

Sularda Koliform Tayini

Çoklu tüp fermantasyon tekniğinin ana hatları: Koliform grubu, aerobik ve fakültatif anaerobik, gram negatif, spor oluşturmeyan çubuk şekilli bakterileri tanımlar. Bunlar; laktozu 48 saatte, 35 °C’de gaz çıkışı ile fermente ederler.

Çoklu tüp fermantasyon tekniği; tahmin testi, doğrulama testi ve tamamlama testi olmak üzere 3 kademede yapılır.

Tahmin Testi

Bu testin amacı sularda tahmin edilen kirlilik derecesine göre belirlenen numune hacminin fermantasyon tüplerine konulması ve bu tüplerde 48±3 saat içinde gaz oluşumunun incelenmesidir. Eğer fermantasyon sonucu gaz oluşursa, üreme ortamı bulanık hale gelir. Aktif fermantasyon, aşağıdan yukarı doğru sürekli gaz kabarcıklarının çıkışı ile gözlenebilir. 48±3 saat sonunda tahmin deney tüplerinde koliform bakteri üremesine kanıt olan bir gaz oluşumu yoksa, test sonucu negatiftir. Tahmin deneyi için laktoz broth kullanılabilir. Pozitif sonuçlar doğrulama testi yapılmadan kullanılmamalıdır.

Doğrulama Testi

Fermantasyon için laktoz broth kullanılabilir. Doğrulama testi için parlak yeşil laktoz safra broth besi yeri kullanılması tavsiye edilmektedir. Bu testin yapılmasındaki amaç, 48 saatin sonunda, tahmin testinde belirlenen gazın koliform bakteriler tarafından meydana getirilip getirilmediğinin doğrulanmasından ibarettir. 48 saat sonunda gaz üretimi görülen numunenin orijinalinden tüm tüplere çeşitli seyreltmeler yapılır. Seyreltme yapılan tüm fermantasyon tüplerinde üreme ve gaz oluşumunun varlığı kontrol edilir. 24 saatlik inkübasyon sonunda, ortamda bir gaz oluşumu varsa, doğrulama testi pozitifdir; gaz oluşumu izlenmezse test negatiftir.

Tamamlama Testi

Tamamlama testi, doğrulama testinden sonra uygulanır ve en son kademedir. İki testten olumlu sonuç alındıktan sonra, tamamlama testi yapılır. Bu amaç için parlak yeşil laktoz safra broth içeren fermantasyon tüpleri kullanılır. Gaz üretimi gözlenen tüplerin her

birinde gaz çıkışı gözlenir gözlenmez, hemen numune alınarak Endo veya Eosin Metilen Mavisi içeren kaplara ekim yapılır. Kap 35 ± 0.5 °C'de, 24 ± 2 saat inkübe edilir. Endo veya eosin metilen mavisi agar üzerinde gelişen koloniler tipik, atipik veya negatif olarak tanımlanır. Oluşan koloniler, koloni sayıcıda belli bir büyütme altında sayılırlar. Eğer 48 saat sonunda laktozda gaz üretimi varsa ve mikroskopik inceleme, spor oluşturmayan gram negatif çubuk bakterilerin varlığını gösteriyorsa, test tamamlanmış sayılır ve koliform organizmaların varlığı kanıtlanmış olur.

Tahmin testi:

% 10 oranında laktoz içeren 5 adet 10 ml'lik fermentasyon tüpünün her birine 1 ml seyreltilmiş su numunesi konur, 37 °C'de inkübe edilir.

Doğrulama testi:

Sonuçlar incelendikten sonra, durham tüplerinde gaz çıkışı olan fermentasyon tüplerinden eozin metilen blue agar yüzeyine ekim işlemi gerçekleştirilir, 37°C'de inkübe edilir.

İnkübasyondan sonra aşağıda verilen koloni tipleri oluşabilir;

Koliform grubu bakteriler;

- ❖ Koyu kırmızı, çekirdekli, metalik parlaklık olabilir ya da
- ❖ Pembe, opak, çekirdeksizdirler.

Diğer saydam renkli koloniler Koliform değildir.

Tamamlama testi:

Doğrulama testine pozitif sonuç veren kolonilerden tekrardan laktoz içeren tüplere ekim işlemi gerçekleştirilir. 37°C'de inkübe edilir. Gaz çıkışı tamamlama testinin de pozitif olduğunu gösterir.