

## 36. İzolasyon ve Tanımlama Esasları

Gıda mikrobiyolojisinde izole edilen bir bakterinin tanımlanması çoğu kez önemlidir. Bir gıda maddesinden izole edilen bakterinin gerçekten *Salmonella* olup olmadığının belirlenmesi gereklidir. Buna göre ürün imha edilebilir ya da güvenli bir şekilde pazarlanabilir.

Ne olduğu hiç bilinmeyen bir izolatın tanımlanması ile belirli bir cins ya da tür olup olmadığının belirlenmesindeki yöntemler ve yaklaşımlar oldukça farklıdır. Örneğin, izolatın *Salmonella* olup olmadığının incelenmesindeki uygulamalar ile izolatın ne olduğunun araştırılmasındaki uygulamalar farklıdır.

Tanımlamada basit ve yaygın olarak morfolojik analizler ve biyokimyasal testler uygulanmaktadır. Faj tiplendirmesi ve genetik esaslı testler, ancak gelişmiş laboratuvarlarda ve genellikle bilimsel araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Bu kitabın kapsamında sadece basit morfolojik ve biyokimyasal testler verilmiştir.

Morfolojik analizler temel olarak koloni morfolojisi ve mikroskopik morfoloji olarak 2 şekilde yapılır. Koloni şekli ve büyüklüğü ile basit boyanmış ve Gram boyanmış kültürlerin mikroskopik morfolojisi bazı analizlerde çok önemli olabilmektedir. İzolata doğrudan Gram boyama uygulanarak hem morfolojisi hem de Gram reaksiyonu belirlenebilirse de, prensip olarak morfolojinin belirlenmesi amacıyla basit boyama testi uygulanmalıdır. Bunun nedeni Gram boyamada morfolojilerin yeterince ayrıntılı olarak görülemeyebilmesidir. Burada kastedilen çubuk ve kok farkı değil, pleomorfizm ve kokobasil gibi özel morfolojilerdir. Flagella boyama ile bakterinin hareketli olup olmadığı belirlenebilirse de, yarı katı besiyerinde (yumuşak agar) ya da çukur lamda hareket tespiti daha kolaydır.

Basit biyokimyasal testler genel olarak 3 şekilde yapılır;

-İndol testi örneğinde olduğu gibi sonucu pozitif ve negatif olarak değerlendirilen testler: Tanımlamada en yaygın kullanılan testler bunlardır.

-Belirli bir maddenin hangi derişimine kadar gelişme olduğunun saptanması: Burada değinilen "madde", mutlaka inhibitör olmak zorunda değildir, %50 Glikoz Broth ortamında sadece ozmofilik/ozmotolerant mayalar gelişebilir.

-Koloni rengi, koloni zon rengi, sıvı besiyerinde renk değişimi, floresan ışımaya gibi gözle yapılan değerlendirmeler: Bunlar koloni morfolojisi gibi değil, doğrudan temel biyokimyasal testler olarak değerlendirilir.

Sonucu pozitif ya da negatif olarak alınan testlerdeki değerlendirmeler test edilen bakteri türünün daha önce denenmiş yüzlerce suşu içinde yüzde kaçının bu reaksiyonu pozitif olarak verdiği ile ilişkilidir. Örneğin, *E. coli* suşlarının %100'ü VP testinde pozitif sonuç verirken, *Citr. Freundii* için laktoz testi sonucunda suşların %50'si pozitif; %50'si negatif sonuç vermektedir. Buna göre VP testi pozitif olarak elde edilen bir izolatın *E. coli* olma olasılığı varken, laktoz testi için sonuç ne olursa olsun *Citr. freundii* olup olmadığı konusunda tahminde bulunmak mümkün değildir.

Basit biyokimyasal testlere yönelik değerlendirmeler spektrofotometrik okuma ve bilgisayar destekli programlar ile ya da çoğu uygulamada olduğu gibi gözle yapılır. Nümerik taksonomik yaklaşımlar da tanımlamada her zaman geçerlidir.

Basit biyokimyasal testlerde günlük uygulanan test için pozitif ve negatif sonuç veren 2 bakterinin şahit olarak teste dahil edilmesi, ayrıca aşılammış bir Besiyeri tüpünün ya da Petri kutusunun da şahit olarak denemeye dahil edilmesi gereklidir. Bunun en tipik örneği üre testi için verilmektedir. Üre testi yapılırken, 4 adet Urea Broth besiyeri hazırlanır. Bunlardan birincisine bakteri aşılammaz ve inkübasyon

sonunda orijinal portakal kırmızısı renk izlenir (şahit). İkincisine test edilen kültür (test), üçüncüsüne negatif sonuç için *E. coli* ve dördüncüsüne pozitif sonuç için *Proteus* spp. inoküle edilir. Bu 4 tüpün beraberce inkübasyonu ve renk değerlendirilmesi sonucunda test kültürünün üre reaksiyonu belirlenir.

## Saf Kültür Tekniği

Tanımlanacak kültürün saf olarak elde edilmesi tanımlama testlerine geçmeden önceki en önemli aşamadır. Bir diğer deyiş ile saf kültür elde edilmesi tüm tanımlama testleri öncesinde yapılmış olmalıdır.

Saf kültür, standart bir Petri kutusundaki katı besiyerinde gelişen koloniden elde edilir. Buna izolat da denilir. Saf kültür elde etmek için izolasyon sırasında izole edilecek koloninin yakın çevresinde başka koloni olmamalıdır.

İzolasyonda öze kullanılacak ise kısa saplı olanların tercih edilmesi gerekir. Bunun nedeni el ile daha rahat kullanılabilmesi ve sadece istenen noktaya dokundurma kolaylığıdır. Yaklaşık 5 cm boyunda boş küçük tüplere birer birer olmak kaydı ile kürdan (Japon tipi olarak bilinen) koyulup, pamuklanarak otoklavlanması ile de iyi bir izolasyon gereci elde edilir. Sterilize edilmiş kürdan tüpten çıkartılır, koloniye değdirilir, içinde 2 mL kadar besiyeri bulunan kısa tüplerin içine bırakılır.

Kürdan kullanımında, elle tutulan ucu asla tüpteki besiyerine temas etmemelidir. İkinci olarak kürdan, içinde besiyeri olan tüple birlikte sterilize edilmemelidir. Bunun nedeni tahta kürdanın besiyerini emmesidir. Eğer kürdan ve besiyeri beraberce sterilize edilecekse kürdanın besiyerine temas etmemesi sağlanmalıdır.

Test edilen kültürde beklenmedik sonuçlar alınmıyorsa öncelikle kültürün saf olup olmadığı kontrol edilmelidir. Örneğin, *Salmonella* kuşkusunu ile selektif bir besiyerinden izole edilen tipik bir koloniye izolasyon aşamasında ya da daha sonra *E. coli* bulaşursa, uygulanan testler sırasında hem *Salmonella* 'ya hem de *E. coli* 'ye yönelik olarak pozitif sonuçlar alınacaktır.

Bu gibi şüpheli durumlarda kültür paralel olarak hedef mikroorganizma için selektif besiyerine hem de CASO Agar genel bir besiyerine öze ile tek koloni oluşturacak şekilde sürülür, inkübasyona bırakılır. Genel besiyerinde morfolojik olarak farklı koloniler varsa kontaminasyon olduğu açıktır. Kolonilerin hepsi aynı morfolojide ise, bu kontaminasyon olmadığını göstergesi değildir.

Laktoz test sonucunu gösteren selektif besiyerine sürme yapılarak, örneğin, laktoz negatif muhtemel *Salmonella* kolonisi ile laktoz pozitif herhangi bir bakteri (*E. coli*) kolaylıkla ayrılabilse de laktoz negatif olan *Proteus vulgaris* kontaminasyonu bu şekilde ayırt edilemez.

Bu gibi sorunlarla karşılaşmamak için Doğru Laboratuvar Teknikleri (Good Laboratory Practice) uygulamalarına özen gösterilmelidir. Bu konuda 02. Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı; Genel Kurallar bölümünde açıklayıcı bilgi bulunmaktadır.

## İzolasyonda 1:100 Oranı

Standart Petri kutusundan izolasyon için 100 koloni esas alınır. Bu sayıda standart 1–2 mm çaplı koloni Petri kutusu içinde düzgün olarak dağılmış ise farklı renkteki bir koloni diğerleri içinden kolaylıkla fark edilerek kontaminasyon olmaksızın güvenle izole edilebilir. Bu kural, özellikle 100 renkli koloni içinde 1 renksiz koloni için geçerlidir. 150 renkli koloni içinde 1 renksiz koloninin fark edilerek bunun izolasyonu önemli ölçüde deneyim gerektirir.

Bu durumda, örneğin, *E. coli* O157:H7 analizinde CT–SMAC Agar besiyerinde gelişebilen refakatçi floradan renkli koloni oluşturanlar, renksiz koloni oluşturan *E. coli* O157:H7'nin varlığını maskeleyebilir ve sonuç "*E. coli* O157 serotipi yoktur" şeklinde sahte negatif olarak alınabilir.

Bu şekilde sahte negatif sonuçlar gıda sanayisinde yapılan analizlerde –özellikle katı besiyeri selektivitesindeki yetersizliğe bağlı olarak- sıklıkla alınmaktadır.

Refakatçi flora baskılanmasına yönelik olarak yapılacak uygulamaların büyük çoğunluğunun hedef mikroorganizmayı da etkileyeceği açıktır. Halofil, ozmofil, termofil vb. grupların analizinde sadece hedef mikroorganizmanın bu özelliği ile refakatçi flora baskılanmaktadır. Örneğin, ozmofil maya analizinde (bakınız; 17.03. Bölüm) %50 glikoz konsantrasyonu zaten bu grubun gelişimi için gerekli iken, refakatçi floranın bu derişimdeki glikozda gelişimi tümüyle mümkün değildir.

Bu örnek tümüyle sıra dışı olup, çok ender birkaç mikroorganizma için geçerlidir. Oysa, gıda mikrobiyolojisindeki analizlerin büyük çoğunda hedef mikroorganizma analizi sırasında refakatçi flora baskılaması önemli ölçüde görülür. Çok tipik bir örnek olmak üzere *Listeria* analizinde laktobasiller gerek zenginleştirme gerek selektif katı besiyerinde gelişebilirler.

Selektif zenginleştirme aşamasında ya da selektif katı besiyerinde refakatçi floranın baskılanması, besiyeri geliştirme çalışmalarının temellerinden birisidir.

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde sahte negatif sonuçlardan olabildiğince kaçınmak için, özellikle yoğun refakatçi flora varlığı olan gıdalardaki patojen analizlerinin Singlepath kitleri ile yapılması ayrı bir önem taşımaktadır.