

# ***Salmonella***

## 01. Genel Bilgiler

### 02. Aranması

#### 02.01. Önzenginleştirme

#### 02.02. Selektif Zenginleştirme

#### 02.03. Selektif Katı Besiyerine Sürme

#### 02.04. Kombine Besiyerleri

### 03. Doğrulanması

#### 03.01. Biyokimyasal Testler

##### 03.01.01. Üre Testi

##### 03.01.02. Triple Sugar Iron Agar Testi

#### 03.02. Serolojik Doğrulama

### 04. Kullanılan Besiyerleri

#### 04.01. Tamponlanmış Peptonlu Su

#### 04.02. Salmosyst Broth

#### 04.03. Salmosyst Selective Supplement

#### 04.04. RVS Broth

#### 04.05. Selenite Cystine Broth

#### 04.06. Brilliant Green Fenol Red Agar

#### 04.07. Bismuth Sulfite Agar

#### 04.08. Rambach Agar

#### 04.09. Hektoen Enteric Agar

#### 04.10. Salmonella-Shigella (SS) Agar

#### 04.11. Xylose Lysine Deoxycholate Agar

#### 04.12. XLT4 Agar

#### 04.13. MSRV Medium

#### 04.14. Diasalm Medium

#### 04.15. Urea Broth

#### 04.16. Triple Sugar Iron Agar

## **01. Genel Bilgiler**

*Salmonella*, Enterobacteriaceae familyası üyesi olup fakültatif anaerob, gram negatif, çubuk şeklinde, S. Gallinarum ve S. Pullorum hariç olmak üzere hareketli bir bakteridir. *Salmonella* cinsi içinde yalnız insanlarda, yalnız hayvanlarda ve hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalık yapan birçok tür bulunmaktadır. Bunlardan ilk kez *Salmonella Choleraesuis* 1886 yılında Salmon tarafından izole edilmiş, sonraları bu cinse *Salmonella* adı verilmiştir. Bu cins içinde 2500 kadar serotip tanımlanmıştır. Yeni sisteme göre *Salmonella* serotipleri yazılırken S. Gallinarum örneğinde olduğu gibi italik harf kullanılmamakta ve serotipin ilk harfi büyük yazılmaktadır.

*Salmonella* 'ya genellikle koliform grup bakteriler tarafından yoğun düzeyde kontamine olmuş gıdalarda rastlanır. Klasik bir gıda enfeksiyonu olarak bilinen salmonellosis etmeni *Salmonella* 'ların gıda mikrobiyolojisindeki önemleri büyüktür. *Salmonella* 'ların neden olduğu gastroenterit de ölümle sonuçlanabilir. Mikrobiyel gıda zehirlenmeleri arasında dünyada en çok görülen hastalıklardan biri olan salmonellosisin sadece Amerika Birleşik Devletleri' nde yılda 2-4 milyon kadar vakaya neden olduğu ve hastalık sayısının giderek arttığı tahmin edilmektedir.

Gıda maddelerinde çok düşük düzeyde *Salmonella* bulunsa bile bunlar riskli olarak kabul edilir. Dolayısıyla gıda maddeleri, içme ve kullanma sularında *Salmonella* bulunmasına izin verilmez.

*Salmonella* 'nın en çok bulunduğu gıda maddelerinin başında hayvansal ürünler gelir. Bunlar arasında kümes hayvanları eti, kıyım, sosisler, yumurta ürünleri, su ürünleri, dondurma, süttozu ve krema *Salmonella* açısından önemli gıdalardır. Bunların yanında çeşitli soslar ve salatalar, pudingler, diğer süt ürünleri de *Salmonella* riski taşıyan gıdalardır. Hammadde, işleme teknolojisi, depolama ve pazarlama koşulları *Salmonella* riskinin büyümesine neden olmaktadır.

*Salmonella* hakkında daha fazla genel bilgi için [burayı tıklayın](#).

## 02. Aranması

Gıda maddelerinde *Salmonella* belirlenmesi genellikle klasik kültürel yöntemler ile yapılmaktadır. Bu yöntemlere ilaveten membran filtrasyon ve enzim immunoassay yöntemleri ile de *Salmonella* varlığı araştırılabilmektedir. Bunların yanında "geliştirilmiş kültürel-enzimatik yöntemler" olarak tanımlanan "hızlı analiz yöntemleri" üzerinde de son yıllarda büyük çalışmalar yapılmaktadır. Ancak bugün için yasal kuruluşlarca kabul edilen analiz yöntemleri çoğunlukla klasik kültürel yöntemlerdir.

*Salmonella* 'nın klasik yöntemle tayininde önzenginleştirme, selektif zenginleştirme, selektif katı besiyerine sürme, biyokimyasal testler ve serolojik doğrulama aşamaları vardır ve bu tayin 7 gün sürmektedir. Bu yöntemde uygulamada görülen farklılıklar çeşitli kuruluşlar tarafından farklı besiyerleri ve farklı inkübasyon sıcaklıkları önerilmesinden kaynaklanmaktadır.

*Salmonella* aranmasında geleneksel kültürel metodun ilk adımı selektif olmayan bir sıvı besiyerinde önzenginleştirmedir. Önzenginleştirmenin başlıca fonksiyonu proses süresince dehidre olan hücrelerin rehidre olmasını ve hasar görmüş olan hücrelerin onarılmasını sağlamaktadır.

Geleneksel kültür metotları ile *Salmonella* tespit edilmesinde ikinci aşama selektif zenginleştirmedir. Selektif zenginleştirme besiyerlerinde refakatçi bakteri türlerinin çoğalması sınırlanırken *Salmonella* hücrelerinin artışına izin verilir.

Zenginleştirme işleminden sonra *Salmonella* 'yı saf olarak izole etmek için değişik seçici, ayırt edici besiyerleri kullanılmaktadır. Zenginleştirme ortamlarında olduğu gibi selektif katı besiyerleri de pek çok modifikasyonlar ile kullanılmaktadır

Selektif katı besiyerinden *Salmonella* şüphesi ile izole edilen bakterinin *Salmonella* olup olmadığı biyokimyasal ve serolojik testler ile doğrulanmalıdır. Bu amaçla en yaygın uygulanan biyokimyasal testler Triple Sugar Iron Agar besiyerinde glikozdan asit ve gaz oluşumu, laktoz ve/veya sakkarozun kullanımı, H<sub>2</sub>S oluşumu testleri ile Urea Broth besiyerinde üre testidir.

*Salmonella* analizinde selektif olmayan önzenginleştirme işleminden sonra selektif zenginleştirme ve selektif katı besiyerine sürme işlemlerini kombine ederek analiz süresini 1 gün kısaltan yarı katı besiyerleri de son yıllarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Gıdaların rutin mikrobiyolojik kontrolünde *Salmonella* sadece aranır ve yukarıda verilen analiz ile 25 gram (veya 25 ml) gıdada "*Salmonella* var" ya da "*Salmonella* yok" şeklinde sonuç verilir. Özel çalışmalar çerçevesinde *Salmonella* sayılması gerekiyor ise EMS yöntemi kullanılarak sayım yapılabilir.

*Salmonella* analizi hakkında daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

## 02.01. Önzenginleştirme

25 g ya da 25 ml örnek 225 ml önzenginleştirme besiyerine ilave edilir. Örnek sıvı ise (su, süt, peyniraltı suyu, yumurta vb.) çalkalanıp karıştırılarak doğrudan inkübasyona bırakılır. Örnek suda eriyebilir ise (şeker, süttozu, peyniraltı suyu tozu, krema, yumurta tozu vb.) önce eritilir sonra inkübasyona bırakılır. Gerekirse manyetik karıştırıcı kullanılır. Örnek katı ise (peynir, et ve et ürünleri vb.) steril blender gövdesine 25 g örnek alınır, üzerine 225 ml steril önzenginleştirme besiyerinden yaklaşık 150-200 ml aktarılır, homojenizasyondan sonra homojenizat steril 500 ml' lik erlene aktarılır. Kalan önzenginleştirme besiyeri (yaklaşık 50-100 ml) ile blender gövdesi çalkalanır ve bu kısım da aseptik koşullar altında homojenizat olan erlene aktarılır.

Önzenginleştirme besiyeri olarak tamponlanmış peptonlu su (Peptone Water, Buffered ; Merck 1.07228) ve Salmosyst Broth (Merck 1.10153) kullanılmaktadır. Lactose Broth besiyeri ise yaygın kullanım alanı bulmamıştır.

Tamponlanmış peptonlu su kullanıldığında inkübasyon 35-37 °C' da 16-20 saat olarak yapılmaktadır. Yasal analizlerde önzenginleştirme besiyeri olarak tamponlanmış peptonlu su kullanılmaktadır.

Salmosyst Broth ise daha ziyade gıda sanayiinde otokontrol için kullanılan bir önzenginleştirme besiyeridir. Salmosyst Selective Supplement ile kombine olarak kullanılır. Salmosyst Broth önzenginleştirme besiyerinde inkübasyonun 35 °C' da 6-8 saat olarak yapılması bu besiyerine önemli bir analiz süresi kısalığı üstünlüğü sağlamaktadır. Bu besiyerleri ile selektif izolasyon besiyeri olan Rambach Agar genellikle beraber kullanılır. Salmosyst / Rambach Agar kombinasyonu hakkında daha fazla bilgi almak için [burayı tıklayın](#).

## 02.02. Selektif Zenginleştirme

Önzenginleştirme işleminden sonra uygun bir selektif zenginleştirme besiyerine ekim yapılarak analize devam edilir. Selektif zenginleştirme amacı ile en yaygın kullanılan besiyerleri RVS Broth (Merck 1.07700), Selenite Cystine Broth (Merck 1.07709) besiyerleri ve Salmosyst Selective Supplement (Merck 1.10141)' dir. RVS Broth besiyeri ; Rappaport Vassiliadis Magnesium Chloride Malachite Green Broth, Rappaport Vassiliadis Soy Broth isimleri ile de bilinir. RVS Broth ve Selenite Cystine Broth besiyerleri standart analizlerde

kullanılır. Bu besiyelerinin dışında *Salmonella* selektif zenginleştirmesi amacı ile kullanılan pek çok besiyeri vardır.

Standart analiz yönteminde 10 ml RVS Broth besiyerine 0,1 ml önzenginleştirme kültürü ve 100 ml Selenite Cystine Broth besiyerine 10 ml önzenginleştirme kültürü ilave edilip RVS Broth 42 °C 'da 24 saat, Selenite Cystine Broth 35-37 °C' da 48 saat inkübe edilir. Selenite Cystine Broth besiyeri selektiviteyi artırmak için 42 °C' da da inkübe edilebilir ancak bu uygulama analiz raporunda belirtilmelidir. RVS Broth kültüründen 24 saatlik inkübasyon sonunda, Selenite Cystine Broth kültüründen ise 24 ve 48 saatlerde örnek alınarak selektif katı besiyelerine sürme yapılır.

Salmosyst Selective Supplement kullanımında ise yukarıda da belirtildiği gibi Salmosyst Broth ile bir kombinasyon vardır. Salmosyst Broth kültüründen 10 ml steril bir standart deney tüpüne alınıp üzerine 1 tablet Salmosyst Selective Supplement ilave edilir. 30 dakika kendi halinde oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüp karıştırıcıda kuvvetli bir şekilde karıştırılır ve 35 °C' da 22 saat inkübasyona bırakılır. Böylece yasal analiz yöntemi için gereken önzenginleştirme ve selektif zenginleştirme aşamaları toplamı olan 20 + 48 = 68 saat yerine Salmosyst Broth ve Salmosyst Selective Supplement kombinasyonu ile 8 + 22 = 30 saatlik bir zenginleştirme işlemi yapılmış olur.

### **02.03. Selektif Katı Besiyerine Sürme**

Standart analizlerde selektif zenginleştirme kültürlerinden biri mutlaka Brilliant Green Phenol Red Agar (Edel ve Kampelmacher' a göre ; Merck 1.10747) olmak üzere 2 farklı selektif besiyeri kullanılması gerekmektedir. Diğer selektif zenginleştirme besiyeri analiz yapan laboratuvarın seçimine bırakılır. Bununla beraber Bismuth Sulfite Agar (Merck 1.05418) genellikle ikinci selektif besiyeri olarak kullanılır. Bunun dışında Rambach Agar (Merck 1.07500), Hektoen Enteric Agar (Merck 1.11681), Salmonella-Shigella (SS) Agar (Merck 1.07667), Xylose Lysine Deoxycholate Agar (Merck 1.05287) besiyerleri de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Son zamanlarda XLT4 Agar (Merck 1. 13919) besiyeri yaygın bir kullanım alanı bulmuştur.

Selektif katı besiyerine sürme işleminden sonra 35 - 37 ° C' da 24 saat, tipik koloni gelişmesi olmaz ise aynı sıcaklıkta 24 saat daha inkübasyon yapılır. İnkübasyon sonunda selektif katı besiyerine göre değişen morfolojilerdeki tipik *Salmonella* kolonileri izole edilip doğrulama için önce biyokimyasal test besiyelerine ekilir. Prensipte olarak her besiyerinden en az 5 adet tipik koloni biyokimyasal testler için izole edilir. Katı besiyerinde tipik koloni yoksa diğer kolonilerden 5 adet izole edilip yine biyokimyasal testler ile çalışmaya devam edilir. Bu testler izolat(lar)ın *Salmonella* olduğunu gösterirse serolojik doğrulama testleri yapılarak analiz tamamlanır. Hangi önzenginleştirme veya selektif zenginleştirme veya selektif katı besiyerinden izole edilmiş olursa olsun 1 koloni dahi *Salmonella* olarak doğrulanırsa "analiz edilen örnekte *Salmonella* bulundu" şeklinde rapor verilir.

### **02.04. Kombine Besiyerleri**

Selektif zenginleştirme aşaması atlanılarak tamponlanmış peptonlu su önzenginleştirme kültürü doğrudan MSR/V (Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis) Medium (Merck 1.09878) besiyeri yüzeyine üç farklı noktaya birer damla olarak ekilir. Petri kutusu ters

çevrilmeden 42 °C' da 24 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda opak hale oluşturan koloniler hareketli *Salmonella* türleri olarak tanımlanır. Bu besiyerinde doğal olarak hareketsiz olan *S. Gallinarum* ve *S. Pullorum* belirlenemez. Bununla beraber MSRV besiyeri tüm dünyada yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Özenleştirme kültüründen doğrudan ekim yapılan bazı diğer hızlı *Salmonella* analiz sistemlerine göre en büyük üstünlüğü doğrulama için koloni izolasyonuna izin vermesidir.

Diasalm (Diagnostic Salmonella Semi-Solid Rappaport Vassiliadis) Medium (Merck 1.09803) da benzer şekilde kullanılmaktadır. Tamponlanmış Peptonlu Su besiyerinde özenleştirme işleminden sonra besiyerinin 3 noktasına 0,03 'er ml damlatılmakta, 42 °C 'da 18 – 24 saat inkübasyondan sonra hareketli *Salmonella* 'ların gelişimi sağlanmaktadır.

### **03. Doğrulanması**

#### **03.01. Biyokimyasal Testler**

*Salmonella* aranmasında en yaygın kullanılan testler üre testi ile Triple Sugar Iron Agar besiyerinde yapılan testlerdir. Gerekirse lisin dekarboksilaz, Voges-Proskauer, indol ve β-galaktozidaz testleri de yapılabilir.

*Salmonella* analizi hakkında daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

##### **03.01.01. Üre Testi**

Bir öze dolusu koloni alınıp Urea Broth (Merck 1.08483) besiyerine inoküle edilir ve 35 °C' da 48 saate kadar inkübe edilir. Bu işlem sırasında bir başka Urea Broth besiyerine pozitif kontrol olarak *Proteus*, bir başka besiyerine negatif kontrol olarak *E. coli* inoküle edilir, ayrıca bir tüp Urea Broth besiyeri şahit olarak kullanılır. İnkübasyon sonunda 4 tüpün rengi kontrol edilir. Şahit tüp sarımsı kırmızı renkte, pozitif kontrol kırmızı renkte, negatif kontrol sarı renkte olmalıdır. Asıl test tüpü kırmızı ise alınan koloni *Salmonella* değildir, analize son verilir. *Salmonella* üre negatif bir bakteridir. Besiyeri sarı renkli ise Triple Sugar Iron Agar Testi ile devam edilir. Zamandan kazanmak açısından çoğu kere üre testi sonucu beklenmeden aynı anda Urea Broth ve Triple Sugar Iron Agar besiyerlerine beraberce ekim yapılır. Ancak bu koşulda da değerlendirme yine Urea Broth ile başlamalıdır.

##### **03.01.02. Triple Sugar Iron Agar Testi**

Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.08483) yatık besiyerine yüzeye sürme ve dibe daldırma yapılır. Bu amaçla aşı özesi ile besiyerinin yüzeyine sürme yapılır, aşı iğnesi ile dibe daldırma yapılır. Daldırma işlemi bir defada tüpün merkezinden geçecek bir hat boyunca dibe kadar iğnenin sokulması ile yapılır. Besiyeri 35 °C' da 48 saate kadar inkübe edilir. Ancak reaksiyon sonuçları 24 saat inkübasyon sonunda da izlenmelidir. Bu sürenin sonunda dip kısmın sarı (glikozun kullanımı) ve siyah olması (hidrojen sülfür oluşumu), yüzeyin kırmızı olması (laktoz ve sakkarozun kullanılmaması), besiyerinde gaz delikleri ve/veya yarıkları oluşması ve/veya besiyerinin dip kısmından yukarı doğru itilmesi (glikozdan gaz oluşması) *Salmonella* 'yı doğrular. Bazı hallerde siyah renk dipteki sarılığı örtecek kadar baskın olabilir. Bu durumda da kültür *Salmonella* pozitif olarak değerlendirilir. *Salmonella* genel olarak glikoz

pozitif, glikozdan gaz oluşturma pozitif, laktoz negatif, sakkaroz negatif ve hidrojen sülfür pozitif bir bakteridir. Bununla beraber *S. Gallinarum* ve *S. Typhosa* glikozdan gaz oluşturmazlar. *S. Paratyphi A* ve *S. Choleraesuis* hidrojen sülfür oluşturmeyen tiplere örnektir. Benzer şekilde laktoz pozitif *Salmonella* tipleri de vardır.

### **03.02. Serolojik Doğrulama**

Biyokimyasal test sonuçlarına göre *Salmonella* olduğundan kuşku duyulan kültürler serolojik olarak doğrulanmalıdır. Serolojik doğrulama testleri mono veya poli O, Vi, H antiserumları kullanılarak yapılır. Serolojik testler ancak deneyimli laboratuvarlarda yapılmalıdır.

*Salmonella* 'larda tip tayini Kauffman-White şemasına göre yapılır. Biyokimyasal karakterlerine göre *Salmonella* olduğu saptanan suşlar, kullanım kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış *Salmonella* polivalan O antiserumlarıyla ayrı ayrı olarak lamda aglütinasyona tabi tutulur. Hangi polivalan O antiserumu ile aglütinasyon verirse, o polivalan serumun içerdiği O grup serumlarıyla ayrı ayrı lamda aglütinasyon testi yapılır. Bakteri hangi grup serumuyla aglütinasyon verirse serolojik grubu tespit edilmiş olur. Serolojik olarak grubu tespit edilen suşun serotipini belirlemek için flagella antijen testi uygulanır. Bakteri kültürü yumuşak agarlı besiyerinde geliştirilir. Yumuşak agarda flagellası aktifleştirilen bakteri kültüründen bir öze alınıp kullanım kılavuzuna göre hazırlanmış H antiserumu (monofazik) veya (difazik) ile test edilir, aglütinasyona göre serotip tespit edilmiş olur.

Lam Aglütinasyon testi için temiz bir lam alınır. Bir ucuna tuzlu su, diğer ucuna antiserum damlatılır. Bakterilerin katı besiyerlerindeki kültürü tuzlu su içerisinde süspanse edilir ve bu süspanسیون antiserum ile karıştırılır. Lam bir elle tutulup iki tarafa doğru hafifçe birkaç defa eğilerek 1 dakika gibi kısa bir zaman beklenir. Aglütinasyon çıplak gözle ya da mikroskopun küçük büyütmesi ile gözlenebilir.

*Salmonella* lateks testi (Oxoid FT 203) pratik uygulamada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

## **04. Kullanılan Besiyerleri**

### **04.01. Tamponlanmış Peptonlu Su (Merck 1.07228)**

Dehidre besiyeri 25,5 g/l olacak şekilde su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak eritilir, 500 ml erlenlere 225' er ml olacak şekilde dağıtılır ve otoklavda 121 °C' da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarı renklidir. Besiyeri bileşiminde bulunan fosfat tampon pH düşmesine karşı özellikle hasar görmüş olan bakterileri korur. Hazırlanmış besiyeri oda sıcaklığında 2 ay depolanabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 87 adet 225 ml besiyeri hazırlanır.

### **04.02. Salmosyst Broth (Merck 1.10153)**

Dehidre besiyeri 25 g/l olacak şekilde distile su içinde gerekirse ısıtılarak iyice eritilir ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak 500 ml erlenlere 225' er ml halinde bölünüp otoklavda

121 °C' da 20 dakika süre ile sterilize edilir. Besiyeri dibinde kalsiyum karbonattan gelen beyaz renkli bir çökeltme olur. Kalsiyum karbonat pH düşmesine karşı özellikle hasar görmüş olan bakterileri korur. Hazırlanmış besiyeri oda sıcaklığında 1 ay depolanabilir. Uzun süreli depolamalarda kalsiyum karbonatın erimesine bağlı olarak pH' da önemsiz bir yükselme görülebilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 88 adet 225 ml besiyeri hazırlanır. Salmosyst Broth hakkında daha fazla bilgi almak için [burayı tıklayın](#).

#### **04.03. Salmosyst Selective Supplement (Merck 1.10141)**

Hazır ticari tablet şeklinde kullanılır. Selektif katkı bileşiminde bulunan potasyum tetratiyonat, safra tuzları ve brilliant green refakatçi floranın gelişimini engeller. 1 kutuda bulunan 250 adet tablet aynı sayıda örneğin analizi için kullanılabilir. Salmosyst selektif katkı hakkında daha fazla bilgi almak için [burayı tıklayın](#).

#### **04.04. RVS Broth (Merck 1.07700)**

Dehidre besiyeri 43 g/l olacak şekilde distile su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak çözülür, standart deney tüplerine 10' ar ml olacak şekilde dağıtılır ve otoklavda 115 °C' da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve koyu mavi renklidir. Buzdolabında en az 7 ay süre ile korunabilir. Besiyeri bileşiminde bulunan malaşit yeşili ve magnezyum klorür konsantrasyonları benzeri diğer besiyerlerine göre daha azdır. Bu konsantrasyonlar *Salmonella* 'nın 43 °C' daki inkübasyon sırasında gelişmesini artıracak düzeyde tutulmuştur. Aynı amaçla besiyeri bileşiminde soya peptonu bulunmaktadır. pH' nın 5,2 olması bu besiyerinin selektivitesini yükseltir. Besiyerine 40 mg/litre olacak şekilde novobiosin (Merck 1.06255) katılmasının selektiviteyi artıracığı belirtilmektedir. Novobiosin filitre ile sterilize edilip 50 °C' a soğutulmuş besiyerine ilave edilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 1162 adet 10 ml besiyeri hazırlanır ve dolayısı ile bu sayıda örnek analiz edilebilir. 1 g novobiosin (Merck 1.06255) yaklaşık 2 kutu 500 g dehidre besiyeri için yeterlidir.

#### **04.05. Selenite Cystine Broth (Merck 1.07709)**

100 ml distile su içinde 2,3 g dehidre besiyeri gerekirse en çok 60 °C' a kadar ısıtılarak çözülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Eğer besiyeri hemen kullanılmayıp depolanacak ise filitre ile sterilize edilmeli veya tercihen gereken miktarlarda hazırlanmalıdır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve açık sarı renklidir. Besiyeri bileşimindeki selenit inkübasyonun ilk 12 saatine kadar koliform bakterilerin ve enterokokların gelişimini baskılar, daha sonra inhibisyon etkisi giderek azalır. Dehidre besiyeri 15 °C altında depolanmalıdır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 217 adet 100 ml besiyeri hazırlanır ve dolayısı ile bu sayıda örnek analiz edilebilir. Bu besiyeri hakkında daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

#### **04.06. Brilliant Green Fenol Red Agar (Merck 1.10747)**

Dehidre besiyeri 51,5 g/l olacak şekilde distile su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda karıştırılarak eritilir ve steril petri kutularına 12,5' er ml dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı

ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri parlak ve kırmızı renklidir. Refakatçi floranın gelişimi yükseltilmiş brilliant green konsantrasyonu ile baskılanır. Bu besiyerinde *Salmonella* kolonileri etrafı parlak kırmızı bir zon ile çevrili pembe - kırmızı renklidir. Bu görüntü koloninin laktoz ve sakkarozu kullanmadığını gösterir. *Proteus* (yayılmayan koloni), *Pseudomonas* (küçük ve kenarı tırtıllı koloni) türleri de bu morfolojiyi gösterir. Etrafı sarı bir zon ile çevrelenmiş sarı koloniler ise laktoz ve/veya sakkarozu kullanabilen *E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* türlerine ait olabilir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 776 adet petri kutusu hazırlanabilir.

#### **04.07. Bismuth Sulfite Agar (Merck 1.05418)**

Dehidre besiyeri 47,5 g/l olacak şekilde distile su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda karıştırılarak eritilir ve steril petri kutularına yaklaşık 25' er ml olacak şekilde kalın bir tabaka halinde dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri bulanık ve yeşilimsi sarı ile soluk yeşil renklidir. Eğer besiyeri kahverengi ise kullanılmaz. Bismuth Sulfite Agar besiyerinde siyah merkezli, etrafında metalik bir parlaklık olan siyah çöküntülü (presipitat) zon bulunan koloniler tipik *Salmonella* kolonileridir. Küçük, yeşil-kahverengi, bazen mukoid olanlar ise koliform grup bakteriler ve *Serratia* ile *Proteus* kolonileridir. Bununla beraber *Proteus* kolonileri sıklıkla *Salmonella* ile karıştırılmaktadır. Bileşimde bulunan brilliant green ve bismuth refakatçi floranın gelişimini baskımlarken bismuth iyonlarının metalik bismuth' a indirgenmesi koloni etrafında metalik bir parlaklık oluşturur. Taze hazırlanmış besiyeri refakatçi flora üzerinde yoğun inhibisyon etki gösterirken *Salmonella* kolonileri etrafında metalik parlaklık ancak 48 saat inkübasyon sonunda oluşur. Besiyerinin 4 °C' da 4 gün depolanması sonunda inhibisyon etkisi zayıflar ancak metalik parlaklık daha kısa sürede oluşur. *Proteus* türlerinin koloni rengi *Salmonella* kolonilerine benzer, fark koloni etrafındaki metalik parlak zondur. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 421 adet petri kutusu (25 ml/petri kutusu) hazırlanabilir. Bu besiyeri hakkında daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

#### **04.08.Rambach Agar® (Merck 1.07500; 4x250 ml)**

1 şişe selektif katkı 500 ml erlende bulunan 250 ml destile suya ilave edilir, iyice eriyinceye kadar karıştırılır. Üzerine 1 kutu toz besiyeri dökülür ve 20 dakika süre ile kaynar su banyosunda bekletilir, bu sırada her 4-5 dakikada bir çalkalanır. Erlen iç çeperinde gözle görülür parça kalmamalıdır. Rambach Agar besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Soğuk su banyosunda en geç 30 dakikada olacak şekilde besiyeri sıcaklığı 45-50 °C' a indirilir. Tekrar çalkalanıp steril petri kutularına 12,5' er ml dökülür. Döküm sırasında petri kutuları soğuk olmalıdır. Besiyeri dökülmüş petri kutuları besiyeri katılaştıktan sonra stretch film ile sarılarak buzdolabının en alt gözünde ve 6 °C' in altında olmamak üzere saklanır. Besiyeri 2 aydan uzun depolanmaz. Besiyeri kullanılmadan önce yüzeyi kontrol edilir, ıslak bir görüntü varsa kurutulur. Aşırı kurutma yapılmamalıdır. Rambach Agar bugün için kullanılan *Salmonella* izolasyon besiyerleri içinde başta *Proteus* olmak üzere refakatçi flora ile en iyi ayrımı sağlayan besiyeridir. Bu besiyerinde *Salmonella* kırmızı renkli koloni oluşturur iken *Proteus* ve *Shigella* renksiz sarımsı, koliform bakteriler mavi-yeşil veya mavi-mor renkli, *Pseudomonas* renksiz kırmızımsı koloni morfolojisi verir. *Salmonella*, besiyeri bileşimindeki propylen glyocol' den asit oluşturur ve pH indikatörü ile koloni renginin kırmızı olması



sağlanır. Koliform grup bakterilerin *Salmonella* 'dan ayrımı için bileşimde kromojenik substrat vardır. Koliformlar için spesifik olan  $\beta$ -galactosidase enzimi ile bu kromojenik substrat parçalanır ve böylece koliformlar tipik mavi-yeşil renkli koloni oluşturur. 4 X 250 ml olan 1 kutu besiyeri ile 80 petri kutusu hazırlanır. Rambach Agar hakkında daha fazla bilgi almak için [burayı tıklayın](#).

#### **04.09. Hektoen Enteric Agar (Merck 1.11681)**

Dehidre besiyeri 75 g/l olacak şekilde distile su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda eritilir ve steril petri kutularına 12,5' er ml dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri parlak ve mavi-yeşil renklidir. Besiyeri bileşimindeki safra tuzları çoğu refakatçi floranın gelişimini engeller. Tiyosülfat, hidrojen sülfür pozitif kolonilerin siyahlaşmasını sağlar. Bileşimdeki 2 farklı pH indikatörü yardımı ile laktöz pozitifler negatiflerden rahatlıkla ayrılır. Besiyeri bileşimine 50 °C' a soğuduğunda 15 mg/litre konsantrasyonda olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş novobiosin (Merck 1.06255) katılmasının selektiviteyi artıracığı belirtilmektedir. Bu besiyerinde siyah bir merkezi olan veya olmayan mavi-yeşil renkli koloniler *Salmonella*, *Paracolobactum* ve *Proteus* olarak tanımlanırken, yeşil, nemli, düz ve saydam koloniler *Shigella* ve *Providencia* olarak, yeşil-mavi renkli, düz ve kenarları düzgün olmayan şekilde olanlar *Pseudomonas* olarak ve pembe renkli, etrafında bir çökelti zonu olanlar ise koliform bakteriler olarak tanımlanır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 533 adet petri hazırlanabilir.

#### **04.10. Salmonella-Shigella (SS) Agar (Merck 1.07667)**

Dehidre besiyeri 60 g/l olacak şekilde distile su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda eritilir ve steril petri kutularına 12,5' er ml dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızımsı kahve renklidir. Besiyeri bileşimindeki brilliant green, safra tuzları, tiyosülfat ve sitrat çoğu refakatçi floranın gelişimini engeller. Hidrojen sülfür oluşumu tiyosülfat ve demir iyonları ile belirlenir. Renksiz-yarı saydam koloniler *Shigella* ve pek çok *Salmonella* için tipiktir. Bazı *Salmonella* türleri siyah merkezli yarı saydam koloni oluştururlar. Aynı morfoloji *Proteus* türleri için de geçerlidir. Pembe-kırmızı koloniler *E. coli* olarak tanımlanırken, pembe-beyaz ya da krem renkli olanlar *Enterobacter aerogenes* kolonileridir. Bu besiyerinde *Salmonella* kolonilerinin *Shigella* kolonilerinden ayrımı besiyerinde koloni etrafındaki renk değişiminin *Salmonella* 'da sarı, *Shigella* 'da sarımsı olması ile yapılır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 666 adet petri kutusu hazırlanabilir.

#### **04.11. Xylose Lysine Deoxycholate Agar (Merck 1.05287)**

Dehidre besiyeri 55 g/l olacak şekilde distile su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda eritilir ve steril petri kutularına 12,5' er ml dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir. Besiyeri bileşimindeki tiyosülfat ve demir tuzu ile hidrojen sülfür oluşumu, ksiloz ve/veya laktöz ve/veya sakkarozun kullanımı bir pH indikatörü olan fenol red ile belirlenir. Lisinin dekarboksilasyonu ile

kadeverin oluşması koloni etrafındaki pH yükselmesine bağlı olarak menekşe renkli bir zon ile görülür. Bu besiyerinin refakatçi flora üzerinde zayıf bir inhibitör etkisi vardır. *Salmonella* kolonileri besiyeri ile aynı renkte, yarı saydam, bazen siyah merkezli olurlar. *Shigella*, *Providencia*, *Pseudomonas* kolonileri de besiyeri ile aynı renkte ve yarı saydamdır ancak bunlarda siyah merkez oluşmaz. Sarı ve sarı zonlu koloniler koliform grup bakteriler, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Proteus* ve *Hafnia* kolonileridir. Ksiloz pozitif olan *Salmonella* Typhosa bu besiyerinde portakal-hafif opak koloni oluşturur. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 727 adet petri hazırlanabilir. Bu besiyeri hakkında daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).

#### 04.12. XLT4 Agar (Merck 1.13919)

Dehidre besiyeri 59 g/l konsantrasyonda destile suya katılır, üzerine XLT4 Agar katkısından (Merck 1.08981) 4,6 ml eklenir. Kaynar su banyosunda tutularak eritilir. Eritme işleminin ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda yapılmamalıdır. Isıya oldukça duyarlı olan bu besiyeri 50 °C üzerinde 45 dakikadan fazla tutulmalı, 50 °C 'a soğutulup petrilere dökülmelidir. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızıdır. Bileşimindeki besin maddeleri *Salmonella* 'nın gelişini teşvik ederken, Tergitol-4 / Sodium tetra-decylsulfate refakatçi florayı inhibe eder. 35 – 37 °C 'da 18 – 24 saat inküasyondan sonra *Salmonella* kolonileri hidrojen sülfür oluşumuna bağlı olarak siyah renkli görülür. Bu besiyerinde *E. coli* ve *Proteus* türleri zayıf, *Enterobacter aerogenes* ve *Citrobacter freundii* iyi gelişir ve tümü sarı renkli koloni oluşturur. Selektif katkı %26 – 28 konsantrasyonda Sodyum tetradecil-sülfat bileşimindedir ve 100 ml ambalaj şişede pazarlanmaktadır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 ml/petri hesabı ile 678 petri kutusu hazırlanır. 1 şişe selektif katkı 2,5 kutu dehidre besiyeri için yeterlidir. XLT4 Agar hakkında daha fazla bilgi almak için [burayı tıklayın](#).

#### 04.13. MSRVR Medium (Merck 1.09878)

Diğer besiyerlerinden farklı olarak 15,8 g dehidre besiyeri 500 ml distile su içinde tümüyle çözülünceye kadar kaynar su banyosunda tutulur. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyerini eritirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Besiyeri sıcaklığı 50 °C' a düştüğünde 1 ml steril distile su ile sulandırılmış olan 1 şişe MSRVR Medium selektif katkısı (Merck 1.09874) ilave edilir, karıştırılıp steril petri kutularına dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve mavi renklidir. Buzdolabında 2 hafta süre ile depolanabilir. Diğer geleneksel *Salmonella* izolasyon besiyerlerine kıyasla MSRVR Medium besiyerinin daha iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir. Bu besiyerinde *Salmonella* belirlemenin prensibi *Salmonella* 'nın yarı katı besiyerinde hareket ederken opak hale oluşturmasıdır. Hareketli diğer refakatçi floranın hareketini magnezyum klorür, malaşit yeşili ve novobiosin varlığı ile 43 °C' a yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı engeller. Besiyeri kullanılmadan önce oda sıcaklığında en az 1 saat tutularak yüzeyinin yeterince kuruması sağlanmalıdır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile her petride 12,5 ml olacak şekilde 1265 adet petri hazırlanabilir. Bu besiyeri ile birlikte kullanılan MSRVR Medium selektif katkısının 1 kutusunda 16 şişe vardır. Her şişe 500 ml besiyerine (40 petri kutusu) ilave edileceğine göre 500 g olan 1 kutu dehidre bazal besiyeri için toplam 32 şişe (2 kutu) selektif katkı gereklidir. Dehidre besiyeri kullanım hacmine bağlı olarak stok selektif katkı miktarı planlanmalıdır. MSRVR Medium hakkında daha fazla bilgi almak için [burayı tıklayın](#).

#### 04.14. Diasalm Medium (Merck 1.09803)

Dehidre besiyeri 64 g/l konsantrasyonda olacak şekilde kaynar su banyosunda tümüyle eriyinceye kadar tutulur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. 45 – 47 oC 'a soğutulup 1 şişe MSRVR katkısı (Merck 1.09847) ilave edilir. MSRVR katkısı liyofilize formda olup, üzerine 1 ml steril destile su ilave edilerek eritilir. Hazırlanmış besiyeri koyu yeşil renkli ve berraktır, buzdolabı sıcaklığında 1 hafta depolanabilir. Kullanılmadan önce oda sıcaklığında en az 1 saat tutularak yüzeyi kurutulur. Tamponlanmış Peptonlu suda önzenginleştirme kültüründen besiyerinin tam ortasına 0,1 ml ya da 3 noktasına 0,03 ml damlatılır. Petriler düz şekilde (taban üzerinde) 42 °C 'da 12 –28 saat inkübe edilir. İnkübasyon 24 saati geçmemelidir. Hareketli *Salmonella* damlatma yapılan yerin etrafında menekşe renkli bir zon ile yayılıcı koloni yapar. Bu zonun etrafında açık kahve – siyah renkli ikinci bir zon daha görülür. Koloninin yayılma göstermemesi ve gri – siyahımsı merkezli olması hareketsiz *Salmonella*, *Citrobacter freundii* ya da *Proteus* spp. olasılığı gösterir. Bu besiyeri yarı katı indol hareket (SIM Medium ; Merck 1.05470) ile RVS Broth karışımına benzer. Yüksek konsantrasyondaki magnezyum klorür, novobiosin, malahit yeşili Gram negatif ve pozitif pek çok refakatçi florayı inhibe eder. Besiyerinin yarı katı olması hareketli *Salmonella* 'nın yayılıcı koloni oluşturmasını sağlar. Nadiren de olsa *Salmonella* bazen diğer bakteri kolonilerinin üzerinde de gelişir. Bu nedenle yayılmış koloninin dış tarafından alınacak bir öze kültürün Rambach, XLT4 gibi selektif bir besiyerine sürülmesi önerilmektedir. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 12,5 ml/petri hesabı ile 625 petri hazırlanabilir. 1 kutu MSRVR katkısı 2 kutu Diasalm Medium için yeterlidir. Diasalm Medium hakkında daha fazla bilgi almak için [burayı tıklayın](#).

#### 04.15. Urea Broth (Merck 1.08483)

3,85 g dehidre üre broth besiyeri 100 ml distile su içinde gerekirse hafifçe ısıtılarak (40 °C) çözülür ve filitre ile sterilize edilir. Bu amaçla 250 ml hacminde steril erlen kullanılır. Daha sonra steril vida kapaklı küçük tüplere steril pipet kullanılarak 3' er ml dağıtılır. Kapaklar tam sıkı olacak şekilde kapatılır ve buzdolabının alt gözünde saklanır. Filtre olanağı yok ise tüplere dağıtımdan sonra kaynar su banyosunda 5 dakika tutularak sterilizasyon sağlanabilir. Besiyeri 1 aydan uzun depolanamaz. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile 3 ml hacminde 4329 identifikasyon tüpü hazırlanır.

#### 04.16. Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915)

6,5 g dehidre Triple Sugar Iron Agar besiyeri 100 ml destile suya ilave edilir, kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak besiyerinin iyice erimesi sağlanır. Besiyeri sıvı halde iken standart 16x160 mm tüplere 7' şer ml olarak dağıtılır, ve tüpler 121 °C' da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılır. Bu şekilde tüpün dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olmalıdır. Tüpler bu şekilde bekletilir, besiyeri katılaştıktan sonra tüpler strech filim ile sarılarak buzdolabının alt gözünde 2 aya kadar depolanır. Bu besiyerinin standart yöntemle hazırlanmasında önce sterilizasyon sonra tüplere dağıtım vardır. Ancak yukarıda verilen yöntemle göre besiyerinin önce tüplere dağıtılıp sonra sterilizasyonu tartışmasız bir şekilde daha güvenli ve daha kolaydır. 500 g olan 1 kutu dehidre besiyeri ile her tüpte 7 ml olmak üzere 1098 identifikasyon tüpü hazırlanır. Bu besiyeri hakkında daha fazla bilgi için [burayı tıklayın](#).