

Koliform Bakteriler

[01. Giriş](#)

[02. Sayılması / Aranması](#)

[03. Kullanılan Besiyerleri](#)

[03.01. LST Broth](#)

[03.02. BGB Broth](#)

[03.03. Lactose Broth](#)

[03.04. MacConkey Broth](#)

[03.05. LMX Broth](#)

[03.06. ReadyCult Coliforms](#)

[03.07. VRB Agar](#)

[03.08. MacConkey Agar](#)

[03.09. EMB Agar](#)

[03.10. Lactose TTC Agar Tergitole Agar](#)

[03.11. Presence – Absence Broth](#)

01. Giriş

Koliform grup bakteriler tanım olarak Gram negatif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, çubuk şeklinde ve laktozdan 48 saat içinde gaz oluşturan bakterilerdir. Bu tanıma göre koliform grup bakteriler oldukça karışık bir grubu oluşturmaktadırlar ve *Enterobacteriaceae* familyası içinde bu tanıma giren çok sayıda bakteri bulunur. Bununla beraber gıda mikrobiyolojisi açısından koliform grup bakteriler denildiğinde *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* ve *Klebsiella pneumoniae* anlaşılmaktadır. Bunlar gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında en sık aranan / sayılan bakteri grupları içinde yer alırlar.

Bu bakterilerden fekal koliformlar olarak tanımlanan grubun gıda maddelerinde bulunmasına genel olarak izin verilmez. Fekal koliformların en bilinen üyesi *E. coli* 'dir.

Koliform grup bakteriler ile ilgili fazla genel bilgi için [burayı tıklayın](#).

02. Sayılması /Aranması

Gıda mikrobiyolojisinde toplam koliform bakteri sayımı genel olarak En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemi ile yapılır. Bunun nedeni gıdalarda bulunmasına izin verilen koliform grup bakteri sayısının katı besiyeri kullanılan standart kültürel yöntemler ile belirlenemeyecek kadar az olmasıdır. Buna paralel olarak membran filtrasyon yöntemi de koliform bakteri analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber katı besiyeri kullanımı da söz konusudur.

Gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaların analizi ; temel ilkeler için [burayı tıklayın](#).

Koliform grup bakterilerin EMS yöntemi ile sayılmasında en yaygın kullanılan besiyeri Lauryl Sulfate Tryptose (LST ; Merck 1.10266) Broth besiyeridir. Ekim ve 35 – 37 °C 'da 24 saat inkübasyon sonrasında tüplerde gelişme (bulanıklık) ve Durham tüpünde gaz görülen tüpler

pozitif olarak değerlendirilir. Negatif tüpler için inkübasyona 24 saat daha devam edilir. ISO (ve dolayısı ile TSE) ile FDA gibi uluslararası kontrol kuruluşları LST besiyerinde alınan pozitif sonuçların Brilliant Green Bile (BGB ; Merck 1.05454) Broth %2 besiyerinde doğrulanmasını önermektedirler. Gıda sanayiinde yapılan pratik uygulamada LST Broth besiyerinde negatif sonuçlar için ilave 24 saat inkübasyon ve BGB Broth besiyerinde doğrulamaya gerek duyulmamaktadır.

Toplam koliformların EMS yöntemi ile sayımında sıvı besiyeri olarak Lactose Broth (Merck 1.07661), MacConkey Broth (Merck 1.05396) gibi besiyerleri kullanılabilirse de yukarıda belirtildiği gibi en yaygın olarak kullanılan ve uluslararası kontrol kuruluşlarının standartlarında da yer alan besiyeri LST Broth 'dur.

Özellikle içme veya kullanma sularının toplam koliformlar açısından analizinde Durham tüpüne gerek duyulmayan Fluorocult LMX Broth (Merck 1.10620) besiyeri kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Bu besiyerinin 50 ya da 100 ml su örneğinde koliform bakteri var/yok şeklinde analizinin yapıldığı pratik uygulamalı sistemleri de (Readycult Coliforms ; Merck 1.01298) vardır. Sularda koliform bakterilerin var / yok analizinin yapıldığı yeni bir besiyeri ise Presence – Absence Broth (Merck 1.00414) besiyeridir.

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde toplam koliform sayımı için en yaygın kullanılan katı besiyeri ise Violet Red Bile (VRB Merck 1.01406) Agar besiyeridir. Yaygın olmamakla beraber McConkey Agar (Merck 1.05465), Eosin Methylen Blue (EMB) Agar (Merck 1.01347) besiyerleri de yine bu amaçla kullanılabilir.

Özellikle hasar görmüş olan koliform bakterilerin katı besiyerinde sayımı için analiz edilecek örnek Triptik Soy Agar (CASO Agar ; Merck 1.05458) besiyerine yayma yöntemi ile ekilmekte, besiyeri örneği emdikten sonra (yaklaşık 5 – 10 dakika) üzerine ikinci kat olarak VRB Agar besiyeri dökülmektedir.

Katı besiyerlerinin koliform analizinde kullanılmasında en büyük değerlendirme hatası gelişen kolonilerin tanımlanarak analiz edilen gıdanın “sağlığa uygun / uygun değil” şeklindeki yorumudur. Her ne kadar yasalar gıdalarda sağlığa aykırı bakteri bulunmamasını emrediyor ise de aynı yasalar EMS yöntemi kullanılarak yapılan analizde belirli sayıda koliform bulunmasına izin vermektedirler. Bir diğer deyiş ile, sağlığa aykırı da olsa *Klebsiella pneumoniae* gibi bazı koliform bakterilerin az sayıda bulunması kabul edilmektedir. Burada yoruma gerek yoktur. Kuşkusuz, bu çelişkiyi yaratan aynı yasanın farklı maddeleridir. Gıda kodeksi altında bu çelişkiler ortadan kaldırılmaktadır.

Membran filtrasyon yöntemi ile sayımda üretici firmaların önerdiği besiyerleri kullanılabilceği gibi özel olarak membran filtrasyonla sayım için geliştirilmiş olan Lactose TTC Agar with Tergitole Agar (Merck 1.07680) ile standart kültürel yöntemde kullanılan diğer tüm katı besiyerleri kullanılabilir.

Koliform bakterilerin analizinde PetriFilm, empedans yöntemi uygulamaları da bulunmaktadır.

Koliform grup bakterilerin sayımı ile ilgili daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

03. Kullanılan Besiyerleri

03.01. LST Broth (Merck 1.10266)

Dehidre besiyeri tek kuvvet için 35,5 g/litre ; çift kuvvet için 71,0 g/litre olacak şekilde distile su içinde eritilir, içinde durham tüpü bulunan tüplere 10' ar ml dağıtılıp otoklavda 121 °C' da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı renktedir. Buzdolabında 2 ay, oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan lauryl sulfatı refakatçi floranın gelişimini baskımlarken yüksek düzeyde bulunan besin maddeleri ve fosfat tampon "laktozu yavaş kullanan" koliform bakterilerin dahi hızlı gelişimini ve fazla miktarda gaz çıkışını sağlar. İnkübasyon sonunda gelişme saptanan tüplerde gaz çıkışı durham tüplerinde gaz birikmesi ile belirlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyerinden tek kuvvette 1408 tüp hazırlanır. Bu besiyeri ile ilgili daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

03.02. BGB Broth (Merck 1. 05454)

Dehidre besiyeri 40,0 g/l olacak şekilde distile su içinde eritilir, içinde durham tüpü bulunan tüplere 10' ar ml dağıtılıp otoklavda 121 °C' da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşil renktedir. Buzdolabında 2 ay, oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan brilliant green ve safra tuzları refakatçi floranın gelişimini baskımlarken, koliform grup bakterilerin laktozdan gaz oluşturması gelişme ve durham tüpünde gaz birikmesi ile belirlenir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1250 tüp hazırlanır. Bu besiyeri ile ilgili daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#). Bu besiyeri Brilliant Green Bile Lactose Broth ve BRILA Broth isimleri ile de bilinir.

03.03. Lactose Broth (Merck 1.07661)

Tek kuvvette 13,0 g/l, çift kuvvette 26,0 g/l olarak distile su içinde hazırlanır, içinde Durham tüpü bulunan tüplere 10 'ar ml dağıtılıp, otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsıdır. 35-37 °C 'da 24 (gerekirse 48) saat inkübasyondan sonra gelişme ve Durham tüplerinde gaz birikmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir. 500 g olan dehidre besiyeri ile standart tek kuvvette 3846 tüp hazırlanabilir. Bu besiyeri ile ilgili daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

03.04. MacConkey Broth (Merck 1.05396)

Dehidre besiyeri tek kuvvette 35,0 g/l, çift kuvvette 70,0 g/l olacak şekilde distile su içinde eritilir, içinde Durham tüpü bulunan standart test tüplerine 10 'ar ml dağıtılıp, otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve menekşe renklidir. 35-37 °C 'da 24 (gerekirse 48) saat inkübasyondan sonra gelişme olması ve Durham tüplerinde gaz birikmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Gelişme pH indikatörü nedeni ile besiyeri renginin sarıya dönüşmesi ile kolaylıkla belirlenir. 500 g olan 1 kutu ile standart tek kuvvette olmak üzere 1428 tüp hazırlanır. Bu besiyeri ile ilgili daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

03.05. Fluorocult LMX Broth (Merck 1.10765)

Genellikle su örneklerinde koliform grup bakteriler ile *E. coli* 'nin beraberce sayımı için kullanılan bu besiyeri hakkında ayrıntılı bilgi için [burayı tıklayın](#).

03.06. Fluorocult ReadyCult Coliforms (Merck 1.01298)

LMX Broth besiyerinin bir modifikasyonudur. Genellikle su örneklerinde koliform grup bakteriler ile *E. coli* 'nin beraberce sayımı için kullanılan bu besiyeri hakkında ayrıntılı bilgi için [burayı tıklayın](#).

03.07. VRB Agar (Merck 1.01406)

Dehidre besiyeri 39,5 g/l olacak şekilde distile su içinde karıştırılarak kaynatılır ve kaynama başladıktan sonra en çok 2 dakika daha kaynama sıcaklığında tutulup, soğuyunca steril petri kutularına 12,5 ml dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon, kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. VRB Agar besiyerinin aşırı ısıtılmasından kaçınılmalıdır. Aşırı ısıtma selektiviteyi azaltır. Kaynar su banyosundaki ısıl işlem etkinliğinin sağlanması için besiyerinin 500 ml' den fazla hacimlerde hazırlanmaması önerilir. Önceden 1 litre erlen içine 500 ml destile su konulup ağzı kapatılarak otoklavda sterilize edilmesi ve besiyerinin bu erlende hazırlanıp eritilmesi önerilir. Hazırlanmış besiyeri parlak ve kırmızı-kahve renklidir. Besiyeri bileşiminde bulunan safra tuzları ve kristal viyole başta gram pozitifler olmak üzere refakatçi floranın gelişimini inhibe ederken laktoz pozitif bakterilerin varlığı pH indikatörü ile koloni renginin kırmızıya dönüşmesi ve safra asitlerinin koloni etrafında çökelti oluşturması ile belirlenir. Dolayısıyla 35 –37 °C 'da 18 – 24 saat süren inkübasyondan sonra 1-2 mm çapında kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler laktoz pozitif Enterobacteriaceae familyası üyeleri olan koliform grup bakteriler olarak sayılır. Enterokoklar ve koliform grup dışındaki *Klebsiella* türleri bu besiyerinde toplu iğne başı büyüklüğünde küçük pembe koloniler oluştururlarken, laktoz negatif Enterobacteriaceae üyeleri renksiz koloniler meydana getirirler. 500 g olan 1 kutu dehidre VRB Agar besiyeri ile 12,5 ml/petri olacak şekilde 1012 adet petri kutusu hazırlanabilir. Bu besiyeri ile ilgili daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

03.08. MacConkey Agar (Merck 1.05465)

Koliform grup bakterilerin izolasyonu için kullanılan besiyerleri içinde selektivitesi en az olanlardan birisidir. Dışkı, idrar, atık su ve gıda örneklerinden koliform bakteriler yanında *Salmonella* ve *Shigella* izolasyonu için de kullanılır. 50,0 g/l olacak şekilde distile suya ilave edilir, kaynatılarak eritilir ve otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir. Besiyeri bileşiminde bulunan safra tuzları ve kristal viyole Gram pozitif refakatçi florayı baskılar, pH indikatörü olan neutral red laktozun kullanıldığını ya da kullanılmadığını gösterir. 35 –37 °C 'da 18 –24 saat inkübasyon sonunda laktoz negatif bakteriler renksiz koloniler yaparken, laktoz pozitif olanların kolonileri kırmızı olur ve etrafları pH düşmesine bağlı olarak safra asitlerinin presipitasyonu nedeni ile bulanık bir zon ile çevrilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı kahve renklidir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile standart 12,5 ml/petri hesabı ile 800 petri hazırlanır. Bu besiyeri ile ilgili daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

03.09. EMB Agar (Merck 1.01347)

Dehidre besiyeri 36 g/l konsantrasyonda destile su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilip petrilere dökülür. Besiyerindeki boyalar refakatçı floranın gelişimini baskılar. Bu besiyeri, bileşimindeki laktoz ve sakkaroz nedeni ile asıl olarak her iki karbohidrat bakımından da negatif olan *Salmonella* ve *Shigella* 'nın ayrımı için geliştirilmiş olmakla beraber, yaygın olarak koliform grup bakteri sayımında ve *E. coli* tanımlanmasında kullanılmaktadır. 35 – 37 °C 'da 24 saat inkübasyon sonunda saydam, amber renkli koloniler *Salmonella* ve *Shigella* gibi laktoz ve sakkaroz negatif bakterileri, menekşe renkli ve yansıyan ışıkla yeşilimsi metalik parlak görülen koloniler *E. coli* 'yi, pembe – menekşe renkli, mukoid, gri kahverengi merkezli koloniler *Enterobacter*, *Klebsiella* ve diğer koliformları gösterir. 500 g olan 1 kutu besiyeri ile 12,5 ml/petri hesabı ile 1111 adet petri kutusu hazırlanır. Bu besiyerinin Levine tarafından modifiye edilmiş formu olan Levine EMB agar (Merck 1.01342) yukarıdaki özelliklere ilaveten *Candida albicans* 'ın hızlı tanımlanmasında kullanılır. Bu besiyeri ile ilgili daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

03.10. Lactose TTC Agar with Tergitole (Merck 1.07680)

Özellikle su analizlerinde koliform bakterilerin membran filitasyon yöntemi ile sayılmasında kullanılır. 53,9 g/l konsantrasyonda olacak şekilde destile su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir. 45 – 50 °C 'a soğutulup, 0,025 g/l konsantrasyonda olacak şekilde filitre ile sterilize edilmiş 2,3,5, Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC ; Merck 1.08380) ilave edilir, karıştırılır ve petrilere en az 5 mm kalınlık olacak şekilde dökülür. TTC ilavesinde pratik olarak 100 ml bazal besiyerine %0,05 konsantrasyondaki çözültiden 5 ml ilave edilmektedir. TTC çözültisi ve dolayısı ile TTC ilave edilmiş ve petrilere dökülmüş besiyeri buzdolabında ve karanlıkta saklanmak koşulu ile en çok 1 hafta depolanabilir. 35 –37 °C 'da 18 – 24 saat inkübasyondan sonra sarı renkli koloniler koliform bakterileri (laktoz pozitif), kırmızı koloniler *Pseudomonas* gibi laktoz negatif kolonileri gösterir. Besiyeri genellikle standart membran filitrenin yerleştirileceği gibi 60 mm steril tek kullanımlık plastik petrilere hazırlanır. Bu petrilere 5 mm yükseklik olacağına göre 15 ml/petri hesabı ile 500 g olan 1 kutu besiyeri ile 618 adet petri hazırlanır. Bu besiyeri ile ilgili ayrıntılı [bilgi için tıklayın](#).

03.11. Presence – Absence Broth (Merck 1.00414)

Dehidre besiyeri üçlü kuvvette 91,5 g/l konsantrasyonda hazırlanır, 250 ml erlen ya da şişelere 50 ml olacak şekilde dağıtılır, otoklavda 121 °C 'da 12 dakika sterilize edilir. Üzerine analiz edilecek su örneğinden 100 ml ilave edilir, karıştırılır ve 35 °C 'da 24 saat inkübe edilir. Negatif sonuçlar için ilave 24 saat inkübasyon önerilir. Laktoz pozitif olan koliform bakterilerin laktozu fermente etmelerine bağlı olarak besiyerinin orijinal kırmızı rengi bromocresol purple indikatörü nedeniyle sarıya döner. Gerekirse erlenin hafifçe çalkalanması ile çıkan gaz baloncuklarının izlenmesi ile gaz oluşumu da değerlendirilebilir. Asit ve/ veya gaz pozitif sonuçların Brilliant Green Bile Broth ([Merck 1.05454](#)) besiyerinde doğrulanması önerilmektedir. Besiyeri bileşimindeki pepton ve et ekstraktı koliformlar için iyi besin kaynağı iken, fosfat tampon ve tuz iyi bir ozmotik denge sağlar. Lauril sülfat ise refakatçı flora üzerinde olumsuz etki yapar. 500 g olan bir kutu dehidre besiyeri ile 100 ml su analizinde kullanılmak üzere 109 adet 50 ml triple konsantr (üç kuvvette) besiyeri hazırlanabilir. Bu besiyeri ile ilgili daha fazla bilgi almak için [burayı tıklayın](#).