



T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ

FEN FAKÜLTESİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI

SAMSUN

Mikrobiyoloji Laboratuvarında Uyulması Gereken Kurallar

- ❖ Öncelikli olarak laboratuvar çalışması süresince, laboratuvar görevlilerinin ikaz ve isteklerine muhakkak uyulmalıdır.
- ❖ Mikrobiyoloji laboratuvarlarında başlıca sorun kontaminasyon tehlikesidir. Bu yüzden, Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışırken genel temizlik kurallarına mutlaka uyulmalıdır.
- ❖ Laboratuvar önlüğü mutlaka giyilmelidir. Laboratuvara girmeden önlük giyilir ve dersin bitiminde önlük laboratuvardan çıkıldıktan sonra çıkarılır.
- ❖ Çalışmaya başlamadan önce ve sonra eller bol sabunla ya da mümkünse antiseptik bir madde ile yıkanmalıdır.
- ❖ Çalışmaya başlamadan önce ve çalışma bitiminden sonra çalışma alanı dezenfektan bir madde ile muhakkak silinmelidir.
- ❖ Mikrobiyolojik çalışmalar her zaman alev altında yapılmalıdır. Bu amaçla sıklıkla Bunzen beki kullanılmaktadır.
- ❖ Cam araç gereçler hem açılırken hem de kapatılırken ağız kısımları muhakkak alevden geçirilmelidir. Alevden geçirilen ağız açık eşya alevden uzaklaştırılmamalıdır.
- ❖ Çalışmada platin öze kullanılıyorsa, kullanım öncesi ve sonrası özeler akkor haline gelinceye kadar ateşte tutulmalıdır.
- ❖ Çalışma sonrası kullanılan araç gereçler ve kontamine olmuş çöpler direkt olarak çöp kutusuna kesinlikle atılmamalı, tekrardan sterilize edilmelidir.
- ❖ Çalışırken laboratuvar kapı ve pencereleri kapalı tutularak hava akımından uzak durulmalıdır. Bek alevi etrafında ani hareketlerden kaçınılmalıdır.
- ❖ Ellerde açık yara ve kesik gibi durumlar varsa patojen türlerle yapılan çalışmalarda eldiven giyilmeden hiçbir çalışmaya katılınmamalıdır.
- ❖ Laboratuvardan ayrılmadan önce hem kendi bençlerimizin hem de bek alevi etrafındaki bençlerin temizliği gerçekleştirilmeli, musluklar ve gazların kapatıldığından kesin emin olunmalıdır.

Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük ve tek hücreli canlıları ifade ederken bu grup içerisinde bakteriler, arkeler, mayalar, küfler, algler ve protozolar sıralanabilmektedir. Mikrobiyoloji bilim dalı ilk defa Anton van Leeuwenhoek'un kendi tasarımı olan bir mikroskop kullanarak mikroorganizmaları keşfetmesi ile başlamıştır.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan araç ve gereçler şunlardır.

- Otoklav
- Otoklav Şişeleri
- Mezür
- Hassas terazi
- Spatul
- Beher
- Balonlar
- Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı
- pH metre
- Petri kapları
- Test tüpleri ve taşıyıcıları
- Erlen mayer
- Steril kabin
- Öze
- Eküvyon çubuğu
- Bunzen Beki
- İnkübatör
- Su banyosu
- Etüv
- Filtre üniteleri
- Boya küveti
- Lam-lamel
- Piset
- Mikroskop
- Pasteur pipetleri
- Pipet ve pipet puarı
- Mikropipet ve pipet uçları
- Eppendorf tüpleri ve taşıyıcıları
- Baget
- Vorteks
- Santrifüj
- Huni
- Havan
- Spektrofotometre

Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon

Sterilizasyon: Belirli bir ortamda mikroorganizmaların vejetatif ve spor formlarının yok edilmesi veya uzaklaştırılmasıdır. **Dezenfeksiyon:** Belirli bir ortamda mikroorganizmaların sadece vejetatif formlarının yok edilmesi veya ortadan kaldırılmasıdır.

Vejetatif form, mikroorganizmaların normal metabolik faaliyetlerini devam ettirdiği, stres koşulları altında bulunmayan formdur. Organizma beslenme, hareket etme, üreme ve protein sentezleme gibi işlevlerini sürdürür. **Spor form,** stres koşulları altında oluşan formlardır. Metabolik aktivite minimuma indirgenmiştir. Stres koşulları besin sıkıntısı, ışıksız ortam, sıcaklığın artması ve düşmesi olabilir. Bu koşullar altında mikroorganizma normal yaşamsal faaliyetlerini devam ettiremez ve kendini koruma altına alır. Bu stresli dönemi atlatmaya çalışır. Bakterilerde spor oluşturma dönemi hayatta kalmaya dayalıdır, üreme amaçlı değildir.

Spor oluşturmada organizma stresli koşullar altına girdiğinde DNAsı çevresinde çok az sitoplazma ve su alarak kalın duvar oluşturur. Bu olaya **sporulasyon** denir. Ortam koşulları normale döndüğünde ise organizma bu kalın duvarı yıkar ve vejetatif forma döner. Bu işleme ise **germinasyon (çimlenme)** denir.

Sporulasyon veya **germinasyon** işlemleri çok hızlı olmaz yani bir ortamda stres koşulları oluşunca anında organizma spor oluşturmaz bunun için bir süre gerekmektedir. 24-48 saat bunun için yeterlidir.

Mikrobiyoloji çalışmalarının doğru yapılabilmesi için **kontaminasyona** (bir ortamda istediğimiz mikroorganizma dışında başka organizma olması) neden olmamalıdır. **Aseptik tekniklere** (mikrobiyolojide kontaminasyona neden olmadan çalışma yapmak için uyulan kurallar bütünü) uyularak işlemler yapılmalıdır. **Saf kültür** (tek bir bakteri hücresinin bölünerek çoğalmasıyla oluşan ve tek türden ibaret bakteri topluluğu) eldesi çalışmaların temel basamağıdır. **Karışık kültürlerin** (bir ortamda birden fazla tür olması durumu) çalışılması yanlış sonuçların elde edilmesine neden olur.

Sterilizasyon Tipleri

A. Sıcaklık ile sterilizasyon

Kuru sıcaklık ve nemli sıcaklık ile sterilizasyon diye ikiye ayrılır.

1. Kuru sıcaklık ile sterilizasyon

- Yakma ile sterilizasyon
- Alevden geçirme
- Yüksek sıcaklıktaki fırınlarda bekletme

2. Nemli sıcaklık ile sterilizasyon

- Kaynatma
- Buhar ile sterilizasyon
Basıncı buhar ile
Basıncısız buhar ile
- Tindalizasyon

B. Filtre ile sterilizasyon

Mekanik olarak sterilizasyon gerçekleşir. Isıya dayanıklı olmayan sıvı materyallerin sterilizasyonunda kullanılır. Küçük çaplı gözeneklerden (0.22 veya 0.4µm) yaklaşık olarak 1µm çapındaki mikroorganizmalar geçemez ve steril olur.

C. Kimyasal ile sterilizasyon

Kimyasal maddeler içinde etilen oksit en iyi sterilizasyon etkenidir. Ayrıca sodyum hipoklorid (çamaşır suyu) bençlerin sterilizasyonunda kullanılır.

D. Işınlama ile sterilizasyon

Ultraviyole (UV), X ışınları ve Gama ışınları bu sterilizasyonda sıklıkla kullanılır.

Mikroorganizmaların üretilmesinde kullanılan besiyerleri, besiyerlerin hazırlanması, katı besiyeri, yatık ağı ve sıvı besiyeri hazırlanması

Holozoik Beslenme: Besin maddelerini (katı veya sıvı) özel bir organ veya organel yardımıyla alınıp enzimatik olarak kullanılabilir hale getirerek beslenmedir.

Holofitik Beslenme: Besin maddelerini hücre dışında enzimatik olarak parçalayıp, hücre içine alınmasıyla yapılan beslenme şeklidir.

Mikroorganizmaların üretilmesi için gerekli olan çeşitli organik veya inorganik maddelerden oluşan ortamlara **besiyeri** denir.

A. Fiziksel Özelliklerine Göre Besiyerleri

- Sıvı Besiyeri
- Katı Besiyeri
- Yarı Katı Besiyeri

Ortam sıvı olduğu için mikroorganizmalar besin kaynaklarının tamamına ulaşırlar ve daha yoğun ürerler. Bu tip ortamlarda üreme tortu, bulanıklık, zar oluşumu ve renk değişimiyle tespit edilir.

Sıvı besiyerine litrede yaklaşık olarak %2-3 oranında agar ilavesiyle katı besiyeri oluşturulur. Mikroorganizma türlerinin ayırt edilmesi ve saf kültür oluşturulmasında kullanılır.

Agarın düşük yoğunlukta (%0.05-0.5) eklendiği besiyerleridir. Mikroaerofillerin üretilmesi ve mikroorganizmaların hareket özelliklerinin anlaşılmasında kullanılır.

Agar, mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılmaz. 42-43°C'de katılaşır. 90-95°C'de erir. Erime ve katılaşma özelliği ortamın pH'ından etkilenir. pH<5 ise agarın katılaşma özelliği kaybolur. Katılaştırıcı ajandır.

Jelatin, ilk olarak besiyerlerini katılaştırmak için kullanılmıştır. 37 °C'de erir, 22-24°C'de katılaşır. Fakat jelatin düşük sıcaklıklarda erimesi, bazı mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılması ve 121°C'de jelleşme özelliğini kaybetmesi nedeniyle tercih edilmemektedir.

B. Kimyasal Özelliklerine Göre Besiyerleri

- **Sentetik Besiyerleri**
- **Sentetik Olmayan Besiyerleri**

İçerisindeki kimyasal maddelerin yapı ve miktarı tam olarak bilinen besiyerleridir.

İçerisindeki kimyasal maddelerin yapı ve miktarı tam olarak bilinmeyen besiyerleridir.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında genellikle bu tip besiyeri kullanılır.

Canlı besiyerleri bu gruba girer.

C. Kullanım Amacına Göre Besiyerleri

➤ Genel Besiyerleri

Herhangi bir inhibitör içermeyen, besin maddelerince yeterli, her hangi bir organizma grubunun gelişmesini özellikle desteklemeyen, zor gelişen mikroorganizmalarında dahil olduğu pek çok organizmanın gelişebildiği besiyerleridir.

➤ Seçici Besiyerleri

Gelişmesi istenmeyen mikroorganizmaların baskılandığı, gelişmesi istenen mikroorganizmaların gelişmesine her hangi bir olumsuz etkinin oluşturul-madığı besiyerleridir. Ör: Antibiyotik ve tuz ilavesi

➤ Ayırt Edici Besiyerleri

Bazen inhibitörlerin (antibiyotik) kullanılması uygun olmayabilir. Bu nedenle ayırt edici besiyerleri kullanılır. Bu besiyerlerinde istenilen organizmanın yanı sıra başka organizmalarda gelişebilir fakat koloni morfolojisi farkıyla onlardan ayrılırlar.

➤ Zenginleştirici Besiyerleri

Hedeflenen bir mikroorganizmanın üretilmesi ve sayısının artırılması için kullanılır. Kan, yumurta veya glukoz ilave edilebilir

➤ Tanımlayıcı Besiyerleri

Mikroorganizma izolatlarının tanımlanması için kullanılan besiyerleridir. Mikroorganizmanın belli bir besin maddesini kullanıp/kullanmadığı, besin maddesinin kullanımıyla oluşan metabolitlerin oluşup/oluşmaması ile belirlenebilir.

Besiyerleri İçinde Bulunan Maddeler

- Pepton
- Karbohidratlar
- Mineral Maddeler
- Yeast Ekstrakt (Maya Ekstraktı)
- Malt Ekstrakt
- Beef Ekstrakt (Et Ekstraktı)
- Serum
- Kan
- Su
- Boya Maddeleri
- Antibiyotikler
- Amino asitler
- Vitaminler

Aseptik teknikler, çevremizdeki mikroorganizmalar

Mikrobiyolojik çalışmaların doğru bir şekilde yapılabilmesi için saf kültüre ihtiyaç vardır. Saf bir kültür elde etmek için kontaminasyona neden olmadan çalışmamızı yapabilmemiz gerekir. Kontaminasyona neden olmadan çalışmamızı yapmamız için gereken kurallar bütününe **aseptik teknikler** demekteyiz. Aseptik teknikler sterilizasyon işleminden itibaren kontaminasyon oluşmadan saf kültür elde edilmesi için yapılan işlemlerdir.

Aseptik tekniklerin önemi özellikle inokülasyon (aşılama bir bakteriyi bir ortamdan başka bir ortama aktarma) işleminde daha ön plana çıkmaktadır. Bakterinin aşılacağı ortamın ve özenin (aşılama aracının) steril olması gerekmektedir ve çalışma süresinde bu sterilitenin korunması gerekir. Bu nedenle petriler açılıp kapanırken ve aşılama işlemi yapılırken bazı kurallara dikkat etmek gerekir ki bunlar aseptik teknikler içindedir.

- Petri tutulmasının ve açılıp kapatılmasının gösterilmesi
- Aseptik koşullarda bir ekimin nasıl yapılacağının gösterilmesi
- Çevremizden elde ettiğimiz mikroorganizmaların (karışık kültür) nutrient agar besi ortamına eküvyon ile aşılması

Saf Kültür ve nemi

Besi yerinden alınan tek bir mikroorganizma hücresinin üremesiyle oluşan mikroorganizma topluluğuna **saf kültür** denir. Saf kültürdeki her bir mikroorganizmanın morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genel özellikleri birbirlerinin aynısıdır.

Mikrobiyolojik çalışmalarda bir organizmanın özelliklerinin belirlenmesi ve ona ait bir tanının yapılabilmesi için saf kültür elde edilmesi öncelikli işlemdir. Bu şekilde o mikroorganizmanın cins, tür, tip düzeyinde tanısını yapabilmek ve adını koyabilmek mümkün olmaktadır. Karışık bir kültürü ele aldığımızda tek bir mikroorganizma için yorum yapmak g-imkansız olacaktır. Örneğin bir petri kabında karışık bakteri kültürü var ise temiz görünen bir kolonide bile diğer bir koloninin yesi olabilir. Bu DNA, RNA, metabolizma vb. alışmaları olumsuz etkileyecektir. Karbon kullanımını kontrol etmek istediğimiz bir organizmayı karışık kültürden alıp steril besiyerine ektiğimizde aldığımız sonuç doğru olmayacaktır.

izgi ekim yöntemi birbirleriyle karışmış mikroorganizmalardan tek tek kolonileri düşürerek saf kültür elde etmek için steril agar besiyerleri ihtiva eden petri kaplarına ze ile zikzaklar çekilerek yapılan inoklasyondur. Bu herhangi bir ortamdaki mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonu için ilk yapılan işlemdir. Karışık mikroorganizmaları içeren sıvı ya da katı besiyerlerinden ekim yapılır. Bunun sonucunda tek bir organizma besiyeri üzerine ekilmiş olur. İnokülasyon sonucunda ekim yapılmış her bir bakteriden bir koloni gelişir. Eğer koloni sadece bir tek bakterinin çoğalmasından oluşmuş ise üretilen hücre topluluğuna **saf kültür** veya **klon** adı verilir.

Eğer ekim sırasında batık ekim yapılırsa, yüzeydeki koloniler batık kolonilerden daha büyük gzlenecekleri ve yüzeydeki kolonilerin daha fazla oksijen nedeniyle pigment yapıp batıklar pigment yapamayacaklarından ve diğer bir yandan uygun seyreltme yapılmadığı zaman koloniler çok kalabalık olur ve bu yüzden birbirlerine çok yakın kolonilerden izolasyon zorlaşır. Bu sakıncalardan ötürü daha çok çizgi ekim metodu uygulanır.

Saf kültürün yeni besiyerlerine ekilmesi veya deney hayvanlarına nakledilmesi işlemine **pasajlama** denir.

Farklı Ortamlardan Mikroorganizmaların İzolasyonu

FUNGUSLAR

Mantarlar, fotosentetik olmayan ökaryotik mikroorganizmalardır. Fungal hücre duvarları doku olarak bitki hücre duvarlarına benzerken kimyasal yönleriyle farklılık gösterirler. Fungusların çoğunun hücre duvarları bir glukoz türevi olan N-asetilglukozaminden yapılmış **kitin** içerir. Bazı fungal hücre duvarlarında kitin yerine **mannanlar, galaktozanlar** ve **kitozanlar** gibi diğer polisakkaritler bulunur.

Belirgin bir çekirdek zarı ile çevrili çok kromozomlu bir çekirdekleri ve çekirdekçikleri vardır. Sitoplazmik zarlarında **sterol** bulunur. Sitoplazmanın içinde çeşitli granüller (glikojen, volutin, yağ vb.), mitokondriler, golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum bulunur. Ayrıca sitoplazmik zarın dışında **hücre çeperi** vardır.

Fungal hücre duvarları tipik olarak **%80-90 oranında polisakkarit olup proteinler, lipitler, polifosfatlar ve inorganik iyonlar** hücre duvarının çimento matriksini yaparlar.

Fungusların habitatları oldukça çeşitlidir. Bazı funguslar akuatik olup tatlı sularda yaşar. Bazıları ise denizlerde bulunur. Ancak fungusların çoğu karasaldır. Bunlar toprak veya ölü bitki materyali üzerinde yaşarlar ve organik karbonun mineralizasyonunda önemli roller oynarlar. Özellikle bazidiyomiset üyeleri başta olmak üzere birçok fungusun esas ekolojik aktivitesi doğal kaynaklardan elde edilen odun, kağıt, elbise ve diğer ürünlerin dekompozisyonudur. Bu ürünleri kullanan bazidiyomisetler bunlardaki selüloz veya lignini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler.

Mantarlarda üreme **sporlar** ile olmaktadır. Hücre nükleusları arasında birleşme olmaksızın oluşan sporlara **eşeyssiz sporlar**, hücre nükleusları arası birleşmeden sonra oluşan sporlara **eşeyli sporlar** adı verilir. Eşeyli sporlar; **Zigosporlar, Askosporlar, Bazidiosporlar, Oosporlar**'dır. Eşeyssiz sporlar; **Artrosporlar, Blastosporlar, Klamidosporlar, Konidiosporlar, Sporangiosporlar**'dır.

Mikrobiyolojik mantarlar iki tür yapı gösterirler:

1- Küf

2- Maya

Küfler filamentli funguslardır. Bunlar doğada yaygın olup daha çok ekmek, peynir veya meyveler üzerinde bulunurlar. Küflerin çoğu **zorunlu aerob**dur. Her filament uçtaki hücrenin uzamasıyla büyür. Hifler bölmelere ayrılmışlarsa bölmeli hif (**septalı hif**); uzun ve bölmelere ayrılmamışlarsa bölmesiz (**septasız**) hif adını alır. Bölmeler arası boşlukla sitoplazma ilişkisi sağlanır. Bölmesiz hiflerde birçok nükleus bulunur (**sönotik hif**). Uygun ortamda çoğalan küflerin gözle görülen sınırlı kitlelerine **miselyum** (mycelium) adı verilir. Küflerin katı besiyerinde çoğalma şekillerine göre farklı miselyumlar oluşur. Miselyumlar bulundukları seviyenin üstüne, havaya doğru gelişirlerse **hava miselyumu** adını alırlar. Bazı hava miselyumlarında mantarların çoğalmasını ve yayılmasını sağlayan sporlar bulunur. Bunlara **çoğalma miselyumu (reprodüktif miselyum)** adı verilir. Bazı mantarlar bulundukları ortamın derinliğine doğru gelişerek **vejetatif miselyum (besleyici miselyum)** denilen şekilleri oluşturur. Vejetatif miselyum, mantarın bulunduğu ortama tutunmasını ve ortamdan besinleri almasını sağlayan **rizoid** denen yapılara sahiptir.

Mikrobiyolojide Boyama Yöntemleri

Mikroorganizmalar renksiz ve şeffaf oldukları için mikroskopla yapılan gözlemlerde morfolojileri tam olarak belirlenemez. Bunun için mikroorganizmanın çeşitli boyalardan biri ile boyanması gerekir. Boyanmış olan mikroorganizma canlılığını kaybeder ve zeminle arasında oluşan renk ton farklılığı (kontrast) onun morfolojik olarak net görünmesini sağlar. Boyama işlemi bakterinin o boya grubuna karşı reaksiyonunu belirlemek için de yapılabilir (Gram boya metodu). Ayrıca mikroorganizmanın çeşitli organellerinin (Kapsül, spor, çekirdek, flagella vb.) belirlenmesi için de değişik tip boya ve metotları da kullanılmaktadır.

Boyama mikroorganizma ve boya arasında kimyasal bir reaksiyon sonucu meydana gelir. Boyalar genellikle iyonlardan bir tanesinin renkli olduğu tuzlardır. Tuz negatif ve pozitif yüklü iyonlardan oluşur. Renk pozitif iyon üzerinde ise bazik; negatif iyon üzerinde ise asidik olarak adlandırılır. Hücre kendisini çevreleyen ortamın nötr pH' a sahip olduğu genellikle negatif yüklüdür. Böylece bazik boya ile boyanan hücre, negatif ve pozitif yüklü iyonların birleşmesi sonucu boyanır. Metilen mavisi, safranin ve kristal violet bazik boyalara örnek olarak verilebilir.

Asit boyaları ise negatif yüklü hücreyi boyayamayacakları için, hücre etrafında deposit oluştururlar. Bu tür boyamaya negatif veya direk olmayan boyama denir. Bu tür boyama genelde bakteriyolojide kullanılmaz. Fakat bu tür boyama ile mikroorganizmanın şekli ve büyüklüğü daha net olarak görülür. Kapsüllerin görünmesi için negatif boyama yapılır. Bakteri çini mürekkebi veya nigrosin ile giremediklerinden dolayı, bakteriler mavimsi renkte boyanan zemine kıyasla daha açık renkte teşhis edilirler.

Mikrobiyolojide kullanılan boyama yöntemlerini başlıca iki gruba ayırmak mümkündür.

1) Basit boyamalar: Bu tarz boyamada, preparatlardaki mikroorganizmalar hakkında kısa süre içinde bilgi edinmek için tek boya solüsyonu kullanılır. Boya preparata bir defa uygulanır ve bakteriler boyaların karakterine göre boyanır. Bu amaçla karbol fuksin, kristal violet ve metilen mavisi gibi bazik boya solüsyonlarından biri seçilir.

2) Bileşik boyamalar: Birden fazla boya ile yapılan boyama yöntemidir. Bunlar; a) Diferansiyel boyamalar: Mikroorganizmaları birbirinden ayırmada kullanılır. (Gram boyama) b) Strüktürel boyamalar: Bakterilerin iç ve dış yapılan hakkında bilgi edinmek için kullanılan bileşik boyama yöntemleridir. (Spor, kapsül, flagella, çekirdek, lipid v.s.)

Basit Boyama Metodu

Deneyin Amacı:

Bakterilerin morfolojileri hakkında bilgi sahibi olmanın yanında bazı bakterilerin boyanma reaksiyonlarını belirlemek. Bazı basit boyama yöntemleri:

1. Karbol Fuchsinle Boyama: Usulüne göre hazırlanmış, kurutulmuş ve fiske edilmiş preparatlar üzerine, karbol fuchsin solusyonu filtre kağıdından süzülerek konur ve 5 – 10 saniye boyama için bırakıldıktan sonra, boya dökülür ve hafif akan su ile yıkanır. Kurutma kağıdı ile veya havada kurutulduktan sonra, üzerine sedir yağı konarak immersiyon objektifi ile bakılır. Mikroorganizmalar kırmızı renkte görünür.

2. Krital Viyolet ile Boyama: Hazırlanan preparat üzerine kristal viyolet solusyonundan konarak 20 – 30 saniye kadar bekletilir. Sürenin sonunda boya dökülür, preparat su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroorganizmalar mor renkte görülürler.

3. Metilen Mavisi ile Boyama: Bu amaçla Löffler metilen mavisi solusyonu kullanılır. Preparat üzerine boya solusyonu konarak 5 – 8 dakika bekletilir. Boya dökülür, yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroplar mavi renkte görülürler.

4. Negatif Boyama: Bu tür boyama yönteminde mikroorganizmalar değil, saha boyanır. Karanlık olan sahada mikroplar renksiz ve parlak olarak görünürler. Bu amaç için, nigrosin ve çin mürekkebi kullanılır. Lam üzerine bir damla boya ve sonra bir damla kültür konarak yayılır ve ince bir froti hazırlanır. Kuruduktan sonra muayene edilir. Bu yöntemden kapsülleri görmek için yararlanılır.

5. Spor Boyama: Safranin ile 30 saniye boyanır. Boya dökülür, saf su ile yıkanır. Kurutma kağıdı ile kurulanır. Sırasıyla olmak üzere tüm objektiflerle incelenir. İmmersiyon yağı ile immersiyon objektifinde sporlar yeşil, bakteriler kırmızıdır.

6. Mantar Boyama: Katı mantar kültüründen iğne ile numune alınır, kurutulur, tespit edilir. Laktofenol mavisi ile 3 dakika boyanır. Dökülür, saf su ile yıkanır. Kurutulur ve immersiyon objektifinde mantarlar mor olarak gözlenir.

Deneyde kullanılan alet ve malzemeler:

- Mikroskop
- Lam, öze, boyalar, immersiyon yağı, beher, kurutma kağıdı

Deneyin Yapılışı:

- Kültür ortam sıvı ise: Sterilize edilmiş olan öze ile alınan kültür temiz bir lamın orta kısmına konarak yayılır.

- Kültür ortamı katı ise: Hazırlanan peptonlu (% 0.1) veya fizyolojik tuzlu sudan (% 0.085) temiz lam üzerine pipetle (1 ml'lik) bir damla damlatılır. Katı vasattan sterilize edilmiş iğne öze ile alınan kültür bu suda özelenir (Homojenize edilir).

Basit Boyama:

- ❖ Lam üzerine alınan numunenin havada kuruması sağlanır.
- ❖ Alevden geçirilerek (3 defa) fiziksel tesbit edilir,
- ❖ Eğer basit boyama yapılacaksa, kültürün yayıldığı alanı örtecek şekilde boyalardan biri (Metilen mavisi veya safranin vb) lam üzerine dökülür 2 dakika beklenir.
- ❖ Boya kaba dökülerek, lam az miktarda akan musluk suyu ile yıkanarak kurutma kağıdı ile kurulanır.
- ❖ Bir damla immersiyon yağı damlatılarak, mikroskopla incelemeye alınır (100 x).

Mikroskopta incelenmeye hazır hale getirilmiş numuneye “preparat” denir. Preparata boyama işlemi yapılırsa bunlar boyalı preparat olarak belirtilir. Mikroskopik inceleme amacı ile şüpheli kültürlerden veya marazi maddelerden (organlardan, patolojik sıvılardan, kandan, idrar, gaita, sperma, süt vb.) preparatlar hazırlanır. Lamin üstüne kültür veya numuneden konulup lamel kapatılarak yayma, kurutma, fıkse etme gibi işlemler yapılarak preparat hazırlanır. Preparat hazırlamada kullanılacak lamaların kalitesi (şeffaflığı, yüzeylerinin çiziksiz olması, kenarlarının ve ölçülerinin düzgünlüğü, kalınlığının homojenliği ve camın sağlamlığı) ve temizliği son derece önemlidir. Lam üzerinde bulunan çok küçük bir leke, toz, kalıntı veya çizik mikroskopta yanlış algılamalara neden olabilir ve görüntünün net olarak görülmesini engelleyebilir. Preparat hazırlamada kullanılacak lam, ksilol veya etil alkolle ıslatılarak temiz bir bezle silinip alevden geçirilir ve aşağıdaki aşamalar takip edilerek preparat hazırlanır. Preparatların tespit (fiksasyon) edilmesindeki temel amaç bakterilerin lama yapışmalarını sağlayarak tutturmaktır. Bu suretle üzerlerine uygulanacak sıvılarla lamdan ayrılmaz. Tespit işlemi genellikle “ısı uygulama ile tespit” veya “kimyasal maddelerle tespit” olmak üzere iki yöntemle yapılır. Laboratuvar da, bakteriyolojik preparatların tespitinde en sık kullanılan yöntem ısı uygulama ile tespit yöntemidir. Kurutulan preparat, bir ucundan özel pensle tutulup alevden 3-4 defa geçirilerek tespit edilir. Tespit sırasında preparatın yanmamasına dikkat edilir. Yanmış preparatlarda mikroorganizmalar dağılmış, şişmiş ve deforme olmuş bir şekilde görülür. Isı ile bozulabilecek ökaryot hücrelerden ve protein yönünden zengin numunelerden (kan ve dokulardan) yapılan preparatlara kimyasal tespit uygulanır. Kimyasal tespit işlemi etil alkol, metil alkol, alkol-eter, alkol-aseton gibi kimyasal maddeler içerisinde bekletilerek yapılır. Metil alkol de 3-4 dakika, etil alkol de 10 dakika bekletilen preparat çok hafif akan suda yıkanıp kurutulur.

Boyama

Mikroorganizmalar, mikroskop altında boyasız incelenemediği gibi iyi ve detaylı görebilmek, identifikasyonlarına (tanıma, tanımlama, mikroorganizmanın cins ve türünün belirlenmesi) yarayacak bazı bilgileri (spor, kapsül, şekil, boya reaksiyonları vb.) elde edebilmek için boyanarak incelenmeleri de gerekir. Bu amaçla, kültürlerden veya marazi maddelerden usulüne uygun olarak preparatlar hazırlanır, boyanır ve mikroskopta incelenir.

Gram Boyama

Gram boyama tekniği, mikrobiyolojide sık kullanılan bir boyama yöntemi olup mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılır.

Gram boyama ile bakteriler “gram pozitif” (gram olumlu) ve “gram negatif” (gram olumsuz) olarak ikiye ayrılır. Basillerin yaklaşık yarısı, kokların büyük kısmı ve mantarlar gram pozitifdir. Spiral şekilli bakteriler ise gram negatiftir. Gram pozitif bakterilere örnek olarak *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* verilebilir. Gram negatif bakterilere örnek olarak *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* verilebilir.

Gram boyama için hazırlanacak preparatlarda kullanılacak kültürlerin genç (18-24 saatlik) olması gerekir. Daha yaşlı kültürlerle çalışılması durumunda yanlış sonuçlar alınabilir. Gram (+) bakteriler de gram (-) gibi değerlendirilebilir.

En sık uygulanan gram boyama yönteminde aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanır:

- ❖ 1,2’de belirtildiği şekilde preparat hazırlanır (yayma, kurutma, tespit).
- ❖ Preparatın üzerine kristal viyole boya çözeltisi eklenerek kaplanır ve 1 dakika beklenir.
- ❖ Preparat bol distile suyla yıkanır.
- ❖ Preparatın üzerine lugol çözeltisi eklenerek kaplanır ve 1 dakika beklenir.
- ❖ Preparat distile suyla yıkanır.
- ❖ Preparatın üzerine %95’lik etanol veya asit-alkol karışımı eklenerek 10-15 saniye beklenir.
- ❖ Preparat distile suyla yıkanır.
- ❖ Preparatın üzerine sulu fuksin veya safranin boya çözeltisi eklenerek kaplanır ve 30 saniye beklenir.
- ❖ Preparat bol distile suyla yıkanır.
- ❖ Preparat havada veya kurutma kâğıdı ile kurutulur.
- ❖ Mikroskopta incelenir.

Mor renkte görülen mikroorganizmalar gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise gram (-) olarak değerlendirilir. Gram (+) ve gram (-) mikroorganizmaların tamamı kristal viyole boyası ile mor renge boyanırlar. Preparata eklenen lugol solüsyonu ile gram (+) bakterilerin oluşturdukları yapı, daha sonra ortama eklenen alkol ile giderilemez. Oysa gram (-) bakterilerin oluşturduğu yapı alkol ile giderilebilir. Bir başka deyişle, boya, bakteri hücrelerinden dışarıya salınır (dekolorizasyon).

Gram boyanma özelliği bakteri hücre duvarının (çeperi) yapısı ile ilgilidir. Hücre duvar yapıları arasındaki farklar:

- ❖ Gram (+) bakterilerin hücre çeperinde gram (-) bakterilere göre daha kalın peptidoglikan tabakası mevcuttur.
- ❖ Gram (+) bakterilerin hücre çeperinde karbonhidratlar, gram (-) bakterilerin hücre çeperinde lipidler fazladır. Karbonhidratlar alkolle dekolarizasyon esnasında dehidratasyona (su molekülünün açığa çıkması) uğrar. Porlar iyice büzüşür, daralır ve boya dışarı çıkamaz. Lipitler de ise alkol çözücüdür ve hücre çeperinde olan porlar daha çok açılarak genişler.
- ❖ Gram (+) hücre çeperinde teikoik asit olmasına rağmen gram (-) yoktur.

Spor Boyama

Bazı bakteriler, hücre içerisinde dış etkenlere karşı daha dirençli olan ve “endospor” olarak adlandırılan özel formlar oluşturur. Endospor oluşumundan sonra bakteri hücresi ölebilir veya çeşitli etkenlerle hücre parçalanarak dağılabilir. Bu durumda endosporlar serbest hale geçer. Bunlara “spor” denir. Sporların soğuk, sıcak, UV (ultraviyole), ozmotik basınç gibi fiziksel etkilere ve kimyasal maddelere karşı vejetatif hücrelerden daha dayanıklı olması, kimyasal ve fiziksel yapılarının farklılığından kaynaklanmaktadır.

Vejetatif hücre normal boyalarla boyanmasına karşın sporun etrafında kalın muhafazaların bulunması ve bunların geçirgen olmaması boyanmalarını zorlaştırır. Bundan dolayı özel spor boyama yöntemleri geliştirilmiştir. Endosporların normal çevre sıcaklıklarında boyaları içlerine almaya karşı dirençleri vardır. Ancak boyama esnasında ısı işlem uygulanması endosporların bu direncini kırmakta ve endosporların boyayı içlerine alarak boyanmalarını sağlamaktadır. Spor boyaması için başlıca iki metot geliştirilmiştir.

Malaşit Yeşili ile Spor Boyama

- ❖ Preparat hazırlanır (yayma, kurutma ve tespit).
- ❖ Preparat uygun bir kaynar su banyosu düzeneğinin üstüne yerleştirilir.
- ❖ Preparatın üzeri % 5’lik malaşit yeşili boya çözeltisi ile kaplanır. Bunun üzerine daha önceden lamdan daha küçük boyutta olacak şekilde kesilerek hazırlanmış olan bir kurutma kâğıdı yerleştirilir. Kurutma kâğıdı boya çözeltisini çekerek ıslanır.
- ❖ Kurutma kâğıdının üzerine malaşit yeşili boya çözeltisi damlatılarak kâğıdın sürekli ıslak kalması sağlanır.
- ❖ Kurutma kâğıdının ıslaklığı azaldıkça malaşit yeşili boya çözeltisi damlatılarak preparat bu şekilde 5-6 dakika boyanır.
- ❖ Süre sonunda kurutma kâğıdı bir pensle alınarak atılır, preparat yıkanır.
- ❖ Sulu fuksin veya % 0,5’lik safranin ile 20-30 saniye boyanır.
- ❖ Yıkanır ve havada kurutulur.
- ❖ Mikroskopta incelenir. Bu boyamada bakteriler pembe-kırmızı, sporlar yeşil olarak görülür.

Katalaz Testi

Aerobik ve pek çok fakültatif anaerobik mikroorganizma katalaz enzimine sahiptir. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *E.coli*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* katalaz pozitif bakterilere örnek gösterilebilir. *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* gibi Laktik asit bakterileri ve *Clostridium*'lar genelde katalaz negatif bakterilerdir (bazı laktik asit bakteri suşlarının özellikle kan içeren besiyerinde katalaz testine pozitif netice verdiği bilinmektedir).

Stafilokokları, streptokoklardan ayırt edebilmek için besiyerinde oluşan hemoliz, koloni ve gram boyamanın özellikleri yeterli değildir. Bu ayrımı yapabilmek için katalaz testi kullanılır. Katalaz, streptokokların dışında birçok aerobik ve fakültatif bakteri tarafından üretilen bir enzimdir. Katalaz enzimi, eritrositlerde de bulunduğundan dolayı; test edilecek bakteri kolonisi, kan içermeyen bir besiyerinden alınır. Katalaz testinde, süspanse bakteri kolonisine hidrojen peroksit (H_2O_2), damlatarak katalaz enzimini tespit etmek amaçlanmaktadır. Katalaz enzimi varlığında H_2O_2 , oksijen (O_2) ve suya (H_2O) dönüşür. Stafilokoklarda katalaz pozitif, streptokoklarda ise katalaz negatiftir. Test; tüpte, lamda, tüp veya petri kutusundaki besiyerinde olmak üzere üç şekilde yapılır.

Tüpte Katalaz Testi

- İncelenecek bakteri kolonisinden özeye alınarak temiz bir tüp içinde, bir damla serum fizyolojik ile süspanse edilir.
- Üzerine % 3'lük H_2O_2 damlatılır ve karıştırılır.
- Karışım içinde oksijenin açığa çıkması yani, hava kabarcıklarının oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

Lamda Katalaz Testi

- İncelenecek bakteri kolonisinden özeye alınarak temiz bir lam üzerinde, bir damla distile su ile süspanse edilir.
- Üzerine %3'lük H_2O_2 damlatılır ve karıştırılır.
- Karışım içinde hava kabarcıklarının oluşması, testin pozitif olduğunu gösterir.

Tüp veya Petri Kutusundaki Besiyerinde Katalaz Testi

- Tüp veya petri kutusundaki sıvı veya katı besiyerinde geliştirilen bakteri kültürü yüzeyine, %3'lük H_2O_2 'ten 1ml damlatılıp karıştırılır.
- Karışım içinde hızla başlayan ve kısa sürede kaybolmayan hava kabarcıklarının oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

Koagülaz Testi

Bu test, özellikle stafilokoklarda bulunan ve kan plazmasını pıhtılaştıran koagülaze enzimini (stafilokoagülaze) ortaya koyma, patojenik olanlarla nonpatojenik olanları ayırmak amacı ile yapılır. Patojenik olan *S. aureus* pozitif reaksiyon vermesine karşın *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* negatif reaksiyon gösterir.

Bazı araştırmacılar, koagülaze enzimini, normal plasma faktörü ile reaksiyon vererek trombin benzeri substansı oluşturan ve protrombin benzeri bir madde olduğunu da bildirmişlerdir. Bu madde sonradan fibrinojen'i aktive ederek fibrin haline dönüştürür. Stafilokoklar dışında bazı mikroorganizmalar da koagülasyon meydana getirebildikleri saptanmıştır. Ancak buradaki reaksiyon enzimatik olmayıp, plasma antikoagülatanın tahrip olması etkisinin ortadan kalkmasıyla meydana gelir. Koagülaze enziminin fazla olması reaksiyonun daha çabuk ve belirgin olarak meydana gelmesine neden olur. Stafilokoklarda koagülaze aktivitesinin, bu etkenlerinin oluşturduğu diğer toksik substanslarla bir bağlantısı olmadığı bildirilmiştir.

Materyal

1. Steril taze insan veya tavşan plasması (heparinli veya fibrinojen)
2. Taze ve saf stafilokok sıvı veya katı ortamdaki kültürü
3. Koagülaze pozitif (*S. aureus*) ve negatif (*S. epidermidis*) suşlarının taze kültürleri (kontrol mikroorganizmalar)

Metot

Temiz bir lam üzerine bir damla steril fizyolojik su (veya distile su) konur. Buna taze sıvı stafilokok kültüründen bir damla ilave edilir veya agardan bir-iki koloni alınarak sıvı ile bir suspansiyon yapılır. Sonra bunun üzerine bir damla steril taze plasma konur ve homojenize edilir. Reaksiyon 3-5 saniye içinde okunabilir. Şüpheli durumlarda sonucu almak için 2-3 dakika kadar beklenebilir.

Değerlendirme

Lam üzerinde 3-5 saniye içinde oluşan kümeleşme pozitif reaksiyon olarak kabul edilir. Bu süreden sonra bir dakikaya kadar olan kümeleşmeler geç reaksiyon olarak değerlendirilir. Bir dakikadan sonraki reaksiyonlar şüpheli ve hiçbir değişiklik yoksa negatif olarak dikkate alınır. Şüpheli ve geç reaksiyon hallerinde tüp testi ile duruma kesinlik kazandırılır.

Bu test, özellikle stafilokoklarda bulunan ve kan plazmasını pıhtılaştıran koagülaze enzimini (stafilokoagülaze) ortaya koyma, patojenik olanlarla nonpatojenik olanları ayırmak amacı ile yapılır. Patojenik olan *S. aureus* pozitif reaksiyon vermesine karşın *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* negatif reaksiyon gösterir. Aslında koagülaze'nin patojenite ile ilişkisi de tam olarak aydınlatılmamıştır.

Hidrojen Sülfür Üretimi

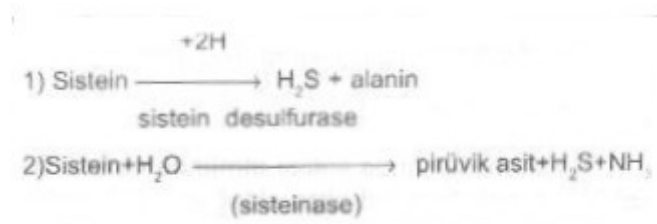
Hidrojen sülfür, renksiz, çürük **yumurta** kokusunda zehirleyici bir gazdır. 1796'da **C. Louis Berthallet** tarafından bileşiği meydana getiren **elementler** tâyin edildi. Formülü H_2S şeklindedir.

Çok şiddetli **zehir** olan hidrojen sülfürün 10-5lik bir konsantrasyonda da kokusu hissedilebilir. Sıvılaştırılmış hidrojen sülfür elektriği iletmez. Kaynama noktası $-60,75\text{ }^{\circ}\text{C}$, erime noktası ise $-83,70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. Havadan 1.19 defâ daha ağırdır. Kaynama noktasında yoğunluğu 0,993'tür. Suda ve alkolde oldukça çözünür. Yanıcıdır. % 4,5-45,5 oranında hidrojen sülfür içeren hava patlayıcıdır.

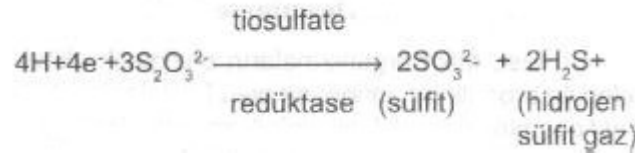
Hidrojen sülfür az miktarda petrolde, kaplıcalarda ve tabiî gaz kuyularında bulunur.

Bu test, mikroorganizmaların, sülfür içeren bazı aminoasitleri (sistin, sistein, metionin, glutation) veya bileşikler (sülfatları) ayrıştırarak hidrojen sülfür (H_2S) meydana getirebilme durumlarını saptamak için yapılır.

Bu deney bakterilerin cins ve türlerini tayinde işe yarar. Sülfür içeren sistein başlıca iki tarzda ayrıştırılır.



Bu ikinci form, anaerobik katabolizmayı ifade eder. Besi yerinde bulunan sodyum tiosülfatın ayrışması da yandaki tarzda meydana gelir.



Ortama indikatör olarak demir bileşiklerinin konulduğu durumlarda (örn, SIM besiyeri) demir sülfid (FeS) oluşarak siyah renk teşekkül eder.

Besi yerinde oluşan hidrojen sülfürü ortaya koymada, TSI (triple sugar iron agar), Kligler demirli Agar (KDA) Sülfid İndol-Motile (SIM) yarı katı agar, pepton iron agar (PIA) Bismut Sülfid Agar (BSA) vs. katı veya yarı katı besiyerlerinden yararlanılır.

Materyal

- 1) Tüpte hazırlanmış SIM yarı katı besi yeri (bu ortam hidrojen sülfürü ortaya koyması yanı sıra indol ve hareket muayenesi için de kullanılır).
- 2) Muayene edilecek mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (*S. gallinarum*, *P. vulgaris*) ve negatif (*E. coli*) kültürleri,

Metot

- 1) SIM besi yerine, mikroorganizma kültürleri batırılmış iğne ile dikine ekim yapılır.
- 2) Tüpler 37°C de 2-7 gün inkubasyona bırakılarak her gün gözle kontrol edilirler.

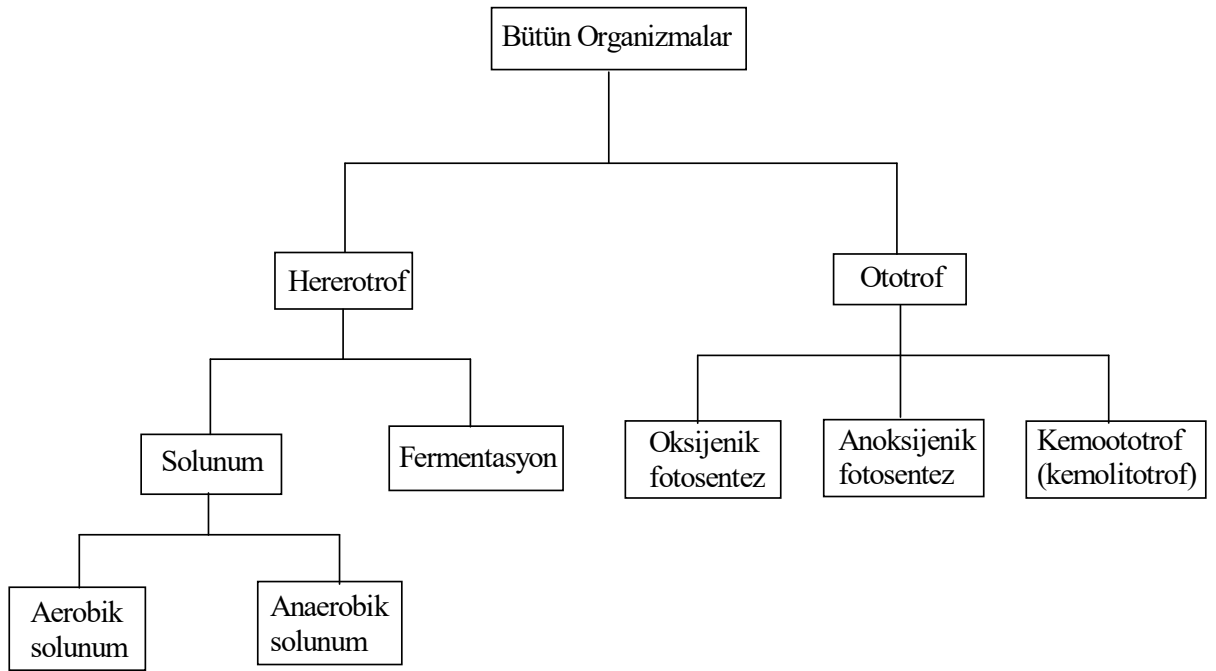
Değerlendirme

- 1) SIM besi yerinde, inokulasyon hattı boyunca siyah rengin (demir sulfid, FeS) meydana gelmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Hiçbir değişiklik yoksa negatif olarak kabul edilir.
- 2) İnokulasyon hattından yanlara doğru yayılan üreme, hareketi ifade eder.
- 3) Besi yerinin üzerine Kovacs solusyonu konduğunda kırmızı rengin oluşumu indol'un varlığını bildirir.

Karbonhidrat Fermentasyon Testi

Fermentasyon , genellikle glikozun alkole dönüştüğü reaksiyonlar için kullanılan bir isimdir. Bu dönüştürme işi maya adı verilen tek hücreli canlıların sitoplazmalarında gerçekleşir. Ancak fermentasyonun daha uygun bir tanımı, **karbonhidratların alkol ve asitlere dönüştürülmesidir.**

Fermentasyon işlemi pek çok farklı besin maddesinin üretiminde kullanılmaktadır. Yoğurt, boza, alkollü içkiler fermentasyon yoluyla üretilen pek çok besinden bazılarıdır. Özel olarak fermentasyonla ilgilenen bilimin adı "**Zimoloji**"dir.



Oksijensiz Solunum

- Elektron verici organik molekül
- Elektron alıcı inorganik molekül
- ATP için ETS'ye gerek vardır (ancak kısadır)
- Son elektron alıcısına göre isimlendirilir (örn nitrat solunumu)

Fermentasyon

- Elektron verici organik molekül
- Elektron alıcı organik molekül
- ATP için ETS'ye gerek yok. Yaklaşık 2 ATP
- Oksijen gerekmez.
- Fermentasyon ürününe göre isimlendirilir.

Karbonhidratların birçoğu bakteriler tarafından fermente edilir ve fermentasyon şekli bazı tür, cins ya da diğer **taksonomik grupların önemli özellikleridir**. Fermentasyon testinin amacı mikroorganizmaların karbonhidratları parçalayarak asit veya gaz ya da her ikisini bir arada oluşturma özellikleri incelenir. Fermentasyon sırasında karbonhidrat glikoz yoluyla piruvata çevrilir. Pirüvattan sonra oluşan ürünün farklılığına göre fermentasyon 3 şekilde olmaktadır.

1. Asidik fermentasyon
2. Alkolik fermentasyon
3. Karışık fermentasyon

Asidik fermentasyonda laktik asit, formik asit ve süksinik asit gibi organik asit oluşturulur. Alkolik fermentasyonda son ürün olarak etil alkol, asetil metil karbinol, 2,3-bütillen glukol ve diasetil gibi nötral ürünler ve CO₂ oluşur. Karışık fermentasyonda hem asidik hem de alkolik fermentasyon ürünleri oluşur.

Materyal

1. Farklı karbonhidrat (glikoz, sakkaroz, laktoz) ve bromtimol ilaveli pepton broth
2. Mikroorganizmalar
3. Öze
4. Bek alevi

Metot

- ❖ Aseptik koşullar altında bek alevi etrafında önce özemin ucunu akkor hale getiririz.
- ❖ İçerisinde mikroorganizma kültürü bulunan besiyerini hemen alevin arka tarafında açarak besiyeri içerisindeki boş bir alanda özenin ucunu soğuturuz.
- ❖ Soğutma işleminden sonra çok az miktar mikroorganizmayı besiyerinden alıriz. Besiyerini kapatarak yerine koyarız.
- ❖ Özemin ucunu alevin etrafından uzaklaştırmadan bromtimol mavisini ilaveli farklı karbonhidratların bulunduğu brothun kapağını serçe parmağımızla kavrayarak açarız.
- ❖ Daha sonra tüpün ağzını hızlı bir şekilde alevden geçiririz. Önce broth tüpünü hafifçe eğerek özemin ucundaki mikroorganizmayı güzelce süspanse ederiz. Daha sonra tamamen tüpün içerisine daldırarak ekim işlemini sonlandırırız.
- ❖ Son olarak da önce tüpün ağzını alevden geçirerek yine serçe parmağımızla kapağını kapatırız. Özemi de akkor hale getirerek deneyimizi tamamlamış oluruz.

Değerlendirme

- ❖ Eğer organizma alkolik fermentasyon yapıyorsa durham tüpünde gaz çıkışı görülmektedir.
- ❖ pH nötr olduğu durumda yeşil, pH asidik olduğu durumda sarı, pH alkali olduğu durumda ise mavi renk almaktadır. Asidik fermentasyon yapıyorsa besiyerinin rengi sarıya dönecektir.
- ❖ Besiyerinin sarı renge dönüşmesi ve durham tüpünde gaz çıkışının gözlemlenmesi sonucunda mikroorganizmanın karışık fermentasyon yaptığı sonucuna varılır.
- ❖ Ne besiyerinin renginde bir değişme ne de durham tüpünde gaz çıkışı gözlemlenmiyorsa organizmamızın fermentasyon yapmadığı anlaşılır.

IMViC (İndol ve Sitrat Testi)

İndol, Metil red, Voges - Proskauer ve Sitrat, (Citrat) testlerinin ilk harflerinden oluşmuştur. Vi 'deki "i" küçük harf olarak yazılır ve sadece okuma kolaylığı sağlar. Bu testler koliform grup bakterilerin ayrımı için kullanılmaktadır. Son zamanda IMViC testleri IMVEC olarak kullanılmaktadır. E harfi Eijkman, testini simgelemektedir. Koliform grup bakteriler için HOMoC testleri de uygulanmaktadır.

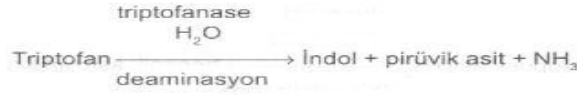
IMViC testleri, özellikle Enterobacteriaceae üyelerinin ilk tanımlama basamağında klinik mikrobiyoloji laboratuvarları için vazgeçilmez testlerdir. Bu UMS'nin amacı IMViC test paketinde yer alan testlerin doğru uygulanmaları ve yorumlanmaları için bir rehber sunmaktır.

Bakteri	İndol	MR	VP	Sitat
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	-
<i>Salmonella spp.</i>	-	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+
<i>Shigella spp.</i>	-	+	-	-

İndol Testi

Bu test, mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılır.

Aynı zamanda, bakterilerin cins (*Salmonella* (-), *Edwardsiella* (+), *E. coli* (+), *Klebsiella* (-), *Enterobacter* (+), ve türlerin (*P. multocida* (+), *P. haemolytica* (-), *P. mirabilis* (-), *P. vulgaris* (+) ayırımında da işe yarar.



Materyal

- 1) İçinde triptofan bulunan sıvı besi yeri veya peptonlu su (tüpte, 5 ml).
- 2) Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (*E. coli*) ve negatif (*S. gallinarum*) kültürleri
- 4) Ekilmemiş sıvı besi yeri
- 5) Kovaks veya Ehrlich ayırıcı

Metot

Mikroorganizmalar sıvı besi yerine veya peptonlu sıvıya ekildikten sonra 37 °C de 1-5 gün inkubasyona bırakılır. Kültürlerin üzerine kovacs (veya Ehrlich) ayırıcından 0.5 ml ilave edilir ve iyice karıştırılır.

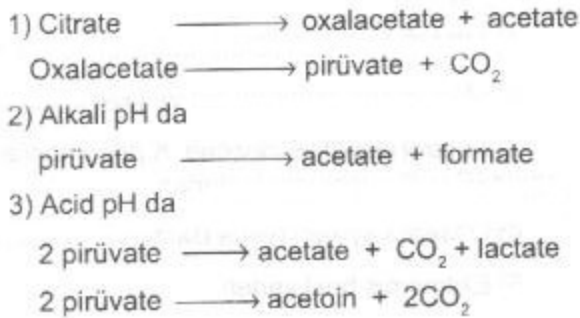
Değerlendirme

Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon (indol formasyonunu) ifade eder. Sarımsı halka indolun oluşmadığını gösterir (negatif indol testi). Renk, indol içinde bulunan pyrrole'den ileri gelir.

Sitrat Testi

Bu test, mikroorganizmaların, besi yerlerine katılan sitrati karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada, bakteri cins ve türlerini identifikasyonda kullanılır. Bakteriler tarafından sitratın ayrışması (sitrat metabolizması) enzim sistemi tarafından gerçekleştirilir. Bu enzime citritase (citrate oxalacetate-lyase) veya citrate demolase adı verilir.

Bu enzimin aktivitesi için magnezyum veya manganez tarafından sağlanan divalen katyonlara gereksinim vardır. Sitrat metabolizmasında elde edilen ürünlerin ortamın pH'sı ile sıkı bir ilişkisi vardır. Son ürün ne olursa olsun, sitrat fermentasyonunda esas basamak, piruvat'ın meydana gelişidir. Piruvatın ayrışma ürünleri besi yerinin pH 'sına bağlıdır.



Yukarıda da görüldüğü gibi alkali pH da (No.2), daha fazla acetate ve formate meydana gelmesine karşın, asit ortamda (No.3) acetylmethylcarbinol (acetoin) ve lactate'lar esas ürünler arasında bulunmaktadır. Sitrat fermentasyonu için kullanılan besi yerlerinde amonyum tuzlarının bulunması nedeniyle de, bakterilerin bu tuzu nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yetenekleri de ölçülmektedir. Amonyum tuzu ayrışınca amonyak (NH₃) meydana gelerek ortamın pH sı yükselir. Bakteriler tarafından organik asit ve tuzlarının karbon kaynağı olarak kullanılması sonucu karbonatlar ve bikarbonatlar meydana gelir.

Materyal

- 1) Tüp içinde yatık Simmons citrate agar besi yeri (4-5 ml, pH 6.9 ve yeşil renkte) veya Christensen sitrat sulfid besi yeri (4-5 ml pH 6.7, açık renkte)
- 2) Test edilecek mikroorganizmaların taze ve saf kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (Klebsiella aerogenes) ve negatif (E. coli) mikroorganizmaları
- 4) Ekilmemiş besi yerleri

Metot

Muayeneleri yapılacak saf kültürler steril fizyolojik su veya buffer ile biraz sulandırıldıktan sonra besi yerlerine ekimler yapılır ve tüpler 2-7 gün 37 °C inkubasyonda tutulur. Christensen besi yerine iğne ile inokulasyon yapılır ve yatık yüzeye de iğne sürülür.

Değerlendirme

- 1) Simmons citrate besi yerinde, uygun bir inkubasyon süresi sonunda hiçbir üremenin olmaması ve ortamın orijinal yeşil rengini muhafazası negatif reaksiyon ve ekim hattı boyunca üreme ile birlikte koyu mavi rengin meydana gelmesi de pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir.
- 2) Christensen sitrat sülfid besi yerinde hiç bir renk değişikliğinin görülmemesi (açık rengin muhafaza edilmesi) negatif reaksiyon ve ekim hattı boyunca üreme ile birlikte pembe-kırmızı rengin oluşumu da pozitif reaksiyonu ifade eder.
- 3) Değerlendirme, kontrollere bakılarak yapılmalıdır.

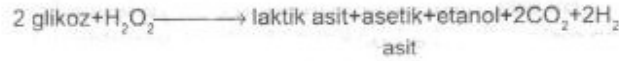
Bazı organizmalar sitratı tek karbon (enerji) kaynağı olarak kullanırlar. Sitrat testi bakterilerin sitratı kullanma yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılır. Test için sitrat agar (Simmon"s citrate agar) kullanılır. Tüpte yatık hazırlanan bu besiyeri karbon kaynağı olarak sadece sitrat içerir; nitrojen kaynağı olarak da amonyum tuzları bulunur. **Sitratı kullanan organizmalar** inorganik amonyum tuzlarını da tek nitrojen kaynağı olarak kullanabildiklerinden, **metabolizma alkali ürünlerin (amonyak) artışı ile sonuçlanır (pH>7.6)**. Ortamda bulunan indikatör madde bromtimol mavisi olup, pH"ın yükselmesine paralel olarak besiyerinin rengi yeşilden koyumaviye döner (7,8). Bakterilerin sitratı kullanma yeteneğinin test edilmesi özellikle Enterobacteriaceae üyelerinin ve diğer bazı gram negatif bakterilerin tanımlanmasında anlamlıdır. Çok az köken hariç Salmonella, Edwardsiella, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia ve Providencia türleri sitrat pozitif iken Escherichia, Shigella, Morganella ve Yersinia sitrat negatiftirler.

IMViC (VP-Metil Kırmızısı Testi)

Metil Kırmızısı Testi

Bu test, glikozun fermentatif metobolize olması sonu besi yerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılır. Deney, mikroorganizma cinslerinin (*E. coli* +, *Enterobacter aerogenes* -, *E. cloacae* -) ve türleri (*L. monocytogenes* +) ayırmada kullanılır. Metil kırmızısı solusyonu pH 6.0 da sarı renk ve pH 4.4 den aşağıda kırmızı renk gösterir.

E. coli tarafından glikozun ayrıştırılması yanda gösterilmiştir.



Materyal

- 1) Tüpte hazırlanmış Clark ve Lubs besi yeri (MR/VP buyyonu)
- 2) Saf ve taze mikroorganizma kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (*E. coli*) ve negatif (*E. cloacae*) mikroorganizma kültürleri
- 4) Metil kırmızısı pH indikatörü
- 5) Ekilmemiş besiyerleri

Metot

Üremiş kültürlerden, besi yerlerine ekimler yapılır ve tüpler 37 °C de 2-7 gün inkubasyona bırakılır. Üzerine metil kırmızısı solusyonunundan 4-5 damla damlatılır ve iyice karıştırılır.

Değerlendirme

Metil red, besi yerine damlatıldıktan sonra üstte kırmızı renkli bir halkanın meydana gelişi pozitif metil kırmızısı testi olarak kabul edilir. Negatif reaksiyon halinde üst tarafta sarı bir halka görülür.

MR testi bir bakterinin glikoz fermentasyonu sonucu **asit son ürünler meydana getirip getirmediğini saptamak için** kullanılır. Testin indikatörü metil kırmızısıdır. Glikozlu bir buyyonda belli bir inkübasyon süresinin sonunda oluşan pH değişimini değerlendirmek için kullanılır (pH5.8, sarı)

Voges - Proskauer (VP) Testi

Bu test, bazı mikroorganizmaların glikozu fermente edilerek, nötral bir ürün olan acetylmethylcarbinol'u (acetoin) meydana getirme yeteneğini tayinde kullanılır. Bakteri türlerini (*K. pneumoniae* (+), *E. coli* (-) belirlemede kullanılır. Glikoz, önce pirüvik asit'e metabolize olur. Pirüvik asit, glikolizisde en önemli kilit intermedierdir. Pirüvik asidin ayrışması, bakterilerin türlerine göre aerobik veya anaerobik yolla olur. Glikozun fermentasyonu sonu acetoin ve bunun bir nötral redüksiyon ürünü olan 2,3 - butanediol'da ($\text{CH}_3\text{CHOH.CH}_3$) meydana gelmektedir.

Voges Proskauer testi ile metil red testi, ortamlarının aynı olması nedeniyle birlikte uygulanabilirler. Metil red pozitif olanlarda (organik asit fazla olması nedeniyle), VP reaksiyonu negatif olabilir. Nötral ürünler meydana gelmeyebilir (genel bir kural değil). İlk başlangıçta MR testi pozitif görülebilir. İnkubasyon süresi uzarsa acetoin oluşabilir.

Materyal

- 1) MR/VP besi yeri (Clark-Lubs, pH 6.9,5 ml)
- 2) Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (*E.cloacae*, *K.pneumoniae*) ve negatif (*E.coli*) suşlarının kültürleri
- 4) Alpha-naphthol, 5%, Potassium Hydrooxide, 40%
- 5) Ekilmemiş besi yerleri

Metot

İçinde glikoz bulunan bufferlı besi yerine kültürlerden ekilir ve 37°C de 2-7 gün inkube edilir. Bu sürenin sonunda kültürlerle ve ekilmemiş tüplere ayırdıktan (O'Meara) 1 ml ilave edilerek hafifçe çalkalanır ve su banyosunda (37°C de) 4 saat tutulur. Aralıklı olarak hafifçe çalkalanır.

Değerlendirme

Besiyerinin üstünde 2-5 dakika içinde pembe rengin oluşu, acetoin varlığını ortaya koyduğundan pozitif reaksiyon olarak kabul edilir.

Eğer sarı renk meydana gelirse negatif olarak dikkate alınır. O'Meara testi, ortamda oluşan acetoin'e bağlıdır. Bu madde de, oksijenin bulunduğu durumda alkali ortamda okside olur ve diasetil ($\text{CH}_3\text{CO.CO.CO}_3$) meydana gelir. Bu son madde de, kreatin'le reaksiyona girerek pembe renk meydana getirir.

VP testi ise bir bakterinin glikoz fermentasyonu ile nötral son ürünler meydana getirip getirmediğini saptamak için kullanılır. Pürivik asidin ileri yıkımında organizmalar butilen-glikol yolunu kullandıklarında asetoin (asetil metil karbinol) ve butandiol oluştururlar; bu nötral son ürünler ortam pH'ını yükseltirler ($\text{pH} > 6$). Eğer ortamda asetoin varsa, güçlü bir alkali (%40'lık KOH), α -naftol ve atmosferik oksijen varlığında oksitlenerek „diasetil“e dönüşür ve kırmızı bir kompleks oluşur. VP testinde α -naftol duyarlılığı (renk yoğunluğunu) yükselten bir madde olup ortama KOH'den önce ilave edilmelidir.

Sonuçların değerlendirilmesi/yorumlanması

İndol

- ♣ Pozitif indol testi – Reajen damlatılmasından sonra 20 saniye içinde renk değişimi (benzaldehit reajen ile kırmızı; sinnamaldehit reajen ile mavi)
- ♣ Negatif indol testi – hafif sarı renk oluşması veya renk değişimi olmaması

MR testi

- ♣ Pozitif MR testi – belirgin kırmızı renk oluşumu
- ♣ Negatif MR testi – sarı renk
- ♣ Zayıf MR pozitifliği – kırmızı-turuncu arası renk meydana gelmesi. Turuncu renk görülmüş ise, ayrılmış alikotun 4. güne kadar inkübasyonu ve takiben reaktif damlatılarak yeniden gözlenmesi önerilir. Bu durumda, besiyerinin ikiye bölünerek birinin de 25°C'de inkübe edilmesi daha iyi sonuç verebilir.

VP testi

- ♣ Pozitif VP testi – yüzeyde pembe-kırmızı renk değişikliği
- ♣ Negatif VP testi – renk değişikliğinin olmaması. Bakır rengi görünümü de “negatif” olarak yorumlanmalıdır.
- ♣ Pas rengi zayıf pozitiflik şeklinde değerlendirilir. Ayrılmış alikot 48 saat daha inkübe edildikten sonra reaktifler katılarak yeniden gözlenmesi önerilir.

3.4. Sitrat testi

- ♣ Pozitif sitrat testi – ekim çizgisi boyunca üreme ve belirgin mavi renk oluştuğunun görülmesi
- ♣ Negatif sitrat testi – besiyerinde üreme ve renk değişikliği olmaması; besiyeri yeşil kalır.

Olası sorunlar/kısıtlılıklar

İndol

- ♣ indol testi için koloni seçiminde saf kültürler tercih edilmelidir.
- ♣ İndol testi için kültürler olabildiğince aerobik şartlar sağlanarak inkübe edilmelidir; çünkü oksijen azaldıkça indol üretimi düşer.

MR-VP

- ♣ İnokulum miktarının büyük olmasından kaçınılmalıdır; çünkü canlı organizma sayısı 109 cfu/mL"yi geçerse bakteriyel üreme inhibe olabilir.
- ♣ Eğer MR indikatörü yeterli inkübasyon süresinden daha önce damlatılacak olursa MR-negatif organizmalar için yanlış-pozitif sonuç alınabilir.
- ♣ Uzamış inkübasyonda (>3 gün) bazı VP pozitif organizmalar ortam pH"ını düşürebilirler (asit ortam) ve VP reaksiyonunun zayıf-pozitif veya negatif olmasına neden olabilir.

Sitrat

- ♣ Sitrat agarın yatık yüzeyinde renk değişimi meydana gelmemiş ancak rahat bir üreme gözleniyor ise, test yine pozitifdir. Ancak bir süre daha inkübe edildiği halde agar rengi maviye dönmüyorsa test, inokulum miktarı azaltılarak tekrarlanmalıdır.
- ♣ Arada kalmış durumlarda test tekrarlanmalıdır.
- ♣ Besiyeri taşımamak için sıvı kültürlerden inokülasyon yapılmamalıdır.
- ♣ Plak besiyerinden yapılacak inokülasyonlarda, yanlış pozitif reaksiyonları önlemek için, besiyeri materyali taşımaktan kaçınacak şekilde küçük inokulum kullanılmalıdır.
- ♣ Sitrat besiyerinden elde edilen sonuç tek başına tür düzeyinde tanımlama için yeterli değildir.

Atmosferik O₂ Etkisi

Mikroorganizmalar oksijene olan gereksinme durumlarına göre, aerobik, fakültatif, mikraerofilik, aerotolerant ve anaerobik olmak üzere 5 bölüme ayrılırlar.

Aerob mikroorganizmalar: Aeroblar havanın oksijen oranı olan % 21 oksijen varlığında yaşama yeteneğinde olan türlerdir. Aerobik solunum yaparlar. Aerobik solunum yapan organizmalar, enerjilerini organik ya da inorganik bileşiklerin oksitlenmesinden sağlarlar ve oksitlenen bileşikten gelen elektronlar son basamakta O₂'ne aktarılır. Oksijen son elektron alıcısıdır. Mikroorganizmaların çoğu, özellikle küfler bu gruba girer. Pek çok aerob fakültatif'dir, bunlar uygun besin ya da kültür ortamlarında oksijen olsun veya olmasın yaşayabilirler. Fakültatif aeroblar için oksijen gerekli değildir, ancak oksijen varlığında daha iyi ürerler. Memeli kalın bağırsağında yaşayan E. coli de fakültatif aerobtur.

Anaerob mikroorganizmalar: Moleküler oksijenin olmadığı ortamlarda gelişirler. Bu organizmalar anaerobik solunum yaparlar. Anaerobik solunum yapan organizmalar, enerjilerini organik veya inorganik bileşiklerin oksitlenmesinden sağlarlar, bu sırada açığa çıkan elektronlar en son basamakta oksijen dışındaki bir elektron alıcısına, genelde inorganik bir bileşiğe (nitrat, sülfat, kobondioksit gibi) verilir. İki tip anaerob organizma vardır:

- 1- Oksijeni tolere edebilen, oksijen varlığında yaşayabilenler ancak oksijen varlığında daha iyi gelişmezler.
- 2- 2- Bunların zorunlu ya da kesin (obligat) anaerob olanları ise oksijen varlığında ölürler ve zorunlu anaerob mikroorganizmalar olarak adlandırılırlar. Metan bakterileri zorunlu anaerobtur. Metan bakterileri en son basamakta basamakta elektronları CO₂ 'e aktarırlar ve son ürün olarak metan oluşur.

Zorunlu anaerob mikroorganizmalar: oksijen bunlara zehir etkisi yapar. Moleküler oksijenin olmadığı ortamlarda gelişirler. Clostridium cinsindeki bakteriler zorunlu anaerobdur. Zorunlu anaeroblarda anaerob koşullar mikroorganizma üretimi sırasında sağlanmalıdır.

Besiyerlerinin O₂ durumu üretilecek mikroorganizmaya göre ayarlanmalıdır. Aerobik kültürlerde O₂ havadan sağlanır. Bunun için çalkamalı inkübatörler kullanılır. Bazen oksijen ortama oksijen tüpleri ya da akvaryum pompasından hava basarak verilebilir. O₂ istemeyen yani anaerob olan mikroorganizmaların üretiminde ise besiyerinin atmosferik O₂ ile ilişkisi kesilmelidir. Bunun için besiyerine Na-tiyoglikolat gibi indirgen maddeler katılabilir, bu maddeler ortamdaki oksijeni suya indirgerler. Agarların üzeri parafin gibi O₂ girişini engelleyecek maddelerle örtülebilir. H₂ veya azot gazı verilebilir.

Fakültatif aerob durumunda ise; hem havalı hemde havasız şartlarda gelişirler dolayısıyla ortama özel olarak hava vermeye ya da çalkalamaya gerek yoktur. Besi ortamında çözünmüş olan O₂ bunlar için yeterli olacaktır.

- İçerisinde Na-tioglikolat buluna besiyerine ekim işlemi gerçekleştirilir.
- Ekim işlemi sonunda mikroorganizma gelişimi kontrol edilir ve oksijen ihtiyacına göre mikroorganizmanın sınıfı belirlenir.

Antibiyogram ve MIC

Antibiyotik, bakterileri inhibe eden veya öldüren doğal olarak bulunan maddedir.

Antibakteriyel, bakterileri inhibe eden doğal, semi-sentetik veya sentetik olarak bulunan maddedir.

Antimikrobiyal, mikroorganizmaları inhibe eden doğal, semi- sentetik veya sentetik olarak bulunan maddedir.

Kemoterapi, ilaçların bir hastalığın tedavisinde kullanılması

Seçici toksisite İlaç mikroorganizmayı insanlarda oluşturacağı toksik etkilerden daha düşük bir düzeyde etkilemelidir.

Bakteriyostatik Bakteri hücrelerinin gelişmesinin ve üremesinin durdurulmasıdır. Bakteriyostatik etki gücünün göstergesi minimum inhibitör konsantrasyondur [MİK].

Bakterisidal Bakteri hücrelerinin direkt olarak öldürülüp yok edilmesidir. Bakterisid etki gücünün göstergesi minumum bakterisid konsantrasyondur [MBK].

Antibiyotik duyarlılık testleri içinden en sık kullanılanlar;

1. Disk difüzyon testleri

2. Dilüsyon testleri

A. Agar dilüsyon testleri (katı by.de sulandırım testi)

B. Broth dilüsyon testleri

a. Makrodilüsyon (tüp dilüsyon) yöntemi

b. Mikrodilüsyon testleri

3.Gradient strip testleri(E-test,MICE)

4.Otomatize yöntemler

5.Moleküler yöntemler

Mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı çok değişik şekilde duyarlılık gösterirler. Bu durum, hem antibiyotiklerin yapısına ve hem de mikroorganizmaların türüne göre değişebilir. Bu bakımdan gerek koruyucu amaçla ve gerekse en önemlisi sağaltım için kullanılacak antimikrobial ilaçların spesifik hastalık etkenine karşı olan statik ve/veya sidal etkisinin çok iyi belirlenmesi ve böyle bir ilacın seçilerek yeterli sürede ve dozda bir program dahilinde kullanılması gereklidir. Hatta, bazen bu da yeterli olmayabilir. Çünkü, tedavi sırasında antimikrobial ilaçlara karşı hastalık ajanlarının duyarlılığında değişimler olmakta ve ilaçlar yetersiz kalmaktadır. Böyle durumlarda nüks'ler oluşmakta ve enfeksiyonun prognozu değişik yöne kaymaktadır. Bazen de, enfeksiyonlardan primer etken yerine sekonder mikroorganizmalar izole edilmektedir. Böyle hallerde, hastalığın

esas etkenine karşı değil de sekonder ajanın duyarlılığına göre seçilmiş antibiyotikler kullanılmaktadır. Bunların da bir yararı olmamaktadır.

Bazen de spesifik etkenin izolasyonu ve identifikasyonu imkansız olabilir. Bu takdirde çok zaman klinik belirtilere, anamneze ve diğer muayenelere dayanılarak yapılan bir teşhis için, geniş spektrumlu bir antibiyotik denenebilir. Eğer, etkenin izolasyon ve identifikasyonu yapıp antibiyogramı yapıldığında, o zaman ya aynı antibiyotiğe devam edilir veya değişiklik yapılabilir.

Bütün bu tür olguları göz önüne alarak spesifik etkene yönelik en etkili (sidal) antibiyotiğin seçilmesi ve kullanılması gereklidir.

Diğer önemli nokta da, duyarlılık testlerinde mikroorganizma ile antimikrobiyal ilaç direk temasa gelmekte ve buna göre duyarlılık belirlenmektedir. Halbuki, aynı ilaç vücuda verildiğinde aynı konsantrasyon her zaman sağlanamamakta, ilacın etkinliği çeşitli nedenlerle azalmakta veya vücuttan çabuk atılmaktadır. Bazen de, kapsüllü olan veya irin içinde, nekrotik dokularda, lezyonlarda, vs. bulunan etkenlere, ilacın ulaşması ve etkinliği çok az olmakta ve sidal etki meydana gelmemektedir.

Mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılığın saptanmasında genellikle disk diffüzyon yöntemi kullanılır.

1. Antibiyogram deneyinde besiyeri yüzeyine ilgili antibiyotik yayma ekim ile ekilir.
2. Ekim sonrası denemek üzere seçilen antibiyotik emdirilmiş diskler besiyerine üzerine belli aralıklarla yerleştirilir.
3. Petri inkübasyona bırakılır.
4. İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik disklerinin etrafında zon oluşumu ve oluşmuşsa kaç cm olduğu belirlenir.
5. Antibiyotikler için konsantrasyonlara özgü dirençlilik-duyarlılık değerleri ile ilgili sonuçlar karşılaştırılır.

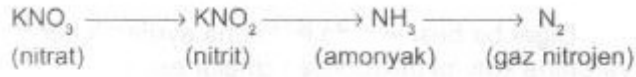
Tüp dilusyon tekniği: Bu teknik antimikrobial ilaçların MİK (minimal inhibitör konsantrasyonunu) ve MLK (minimal letal konsantrasyonlu) değerlerini belirlemede yardımcı olur. Bu amaçla, Mueller-Hinton buyyonunda antimikrobial ilacın 2 veya 10 katlı dilusyonları yapılarak gittikçe azalan yoğunlukta ilaç içeren dilusyonları elde edilir. Örn. ilaç 1 ml'de 256 µg'dan başlayarak, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12 µg/ml giderek azalan şekilde iki katlı sulandırılır. Üzerlerine, izole edilen test mikroorganizmanın 24-48 saatlik sıvı besiyeri kültüründen 0.1 ml. miktarında ekilir ve iyice karıştırıldıktan sonra 24-48 saat 37 °C' de inkube edilir. Tüplerdeki üreme gözle değerlendirilir. Böylece üremenin olmadığı son dilusyon MİK değeri olarak kabul edilir. Ancak, bu noktanın kesin olması için, testin ikili paralel yapılması uygundur. Eğer, süre yetersiz ise uygun bir süre yine inkubasyonda tutulabilir.

Üremenin olmadığı bu son dilusyondan alınan 0.1 ml. miktarındaki inokulum 10 ml sıvıbesiyerine (veya agara) ekilerek uygun bir süre inkubasyonda tutulur. Tüpte üremenin olmaması MLK değerini, eğer tüpte üreme varsa MİK değerini yansıtır. Agarda

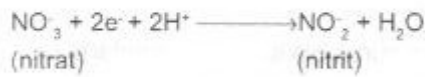
ya bazı koloniler meydana gelecek veya hiç koloni oluşmayacaktır. Koloni oluşursa MİK değerini, oluşmazsa MLK değerini belirler. Ancak, antibiyotik, inokulum ile birlikte agar yüzeyine aktarılacağından etkisi devam edebilir ve koloni oluşmayabilir. Bu nedenle broth kültürü daha uygundur.

Nitrat Hidrolizi

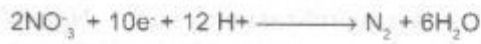
Bu test, mikroorganizmaların nitratları redükte edebilme yeteneğini belirlemede kullanılır. Bazı bakteriler nitratları (NO₃) redükte ederek nitritlere (NO₂) ve hatta daha ileri basamaklara (amonyak (NH₃) ve gaz nitrojen (N₂) kadar ayrıştırabilmektedir (denitrifikasyon). Olay genellikle anaerobik koşullarda ve redüktase enzimlerinin katalitik etkisiyle sürdürülür.



Nitratların nitritlere redüksiyonu:



Nitritlerin moleküler nitrojene ayrışması:



Test, mikropların türlerini ayırt etmede büyük yardımcı olur. *Enterobacteriaceae* familyası genellikle pozitif reaksiyon verir. Nitratların ayrışması sonu oluşan ürünler mikropların karakterine göre değişebilir. Her ne kadar gaz nitrojen meydana gelirse de bunun yanı sıra nitrik oksidi (NO) ve nitrös oksid (N₂O) veya hidroksilamin (R.NH.OH) de teşekkül edebilir. Bu maddeler hücre içinde metabolize edilerek protein ve nukleik asit yapımında yapıtaşı olarak kullanılırlar.

Materyal

- İçinde Durham tüpleri bulunan nitratlı (KNO₃, % 0.1) sıvı besi yerleri (pH 7.0, 5 ml) gerektiğinde yarı katı besi yeri.
- Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- Kontrol pozitif (*S. gallinarum*) ve negatif (*H. vaginalis*, veya *Acinetobacter anitratus*) kültürleri.
- Griess-Ilosvay ayırıcı (taze hazırlanmış) (alfa naftilamin % 0.5 (A) + sulfanilik asit %0.8 (B)).
- Ekilmemiş sıvı besi yerleri.

Metot

Üremiş mikroorganizmalarından nitratlı sıvı besi yerlerine ekim yapıldıktan sonra tüpleri 37°C de 1-5 gün inkubasyona bırakılır. Durham tüpleri içinde gazın oluşumuna dikkat edilir. Tüplere Griess-Ilosvay ayıraçlarından (A+B) 5'er damla konur.

Değerlendirme

- 1) Tüplerde gaz oluşumu (N_2) denitrifikasyonu gösterir ve pozitif olarak kabul edilebilir (eğer bakteriler fermenter değilse). Ancak, böyle tüplere Griess-Illosvay ayırıcından A ve B solusyonlarından 5'er damla damlatıldıktan sonra hafifçe çalkalanır. Bir iki dakika içinde kırmızı rengin meydana gelmesi de nitratların nitritlere kadar redükte olduğunu ifade eder (pozitif reaksiyon).
- 2) Tüplerde gaz yoksa, yine ayıraç damlatılır. Bir iki dakika içinde kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif olarak kabul edilir.
- 3) Eğer, sonuç negatif (hiç reaksiyon oluşmazsa) olarak görülürse, ya nitratlar hiç ayrışmamıştır veya nitratların ayrışması nitrit safhasından da öteye (amonyak veya gaz nitrojene ulaşmış olabilir. Bu durumda, ayıraçlar konmuş olan tüplere çok az miktarda toz çinko (15-20 mg) katılır. Eğer, çinko ilavesi sonu kırmızı renk meydana gelirse (nitrat nitrite redükte olmuştur). Sonuç negatif olarak değerlendirilir. Eğer kırmızı renk oluşmazsa, bu durum, nitratların nitritten de daha öteki safhalara redükte olduğunu ifade eder (pozitif reaksiyon). Amonyak oluşumu de Nessler ayırıcı ile ortaya konabilir.

Dikkat edilecek noktalar

- 1) Bazı mikroorganizmalar fermentasyon sonu tüpler içinde gaz (hidrojen) meydana getirebilir. Bu durum karşısında bakterinin karakterini iyi bilmek gerekir. Eğer tüpte gaz oluşmuşsa ve mikroorganizma fermentasyon oluşturan türden değilse, gazın nitrojen (N_2) olma olasılığı büyüktür ve ayırıcı koymaya gerek olmayabilir. Ancak, bakteri fermenter türden ise ayıraçları kullanmak zorunludur.
- 2) Bazı araştırmacılar ayrı katı ortamların daha iyi sonuç verdiğini bildirmektedirler. Gerekirse içinde % 0.02 - 0.04 agar ve % 0.1 KNO_3 bulunan yarı katı besiyeri de denenebilir.
- 3) Ayıraçlar taze hazırlanmaları ve iyi çalıştıkları kontrol edilmelidir. A-reagenti buzdolabında ve buna karşın b-reagenti ise oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir.
- 4) Alfa naftil amin karsinogenik etkiye sahip olduğundan dikkatlice kullanılmalıdır (pamuklu pipetle ve ağızdan çekilerek kullanılmaz).

Üreaz Testi

Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden ürease enzimini saptamak amacıyla yapılır. Ürease hidrolizasyon testi bakterilerin cins ve türlerini tayinde işe yarar. Üre, karbonik asit'in bir diamid'idir. Bütün amidler de kolayca hidrolize olurlar. Ürenin hidrolizasyonu da spesifik bir enzim olan ürease tarafından katalize edilir. Reaksiyonun sonunda 2 molekül amonyak ve karbondioksit meydana gelir.

Ürease aktivitesi için optimal pH 7.0 dir. Besiyerinde amonyak meydana gelmesi pH'nın yükselmesine neden olur. Amonyağın meydana geldiği de indikatör boya ve Nessler ayırıcı ile ortaya konur. Ürease testi için bazı yöntemler (Christensen, Stuart, vs.) geliştirilmiştir. Bunların seçimi araştırmacıya bağlıdır. Aşağıda Christensen Metodu bildirilmiştir.

Materyal

- Christensen'in üreli agarı (tüp veya petri kutusunda) veya üreli broth
- Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- Kontrol mikroorganizmalar. *P. vulgaris* (+) ve *E. coli* (-)

Metot

Petri kutusu üzerine fazla miktarda mikroorganizma ekildikten sonra 37°C de 1-5 gün bırakılır. Her gün kontrol edilen kültürlerde (kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif reaksiyon) renk değişmelerine dikkat edilir. Bazı durumlarda renk değişikliği 5-6 saat içinde meydana gelebilir.

Değerlendirme

Kültürde kırmızı rengin meydana gelmesi (amonyak oluşumu nedeniyle pH'nın yükselmesi sonu indikatörün renginin ortaya çıkması) pozitif reaksiyon olarak ve hiçbir değişikliğin olmaması de negatif olarak değerlendirilir.

Jelatin Hidrolizasyon Testi

Bu test, mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinase enzim sentez yeteneğini ölçmede kullanılır. Bakterilerin identifikasyonunda işe yarar. Jelatin protein karakterinde bir madde olup kollagenin hidrolizasyonundan elde edilir.

Büyük molekülü olduğundan bakteri hücre duvarından geçemez. Bu nedenle daha küçük moleküllere katalize edilir. Bu görevi de ekstra sellüler bir enzim olan jelatinase yapar. Jelatinase tarafından proteinlerin katabolizması iki aşamalıdır.

Uzun süre yüksek ısıda bulunan jelatin kısmen hidrolize olur ve katılaşma özelliğini kaybeder.

Materyal

Jelatinin hidrolizasyonunu saptamak için bir çok besi yerleri geliştirilmiştir. Bunlardan basit olanı tüplerde uygulanmaktadır.

- İçinde % 10 oranında jelatin bulunan broth (5 ml tüplerde).
- Denenecek mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri.
- Kontrol pozitif (*S. aureus*) ve negatif (*A. hydrophila*) mikroorganizma kültürleri.

Metot

Mikroorganizma kültürlerinde değdirilmiş olan iğne, dik olarak jelatinli besi yerlerine daldırılır (yeterince ekim yapılmalıdır). Tüpler 37°C de 15 gün kadar inkube edilir. Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buz dolabı sıcaklığında 1-2 saat bırakılır. Erimenin olup olmadığına dikkat edilir. Bu besi yerinde mikroorganizmalar iyi üremez ise diğer testler denenebilir (Frazier jelatin agar besi yeri).

Değerlendirme

Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda, buzdolabından çıkarılınca, jelatinli ortamın sıvı halinde ve katılaşmadığı görülür (pozitif jelatin hidrolizasyonu). Negatif durumlarda tüpteki sıvı jelatinli besi yeri katılaşır.

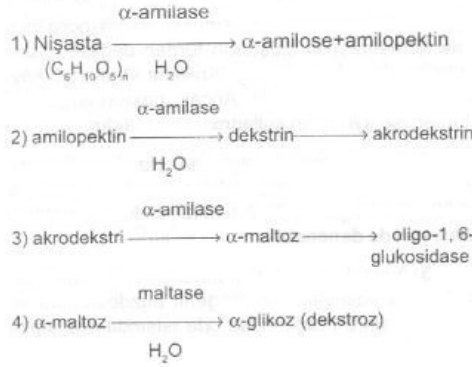
Dikkat edilecek noktalar

- ❖ İçinde % 12-14 jelatin bulunan broth oda sıcaklığında katı olmasına karşın 37°C de sıvı haline dönüşür. Bu nedenle, değerlendirmeyi buzdolabında tutulduktan sonra yapmak gerekir.
- ❖ Kontrol tüpler çok önemlidir. Bunlara bakarak karar verilmelidir.
- ❖ Kontrol mikroorganizmaların özellikle pozitif olan aktivitesi fazla olmalıdır.
- ❖ Jelatin kültürleri çalkalanmamalıdır. Çünkü bazı mikroorganizmalar yüzeyde üreyip hidrolizasyonu burada yapabilirler.
- ❖ Besi yerindeki jelatinin de iyi kalitede olması ve iyi hazırlanması gerekir. Fazla ısı, aktivitesini bozar ve yanlış sonuçlara götürür.
- ❖ Bazı bakterilerin (*stafilokok*, *salmonella*, *serratia*) jelatinase aktivitesi için kalsiyum tuzlarına ihtiyaç vardır. Bu nedenle ortama 0.01 M $CaCl_2$ katılabilir.

- ❖ Mezofilik bakterilerin bir kısmı 22° - 25°C de üremektedirler. Bu durum dikkate alınmalıdır.
- ❖ Bazı mikroorganizmalarda % 12-15 jelatinin üreme üzerine olumsuz etkisi olabilmektedir. Bu nedenle test değişikliği yapılmalıdır. Bu takdirde % 0.4 oranında jelatin içeren agar besi yeri kullanılmalıdır (Fraziler jelatin agar besi yeri).

Nişasta Hidrolizasyon Testi

Bu test, bir homopolisakkarid olan nişastanın, bazı mikroorganizmalarca sentezlenen ekstrasellüler amilase enzimi tarafından hidrolizasyonunu ortaya koymak amacı ile yapılır. Ayrıca bu test bakteri cins ve türlerinin belirlenmesinde de yardımcı olur. Nişastanın glikoz'a kadar olan ayrışma aşamaları yanda gösterilmiştir.



Materyal

- Petri kutularında hazırlanmış nişastalı agar besiyerleri
- Denenecek mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- Kontrol mikroorganizmalar [(E. coli (-) ve B. subtilis (+)]
- Lugol solusyonu veya % 95 etanol
- Test, agar üzerinde olduğu gibi, sıvı kültürler (nişastalı buyyon) içinde de yapılabilir.

Metot

- 1) Nişasta hidrolizasyon aktivitesi ölçülecek mikroorganizmadan nişastalı agar üzerine çizgi tarzında ekimler yapılır ve 37°C de 2-5 gün inkube edilirler.
- 2) Diğer bir besiyeri de iki kısma ayrılarak her bir yarımına kontrol mikroorganizmalar ekilir.

Değerlendirme

- 1) İnkubasyon süresinin sonunda agarların üzeri lugol solusyonu ile kaplanır. Pozitif reaksiyonlarda, koloni etrafında renksiz bir halka oluşur (alfa-amilase enziminin nişastayı hidrolizasyonu sonucu). Negatif durumlarda besiyeri mavi renkte görülür. Koloni etrafındaki oluşan pembe-esmer bölge şüpheli reaksiyonu ifade eder. Reaksiyon 5 dakika içinde okunmalıdır.
- 2) Petri kutuları üzerine lugol solusyonu yerine 8-10 ml % 95 etanol'de konulabilir. Nişastanın hidrolizasyonu halinde koloni etrafında açık alan meydana gelir (pozitif amilase). Negatif durumlarda bu alan süt beyazı görünümündedir. Reaksiyon 30 dakika içinde okunur. Her iki yöntemde de lugol ve etanol döküldükten sonra değerlendirme yapılır.

Dikkat edilecek noktalar:

- ❖ Nişastalı katı veya sıvı besi yerleri çok fazla ısıtılmamalıdır.
- ❖ Besi yerleri nötr (pH 7.2) olmalıdır.
- ❖ Nişastalı besi yerleri taze oldukları zaman daha belirgin ve çabuk sonuç verirler. Eski besi yerleri ise opaklaşır ve yanlış değerlendirmelere yol açar.
- ❖ Besi yerlerinde, alfa -amilase aktivitesi için klorid iyonları bulunması gereklidir. Bu nedenle klorid iyonlarının en az 0.01 M konsantrasyonunda olması gereklidir.
- ❖ Besi yerlerinin buzdolabında bulunması ve muhafazası opaklaşmaya yol açar.
- ❖ Testte kullanılan lugol solusyonu 1/5 sulandırılarak kullanılır. Saf lugol yanlış negatif sonuçlara yol açar.
- ❖ Lugol solusyonu besi yeri üzerinde 5 dakika (etanol 30 dakika) tutulduktan sonra dökülür ve değerlendirme yapılır.

Kazein Hidrolizasyon Testi

Bu test, sütün proteinini oluşturan ve kolloidal karakterde bulunan kazeinin, bakterilerce sentezlenen, proteolitik ve ekstrasellüler bir enzim olan protease tarafından hidrolize edilebilme durumunu saptamak için kullanılır. Mikroorganizmaların türlerinin identifikasyonunda işe yarar.

Materyal

- ❖ İçinde % 10 yağsız süt bulunan agar (sütlü agar)
- ❖ Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- ❖ Kontrol pozitif (B. subtilis) ve negatif (E. coli) mikroorganizma kültürleri
- ❖ Ekilmemiş besi yeri
- ❖ Gerekğinde sütlü sıvı besi yeri de kullanılabilir.

Metot

Sütlü agar besi yerine çizgi tarzında mikroorganizmalar ekilir ve petri kutusu 37°C de 2-14 gün kadar inkubasyona bırakılır. Petri kutuları her gün, kontrollerle karşılaştırılarak, muayene edilirler.

Değerlendirme

Süre sonunda koloniler etrafında oluşan açık alan, sütteki kazeinin hidrolize olduğunu ifade eder (pozitif reaksiyon). Negatif durumlarda koloni etrafında hafif opaklaşma görülür.

Dikkat edilecek noktalar

- ❖ Sonucu iyi değerlendirmek için Petri kutuları siyah bir zemin üzerine konulur.
- ❖ Sütte bulunan laktozu fermente eden mikroorganizmalar asit oluşturmaları nedeniyle süt proteininde değişimler meydana getirebilir ve açılmalara yol açabilir. Bunu anlamak için, petri kutusuna % 1 HCl veya % 1 Cıva klorür solusyonundan konur. Eğer açılan sahaların rengi kaybolursa, kazein hidrolize olmamıştır.

Sularda Koliform Tayini

Çoklu tüp fermentasyon 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 fermentasyon 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 fermentasyon tüplerine konulması ve bu tüplerde 48±3 saat içinde gaz oluşumunun incelenmesidir. Eğer fermentasyon sonucu gaz oluşursa, üreme ortamı bulanık hale gelir. Aktif fermentasyon, 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

Fermentasyon 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 fermentasyon tüplerinde üreme ve gaz oluşumunun varlığı kontrol edilir. 24 saatlik inkübasyon sonunda, ortamda bir gaz oluşumu varsa, doğrulama testi pozitiftir; 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 fermentasyon 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 fermantasyon 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.