

ENTEROBACTER İDENTİFİKASYONUNDA BİRLEŞTİRİLMİŞ TESTLER ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA¹

A RESEARCH ON COMBINED TESTS FOR ENTEROBACTER IDENTIFICATION

Hilal B.DOĞAN², Elif SARIKAYA³ A.Kadir HALKMAN²

2) Ank.Üniv.Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

3) Ank.Üniv.Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

ÖZET: Bu çalışmada enterobakter identifikasyonunda kullanılan sorbitol, hareket ve indol testlerinin tek besiyerinde yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı cins ve türlerden 285 enterobakter suşunda sorbitol, hareket ve indol testleri ayrı ayrı ve kombine besiyerinde yapılmıştır. 3 testin (+) ve (-) olmak üzere toplam 8 kombinasyonunda sadece sorbitol (+), hareket (-), indol (+) olanında sahte (-) indol sonuçları alınmış diğer 7 kombinasyonda bağımsız testler ile kombine besiyeri sonuçları aynı olarak elde edilmiştir. Konu üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

SUMMARY: This research's aim is to make sorbitol, motility and indol tests in one media for enterobacter identification. These tests were made individually and in combined media for 285 enterobacter strains. For the 8 combinations according to (+) and (-) results of these 3 tests, only the combination of sorbitol (+), motility (-), indol (+) gave false (-) results for indol test, but all other 7 combinations same with individually tests. Researchs are continuing on this subject.

GİRİŞ ve LİTERATÜR ÖZETİ

Bir bakteri izolatının identifikasyonu öncelikle çeşitli morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal testler ve gerekirse genetik, serolojik, enzimatik testler ve faj tiplendirmesi ile yapılır. Bu testler sonucunda bakteri cins ve tür bazında tanımlanır. Bazı çalışmalarda izolatın sadece cinsinin bulunması yeterlidir. Örneğin gıdaların rutin mikrobiyolojik kontrolunda bakterinin salmonella cinsine girip girmediğinin belirlenmesi yeterlidir. Buna karşın araştırma esaslı çalışmalarda ise salmonella cinsinin hangi türü olduğu çoğu kere yeterli olmaz, serolojik testler ile tiplendirme yapılır (ANDREWS, 1985; ANONYMOUS, 1984a).

İdentifikasyonda karbohidratların fermentasyonu, indol, metil red ve Voges-Proskauer testleri, sitratın kullanımı, H₂S oluşumu, aminoasit testleri başta olmak üzere izolata pek çok test uygulanmaktadır. Bakteri identifikasyonunda temel kitap olan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology adlı kitabın 9. baskısında (ANONYMOUS, 1994b) enterobakterlerin identifikasyonu için 50 test verilmektedir.

Biyokimyasal test sonuçları çoğunlukla (+) ya da (-), bazende zayıf (w) olarak alınır. Bakterinin yaşı, suşu, testlerde kullanılan besiyerleri ve kimyasalların hazırlanış şekilleri test sonucunu etkiler. Yanlış hazırlanmış bir test çözeltisi ile doğru analiz sonucu elde etmek mümkün değildir. İdentifikasyonda sahte (=false) sonuçların alınması ile kuşkusuz sahte tanımlamalar yapılır. Bu nedenle testlerin doğru sonuç verdiğinden emin olunmalıdır (ANONYMOUS, 1984a; HALKMAN, 1995).

Mikroorganizmaların tanımlanması için kullanılan geleneksel yöntemler, bunların kültüre alınması esasına dayanır. Bu yöntemlerin dezavantajları arasında ayrı ayrı tüplerde veya petriyelerde besiyeri hazırlama, inokülasyon, inkübasyon gibi zaman kaybettirici, emek yoğun çalışmalar vardır. Bunların yanında çoğu kere laboratuvar inkübatörlerinde yer bulmak, bu tüplerin ve/veya petriyelerin yıkanması gibi işlemler de kayda değer sıkıntılar oluşturmaktadır. Bu gibi sıkıntıların giderilmesi amacıyla 1'den fazla testin tek tüp veya petride yapılması konusunda çeşitli çalışmalar yapılmış ve tatmin edici sonuçlar alınmış, bütünleştirilmiş

1)Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen 96-11-12-01 nolu projenin ön bulgularını içermektedir.

testlere yönelik olarak pek çok besiyeri ticari firmalar tarafından üretilerek piyasaya sunulmuştur (HALKMAN, 1995; HALKMAN ve ark., 1994; LASSEN, 1975).

Gıda mikrobiyolojisinde üzerinde en çok çalışılan bakteriler *Enterobacteriaceae* familyası üyeleridir. Bu familyaya ait koliform grup bakteriler ve özellikle *E.coli* ile sadece gıda mikrobiyolojisinde değil tıbbi mikrobiyoloji, veteriner mikrobiyolojisi ve çevre mikrobiyolojisi alanlarında da yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar arasında yukarıda da belirtildiği gibi identifikasyonda testlerin birleştirilmesine yönelik olanların geçmişi 20.Yüzyılın başlarına kadar gitmektedir. İdentifikasyonda bugün için dahi yaygın olarak kullanılan Kligler Iron Agar besiyeri 1917 yılında geliştirilmiştir. Kligler Iron Agar besiyerinde glukoz kullanımı, glukozdan gaz oluşumu, laktozun kullanımı ve H₂S oluşumu testleri bir tüpte yapılmaktadır. Triple Sugar Iron Agar besiyeri Kligler Iron Agar'ın bir modifikasyonudur. Triple Sugar Iron Agar besiyeri bugün pratik uygulamada sadece *Salmonella* için kullanılırken Kligler Iron Agar tüm enterobakter üyeleri için kullanılmaktadır (ANONYMOUS, 1984a ; ANONYMOUS, 1984b; ANONYMOUS, 1994a).

Dulsitol fermentasyonu, malonat kullanımı, fenilalanin deaminasyon testlerinin birleştirilmesi (ESKANAZI ve LITTEL, 1978), sitrat testi, üre testinin birleştirilmesi (KORN, 1980) IMViC testlerinin tek petri kutusunda yapılması (POWERS ve LATT, 1977), β-D-glucuronidase, β-D-galaktozidase, β-D-xylosidase, triptofan deaminaz, hidrojen sülfür, sitokrom oksidase ve indol testlerinin birleştirilmesi (MANAFI ve ROTTER, 1991), konusunda çalışmalar yapılmış ise de bunlar ticari preparat olarak hazırlanmamıştır. LASSEN (1975)'in geliştirdiği Norveç 3'lü tüp yöntemi de ticari olarak üretilmemekle beraber başta salmonella olmak üzere enterik bakterilerin identifikasyonunda başarı ile kullanılmaktadır. Bu sistemde 1.tüpte glukoz fermentasyonu, laktoz fermentasyonu, H₂S oluşumu, lizin dekarboksilaz testi, β-galaktozidaz testi, fenil alanin deaminaz testi ; 2.tüpte mannitol fermentasyonu, hareket ve nitrat redüksiyon testleri; 3.tüpte ise üre kullanımı, indol oluşumu ve triptofan deaminaz testleri olmak üzere toplam 12 test yapılmaktadır (BEKAR, 1995).

Ticari üretimleri olan ve en yaygın olarak kullanılan birleştirilmiş test besiyerleri ise yukarıda belirtildiği gibi Kligler Iron Agar, Triple Sugar Iron Agar, LIM Agar (Lizin dekarboksilasyon, indol, hareket testleri), OIM Agar (ornitin dekarboksilasyon, indol, hareket testleri,) SIM Agar (sülfür, indol, hareket testleri), MR-VP (Metil Red, Voges Proskauer testleri) besiyerleridir. (ANONYMOUS, 1984b; ANONYMOUS, 1988; BRIDSON, 1990; ANONYMOUS, 1994a). Kuşkusuz, bunların dışında birleştirilmiş testlere yönelik daha pekçok besiyeri bulunmaktadır.

MATERYAL, METOT

Materyal

Bu çalışmada kullanılan 285 bakteri 3 ayrı proje çalışmasında gıdalardan izole edilmişlerdir (HALKMAN ve ark., 1994; HALKMAN ve NOVEIR, 1996; HALKMAN ve ark., 1996). Bu bakterilerin cins ve türleri ile sorbitol, hareket ve indol reaksiyonları aşağıda verilmiştir.

Sorbitol (+) , Hareket (+) , İndol (+) : 54 *Escherichia coli*

Sorbitol (+) , Hareket (+) , İndol (-) : 31 *Enterobacter cloaceae*, 19 *Citrobacter freundii*, 10 *Enter. dissolvens*, 5 *Enter. aerogenes*, 4 *Salmonella ssp*, 3 *Serratia proteamoculans*, 3 *Serratia ssp*, 2 *Ser. marcescens*

Sorbitol (+) , Hareket (-) , İndol (+) : 24 *Klebsiella oxycata/planticola*, 5 *E.coli* (Hareket -), 3 tanımlanamadı

Sorbitol (+) , Hareket (-) , İndol (-) : 22 *Kleb. terrigena*, 20 *Klebsiella pneumonia*, 9 *Rahnella aquatica*

Sorbitol (-) , Hareket (+) , İndol (+) : 6 *Providencia rustigianii*, 5 *Proteus vulgaris*, 2 *Prov. rettgeri*, 1 *Escherichia hermannii*

Sorbitol (-) , Hareket (+) , İndol (-) : 11 *Proteus mirabilis*, 9 *Pseudomonas ssp*, 6 *Hafnia alvei*

Sorbitol (-) , Hareket (-) , İndol (+) : 7 tanımlanamadı, 5 *Prov. rustigianii*, 3 *Prov. stuartii*

Sorbitol (-) , Hareket (-) , İndol (-) : 9 *Prot. penneri*, 4 tanımlanamadı, 3 *Ent. hormaechei*

Bu bakterilerin identifikasyonları ANONYMOUS 1994b'ye göre yapılmıştır. 9 adet *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* familyasına dahil olmamakla beraber bu familya üyelerinin izolasyonuna yönelik besiyerlerinden izole edildikleri için bu çalışma kapsamına alınmışlardır. Farklı kombinasyonlarda görülen 14 adet tanımlanamayan bakteri için de aynı durum geçerlidir.

Metot

Enterobakter üyelerinin identifikasyonunda yoğun ölçüde kullanılan sorbitol fermentasyonu, hareket testi ve triptofandan indol oluşumu testleri birleştirilmiş besiyerinde ve her biri bağımsız olarak tek tüpte yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan besiyerinin bileşimi tripton 10,0 g/l ; sorbitol 10,0 g/l; NaCl 5,0 g/l ; %0,2'lik fenol red çözeltisinden 2,25 ml/l ; agar 3,0 g/l şeklindedir. Son besiyeri pH'sı $7,3 \pm 0,1$ olacak şekilde tüplere 10'ar ml dağıtıldıktan sonra otoklavda 121°C 'da 15' sterilize edilmiştir. Bu besiyeri, herbiri bağımsız yapılan sorbitol, hareket ve indol testlerinde kullanılan besiyerlerinin kombinasyonudur.

Bakteri kültürleri Nutrient Broth besiyerinde 37°C 'da aktifleştirildikten sonra Sorbitol-Hareket-İndol dik agar besiyerine aşı iğnesi ile daldırılarak inoküle ve 37°C 'da 48 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda sorbitol kullanımı besiyeri renginin değişimi, hareket testi bakterinin yumuşak agar besiyerinde üreme şekli ile kontrol edilmiş, tüplere Kovacs indol ayracı damlatılarak indol testi yapılmıştır.

ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

285 bakterinin bağımsız denemelerdeki ve kombine besiyerindeki sorbitol, hareket ve indol test sonuçları çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Sorbitol, hareket ve indol test sonuçları

Adet	Bağımsız Testler			Kombine besiyeri			Hatalı Sonuç
	Srb	Har	İnd	Srb	Har	İnd	
54	+	+	+	+	+	+	0
77	+	+	-	+	+	-	0
32	+	-	+	+	-	+/-	24
51	+	-	-	+	-	-	0
14	-	+	+	-	+	+	0
26	-	+	-	-	+	-	0
15	-	-	+	-	-	+	0
16	-	-	-	-	-	-	0

Srb: Sorbitol; Har: Hareket; İnd: İndol

Çizelge 1'den izlendiği gibi 8 farklı kombinasyondan sadece sorbitol (+), hareket (-), indol (+) olan kombinasyonda denenen 32 bakterinin 24 adedi indol (+) yerine indol (-) sonuç vermiştir. Bu 24 bakterinin tümü *Klebsiella oxycata/planticola* olup bu kombinasyona giren 5 adet hareket (-) *E.coli* ile tanımlamayan 3 adet olmak üzere toplam 8 adet bakteri bağımsız testlerde olduğu gibi indol (+) sonuç vermişlerdir. Diğer 7 kombinasyonda denenen toplam 253 bakteride bağımsız testler ile kombine besiyerinde alınan sonuçlar aynı olmuştur.

Bir başka yaklaşımla, sorbitol ve hareket testleri bağımsız testlerde ve kombine besiyerinde alınan testlerde 285 bakterinin tümünde aynı sonuç verirken, indol testinde 285 bakteri için toplam %91,6 düzeyinde aynı sonuç, %8,4 oranında farklı sonuç alınmıştır.

Kombine besiyerinde yapılan indol testinin sahte (-) indol sonucu vermesi kabul edilemez. Bunun nedeni, bu besiyerinin identifikasyon amaçlı olarak planlanmasıdır. İdentifikasyonda indol ya da herhangi bir testin yanlış sonuç vermesi ise sonucu yanlış tanımlamaya götürecektir.

İdentifikasyonda bazı testlerde sahte (-) sonuçlar alınmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı hareket testi ve aminoasit testleridir. Pratik uygulamada yumuşak agar besiyerinde (+) olan sonuçlara güvenilmekte ancak bu testte alınan (-) sonuçlar asılı damla yöntemi ile kontrol edildiğinde bazı (+) sonuçlara rastlanılmaktadır (HALKMAN ve ark., 1996). İndol testinin sahte negatif sonuçlarına da rastlanıldığı, bunun incelenmesi için standart olarak kullanılan Pepton Water besiyerine oranla Hearth Infusion Broth besiyeri kullanılması önerilmektedir (ANONYMOUS 1984a). Sorbitol testi ve diğer karbohidrat fermentasyon testlerinde denenen karbohidratın konsantrasyonunun sonucu etkilediği, yaygın olarak kullanılan %0,5 ve %1 konsantrasyonlardan %1'de alınan sonuçların daha doğru olduğu, daha çok benimsendiği bildirilmektedir (ANONYMOUS 1984b). Nitekim bu çalışma kapsamındaki ödenemelerde sorbitol konsantrasyonu %0,2; %0,5 ve %1 olarak denenmiş ancak olumsuz sonuçlar nedeni ile asıl çalışmada sadece %1 konsantrasyon ile devam edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar geniş kapsamlı bir çalışmanın ön bulguları niteliğindedir. Bu çalışmada indol testindeki sahte (-) sonuç identifikasyonu cins değil tür bazında etkilemektedir. Bir diğer deyiş ile *Klebsiella* cinsinin belirlenmesi identifikasyonda yeterli ise indol testinin (-) ya da (+) olması sonucu değiştirmez, yani indol testine gerek yoktur. Ancak, identifikasyon mantığı ve prensibi uyarınca indol testinde sahte (-) sonuç alınması kabul edilemez. Bununla beraber 8 farklı kombinasyonun 7 adedinde doğru sonuçlar alınması da küçümsenemez. Dolayısı ile konu üzerinde gerek indol testindeki sahte (-) sonuçların giderilmesi, gerek diğer testlerin kombine edilmesi şeklinde çalışmalar devam etmektedir.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

- ANDREWS, W.H. 1985. A Review of Culture Methods and their Relation to Rapid Methods for the Detection of *Salmonella* in Foods. Food Tech 1985 (March) 77-82
- ANONYMOUS 1984a. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds N.R.Krieg, J.G.Holt. Williams, Wilkins Baltimore, London 964 s.
- ANONYMOUS 1984b. DIFCO Manual 10th Ed. Detroit, Michigan 1155s.
- ANONYMOUS 1988. Manual of BBL Products and Laboratory Procedures. Maryland 389s.
- ANONYMOUS 1994a. MERCK Microbiology Manual 1994. Darmstad 347s.
- ANONYMOUS 1994b. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition. Eds. J.G.Holt, N.R.Krieg, P.H.A.Sneath, J.T.Staley, S.T.Williams L.Williams, Wilkins Comp. Baltimore, 787s.
- BEKAR, M. 1995. *Enterobacteriaceae* Familyası Mikroorganizmaların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri. Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Yayınları, Ankara 143s.
- BRIDSON, E.Y. 1990. The Oxoid Manual. 6th Ed. Unipath Ltd Basingstoke
- ESKANAZI, S., A.M.LITTEL 1978. Dulcitol-Malonate-Phenylalanine Agar for the Identification of *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*. Appl.Envr.Micr. 35(1)199-201
- HALKMAN, A.K. 1995. Mikrobiyolojide Kullanılan Besiyerleri. Orkim Ltd.Şti. Yayınları. Armoni Matbaacılık Ltd.Şti. Ankara,
- HALKMAN, A.K., M.R.NOVEIR 1996. Hayvansal Gıda Maddelerinde *E.coli* O157:H7 Aranması. TÜBİTAK-VHAG-1192 nolu proje, devam ediyor.
- HALKMAN, A.K., H.B.DOĞAN, M.R.NOVEIR 1994. Gıda Maddelerinde *Salmonella* ile *E.coli* Aranma ve Sayılma Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Gıda Tekn.Derneği Yayın no 21. Armoni Matbaacılık Ltd.Şti. Ankara 93s.
- HALKMAN, A.K., E.SARIKAYA, H.B.DOĞAN 1996. Enterobacter İdentifikasyon Şemasının Geliştirilmesi. Ankara Üniv. Araştırma Fonu 96-11-12-01 nolu proje, devam ediyor.
- KORN, R. 1980. Identification of *Escherichia coli* on Citrate/Urea Medium. Revista-de-Cresterea-Animalelar 30(4)37-42
- LASSEN, J. 1975. Rapid Identification of Gram (-) Rods Using a Three Tube Method Combined With a Dictomic Key. Acta Micr Scand Sec B 83: 525-533
- MANAFI, M., M.L.ROTTER 1991. A New Plate Medium for Presumptive Identification and Differention of *Enterobacteriaceae*. Int J Food Micr. 1991(14)127-134.
- POWERS, E.M., T.G.LATT 1977. Simplified 48 hours IMViC test on Agar Plate Medium. Appl.Envr.Micr. 34(3)274-279