

İzolasyon ve İdentifikasyon¹

01. İzolasyon

01.01. Genel Bilgiler

01.02. İzolasyon Amacıyla Besiyeri/Yöntem Seçimi

01.03. İzolasyon İşlemi

02. İdentifikasyon

02.01. Genel Bilgiler

02.02. Morfolojik ve Fizyolojik Özelliklerin Belirlenmesi

02.03. Biyokimyasal Testler

02.04. Serolojik Testler

02.05. Faj Tiplendirmesi

02.06. Genetik Analizler

02.07. Nümerik Taksonomi

01. İzolasyon

01.01. Genel Bilgiler

İzolasyon, "ayırarak" anlamına gelir. Mikrobiyolojide izolasyon denildiğinde bir mikroorganizmayı saf halde elde etmek anlaşılır.

Mikroorganizmalar doğada çok ender olarak saf halde bulunurlar. Genellikle karışık halde bulunan mikroorganizmalardan çeşitli amaçlar ile saf kültürlerin elde edilmesi gerekir. Saf kültür, sadece bir tek mikroorganizma hücresinden çoğaltılmış olan mikroorganizma topluluğudur. Söz konusu amaçlardan bazıları aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- Endüstriyel önemi olan mikroorganizmalar saf halde elde edilmelidir. Örneğin süt ürünlerinin yapımında kullanılan bakteriler, şarap mayası, baklagillerle simbiyotik yaşayarak azot fikse eden bakteriler, tarımsal savaşta kullanılan bakteriler gibi endüstriyel mikroorganizmalar saf halde kullanılmalıdır.

- Her hangi bir bozulma ve/veya hastalık etmeninin belirlenmesi için mikroorganizma saf halde elde edilmelidir.

- Eğitim, şahit mikroorganizma gibi amaçlarla kullanılan mikroorganizmalar da saf halde elde edilmelidir.

- Gıda mikrobiyolojisi açısından izolasyonun en önemli uygulamalarından birisi de belirli bir miktar gıda içinde bulunmasına izin verilmeyen *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 *Listeria* gibi patojenlerin varlığının gösterilmesi için yapılan çalışmalarda, kontrol edilen gıdalarda bu bakterilerin kolonileri izole edilmeye çalışılır.

¹ Kaynak : **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları ; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü**

İzolasyon; karışık bir kültürden sadece istenen bir ya da daha fazla mikroorganizmanın saf halde elde edilmesi, karışık bir kültürde bulunan tüm mikroorganizmaların ayrı ayrı saf halde elde edilmesi, saf olduğu sanılan mikroorganizmanın saflık kontrolünün yapılması şeklinde olabilir. Bir diğer deyiş ile farklı amaçlar ile farklı izolasyon çalışmaları yapılabilir. Her amaç için yapılacak izolasyon çalışmalarında uygulanacak çalışma yöntemleri tümüyle birbirinden farklıdır. Bu farklılıklar selektif bir besiyerinden tipik koloninin ayrılması ile başlayıp immunomanyetik seperasyon tekniğine kadar çok farklı yaklaşımları içerir. Bu bölümde temel olarak standart yöntem olan besiyerinden izolasyon uygulaması anlatılmıştır.

01.02. İzolasyon Amacıyla Besiyeri/Yöntem Seçimi

İzolasyon amacıyla kullanılan tüm yöntemlerde "besiyeri seçimi" en önemli aşamadır. Amaca ve izolasyon yöntemine göre sıvı veya katı besiyeri, genel veya selektif besiyeri kullanılır.

Genel besiyerlerinde bileşimde sadece besin maddeleri vardır ve bu besiyerlerinde çok sayıda mikroorganizma gelişebilir. Yağsız süt (skim milk), Nutrient Broth, Tryptic Soy Pepton Broth ile bunların agarlı formülleri ile Plate Count Agar genel besiyerleridir. Selektif besiyerleri ise belirli grup ya da tek bir mikroorganizmanın geliştirilmesine yönelik olarak sırasıyla yarı selektif ve tam selektif olarak hazırlanır. Tam selektif besiyeri hazırlamak oldukça zordur ve sadece bazı mikroorganizmalar için formülize edilebilmiştir. Yarı selektif besiyerleri, geliştirilmesi istenen hedef mikroorganizmayı diğerlerinden koloni morfolojisi gibi basit bir şekilde ayırt edebilmeye olanak sağlıyor ise bunlara ayırt edici (diferansiyel) besiyerleri adı verilir ve bunlar en yaygın kullanılan selektif besiyerleridir. Kolonilerin morfolojik olarak ayırt edilebilmesi yanında çeşitli pH indikatörleri ile koloni renginde farklılık, MUG reaksiyonu gibi kolonide ışımaya gibi yöntemlerle de diferansiyel besiyerleri hazırlanabilir.

Selektif besiyeri hazırlanmasında hedef mikroorganizma ile beraber bulunabilen refakatçi floranın gelişmesi baskılanmaya çalışılır. Bu amaçla, refakatçi florayı en fazla baskılayacak ancak hedef mikroorganizmayı en az etkileyecek kimyasallar kullanılmakta, hedef mikroorganizmanın yararlanabileceği ancak refakatçi floranın yararlanamayacağı kompleks besin maddeleri kullanılmakta, hedef mikroorganizmanın kullanıp diğerlerinin kullanamayacağı özel gelişme faktörleri kullanılmaktadır. Bunlara ilaveten çiğ süttten *S. lactis* izole edilmek isteniyor ise bu çiğ süttten peynir yapılır, bu süre içinde *S. lactis* sayısı hızla yükselir ve izolasyon şansı artar. Bu uygulama izole edilmek istenen bakteri lehine, ancak refakatçi flora zarar vermeden yapılan bir özel zenginleştirme işlemidir.

Refakatçi flora içinden hedef mikroorganizmanın seçimi için yüksek inkübasyon sıcaklığında ve/veya inkübasyon atmosferinde refakatçi floranın baskılanması da mümkündür. Pastörizasyon gibi ön uygulamalar ile de refakatçi flora aleyhine ve dolaylı olarak hedef mikroorganizma lehine uygulamalar da yapılabilir. Sporlu bir bakteri olan *Bacillus cereus* 'un çiğ sütlerden izole edilmesi için selektif besiyerleri kullanılmakla beraber *B. cereus* ile bulunabilen refakatçi flora içindeki bazı bakteriler de bu selektif besiyerinde gelişmekte ve *B. cereus* izolasyonunu güçleştirmektedir. Sütün pastörize edilmesiyle sporsuz refakatçi flora öldürülür ve geriye sadece sporlu *Bacillus* türleri kalır.

Aşağıda tam ve yarı selektif besiyeri için hayali bir örnek verilmiştir. Ortamda A, B, C, D, E, F, G bakterileri beraberce bulunmaktadır. Bu bakterilerin çeşitli özellikleri ise çizelge 1 'de verilmiştir.

Bu bakterilerden sadece (A)'nın izolasyonu için bir besiyeri hazırlamak gerekirse ; ortama laktoz katıldığı için laktozu kullanamayan B, D, E bakterileri gelişemeyecekler (ya da C kaynağı olarak azotlu bileşiklerin, örneğin peptonların kullanılmasına bağlı olarak, geç gelişecekler) ancak A'nın yanında C, F, G de gelişebilecektir. C bakterisi 45 °C'da yapılan inkübasyonda gelişemeyecektir. D bakterisi de aynı şekilde yüksek inkübasyon sıcaklığında gelişemeyecektir, ancak zaten bu bakterinin gelişmesi laktoz kullanılması, bir diğer deyişle basit besin maddelerinin yokluğu nedeniyle engellenmiştir. Şu halde laktoz kullanımı ve yüksek inkübasyon sıcaklığı ile ortamdaki 7 bakteriden A, F, G gelişebilecek diğerleri gelişemeyecektir. A bakterisinin 4 ppm antibiyotiğe dirençli olmasına rağmen F ve G bakterilerinin ancak 3 ppm antibiyotiğe dirençli olabilmeleri nedeniyle besiyeri bileşimine 4 ppm antibiyotik katılması ile F ve G bakterilerinin üremeleri önlenecek dolayısıyla sadece A'nın gelişebileceği tam selektif bir besiyeri elde edilmiş olacaktır. Görüldüğü gibi bu örnekte tuza dirençlilik özelliği besiyeri bileşiminin belirlenmesinde kullanılmamıştır.

Çizelge 1. Tam ve Yarı selektif Besiyeri için Örnek

Bakteri	Laktozu Kullanabilme	45 °C 'da gelişebilme	Antibiyotiğe Direnç ppm	Tuza Direnç %
A	Evet	Evet	4 ppm	% 3
B	Hayır	Evet	5 ppm	% 2
C	Evet	Hayır	4 ppm	% 1
D	Hayır	Hayır	3 ppm	% 5
E	Hayır	Evet	3 ppm	% 2
F	Evet	Evet	3 ppm	% 3
G	Evet	Evet	3 ppm	% 2

Aynı bakterilerden sadece D'nin izolasyonu için bir besiyeri hazırlanmak istenirse, besiyeri bünyesine ilave edilecek %5 (hatta %4) konsantrasyondaki tuz diğer tüm refakatçi bakterilerin gelişmesini önleyecektir.

Bu kez F bakterisinin izolasyonu için bir besiyeri hazırlanmak istenirse yine laktoz katılması ve yüksek inkübasyon sıcaklığı ile B, C, D, E bakterileri elimine edilir. F bakterisi 3 ppm antibiyotiğe dirençlidir. Ancak A ve G bakterileri de bu konsantrasyonda üreyebilmektedirler. Dolayısıyla antibiyotik dirençliliği bu besiyeri kompozisyonunda yararlı değildir. A ve F bakterileri %3 tuz, G %2 tuz konsantrasyonuna dirençli olduklarından, besiyeri bünyesine %3 tuz ilavesi ile G bakterisinin gelişmesi önlenecek, ancak, A'nın gelişmesi bu özellikler kullanılarak önlenemeyecektir. Bu durumda F için tam değil yarı selektif bir besiyeri elde edilmiş olur. Bu besiyerinde A ve F'nin tüm koloni özellikleri aynı ise besiyeri "yarı selektif" A ve F'nin koloni yapıları çıplak gözle ayrılabilir şekilde farklı ise besiyeri "ayırıcı" olarak tanımlanır.

01.03. İzolasyon İşlemi

Mikroorganizma izolasyonunun temel basamağı "koloni elde edilmesidir". İzolasyonda kullanılacak materyalin özelliğine göre farklı ön işlemler gerekebilir.

- Materyal sıvı ise doğrudan katı besiyerine sürme yapılır.

- Materyal katı ise öncelikle serum fizyolojik, ringer çözeltisi, peptonlu su ile muamele edilerek katı materyaldeki mikroorganizmaların sıvıya geçirilmesi sağlanır. Katı materyalin özelliğine göre farklı uygulamalar gerekebilir. Aşağıda bu konuda çeşitli örnekler verilmiştir.

- Peynirden laktobasil izolasyonu isteniyorsa peynir rendelenir veya kum ile ezilir veya blenderden geçirilir. Böylece peynir kitlesindeki tüm mikroorganizmalar homojen bir şekilde sıvı faza geçirilmiş olur.

- Peynirden anaerobik bir bakteri izole edilmek isteniyorsa yine kitledeki mikroorganizmaların sıvı faza geçirilmesi gerekir; ancak bu amaçla blender kullanılamaz. Bunun nedeni, blenderde parçalama sırasında kitle oksijenle aşırı şekilde temas edecek ve bu durumdan anaerobik bakteri zarar görecektir.

- Şeker, tuz gibi suda rahat eriyebilen materyal doğrudan eritilerek çözelti haline getirilir.

- İzolasyon materyali olarak toprak kullanılıyorsa önce bakterilerin toprak partiküllerinden ayrılması ve iyi bir dağılımı (dispersiyonu) sağlanmalıdır. Bu amaçla Tween 80 ile seyreltik NaOH veya KOH gibi maddeler kullanılabilir.

- Kuru kayısı yüzeyinde koliform bakteri aranıyorsa meyveler suya atılır, ara sıra karıştırılarak yüzeydeki mikroorganizmaların suya geçmesi sağlanır. Burada sadece yüzey florası araştırıldığından meyvenin tümüyle parçalanmasına gerek yoktur.

Sürme işleminden sonra uygun sıcaklık ve atmosfer ortamında (aerobik, mikroaerofil, anaerobik) inkübe edilerek koloni oluşması beklenir. Oluşan koloniler arasından etrafında başka koloniler olmayan biri seçilir ve bu koloni bir öze ile besiyeri üzerinden hafifçe kazınır sonra derhal 1-2 ml steril serum fizyolojik içinde süspand edilir.

Koloni "katı besiyerinde tek bir hücrenin çoğalması sonunda meydana gelen milyonlarca hücrenin oluşturduğu yapı" olarak tanımlanır. Bir diğer deyiş ile koloni tek bir hücreden oluşur yani koloninin besiyerinden kazınması ve serum fizyolojik içinde süspand edilmesi ile saf bir kültür elde edilmiş olur. Bu süspansiyondan, daha sonra çalışmanın amacına göre uygun sıvı veya katı besiyerine ekim ya da mikroskopik incelemeler yapılır.

Bazı çalışmalarda yukarıda açıklanan yöntemle elde edilen koloni süspansiyonu saf olmayabilir. Katı besiyerinde çok yakın olarak bulunan 2 farklı türdeki bakteri beraberce gelişerek tek bir koloni oluşturabilirler. Bu durum aynı koloni morfolojisi veren mikroorganizmalarda görülebilir. Farklı koloni morfolojileri veren bakteriler de tek bir koloni gibi görülebilir. Örneğin (A) bakterisi küçük sarı koloni (B) bakterisi büyük turuncu koloni oluşturuyorsa ve bu iki bakteri birbirlerinin gelişmesini engellemiyorlar ise inkübasyonun ileri dönemlerinde (B) bakterisinin kolonisi (A) bakterisinin kolonisini içine alır. Bu gibi yanılgılardan kurtulmak için elde edilen koloni süspansiyonunun çeşitli genel ve selektif besiyerlerine sürülerek saflık kontrolünün yapılması veya reizolasyon önerilir.

02. İdentifikasyon

02.01. Genel Bilgiler

İdentifikasyon, "tanıma" anlamına gelir. Mikrobiyolojide identifikasyon denildiğinde izole edilmiş bir mikroorganizmanın cins ve türünün (ya da serotipinin) belirlenmesi anlaşılır. İzolasyon bölümünde deyinildiği gibi identifikasyon amacı ile de kullanılan basit biyokimyasal testler ile immunolojik, genetik, immunoenzimatik vb. pek çok gelişmiş yöntem bulunmaktadır. Yine bu bölümde standart yöntem olarak morfolojik ve biyokimyasal özelliklere göre yapılan identifikasyon ağırlıklı olarak anlatılmış, serolojik testler, faj tiplendirmesi bölümlerine ise temel kavram olarak kısaca değinilmiştir.

İdentifikasyonda genel olarak üç basamak vardır. Bunlar sırasıyla morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi, biyokimyasal testler ve eğer gerekli ise serolojik ve/veya toksin belirleme testlerdir. Biyokimyasal testler de kendi içinde belirli aşamalar ile yapılır. Elde edilen bulgular "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" gibi temel kaynaklarda verilen sonuçlarla karşılaştırılır ve buna göre sonuç elde edilir.

İdentifikasyon zor, deneyim isteyen, uzun süre alan ve pahalı bir uygulamadır. Yüzlerce identifikasyon testi arasından belirli bir sistematik yaklaşım ile en basit ve en çabuk sonuç verecek olanlar seçilmelidir. İzolatın elde edildiği materyal izolatın ne olduğunun veya ne olmadığını tahmin edilmesinde önemli bir veri kaynağıdır. Buna ilaveten morfolojik özellikler, izole edilen besiyerinin özellikleri, koloni yapısının incelenmesi ile identifikasyonda önemli ölçüde yol alınır. Örneğin topraktan genel bir besiyeri kullanılarak aerobik inkübasyon sonunda elde edilmiş Gram pozitif, spor oluşturan çubuk bakteri çok büyük bir olasılıkla *Bacillus* cinsine aittir. Çeşitli biyokimyasal testler uygulanarak izolatın gerçekten basil olup olmadığı, basil ise hangi türe ait olduğu belirlenebilir. Kuşkusuz bu izolata koklara, Gram negatif çubuklara, mutlak anaeroblara uygulanan testler uygulanmayacaktır.

İzolatın morfolojik olarak incelenmesi identifikasyonun ilk ve belki de en önemli aşamasıdır. Bu işlemin önemi, daha sonra yapılacak testlere basamak olduğundan, burada yapılacak en küçük bir hata ileriki testlerde büyük yanlışlara yol açabilir. Basit ışık mikroskobu veya gerekli ise faz kontrast mikroskop veya elektron mikroskop kullanılarak yapılan mikroskobik incelemeler ve çeşitli boyama yöntemleri uygulanması ile izolatın morfolojisi, gram reaksiyonu, sporlu olup olmadığı, sporlu ise sporun hücre içindeki konumu, flagellası olup olmadığı, flagellalı ise flagella sayısı ve konumu belirlenir. Baird-Parker Agar gibi selektif bir *Staphylococcus aureus* besiyerinden izole edilen tipik bir koloniye basit boyama uygulandığında mikroskopta yuvarlak ve üzüm salkımı gibi görüntü alınır ise identifikasyon bu aşamada cins aşamasına kadar gelmiştir. Ancak VRB Agar gibi yine, ancak bu kez koliform grup bakteriler için selektif bir besiyerinden izole edilen ve mikroskobik incelemede Gram negatif çubuk olduğu onaylanan bakterinin identifikasyonu familya düzeyinde dahi belirlenemez.

Bakteriler genel olarak morfolojik ve fizyolojik karakterlerine göre sınıflandırılırlar. Oksijen gereksinimleri ve karbohidratları (özellikle glikozu) kullanma durumları identifikasyonda önemli rol oynar. Örneğin aerobik, gram negatif çubuklar identifikasyon amacıyla ayrı bir grup içinde toplanmışlardır. Bunlar şekerleri oksidatif olarak kullanılırlar. Fakültatif anaerobik gram negatif çubuklar ise şekerleri fermentatif olarak kullanırlar. Bunlar da ayrı bir grup içinde toplanmışlardır. Her grup içinde çok sayıda cins ve tür bulunur. Bu durumda pratik olarak identifikasyon için bakterinin morfolojik özellikleri, oksijen gereksinimi ve şekerleri kullanma şeklini ortaya koymak gereklidir.

Yukarıda değinilen basit testler ile bakterilerin dahil olduğu gruplar belirlendikten sonra daha detaylı fizyolojik ve biyokimyasal testler ile identifikasyona devam edilir. İdentifikasyonda

kullanılan basit biyokimyasal testler; oksidaz, katalaz, üreaz, nitrat redüksiyonu, H₂S oluşumu, şekerlerden asit ve/veya gaz ve/veya çeşitli metabolitlerin oluşumu, amino asit metabolizmasının belirlenmesi, gelişebilme sıcaklığı sınırları, NaCl 'e ve antibiyotiklere duyarlılık testleridir. Bazı cinsler için özel besin maddeleri gereksinimi, özel substratları kullanmaları ve polihidroksibütirat oluşumunun belirlenmesi testleri de identifikasyonda önemli testlerdir.

İdentifikasyonda tüm aşamalar doğru bir şekilde yapıldıktan sonra bakterinin cins ve türü belirlenir. Eğer bakteri, identifikasyonda tüm dünyada en yaygın olarak kullanılan "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" adlı kitapta gösterilen şekilde sınıflandırılmıyor ise iki olasılık vardır. Bunlar ya yeni bir tür bakteri izole edilmiştir ya da identifikasyon işleminde bir hata yapılmıştır. İkinci olasılık çok daha yüksek şansa sahiptir. Böyle bir durumda ;

- a) izolatin saflığı,
- b) uygun testlerin seçildiği,
- c) testlerin doğru olarak yapıldığı kontrol edilmelidir.

Bakteri identifikasyonunda en çok yapılan hatanın, şekil, gram reaksiyon ve hareketlilik belirlemelerinde olduğu söylenebilir. Testlerin doğruluğunun kontrolü için "şahit mikroorganizma" kullanılması önerilir (bkz. bölüm 04). Kuşkusuz şahit mikroorganizma kullanmak için öncelikle izolatin hangi bakteri olduğu hakkında bir tahminde bulunmak gerekir.

Maya identifikasyonu bakteri identifikasyonuna kısmen benzer, ancak mikroskopik incelemeler maya identifikasyonunda önemlidir. Küflerin identifikasyonu hemen tümüyle selektif besiyerlerinde oluşan kolonilerin çapı ve rengi, mikroskopik olarak spor oluşum şeklinin belirlenmesi, hiflerin özelliklerinin belirlenmesi gibi karakteristikler üzerine yapılmaktadır.

02.02. Morfolojik ve Fizyolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Yukarıda da değinildiği gibi çeşitli mikroskopik incelemeler identifikasyonda en önemli basamaklardan birisidir. Bunun yanında, sıvı besiyerinde ürerken zar yapıp yapmadığı, eğer zar varsa zarın yapısı (ince, kalın), tortu meydana gelmesi, üremenin tüp içinde homojen olup olmadığı gibi özellikler, katı besiyerinde meydana gelen koloninin düz, konveks, tırtıllı, mat, parlak, düğmeli, pürüzlü olması gibi özellikler, pigmentasyon, zon oluşumu, gelişme sıcaklık sınırlarının saptanması da identifikasyonda en çok kullanılan karakteristikler arasındadır.

02.03. Biyokimyasal Testler

Başta karbohidratlar olmak üzere çeşitli besin maddelerini kullanabilme özelliği, belirli enzimleri meydana getirebilme, bazı maddeleri oluşturabilme özelliklerinin belirlenmesi ile identifikasyon yapılmaktadır. Biyokimyasal identifikasyonun esası pozitif ya da negatif olarak alınan sonuçların "Bergey' Manual of Determinative Bacteriology" gibi identifikasyon kaynaklarında verilen değerler ile kıyaslanması ve buradaki sonuçlara göre izolatin tanımlanmasıdır. Bu aşamada en büyük sorun bakterilerin denemelerde kullanılan testlere hangi olasılıkla pozitif veya negatif verdikleridir. Örneğin *E. coli* identifikasyonu için kullanılan testlerden indol testi bugüne kadar denenen binlerce *E. coli* suşu için %98 oranda pozitif bulunduğu için kaynaklarda *E. coli* 'de indol testi "suşların %90' dan fazlası pozitif olduğu için" ya "+" ile ya da başka kaynaklarda doğrudan "98" rakamı ile gösterilir. Oysa indol testi *E. coli*

için kullanılan besiyerlerinde gelişebilen *Serratia odorifera* için %50 pozitifdir, bir diğer deyiş ile *S. odorifera* suşları için indol testi yapılması önemli değildir. Ancak identifikasyonda zaten testler ile izolatın ne olduğunun anlaşılması amaçlandığına göre yapılan indol testi sonucu pozitif ise bu izolat *E. coli* olabileceği gibi *S. odorifera* da olabilir. *E. coli* aranmasında kullanılan besiyerlerinde *E. coli* ile aynı grupta bulunan (gram negatif fakültatif anaerob bakteriler) gıda kökenli 72 tür bakteri vardır ve bunlardan 27 adedi indol testinde pozitif sonuç verebilmektedir. Bu duruma göre *E. coli* aranmasında kullanılan bir besiyerinden izole edilen bakteriler arasından izole edilen birinin *E. coli* olup olmadığını belirlemek için sadece indol testi yeterli olamaz. Bununla beraber izolatın elde edildiği besiyeri VRB Agar gibi laktoz kullanım sonucunu da kırmızı-pembe renkli koloni oluşumu ile gösteriyor ise ve bu renkte bir laktoz pozitif koloni izole edildi ise bu kez laktoz ve indol pozitif olanların sayısı 16' ya düşer ancak sayı halen çok yüksektir.

İndol ve laktoz testinin değerlendirilmesi sonucunda her iki testi de pozitif olarak veren 16 bakterinin hangi testler ile ayrılacağı kaynak kitaplardan saptanabilir. Örneğin söz konusu 16 bakterinin tümü H₂S negatif olduğuna göre bu testin uygulanması gereksizdir. Benzer şekilde bunların tümü glikozdan gaz oluşturmaktadır ve sadece 1 bakteri metil red testinde negatif sonuç vermektedir. Voges-Proskauer testi uygulandığında *E. coli* gibi bu test sonucu negatif olan bakteri sayısı 12 'ye düşer.

İdentifikasyon bu mantıkla yapılacak olur ise en az sayıda test yapılmış olur ancak her testin iki gün aldığı varsayımı ile analiz aylar sürer. Tersine olarak laboratuvar disiplinine tümüyle aykırı olmak üzere, denenebilecek yüzlerce test bir anda uygulanırsa gereğinden fazla test yapılmış olur ve bu tüpleri koyacak inkübatör dahi bulunamaz.

Bu durumda çözüm, elden geldiği kadar az sayıda seçilmiş test ile identifikasyona başlanıp bir defada bitirilmesidir. Örneğin enterobakteriler için indol, metil red, Voges-Proskauer, H₂S oluşumu, lisin dekarboksilaz, hareket, glikozdan gaz oluşumu ve laktoz testlerinin biranda uygulanması ile pek çok bakteri tanımlanabilmekte, tanımlanamayanlar ise çok az sayıda bakteri grupları içerdiklerinden bunların ayrılması kolay olmaktadır.

Biyokimyasal testler çalışma kolaylığı açısından kombine besiyerlerinde yapılmaktadır. Örneğin Salmonella identifikasyonu için kullanılan Triple Sugar Iron Agar besiyerinde Salmonella için önemli olan testlerden glikozun kullanımı, glikozdan gaz oluşumu, H₂S oluşumu, laktozun kullanımı ve sakkarozun kullanımı olmak üzere beş ayrı test bir tüpte yapılmaktadır. Enterobakteriler için geliştirilmiş "Norveç üçlü tüp" yönteminde 3 tüpte yapılan testler ile identifikasyon tamamlanabilmektedir.

Biyokimyasal testlerde yeni bir yaklaşım hazır identifikasyon kitleridir. İdentifiye edilecek gruba özel olarak seçilmiş 20-25 kadar testi minyatür bir şekilde içeren kitler ile identifikasyon oldukça doğru ve hızlı bir şekilde yapılmaktadır. Bu kitlerde test sonuçları laboratuvar personeli tarafından değerlendirilerek kataloglardan izolatın ne olduğu saptanabildiği gibi kitler özel okuma cihazları ile değerlendirilip sonuçlar bilgisayar yardımı ile doğrudan alınabilmektedir.

Rutin analizler yapan bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında identifikasyon burada anlatıldığı kadar zor ve pahalı değildir. Mikroorganizmaya özel enzimlerin varlığının belirlenmesi ile identifikasyon çok hızlı olarak yapılmaktadır. Örneğin *E. coli* 'ye özel olan β -glucuronidase enzimi kısa adı MUG olan bir bileşiği uzun dalga boylu UV ışığı ile floresan veren bir bileşiğe parçalamaktadır. Böylece bir izolatın *E. coli* olup olmadığı sadece MUG reaksiyonu ile belirlenebilmektedir. MUG katkısı besiyerine ilave edilerek tüpteki kültürün ya da agarlı

besiyerine ilave edilerek katı besiyerinde gelişen koloninin *E. coli* olup olmadığı, ileri identifikasyona neredeyse gerek kalmadan belirlenmektedir. *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria* gibi primer gıda patojenleri ile *E. coli* için benzer şekilde hızlı ve doğru sonuç veren biyokimyasal ve/veya serolojik esaslı testler başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

02.04. Serolojik Testler

En basit olarak antijen-antikor reaksiyonu olarak tanımlanır. Bakteriler antijenik özellik gösterir. Deney hayvanlarına aşılandıklarında bu hayvanların kanında bu antijene özel antikor oluşur. Hayvandan alınan kan bu antikorları içerir. Kanın sadece serum kısmı kullanılır ve buna antiserum denilir. Bir başka deyiş ile antiserum belirli antijene karşı olarak deney hayvanında üretilmiş antikorları taşıyan kanın serum kısmıdır. Antiserumlar ticari olarak elde edilip pazarlanır. Antijen-antikor reaksiyonu oldukça spesifiktir. Yani (A) bakterisi kullanılarak elde edilmiş (A) antiserum sadece (A) bakterisi ile reaksiyona girer. Böylece izole edilen bakteri farklı antiserumlar ile karıştırılır, pozitif reaksiyonun alındığı antiserum bakteriyi tanımlar. Serolojik testler için hazırlanmış ve kolaylıkla kullanılan lateks testleri de gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

02.05. Faj Tiplendirmesi

Bakteriyofajlar bakterilere yüksek derecede spesiflik gösterirler. Bakteri farklı fajlarla karıştırılır, bakteriyi lize eden faj bakteriyi tanımlar. Serolojik testlerde olduğu gibi faj tiplendirmesinde de mutlak özgüllük olmadığı gözden uzak tutulmalıdır. Serolojik testler ve faj tiplendirmesi, diğer identifikasyon yöntemleri ile en azından "cins" aşamasına kadar identifiye edilmiş izolatların kesin tanımlarının yapılmasında kullanılır.

02.06. Genetik Analizler

Moleküler biyolojideki gelişmeler mikroorganizmalar arasındaki benzerliklerin genetik analizler ile gösterilmesi bakımından önemli rol oynamaktadır. DNA 'daki taban diziliş sırasının belirlenebilmesi kuşkusuz identifikasyonda en kesin sonuçların alınabilmesini sağlamaktadır. Bunun yanında DNA molekülündeki Guanin + Sitozin tabanlarının toplam taban içindeki oranı ($\% G+C = \frac{G+C}{G+C+A+T}$), hibridizasyon ve DNA homolojilerinin belirlenmesi identifikasyonda yeni ufuklar açmaktadır.

02.07. Nümerik Taksonomi

Mikroorganizmalar arasındaki benzerliği ortaya koyan bir sistemdir. Elden geldiğince fazla sayıda karakteristik kıyaslanır. Her karakteristik aynı değerdedir ve "her iki bakteri için pozitif olan sonuç sayısı (Nsp), her iki bakteri için negatif olan sonuç sayısı (Nsn) toplanır, toplam incelenen karakter sayısına oranlanır ve yüzde benzerlik oranı olarak hesaplanır. İncelenen iki bakteri arasında %90 ve daha fazla benzerlik bulunursa bu ikisinin aynı türe ait olduğuna karar verilir.