.

Aşama 3:

Quanti-Plaka mühürleyicisi ile mühürlenir.

36 +/- 2°C'deki bir inkübatör içerisinde 18 ila 22 saat tutulur.

Aşama 4:

Kıyaslayıcıda çukurlar incelenir.

Sarı çukurlar incelenir. UV altında tutulduktan sonra eğer bu aynı çukurlar floresanlı ile E.coli mevcudiyeti ortaya çıkmış olur.

Sonuçlar :

Sarı çukurlar = Total koliform

Sarı çukurlar + floresan = E coli

Aşama 5:

Hesaplama. 51 çukurlu Quanti-Tray 200'ü kullanan plakalarda işlem çözeltilsiz yapılır.

Bu durum 100ml ile mikroorganizmaların 1'den 200'e okunmasına imkan verir.

Örneğin, çukurların sayılması 6 sarı çukur verdiyse ve 6 çukur üzerinden 5'i floresanlı ise En Muhtemel Sayı hesaplaması ve ardından kit ile sunulan başvuru tablosu veya 9308 normu tarafından verilenler şunları belirtmektedir :

- 100ml yoluyla 6 sarı çukur verdiyse ve 6 çukur üzerinden 5'i floresanlı ise, kit tarafından sunulan tabloya bakılmasının ardından en muhtemel sayı hesaplaması veya 9308-2 normu aşağıdaki veriri :
- 6 sarı çukur için En Muhtemel Sayı 6,4 ve bu 100 ml'deki Toplam Koliform için En Muhtemel Sayıdır.
- 5 floresanlı çukur için En Muhtemel Sayı 5,3 vr bu 100ml'deki E.coli için En Muhtemel Sayıdır. %95'lik güven aralığı 2,3 ile 12,3 arasındadır.

Aşama 6:

Quanti-Tray/2000 plakaları için hesaplama büyük çukurlar ve küçük çukurlardan oluşur. Bu çukurlar 100ml'de 1'den 2419'a kadar okumaya imkan verir.

Örneğin çukurların sayılması büyük çukurlar arasından 1 çukur ve küçük çukurlar arasından 2 pozitif çukur verirse, En Muhtemel Sayı Quanti-Tray/2000 tablosuna başvurulması yoluyla En Muhtemel Sayı hesaplaması 3,0 E.coli/100ml'lik bir En Muhtemel Sayısını verir.

Aşama 7:

Kalitenin kontrolü. 2 şişe 100 ml'lik steril su ile doldurulur.

Şişelerden birinin E.coli ATCC 25922 (pozitif şahit) ile kültürü yapılır.

Ardından aynı işlem P aeruginosa ATCC 10145 (negatif şahit) ile yapılır.

Kıyaslayıcıdaki numuneler kıyaslanarak sonuçlar okunur :

Renksiz = negatif

Sarı = Toplam koliform

Sarı + Floresan : E coli

Güven aralığı %95'te 0,6 ve 7,3 arasını kapsar.

## 6 Sonuçların ifadesi

Sonuçlar, « En Muhtemel Sayı/100 ml » olarak ifade edilir.

## 7 Standarta kıyasla farklılık

Standardın talimatı	Laboratuvarda gerçekleştirilen	Doğrulama
44°C ± 0.5°C arası inkübasyon	44°C ± 1°C arası inkübasyon	İnkübasyon materyali 4/-0,5°C'lik bir kesinlik elde etmeye imkan vermez.

### 2.3.6. Analizin Maliyeti

Yaklaşık 5 Euro

## 2.4. Yüzey ve Atık Sularda Bağırsak Enterokoklarının Araştırılması ve Sayımı

### 2.4.1. Amaç

Enterokokların su içerisindeki dayanıklılıkları diğer gösterge organizmalarınkinden 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

### 2.4.4. Prensip

Dehidrate kültür ortamı ihtiva eden mikropalak kuyucukları içerisine sulandırılmış numune ekilir;

44°C ± 1°C sıcaklıkta en az 36 saat inkübe edilir;

Mikropalaklar 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

### 0 Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazılım.

### 1 Yöntem

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

Güvenlik ve Önlemler	İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyulması
Atıklar	Bu Kullanıma Ayrılmış Atık Kutularına Atılmaları

### 3 Prensipten (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.

Numunenin Kaynağı	Seyreltme Sayısı	Seyreltme Sayısı/ Kuyucuk Sayısı	Ölçüm Aralığı Bakteri/100 ml
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.

#### **Açıklama 1:**

*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 öngörülmüş steril yapışkan bantla kaplanır.

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

### 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
<b>2 seyreltme</b> 1/2, 1/20 seyreltme 64 / 32 kuyucuk	< 15 / 100 ml	> 34 659 / 100 ml

### 7 Standarta kıyasla farklılık

Standardın talimatı	Laboratuvarda 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

9,00 ila 33,40 Euro

## 2.5. En Muhtemel Sayı Yöntemiyle İntestinal Enterococcilerin Sayılması

### Yüzey Sularında ve Bakiye Sularda İntestina Enterococcilerin Araştırılması ve Sayımı

#### 2.5.1. Neden Böylesi Bir Araştırma?

İçme sularında enterococcilerin direnci kendilerini özellikle suyun arıtımını değerlendirmek için öncelikli göstergeler yapan dezenfektan ajanlara dirençlerinden ötürü diğer bazen gösterge organizmalarından daha yüksektir.

Ayrıca nemini almaya karşı olan güçlü dirençleri enterococcileri, kurutulmaya ihtiyaç duyan şebekelerin onarımı aşamasında iyi bir kontrol göstergesi yapar.

#### 2.5.2. Bu Araştırmanın Amacı

Genellikle enterococciler bir dağıtım şebekesinde çoğalmazlar, enterococcilerin saptanması daha önce olmuş bir fekal kirliliğe işaret eder.

Enterococcilerin araştırılmasındaki amaç, bunların E.coli'ye kıyasla zorlu çevresel koşullara daha dirençli olmaları ve suda daha fazla kalmalarından gelmektedir.

### 2.5.3. Normlar

## Yüzey Sularında ve Bakiye Sularda İntestinal Enterococcilerin Araştırılması ve Sayımı

### 2.5.4. Prensiptir

- Dehidrate kültür ortamı içeren bir mikropalak çukuru serisinin içersine seyreltilmiş numune tekniğinin konması ile ekim yapılır;
- 36 saat boyunca 44°C ± 1°C'de inkübasyon yapılır ;
- 366 nm ultraviyole ışığı altındaki mikropların karanlıkta incelenmesi ;
- Enterococcilerin mevcudiyeti MUD hidrolizinden çıkan mavi floresanlar yoluyla belirlenir;
- Sonuçlar 100 ml'de en muhtemel sayı olarak ifade edilir.

**Enterococciler:** Mikro-organizmalar, sıvı ortamda 44°C±1°C'de aerobioz çoğalmasına ve talyum asetat ile nalidik asit mevcudiyetinde glokosidaz β-D sayesinde 4 metil-umbeliferil β-D glukosidinin hidrolize edilmesine neden olabilmektedirler.

### 2.5.5. Kalitenin Sağlanması: Metodun Prosedürü

#### 0 Değişiklik

#### 1 Metot

Uygulama alanı	Referans normu:
Yüzey suları, yüzme suları, bakiye sular, deniz suları	TS EN ISO 7889-1 (Nisan 2002)
Saklama	Analiz öncesi saklama süresi
Camdan veya steril polietilenden şişeler	24 saat
Saklama ısısı	
Taşıma sırasında : yaklaşık 10°C'de soğutulmuş araba içersinde veya soğutucu akümülatörü olan izotermik kaplar içersinde. İlk 6 saat tolerans : oda sıcaklığı (<25°C) Analize kadar laboratuvara varıştan itibaren : 5°C ± 3°C'de soğuk odalarda.	
Saptama sınırı	Sonuçların ifade edilmesi
Çözelti ve çözelti tarafından ekimi yapılan sayılara göre değişkendir.	24 saat

#### 2 Güvenlik

Önlemler ve Güvenlik	İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyulması
Atıklar	Bu Uygulamaya Ayrılmış Çöplere Atılması

#### 3 İlkeler (bkz. Yukarı)

#### 4 Materyal, kültür ortamı

##### Materyal

- Güncel olarak mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan materyaller (steril pipetler, Petri kutuları, inkübatör...)

##### Çözelti

- Mikropalak çözeltileri : DMS (MR 13-00)

##### Selektif (seçici) kültür ortamı (uygulamaya hazır sistem)

- Enterococci Mikropalağı (RID 22)

## 5 İşlem modu

### Çözeltilerin seçilmesi

Ekimi yapılacak olan çözeltilerin sayısı analiz edilecek olan numunenin kirlilik düzeyine göre değişmektedir.

Numunenin Kökeni	Çözeltilerin Sayısı	Çukurların/ Çözeltilerin Sayısı	Ölçüm Plajları Jermier/100ml 15 ila 3,4. 104
Yüzme suları Deniz suları	2	64 çukur 1/2 32 çukur 1/20	

**Dikkat :** Deniz suları için kullanılan teknik tatlı sular ve deniz suyu ile tatlı suların geçiş noktası arasındaki sular için kullanılan teknikle aynı şekildedir ancak steril demineralize su çözeltisi olarak 1/2 çözeltileri ve aşağıdaki çözeltiler için ise DMS kullanılır.

### Ekim

Ekimler L029 bölümünde 4. konumunda yapılır.

*Dikkat 1 :* Mikroplakların ekimi sırasında özellikle yer değiştirme gibi hiçbir faaliyet yapılmamalıdır.

*Dikkat 2 :* Daha az kirlendiği düşünülen diğer numunelerin analiz edilmesi sırasında bakiye suların analiz edilmesi halinde, bu numunelerin ekiminin diğer numunelerin kültür ortamına konmasından sonra yapılması zorunludur.

- İlk çözelti tüpünü 90 mm Ø 'de steril konileri bulunan çoklu kanallı pipet yardımıyla bir Petri kutusuna aktarınız ;
- Bu ilk çözeltilere denk gelen çukurların her birinin içerisine 200 µl'ı paylaşınız. (yüzey suları için 8 kanallı pipet kullanılmakta olup ; bakiye sular için 4 kanallı pipet kullanılmaktadır) ;
- Aşağıdaki çözeltilerin her biri için (1/20, 1/200, vsr.) Petri kutusunu ve steril konileri her bir çözelti arasında değiştirerek aynı şekilde işlemi uygulayınız. (çözelti için 2 tüp kullanılması halinde, bunları aynı Petri kutusunun içerisinde karıştırınız).
- Ekimden sonra mikroplak steril yapıştırıcı ile kapatılır.

*Dikkat :* Çukurların ekimi sırasında her türlü kirliliği önlemek için taşırmamaya dikkat ediniz.

### Inkübasyon

- 44°C±1°C'de en az 36 saat boyunca mikroplak inkübe edilir , floresan zaman içerisinde değişmemektedir. Inkübasyon 36 saati aşkın süre boyunca da yapılabilir (maksimum 72 saat).

*Dikkat :* Mikroplaklara uygulanan işlemlerde mikroplakların eğdirilmemesine dikkat edilir.

### Mikroplakların okunması

- Her bir mikroplak U.V. gözlem odasına yerleştirilir.  
Bir bulanıklık ve mavi floresan içeren çukurlar pozitif olarak değerlendirilir.

- Yorumlanmamış sonuçlar formlar üzerine yazılır:

Yüzme suları için E/LC/504 (2 çözelti)

Yüzey suları için E/LC/505 (4 çözelti - 24 çukur / çözelti)

Bakiye sular için E/LC/506 (6 çözelti - 16 çukur / çözelti)

### 6 Hesaplama

2 çözelti olması halinde, (1/2 - 64 çukur ve 1/20 - 32 çukur), her bir çözelti için pozitif haznelerin sayısı not edilir ve En Muhtemel Sayıyı belirlemek için mikroplaklarla birlikte verilen « **Deniz suları – yüzeydeki tatlı sular** » istatistik tablosuna başvurulur.

Sonuçlar **100 ml için En Muhtemel Sayı** olarak verilir.

2'den fazla çözeltinin ekiminin yapılması halinde, bunlara ilişkin sayıyı tanımlamak için, ard arda gelen 3 çözelti için elde edilen sayı (pozitif çukurların sayısı) not edilir.

Çözeltinin (en baskın çözeltinin) pozitif hazne içermeyen en zayıf çözeltiliye denk geleceği şekilde 3 çözelti seçilir.

<b>Örnek :</b>	1/2	16	(+)	16 üzerinde
	1/20	16	(+)	16 üzerinde
	1/200	12	(+)	16 üzerinde
	1/2000	5	(+)	16 üzerinde
	1/20000	0	(+)	16 üzerinde
	1/200000	0	(+)	16 üzerinde

1/200, 1/2000 ve 1/20000 çözeltileri alınır. Bu durumda niteliği belirten sayı : 12/5/0'dır. Hiçbir çözeltinin negatif sonuç vermemesi halinde, son 3 çözeltinin sonuçları seçilir.

<b>Örn:</b>	1/2	<b>24</b>	<b>(+)</b>	<b>24 üzerinde</b>
	1/20	18	(+)	24 üzerinde
	1/200	5	(+)	24 üzerinde
	1/2000	1	(+)	24 üzerinde

Son 3 çözelti elde edilir (1/20, 1/200, 1/2000). Bu durumda niteliksel sayı 18/5/1'dir.

En Muhtemel Sayıyı belirlemek için istatistiksel tablolar kullanılır :

Yüzey suları için « **çözelti başına 24 çukur** »

Bakiye sular için « **çözelti başına 16 çukur** »

Sonuçlar, En Muhtemel Sayı hesaplanması için elde edilen en zayıf çözeltinin **ml başına En Muhtemel Sayısı** olarak ifade edilir. Yuvarlama kuralı gereği, aşağıdaki tabloya başvurulur :

Brüt sonuçlar	Yuvarlanmışları	Nihai sonuçlar
100'den 1000'e	10luk yuvarlama yapılır	0'dan 4'e= düşük olan onluk yuvarlanır. 5'den 9'a=yukarı 10'luğa yuvarlanır.
1001'den 10 000'e	Yüzlük yuvarlama yapılır	00'dan 49'a= alt yüzlüğe yuvarlanır. 50'dan 99'a= yukarı yüzlüğe yuvarlanır.
10 001'den 100 000'e	Bine yuvarlanır	000'dan 499'a=alt binliğe yuvarlanır. 500'dan 999'a=yukarı binliğe yuvarlanır.
100 001'den 1 000 000'e	10 000'e yuvarlanır	000'dan 4999'a=alt 10 000'e yuvarlanır. 5000'den 9999'a=yukarı 10 000'e yuvarlanır.
> 1000 000	50 000'e yuvarlanır	00000'den 24999'e yuvarlanır=alt 50 000'e yuvarlanır. 25000'den 49999'e=yukarı 50 000'e yuvarlanır.

Tabloda okunmuş olan değerlerden yola çıkarak sonuçları En Muhtemel Sayı/100ml olarak ifade etmek için çarpım faktörleri :

<i>Elde edilen çözeltiler</i>	<i>Faktörler</i>
1/2 - 1/20 - 1/200	100
1/20 - 1/200 - 1/2000	1 000
1/200 - 1/2000 - 1/20000	10 000
1/2000 - 1/20000 - 1/200000	100 000

Sayımın nihai sonucu, E/LC/500 not defteri üzerine yazılır.

Tamamen artışın olmaması halinde veya haznelerin hepsi pozitif iken sonuçların ifade edilmesi.



	Eğer tüm çukurlar	Eğer tüm çukurlar +
<b>2 çözelti</b>		
Çözelti başına, 1/2, 1/20 64/32 çukur	<15%/100 ml	>34 659/100ml
<b>4 çözelti</b>		
1/2, 1/20, 1/200, 1/2000 Çözelti başına 24 çukur	<38/100ml	>3 180 000/100ml
<b>6 çözelti</b>		
1/2, 1/20...1/200000 Çözelti başına 16 çukur	<56/100ml	>670 000 000/100ml

## 7 Norma kıyasla sapma

Normun öngördüğü	Laboratuvarın gerçekleştirdiği	Gereçlendirme
44°C'den ± 0.5°C'ye inkübasyon	44°C'den ± 1°C'ye inkübasyon	100.2 spesifik programının zorunluluk toleransına göre, inkübasyon materyali ± 0.5°C'de bir zorunluluk elde etmeye imkan vermez.

### 2.5.6. Analiz Maliyeti

13,80'den 33,40 Euroya kadar

## 2.6. ENTEROLERT-E Tarafından Enterococcilerin Sayılması

ENTEROLERT-E prosedürü yüzme amaçlı sularda mevcut olan enterococci sayısını belirlemeye imkan vermektedir. ENTEROLERT E.Faescium ve E.faecalis gibi enterococci ortaya koymaya imkan verir.

### 2.6.1. Neden Bu Araştırma?

Enterococcus sudaki fekal kirliliğin bir göstergesidir. Yüzme sularında Enterococcus yoğunluğu olası gastroenteritlere bağlıdır. Rehber değerler, 35 Enterococci/100ml yoğunluğunu yüzme sularında gastroenterite neden olabilen bir yoğunluk olarak gösterirler. Kara suları için bu değer 33/100ml'dir.

### 2.6.2. Bu Araştırmanın Amacı

Bkz. paragraf 2.5.2

### 2.6.3. Normlar

Günümüzde ENTEROLERT'e denk gelen ISO normu bulunmamaktadır. Ticari ürün ise bulunmaktadır.

Bu metoda ilişkin referans ENTEROLERT kullanılan sularda Enterococci için Standart Test Metodudur: ASTM D6503-99(2009)

### 2.6.4. Prensipler

Bu deney metodu tatlı sular ve deniz sularındaki atık sularda Enterococci saptaması için basitleştirilmiş bir prosedürü kapsamaktadır (DST). ENTEROLERT metabolize olduğu zaman bir floresans nütrient göstergesini kullanmaktadır. Enterococcinin saptanması 24 saat içerisinde olabilir. Suda bu bakterinin mevcudiyeti, bir fekal kirliliği ve olası bir patojen ajanın varlığını işaret etmektedir.

### 2.6.5. Kalite Girişimi: Metot Prosedürü

#### 1 Metot

Uygulama alanı	Referans normu
Yüzey suları, Yüzme suları, Atık sular, Deniz suları.	ISO normunun olmaması
Saklama	Analiz öncesinde saklama süresi
Camdan veya steril polietilenden şişeler.	24 saat
Saklama süresi	
Taşıma sırasında, numune ışıktan uzakta +4°C'de soğutulmuş bir kap içerisinde saklanmalıdır. Tolerans: İlk 6 saatte, ortam ısısı 25°C'nin altında olmalıdır. Depolama ısısı: 5°C +/- 3°C	
Saptama sınırı	Çözümlerin ifadesi
Çözeltiler ve çözelti başına ekimi yapılan kuyu sayısına göre değişmektedir.	100 ml başına En Muhtemel Sayı MPN par 100 ml

## 2 Güvenlik

<b>Önlem ve Güvenlik</b>	İyi laboratuvar uygulamalarına uyulması
<b>Atıklar</b>	Bu kullanıma ayrılmış çöp kutularının boşaltılması

## 3 PrensiP (bkz. daha yukarı)

## 4 Kültür Ortamının Materyali

### Materyal:

41'den +/- 1°C inkübatör

### Ekipman:

Çoklu kanallı Quanti-Tray plakaları  
Otomatik mühürleyici ile termik lehimleme  
366nm'de inceleme için UV lambası  
100ml'de köpük oluşumunu engelleyici steril şişeler  
Tek kullanımlıklar  
Önceden dozlanmış çoklu çukurlu plakalar  
Steril distile edilmiş su  
Renk kıyaslayıcısı

## 5 İşlem modu

Numunenin özelliklerine göre Quanti-Tray plakalarının belirlenmesi.

Tüm sular için, analiz edilecek olan numune miktarı, numune ne olursa olsun (arıtılmış, arıtılmamış) veya ister bir çözelti olsun 100ml'ye eşittir.

Steril su ile 1/10'luk bir çözelti, deniz suyu için gereklidir.

### Enterococcilerin mevcudiyeti veya yokluğu

Aşama1:

100 ml'lik deniz suyunun toplanması  
Enterolert reaktifinin eklenmesi  
Karıştırılması  
24 saat boyunca 41'den + :-1°C'ye inkübe edilmesi

Aşama 2:

Floresanlı çukurların sayısını saymak için UV altında okuma yapılması.

### Enterococci sayımı

Aşama 1:

100ml'lik deniz suyu toplaması yapılması  
Enterolert reaktifinin eklenmesi  
Karıştırılması  
Tahmin edilen konsantrasyona göre 200 veya 2000'lik Quanti-Tray'in boşaltılması  
Quanti-Tray mühürleyicisi ile plaketin termik lehimlenmesi  
24 saat boyunca 41'den +/- 1°C'e inkübe edilmesi  
UV altında floresan çukurlarının sayılması

Aşama 2:

En Muhtemel Sayı tablosunun yarımıyla sonuçların verilmesi  
Floresan yokluğu=enterococci yokluğu  
Floresan=enterococci mevcudiyeti

Aşama 3:

Kalite kontrolü. 2 steril şişeyi steril su ile doldurunuz.  
Şişelerden birine E. faecalis ATCC 51299 enjekte ediniz (pozitif şahit).  
Ardından aynı işlemi P aeruginosa ATCC 10145 ile yapınız (negatif şahit).

## 6 Hesaplama

En Muhtemel Sayı tablosunun yardımı ile sonucu veriniz.

**Sonuçlar 100ml başına En Muhtemel Sayı olarak ifade edilir.**

## 7 Norma kıyasla sapma

Tedarikçiler için Yönerge	Laboratuvarda Uygulama	Gerekçeleştirme
41°C'de inkübasyon	41'den +/-1°C'ye inkübasyon	İnkübasyon materyali +/- 0,5°C'lik bir inkübasyona izin vermemektedir.

### 2.6.6. Analizin Maliyeti

5 Euro

## 2.7. Bağırsak Enterokoklarının Tespit ve Sayımı, Membran Filtrasyon Yöntemi (TS EN ISO 7899–2)

• Bu yöntemde Bağırsak Enterokokları: Slanetz-Bartley agar'da 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorürü formazona indirgeyerek üreyen ve Safra-Eskülin Azid Agarda, 44±1°C'de eskülini hidroliz edebilen bakterilerdir.

### 2.7.1. Neden bu Araştırma

Enterococcus suda daha önce meydana gelen kirlilik göstergesidir. Yüzme sularında Enterococcus yoğunluğu gastroenteritlere neden olabilir.

### 2.7.2. Bu Araştırmanın Amacı

E.coli' ye kıyasla çevresel koşullara daha dirençli olmaları ve suda daha uzun süre yaşayabilmeleri nedeniyle Enterokoklar araştırılmaktadır.

### 2.7.3. Normlar

TS EN ISO 7899-2 standardının gereklerine göre analiz yapılacaktır.

### 2.7.4. Metodun Prosedürü

#### 2.7.4.1. Kullanılacak Malzemeler

- İnkübatör (37 ± 1) °C ve (44±0.5) °C
- Membran Filtrasyon Sistemi
- 0.45 µ Membran Filtre
- Slanetz-Bartley Agar
- Safra Escülin Azid Agar

### 2.7.5. Numune Kabul

\* Numune kabul kriterlerine göre kabul/red edilir

- kendi sıcaklığında 6 saat, (5±3°C)'de 24 saat

- kullanılan şişe, taşıma koşulları vb.

### 2.7.6. Filtrasyon

\* Numune iyice çalkalanır,

\* Gerekliyse seyreltiler hazırlanır,

\* 100/250 ml su numunesi 0,45 µm'lik membran filtreden geçirilir ve Slanetz-Bartley agar besi yeri üzerine yerleştirilir.

### 2.7.7. İnkübasyon

44±4 saat boyunca 36±2°C sıcaklıkta inkübe edilir.

### 2.7.8. Petrilerin değerlendirilmesi

\* Merkezi veya etrafı kırmızı, mor veya pembe renkte olan bütün bombeli koloniler şüpheli Enterokok olarak kabul edilir.

- Membran filtre Safra Eskülin Azid Agar (1 saat boyunca 44°C sıcaklıkta önceden ısıtılmış) üzerine konular ve 2 saat boyunca (44±0.5)°C sıcaklıkta inkübe edilir.
- Eskülin hidrolizi nedeniyle, rengi ten renginden siyah renge kadar değişen renkler oluşturan tipik koloniler pozitif reaksiyon vermiş kabul edilir.
- Filtre edilmiş hacmin içerisindeki Fekal (intestinal) Enterokok sayısı kob olarak ifade edilir, yapılan seyreltme faktörü ile çarpılır.

### 2.7.9. Sonucun verilmesi

- Tespit edilen sayı 0 ise sonuç n=0 kob/100mL
- Tespit edilen sayı 1<n<100 ise sonuç kob/100 mL
- Sayılamayacak kadar koloni var ise sonuç >100 kob/100 mL olarak verilir.

## 3. PATOJEN ETKEN ARAŞTIRMASI

### 3.1. Salmonella Araştırması (TS EN ISO 19250:2013)

#### 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 mukozal çevre içerisinde değişime uğrayabilmektedirler. *E.coli* genellikle *Salmonella*'nın varlığını düşündürmek için iyi bir göstergedir.

#### 3.1.3. Standartlar

##### *Salmonella* Araştırması (TS EN ISO 19250:2013)

#### 3.1.4. Prensip

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

1. Seçici olmayan sıvı ortamda ön zenginleştirme

- Numune (> 100 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 fertilitate), önemli ölçüde istenmeyen flora olduğunda dahil (ön-zenginleştirme buyyonunun 50 ml'si içerisinde yaklaşık  $1.10^8$  *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 H<sub>2</sub>S üreten, laktöz 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**

#### **0 Değişiklikler**

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazılım

#### **1 Yöntem**

Uygulama alanı	Referans standart
Lağım suları hariç bütün su çeşitleri	TS ISO 6340 (Nisan 1999)
Analizden önce muhafaza süresi	Muhafaza sıcaklığı
24 saat içerisinde mümkün olduğunca çabuk analiz edilir Numune alımından sonra en fazla 24 saat	5°C ± 3°C
Tespit Sınırı	Sonuçların ifade edilmesi
	Yok / Analiz edilen hacim Var / Analiz edilen hacim

#### **2 Güvenlik**

Güvenlik ve Önlemler	İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyulması
Atıklar	Bu Kullanıma Ayrılmış Atık Kutularına Atılmaları

#### **3 Prensip ( 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 Sülfid 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 petripler 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) Petriplerine 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) petripleri 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 petripler 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 petriplerinden alınır.

√ Seçilen koloni (veya koloniler) steril Distile su içerisinde süspansiyon haline 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 besiyerlerine ekim için kullanılır. Tanımlanacak her kültür için bu işlem tekrarlanır.***

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

**Üre Agar:** Nutrient Agar üzerinde çok iyi izole edilmiş bir koloni Üre agar tüpü içerisine ekilir ve, 24 saat boyunca 36°C ± 2°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:** Nutrient Agar üzerinde çok iyi izole edilmiş bir koloni besiyerine ekilir ve besiyeri steril sıvı parafin veya yağ ile örtülür. 24 saat boyunca 36°C ± 2°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:

---

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu  
Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları  
Daire Başkanlığı Sağlık Mah.  
Adnan saygun Cad. Çankaya/Ankara

---

### 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	Laboratuvarında 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 klorla *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. Prensiptir

- Su numunesinin belli bir hacmi membran filtreden geçirilir ve membran filtre seçici besiyerine konulur;
- 36°C ± 2°C sıcaklıkta 44saat ± 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

#### **0 Değişiklikler:**

- Yöntem (uygulama alanı, muhafaza sıcaklığı ve süresi)
- İnkübasyon sıcaklığının 36°C ± 2°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

Uygulama alanı	Referans standart
Filtrelenebilir bütün su çeşitleri, özellikle havuz suları, insani tüketim amaçlı sular, sağlık kuruluşları binalarının suları ...	XP T 90-412 Haziran 2006 NF T 90-421 Ağustos 2006
Muhafaza	Analiz öncesi muhafaza süresi
Cam veya polietilen numune şişeleri	Mutlaka numunenin alındığı gün ve en kısa sürede analiz yapılır
Muhafaza sıcaklığı	
Numunenin alınmasından analiz edilmesine kadar: 5°C ± 3°C	
Tespit Sınırı	Sonuçların ifade edilmesi
CFU=Koloni oluşturan ünite	CFU/100ml

## 2.Güvenlik

Güvenlik ve Önlemler	İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyulması
Atıklar	Bu Kullanıma Ayrılmış Atık Kutularına Atılmaları

## 3 Prensipten (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:

### Doğrulamaya 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 mannitolü 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. Analizin Maliyeti

9,00 - 23,90 € arası

## 3.3. Enterovirüslerin Araştırılması

### Cam Yünü Üzerinde Konsantrasyon ve Hücresel Kültürle Tayin Yöntemi (XP T 90-451)

#### 3.3.1. Amaç

Enterovirüsler çok kısa bir inkübasyon döneminin ardından, miyokardit, menenjit, poliomyelit 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 hücresel 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 hücresele kültürle tayin yöntemi (XP T 90-451)

### 3.3.4. Prensip

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 monohidrojenofosfat 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 mikropklarda yeni üretilmiş BGM hücrelerine inokülasyonu;
- 5 gün boyunca  $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübasyondan sonra (1inci pasaj), her bir besiyerinin içeriğinden bir fraksiyonun ardışık şekilde iki pasajının yeni mikropklaklar üzerinde gerçekleştirilmesi;
- 5 günlük 3.üncü inkübasyondan sonra doğrulanmış kuyucukların sayımı.

#### İzole edilmiş viral partiküllerin karakterizasyonu

- $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  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 metanolle 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

Uygulama alanı	Referans standart
Bütün su çeşitleri. Analiz edilebilen hacimler: - Tüketim suyu: $\geq 100$ l - Yüzey suları ve deniz suyu: 10 l'den 100 l'ye - Atık su: 5 l'den 20 l'ye	XP T 90-451: Mart 1996 (T90-451) - Standart deney -
Muhafaza	Analizden önce muhafaza süresi
- Steril polietilenli bidon (Jerrican) (dezenfekte edilmiş su için Na tiosülfat ile) - Alanda (in situ) numune alma	24 saat Şişelenmiş sular için 12 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
Ekilen besiyeri sayısına göre	MPNCU / l (MPNCU veya EMSÜS: most probable number of cytopathic units:: en muhtemel sitopatik ünite sayısı)

## 2 Güvenlik

Güvenlik ve Önlemler	İyi Laboratuvar Uygulamalarına Uyulması
Atıklar	Bu Kullanıma Ayrılmış Atık Kutularına Atılmaları

## 3 Prensipten (yukarıya bkz.)

## 4 Materyal, reaktifler

### 4.1. Virüslerin Cam Yünü Üzerinde Konsantre Edilmeleri İçin Materyal ve Reaktifler

*Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan materyal:*

#### Özellikle:

- Rantigny 725 referanslı ve Saint-Gobain-Isover-Orgel: BP 19 – 60290 Rantigny tarafından dağıtım 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 (sığırcı 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 İçin Materyal ve Reaktifler

*Mikrobiyoloji laboratuvarında sıklıkla kullanılan materyal:*

### **Özellikle:**

- İnvart (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/cm<sup>3</sup> 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 - Virüslerin Yıkanması****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  $7,2 \pm 0,1$  pH oranıyla nötralize edilir

**5.1.5. İkincil Konsantrasyon**

- Manyetik karıştırıcı üzerinde 3 mol/l HCl ile  $3,5 \pm 0,1$  pH oranıyla 1.inci konsantre asitlenir.
- Bir saat boyunca ortam sıcaklığında tepkimeye bırakılır.
- 45 dakika boyunca konstre  $4^{\circ}\text{C}$  35 000  $\text{ms}^{-2}$  '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,  $7,2 \pm 0,1$  oranına getirilir.

**5.1.6. Bakteri ve Mantarların Dekontaminasyonu**

- 2 ml'lik steril bovine serum (dana serumu) solüsyonu ile  $0,2 \mu\text{m}$ '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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $25 \mu\text{l}$ /kuyucuk olacak şekilde mikropakanın en az 40 kuyucuğa dağıtılır;
- $175 \mu\text{l}$ /kuyucuk oranında BGM hücre süspansiyonu konsantreyi içeren kuyucuklara dağıtılır;
- Hücresel tabakanın (monolayer) durumuna göre, mikropaklar 5-8 gün boyunca  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta inkübasyona bırakılır;
- İnübasyon dönemi boyunca mikropaklar 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**

- İnkübasyondan sonra, mikroplaklar 3 kere -20° dercede dondurulup 3 kere çözündürülür;
- Her kuyucuk içeriğinin 25 µl'si steril bir şekilde yeni mikroplaklara transfer edilir;
- Kuyucukların her birine hücre süspansiyonundan 175µl dağıtılır;
- 7 gün boyunca 37°C±1°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılır;
- Mikroplaklar 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 sayıSıcaklıkna 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 yıkanılır;
- 20 dakika boyunca hemalum banyosuna batırılıp daha sonra durulanılır;
- pembe renk elde edilene kadar klorhidrik alkol ile farklılaştırılırlar;
- musluk suyuyla 4 kere durulanılır ve preparat mavi renk olana kadar yaklaşık 30 dakika boyunca ortam sıcaklığında bırakılırlar;
- 10 dakika boyunca eozin banyosuna batırılır ve hızlıca distile su içerisinde yıkanılır;
- 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 hücre kültürleri üzerindeki sitopatik etkisi, hücreler düzeyinde çökürdeği 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:**

\*  $MPNCU2 \geq MPNCU1$

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

\*  $MPNCU1 \geq MPNCU2$

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

## 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 artımların da uygulanması gerekir.

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

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

Bu alternatif metotlar ayrıca yukarıda belirtildiği üzere reçine üzerinde bir ön konsantrasyon ile, nitrik ortamda transferi takiben APDC-DDDC ve freon kullanılarak şelasyon-ekstraksiyon metotları şeklindedir.

### 2. TAYİN EDİLECEK ELEMENTLER

#### 2.1. İyon Kromatografisi ile Dozaj

Çözünmüş florür, klorür, nitrit, ortofosfat, bromür, nitrat ve sülfatın sıvı fazlı iyon kromatografisi ile tayini (ISO 10 304-1: Az kontamine olmuş 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. Bu majör anyonların araştırılması suların kimyasal bileşenlerine ilişkin bilgiler bakımından önemli verilerin toplanmasını amaçlamaktadır.

##### 2.1.2. Kapsam

Halk sağlığı açısından bu anyonların mevcudiyeti sakınca teşkil etmemektedir.

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)

##### 2.1.3.1 Prensiy

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

##### 2.1.3.2 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 süzütüsünün ilk kısmı atılır. Eğer nitrit tayini yapılacak ise şişeler tamamen doldurulur.

### 2.1.3.3. 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.

### 2.1.3.4. 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.

### 2.1.3.5. Analiz

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

### 2.1.3.6. Bileşenlerin Tanımlanması

İyonlar kolonda alıkonma sürelerine göre tanımlanır.

### Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar mg/L olarak ifade edilir.

## 2.1.4. Kalite İşlemi: Yöntemin İşleyişi

### 0 Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

### 1 Yöntem

Uygulama alanı	Referans standartları
Tüm su türleri	- ISO 10304-1, TS EN ISO 10304-1
Muhafaza	Analizden önce muhafaza süresi
- PE şişeler (flakonlar) - Göz açıklığı 0.45 µm olan membran filtreden süzülür.	- Numune alımından sonra mümkün olan en kısa sürede analiz 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	Sonuçların ifade edilmesi
0.05 ile 0.1 mg/L elemanlara göre	mg/L

## 2. Güvenlik

<b>Güvenlik Önlemleri</b>	Standart çözeltileri ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
<b>Atıklar</b>	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayırışım reaktifleri özel bir işlemle imha edilmelidir.

### 3 Amaç (bkz. yukarı)

### 4 Materyal, reaktifler

#### 4.1. Araç ve Gereçler

- Pipetler, mikropipetler, etüv, desikatör, balon joje, 0.45 µm' lik membran filitre, polietilen ve PTFE'den yapılmış numune alma şişeleri
- İlekenlik dedektörlü iyon kromatografi cihazı
- Ayırma kolonu, önkolon

#### 4.2. 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 çözeltilerden 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

Standartın Öngördükleri	Laboratuvarın Yaptığı Değişiklikler	Doğrulama
	Yok	

#### 2.1.5. Analiz Maliyeti

30 € ile 60 € arasında

## 2.2. Fenol İndeksinin Tayini

TS 6227 ISO 6439

### 2.2.1. Amaç

Bu analiz sanayi veya evsel kökenli bazı kirleticilere bağlı katkıların fenol göstergeleri maddelerinin araştırılmasına imkan verir.

Bu araştırma bu miktarların yüzme suları bakımından bir risk oluşturmadığını teyit etmeyi de amaçlar.

### 2.2.2. Kapsam

Başka kirlilik parametrelerine bağlı fenol indeksi içeriğinin ölçümü (Kimyasal Oksijen İhtiyacı-COD, Toplam Kjeldahl Azotu-TKN, Askıdaki Katı Madde-AKM) doğal suların farklı kontaminasyon kaynaklarını belirlemeyi hedefler.

### 2.2.3. Standartlar

Fenol indeksinin tayini TS 6227 ISO 6439

#### 2.2.3.1. Prensiptir

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.

#### 2.2.3.2. 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.

#### 2.2.3.3. Kalibrasyon ve Doğrulama

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

#### 2.2.3.4. 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 ferrosiyanür, 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.

### 2.2.3.5. Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar mg/L olarak ifade edilmektedir.

## 2.2.4. Kalite İşlemi: Yöntemin İşleyişi

### 0 Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

### 1 Yöntem

Uygulama alanı	Referans standartları
Bu yöntem, 0,5-0,025 mg/L aralığında fenol tayininde kullanılmaktadır.	- TS 6227 ISO 6439
Muhafaza	Analizden önce muhafaza süresi
-Cam şişede muhafaza edilmelidir. -1g/L bakır sülfat ilave edilir ve asitlik pH < 4 olacak şekilde ayarlanır.	-4- 6 °C arasındaki sıcaklıkta muhafaza edilir. -Numune alımından sonra mümkün olan en kısa sürede analiz edilir.
Muhafaza sıcaklığı	
Numuneler soğuk akümülatörlü izoterm konteynırlarla veya $\leq 10^{\circ}\text{C}$ 'deki soğutulmuş araçlarla taşınır. Laboratuvara getirildikten sonra analiz edilene kadar $4^{\circ}\text{C}$ - $6^{\circ}\text{C}$ arasındaki sıcaklıktaki soğuk odada muhafaza edilir.	
Ölçüm sınırı	Sonuçların ifade edilmesi
0.025 mg/L Fenol	mg/L

### 2 Güvenlik

<b>Güvenlik Önlemleri</b>	Standart çözeltiler ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
<b>Atıklar</b>	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işlemlerle imha edilmelidir.

### 3 Prensiip (Bkz. yukarı)

### 4 Malzeme, reaktifler

#### 4.1. Araç ve Gereçler

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

#### Reaktifler

Sodyum klorür

Kloroform

Minimum %85'lik fosforik asit

100 g/l'de bakır sülfat solüsyonu

Tampon: solüsyon:

34 g amonyak klorür

200g sodyum tartrat sodyum ve potasyum

15 ml hidroksik amonyak

700 ml suda çözeltir, 1000ml'de tamamlanır ve hidroksit amonyum ile 9.5 pH da doğrulandır.

Ferrosiyanür potasyum, 20 g/l solüsyonda

Amino-4 antiprin, 20g/l solüsyon

### 5 İşletme modu

500 ml numune çözeltirler ardından 1.5 pH ile ayarlanır ve 1/l bakır sülfat eklenir;

Çözeltiye 10 ml pH 9.5 tampon eklenir.

Amonyak-4 antiprin solüsyonlu 2ml eklenir.

2ml'lik ferrisiyanür potasyumlu çözelti eklenir.

5 dk boyunca renklenme beklenir

5ml, 3ml ve 2ml kloroform özütlenir.

0.025mg/l'den 0.5ml/l fenollü bir kalibrasyon dizisi çıkarılır.

Bir kör deney yapılır.

Kalibrasyon dizisi yapılır, kör deney yapılır ve numuneler üzerine 460 nm'lik spektrometri yoluyla ölçümler yapılır.

### 6 Kontrol

Boş bir deneme yapılır.

Damıtma ile fenollerin düzgün alımının kontrolü sağlanır.

### 7 Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar mg/L fenol olarak ifade edilir.

### 8 Standartlara göre ayırım

Standardın Öngördükleri	Laboratuvarın Yaptığı Değişiklikler	Doğrulama
	Yok	

### 2.2.5. Analiz Maliyeti

10 € ile 20 € arası



## 2.3. Civa Tayini

### 2.3.1. Amaç

Sulardaki varlığı 0.1 µg/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 sulu ortamda organizmalarda ve besin zinciri boyunca birikir.

### 2.3.2. Kapsam

Bu metot, sularda bulunan civanın tayinini kapsar.

### 2.3.3. Standartlar

**Soğuk Buhar ile Atomik Emilim Spektrofotometresi**

**EN ISO 12846**

**Ölçüm Sınırı:** 0,1 µg/L

**Dalga Boyu:** 253,7 nm.

**İndüksiyon akımı ile plazmanın birleştirilmesi - Kütle Spektrometresi (ICP MS)**

**Norme:** EN ISO 17294-1 EN ISO 17294-2 ve US EPA 200.8

**Miktar belirleme sınırı:** 0,1 µg/L İzotop 201, 200, 202

### *Prensip*

Civanın uçuculuğu ve diğer türlerle bağlanması arasındaki ilişkisi numune alımı esnasında birçok tedbir alınmasını gerekli kılar. Mevcut durumda kullanılan çalışma metotları ise, materyalin hazırlanmasının (reaktiflerin artılması, materyalin temizlenmesi, numune alımı) ve analitik tekniklerin kontrolü halinde net ve güvenilir sonuçları elde etmeye imkan verir.

Civa bileşenlerini tam olarak ayırştırmak için, bir parçalama prosedürü gereklidir. Düşük ölçekli bir konsantrasyon içerisinde ölçüm yapmak için, reaktiflerin maksimum saflıkta olması esastır.

### ***Soğuk buhar ile atomik absorpsiyon spektrometresi***

Tek (mono) veya iki değerlikli (divalent) civa bileşenlerinin yanı sıra organo-civasa bileşen KBtO<sub>3</sub>-KBr ile oksidasyon yoluyla divalent civaya çevrilir, ardından asit ortamında klorür kalay yoluyla (II) element halindeki biçimine indirgenir. Civanın elementi ardından hareketsiz bir gaz veya civadan serbest kalmış bir hava yardımıyla solüsyona özütlenir.

Ardından civa, hızlı absorban ısıtıcısıyla serbest bırakılır (desorpsiyon 600oC) sonrasında ise atomik absorpsiyon spektrometresinde ışın demeti içerisinde 253,7nm'de ölçülen absorbans veya absorpsiyon hücreğine doğru gaz vektörü akımı içerisinde taşınır. Konsantrasyonlar bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak veya dozlanmış ekleme metodu ile hesaplanır.

Standart EN 12338'ye uygun olarak amalgam ile zenginleştirilerek kullanılabilir. Bu yöntem ile çok düşük miktarlarda yani 0.01 µg/L seviyesinde ölçüm yapılabilmektedir. Bir ya da iki değerlikli civa; kalay klorür (SnCl<sub>2</sub>) veya asidik ortamda sodyum tetra hidroborat (NaBH<sub>4</sub>) reaktifi ile metalik civa formuna indirgenir. Kapalı bir kaptaki toplanan civa oda sıcaklığındaki bir gaz akımı ile atomik absorpsiyon spektrofotometresinin absorpsiyon ölçme hücreğine gönderilir ve 253.7 nm dalga boyunda absorbansı ölçülür. Deney çözeltisinin absorbansı ile civa miktarları bilinen kalibrasyon çözeltilerinin absorbansları 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 karıştırılabilmektedir. 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.

## **Atomik Floresans Spektrofotometresi**

### **2.3.3.1. Prensi**

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 hücrede 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.

### **ICP MS: Kütle spektrofotometresi ile birleştirilmiş indüklenmiş akımlı plazma (ICP MS)**

Civanın analizi, her ne kadar bu element 62 element arasında görülmesi de, EN ISO 17294 normunda tanımlandığı üzere gerçekleştirilebilir. Gerçekte, normun yazılış tarihinde, analiz cihazları daha az performanslıydı. ISO mevcut durumda demir, titanyum ve civayı içeren bir revizyon projesi üzerinde çalışmaktadır.

Çalışma ölçeği karşılaşılan matrislere ve enterferanslara göre değişmektedir. Yüzme sularında ve nispeten daha az kirlenmiş olan sularda, uygulama sınırı 0,1 µg/l ve 1,0 µg/l arasındadır.

Endüktif birleştirmeli plazma ile kütle spektrofotometrisi yoluyla 62 elementin çok elementli dozajı aşağıdaki aşamaları kapsar:

- Elementlerin desolvasyon, atomizasyon ve iyonizasyonuna neden olan plazma yoluyla ortaya konan enerji transfer prosedürünün yüksek sıklıkla indüklendiği bir plazma içerisine analiz edilecek solüsyonun konulması;
- Entegre edilmiş bir iyonik optik ile diferansiyel pompalama yoluyla alt interfazla plazma iyonlarının ekstraksiyonu ve bir kütle spektrofotometresi yardımıyla kütle yüküne ilişkin taban üzerinden ayrıştırılması (örneğin kuadripoler spektrometre);
- Kütlelerin ayrıştırma ünitesine iyonların konulması (örneğin kuadripoler bir spektrometreye) ve genellikle sürekli diyonid elektronların çoğaltıcısına bir montaj yapılarak saptanması, ardından verilerin arıtım sistemi yoluyla iyonik bilginin kullanılması;
- Uygun kalibrasyon solüsyonları ile kalibrasyon sonrası kantitatif saptama. Sinyal yoğunluğu ile kütle konsantrasyonu arasındaki ilişki genellikle 5 büyüklük sırası içerisinde lineer olarak 1 dir.

### **İnterferanslar**

İzole olan kimi durumlarda, izobar olan ve izobar olmayan interferanslar oluşabilir. Bu bağlamdaki en önemli interferanslar uyumlu kütlelerde olmanın yanı sıra, numune matrisi tarafından ortaya konan fiziksel interferanslardır. En geniş bilgileri elde etmek için, ISO 17294-1'e başvurunuz. Bunları saptamak için aynı elementin birçok farklı izotopunu belirlemek gereklidir. Elde edilen tüm sonuçların benzer olması gereklidir. Eğer bu söz konusu değilse veya belirli bir element için interferanssız hiçbir izotop ölçülemiyorsa, matematiksel bir düzeltme yapmak gereklidir.

Referans elementinin tekniğine göre küçük sapmalar veya varyasyonların yoğunluğunu düzeltmek gereklidir. Genellikle, fiziksel ve spektral enterferansları önlemek için, çözünük madde bakımından kütle konsantrasyonu (tuz bakımından nicelik) 2g/l'yi geçmemelidir. Deniz sularının seyreltilmesi gereklidir.

İzobar elementlerine bağlı enterferanslar interferan elementin etkisi dikkate alınarak düzeltilebilir. Böylesi bir durumda, düzeltme için kullanılan izotoplar interferanssız belirlenebilir olmalı ve yeterli bir güvenilirliğe sahip olmalıdırlar. Cihazın yazılımı sıklıkla düzeltme oranları içerir. Poliatomik iyonlar plazmanın gazlı bileşenlerinin, reaktiflerin ve numune matrislerinin uyumu ile oluşur. Sularda Tungsten mevcudiyetinde civa izotopları ile interferansa girebilen WO türlerinin oluşması riski vardır. Bu nedenle, birçok izotopun takip edilmesi gereklidir (200, 201 ve 202).

Analistin ilgili araç için bu enterferansın önemini düzenli olarak teyit etmesi önerilmektedir.

Matematiksel düzeltilmeler halinde, enterferansın genişliğinin hem plazmanın ayarlanmasına (örneğin oksitlerin oluşumuna) ve genellikle numune çözeltisi ile değişen bir bileşen olan interferan elementin kütesinin konsantrasyonuna bağlı genişliğin dikkate alınması gereklidir.

Cıvanın cam üzerinden kolaylıkla absorbe edebilme ve "hafıza etkilerine" maruz kalma özelliği vardır. Bu nedenle, USEPA (200.8) tarafından tanımlanan metotta analiz materyalini arındırmak için 100 µg/L'lık bir altın solüsyonunun konulması önerilir. Numunelerin tamamının ve kalibrasyon solüsyonlarının absorpsiyon olgularını sınırlandırmak için bir altın çözeltisi (örneğin 5 µg/L) ile takviye edilmesi de mümkündür. Çapraz kontaminasyonların olmadığını teyit etmek amacıyla düzenli olarak kör numuneler kullanılmalıdır.

Matris etkilerinin sonuçlarını sınırlamak için bir iç kalibrasyona başvurmak zorunludur. Bu bir Y sistemi yardımıyla sıraya eklenebilir.

Matris solüsyonu çok önemlidir çünkü bu solüsyon, spektral enterferansları iyi bir şekilde kontrol edildiğini teyit etmeye imkan verir.

ICP-MS metodu multi-elementli mükemmel bir kapasite ile kendini gösterir. Saptama hassasiyeti birçok parametreye bağlıdır (nebülizörün akımı, yüksek frekans jeneratör kuvveti, merceğin gerilimi, merceğin gerilim modu, vsr.). Araçların optimum ayarlanması tüm elementler için aynı anda yakalanamaz.

#### **2.3.4. Numune Alımı ve Numunelerin Hazırlanması**

PE veya silikatlı camdan flakonlar (şişeler)

Kullanılan stabilizasyon uygulamaya konan analiz metoduna bağlıdır:

- %1 kloridik asit veya brom/bromat HNO<sub>3</sub> (veya muhtemelen potasyum dikromat) eklenmesi.
- ICP MS yoluyla analizlerin yapılması halinde, diğer metaller için olduğu gibi nitrik ortamda basit bir asitleştirme gerçekleştirilebilir.

#### **2.3.5. Kalibrasyon ve Doğrulama**

Uygulama alanında miktar belirleme sınırından itibaren

#### **2.3.6. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması**

Özellikle miktar belirleme sınırını entegre eden uygulama alanı ve kalibrasyon ölçeğinin yüksek değeri (5 nokta öngörülmüştür).

#### **2.3.7. Analiz**

Cihaz üzerinde analizlerin gerçekleştirilmesi modelleri.

### 2.3.8. Özet ve Sonuçların İfadesi

en µg/L Hg olarak.

### 2.3.9. Kalite Uygulaması : METODUN PROSEDÜRÜ

#### 1 Metot

Uygulama alanı	Referans normlar
Tüm su tipleri Bir iç kalibrasyonun kullanımı tavsiye edilmiştir.	EN ISO 12846 EN ISO 17852 EN OS 17294 US EPA 200.8
Muhafaza	Analizden önceki muhafaza süresi
Cam veya plastikten flakonlar ve asitleştirme (HCl veya HNO <sub>3</sub> ) Brom/Bromat eklenmesi (yalnızca ICP MS için) ve sarı rengin teyit edilmesi (serbest brom mevcudiyeti). Gerekli olduğunda bir brom/bromate solüsyonu içeriğinin eklenmesi.	1 ay maksimum 5°C±3°C'de Bir kör hava numunesinin öngörülmesi (head space) Bir kör reaktifin öngörülmesi.
Muhafaza sıcaklığı	
Taşıma sırasında: voiture réfrigérée ≤ 10°C'de soğutulmuş bir araç veya Soğuk akümülatörlü izotermik bir kab.	
Miktar belirleme sınır	Sonuçların ifade edilmesi
Metotlarad göre 0.01 ila 0.1µg/L	µg/L

#### 2 Güvenlik

<b>Güvenlik Önlemleri</b>	Standart çözeltiler ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
<b>Atıklar</b>	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işleme imha edilmelidir.

### 3 Prensi (bknz. Yukarı)

#### 4 Malzeme, reaktifler

##### 4.1. Malzemeler

##### Aletler

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

##### 4.2. Reaktifler

- Saf su
- Nitrik asit (Analitik saflıkta)
- Bromür/bromat solüsyon
- 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.
- √ İç kalibrasyon sinyalinin teyidi (ICP MS)

## 7 Hesaplama ve sonuçların ifade edilmesi

Sonuçlar µg/L Hg olarak ifade edilir.

## 8 Standartlara göre ayırım

Standardın Öngördükleri	Laboratuvarın Yaptığı Değişiklikler	Doğrulama
	Yok	

### 2.3.10. 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 sularda uçucu halojenli bileşiklerin yokluğunu teyit etmeyi amaçlar.

### 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.

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 olarak kirliliğin önüne geçmeyi amaçlamaktadır.

### 2.4.3. Standartlar

Yüksek derecede uçucu halojenli Head Space ile tayini.

(ISO 10301: Gaz fazlı kromatografi metotları)

(ISO 15 680: Purge and Trap ve gaz fazlı kromatografi metodu).

#### 2.4.4. Prensip

- 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: headspace 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.

Havuz sularının analizi için, termostat ısısı bazı kloroformlu bileşenlerin (kloral hidrat) bozulmasını önlemek amacıyla 40°C'yi aşmamalıdır.

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

#### EN ISO 15680

Gazı alınmış sabit bir hacim daha sonradan absorbe olacak olan uçucu bileşenleri özütlemek için hareketsiz bir gaz ile sabitlenir. Tutma aşağıdaki şekilde yapılır:

- Emici madde ile dolu bir kapan (kriyofokalizasyon yani soğukla sabitleme sistemi ile birleştirilmiş ya da birleştirilmemiş) veya doğrudan soğuk ince borular olan bir kapan üzerinde. Gazını alma süreci bittikten sonra, kapan gaz fazlı kromatografinin ince borularından bir kolona doğru gaz vektörü yoluyla yer değiştiren emilmiş uçucu bileşenlerin geri çıkarılması için ısıtılır. Kromatografik kolon içerisine transfer bir hat üzerinde veya hat dışında montaj ile yapılabilir.
- Ardından bileşenler bir ısı programlaması yoluyla gaz fazlı kromatografi yoluyla ayrılırlar ve bir kütle spektrometresi yardımıyla saptanırlar. Veriler kalibrasyonlarla kıyaslamaya imkan vermek için toplam tarama modunda veya spesifik parçacıkların yeterli bir sayısı üzerinden toplanmalıdır. Saptama kriterleri mevcut olduğu zaman bir bileşen mevcut olarak değerlendirilmektedir. Miktar belirleme ise her bir analit için seçilmiş olan karakteristik parçacıkların yardımıyla yapılır.

#### 2.4.5. 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.

Havuz sularında THM analizi için, sodyum tiyosülfatı askorbik asit ile (300mg/L) yer değiştiriniz. Bu kloru nötralize etmeye (tiyosülfat gibi) ve numuneyi asitleştirmeye sağlar. Numunenin asitleştirilmesi bazı alt ürünlerin kloroform olarak ayrışmasını önler (kloral hidrat,...) bu durum ise aşırı dozlamayı önlemeye yarar.

### ***Purge and Trap metodu***

- Numuneler PTFE sıvalı silikondan su geçirmez ekli tıpa ile vidalanmış kaplar içerisine alınmıştır.
- Otomatik numune alıcısı ile gazını alma ve kapma sistemlerinde otomatik numune alıcısı için üreticinin tavsiye ettiği kapları kullanınız.
- Numunelerin serbest klor veya diğer her türlü kuvvetli oksidanı içermesi halinde, sodyum tiyosülfat ekleyiniz.
  - o Numunelerin saklanması için, pH' o sodyum hidrojenosülfat yardımıyla 2'ye düşürünüz.
  - o Havuz sularında THM analizi için, sodyum tiyosülfatı arkorbit asit (300mg/L) ile değiştiriniz.

Bu kloru nötrale etmeye (tiyosülfat gibi) ve numuneyi asitleştirmeye imkan verir. Numunenin asitleştirilmesi ise, aşırı doz vermeyi önleyen kloroform bakımından bazı dezenfeksiyon alt ürünlerinin (kloral hidrat,...)ayrışmasını önler.

### **2.4.6. 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.

#### ***Purge and trap metodu vakası***

- Metodun kalibrasyonu: işaretlenmiş kalibreleri içeren iç kalibrasyon solüsyonunun eklenmesi ile 0.001mg/l – 0.005mg/l aralığı veya analiz edilen numuneler içerisinde saptanamayan aynı kimyasal familyadan maddeler.
- Aseton, metanol, dimetilsofoksit veya dimetilformamid içerisinde ana solüsyonlar
- Maddeler: şunları içeren 48 bileşen: benzen, tolüen, o-ksilen- m-ksilen,- p-ksilen, etilbenzen.
- Şu bileşenler arasından seçilecek iç kalibrasyonlar: benzen-d6, tolüen-d8, 1,4-diklorbütan.

### **2.4.7. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması**

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

### **2.4.8. 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 numuneden sonra hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinden birisi (kontrol noktası) okutulur. Numunelerin, numune aktarımı için kullanılanlardan farklı flakonların içerisine alınması halinde, bu aşamada uçucu bileşenlerin kayıplarına neden olabilecek her türbülansı önleyerek laboratuvara aktarılması gereklidir.

#### 2.4.9. 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.

#### 2.4.10. Hesaplama ve Sonuçların İfade 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.

#### 2.4.11. Kalite İşlemi: Yöntemin İşleyişi

##### 0 Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

##### 1 Yöntem

Uygulama alanı	Referans standartlar
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	- EN ISO 10301 - EN ISO 15680 - EN ISO 11423-1
Muhafaza	Analizden önceki muhafaza süresi
- PTFE kaplı su geçirmez tıpalı oturtulmuş kapak sistemli küçük numune alma şişesi ya da oturtulmuş cam tıpalı cam şişelerde 2 gün 5°C ± 3°C'de. - 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.	- 5°C ± 3°C de 2 ila 5 gün - 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	Sonuçların ifade edilmesi
Bileşenlere göre 0.1 µg/L' den 100 µg/L' ye.	µg/L

##### 2 Güvenlik

<b>Güvenlik Önlemleri</b>	Standart çözeltileri ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
<b>Atıklar</b>	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işlemle imha edilmelidir.

##### 3 Amaç (bkz. yukarı)



## 4 Malzeme, reaktifler

### Malzeme

#### 4.1. 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

#### Purge and trap metodu

Özellikle: PTFE kaplı silikondan su geçirmek ekli vidalı tıpa ile numune alım kapları, pipetler, absorban kapanlar.

- Gazını alma ve kapan cihazları
- Detektörler ile gaz fazlı kromatografi: alevli iyonizasyon detektörü, fotoiyonizasyon detektörü, elektron veya kütle spektrometresi sensörlü detektörü.
- İnce borulu kolonlar: örneğin DB624, uzunluk: 60 metre, yarıçığı: 0.32mm, filmin kalınlığı 1.8 µm.

#### 4.2. Reaktifler

- 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 ve Purge and Trap 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 µg/L olarak ifade edilir.

Çift tarama durumunda, en düşük sonuç seçilir.

## 8 Standartlara göre ayırım

Standardın Öngördükleri	Laboratuvarın Yaptığı Değişiklikler	Doğrulama
	Yok	

### 2.4.12. Analiz Maliyeti

50 € ile 120 € arasında

## 2.5. Hidrokarbonların Tayini

Hidrokarbonların belirlenmesi (ISO 9377-2: Hidrokarbonların tayini - Bölüm 2: Solventli ayrışım 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 olarak 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.

### 2.5.5. 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.

### 2.5.6. 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

### 2.5.7. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

Kalibrasyon çözeltileri ana stok çözeltilerden başlanarak hazırlanır.

### 2.5.8. Analiz

- Asitleme ile numunenin ön işlemi, 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

### 2.5.9. Bileşenlerin Tanımlanması

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

### 2.5.10. Hesaplama ve Sonuçların İfade Edilmesi

Sonuçlar mg/L olarak ifade edilir.

### 2.5.11. Kalite İşlemi: Yöntemin İşleyişi

#### 0 Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

## 1 Yöntem

Uygulama alanı	Referans standartı
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.	- ISO 9377-2
Muhafaza	Muhafaza süresi
- PTFE'den yapılmış su geçirmez tıpalı ya da rodajlı 1 litrelik kahverengi cam numune şişelerine alınır.	- 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	Sonuçların ifade edilmesi
0.1 mg/L	mg/ L

## 2 Güvenlik

<b>Güvenlik Önlemleri</b>	Standart çözeltiler ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
<b>Atıklar</b>	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işlemle imha edilmelidir.

## 3 Prensipten (bkz. yukarı)

### 4 Malzeme, reaktifler

#### 4.1. 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.

#### 4.2. 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
- Arıtma 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 konsantr edilir.

Kromotografi sisteminin kullanım koşulları sağlanır.

Analitik aralığı: kalibrasyon çözeltileri, analiz edilecek numuneler, 10 numunedan 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.

Yukarıdaki 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	

### 2.5.12. Analiz Maliyeti

50 € ile 100 € arasında

## 2.6. Mikrosistinlerin Tayini

**Sıvı Faz Ekstraksiyonu (SPE) ayrışımı 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 yüzücülerin sağlıklarını etkileyebilecek siyanobakterilerin endotoksinlerini (mikrosistinler) serbest bırakmaya elverişli bir ortamdır.

Aynı toksin farklı cinsler tarafından üretilir. Böylelikle, mikrosistinler, mikrosist türlerinde gözlemlenebilmenin yanı sıra Anabaena, Planktothrix veya yine Nostoc türlerinde gözlemlenebilirler. Aynı tür farklı toksinleri üretebilir. Böylece Anabaean spiroides anatoksin-a'nın yanı sıra mikrosistler de üretebilir. Netice itibarıyla, bir biyo-kütle ünitesi tarafından üretilen toksinlerin miktarı çevresel koşullara, büyüme fazına veya ilgili klonu göre aynı tür içerisinde değişken olabilir. Mikrosistin LR'nin 25 µg.L<sup>-1</sup>'i aşması halinde yüzme alanının yasaklanması ve kimi su faaliyetlerinin kısıtlanması tavsiye edilmektedir. Köpük ya da süprüntü mevcudiyeti halinde yüzme alanının yasaklanması ve su faaliyetlerinin uygulanmasına izin verilmemesi önerilmektedir.

### 2.6.2. Kapsam

Bu toksinlerin toksikliğinin ve sağlık riskinin mevcudiyeti bakımından bu araştırma yüzme sularına bağlı risklerin sınırlandırılması için tedbirsel önlemler almaya imkan verir. Siklik yapıdaki hepatotoksinler arasından, mikrosistinler hayvanlarda ve insanlarda zehirlenme olaylarının en sık görüldüğü siyanotoksinlerdir. Bunlar temel olarak Mikrosistin ve Planktotriks türlerine ait cinslerde üretilir. Bunları aynı zamanda Anabaena, Anabaenopsis, Nostoc, Oscillatoria ve Hapalosiphon türü kimi cinsler tarafından da sentezlenmiş şekilde bulmaktayız. Böylelikle, diğer yerlerin yanı sıra şu ülkelerdeki su ortamlarında bulunmaktadırlar: Güney Afrika, Avustralya, Çin, Japonya, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Almanya, Danimarka, Finlandiya, Fransa, Portekiz, Çek Cumhuriyet, Slovakya ve Bileşik Krallıklar.

### 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. Prensipte

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

Özütlerin saflaştırılması prosedürleri genellikle C18 desteği üzerine devrik fazda katı faz üzerinden özütlemeye üzerine dayalıdır.

Mikrosistinler için, özüt önceden hazırlanmış C18 reçine kartuşu üzerinde bırakılır, özütü içeren flakon metanol-su karışımı ile çalkalanır ve ardından kartuş üzerine bırakılır. Tutulmayan organik maddeleri elemek için, kartuş birkaç ml metanol-su (20-80 hacim/hacim) karışımı ile yıkanılır. Tutulan mikrosistinler %0,1 formik asit ile asitleştirilmiş metanol/su (90-10 hacim/hacim) karışımı ile elüe edilir. Elüat azot şeklinde buharlaştırılır ardından analiz flakonuna konmadan önce 50 µl'lık bir metanol/su (20-80 hacim/hacim) içerisinde azot biçiminde çözülür. Özüt kromatografik analiz için hazır hale gelir.

Molar kütlelerinden ve kimyasal yapılarından ötürü, mikrosistinlerin ayırımı C18 türü devrik fazda kolon üzerine sıvı kromatografi ile yapılır.

n-oktadesil (C18) aşılınmış silis orta düzeyde hidrofob olan siyanotoksin hidrofob a için en sık kullanılan abrosbandır.

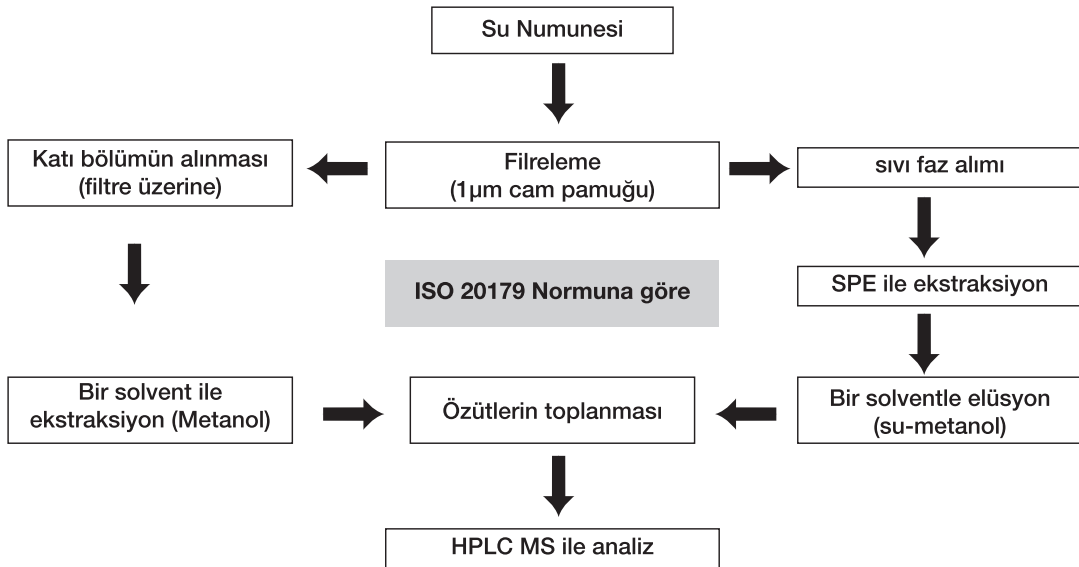
Elüe etme ise TFA bakımından %0,05 asitli mobil asetonitril-su fazı yoluyla veya formik asit yoluyla yapılır.

Saptama UV spektrofotometrisi yoluyla yapılabilir. Farklı mikrosistinlerin tanımlaması özellikle bu kromatografi kolonu içerisindeki analizlerin tutulma sürelerine, neredeyse mükemmel bir şekilde üst üste konabilir UV görüntüleri üzerine dayanmaktadır. Bu tanımlama yalnızca bir referans kalibrasyonuna erişilebildiğinde mümkündür. Bileşimin net tanımlaması ve analiz numuneleri içerisinde bu toksinlerin yapısının belirlenmesi bu detektör türü ile her zaman mümkün değildir.

Karmaşık matrisler içerisinde saptama interferanslarını çıkarmak için bir belirleme garantisi sunmak için kütle spektrometresi yoluyla saptama kullanmak tavsiye edilmekte ve bu durum iyon özellikleri yoluyla farklı toksinlerin mevcudiyetini ortaya koymaya imkan tanımaktadır.

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

Mikrosistinlerin miktarı, 238nm'de UV dedektörlü HPLC cihazı kullanılarak belirlenir.



### 2.6.5. 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.

### 2.6.6. 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

### 2.6.7. Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması

- Ana stok çözeltiden başlayarak kalibrasyon çözeltileri hazırlanır.

### 2.6.8. Analiz

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

### 2.6.9. Bileşenlerin Tanımlanması

Bileşenler tutulma sürelerine ve UV spektrumlarına göre belirlenir. Mikrosistin LR, YR, RR HPLC UV ile belirlenebilir.

HPLC/UV yöntemine bir alternatif olarak kütle spektrometri ile çift HPLC kullanılmaktadır.

### 2.6.10. Hesaplama ve Sonuçların İfade Edilmesi

Sonuçlar µg/L olarak ifade edilir.

### 2.6.11. Kalite İşlemi: Yöntemin İşleyişi

0 Değişiklikler

Değişiklik: Basitleştirilmiş yazım

#### 1 Yöntem

Uygulama alanı	Referans standartları
Yöntem, içme sularına ve işlenmiş içme sularında mikro sistinlerin tayininde kullanılır.	- ISO 20179 - Diğer yöntem: ISO/DIS 20179: Yüksek performansta sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi ve kütle spektrometri (MS/MS) tarama
Muhafaza	Analizden önce muhafaza süresi
- Numune 1000 mL'lik kahverengi cam şişelere tamamen dolacak şekilde alınır.	- 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 gelindiği andan analize kadar 5°C ± 3°'de soğuk odada muhafaza edilir.	
Ölçüm sınırı	Sonuçların ifade edilmesi
1 µg/L	µg/L

#### 2. Güvenlik

<b>Güvenlik Önlemleri</b>	Standart çözeltileri ve reaktifler hazırlanırken eldiven takılmalıdır.
<b>Atıklar</b>	Kalibrasyon sıvıları ve kromatografik ayrışım reaktifleri özel bir işlemle imha edilmelidir.



### 3 Amaç (yukarıya bakınız)

#### 4 Malzeme, reaktifler

##### 4.1. 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, doldurma parçalarının boyu: 3 ila 5 µm
- Enjeksiyon halkası

##### 4.2. 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)

Tedarikçilere göre son derece değişken olabilen mikrosistin kalibrasyon solüsyonları kalitesine özel bir dikkat verilmelidir. Bunun sonucu olarak, kalibrasyon dizisinden farklı tedarikçilerden (veya lotlardan) gelen kontrol solüsyonlarının kullanılması önemlidir veya ISO 20179 normu içerisinde öngörüldüğü üzere psektofotometrik ölçüm ile çözeltiler bakımından kontrol yapılmalıdır.

#### 5 Uygulama

Numune göz açıklığı 0.45 µm olan filtreden süzülür.

C18 biçiminde katı emilim halinden sıvı hale ayrıştırılır.

- Kartuş 4M1 metanol -4ml su ile temizlenir.
- Numunenin pH'ının 5 ile 8 arasında olduğunu teyit ediniz ve gerektiğinde bunu ayarlayınız (trifloroasetik asit/amonyum hidroksit).
- 500ml numuneye 500 µL sodyum tiyosülfat ekleyiniz. Çalkalayınız.
- 500ml numuneye 5ml methanol ekleyiniz.
- Maksimum 10ml/dk. Hızda kartuş üzerinde numuneyi perkole ediniz.
- Kartuşu 4ml methanol/sui le çalkalayınız (20:80).
- Kartuşu 2ml metanol/su (90 :19) + 0.1 TFA ile bir cam tübün içerisinde elüe ediniz.
- Azot altında kuru olarak buharlaştırınız (400C).
- Çökeltiyi 500µl metanol/su (20 :80) ile eritiniz.
- 5mn boyunca numuneyi ultrasondan geçiriniz.

Ultrasonda tutulmuş fazı 0.45µm membran üzerinde özütleyiniz :

- Filtreyi 3 kez 3ml metanol/su (75 :25) solüsyonu ile çalkalayınız.
- Solüsyonu 2dk. boyunca ultrasondan geçiriniz (tercihi olarak banyo).
- 10 dk. boyunca en az 4000tur/dk. boyunca solüsyonu santrifüjleyiniz.
- Yüzer bölümü toplayınız ve azot altında kuru olarak buharlaştırınız (400C).
- 500µl metanol/su içerisinde çökeltiyi çözünüz (20 :80).
- 5dk. boyunca numuneyi ultrasondan geçiriniz.

Filtre özütünün arındırılması

- Yukarıda alınan numuneyi SPE kartuşu üzerinden geçirerek işleme tabi tutunuz.
- Tübü 500µl metanol/su ile çalkalayınız (20 :80).
- Kartuşu 4ml metanol/su ile çalkalayınız (20 :80).
- Toplanmış olan kesidi eleyiniz.
- 2ml metanol/sy (90 :10) + %0.1 TFA ile camdan tüp içerisinde kartuşu elüe ediniz.
- Azot altında kuru buharlaştırınız (400C).
- 500µl metanol/su içerisinde çökeltiyi eritiniz (20 :80).
- 5dk. boyunca numuneyi ultrasondan geçiriniz.

Kromatografik sistemin kullanım koşullarını stabilize ediniz.

Analitik kör ölçümler, kalibrasyon solüsyonları, özütleme randımanının kontrolö noktasını, kontrol solüsyonları, analiz edilecek numuneler, her 10 numunede 1 kontrol noktasının ölçümlerini içeren analitik bir seri hazırlayınız. Kalibrasyon eğrisini çiziniz ve miktar belirlemeyi yapınız.

### 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 sonra suda saptanabilecek kirleticilerin çevresel koşullardan değil suyun kendisinden kaynaklandığından emin olunmalıdır.
- Kalibrasyon eğrisi kontrol edilmelidir: Stabilitate, 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	

### 2.6.12. 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 tespitinin 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.

## KALİTE UYGULAMASI / AKREDİTASYON

### 17025 STANDARDI: GENEL ÖZELLİKLER

#### 1.1. Neden

1998 tarihli İçme Suları ile İlgili 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.

#### 1.2. 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. Akreditasyonunun önemi: laboratuvarın etkinliğinin artırılması, personelin sorumluluklarının ve motivasyonun artırılması 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).

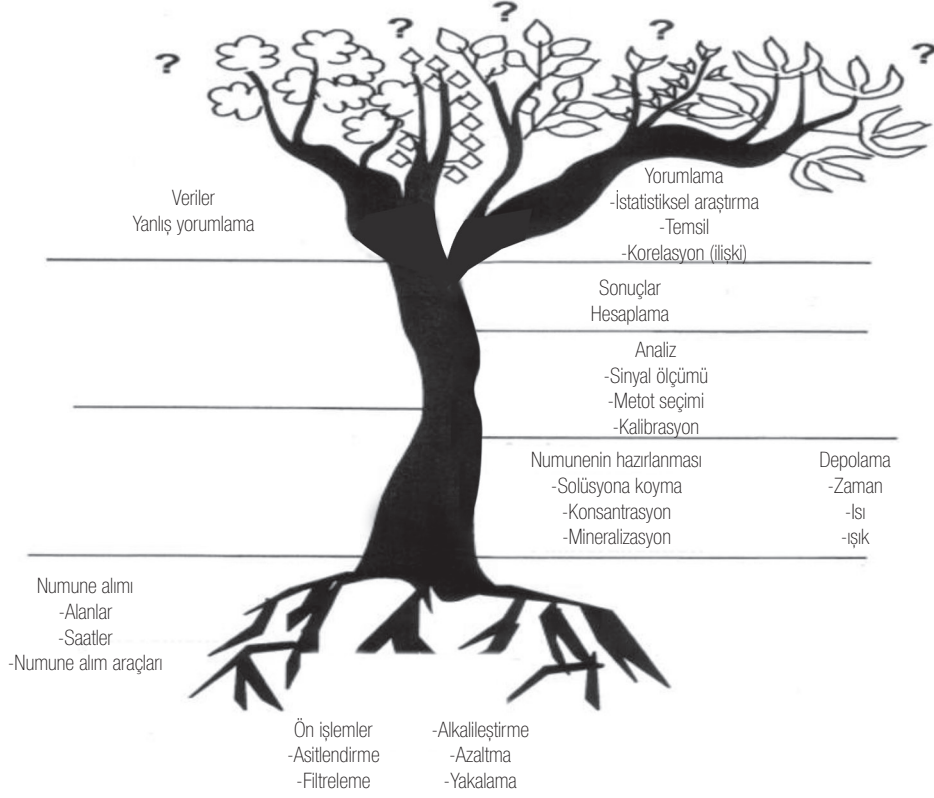
Akreditasyon uygulamaları sürekli iyileştirme süreçleri içerisinde olunmasını sağlamaktadır ki bu da laboratuvar uygulamalarının düzenli olarak sorgulanmasına olanak vermektedir.

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 alınması,
- Laboratuvar aşamasındaki hatalar: numunenin hazırlanmasındaki hatalar, miktarın/dozun belirlenmesinde yapılan hatalar.

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

## İyi bir sonuç iyi analitik sonuçlara dayanır



### 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 (Asitlendirme, filtrasyon, alkalileştirme, redüksiyon)
  - Muhafaza (Zaman, sıcaklık, ışık)
2. Analizde hata kaynakları;
  - Numunenin hazırlanması (Solüsyon ekleme, konsantrasyon, mineralizasyon)
  - Analiz (Metot seçimi, sinyallerin ölçümü, kalibrasyon)
3. 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 tabii tutulduğu 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 oluyor mu?
- Kullanılan cihaz, materyaller ve reaktifler yeterli mi?
- Kullanılan yöntemler uygun ve geçerli, onaylanmış (validasyon) yöntemler mi?
- Sonuçlar ne şekilde yorumlanıyor ve nasıl iletiliyor?

### **1.3. 17025 Standardının Farklı Şartları**

#### **1.3.1. Organizasyonla İlgili Şartları**

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 ortaya koyması ve müşteriyle karşılıklı çıkarılara hizmet etmesidir.

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 dokümanları yayımlamak,
- √ Sistemin gelişimi hakkında Yönetime bilgi vermek,
- √ Kalite yönetim sistemi konusunda çalışanları eğitmek,
- √ TS EN ISO 17025 gereklilikleri doğrultusunda yasal düzenlemeleri izlemek,
- √ Standart laboratuvarında uygulanıp uygulanmadıklarını kontrol etmek.

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

Dokümanların yapılandırılması, Kurum ve Kalite Sorumlusu tarafından hazırlanan genel dokümanlardan (Prosedürler ve Kalite El Kitabı), uygulayıcılar tarafından hazırlanan çok daha ayrıntılı dokümanlara doğru giden bir doküman piramidi şeklinde organize edilmektedir.

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

### Dört çeşit doküman hazırlanmalıdır:

1. **“Yöntem”** içerikli dokümanlar: 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?

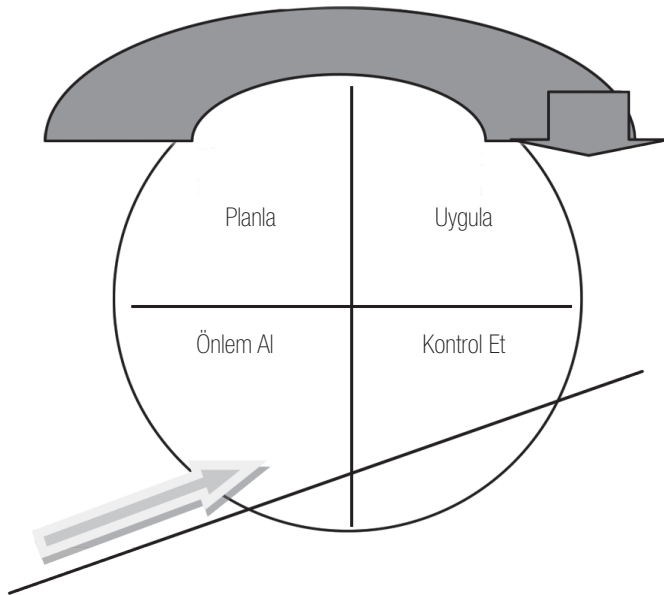
2. **“Metodoloji”** ile ilgili dokümanlar: örneğin; incelemenin gerçekleştirilmesi talimatı veya analiz talimatı;

3. **“Kayıt”** dokümanları; gerçekleştirilen işlemlerin izlenebilirliği hakkında,

4. **“Kayıt”** dokümanları.

Dokümanların 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 Kitabıdır. 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 kurlarını sıralamak ve organizasyona ilişkin net bir görüntü sunmaktır.



#### **P. Planlama**

İşin: ne, ne zaman, nerde, nasıl, kim tarafından yapılacağı kararlaştırılır.

#### **D. Uygulama**

Planlanan faaliyetlerin belirlenen kişi, yöntem ve zamanlarda gerçekleştirildiği aşamadır.

#### **C: Kontrol**

Hedeflere ne kadar ulaşıldığı belirlenir. Uygulama faaliyetleri kontrol edilir ve standartlaştırılır.

#### **A: Harekete Geçmek ve İyileştirmek**

Önlem Al

Planlanan faaliyetler ile uygulamalar arasında ortaya çıkan farklılıklar ve sapmaların nedenleri araştırılır. Bunlara yönelik faaliyetler başlatılır.

### Kalite Yönetimi ve Çevre

### Çizim: Demming Döngüsü

#### **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” Döngüsüne göre organize edilmektedir. **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 beyanı 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 beyanı olmalıdır.

**Bölüm 2,** laboratuvarın müşterilerine yönelik taahhüdünü tanımlamaktadır. Bu belge laboratuvarın taahhütlerine ilişkin anlaşma olarak kabul edilmelidir. Su analizi laboratuvarların onaylama referansına göre düzenlenmelidir.

Bu dokümanda, numunelerin incelemeye alınmasına ve sonuçların verilmesine ilişkin kavramlar yer almalıdır. Bu dokümanda inceleme kriterleri ve hangi sıklıkta yapılması gerektiği ,inceleme yöntemleri ve numunelere ait uyulması gereken şartlar net bir şekilde ifade edilmelidir.

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 sözleşme laboratuvar ve müşterisi için kabul edilebilir olmalıdır. Laboratuvar numune alma işleminde kullanılacak kapların türü, taşıma süreleri ve numune alma işlemini gerçekleştiren kişiler ile ilgili kriterleri belirlemeli ve gerekli tedbirleri almalıdır.

**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 süre için yetkilendirilmiş olan personelin listesinin bilinmesi gerekmektedir (numunelerin alımı, farklı analitik tekniklerin uygulanması, 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 olabildiğini temin eder.

Laboratuvara alınan her yeni personel yetkin olmalı ve yetkin kılma yönteminin de yazılı olarak düzenlenmiş olması gerekir: göreve alınan kişinin adı ve yetkinlik programının belirlenmesi (örneğin: incelemenin yetkilendirilmiş birisi ile ikili olarak yapılması), yetkinlik çalışmasında alınacak kararlara esas teşkil edecek kriterler kayıt edilmelidir.

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 iletimiyle 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 alıma karar verdiği prosedürde belirtilmelidir. Bu bölümde numune alımlarına ilişkin şişelemeye de değinilmelidir.

**Bölüm 8** ise, numune alımı ve inceleme yönetimi ile ilgilidir. Su analizleri gerçekleştiren laboratuvarın onaylanmış (Akreditasyon Kurumu tarafından) programı mutlaka olmalı ve uygulanacak olan yöntemlere ilişkin teknik inceleme şartlarını, yapılması gereken kontrollerin 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 standartlara ilişkin gelişmeleri takip etmesi gerekir.

Kalite el kitabının 9’uncu bölümü uygunsuzlukların tespiti ve bunlara yönelik önleyici ve düzeltici faaliyetler ile ilgilidir. Bu bölümde, uygunsuzluk veya müşterinin iade talebi (örneğin: analiz süresine uyulmaması, sonuçlara itiraz edilmesi) durumlarının 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 cihaz 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 yöntemleri denemesi ve uygulanmakta olan yöntemlerde iyileştirme olanağının olup olmadığının değerlendirilmesine ve kurallara ne derece uyulduğuna bakılmasına olanak tanımaktadır.

İç denetimlerle kalite sisteminin etkin çalıştığının kontrol edilmesi ve hazırlanmış olan dokümanlara ne ölçüde uyulduğunun tespiti için son derece önemlidir. Prosedürde, kimin denetimi yapacağı, nasıl yapılacağı, hangi dokümanlara 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 üzerine 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 aşağıdaki bileşenleri 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.

#### **1.3.2. Teknik Şartlar**

İlgili öneriler:

##### **1.3.2.1 Yerleşim ve çevre şartları**

Laboratuvar yaptığı işin özelliğine göre uygun fiziki ortama sahip olmalıdır: odalar belirli şartları taşımaktadır.

Mikrobiyoloji analizlerinde, bulaşmayı engellemek için arz eden tedbirler alınmalıdır:

- Mikrobiyolojik ekim faaliyetinin yapıldığı odaların temiz suyun ekim yapıldığı odalardan ayrılması,
- Laboratuvarın düzenlemesiyle çapraz bulaşmalar kontrol altına alınmalı, temiz suların 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 ayarlanmanın 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.

- Önemli koşullar: bir talimat ile tanımlanmalı ve anlatılmalıdır. Laboratuvar, malzeme ve aletlerin temizliği teknik personelin sorumluluğunda gerçekleştirilmeli;
- Özellikle mikrobiyoloji iç kalite kontrollerinin tesis edilmiş olması gerekmektedir.
- Söz konusu kontroller laboratuvar hava ve yüzeylerinin kontrolünü de kapsamalıdır

### 1.3.2.2. Cihazlara ilişkin tavsiyeler

Tüm ölçüm cihazlarının etiketi olmalı ve tanımlanabilir olmalıdır. Laboratuvarda kalibrasyona tabi cihaz ve ekipman listesi bulunmalıdır. 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,
- 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 tanıtımı 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,
- Kontrol kayıtları tutulmalı ve saklanmalı,
- Eğer bir incelemenin gerçekleştirilmesi için laboratuvarda birden fazla cihaz varsa kayıta hangi cihazın kullanıldığının belirtilmesi gerekir. (örneğin, spektrofometre, 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:**

**“Kesinlik ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçümüdür ve ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını gösterir.**

**Belirsizlik, beklenen sonuç ile elde edilen sonuç arasındaki farktır.**

**Bu da güvenilirlik saptamasına tekabül etmektedir.**

**Tolerans belirli bir test için kabul edilebilir sapmanın ölçülmesidir.”**

### **Metrolojinin 10 koşulu aşağıda belirtilmiştir:**

- Ölçüm cihazlarının tespit edilmesi,
- Bir kontrol kartının düzenlenmesi,
- Kalibrasyon için asgari koşulların belirlenmesi,
- Kalibrasyonun sürelerinin belirlenmesi,
- Ulusal ve uluslararası kalibrasyon referans standartlarının belirlenmesi,
- Çevresel koşulların belirlenmesi,
- Cihaz ve ekipmanın kalibrasyonu (sonuçlar kontrol kartlarında),
- Cihaz ve ekipmanın kapasitesinin garanti edilmesi,
- Cihaz ve ekipmanın korunması ve yeniden ayar yapılmasından kaçınılması,
- 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 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 deney durdurulur 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 laboratuvarda belirlenmiş olmalı ve fiziki ölçümlere ilişkin kontrol talimatlarını vermeli (hacim, ısı, yoğunluk) ve cihazların kontrol kartı oluşturulmalıdır.

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

### **Isı**

Sıcaklık 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).

Mikrobiyoloji otoklavlar için kontroller günlük yapılmalıdır (örneğin: sterilite özelliğinin kontrolü, basınç ve ısının kontrolü). Yılda bir kez dışarıdan bağımsız bir kuruluş tarafından kalibrasyon 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 seyreltme kullanılıyor ise, yapılan seyreltme sık sık ve düzenli olarak kontrol edilmelidir.

### 1.3.2.3. Kullanılan malzeme ve reaktiflere ilişkin tavsiyeler

- Reaktiflerin kalitesinin ve laboratuvar malzemelerinin iyi yönetilmesi büyük önem taşımaktadır.
- Sağlık önerileri satın alma özellik şartlarında belirtilmektedir ancak her hangi bir riski bertaraf etmek amacıyla, yıkama ve şişelemeye ilişkin özel tedbirlerin alınması gerekmektedir.
- Şişelerin hangi yöntemle yıkadıkları incelenecek olan parametrelere göre yıkama esaslarına tabi tutulmalıdır ve bu işlem ayrıntılı bir şekilde açıklanmalıdır.

### Söz konusu kontroller tüm süreç üzerinde gerçekleştirilmelidir:

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

Laboratuvarın numune kablalarının yönetime önem vermesi gerekir. Numune kablalarının 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 gerekmekte.

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

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

Kimyasal analizler için kontrol kartları sistemin işleyişinin kontrolünü ve zamanında önlem alınmasını sağlamaktadır.

### 1.3.2.4. 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 kullanılabilen ve bu durumda yöntemlerin aynı sonuca ulaşması gerekir;
- Bir indeksin belirlenmesine yönelik yöntemler (örneğin, tüm klasik mikrobiyoloji yöntemleri), bu durumda yöntemin kesin protokolü izlenmelidir.

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

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

Fransız XP T 90-210 ve XP T90-220 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.

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

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

Talimatta yöntemin (metodun) prensibi, kapsamı, kullanımı malzeme ve kimyasallar, uygulama, hesaplamalar, ölçüm birimleri, kalite kontrolleri, temizlik ve güvenlik için alınması gereken önlemler belirtilmelidir.

Bu süreçte uygulama yöntemin özelliği ve yöntemlerin toplamda nasıl yönetileceği açıklanmalıdır.

#### **1.4. Kalite Güvencesinin Maliyeti**

Kalite güvencesinin sağlanması laboratuvara %20 ek maliyet getirmektedir.

Kalite güvencesinin yarattığı maliyet artışında aşağıdakiler göz önünde bulundurulmalıdır:

- √ Personel eğitim masrafları,
- √ Doküman 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.**

## **2 17025 Standardı: Nasıl uygulamaya konur**

Standardın gerekliliklerine göre kalite sisteminin kurulması, yönetim ve tekniklerle ilgili aşağıda belirtilmiş olan öğeleri gruplandırarak bazı dokümanların yazılması gerekmektedir.

### **2.1. Yönetime İlişkin Talimatlar**

Yönetim zorunluluklarına ilişkin olarak 17025 standardına yanıt vermek için 14 noktanın dikkate alınması gerekmektedir. Bu noktalar şunlardır: 1 Organizasyon, 2 yönetim sistemi, 3 incelenen dokümanlar, 4 müşterilerle ilişkiler, 5 taşeronluk hizmetleri, 6 satın alma, 7 müşteri hizmetleri, 8 şikayetler, 9 uygunsuzluk çalışmalarının yönetimi, 10 iyileştirme, 11 düzeltici ve önleyici faaliyetler, 12 kayıtların yönetimi, 13 iç tetkikler, 14 yönetimin gözden geçirilmesi.

Bu zorunlulukların her birine yanıt verilmesi gerekmektedir ancak bunun laboratuvarın kendi yapısına göre uyarlanarak yapılması gerekmektedir : « Yapılanların yazılması ve yazılanların yapılması gerekmektedir. »

14 noktanın her biri 2 paragrafta özetlenmiştir : 17025 standardının gereğinin yapılması ve bunlarla ilgili prosedürlerin ve diğer dokümanların hazırlanması.

## 1. Organizasyon

### • Zorunluluklar

Çıkar çatışmalarının yönetimi/ personelin baskıya uğramaması , etkiler  
Gizli bilgilerin korunması (elektronik depolama), sonuçlar  
Organizasyonun tanımlanması/laboratuvarın yapısı  
Sorumlulukların tanımlanması/işbirliğindeki yetkililer  
İç iletişim

### • Yazılacak dokümanlar

Yönetim beyanı  
Oluşturulan politikalar  
Organizasyon şeması  
İş tanımları, yetki listeleri

## 2. Yönetim Sistemi

### • Zorunluluklar

Politika belirleme, prosedürler, talimatlar,...  
Kalite politikası/genel hedefler

### • Yazılacak dokümanlar

Kalite el kitabı  
Kalite politikasının beyanı  
• Güvenilirlik, hizmet düzeyi, tarafsızlık, bağımsızlık  
Dokümanların yapısı

## 3. İncelenen Dokümanlar

### • Zorunluluklar

Dokümanların yönetim prosedürü: düzenlemeler, standartlar, deney metotları, yazılımlar,...  
Onay ve dağıtım  
Değiştirme

### • Yazılacak dokümanlar

Dokümanlara dayalı yönetim prosedürü  
Dokümanlara dayalı yönetimin taahhütü, dokümanlar  
Normlara dayalı izleme

## 4. Müşterilerle İlişkiler

### • Zorunluluklar

Taleplerin alınması tekliflerin verilmesi, sözleşme yönelik prosedürler  
Kayıtların gözden geçirilmesi  
Müşterilere bilgi verilmesi

### • Yazılacak dokümanlar

İlkeler:  
• İhtiyaçların karşılanması, öneriler  
• Sürekli işbirliği, bilgi dönüşü  
Prosedürler:  
• İhtiyaç analizi/satınalma/Talep  
İzlenebilirlik: dokümanların arşivlenmesi

## 5. Taşaron Hizmetleri

- **Zorunluluklar**  
Yetkin taraflara taşaronluk verme=ISO 17025'e uygun olarak  
Müşterinin bilgilendirilmesi
- **Yazılacak dokümanlar**  
Taşaronların Türkak tarafından akredite olması

## 6. Alımlar

- **Zorunluluklar**  
Seçim/tedarikçilerin değerlendirilmesi/yüklenicilerin değerlendirilmesi  
Net bir şekilde alınacaklara ilişkin veriler/onaylanmış alım dokümanları  
Teyit edilmiş alımı yapılacak ürünlerin uygunluğu
- **Yazılacak dokümanlar**  
Alım türüne göre tedarikçilerin seçim kriterleri  
Teslim kalitesinin takibi (teknik ve hizmet bakımından)  
Talep döngüsü / onaylama düzeyinin tanımlanması

## 7. Müşteri Hizmetleri

- **Zorunluluklar**  
Müşterilerle işbirliği: deney öncesi, deney sırasında ve sonrasında  
Müşterilere bilgi dönüşü
- **Yazılacak dokümanlar**  
İhtiyaçların analizi  
Deneylere katılım imkanı  
Her bir sözleşmede memnuniyet anketi

## 8. Şikayetler

- **Zorunluluklar**  
Şikayetlerin ele alınması prosedürü
- **Yazılacak olan dokümanlar**  
Prosedür  
Şikayet kaydı  
Yıllık hedef

## 9. Uygunsuzluk Çalışmalarının Yönetimi

- **Zorunluluklar**  
Uygunsuzluk çalışmalarının yönetimine yönelik kurallar  
Sorumluluklar, düzeltmeler, müşterinin bilgilendirilmesi, istisnai durumlar  
Gerektiğinde düzeltici faaliyetlerin başlatılması
- **Yazılacak olan dokümanlar**  
Uygunsuzlukların yönetim prosedürü  
Uygunsuzluk kaydı

## 10. İyileştirme

- **Zorunluluklar**  
Yönetim sisteminin güvenilirliğinin devamlı iyileştirilmesi
- **Yazılacak dokümanlar**  
Düzeltilici ve önleyici faaliyetler  
İç denetimler  
Yönetimin gözden geçirilmesi hakkında iyileştirme planı

## 11. Düzeltici ve Önleyici Faaliyetler

- **Zorunluluklar**

Prosedür

Nedenlerin analizi

Seçim ve uygulamaya koyma

Eylemlerin etkinliğinin teyidi

Teyit edilmiş ek denetimler

- **Yazılacak olan dokümanlar**

Prosedürler

Düzeltici/önleyici eylem kaydı

## 12. Kayıtların Yönetimi

- **Zorunluluklar**

Teknik ve kalite kayıtlarının yönetim prosedürü

Okunabilirlik, erişim kolaylığı, koruma

Elektronik kayıtların dahil edilmesi

Teknik kayıtlar eksiksiz bir takip etmeye imkan vermelidir: dahil olanların, materyallerin, metotların takibi...

- **Kayıt dokümanları**

Analiz dosyası, Analiz raporu, Döküman en az 10 yıl saklanır.

Denetim raporu, Uygunsuzluk dosyası/ yönetim izlemesinin tutanağı, personel yetkilendirme dosyaları, cihaz, alet ekipman dosyaları

## 13. İç Tetkiker

- **Zorunluluklar**

İlgili standarda ve prosedüre göre planlanmış iç tetkiker

Bağımsız ve eğitilmiş denetçiler

Uygunsuzlukların olması halinde düzeltici faaliyetler

Uygunsuzluklar için düzeltici ve önleyici faaliyetlerin izlenmesi

- **Yazılan dokümanlar**

İç denetimlerin yıllık planı

Kayıt ve takip dosyaları

İç denetçiler

## 14. Yönetimin Gözden Geçirilmesi

- **Zorunluluklar**

Yıllık sıklık

Önceden oluşturulan prosedür

Standart tarafından sabitlenen girdi verileri

Tutanak ve karar verilen faaliyetlerin izlenmesi

- **Yazılacak olan dokümanlar**

Yıllık yayın /Müdürlük + sorumlular

Laboratuvarlar + kalite sorumlusu + metroloji sorumlusu + RH + teknik servis sorumlusu + idari yönetici + finansal yönetici

Standardın gerekliliklerine göre gündem

Eylem planı.



## 2.2. Teknik Talimat

Teknik talimatlarla ilgili olarak 17025 standardın gerekliliklerine cevap vermek için 8 nokta bulunmaktadır: 1 insan etkeni, 2 tesisler ve ortam koşulları, 3 deney metodu, 4 ekipman ve ölçümün izlenebilirliği, 5 numune alımı, 6 numune yapılan işlemler, 7 analiz sonuçlarının güvenilirliği, 8 Analiz sonuçlarının raporlanması.

Bu zorunlulukların her birine yanıt verilmesi gerekir ancak bu laboratuvarın kendi yapısına adapte edilerek yapılmalıdır: “Yapılanların yazılması ve yazılanların yapılması”.

Bu 8 noktanın her biri 2 paragrafta özetlenmiştir: 17025 normunun zorunluluklarının hatırlatılması ve bunlara yanıt verilmesi için hazırlanacak olan dokümanlar (prosedürler).

### 1. İnsan Etkeni

#### • Zorunluluklar

Görev tanımları

Görevlere yetkilendirme prosedürü (deney, kalibrasyon)

+numune alımı- görevlendirme tabloları

İzin dosyaları: raporlar, görüş ve yorumlar

İç/dış formasyon – değerlendirme

### 2. Tesisler ve Ortam Koşulları

#### • Zorunluluklar

Ortam koşullarının izlenmesi ve kayıt edilmesi

Çalışma alanlarının ayrılması ve tanımlanması

Sınırlı geçişlerin yapılması

Bakım prosedürü

#### • Yazılacak olan dokümanlar

Fiziki deneyler: ısı ve nem koşullarının yönetimi ( $T=230C\pm 10C$  ve  $H\epsilon=\%50\pm\%2$ ), basınçlı oda, filtreli hava, uygun ışık

Mikrobiyoloji: yüzeylerin ve havanın kirliliğinin yönetimi

Isının analizi

» Sürekli kayıt

» Merkezi ısı ölçümü ile düzenli control

Laboratuvara kontrollü giriş

Her bir odaya erişim izni listesi

Ziyaretçilerin erişim prosedürü

Alanların temizlenme prosedürü

» Temizlik görevlilerinin yetkilendirilmesi

» Görev alanlarına göre çalışmaların tanımlanması

### 3. Deney Metodu/Onaylama

#### • Zorunluluklar

Standart metodların kullanımı

Uyarlanmış metodların onayı

Kalibrasyon ve Referans materyallerin kullanımı,

Diğer metodlarla karşılaştırma

Laboratuvarlar arası karşılaştırma

Sonuçlara etki eden belirsizliklerin belirlenmesi ve değerlendirilmesi

Ölçüm belirsizliğinin belirlenmesi

- **Yazılacak dokümanlar**

Özellikle normlaştırılmış metotlar üzerinde akreditasyon

Her bir deney için:

- » Normun uygulanması modellerini belirleyen işletme modu
- » Sonuçların kontrolü
- » Rapor
- » Rapor formatı, örnek rapor

Normdan sapıldığı noktadan itibaren onaylama dosyaları

Belirsizlikler

- » Temel belirsizlik kaynaklarının değerlerine limit uyum
- » Laboratuvarlar arası deneylere konu olan tekrardan üretilebilirliğe ilişkin tahmin

#### **4. Ekipman / Ölçümün İzlenebilirliği**

- **Zorunluluklar**

Onay ya da düzenli kalibrasyon/belirtilmiş zorunluluklar

Çalışma talimatları

Ekipman ömrünün takip edilebilirliği

Ekipmanların bakımı

Arızaların düzeltilmesi

Etiketleme

Sürekli kalibrasyon zinciri veya ölçüm ekipmanını dayanıklı primer ölçüm cihazlarına bağlayan kıyaslama (vey referans materyaline bağlayan)

- **Yazılacak dokümanlar**

Metrolojik izleme

Akredite olmuş kalibrasyon laboratuvarlarına bağlı ölçüm cihazları (kütleler, kuvvetler, debi, ısı, nem)

- Ekipman başına;
  - » Onay amaçlı işletme modu
  - » Teyit amaçlı şartname kaydı
  - » Teyit amaçlı belirsizlik tahmini
  - » Teyit amaçlı rapor
  - » Örnek raporlar
  - » Kullanım ömrü dosyası

Tüm ekipmanlar için düzenli olarak teyit/kalibrasyon

Ara izlemeler için kontrol kartı

#### **5. Numune Alımı**

- **Zorunluluklar**

Laboratuvar numune alımına geçerse:

- » Numune alımı alanı üzerine elde edilebilir plan ve prosedür
- » İstatistiksel metotlar üzerine dayalı planlar
- » Numune alım koşulları üzerine kayıt

Yazılacak olan dokümanlar

## 6. Deney Objelerine Yapılan İşlemler

- **Zorunluluklar**

Taşıma, alım, uygulanan işlemler, koruma, depolama, saklama, deney numune bertaraf edilmesi prosedürleri  
Benzersiz tanımlama sistemi

- **Yazılacak olan dokümanlar**

Numunelerin yönetim prosedürleri

- » Merkezileştirilmiş alım
- » Laboratuvarda kayıt (bir laboratuvar defteri üzerinden özel bir numaralandırma)
- » Uygun depolama
- » Saklama
- » Bertaraf etme

## 7. Deney Sonuçlarının Kalite Güvenliği

- **Zorunluluklar**

Sonuçların geçerliliğinin resmileştirilmiş takibi:

- » Düzenli olarak referans materyalleri kullanımı
- » Laboratuvarlar arası deneylere katılım
- » Tekrarlanan deneyler

- **Yazılacak olan dokümanlar**

Laboratuvarlar arası karşılaştırma  
Referans materyallerinin kullanımı  
» Referans dizilerinin kullanımı  
Kontrol kartları

## 8. Sonuçlar Üzerine Raporlar

- **Zorunluluklar**

Net, açık, anlaşılabilir olmayan, objektif  
Minimum içeriği ISO 17025 tarafından belirtilmiştir

- **Yazılacak olan dokümanlar**

Önceden belirlenmiş olan türdeki raporlar  
Her bir işletim modunde netleştirilmiş talimatlar

**Düzenlenecek Dokümanların Listesi**  
**Kalite El Kitabı**

Bölüm	Doküman kodu	Doküman adı
0	XXX-M-00-00	Kalite el kitabı özeti Kısaltmalar, tanımlar Kalite el kitabı yayınlarının listesi Organize talimatlar
4	XX-M-04-01 XXX-M-04-02 XXX-M-04-03 XXX-M-04-04 XXX-M-04-05 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 Dokümanların kontrolü ve hazırlanması Sözleşme ve müşteri taahhüdü Materyal ve malzemelerin satın alma öngörülmesi ve organize edilmesi Uyumsuzluk şikayetleri Düzeltilici 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 Ölçüm izlenebilirliği Numunelerin teslim alınmasına ve numune alma işlemlerine ilişkin koşullar Deneysel sonuçlar kalite güvencesi Sonuçlara ilişkin rapor

**Düzenlenecek Dokümanların Listesi**  
**Prosedürler**

Bölüm	Doküman kodu	Doküman adı
2	XXX-P-o2-o2	Personel yönetim prosedürü
4	XXX-P-o4-o1 XXX-P-o4-o2 XXX-P-o4-o3 XXX-P-o4-o4 XXX-P-o4-o5 XXX-P-o4-o6 XXX-P-o4-o7	Düzeltilici ve önleyici faaliyetler prosedürü Kalite kayıtlarının kontrolü prosedürü İç tetkik prosedürü Kalite kontrol prosedürü Yönetim gözden geçirme prosedürü Müşteri memnuniyeti ölçme prosedürü Doküman hazırlama ve kontrol prosedürü
5	XXX-P-o5-o1 XXX-P-o5-o2 XXX-P-o5-o3 XXX-P-o5-o4 XXX-P-o5-o5 XXX-P-o5-o6 XXX-P-o5-o7 XXX-P-o5-o8 XXX-P-o5-o9 XXX-P-o6-10 XXX-P-o5-11	Personelin yönetimi 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 Sterilizasyon prosedürü Yıkama koşullarının kontrol edilmesi prosedürü Numune kabul prosedürü

**Düzenlenecek Dokümanların Listesi (ayrıntılı bir liste değildir)**  
**Talimatlar**

Bölüm	Doküman kodu	Doküman adı
4	XXX-I-o4-o1	Personel nitelik talimatı
5	XXX-I-o5-o1 XXX-I-o5-o2 XXX-I-o5-o3 XXX-I-o5-o4 XXX-I-o5-o5	Terazi kontrol talimatı Sıcaklık ölçer kontrol talimatı Cam malzeme temizleme talimatı Tezgah temizleme talimatı Numune alma kapları temizleme talimatı

**Düzenlenecek Dokümanların Listesi (ayrıntılı bir liste değildir)**  
**Kayıtlar**

Bölüm	Doküman kodu	Doküman adı
4	XXX-E-o4-o1 XXX-E-o4-o2 XXX-E-o4-o3 XXX-E-o4-o4 XXX-E-o4-o5 XXX-E-o4-o6 XXX-E-o4-o7 XXX-E-o5-o1	İç denetim raporu Uyumsuzluk kaydı Düzeltilici faaliyetler kaydı Personel görev tanımı Eğitimlerin kayıtları Eğitim planı Personel nitelik kayıtları Sıcak kontrol kayıtları
5	XXX-E-o5-o2 XXX-E-o5-o3 XXX-E-o5-o4 XXX-E-o5-o5	Temizleme prosedürleri kaydı Cihaz bakım kayıtları Kontrol kartları kayıtları Numune kabul kayıtları

## EKLER

### Ek 1

Kim	Yetkinlik talimatı	Doc	İspat
Analist?	Doğru sonuçlar	Analiz işletme metod/yöntem?	Sonuçların kaydı
Birim Sorumlusu?			Kayıt
Gözetmen	İkili analizde uygulama		
	Gözetmenin sonuçları ile kıyaslama	Hayır	Kayıt Gözetmen imzası
	Doğru sonuçlar	Evet	Kayıt
Ön İşlemler / Preanalitik	Analizlerin yapılması için reaktifin hazırlanması		
Gözetmen	Gözetmen ile birlikte analitik zincir sonuçlarının tamamının kıyaslanması		
		Hayır	
Laboratuvar Müdür- lüğü Kalite Sorumlusu Gözetmen	İkili analizde uygulama	Evet	

*Yetkinlik onayı*

## Ek 2

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

## Ek 3

### Bir kullanım süresi yani yaşam dosyası örneği

YAŞAM DOSYASI ADI			
Tarih	Müdahale edenin İmzası	<u>Kalibrasyon – Teyit</u>	
		Sonuçlar/çıkarmı	

N°

Rev.

Sayfa 1/1

**Bir sonraki kalibrasyon/ teyit**

## Ek 4

<b>GÜNLÜK TERAZİ TAKİBİ</b>	<b>REFERANS:</b> Version n°	TALİMAT	sayfa
-----------------------------	--------------------------------	---------	-------

### AMAÇ:

KULLANIMDAN ÖNCE GÜNLÜK TERAZİ KONTROLÜ

### UYGULAYICI: GÜN İÇİN İLK KULLANICI

### DOKÜMANLAR VE/ VEYA BİLGİLER VEYA GEREKLİ MATERYALLER:

Dokümanların veya bilgilerin listesi:

- Ø Terazinin kullanım modu
- Ø Kontrol kartı
- Ø Kontrol ağırlığı

Aşağıdakilerden elde edilebilir:

- Terazinin yanında
- Terazinin yanında
- Terazinin yanında

### UYULACAK OLAN KOŞULLAR/KISITLAR :

- Ø Kullanımdan en az 30 dk. önce fişe takılır.
- Ø Terazinin su ayarı/denge ayarı (çekül kullanılarak)
- Ø Terazi bütün aksamı ısısı 15°C'den yukarıda olmalıdır.

### AKTARILACAK OLAN DOKÜMANLAR VE/VEYA BİLGİLER :

Dokümanların veya bilgilerin listesi :

- Ø Güncellenmiş ve hedeflenmiş kontrol kartı

Aktarılabacak olanlar :

- Terazinin yanındadır

### TEMEL SORUNLARIA YÖNELİK DAVRANIŞ :

Sorunlar :

- Ø Uygun olmayan değer

Yapılacak olan :

- Terazinin üzerine « arızalı » yazılı kırmızı bir etiket konulması
- Metroloji sorumlusuna haber verilmesi

<b>İlgili dokümanlar :</b>	<b>Terazi kontrol kartı</b>	
Tarih : Rev. Rev.		
Yazım : Tarih :	Teyit : Tarih :	Onay : Tarih :



## Bir terazinin günlük onay talimatı

### Ek 5

#### Kalibrasyon geçerliliğine ilişkin örnekler

#### BENEDICTE WELTE PDF DOSYASI

### Ek 6

#### Basitleştirilmiş talimat: mikrobiyoloji analiz yöntemi

#### İntestinal enterococcinin araştırılması ve sayımı. Membran filtreleme metodu.

#### *O Değişiklikler*

Değişiklik : basitleştirilmiş yazım

#### **1 Yöntem**

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

#### **2 Güvenlik**

<b>Güvenlik ve Önlemler</b>	İyi Laboratuvar Uygulamalarına (GİP) Uyulması
<b>Atıklar</b>	Bu Amaçla Kullanıma Ayrılmış Çöp Kutularına Atılmaları

#### **3 İlke (Metodun/Yöntemin Prensibi)**

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

Tipik koloniler ya ortada veya koloninin tamamında kahverengi-kırmızı veya pembe bir ortası bombişleşmiş koloninin tamamında kahverengi-kırmızı veya pembe bir renklidir.

Doğrulama  $44^{\circ}\text{C}$  ısıda önceden membran filtredeki koloniler  $44^{\circ}\text{C}$  ısıdaki ilgili besiyerine transfer edilir. Safra, eskulin ve azotür jelozu üzerindeki bütün koloniler ile birlikte membrane 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 çalkalanarak 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  $\pm 4$  saat boyunca  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  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  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ısıda önceden ısıtılmış) ve 2 saat boyunca  $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$  ısıya konulur;
- Çevreleyen ortamda siyah bir halo'ya sahip bütün tipik kolonilerin pozitif tepkime gösterdiklerinin kabul edilmesi ve bunların intestinal 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

##### Nufc/250ml

0 UFC/250ml

n UFC/250ml

veya dilüsyonların sonuçları

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

Sonuçlar (okumalar, dilüsyonlar, aşılama) E/LC/502 veya E/LC/508 sayılı formlarda bildirilmelidir.

## 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.

## 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

### EK 7: Kalite El Kitabı İçeriği

- Genel (laboratuvar tanıtımı, terimler, kısaltmalar, kitabın kullanımı, amacı ve uygulama alanları)
- Kalite politikası, hedef ve genel organizasyon şeması
- Kalite sistemi dokümanlarının yönetimi
- Personel
- Yerleşim ve binalar
- Alet – Ekipman
- Reaktifler ve sarf malzemeleri
- Analiz talimatları
- Uygunsuzluklar, düzeltici ve önleyici faaliyetler
- İç kontrol (iç tetkik)

### Kaynakça

Öncelikle yönetmelik ve uluslararası standartlaştırma takibi gerçekleştirilmelidir

Referans laboratuvarı, özellikle yeni bir Avrupa standart metodunun yayınlanması halinde TSE tarafından yürütülen standartlaştırma çalışmasından düzenli olarak haberdar edilmelidir. Mümkün olması halinde TSE, çalışma grubu içerisine dahil edilmelidir (örnek: çevrilmiş olan Fransız dokümanı FD T90521).

Sağlık Bakanlığı ile TURKAK arasında düzenli fikir alış verişi yapılmalıdır (akreditasyon).

Aşağıdakilere ilişkin kaynakça gözden geçirmesi yapılmalıdır:

- Tüm yayınlanmış olan analitik metotlar için,
- Yüzme suyu kalitesi alanına ilişkin bilimsel yayınlar hakkındaki yayınlarda.

### 1. Yönetmeliksel dokümanlar

- Directive 2006/7/EC of European Parliament and of the Council of 15<sup>th</sup> 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 modelités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans les eaux de baignades et de loisirs nautiques

### 2. Tavsiye edilen standartlar

#### 2.1. Kalite güvenliği

- 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. Numune alımı**

- ISO 5667-1: Water quality-Sampling-Part 1Ç 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 5667-16 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? Direction Régionale et Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales de Rhône-Alpes

## **2.3. Analitik metotlar**

### **2.3.1. Mikrobiyoloji**

- 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 93-08-3: 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. İnorganik kimya parametreleri**

- 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 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 15622: Water analysis: determination of threshold odour number (TON) and threshold flavour number (TFN)
- Manuel des analyses chimiques en milieu marin, Alain Aminot, Marcel Chaussepied CNEXO Brest (F) (1983) 395p.
- Methods of seawater analysis, K.Grasshoff, K.Kremling, M.Erhardt, Wiley VCH, Third Edition 624 p.

### **2.3.3. Organik kimyasal parametreler**

- 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 78-75-1 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-Methods 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 hydroxybenzotriazoles 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 organophosphorus compounds in water by dichloromethane extraction and gas chromatographic analysis
- ISO TC 147/SC 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.



