

MEMBRAN FİLTASYON TEKNİĞİ İLE KOLİFORM ANALİZİNDE KULLANILAN BESİYERLERİNİN KIYASLANMASI*

Sevda Taştemür¹, A. Kadir Halkman^{**2}

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sıhhiye, Ankara
Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 26.01.2014

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 06.03.2014

Kabul tarihi / Accepted: 11.03.2014

Özet

Bu çalışmada, çeşitli gıdalardan izole edilen 46 adet koliform grup üyesi bakteri, kontrol olarak PCA ile koliform grup için selektif olan Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC NKS olmak üzere 4 farklı besiyerinde ve 2 farklı inkübasyon sıcaklığında analiz edilmiş ve ayrıca karışık kültür olarak denenmiştir. Saf kültürlerde elde edilen sonuçlara göre besiyerleri arasında bir fark bulunamamıştır ($P>0.01$). Ancak bakteri türüne göre sıcaklık faktörünün etkisi açık olarak görülmüştür ($P<0.01$). Fekal koliform özelliği gösteren *Escherichia coli* (30 izolat), 37 ve 44.5 °C'ta aynı sayıda koloni verirken, *Enterobacter aerogenes* (8 izolat), *Klebsiella pneumoniae* (7 izolatın 6 adedi) ve *Citrobacter freundii* (1 izolat) için inkübasyon sıcaklığı etkili olmuş ve bu bakteriler 44.5 °C'ta gelişememişlerdir. Fekal koliform özellik gösteren 1 adet *Klebsiella pneumoniae* izolatı ise 44.5 °C'ta kolaylıkla gelişmiştir. Karışık kültürlerde besiyeri farkı yok iken ($P>0.01$) sıcaklık farkı etkili olmuştur ($P<0.01$). 44.5 °C'ta gelişebilen tüm kolonilerin *E. coli* olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Koliform bakteriler, fekal koliformlar, *E. coli*, membran filtrasyon, besiyerleri

COMPARISON OF CULTURE MEDIA USED IN COLIFORM ANALYSIS VIA MEMBRANE FILTRATION TECHNIQUE

Abstract

In this study, 46 coliform group bacteria which were isolated from various foods, were analyzed on 4 different culture media such as Tergitol TTC NKS, Endo NKS and mFC NKS that are selective for coliform group and at 2 different incubation temperatures such as 37 and 44.5 °C with the control media PCA. Besides, 3 mixed cultures of those isolates were also analyzed. According to the results obtained from pure cultures, no difference was found between the culture media ($P>0.01$) however, the temperature factor was found as effective ($P<0.01$) depending on the bacterial species. While faecal coliform *Escherichia coli* (30 isolates) gave the same number of colonies at the temperatures of 37 and 44.5 °C, different incubation temperatures were found as effective for *Enterobacter aerogenes* (8 isolates) and *Klebsiella pneumoniae* (6 of 7 isolates) and *Citrobacter freundii* (1 isolate) and these bacteria could not grow at 44.5 °C. One *Klebsiella pneumoniae* isolate that showed a faecal coliform characteristic grew easily at 44.5 °C. While there was no difference between the culture media in mixed culture studies ($P>0.01$), the temperature differences were found as effective ($P<0.01$). All colonies that grew at 44.5 °C were found to be *E. coli*.

Keywords: Coliforms, fecal coliforms, *E. coli*, membrane filtration, culture media

* Bu çalışma, 1. yazarın Yüksek Lisans Tezinden özetlenmiştir. This paper is summarized from the first author's MSc thesis.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ halkman@ankara.edu.tr, ☎ (+90) 312 203 3300/3625, ☎ (+90) 312 317 8711

GİRİŞ

Enterobacteriaceae içinde yer alan ve ailenin genel özelliklerini taşıyan, 35-37 °C'ta 48 saat içinde laktozdan gaz ve asit oluşturan bakteriler koliform grup olarak tanımlanır. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*, bu grupta yer alan ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli bir yere sahip olan bakterilerdir (1, 2).

Bu grubu oluşturan bakteriler, pek çok gıda maddesinde mikrobiyolojik kalite göstergesi olarak aranır/ sayılırlar. Grubun *E. coli* dışındaki türleri genellikle bitki ve toprak kaynaklıdır. Gıdalarda bitki ve toprak kaynaklı olan koliform bakterilere düşük sayılarda izin verilebilir ya da izin verilmez (2, 3). Örneğin, 2011 tarihli Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği, tahıl unları, soya unu patates unları dâhil diğer unlarda 10⁴ KOB/g sayıda koliform bakteriye izin verirken, bu sayı yufka ve kadayıfta 10⁵ KOB/g ve sade kek, sade bisküvi, sade krakerler vb., kaplamalı, dolgulu ve/ veya çeşnili bisküviler, kekler, krakerler ve gofretde (sade, kremalı, dolgulu, kaplamalı vb.) 10⁶ KOB /g şeklindedir (4).

Bazı gıdalarda bulunmasına izin verilen koliform grup bakterilerin içme-kullanma, içme suları ve kaynak sularında bulunmasına izin verilmez. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliğin 2011 yılı baskısında (5) ve 2013 yılında değiştirilen yeni yönetmelikte (6) içme-kullanma sularının 100 mL'sinde, içme suları ve kaynak sularının 250 mL'sinde koliform grup bakteri sayısı 0 olarak verilmiştir.

Koliform grup olarak tanımlanan adı geçen 5 tür bakteri, genellikle insan sağlığı açısından önemli bir tehlike oluşturmaz. Ancak, fırsatçı patojen olarak davranabildikleri gibi özellikle bazı *E. coli* serotipleri ölüme kadar giden enfeksiyonlara neden olabilmektedir (1, 7, 8).

Suların mikrobiyolojik analizinde 1 mL numunede 22 °C'ta koloni sayımı ile 37 °C'ta koloni sayımının dökme kültürel sayım yöntemi ile ancak, 250 mL numunenin *E. coli*, enterokoklar, koliform bakteri, *Pseudomonas aeruginosa*, anaerob sporlu sülfid indirgeyen bakteriler ve patojen stafilokokların membran filtrasyon yöntemi ile analizi hükme bağlanmıştır (6, 9).

Bugün su dolumu yapan işletmelerin çok büyük bir bölümü, kaynak sularını mikroorganizmalardan

arındırmak için membran filtrasyon sistemi kullanılmaktadır. Membran filtre, prensip olarak bir süzgeç gibi işlev görür. Standart olarak kullanılan 0.45 µm porlu (gözenekli) membran filtreden bakteriler geçemez ve filtre üzerinde kalır. Maya ve küf analizlerinde daha büyük porlu (0.65; 0.8; 1.2 µm) membran filtreler kullanılır. Membran filtrasyon sisteminden geçirilen sıvı ve gazlardaki mikroorganizmalar filtre üzerinde tutulur. Daha sonra bu filtre, uygun bir besiyeri üzerine yerleştirilir ve hedef mikroorganizma için uygun sıcaklık, süre ve gaz atmosferinde inkübasyona bırakılır (9, 10).

İçme ve kullanma sularının yasal mikrobiyolojik analizinde farklı parametreler incelenmektedir. Bunlardan en önde gelen kontrollerden birisi koliform grup bakteri analizidir. Membran filtrasyon tekniği ile yapılan bu analizde uluslararası standartlara göre; Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate besiyeri kullanılmaktadır. Zayıf bir selektiviteye sahip olan bu besiyerinde koliform grup bakteriler yanında yakın akraba türler de kolaylıkla gelişebilmektedir. Ancak bu besiyerinin zayıf selektivitesinin avantajı hasar görmüş olan koliformların gelişmesini sağlamaktadır. Günlük uygulamalarda ENDO besiyerinin sıklıkla tercih edildiği bilinmektedir. Koliform grup bakteriler içinde özellikle *E. coli* analizi gerekli ise bu besiyerinde metalik parlak renk ile *E. coli* kolaylıkla diğer koliform bakterilerden ayırt edilebilmektedir. ENDO, selektivitesi yüksek olan bir besiyeridir. mFC ise, fekal koliformların yüksek inkübasyon sıcaklığında mavi renkli koloni oluşturması ile ayırt edilmesini sağlayan yine zayıf selektiviteli bir besiyeridir. Bu besiyerinde selektiviteyi asıl olarak sağlayan yüksek inkübasyon sıcaklığıdır. Günlük kullanımda bu besiyerinin 37 °C'ta inkübe edildiğine rastlanılmaktadır (2, 5, 9).

Özellikle içme suyu üretim tesislerindeki günlük uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bu 3 besiyerinde koliform grup ve *E. coli* analizlerinde hatalı besiyeri ve/ veya inkübasyon sıcaklığı kullanımına bağlı olarak sahte negatif ya da sahte pozitif sonuçlar alınabilmektedir. Sahte negatif sonuçlar halk sağlığını tehdit ederken, sahte pozitif sonuçlar ise gereksiz ekonomik kayba yol açmaktadır. Bu gibi hatalı sonuçlar alınıyor ise bunun önüne geçilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, kullanılan 3 besiyeri ile 37 °C ve 44.5 °C'ta yapılan inkübasyonlarda elde edilen koliform grup/ *E. coli* sayım sonuçları karşılaştırılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM**Materyal**

Bu alışma, Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bakterileri elde etmek için Ankara semt pazarından alınan marul, tere, maydanoz, roka, ilek numuneleri, lokantadan temin edilen salata numuneleri, Atatürk Orman iftliği Süt Fabrikasından (Ankara) alınan çiğ süt numuneleri kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan Tergitol TTC NKS (14056), ENDO NKS (14053) ve m-FC NKS (14068) ile bu besiyerlerine ilişkin membran filtreler, "Sartonet Seperasyon Teknolojileri Ltd. şti. İstanbul" tarafından bu çalışma için bağış yolu ile sağlanmıştır.

Yöntem

Pazardan alınan marul, tere, maydanoz, roka, ilek ile lokantadan temin edilen salata numunelerinden 10 g tartılıp üzerine 90 mL steril Maximum Reconvert Diluent (MRD; Merck) konularak karıştırılmıştır. MRD eklenen numunelerden ve çiğ sütlerden 0.1 mL alınarak VRB Agar (Merck) besiyerine yayma metodu ile ekim yapılmış, 37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Saf kültür elde etmek için 1-2 mm çapında presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler belirlenmiş, iğne öze ile bu koloniler alınarak CASO Broth (Merck) besiyerine ekilmiş, 37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gelişme olan besiyerlerinden öze yardımı ile saflaştırma amacıyla tekrar VRB Agar'a çizgi ekim yapılarak 37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde izole edilen 1-2 mm çapında presipitat zonu ile çevrili kırmızı tek koloniler vida kapaklı yatık CASO Agar (Merck) besiyerine sürülerek 37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmış ve bu şekilde çalışma kültürü koleksiyonu oluşturulmuştur. Tanımlama testleri öncesinde belirlenmiş tüm bakteriler aktif hale gelmesi için CASO Broth besiyerine öze ile ekilerek 37 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (2).

Tanımlama testleri için ilk aşamada bakteriler Fluorocult LST Broth (Merck) besiyerine aşılanmış, 37 °C'ta 24 saat inkübasyon sonunda uzun dalga boylu (366 nm) UV lamba ile floresan oluşturan bütün kültürlere indol testi uygulanmıştır. Floresan ışıma veren ve indol pozitif sonuç veren bütün kültürler *E. coli* olarak tanımlanmıştır (2).

Bu test sonuçlarına göre *E. coli* olmadığına karar verilen kültürlerin tanımlanması için; Metil Red (MR), Voges Proskauer (VP), H₂S oluşturma, hareket, mannitol fermantasyonu, sorbitol fermantasyonu, sakkaroz fermantasyonu ile özellikle *E. coli* olmayan fekal koliform bakterilerin belirlenmesi için Eijkman (44.5 °C'ta gelişme) testi uygulanmıştır (2, 11, 12).

Membran filtrasyon

Aktifleştirilen kültürlerde 10⁸-10⁹ KOB/mL bakteri olduğu kabul edilerek standart yöntemle ve MRD kullanılarak 10⁻⁷'ye kadar seyreltileri yapılmış, bu seyreltiden 100'er mL steril saf suya ayrı ayrı olacak şekilde 1 ve 0.1 mL kültür eklenmiş, bu şekilde saf kültür ile bulaştırılan su örneklerine membran filtrasyon uygulanmıştır. Membran filtrasyonda Sartorius marka 3 hunili sistem kullanılmıştır. Her bakteri için 2 seyrelti, 3 farklı besiyeri ve 2 inkübasyon sıcaklığı (37±0.5 ve 44.5±0.2) için 12 kez membran filtrasyon yapılmış, ayrıca kıyaslama amacı ile 10⁻⁵ ve 10⁻⁶ seyreltilerden Plate Count Agar (PCA; Merck) besiyerine 2 paralel olarak yayma kültürel sayım ile ekim yapılmış, her seyreltme serisinden yapılan ekimlerin 1 takımı 37±0.5 °C, diğeri 44.5±0.2 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (2, 9, 10).

İnkübasyon sonunda PCA besiyerinde 30-300 arasında membran filtrelerde ise ~20-30 koloni olan seyreltiler dikkate alınarak standart formül ile kültürdeki sayı belirlenmiş ve log KOB/mL olarak çizelgelere işlenmiştir.

Orijinal kültürün 10⁻⁷ seyreltisinden 1 mL alınıp 100 mL damıtık su içinde ile 44.5 °C'ta inkübasyon ile yapılan analizde koloni gelişmesi olmayan tüm sonuçlar çizelgelere "Gelişme Yok" olarak işlenmiştir. Devamında, bu kültürler 4 besiyerine öze ile sürülerek 44.5 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmış ve koloni gelişmesi izlenmiştir.

Son olarak 1 adedi *E. coli*, diğeri fekal olmayan koliform bakteri olmak üzere 3 adet karışık kültürden yukarıda açıklandığı şekilde 100 mL damıtık suya eklenmiş ve filtrasyon yapılarak besiyeri ve özellikle inkübasyon sıcaklığının etkisi araştırılmıştır.

Kullanılmış tüm malzeme 121 °C'ta 15 dakika sterilize edildikten sonra atılmış/ yıkanmıştır.

İstatistik analizler

Minitab 15.0 programında 2 faktörlü varyans analizi ile yapılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Denemelerde kullanılan farklı gıda numunelerinden izole edilen bakteriler; 1 adet *Citr. freundii*, 8 adet *Ent. aerogenes*, 7 adet *Kleb. pneumoniae* ve 30 adet *E. coli* olarak tanımlanmıştır. *Kleb. pneumoniae* izolatlarından 1 adedi fekal koliform özelliği göstererek 44.5 °C'ta gelişmiştir. 30 *E. coli* izolatından 2 adedi indol negatif, 1 adedi β-GUR negatif sonuç vermiştir.

Fekal bulaşma göstergesi olarak *E. coli* yerine fekal koliform analizinin daha gerçekçi sonuçlar vereceği (13) ancak, analiz süresi açısından değerlendirildiğinde hâlâ *E. coli* analizinin geçerliliği olduğunun ciddi bir şekilde tartışılması gerektiği açık olarak görülmektedir.

İndol negatif *E. coli* suşları *E. coli* Biyotip 2 olarak adlandırılır ve bu suşların tüm *E. coli* izolatları içinde bulunma olasılığı sadece %1 olarak bildirilmektedir (14). Oysa her ikisi de laboratuvara farklı tarihlerde gelen çiğ süt örneklerinden izole edilen 30 adet *E. coli* izolatından 2 adedinin (2/30; %6.7) indol negatif sonuç vermesi, en azından izolatın elde edildiği hammaddeye göre *E. coli* Biyotip 2 bulunma olasılığının bir kez daha gözden geçirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bu sonuca göre standart analizde, basit olarak LST Broth besiyerinde gelişme ve gaz oluşumu ⇒ EC Broth besiyerinde gelişme ve gaz oluşumu ⇒ Triptofan Broth besiyerinde indol oluşumu ile tanımlanan TS 6063 ISO 7251 (15) standardına göre analiz edilen gıdada *E. coli* olduğu halde *E. coli* olmadığı şeklinde sahte negatif sonuçların elde edilmesi beklenildiğinden daha yüksektir.

İzole edilen 30 adet *E. coli* izolatı içinde 1 adet floresan (β-GUR) negatif sonuç elde edilmiştir. Buna bağlı olarak bu çalışma kapsamını ilgilendirmemekle beraber, bu izolat CT-SMAC (Merck) besiyerine sürülmüş ve 37 °C'ta 24 saat inkübasyon sonunda tipik renksiz (mannitol negatif) koloni elde edilmiştir. Singlepath *E. coli* O157 kiti (Merck) ile yapılan test, bu bakterinin *E. coli* O157 serotipi olduğunu göstermiştir.

4 farklı besiyeri ve 2 farklı inkübasyon sıcaklığı kullanılarak yapılan denemeler sonunda elde edilen bulgular Çizelge 1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1'de 44.5 °C'ta gelişemeyen bakteriler "Gelişme Yok" anlamında GY NG olarak gösterilmiştir. Metot bölümünde belirtildiği gibi bu kültürler 4 besiyerine öze ile sürülerek 44.5 °C'ta 24 saat inkübasyona bırakılmış ve koloni gelişmesi olmamıştır. Buna dayanarak istatistik analizlerde bu sonuçlar 0 KOB/mL olarak değerlendirilmiştir.

Çizelgeden görüldüğü gibi *E. coli* izolatları arasında besiyeri ve sıcaklık açısından fark yoktur

Çizelge 1. 4 farklı besiyeri ve 2 farklı inkübasyon sıcaklığında Koliform Sayım Sonuçları

Table 1. Coliform Count at 4 culture media and 2 different incubation temperature

Bakteri <i>Bacteria</i>	PCA		Tergitol NKS		Endo NKS		mFC NKS	
	37 °C	44.5 °C	37 °C	44.5 °C	37 °C	44.5 °C	37 °C	44.5 °C
<i>Citr. freundii</i> (n=1)	8.78	GY NG	8.82	GY NG	8.92	GY NG	8.81	GY NG
<i>E. coli</i> (n= 30)								
En düşük <i>Min.</i>	8.83	8.60	8.48	7.90	8.73	7.60	8.54	8.01
En yüksek <i>Max.</i>	9.58	9.61	9.60	9.53	9.59	9.34	9.59	9.78
Ortalama <i>Mean</i>	9.13±0.21	9.09±0.23	9.13±0.22	8.92±0.40	9.15±0.20	8.68±0.50	9.12±0.21	9.04±0.37
<i>Ent. aerogenes</i> (n= 8)								
En düşük <i>Min.</i>	8.76	GY NG	8.79	GY NG	8.76	GY NG	8.83	GY NG
En yüksek <i>Max.</i>	9.42	GY NG	9.37	GY NG	9.45	GY NG	9.49	GY NG
Ortalama <i>Mean</i>	9.16±0.23		9.15±0.20		9.17.0.25		9.17±0.22	
<i>Kleb. pneumoniae</i> * (n=1)	9.18	9.05	9.12	8.32	9.38	7.95	9.20	8.34
<i>Kleb. pneumoniae</i> (n= 6)								
En düşük <i>Min.</i>	8.41	GY NG	8.18	GY NG	8.58	GY NG	7.95	GY NG
En yüksek <i>Max.</i>	9.06	GY NG	8.95	GY NG	8.91	GY NG	9.02	GY NG
Ortalama <i>Mean</i>	8.62±0.21		8.53±0.25		8.68±0.11		8.59±0.32	

* Fekal koliform; *Fecal Coliform*

GY NG: Gelişme Yok ; *No Growth*

($P>0.01$). 30 *E. coli* izolatının hepsi 4 farklı besiyerinde ve 2 farklı sıcaklıkta istatistik açıdan benzer sayım sonuçlarını vermişlerdir ($P>0.01$). Bu sonuçlara indol negatif olan 2 adet izolat ile floresan (β -GUR) negatif olan 1 adet izolat da dâhildir. Bir diğer deyiş ile indol negatif 2 izolat ile β -GUR negatif olan 1 adet izolat, *E. coli* Biyotip 1 izolatlarından farklı sonuç vermemiştir.

Enterobacter aerogenes izolatları için ise besiyerleri arasında farklılık görülmemiş ($P>0.01$) ancak sıcaklık faktörü etkili olmuştur ($P<0.01$). Buna göre tüm *Enterobacter aerogenes* izolatları 44.5 °C'ta gelişemedikleri için fekal koliform özelliği taşımamaktadırlar. *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının tümü için besiyerleri arasında fark görülmemektedir ($P>0.01$). Ancak 01 numaralı izolat, 44.5 °C'ta gelişerek diğerlerinden farklı bir özellik göstermiştir ($P<0.01$). Bulgular bu izolatın fekal koliform olduğuna işaret etmektedir.

İstatistik analizi yapılan 46 bakterinin tümü kontrol besiyeri olan PCA ile 37 °C inkübasyon sonunda aynı sonucu vermiştir. PCA, genel besiyeri özelliğinde olup inhibitör maddeler içermez. Ancak, Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC NKS besiyerleri koliform bakteriler için selektif besiyerleridir ve *Enterobacteriaceae* dışındaki bakterilerin gelişmelerini baskılamaya yönelik kimyasal bileşenler içerirler. Koliform bakteriler başta laktozdan asit oluşturabilmeleri nedeni ile *Enterobacteriaceae* üyelerinden farklı renkte koloni verirler ayrıca bu besiyerlerinde kullanılan inhibitörlere dirençlidirler. Bunlardan Endo, diğer 2 besiyerine kıyasla daha fazla selektif inhibitör içerir. Su analizlerinde kullanılan standart besiyeri ise Tergitol TTC olup, zayıf selektivitesi ile hasar görmüş olma ihtimali olan koliform grubu bakterilerin de gelişmesine izin verir. mFC besiyeri de zayıf selektiviteli bir besiyeridir (2, 9).

Bu araştırma sonuçlarına göre 3 besiyerinin birbiri yerine kullanılacağı söylenemez. Bunun temel nedeni denemelerde kullanılan bakterilerin tümünün aktif halde iken kullanılmış olmasıdır. Dolayısı ile besiyerleri arasında selektivite farkı görülmemiştir. Bu, zaten beklenen bir durumdur. Ancak güncel kontrol amaçlı ekimlerde bakterilerin zayıf/ stres altında olması durumunda Endo besiyerinde koloni gelişmesi görülmemesi olasıdır. Dolayısı ile bu uygulamalarda standartta yazılan Tergitol TTC kullanılması gereklidir. Bununla

beraber, ABD Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual (BAM-AOAC), içme sularının koliform bakteriler açısından analizinde membran filtrelerin M-Endo Medium ya da LES Endo Agar besiyeri üzerine yerleştirilerek analizini göstermektedir (8).

Kimi uygulamalarda mFC besiyerinin, "membran Faecal Coliform" olan ismi nedeni ile membran filtrasyon uygulamasında sadece fekal koliformları geliştirebileceği şeklinde hatalı bir bilgi vardır. Fekal koliform bakteriler için geliştirilmiş bir besiyeri yoktur. Nitekim bu çalışmada elde edilen bulgular, fekal olmayan izolatların da 37 °C'ta kolaylıkla gelişebildiğini göstermiştir.

Bazı laboratuvarlarda Tergitol TTC besiyerinde *E. coli* için daha kırmızı renk oluşturması ile diğer koliformlardan ayrılabilmesi şeklinde görüşler bulunmaktadır. Denemeler sırasında koliform grup üyesi bakteriler aynı besiyerinde birbirlerine çok yakın koloni morfolojileri verdikleri gözlenmiştir. Sadece *Klebsiella pneumoniae*, tipik mukoit yapıda koloni oluşturması ile diğer koliform grup bakterilerden morfolojik olarak farklılık göstermiştir. Dolayısı ile koloni morfolojisi üzerinden tür ayırımına gidilmesi konusundaki görüşlerin bir geçerliliği olmadığı görülmektedir. Ancak, suş farklılıklarının önemi de açıktır. Bir diğer deyiş ile aynı bakteriye ait farklı suşlar daha fazla asit oluşturma, TTC'yi daha zayıf ya da daha kuvvetli indirgeme vb. fizyolojik özelliklerine bağlı olarak farklı morfolojiler oluşturabilirler. Bu durumda çok daha fazla izolat ile bu testlerin yapılması gerekliliği ve hatta oluşan renk farklılıklarının sübjektif değil, objektif değerler ile karşılaştırılması gerektiği söylenebilir.

Çizelge 2'de verilen karışık kültür ekim sonuçları değerlendirildiğinde besiyerleri arasında sayım sonuçları arasında fark görülmemiş ($P>0.01$), ancak sıcaklık etkili olmuştur ($P<0.01$). 37 °C'ta yapılan ekimlerde her iki bakteri türüne rastlanırken, 44.5 °C'ta yapılan inkübasyonda beklenildiği gibi sadece *E. coli* gelişimi olmuştur ve sıcaklıklar arasında görülen fark, fekal olmayan koliformların gelişmemesinden kaynaklanmaktadır.

Sularda koliform analizinin EMS yöntemi ile yapıldığı eski tarihli araştırmalara rastlanılmaktadır (16-19). Membran filtrasyonun kullanıldığı bir çalışmada 300 su örneği membran filtrasyonla koliform bakteri varlığı açısından kontrol edilmiş,

Çizelge 2. Membran filtrasyon sayım sonuçları; karışık kültür (log KOB/mL)
Table 2. Membran filtration counts; mixed culture (log CFU/mL)

Karışık Bakteri Kültürü <i>Mixed Culture</i>	PCA		Tergitol NKS		Endo NKS		mFC NKS	
	37 °C	44.5 °C	37 °C	44.5 °C	37 °C	44.5 °C	37 °C	44.5 °C
<i>E. coli</i> + <i>Citr. freundii</i>	9.91	8.62	8.92	8.34	8.94	8.36	8.93	8.53
<i>E. coli</i> + <i>Ent. aerogenes</i>	9.30	8.99	9.34	8.95	9.35	8.99	9.29	8.99
<i>E. coli</i> + <i>Kleb. pneumoniae</i>	8.88	8.48	8.97	8.58	8.91	8.59	8.82	8.57

besiyeri olarak mFC kullanılmış olmakla birlikte 37 °C inkübasyon uygulanmıştır. Araştırmacılar şüpheli kolonilere IMViC testleri uygulamışlardır (20). Özaskan (21), membran filtreyi McConkey Agar üzerinde inkübe etmiştir.

SONUÇ

Bu çalışma sonunda elde edilen somut bulgular şu şekilde sıralanabilir.

-Koliform bakteri izolasyonu amacıyla materyal olarak kullanılan gıdalardan yapılan ekimlerde ağırlıklı olarak *E. coli* izole edilmiştir (30/46; %65.2). *Enterobacter aerogenes* (8/46; %17.4) ve *Klebsiella pneumoniae* (7/46; %15.2) rastlanan izolatlar iken, *Citrobacter freundii* (1/46; %2.2) az rastlanan türdür ancak diğer koliform bakteri üyesi olan *Enterobacter cloacae* türüne hiç rastlanmamıştır.

-Aktif bakteriler, bütün besiyerlerinde kontrol olarak kullanılan PCA ile aynı sayıyı vermişlerdir. Bu sonuçlardan, aktif bakteri ile çalışıldığında Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC NKS besiyerlerinin birbirleri yerine kullanılabilceği söylenebilir. Bu bulgu, denenmedikleri için diğer ticari markalar için geçerli değildir.

-Günlük analizlerde, numunedeki koliform bakterilerin ne denli stres altında bulunduğu bilinemediği ve bu besiyerlerinin selektivitesinin bu konuda ne denli etkili olacağı da bilinmemektedir. Buna bağlı olarak günlük analizlerde selektivitesi düşük olan ve standart olarak önerilen besiyerinin (Lactose TTC Agar with sodium heptadecylsulfate) kullanılması gereklidir.

-Kaynaklarda sadece %1 olduğu bildirilen indol negatif 2 adet (2/30; % 6.7) *E. coli* izole edilmiş olması, indol testi ağırlıklı tanımlamalarda daha dikkatli olunması gerektiğini ortaya koymaktadır.

-*E. coli*, mFC NKS besiyerinde 44.5 °C'ta tipik koyu mavi renkli koloni oluştururken 37 °C'taki

inkübasyonda merkezde pembe, dışarıda koyu mavi renkli koloni oluşturduğunun nedeni anlaşılamamıştır.

-Aynı besiyerinde farklı türlere ait bakteriler, koloni morfolojisi açısından gözle (sübjektif olarak) incelendiğinde dikkate değer bir morfolojik fark gözlemlenmemiştir. Buna bağlı olarak; çeşitli kaynaklarda belirtilen morfolojik farklılıkların daha fazla izolat ile çalışılması ve değerlendirmelerin buna göre yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini göstermektedir.

-Çiğ süttten elde edilen izolatın *E. coli* O157 serotipi olarak tanımlanmış olması çiğ süt tüketimini savunanların çok dikkatli olması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Teşekkür: Sn. Ömer ERDEM'in şahsında; bu çalışmada sarf malzemesi olarak kullanılan Tergitol TTC NKS, Endo NKS ve mFC NPS besiyerleri ile membran filtreleri bağış yolu sağlayan www.sartonet.com; Sartonet Seperasyon Teknolojileri Ltd. Şti. İstanbul'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Çakır İ. 2000. Koliform Grup Bakteriler ve *E. coli*. İçinde, *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı, Sim Matbaası, Ankara, Türkiye, s 335-344.
2. Anonim 2005. *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları* (Ed. AK Halkman). Başak Matbaacılık Ltd. Şti, Ankara, Türkiye, 358 s.
3. Aldsworth T, Dodd CER, Waites W. 2009. Food Microbiology. In, *Food Science and Technology* (Ed. G Campbell-Platt). Wiley-Blackwell, Singapore, p 115-173.
4. Anonim 2011. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. 29.12.2011 tarih ve 28157 sayılı Resm Gazete, Ankara.

5. Anonim 2011. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik. 17.02.2011 tarih ve 25730 sayılı Resm Gazete, Ankara.
6. Anonim 2013. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelikte Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik 07.03.2013 tarih ve 28580 sayılı Resm Gazete, Ankara.
7. Davidson P, Roth L, Gambrel-Lenarz L. 2004. Coliform and Other Indicator Bacteria. In, *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* 17th ed. (Eds. HM Wehr, JF Frank) American Public Health Association, Washington DC, USA, p 187-226.
8. Feng P, Weagant SD, Grant MA, Burkhardt W. 2002 Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm> (Erişim tarihi 10 Ekim 2013).
9. Anonim 2012. Gıda, İçecek ve İlaçlarda Mikrobiyolojik Analizlerin Kolay ve Güvenilir Yolu. Membran Filtrasyon. Sartonet Seperasyon Teknolojileri Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye 63 s.
10. Çakır İ, Doğan HB. 2000. Membran Filtrasyon Uygulamaları. İçinde, *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Genişletilmiş 2. Baskı, Sim Matbaası, Ankara, Türkiye, s 497-506.
11. Johnson T, Case C. 2010. Bacteriologic Water Quality: Membrane-Filtration. Laboratory Experiments in Microbiology. San Francisco, USA http://www.smccd.edu/accounts/case/biol675_water/doc/membr_filt.pdf (Erişim tarihi 10 Ekim 2013).
12. MacFaddin JF. 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd Edition. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, USA, 912 p.
13. Halkman HBD, Halkman AK 2004. Gıdalarda *Escherichia coli* Olmayan Fekal Koliformlar Üzerine bir Araştırma. <http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702040201.pdf> (Erişim tarihi; 10 Ekim 2013).
14. Farmer JJ. 1995. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. In, *Manual of Clinical Microbiology* 6th Ed (Chief Ed. PR Murray). American Society for Microbiology ASM, Washington DC, USA, p 438-449.
15. Anonim 1996. TS 6063 ISO 7251. Mikrobiyoloji - Muhtemel *Escherichia coli* Sayımı için Genel Kurallar En Muhtemel Sayı Tekniği. Türk Standartlar Enstitüsü, Ankara
16. Kıvanç M, Kunduhoğlu B, Atik S, Malkoçoğlu B. 1996. Eskişehir içme ve kullanma sularının bakteriyolojik kirliliği. *Ekoloji Çevre Derg* (19): 19-21
17. Kenar B, Altındış M. 2001. Afyon il merkezi içme ve kullanma sularında hijyenik kalite araştırması. *Kocatepe Tıp Derg* 2: 269-274
18. Avcı S, Bakıcı MZ, Erandaç M. 2006. Tokat ilindeki içme sularının koliform bakteriler yönünden araştırılması. *Cumhuriyet Üniv Tıp Fakültesi Derg* 28(4): 107-112
19. Demirci AŞ, Gümüş M, Demirci M. 2007. Damacana Suların Mikrobiyolojik Kalitesi Üzerine Pompa Temizliğinin Etkisi. *Tekirdağ Ziraat Fak Derg* 4(3): 271-275
20. Ergün F, Ergün Ö. 1999. İstanbul'daki su istasyonlarında satışa sunulan içme sularının genel hijyen kriterleri ve bazı patojenler yönünden incelenmesi. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 25(2): 225-231
21. Özaslan A. 2009. Adana içme suyunda fekal koliform düzeyinin belirlenmesi ve antibiyotik dirençlilik frekansı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye, 54 s.