

Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi (06)

08. İnkübasyon

A. Kadir Halkman¹

08.01. Giriş

İnkübasyonda 3 temel konu; sıcaklık, süre ve gaz atmosferidir. Analizi yapılmakta olan hedef mikroorganizmanın özelliğine göre bu 3 faktör tam olarak sağlanmalıdır.

Analiz raporunda inkübasyonda uygulanan sıcaklık, süre ve gaz atmosferi açık bir şekilde yazılmalıdır. Özellikle toplam bakteri sayımında olduğu gibi farklı inkübasyon sıcaklık ve süreleri uluslararası standartlarda farklı şekilde tanımlanıyorsa analiz raporunda bu belirtilmeler çok daha önemli olur.

08.02. İnkübasyon Sıcaklığı

Mikrobiyoloji laboratuvarında standart hava inkübatörü ve su banyosu olmak üzere 2 tip inkübatör vardır. Ayrıca bazı cihazlarda inkübasyona bırakılacak tüp, özel bir metal yuvaya yerleştirilir.

Günlük gıda analizlerinde kontrolü yapılan mikroorganizmaların çok büyük bir çoğunluğu mezofil sınırdadır ve inkübasyon sıcaklıkları 28-30 °C ve 35-37 °C'tır. Psikrofil ve termofil bakteri analizlerinde belirtilen sıcaklıklar literatürde farklı şekilde gösterilmekle beraber, yaygın kullanılan değerler psikrofiller için 7 °C ve termofiller için 55 °C'tır.

28-30 °C ve 35-37 °C'ta yapılan inkübasyonların fazlaca bir özelliği yoktur. Ekim, standart laboratuvar sıcaklığında yapıldıktan sonra materyal (tüp, erlen, Petri kutusu, kavanoz vb.) standart hava inkübatörüne yerleştirilir. Bu uygulamada, önceden alınması gereken bir önlem yoktur.

Psikrofil, termofil ve mezofil sınırdaki olmakla beraber fekal koliformlar için 44,5 °C ve streptokok tanımlanması için yapılan 15 ve 45 °C'ta gelişme testleri gibi özel inkübasyon sıcaklığı gerektiren çalışmalarda önceden hazırlık yapılmalıdır.

Öncelikle bu gibi özel inkübasyon sıcaklıklarında tercihen su banyosu kullanılmalıdır.

¹ Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: halkman@eng.ankara.edu.tr

Oda sıcaklığındaki ekimi yapılmış bir tüpün, hedeflenen düşük ya da yüksek sıcaklığa erişmesi, hava inkübatörüne göre su banyosunda daha kısa sürede gerçekleşir. Var/ yok testlerinde olduğu gibi daha büyük hacimler kullanılıyorsa bu sürenin daha uzun olacağı açıktır.

İstenen düşük ya da düşük sıcaklığa erişinceye kadar geçen süre içinde, hedeflenen mikroorganizma dışında refakatçi flora belirli bir gelişme gösterebilir. Ve bu gelişme, sahte (false) pozitif değerlendirmelere neden olabilir.

İkinci olarak, hava inkübatörünün kapağının açılıp kapanması, su banyosuna oranla inkübasyondaki materyal için daha fazla etkilidir. Bu kez, tersine olarak büyük hacimler bu gibi uygulamalardan daha az etkilenirler.

Bu vb. nedenlerle böylesi özel inkübasyon sıcaklığı gerektiren çalışmalarda su banyosu kullanılması hava inkübatörlerine tercih edilmelidir.

Ancak, su banyosunun sıcaklık ayarı mutlak olarak mikroprosesör kontrollü olmalı ve su banyosunda sürekli sirkülasyon olmalıdır. Bu özellikleri sağlayamayan su banyolarının kullanılması, mikroprosesör kontrollü hava inkübatörlerine tercih edilmemelidir.

Laboratuvarda mikroprosesör kontrollü su banyosu yoksa ancak mikroprosesör kontrollü hava inkübatörü varsa 2 şekilde sorun giderilebilir:

- Hava inkübatörüne içinde su olan uygun bir kap yerleştirilir. Ekim sonrasında tüpler (ya da diğer materyal) bu su ortamına yerleştirilir. Böylece inkübatör kapağı açılması gibi uygulamalardan en az sapma sağlanmış olur.

- Ekimi yapılacak tüp, erlen vb. materyal önceden inkübatöre konularak gereken düşük ya da yüksek sıcaklık elde edilir. Ekim sonrasında bu materyal hızla inkübatöre yerleştirilir.

Petri kutularının özellikle yüksek sıcaklıklardaki inkübasyonlarda kuruma riski vardır.

- Su banyosunda inkübasyon yapılacaksa Petri kutuları su geçirmeyen basit mutfak tipi poşetler içinde iyice sarmalanarak inkübasyona bırakılabilir.

- Fekal koliformlar fakültatif anaerobdur. Ekim sonrasındaki yüksek inkübasyon sürecinde asıl besiyerindeki kurumayı önlemek için besiyeri üzerine 2. kat olarak aynı besiyeri ya da en ucuz olmak üzere %2 su agar besiyerinden 2 mm kat oluşturacak şekilde besiyeri dökülmesi ile kuruma önlenir.

- Alicyclobacillus* analizinde olduğu gibi aerob bir bakteri uzun süre yüksek sıcaklıkta inkübe edilecekse, Petri kutularının mutfak tipi strech film ile sarılması gereklidir.

Hava inkübatörleri kullanıldığında dikkat edilmesi gereken 2 önemli konu raflar arası sıcaklık farklılığı ve ısı sirkülasyonudur.

Hava inkübatörünün alt ve üst raflarında su olan uygun bir kap içinde termometre bulundurulmalı ve sıcaklık kayıtları her gün 09.00 gibi sabit bir zaman aralığında ölçülmeli ve kayda geçirilmelidir. 2 raf arasındaki sıcaklık farkı 1 °C'ı aşarsa düzeltici faaliyet uygulanmalıdır.

Hava inkübatöründe yeterli hava sirkülasyonu sağlanmalıdır. Tüp sporu ve erlenlerde bir sorun olmaz iken Petri kutuları ve standart kavanozlarda hava sirkülasyonu için yatay ve dikey konumda önlem alınmalıdır. Buna göre Petri kutusu yığınları ve kavanozlar arasında enine ve boyuna olmak üzere 2,5 cm boşluk olmalı, Petri kutusu yığınlarında üstü süte konulacak en çok Petri kutusu sayısı; cam Petri kutuları için 6 ve plastik Petri kutuları için 8'i geçmemelidir.

Genel bir yaklaşım olarak, ekimi yapılmış Petri kutularında inkübasyon süresi içinde kondensasyon ve buna bağlı olarak su damlacıklarının Petri kutusuna düşerek yüzeyde nemlenme ve kolonilerin yayılması gibi bir sorun vardır. Eğer, besiyeri Petri kutusuna 45-50 °C'ta dökülür ise bu kondensasyon en aza iner.

Basit olarak Petri kutularının kapağı üzerine inkübatöre yerleştirilmesi ile bu sorun ortadan kaldırılırsa da membran filtrasyon çalışmalarında Petri kutularının kapağı üzerine inkübasyonu söz konusu değildir.

Membran filtrasyon örneğinde olduğu gibi, Petri kutularının tabanı üzerine yerleştirilmesi zorunlu olan çalışmalarda; besiyeri, Petri kutusuna 45-50 °C'tan daha yüksek sıcaklıkta dökülmez ve/ veya yeterli bir yüzey kuruması yapılır.

08.03. İnkübasyon Süresi

Ekimi yapılmış materyalin standart bir sıcaklık/ süre ilişkisi vardır. Pek çok uluslararası kaynakta bu süre 24-48 gibi yoruma açık bir şekilde verilmektedir.

Aslında burada yoruma açık bir şey yoktur.

24-48 saat bildirişim şu şekilde yorumlanmalıdır: "Standart inkübasyon süresi 24 saattir. Bu süre içinde pozitif sonuç veren tüpleri (erlenleri, Petri kutularını) bu şekli ile değerlendirin ve varsa ileri aşamalara devam edin. Eğer negatif sonuç aldı iseniz inkübasyona 24 saat daha devam edin. Toplam 48 saat sonunda negatif sonuç alırsanız bunu negatif olarak değerlendirin ama geç gelişme olasılığını dikkate alarak 24 saat sonunda negatif sonuç vermeyin. 24 saat sonunda negatif ama 48 saat sonunda pozitif sonuç elde ederseniz çalışmaya standart şekli ile devam edin. Pozitif sonucu 24 yerine 48 saatte alırsanız, bunu bu şekli ile kaydedin".

08.04. İnkübasyon Gaz Atmosferi

Standart gıda mikrobiyolojisi analizlerindeki anaerob bakteri ekimlerinde uygulanacak kurallar tanımlanmıştır.

Temel olarak 3 gaz atmosferi vardır: Aerob, anaerob ve mikroaerofil.

Aerob inkübasyonda; ekim yapılır ve materyal doğrudan inkübatöre yerleştirilir. Havadaki serbest oksijen, aerob mikroorganizmaların gelişmesini sağlar. Gıda sanayisinde en yaygın analizi yapılan toplam bakteri, toplam maya ve küf ile koliform grup mikroorganizmaların inkübasyonu bu şekilde yapılır. Benzer şekilde *Staph. aureus*, *Listeria spp.*, *Bacillus spp.* analizleri de aerob atmosferde yapılır.

Staph. aureus ile yapılan bazı çalışmalarda inkübasyon sırasında tüpün üzerine 1 cm kalındığında sıvı parafin ilave edilir. Bu uygulama ile refakatçi floranın gelişmesi baskılanırken, *Staph. aureus* normal olarak gelişimine devam eder. Benzer uygulama koliform bakteriler için de yapılır ve ekim sonrasında VRB Agar besiyeri üzerine 6-7 mL kadar ikinci kat besiyeri ilave edilir. Toplam bakteri analizlerinde ise yayılıcı basiller florada hâkim ise, ekim sonrasında Plate Count Agar besiyeri üzerine 5 mL kadar ikinci kat olarak Su Agar dökülür. Bu uygulama sadece basillerin yayılmasını engelleyecek bir baskımla yapar, anaerob bir ortam sağlamaz.

Anaerob inkübasyon için çok farklı uygulamalar vardır. Bugün en yaygın olarak kullanılan oksijenin kimyasal olarak bağlanmasını sağlayan kitlerdir. Ekim yapılmış materyal, kapağı sızdırmaz olarak kapatılabilen özel bir kavanoza (anaerobik kavanoz) koyulur, su ilavesi ile aktive edilen anaerob kit de bu kavanoza yerleştirilir ve kapak kapatılır. Bu sistemde anaerob atmosferin sağlanması basit olarak metilen mavisi içeren test şeritleri ile kontrol edilebilir.

Ekimi yapılmış materyalin bulunduğu kavanozda vakum ile havanın çekilmesi, kavanozda mum yakılarak kapağın kapatılması (mum kavanozu; candle jar) gibi uygulamalar da bulunmaktadır. Benzer şekilde besiyeri üzerine sıvı parafin ya da ikinci kat besiyeri ilavesi ile kısmi bir anaerob ortam sağlanabilir.

Mikroaerofilik (kapneik) mikroorganizmalar ile çalışılırken bu amaca uygun kitler kullanılmalıdır. Bu kitler anaerob kavanozda istenilen gaz bileşimini sağlar. *Campylobacter* spp. çalışmaları bunun tipik bir örneğidir.

08.05. Çalkalamalı İnkübasyon

E. coli O157:H7 analizinde olduğu gibi bazı inkübasyonlarda çalkalama istenir. Benzer şekilde endüstriyel mikrobiyolojide çalkalamalı inkübasyon çok sık uygulanır. bazı hava inkübatörleri ve su banyoları zaten çalkalamalıdır. İnkübatör içine çalkalama cihazı da yerleştirilebilir.

Eğer inkübasyon çalkamalı olarak yapılıyorsa bu durum analiz raporunda belirtilmelidir. Bilimsel araştırmalarda çalkalayıcı tipi ve çalkalama hızı da belirtilmelidir. Çok özel analizlerde ilave olarak, çalkalamanın dairesel çapı da analiz raporuna eklenir.