

KOLİFORM BAKTERİ SAYIMI, E.COLİ İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON

a. GENEL ÖZELİKLER

(1) Koliform Grubu Bakteriler :

Aerob ve fakültatif anaerob, Gram (-) spor oluşturmeyen çubukçuk formunda mikroorganizmalar olup, 35 - 37 °C'de 48 saat de laktozu fermente ederek gaz ve asit oluşturma özelliğine sahiptirler.

Escherichia, *Klebsiella*, *Citrobacter* ve *Enterobacter*'ler koliform grubu bakterilerdir

(2) Fekal Koliform Grubu Bakteriler :

İnsan ve sıcak kanlı hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunurlar. Laktozlu ortamda 44 - 45 °C'de (44.5 C) laktozu fermente ederek gaz oluştururlar. Isıya dirençli termotolerant bakteriler olarak da değerlendirilir.

(3) *Escherichia coli* :

Enterobacteriaceae familyasında yer alan bu bakteri Gram (-), fakültatif anaerob ve çubukçuk formundadır. *E.coli* kısa tipik hareketli (peritrik flagellalı, bazıları hareketsiz) olup, bu yönüyle çoğu *Salmonella* serotipleri ile benzerlik gösterir. *E.coli* 4 - 46 °C'ler arasında üreyebilmektedir. Optimal ısı derecesi olan 37 °C'de gelişirler. Optimal pH değeri 7.2 iken, minimal pH değeri ise 5.0'dir. Su aktivitesi (a_w değeri) 0.95'dir. % 6.5 NaCl içeren ortamda *E.coli* 0157 H7'nin yavaşta olsa ürettiği belirlenmiştir. *E.coli*'nin, *Salmonella*'dan ayırımındaki temel özelliklerinden birisi, laktozu ve sakkarozu fermente ederek asit ve gaz oluşturmalarıdır.

E.coli'nin patojen olmayan suşları, insan ve hemen hemen bütün sıcak kanlıların normal, bağırsak florasında bulunur. Bu bakterinin insanlar için patojen olanları 6 grupta toplanmaktadır. Bunlar; Enteropatojenik *E.coli* (EPEC), Enteroinvaziv *E.coli* (EIEC), Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), Enterohemorajik *E.coli* (EHEC), Enteroaggregatif *E.coli* (EaggEC) ve Diffüzadeziv *E.coli* (DAEC) dir.

b. TANIMLAR

(1) TBX (Tryptone Bile X glucuronide) Medium :

Tryptone	20.0 g
Bile salts No.3.	1.5 g
Agar	15.0 g
X Glucoronat	0.075 g
Distile Su	1000 ml
pH	7.2 ±0.2

bileşiminde hazırlanan besiyeridir.

(2) VRBL (Violet Red Bile Lactose) Agar:

Yeast extract	3.0 g
Peptone	7.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Bile Salts no 3	1.5 g
Lactose	10.0 g
Neutrel red	0.03 g

Crytal violet	0.002g
Agar	12.0 g
Distile Su	1000 ml
pH	7.4 ±0.2

bileşiminde hazırlanan besiyeridir.

(3) EC (Chromogenic E.coli / Coliform medium) :

Peptone	5.0 g
Lactose	2.5 g
Yeast extract	3.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Neutral red	0.03 g
Di.Sodium hydrojen phosphate	3.5 g
Potassium di.hydrojen phosphate	1.5 g
Agar	15.0 g
Chromogenic mix	20.3 g
Distile Su	1000 ml
pH	7.4 ±0.2

bileşiminde hazırlanan besiyeridir.

(4) L.S.T. (Lauryl Sülfat Tryptose Broth):

Tryptose	20.0 g
Lactose	5.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Di-Potassium Phosphate	2.75 g
Potassium Phosphate	2.75 g
Sodium Lauryl Sulphate	0.1 g
Distile Su	1000 ml
PH	6.8± 0.2

c.DENEY

(1) 10 g numune hassas terazide tartılarak steril poşet veya kavanoza konulur. 90 ml peptonlu su ile 1 / 10 oranında homojenize edilir.

(2) Katı Besiyerine Ekim : Hazırlanan homojenattan alınarak dökme plak (1ml), yayma plak(0.1ml) veya damla plak(0.05ml) metodlarından birisi ile Violet Red Bile Lactose (VRBL) Agar ya da EC Agara ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat (30 °C'de 48 saat anaerob) inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra 0.5 mm büyüklüğündeki vişne renkli presipitasyon oluşturan kolonilerden yuvarlak uçlu öze yardımıyla Endo Agara (EA) çizme plak yöntemi ile geçirilir. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. Metalik parlaklık görülürse *E.coli* şüpheli olarak değerlendirilir.

Gıdalarda *E.coli* izolasyonu ve sayımı için son yıllarda geliştirilmiş olan Tryptone Bile X-glucuronide Medium (TBX) kullanılmaktadır. Hazırlanan gıda homojenatından 0.1 ml alınarak yayma plak metodu ile TBX mediuma ekim yapılır. Petriler 30 °C'de 4 saat daha sonra 44 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra oluşan mavimsi yeşil koloniler *E.coli* olarak değerlendirilir.

(3) IMViC Testi : *E.coli*'nin identifikasyonunda kullanılır. Endo Agarda üreyen *E.coli* şüpheli kolonilerin doğrulanması amacıyla yapılır.

(a) İndol Testi : Endo agardaki *E.coli* şüpheli koloniden % 1'lik triptofanın sudaki çözeltisinden hazırlanan Tryptone Broth'a (TB) öze ile geçilir. 35 - 37 °C'de 24 saat inkübe edilir. Koliform bakteriler triptofanaz enzimi üretilip üretilmediğini yetenekleri ile birbirinden ayrılırlar. Triptofanaz enzimine sahip mikroorganizmalar, triptofan amino asidinden indol, amonyak ve pirüvik asit oluşturur. Pozitif reaksiyonda kovacs ayırıcı damlatıldığında brothun üst yüzeyinde kırmızı-menekşe renkli halka oluşur.

(b) Metil Red Testi : Endo agardaki *E.coli* şüpheli koloniden Metil Red-Voges Proskauer Medium (MR-VP) bulunan tüpe öze ile geçilir. 37 °C'de 5 gün inkübe edilir. İnkübasyondan sonra tüpe metil red indikatörü ilave edilir. Kırmızı renk oluşumu metil red testinin pozitif olduğunu gösterir. Negatif test sonucunda sarı veya portakal renk meydana gelir.

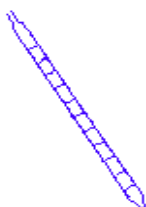
(c) Voges Proskauer Testi : Endo agardaki *E.coli* şüpheli koloniden MR-VP medium bulunan tüpe öze ile geçilir. 37 °C'de 48 - 72 saat (48 saatten önce test yapılmaz) inkübe edilir. İnkübasyondan sonra bakterilerin butanediol fermantasyon yeteneğinde olup, olmadıkları araştırılır. Bu test için; Barrit's reagent A (α -naphtolün alkoldeki % 5'lik solüsyonundan 0.6 ml.) ve Barrit's reagent B (% 40'luk KOH solüsyonundan 0.2 ml ve % 0.5'lik kreatin solüsyonundan 2 damla) inkübe edilen kültüre ilave edilir. Pozitif reaksiyonlarda kırmızı renk oluşur. Negatif reaksiyonlarda kırmızı renk oluşmaz.

(d) Sitrat Testi : Simon sitrat yatık agara Endo agardaki şüpheli koloniden iğne uçlu öze yardımı ile ekim yapılır. 37 °C'de 24 saat inkübe edilir. Test tüpünün rengi nötral pH değerinde yeşildir. Ancak pH 7.6' nın üzerinde yoğun koliform üremesine bağlı olarak amonyum tuzlarından alkali üretimi sonucu besiyerindeki brom timol mavisini indikatörü koyu prusya mavisine dönüşür. Renk değişikliğinin oluşmaması negatif olarak değerlendirilir.

IMViC

+ + - - % 90-95 görülür. \longrightarrow ise *E.coli* olarak değerlendirilir
- + - - % 3 - 4 görülür.

Deneyi devam eden numuneler Gıda Mikrobiyoloji Laboratuvarında numuneler için tahsis edilmiş soğutucuya konulur ve sonuç çıkana kadar burada bekletilir.



10 gr. Numune
+
90 ml Peptonlu
su

