

MİKROORGANİZMALARIN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

Mikrobiyolojide izole edilen bir bakterinin tanımlanması çoğu kez önemlidir. Örneğin, bir gıda maddesinden izole edilen bakterinin gerçekten *Salmonella* cinsine ait olup olmadığının belirlenmesi gereklidir. Buna göre ürün imha edilebilir veya güvenli bir şekilde pazarlanabilir.

Ne olduğu hiç bilinmeyen bir izolatin tanımlanması ile belirli bir cins ya da tür olup olmadığının belirlenmesindeki yöntemler ve yaklaşımlar oldukça farklıdır. Örneğin, izolatin *Salmonella* olup olmadığının incelenmesindeki uygulamalar ile izolatin ne olduğunun araştırılmasındaki uygulamalar farklıdır.

Tanımlamada basit ve yaygın olarak morfolojik analizler ve biyokimyasal testler uygulanmaktadır. Faj tiplendirmesi ve genetik esaslı testler, ancak gelişmiş laboratuvarlarda ve genellikle bilimsel araştırma amacıyla kullanılmaktadır.

Her bakteri veya bakteri grubunun kendine özgü bir biyokimyasal özelliği bulunmaktadır. Diğer bir deyişle, her bakteri kendine özgü enzimlere sahip olup, belirli maddeleri yine kendine özgü bir biçimde metabolize ederek çeşitli yıkım ve yapım ürünleri meydana getirmektedir.

Bilinmeyen veya tanımlanmak istenen bir bakteriye, belirli biyokimyasal testler uygulanır ve elde edilen sonuçlar, Bergey's Manual ve diğer ilgili kaynaklardaki bilgiler ve tanımlama listeleri ile karşılaştırılarak, bakteri tanımlanmasında önemli bir adım atılmış olur. Bakterilerin tanımlanmasında onların diğer bazı özelliklerinin de belirlenmesi gerektiği unutulmamalıdır. Örneğin bazı biyokimyasal testler aşağıdaki şekilde sınıflandırılır:

- Protein, amino asitler ve diğer azotlu bileşikler ile ilgili reaksiyonlar (jelatinin hidrolizi, kazeinin hidrolizi, nitratın indirgenmesi, litmuslu süte etki gibi)
- Karbonhidrat ve diğer karbon bileşikleri ile ilgili reaksiyonlar (nişastanın hidrolizi, karbonhidrat fermentasyon testleri, metil kırmızısı testi, sitrat testi gibi)
- Yağlar ve ilgili bileşikler inceleyen reaksiyonlar (tributirin hidrolizi, lipoliz, lesitin hidrolizi gibi)
- Diğer testler (Katalaz testi, oksidaz testi, fosfataz testi gibi)

9.1. İzolasyon ve İdentifikasyon İçin Kullanılan Besiyerleri

Mikroorganizmaların üretilmesi, canlılıklarının devam ettirilmesi, saf kültürlerinin elde edilmesi, makroskopik morfolojilerinin ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, biyolojik ve metabolik ürünlerinin elde edilmesi vb. amaçlarla, onları buldukları ortam dışında çoğaltmak için kullanılan ve amaca uygun olarak genelde mikroorganizmaların gereksinim duyduğu maddeleri ve özellikleri içeren besleyici ortamlara **besiyeri** denir.

Besiyerleri mikroorganizmaların gereksinim duyduğu temel bazı maddeleri içerecek şekilde düzenlenmelidir. Genel olarak mikroorganizmaların gereksinim duyduğu, dolayısıyla da bileşimlerinde yer verilmesi gereken maddeler şunlardır:

- Su.
- Karbon ve enerji kaynağı maddeler. Karbonhidratlar veya onların yokluğunda proteinler, vb.
- Azot kaynağı maddeler. Proteinler, peptonlar, amino asitler, azotlu inorganik tuzlar (KNO_3 , $(NH_4)_2 PO_4$ gibi) vb.
- İnorganik maddeler.
 - Makroelementler: Na, K, Cl, Ca, Mg, Fe, P, S vb.
 - Mikroelementler: Zn, Mn, Br, B, Cu, Mo, V, Sr vb.
- Üreme faktörleri. Vitaminler, Amino asitler, pürin ve pirimidinler vb.

9.1.1. Besiyeri Çeşitleri

Besiyerleri çeşitli şekillerde sınıflandırılır.

Genel olarak besiyerleri aşağıdaki şekilde gruplandırılabilir:

a. Canlı besiyerleri: Virus ve riketsiyaları üretmek için kullanılır.

b. Doğal besiyerleri: Bileşimlerinde üzüm şırası ve malt suyu gibi doğal ürünler bulunmaktadır.

c. Sentetik besiyerleri: Mikroorganizmaların gereksinim duyduğu maddelerin belirli oranlarda bir araya getirilmesiyle formüle edilen besiyerleridir.

Fiziksel özelliklerine göre besiyerleri katı ve sıvı besiyerleri olmak üzere ikiye ayrılır.

- **Katı besiyerleri**, içinde katılaştırıcı bir ajan (jelatin, pıhtılaştırıcı serum, yumurta, mikroorganizmalar için inert maddelerden olan silika jel; karragenanlar, aljinatlar ve poliakrilamidler) olan besiyerleridir, örneğin Nutrient agar, EMB agar gibi.
- **Sıvı besiyerleri**, içinde katılaştırıcı ajan bulunmayan ve daha çok üremeyi teşvik edici besiyerleridir (Pepton Water, Nutrient Broth).

Bunların dışında ayrıca **yarı katı besiyerleri** vardır. Bunlar sıvı ve katı besiyerleri arasında yer alırlar. Bu besiyerleri, agar ve jelatin gibi katılaşmayı sağlayan maddeleri içermeleri nedeniyle katı besiyerlerine benzerlik göstermelerine rağmen, bu maddelerin oranları düşük olduğu için jelimsi yapıya sahiptir. Bu tip besiyerleri özellikle bakterilerde hareketliliğin saptanmasında kullanılmaktadır.

Besiyerleri kaynaklarına göre **hayvansal** (et suyu, balık unu, yumurta sarısı, karaciğer gb.) ve **bitkisel** kaynaklı (portakal serumu gb.) olmak üzere ikiye ayrılır.

Besiyerleri, kullanım amacına göre de genel ve özel besiyerleri diye ikiye ayrılır.

- **Genel besiyerleri**, Laktik asit bakterileri ve üretimi zor patojen bakteriler hariç, birçok mikroorganizmanın üremesine olanak sağlayan besiyerleridir, örneğin; Nutrient Broth, Nutrient Agar gibi.
- **Özel besiyerleri**, Belli bir amaç veya belli bir mikroorganizma için kullanılan besiyerleridir. Özel besiyerleri şu şekilde sınıflandırılır:

a. Canlandırma besiyerleri: Canlılık oranı çok düşük veya belli bir ortamda hasar görmüş mikroorganizmaların canlandırıldığı, adaptasyonlarının sağlandığı veya kolaylaştırıldığı sıvı besiyerleridir.

b. Selektif (seçici) besiyerleri: İncelenen örnekteki belli bir mikroorganizma veya mikroorganizma grubunun tipik olarak gelişimine olanak sağlayacak şekilde formüle edilen besiyerleridir. Örnekteki diğer istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini tamamen veya belli ölçülerde durdurmak (inhibe etmek) için besiyerine bir ya da daha fazla sayıda inhibitör ajan eklenir. Selektif besiyerlerinde besiyerine özgü mikroorganizmalar tipik bir gelişme gösterirken besiyerine özgü olmayan mikroorganizmalar ya hiç gelişmezler ya da atipik olarak gelişebilirler. Katı selektif besiyerlerinde mikroorganizmalar koloni oluştururken, sıvı besiyerlerinde renk değişimi veya gaz oluşumu gibi değişimler oluştururlar.

Selektif besiyerlerine aşağıdaki örnekler verilebilir :

EMS Agar : Koliform grubu bakterilerin teşhisi ve ayrımı
SS Agar : *Salmonella* ve *Shigella* cinsi bakterilerin izolasyonu ve teşhisi
Baird Parker Agar : *Staphylococcus aureus*'un izolasyonu ve sayımı
Violet Red Bile Agar : Koliform grubu bakterilerin teşhisi
Glucose Azide Broth : Fekal streptokokların belirlenmesi

c. Elektif (seçime dönük) besiyerleri : Belli bir mikroorganizmanın minimum beslenme gereksinimlerini karşılayacak şekilde formüle edilen besiyerleridir.

d. Diferansiyel (farklara dönük) besiyerleri : Belli mikroorganizma türlerinin karakteristik koloniler oluşturarak tanımlanabilir hale geldiği agarlı besiyerleridir.

e. **Zenginleştirme besiyerleri** : İzole edilmek istenen mikroorganizmanın bolca üretilebilmesi amacıyla; bu mikroorganizmanın bir veya birkaç fizyolojik isteğini (pH, besin ögesi gereksinimi vb.) optimum düzeyde karşılayacak şekilde formüle edilen ve inkübasyon koşullarında da (inkübasyon sıcaklığı ve süresi) bu yönde önlemler alınan özel sıvı besiyerleridir.

f. **Biyokimyasal test besiyerleri**

g. **Tamamlama ya da doğrulama besiyerleri**

h. **İndirgenmiş besiyerleri**

9.1.2. Besiyerlerinin sahip olması gereken özellikleri

Bir besiyeri aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

1. Üretilmek istenen mikroorganizmanın gereksinim duyduğu maddeleri içermelidir.
2. Besiyerinin, mikroorganizmanın gereksinim duyduğu optimal koşullara (uygun pH, nem, osmotik basınç ve oksidasyon-redüksiyon potansiyeli) sahip olmasını sağlayacak önlemler alınmalıdır.
3. Kontaminasyona engel olabilmek için uygun ve özel kaplarda hazırlanmalıdır.
4. Sterilizasyona büyük özen gösterilmelidir.
5. Hazırlandıktan sonra sterilite kontrolünden geçirilmelidir.

Her besiyerinin bileşiminde çeşitli sayıda ve miktarda maddeler yer almaktadır. Besiyerlerinin bileşimlerini ve hazırlanış şekillerini birçok mikrobiyoloji kitapları ile besiyeri üreten firmaların el kitaplarında bulmak mümkündür. Besiyerleri kuru formda ve hazır karışımlar halinde ticari olarak üretilmektedir.

- Mikroorganizmaların besin istekleri

Bir besiyerinde mikroorganizma gelişimini sağlayabilmek açısından mikroorganizmaların besin isteklerinin bilinmesi gereklidir. Herhangi bir mikroorganizmanın gelişimine uygun bir besiyerinde 7 temel faktör önem taşımaktadır. Bunlar; su, karbon, enerji, azot, mineraller, gelişme faktörleri ve pH'dır.

- **Su**: Protoplazma % 70-85 su içerir. Tek hücreli bir organizmanın varlığı çevresindeki su ile sürer. Hücre dışındaki besinler hücre içine alınır ve meydana gelen metabolitler hücre dışına salınır. Hücrenin tüm enzimatik reaksiyonları yeterli miktarda su bulunması halinde gerçekleşir.
- **Karbon**: Organizmalar gereksinim duydukları karbon kaynaklarına göre 2 grupta toplanmıştır. Bunlar tüm hücre yapılarının sentezi için karbon kaynağı olarak karbon dioksidi kullanan ototroflar ve karbon kaynağı olarak bir ya da daha fazla organik maddeye gereksinim duyan heterotroflardır. Heterotroflar, ilaveten karbon dioksit de ihtiyaç duyarlar, hatta ortamdan bu gaz uzaklaştırılırsa gelişme önemli ölçüde gecikir.
- **Enerji**: Sahip oldukları pigmentlerle güneş enerjisini kullanabilen organizmalar fotoototrof olarak adlandırılır. Bu organizmalar için hazırlanan besiyerleri enerji kaynağı içermez. Bakterilerin çoğu kemoheterotrof sınıflamasına uymaktadır. Bu bakteriler, glikoz ya da amino asit gibi organik enerji kaynağına gereksinim duymaktadır. Her iki kemosentetik grup için de besiyerine katılan enerji kaynağının oranı % 0,5 düzeyindedir.
- **Azot**: Ototrof organizmaların inorganik azot kaynaklarını kullanabilmelerine karşın, heterotroflar azot kaynağı olarak amino asitler, peptit, proteoz pepton gibi protein parçalanma ürünlerini kullanmaktadır. Nutrient sıvı besiyerinde kullanılan beef ekstrakt ve pepton, heterotrofların bu besiyerinde gelişmeleri için gerekli azot kaynağını oluşturmaktadır.
- **Mineraller**: Tüm organizmalar normal gelişimleri için sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum, mangan, demir, çinko, bakır, fosfor, kobalt gibi metalik elementlere gereksinim duymaktadır.
- **Gelişme faktörleri**: Temel karbon ve enerji kaynaklarından mikroorganizma sentezleyemediği ve hücrenin temel bileşenleri olan maddeler gelişme faktörleridir. Bu tanım bazı amino asitleri ve vitaminleri kapsamaktadır.

- **Hidrojen iyonu konsantrasyonu:** Besiyerinin pH değeri belirli sınırlar içinde değilse organizmaların gelişimi tamamen durabilir. Mikroorganizmaların enzimleri bu faktörden önemli ölçüde etkilenmektedir. Bakterilerin çoğu 7 pH veya biraz altında gelişebildiğinden, nutrient sıvı besiyerinin pH değeri 6,8'e ayarlanmaktadır. Ancak patojenler alkali pH değerlerinin tercih etmektedir. pH değeri 7,3'e ayarlanmış Trypticase Soy sıvı besiyeri, gelişimi zor patojenler için uygun bir besiyeridir.

9.2. İzolasyon Metotları

Mikroorganizmalar doğada saf halde bulunmamaktadır. Diğer taraftan belli bir mikroorganizmanın özelliklerinin incelenmesi ve identifikasyonunun yapılabilmesi için onun saf kültür halinde ve diğer mikroorganizmalardan ayrı olarak elde edilmesi gerekir.

Üzerinde veya içinde mikroorganizma üretilmiş (ya da üremiş) besiyerlerine kültür denir. Kültür tipleri ; saf , karışık, sıvı ve katı kültürdür.

- **Saf kültür:** Besiyerinde yalnızca tek bir mikroorganizma üretilmiş kültürlerdir.
- **Karışık kültür:** İki veya daha fazla çeşitte mikroorganizma türü aynı besiyerinde üretilmişse buna karışık kültür denir.
- **Sıvı kültür:** Sıvı besiyerinde oluşturulmuş kültürlerdir.
- **Katı kültür:** Katı besiyerlerinde (agar içeren) geliştirilmiş kültürlerdir.

Mikroorganizmalar doğada karmaşık, birbiriyle bağlantılı veya bağlantısız olarak yaşamaktadırlar. Bunların **klon** olarak incelenmesi, ancak birbirinden ayırt edildiğinde mümkün olabilmektedir. Bu bakımdan belirli bir mikroorganizmanın özelliklerinin incelenmesi ve teşhisinin yapılabilmesi için saf kültür olarak elde edilmesi gereklidir. Saf olarak elde edilme işlemine **izolasyon** denilmektedir.

Kültüre ait bilgiler, örnek besiyerine aktarılmadan önceki bir aşamada, besiyerinin hazırlandığı petri kutusu, tüp, balon veya erlenmayer gibi kapların uygun bir yerine cam yazar bir kalemle yazılmalıdır. Bu bilgiler şunlar olabilir:

- İnkübasyonun başlatıldığı tarih, gerekirse saat
- Ekilen örneğin adı veya kodu
- Örneğin dilüsyon oranı
- Gerekirse besiyerinin adı
- Gerekirse inkübasyon sıcaklığı ve süresi.

İzolasyon amacıyla çeşitli metotlar kullanılmaktadır.

1. Buyyon dilüsyon metodu
2. Agar dilüsyon metodu
3. Sürme metodu
4. Selektif ve zenginleştirilmiş besiyeri metodu.

- Buyyon dilüsyon metodu

Mikroorganizmaların saf olarak elde edilmesinde sıvı besiyerleri özellikle buyyon dilüsyon metodu eskiden beri kullanılmaktadır. Bunun için içinde buyyon bulunan bir seri tüp hazırlanır. Bu tüplerden ilkinde, bakterinin izole edileceği numuneden pipetle steril şartlarda belli bir miktar aşılır. Tüp iyice çalkalandıktan sonra bu birinci tüpten pipet yardımıyla ikinci tüpe, ikinciden üçüncüye ve bu şekilde devam edilerek istenilen miktarda seyreltme yapılır. Seyreltme yeteri kadar yapıldığında son tüpte birkaç veya tek hücre kalabilir.

Belli bir inkübasyon süresinden sonra orijinal numunede en fazla bulunan mikroorganizma bu en sonuncu dilüsyon tüpünde saf kültür halinde üreme gösterir.

Bu metodun bazı sakıncaları vardır. Başlangıçta en çok mikroorganizma grupları eşit miktarda ise son tüpte ikisi de bulunacaktır. Ayrıca bu yöntemle sadece örnekte en fazla bulunan mikroorganizma izole edilebilecektir.

- Agar dilüsyon metodu

Bu metotta buyyon içine katılmayı sağlamak için agar ilave edilmekte ve seyreltme buyyon dilüsyon metodunda olduğu gibi yapıldıktan sonra petri kutularına dökülmektedir. 40°C'nin altında tutulan petrideki agar katılaştıktan sonra petri belirli bir sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda agar üzerinde koloniler (hücre grubu) oluşur. Eğer yeterli dilüsyon yapılmışsa koloniler birbirlerinden ayrı düşerler. Steril bir öze veya aşı iğnesi ile seçilen koloni tekrar sıvı veya katı besiyerine ekildiğinde mikroorganizmalar gelişerek saf kültürler oluşturulur. Bu metod ilk kez Robert Koch tarafından uygulandığı için "Koch metodu" da denilmektedir.

- Sürme metodu

Bu yöntemde katı besiyeri petri kutularına önceden steril koşullarda konulur. Besiyeri katılaştıktan sonra bunun üzerine öze ile mikroorganizma kültüründen (örnek) sürülür. Öze üzerinde binlerce bakteri bulunduğundan bunun katı besiyeri üzerinde zikzaklar çizerek sürülmesi kolonilerin tek tek düşürülmesini sağlar.

- Selektif ve zenginleştirilmiş besiyeri metodu

Bazı boyalar gram-pozitif, bazıları gram-negatif bakterilerin çoğalmasını önlediği gibi, pH değeri düşük besiyerleri de bir çok bakterinin gelişmesini önlemektedir. Bu durumdan mikroorganizmaların izolasyonunda yararlanılmaktadır. Örneğin Endo agar, gram-pozitif bakteriler için uygun olmaktadır.

9.3. İdentifikasyon Metotları

İzole edilerek saflaştırılan mikroorganizmaların identifikasyonları aşağıdaki yöntemler ile yapılmaktadır.

- Morfolojik Özelliklerin Saptanması

Bunun için mikroorganizmalar sıvı ve katı besiyerinde yetiştirilir. Bakterinin şekli, sıvı besiyerinde zar yapıp yapmadığı, tortu oluşturup oluşturmadığı, katı besiyerinde kolonilerin görünüş ve yapıları saptanır.

- Biyokimyasal Özelliklerin Saptanması

Bu amaçla katalaz testi, oksidaz testi, nitratların redüksiyonu, indol ve H₂S oluşturma, kazein, üre ve jelatinin hidrolizasyonu ve çeşitli şekerleri fermente etme özellikleri özel hazırlanan besiyerlerinde belirlenir.

- Serolojik Deneyler

Mikroorganizmaların aglütinasyon, presipitasyon gibi serolojik özelliklerinden de onların identifikasyonlarında yararlanılır.

9.4. Mikroorganizmaların Sayımı

Bazı mikrobiyolojik problemlerin çözümlenebilmesi için bir ortamdaki mikroorganizmaların sayı ve cinslerinin ortaya konulması gerekmektedir.

Gıdalarda bulunmasına izin verilen ve verilmeyen mikroorganizmaların sayısı gıda maddesinin ve mikroorganizmanın cinsine göre büyük değişiklik gösterir. Bunun yanında çeşitli ülkeler, gelişmişlik düzeylerine göre, gıdalarda bulunması istenmeyen mikroorganizmaların izin verilebilecek sayıları için farklı limitler kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların bulunduğu, onların dahil olduğu çalışma ve araştırmalarda materyalin başlangıçta ve/veya sonuçta bulundurduğu mikroorganizmaların sayısı bilinmelidir. Bu amaçla pek çok sayım tekniği geliştirilmiştir. Sayım yöntemleri ve teknikleri üzerinde; analizi yapılacak mikroorganizma cinsi ve türü, mikroorganizmanın materyalde bulunması beklenen

sayısı, sayım için gerekli toplam süre, sayım maliyeti, sonuçların güvenilirlik oranı gibi çok sayıda faktör etkilidir.

Aşağıda sayım metotları kısaca açıklanmaktadır.

9.4.1. Direkt sayım metotları

9.4.1.1. Breed metodu (Froti sayımı)

Bu metot sıvılarda, özellikle sütlerde bakteri sayımında kullanılır. Bu metotta sonuç kısa zamanda alınmasına karşın, canlı ve cansız bakterilerin birlikte sayılması dezavantajıdır. Metot, belli miktardaki örneği (0,01 ml) bir lam üzerinde işaretlenen 1 cm² lik alana yaymak, tespit etmek ve uygun bir boya ile boyadıktan sonra mikroskop altında saymak ve orijinal örneğin 1 ml'sindeki bakteri sayısını hesaplamaktan ibarettir.

9.4.1.2. Thoma lamı metodu

Özellikle mayaların sayımında kullanılan bu metot bakteri ve spor sayımlarında da kullanılmaktadır. Lam üzerinde kenarları 1/20 mm ve derinliği 1/10 mm olan 400 küçük kare (16 büyük kareden her biri 25 küçük kare içermektedir) bulunmaktadır, ki bunların hacmi 0,1 mm³ yapmaktadır. Alınan belli miktardaki örnek içindeki bakterilerin karelerdeki sayımından 1 ml'deki miktarı hesaplanmaktadır.

9.4.2. Kültürel sayım metotları

9.4.2.1. Koloni sayım metodu

İçindeki mikroorganizma sayısı saptanmak istenen örneğin 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 gibi dilüsyonları hazırlanır, her birinden agarlı besiyerine ekim yapılır ve örnekteki mikroorganizma sayısı saptanır. Örneğin; 1/1.000'lik dilüsyondan alınan 0,1 ml'lik ekimde 15 mikroorganizma sayılmışsa bu dilüsyonun 1 ml'sinde 150 adet ve dilüsyon oranı 1/1.000 olduğuna göre ana örneğin 1 ml'sinde 150.000 adet mikroorganizma vardır.

9.4.3. Roller tüp metodu

9.4.4. Frost'un lam metodu

9.4.5. Mc Crady metodu

KAYNAKLAR

- Acar, J. 1987. Genel Mikrobiyoloji ders notları. Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü. Ankara
- Anonymous. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A.K. Halkman, Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara. 358 s.
- Gürgün, V., Halkman, A.K. 1988. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 7. 146 s.
- Gürsel, A. (Editör). 2015. Mikrobiyoloji, Ankara Üniversitesi Yayınları No:449, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, Türkiye, 206 sayfa. ISBN: 978-605-136-189-5.
- <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab2/lab2.htm>
- <http://www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/pages/101lab4.html>
- Karahan, A. G., Arıdoğan, B.C., Çakmakçı, L. 2002. "Genel Mikrobiyoloji". Uygulama Kılavuzu. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 24. 171 s.
- Özçelik, S. 1998. Genel Mikrobiyoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 1 (İkinci Baskı). 259 s.
- Temiz, A. 1994. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yay. Ankara