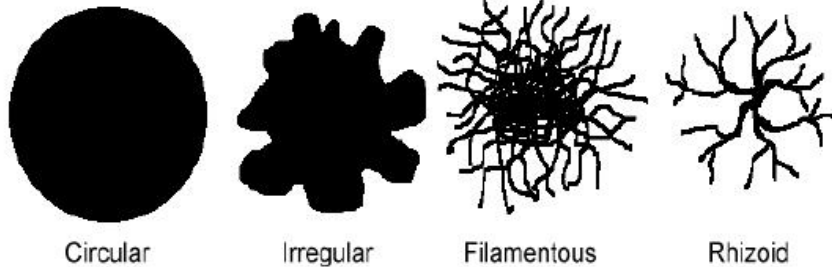


Bazı Önemli Biyokimyasal Mikrobiyolojik Testler

KOLONİ MORFOLOJİSİ

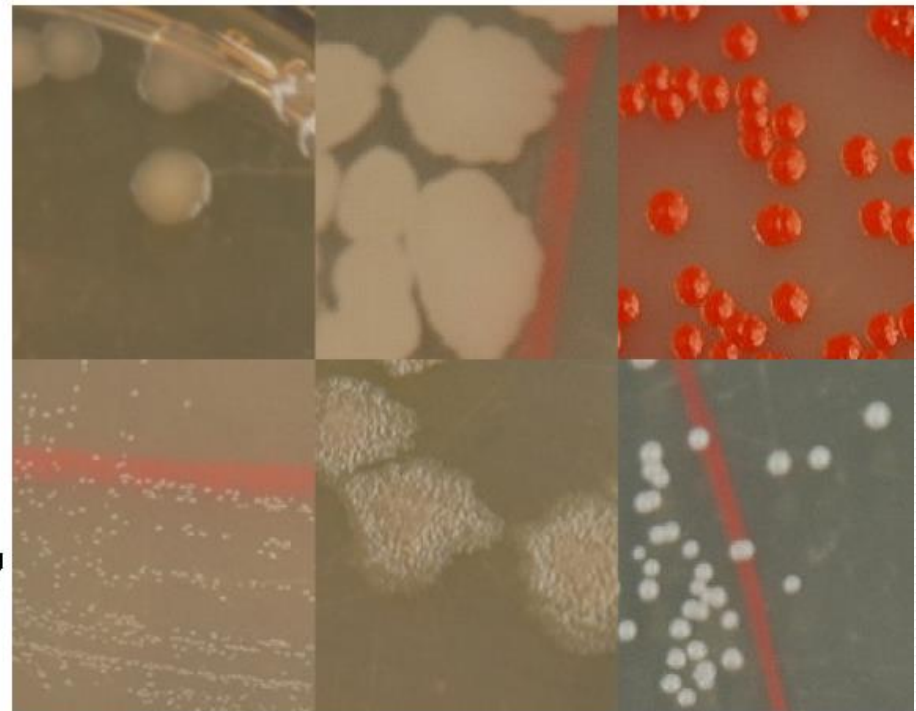
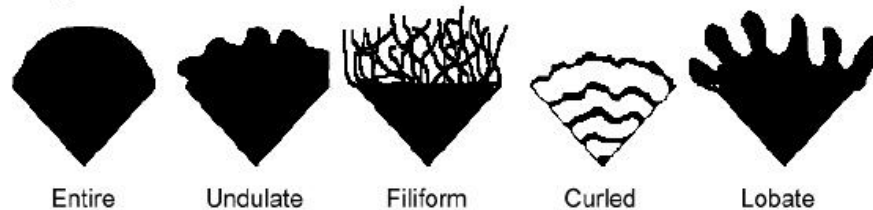
Form



Elevation



Margin



Hemoliz testi:

- Testin anlamı bakterinin hemolitik aktivitesinin varlığının tespitidir. Bu test, aksi belirtilmemişse koyun kanını esas alır.
- Anaeroplara için at veya tavşan kanı kullanılması istenebilir. Kanlı agarda üreyen bakteri kolonilerinin çevresinde eritrositlerin parçalanarak, bir zon oluşması olarak tanımlanır. Eritrositlerin parçalanması haemolysin enzimi ile olur

- Bu test esas itibarı ile bakterinin bu enzimi yapıp yapmadığının tespiti. Hemolizin'ler O ve S olmak üzere iki farklı şekilde bulunabilirler.
- S (Surface) tipindeki hemolizinler agar yüzeyinde, O tipindeki hemolizinler ise agarın derinliklerinde hemoliz yaparlar. Oksijensiz ortamda hemoliz zonu genişler. Pozitif kontrol için *Bacillus cereus* veya A grubu streptokok, negatif kontrol için *S. epidermidis* kullanılabilir.

- A) Beta hemolitik streptokoklar: Kanlı agar plaklarında üretildikleri zaman kolonilerin etrafında eritrositlerin tam olarak erimesine bağlı olarak şeffaf zonlar oluşur bu durumda Beta hemolitik streptokok denir.
- B) Alfa hemolitik streptokoklar: Kanlı agar plaklarında üretildikleri zaman kolonilerin etrafında eritrositlerin tam olarak eritilmemesi sonucu yeşil plaklar oluşur. Bu durumda alfa hemolitik streptokok denir.

- C) Gamma Hemolitik: non hemolitik: Kanlı agarda herhangi bir hemoliz oluşturmeyen streptokoklara denir.



ASM MicrobeLibrary.org © Hanson



Katalaz testi:

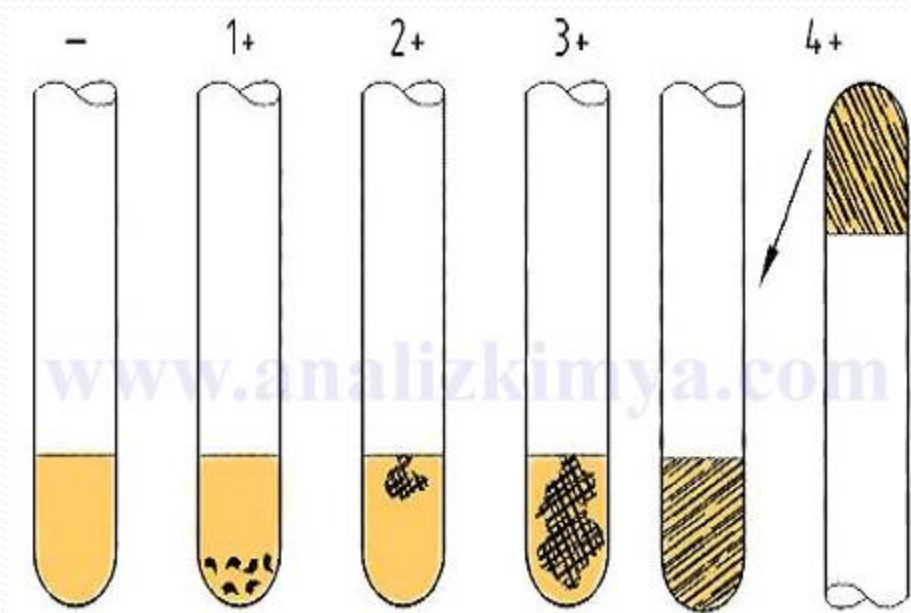
- Genellikle aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmaların sahip olduğu katalaz enzimi, ortamdaki hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırır.
- Sıvı veya katı besiyerinde geliştirilen bakteri kültürüne H_2O_2 ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenebilmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını, dolayısıyla katalaz enziminin varlığını gösterir.
- Tüp veya Petri kutusundaki agarlı kültür yüzeyine 1 ml %3'lük H_2O_2 ilave edilerek gaz çıkışı olup olmadığı incelenir. Hava kabarcıklarının çıkışı testin pozitif olduğunu gösterir.

Koagülaz (Coagulase) testi:

- Koagülaz'lar, sitratlı veya okzalatlı plazmayı koagüle edebilen birbirinden çok farklı iki tane bakteri enzimidir.
- 1) Ortama salınan serbest koagülaz: Kültür filtratlarına geçer, tüp testi gerektirir.
- 2) Hücre duvarına bağlı koagülaz (clumping faktör): Kültür filtratlarında bulunmaz. Lam testi yeterlidir.
- Koagülazların tespiti bilhassa *Staphylococcus aureus*'un ve *Yersinia pestis*'in kendi genusunun diğer üyelerinden ayırımına yardımcı olur. İncelenecek bakteri lamda ve tüpte tavşan plazması ile muamele edilip plazmada koagülasyon aranır.

-
- a) Bağlı koagülaz'ın tesbiti (Lam Test): İncelenecek bakteri kolonisi, lam üzerinde iki ayrı yerde ezilir, bir tanesi üzerine 1 damla izotonik tuzlu su, diğerine plazma ilave edilir. Mukayeseli olarak göz ve mikroskopla aglütinasyon aranır. 5 saniye içerisinde koagülasyon oluşumu pozitif reaksiyonu gösterir. 2 dakika içerisinde oluşmamış ise test sonucu negatiftir.

- b) Serbest koagülazın tesbiti (Tüp Test): İncelenecek bakterinin 18-24 saatlik buyyon kültüründen 1 ml taze plazma üzerine eklenip 1 saat aralıklarla koagülasyon aranır, bulunamaz ise 18 saat oda ısısında bırakılarak tekrar okunmalıdır. Tüp incelenirken hafifçe eğilmeli ancak çalkalanmamalıdır. Plazmada koagülasyon görülmesi pozitif sonuçtur. Thiomersal kullanan bireylerin plazması kullanıldığında koagülasyonu engeller, heparin engellemez. Plazma içerisine 0.5 ml 5% kalsiyum klorit eklenmesi veya şeker hastalarının plazmasının kullanılması bu testi daha duyarlı ve güvenli yapar.

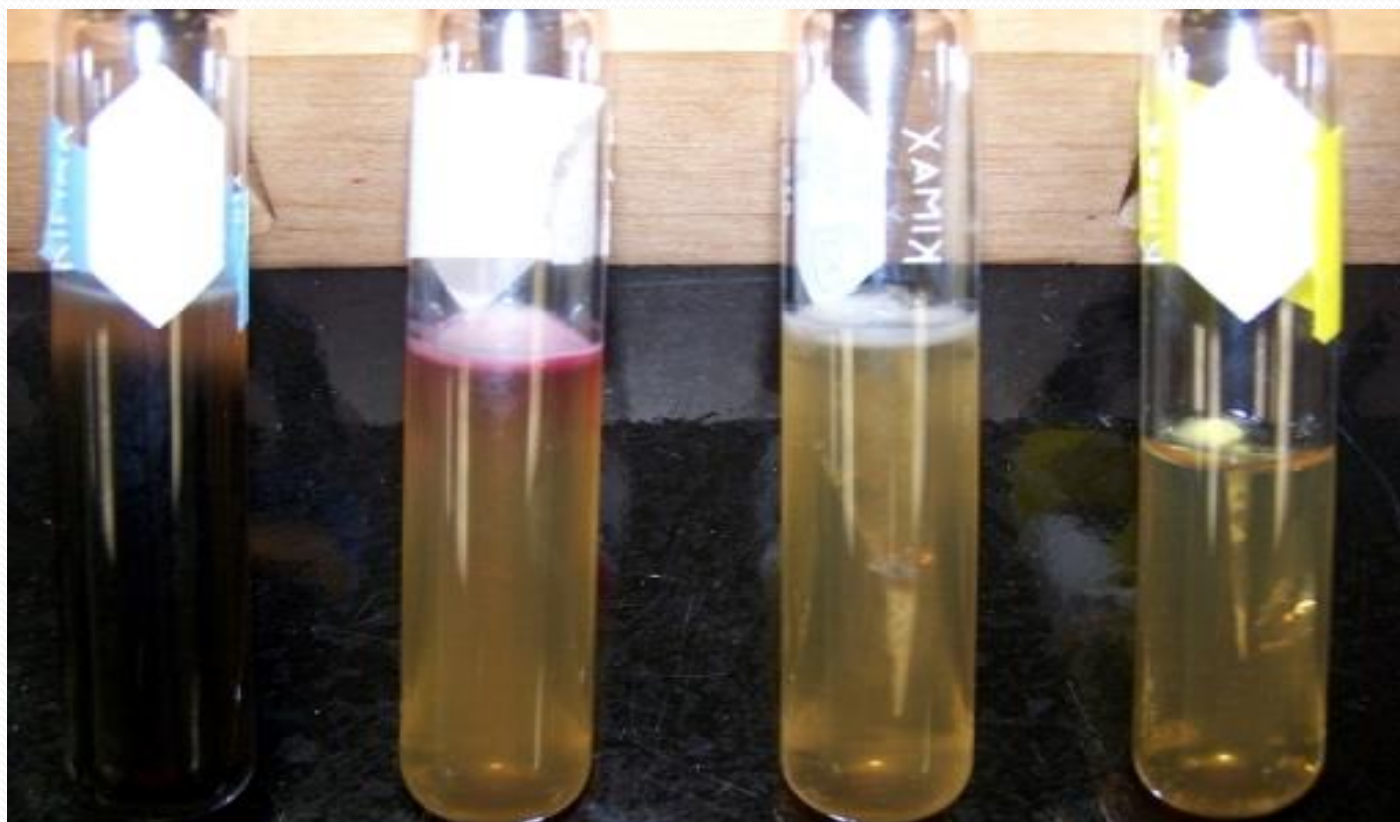


Sitrat kullanımı :

- Sodium citrate bir sitrik asit tuzudur ve trikarboksilik asit siklusu (Tricarboxylic Acid Cycle, TCA, Krebs' cycle) içerisinde bir metabolit olarak yer alır. Bazı bakteriler karbonhidratların dışında bu metaboliti de bir enerji ve karbon kaynağı olarak kullanabilirler. Bu test yapılırken bakteri örneği protein ve karbonhidratlardan yoksun bir ortama ekilerek sitratı kullanmaya zorlanır.



- Eğer bakteri sitratı kullanabilirse bazik ürünler açığa çıkarır. Çünkü besiyeri içerisinde sitrata bağlı olarak bulunan katyonlar, sitrat ayrılınca amonyağa, amonyuma (NH_4^+) ve amonyum hidroksit'e (NH_4OH) dönüşür. Oluşan alkali ortamda bulunan bromtimol mavisi pH indikatörü olarak baz oluşumunu gösterir. Denenecek bakterinin saf kültüründen bir koloni Simmon's Sitrat agar'a (veya Koser's sitrat agarına) ekilir, optimal süreden biraz daha uzun bir süre inkübe edilir. Üreme ve mavi renk aranır.



Enterik bakteriler

Üreaz Pozitif Bakteriler:

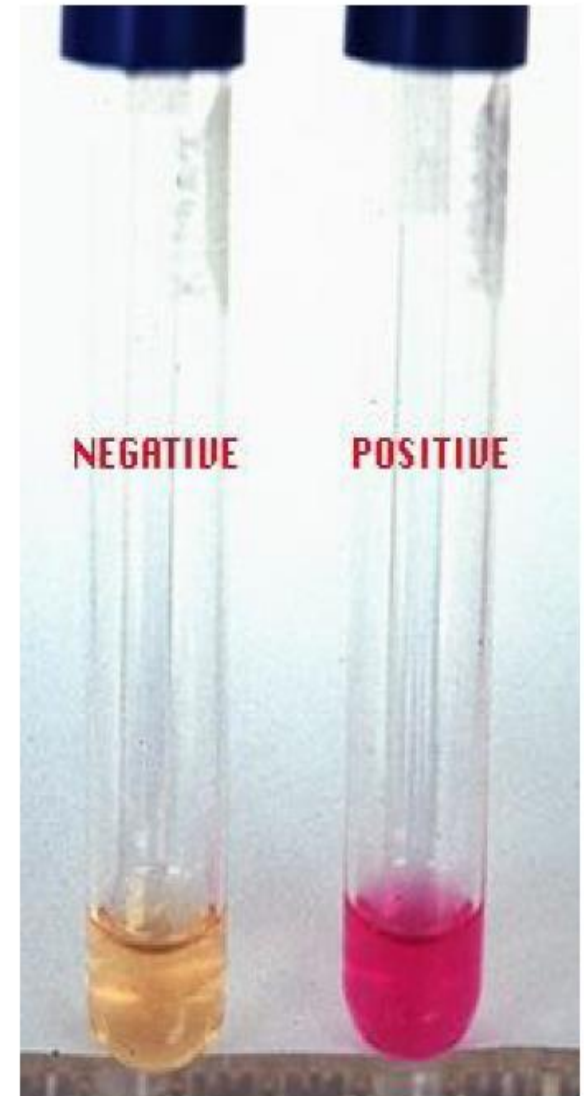
Proteus spp.

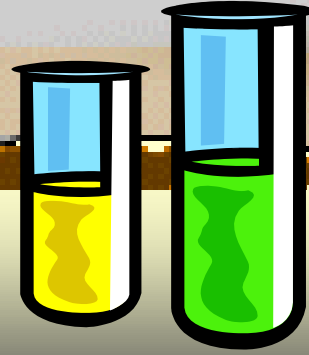
Morganella morganii

Providencia spp.

Klebsiella spp.

Citrobacter spp.





Biyokimyasal Testler

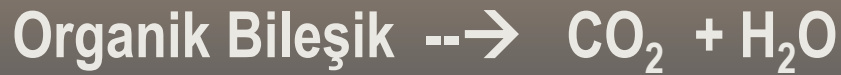


Tests To Know

- ➔ Indole
- ➔ Methyl Red/Voges Proskauer
- ➔ Citrate
- ➔ H₂S production in SIM
- ➔ Urea hydrolysis
- ➔ Motility
- ➔ Lactose fermentation
- ➔ Sucrose fermentation
- ➔ Glucose fermentation & gas production
- ➔ Triple Sugar Iron
- ➔ Nitrate Reduction Test
- ➔ Oxidase
- ➔ Thioglycollate



⇒ **Aerobik Solunum**



⇒ **Anerobik Solunum**



⇒ **Fermentasyon**



Oksidasyon Redüksiyon



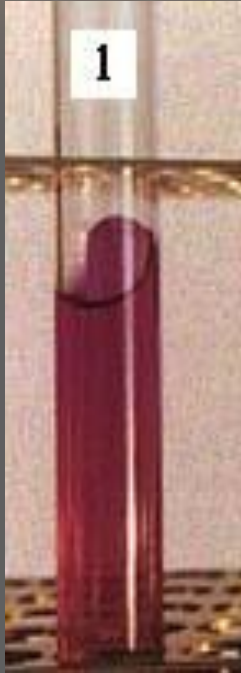
FERMENTASYON TESTİ

Bakteri + Karbohidrat -----> **Organik Asit + Gaz**

↓ ↓
pH İndikatörü Durham tüpü



Şeker Fermentasyon Testi



Negative for sugar fermentation.



Positive for sugar fermentation with acid production only.



Positive for sugar fermentation with acid production and gas production.

IMVIC TESTLERİ

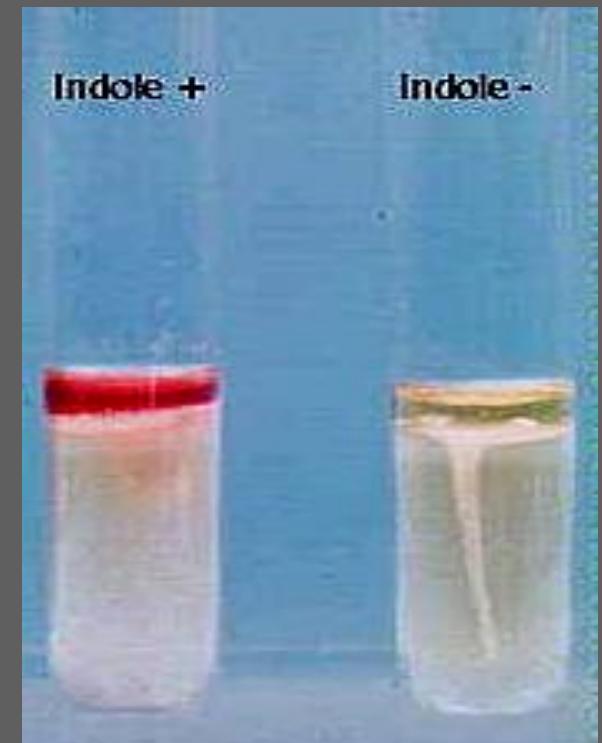
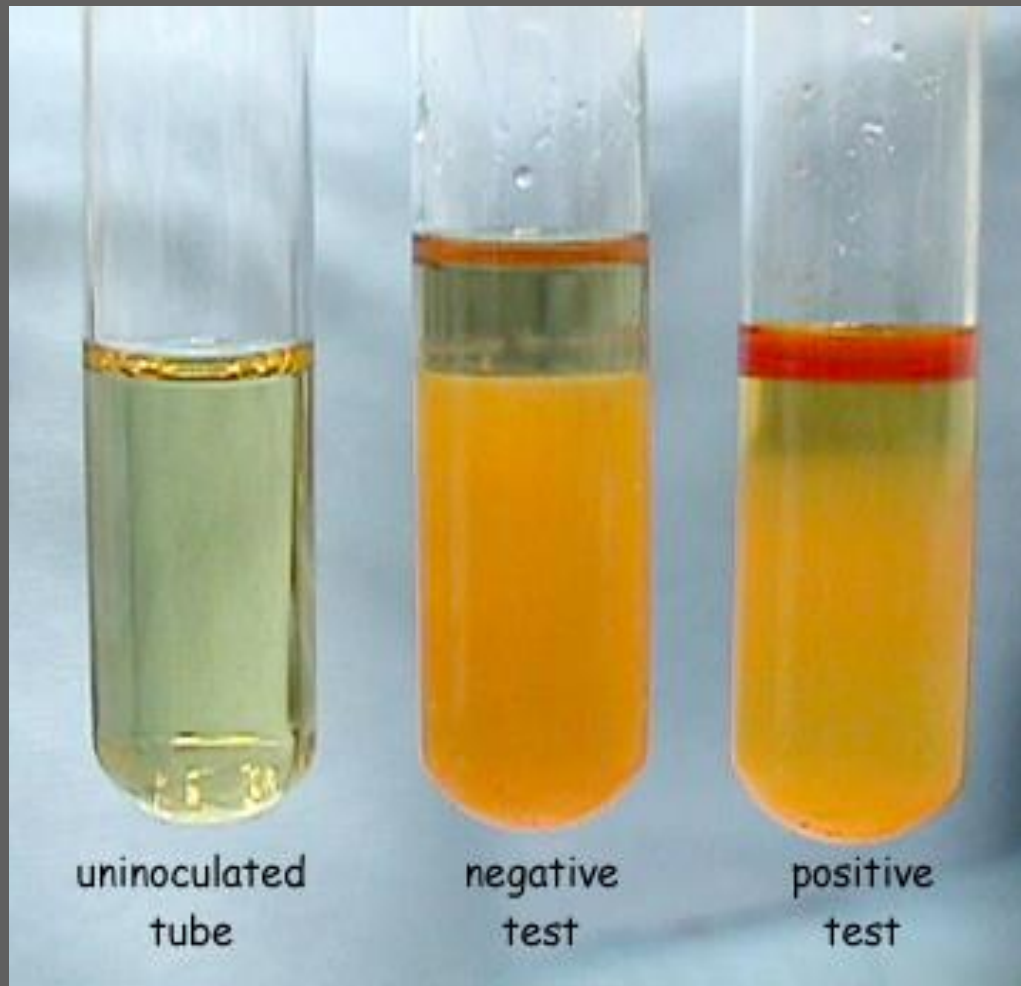
- ⇒ Koliform Grubu bakterilerden *E. coli* ve *Enterobacter* ' in ayırımında kullanılır.

İNDOL ÜRETİMİ

- ⇒ Triptofan -----→ İndol + Pirüvik asit + NH_3

İndol + Kovaks Çözeltisi -----→ Tüpün üst kısmında **kırmızı bir halka** oluşumu varsa + **reaksiyon**

Indole → Tryptone broth'a ekim yapılır.



Methyl Red/Voges Proskauer (MR/VP)

- [illegible]



Methyl Red:

+

-

Voges Proskauer (/VP)

- ⇒ Organizmanın, glukoz fermentasyonu sonucu **nötral ürünler** oluşturup oluşturmadığını belirlemek için yapılır.
- ⇒ *Glikoz ----→ Piruvat ----→ Nötral Ürün + CO₂ + H₂*
- ⇒ *Asetil Metil Karbinol + α- naftol + KOH ---→ **Kırmızı** – Kahverengi renk oluşumu → + reaksiyon*

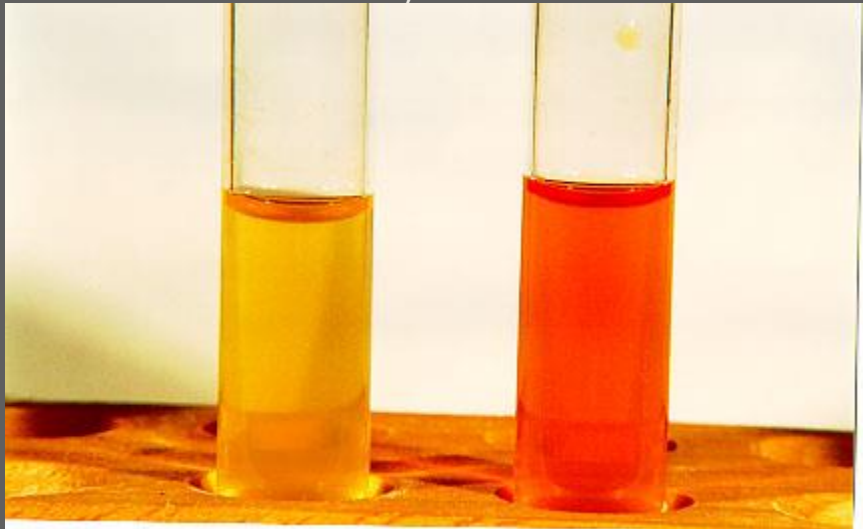
VP Testi



MR/VP continued

➔ Reading Results:

- MR— a + result is red (indicating pH below 6) and a – result is yellow (indicating no acid production)
- VP—A + result is red after VP reagents are added (indicating the presence of acetoin) and a – result is no color change.



Methyl Red: left – and right +



VP: left + and right –

Sitrat Testi

⇒ Simons Sitrat Agar kullanılır.

⇒ Na-sitrat-----→ Pirüvik asit + CO₂ + Oxaloasetik asit

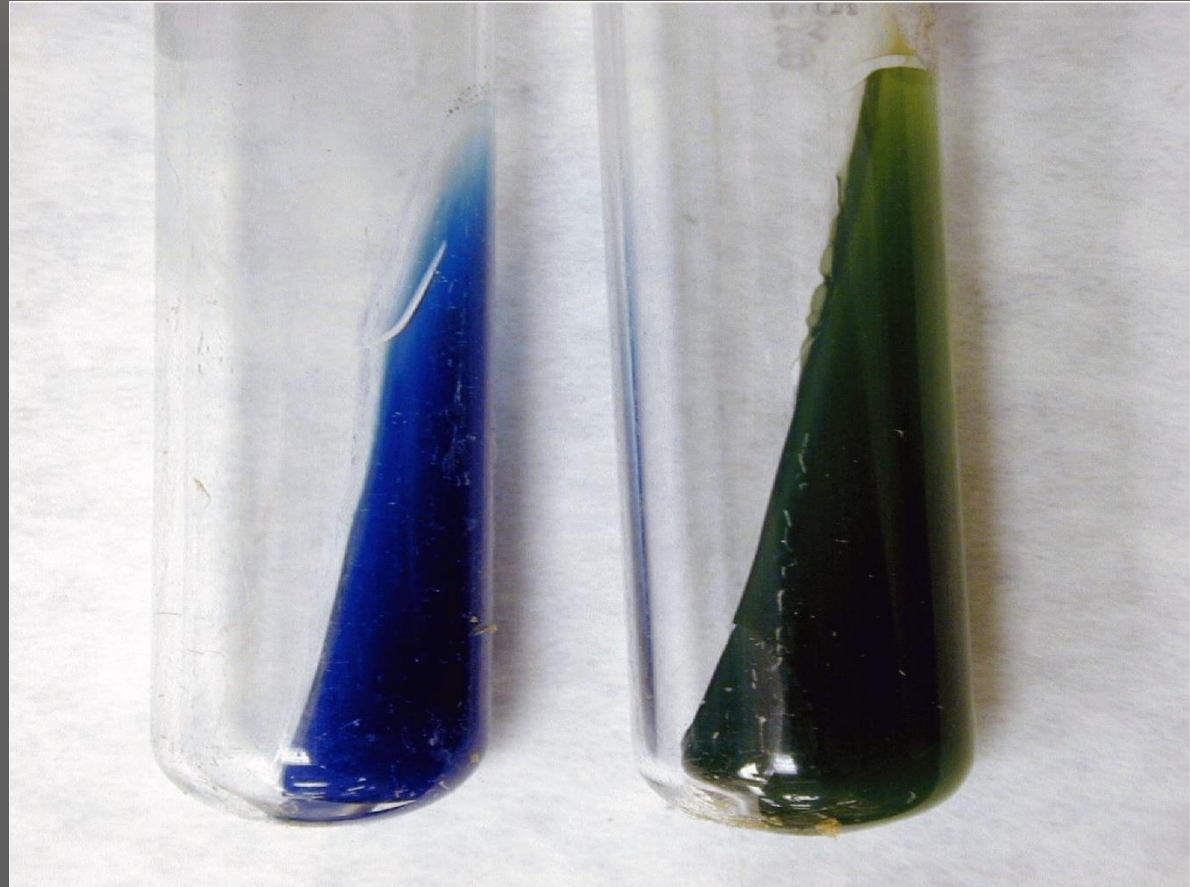
Na + CO₂ + H₂O-----→ Na₂CO₃ (Alkali pH)

⇒ Brom Timol Mavisi İndikatörü pH 6 → Sarı

pH 7 → Yeşil

pH 7.6 → Mavi

Citrate



Left positive and right negative.



H₂S Üretimi

SIM Ortamı kullanılır.

Sistin

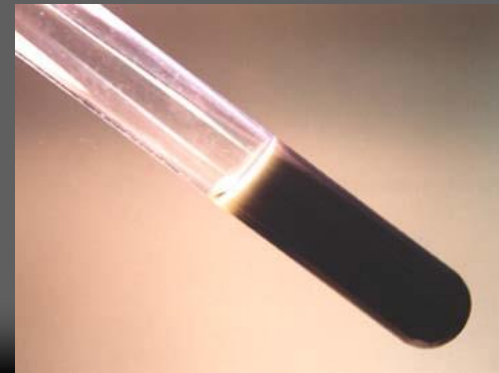
Sistein-----→ S + H₂ -----→ H₂S

Metionin

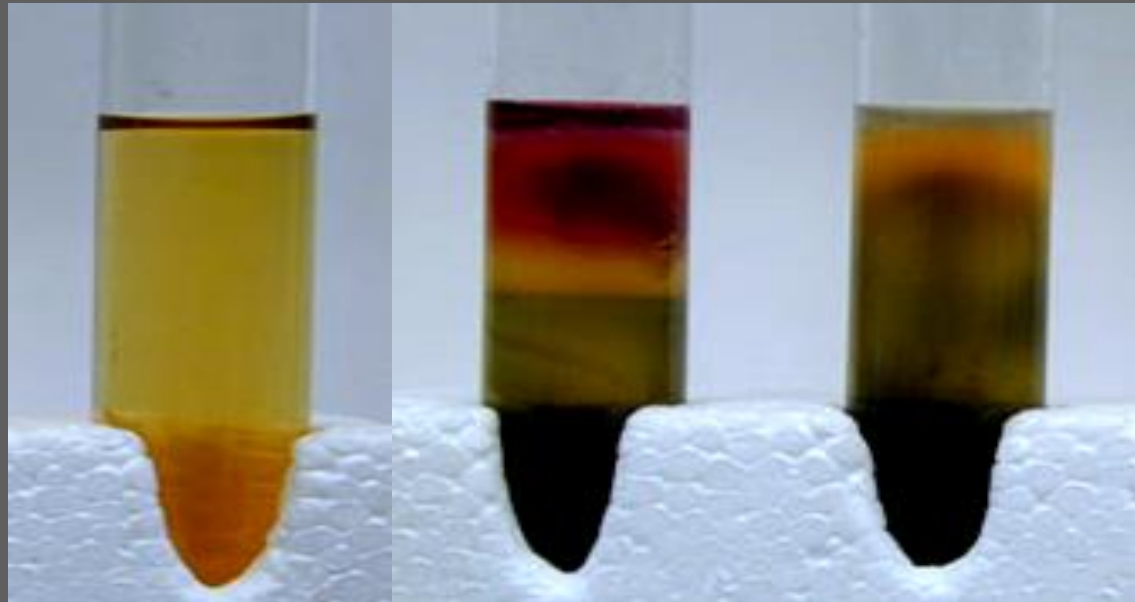
H₂S oluşumunu gözlemlemek için ortama **PbSO₄** veya **FeSO₄** tuzları ilave edilir.

H₂S + PbSO₄ → PbS kahverengi

H₂S + FeSO₄ → FeS siyah



H₂S Sonuç



Besiyerlerinde bakterilerin üretilmesi

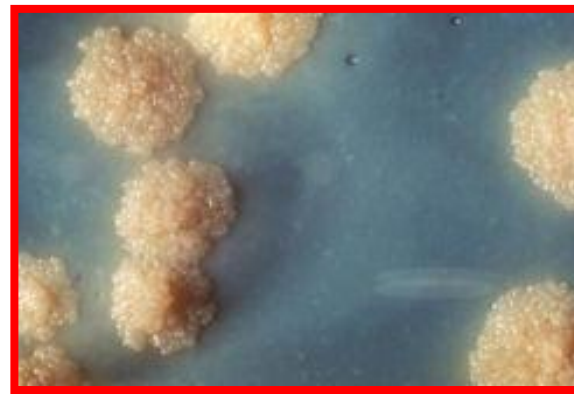
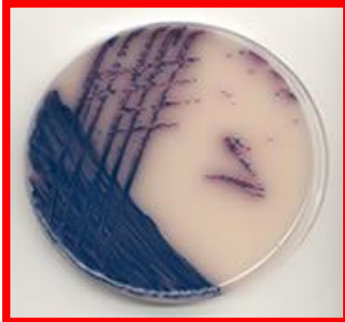
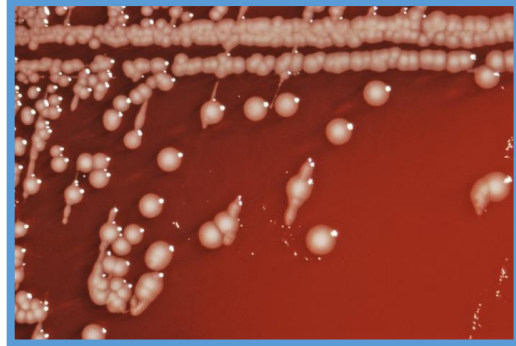
- *Mikroorganizmaları laboratuvarlar şartlarında üretebilmek için optimal fiziksel şartların sağlanması gereklidir.*
- *Bu amaçla*
 - *Farklı besiyerleri*
 - *inkübasyon ısısı,*
 - *inkübasyon süresi,*
 - *atmosfer özellikler değiştirilerek belirli mikroorganizmaların üremesi için daha elverişli ortamlar hazırlanabilir.*
- *Ekim yapıldıktan sonra besiyerleri, bakterilerin üremesi ve çoğalması amacıyla inkübatör (etüv) adı verilen cihazlarda belirli süre bekletilir.*
- *İnkübasyon süresi, bakterinin özelliklerine göre değişebilir.*

Bakteri kolonileri

S koloni: Yuvarlak, düzgün kenarlı, düzgün yüzeyli, nemli ve homojen görümlü kolonilerdir.

İngilizce “smooth” = düzgün kelimesinden türetilmiştir.

En yaygın görülen koloni tipidir.



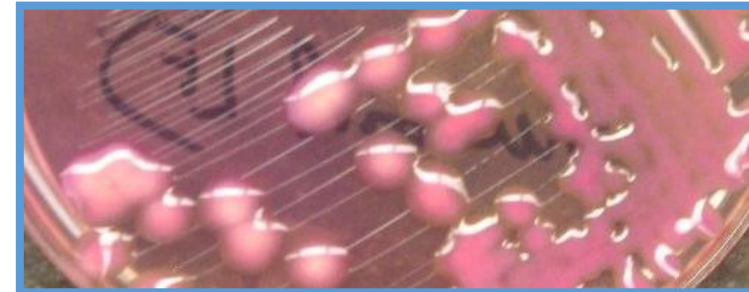
R koloni: Kenarları girintili çıkıntılı, yüzeyleri buruşuk veya tanecikli, genellikle basık görümlü kolonilerdir (İngilizce “rough” = pürüzlü kelimesinden türetilmiştir). *Mycobacterium tuberculosis* ve *Corynebacterium diphtheriae* gibi bakteriler doğal olarak R koloniler oluştururken, normalde S koloni oluşturan bakteriler de, eskimiş kültürlerde veya uygun olmayan koşullarda üretilmeleri sonucunda R koloni oluşturabilir.

Bakteri kolonileri

Bomba koloni: Bazı bakterilerin (örneğin *Shigella sonnei*) oluşturdukları S kolonisinin bir tarafında, R koloni tipinde bir koloni uzantısı görülür (patlamış bombaya benzetildiğinden dolayı bomba koloni adı verilmiştir).



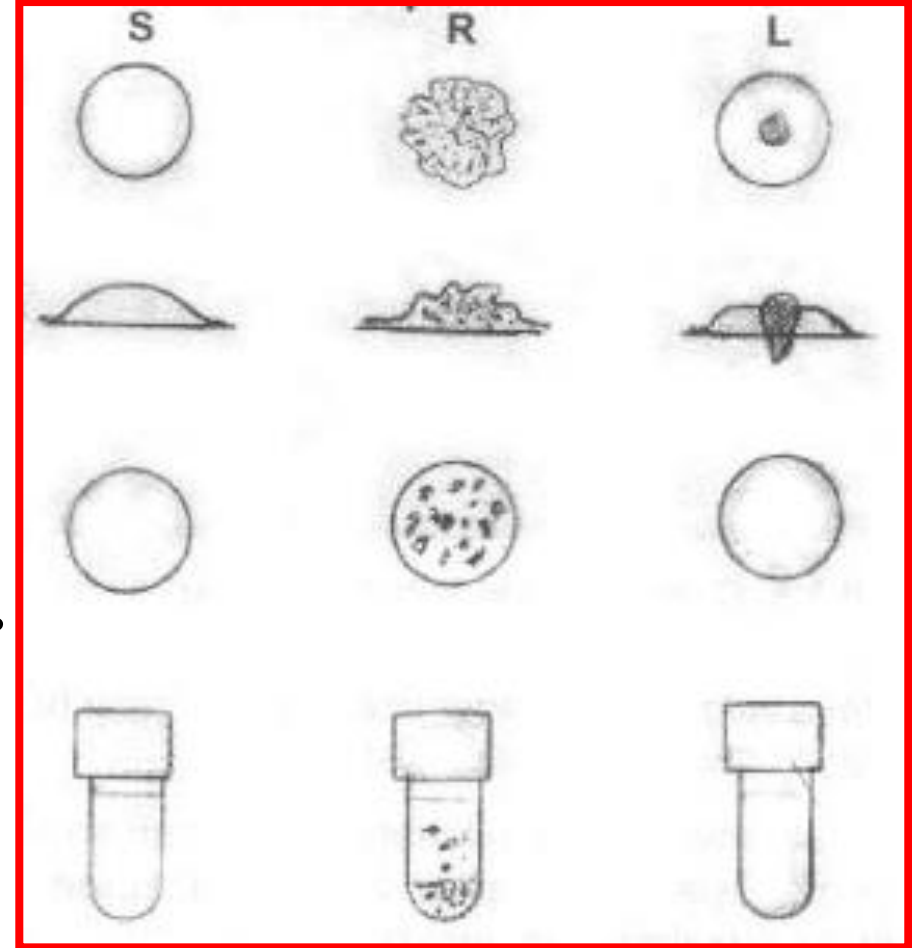
M koloni (mukoid koloni): Parlak, sümüksü görünümlü, yapışkan ve visköz özellikte kolonilerdir. Kapsüllü bakterilerin oluşturdukları tipik koloni şeklidir.



Bakteri kolonileri

L koloni: L-form bakterilerin özel besiyerlerinde oluşturdıkları çok küçük kolonilerdir. Koloni besiyerinin içersine doğru girer.

Mycoplasma cinsi içerisinde yer alan türler özel besiyerlerinde üretildiklerinde çok küçük, yüzeyleri granüllü, ortaları daha koyu görünen (sahanda yumurta görünümü), besiyeri içersine doğru uzanmış koloniler oluştururlar. Ureaplasma türleri ise yine çok küçük ve besiyeri içersine uzanan koloniler oluştururlar

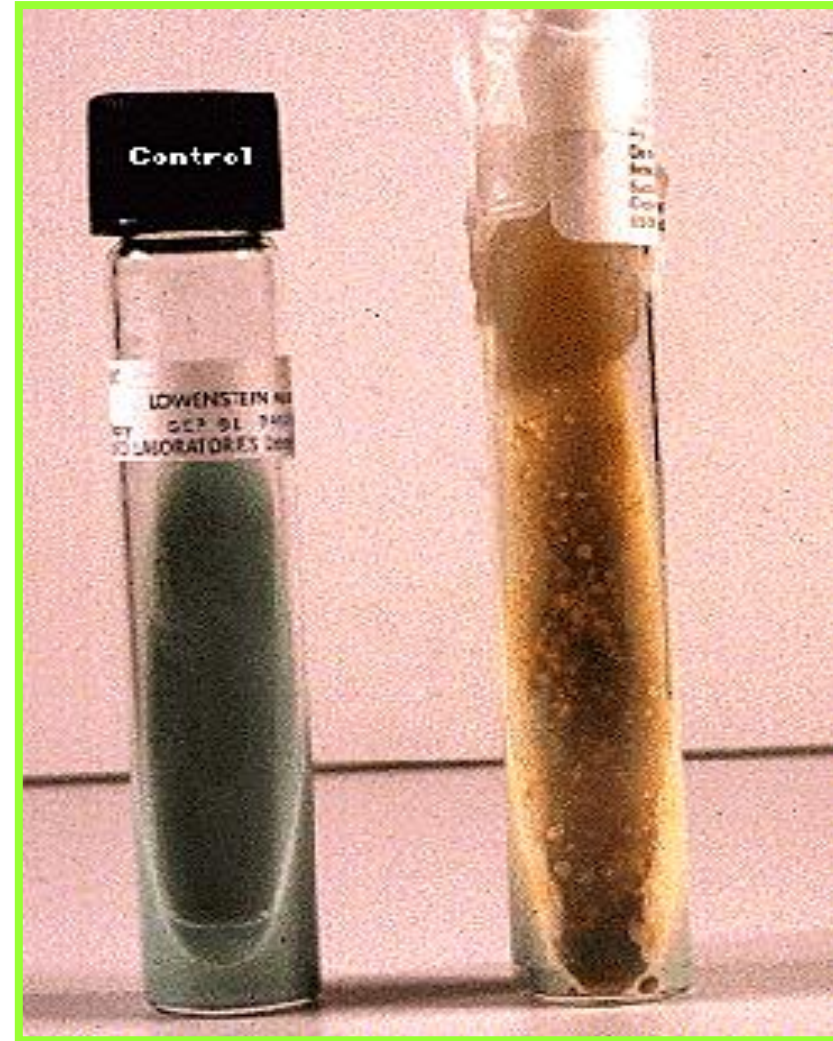


Koloni morfologjisi



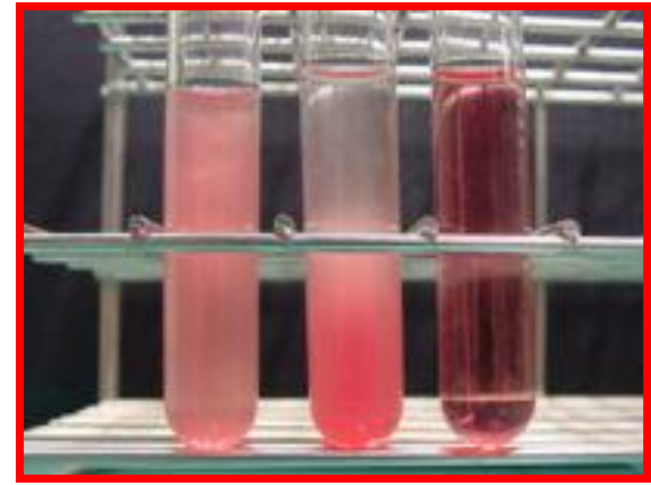
Koloni morfologisi

Lowenstein-Jensen besiyeri



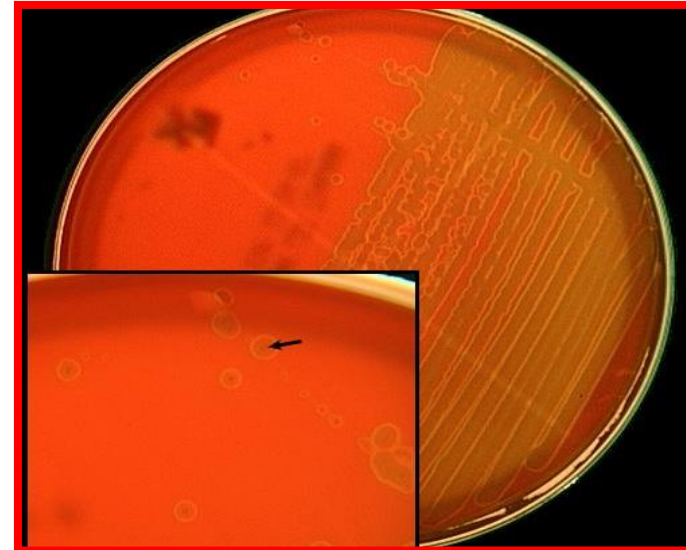
Hemoliz

- *Bazı bakteriler eritrositleri parçalayan hemolizin adı verilen enzimler oluştururlar.*
- *Hemolizine sahip bakterilerin, kanlı agarda oluşturduğu kolonlerin etrafı halka şeklinde hemoliz zonu ile çevrilidir.*
- *Üç türlü hemoliz vardır.*
 - *Alfa (α) hemoliz*
 - *Beta (β) hemoliz*
 - *Gamma (γ) hemoliz (hemolizsiz)*
- *Mikroorganizmaların tanımlanmasında bakterinin hemolizin enzimine sahip olup olmadığının tespit edilmesi önemli bir özelliktir.*
- *Kanlı agar besiyeri hemolitik bakteriler ile non-hemolitik bakterilerin ayırımına olanak sağlayan ayırt ettirici bir besiyeridir.*



Hemoliz

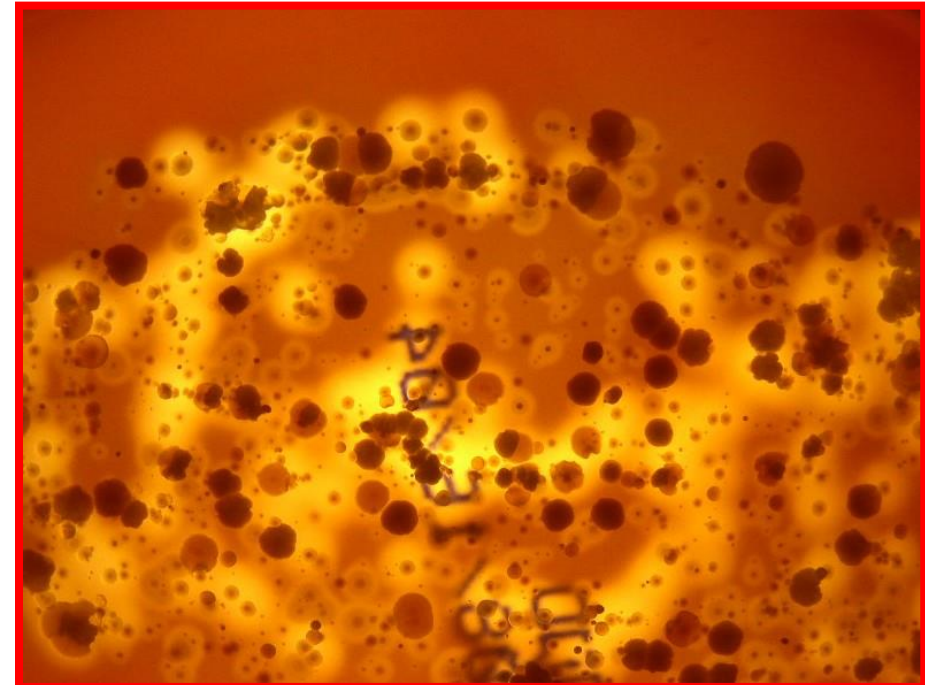
- **Beta hemoliz:** koloni etrafındaki eritrositler tamamen parçalanması ile oluşan tam hemolizdir. Koloninin etrafında tamamen şeffaf bir halka şeklinde görülür.
- **Alfa hemoliz:** eritrositler tam olarak parçalanmamıştır. Koloninin etrafında yeşilimsi sarı renkli, tam şeffaf olmayan bir halka şeklinde görülür.



Hemoliz tipleri



Hemoliz



Kan kültürü

Hemokültür

- *Kan, normal şartlarda sağlıklı insanlarda sterilidir.*
- *Çeşitli infeksiyon hastalıklarının seyri esnasında patojen mikroorganizmalar kanda bulunabilir.*
- *Bakteriyemi: bakterilerin kan dolaşımında bulunması*
- *Viremi: virusların kan dolaşımında bulunması*
- *Fungemi: mantarların kan dolaşımında bulunması*
- *Kanın bakteriyolojik kültürü için genellikle Castaneda'nın difazik kan kültürü besiyeri kullanılır.*
- *Bu besiyeri, hem katı hemde sıvı besiyerinin aynı şişede birarada kullanıldığı bir ortamdır.*
- *Ekilecek kan miktarı, sıvı besiyerinin yaklaşık 1/10'u kadar olmalıdır.*

Besiyerlerinde bakterilerin üreme özellikleri

- *Buyyon veya peptonlu su gibi sıvı besiyerlerinde üreyen bakteriler besiyerinde homojen bir bulanıklık, dipte çöküntü, yüzeyde zar oluşturabilir veya besiyerini pıhtılaştırabilirler.*
- *Katı besiyerlerinde üreyenler ise besiyerinde "koloni" adı verilen gözle görülür kümeler oluştururlar.*
- *Koloni, tek bir mikroorganizmanın katı besiyerinde üreyip çoğalması sonucu meydana gelen oluşumlardır.*

- *Bir kolonide bulunan tüm bakteriler aynı atadan köken alır ve aynı özellikleri taşırlar.*
- *Bakteri kolonilerinin görünüşleri ve özellikleri türden türe (hatta aynı tür içerisinde yer alan bakteriler arasında bile) farklılıklar gösterebilir.*
- *Koloni morfolojisi*
 - *şekli,*
 - *büyüklüğü,*
 - *kanlı agar besiyerinde hemoliz özelliği*

bakteri ve mantarların tanımlanmasında önemli ip uçları verir.

İdentifikasyon

(İzole edilen bakterinin tanımlaması)

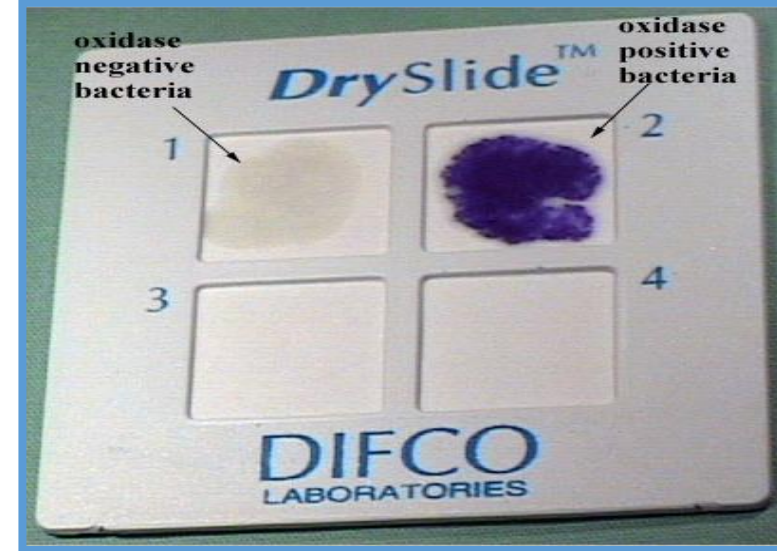
Biyokimyasal testler ve besiyerleri

İzole edilen herhangi bir bakteri

- optimal üreme şartları,
- izolman besiyerinin özelliği
- koloni morfolojisi,
- boyanma ve mikroskopik özellikleri
- sahip olduğu enzim sistemlerinin

tespit edilmesi ile tür ve cins düzeyinde adlandırılabilir.

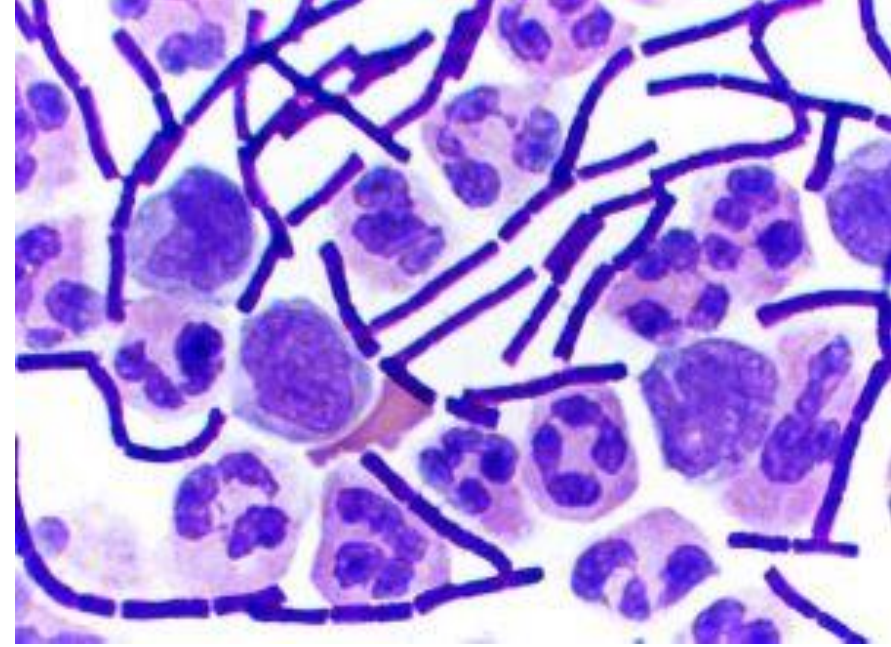
- Bakterinin enzim sistemleri biyokimyasal testler ve identifikasyon besiyerleri yardımı ile incelenebilir.



İdentifikasyon

Gram boyanma özelliği

Gram pozitif basil

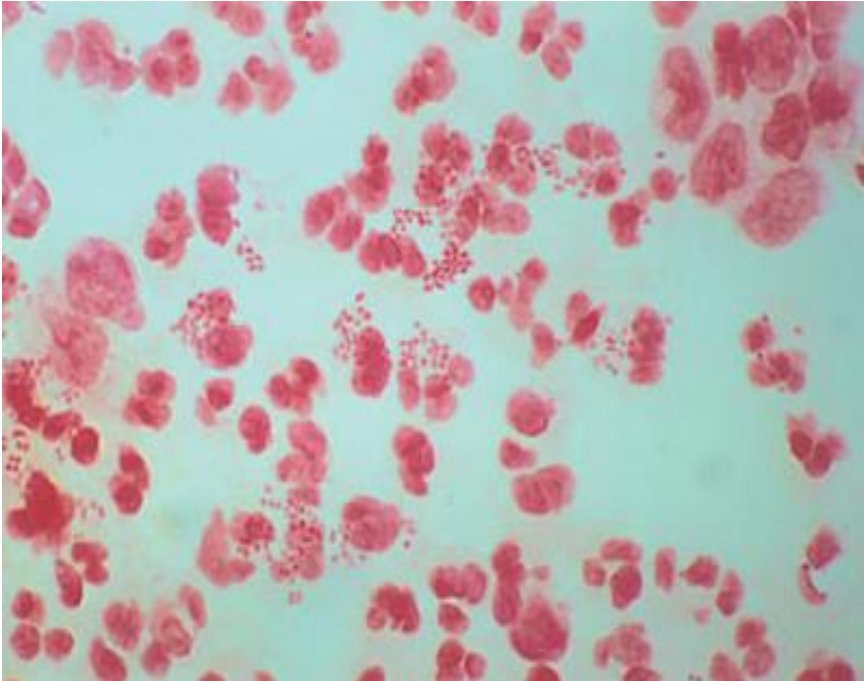
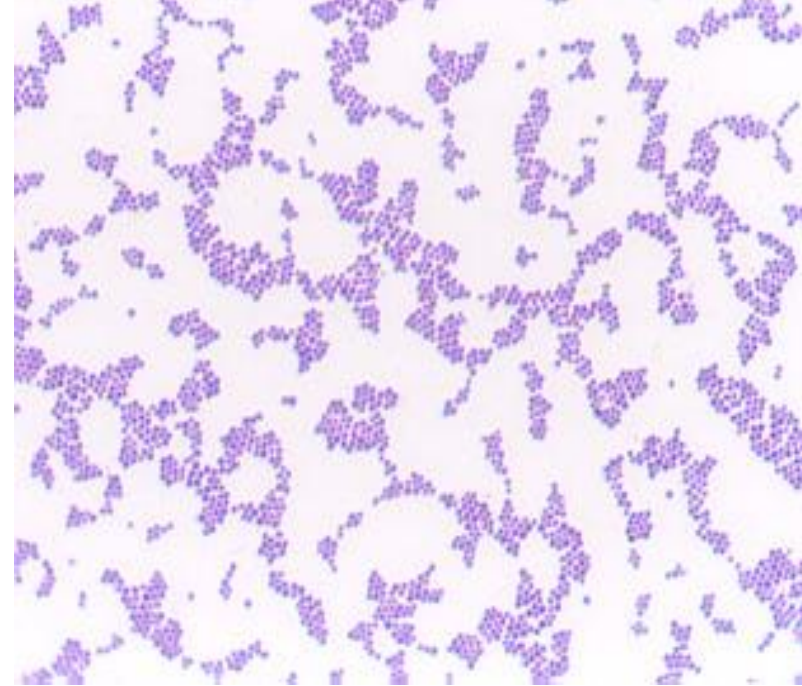


Gram negatif basil

İdentifikasyon

Gram boyanma özelliği

Gram pozitif kok



Gram negatif kok

İdentifikasyon

Gram negatif boyanan pleomorfik bakteriler



İdentifikasyon

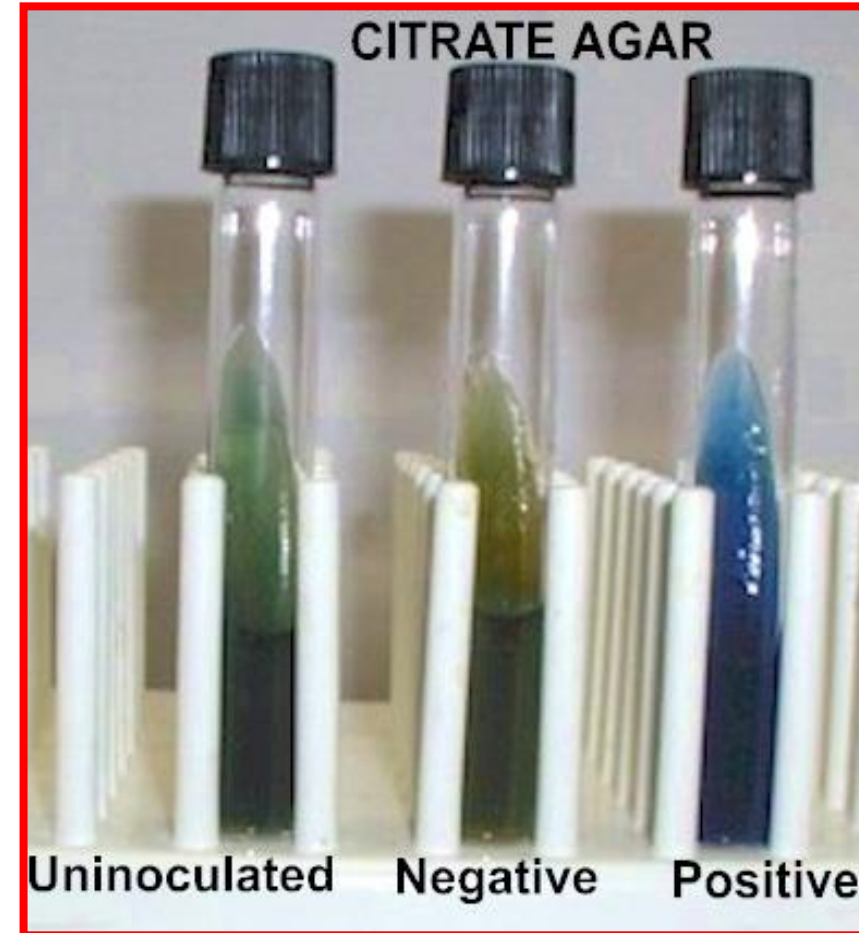
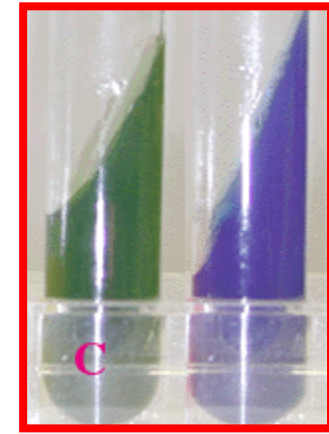
Saf kültür

- *İzole edilen bir bakterinin tanımlanmasında tek koloni temel alınır. Ancak tek bir koloni çok sayıda biyokimyasal testin yapılmasına yetmez. Bu nedenle saf kültür yapılır.*
- *Saf kültür: Bir tek koloniden çok sayıda koloni elde etmek veya bir başka deyiş ile bir tek bakteriden köken alan aynı türdeki bakteri topluluğudur.*
- *Klinik örnekten saf kültür elde etmek için,*
 - *İlk önce örnekten uygun katı besiyerine tek koloni düşürülür.*
- *Tek tek duran bakteriler inkübasyon süresi boyunca bölünerek çoğalır ve koloni oluştururlar.*
- *Değişik amaçlarla saf kültürü yapılmak istenen koloni alınarak uygun sıvı veya katı besiyerine pasajlanır.*
- *Eğer pasaj katı ortama yapıldı ise tek koloni düşürme yöntemi ile koloni besiyeri yüzeyine yayılır.*
- *Ekim yapılan plak etüve kaldırılıp uygun ısı ve sürede inkübe edilir*

İdentifikasyon

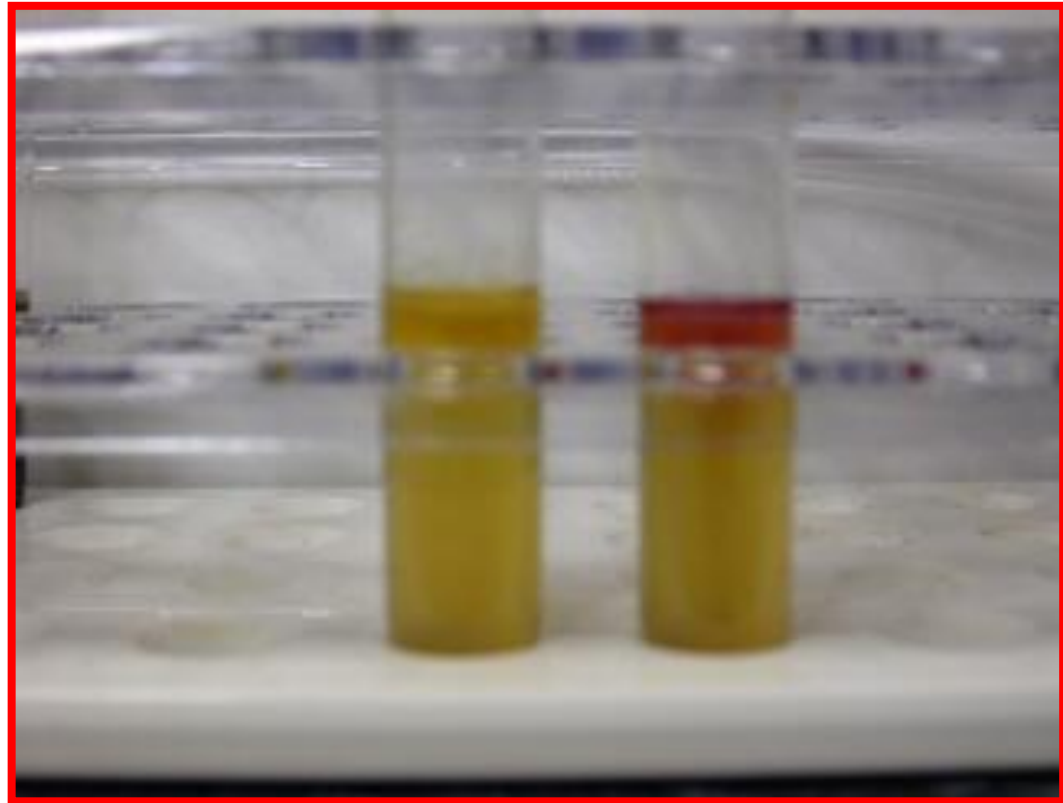
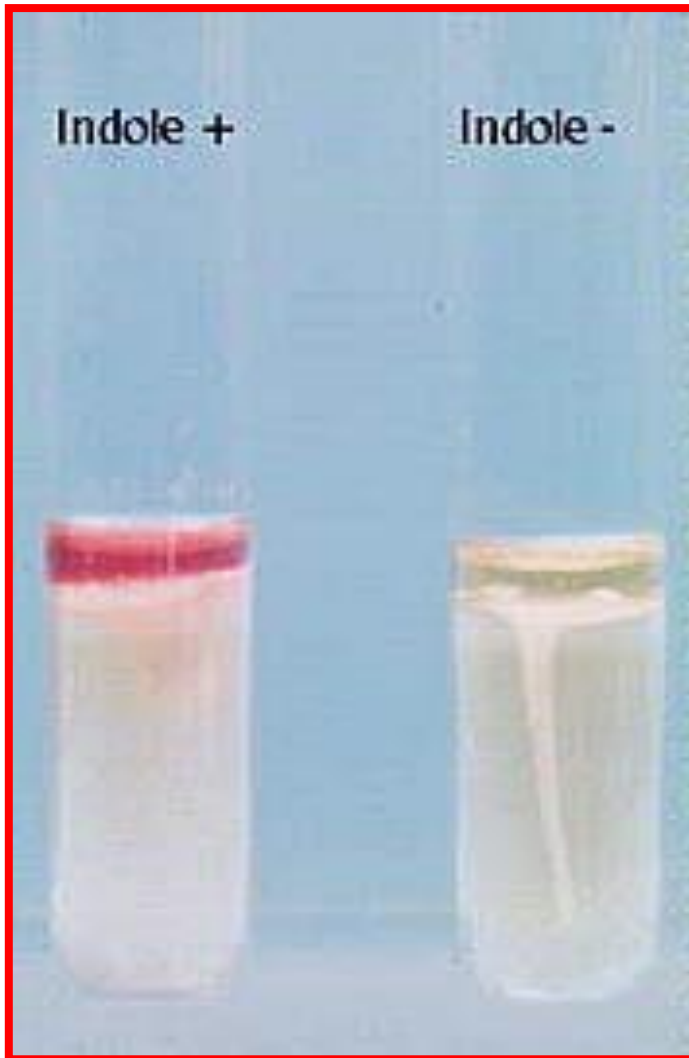
(İzole edilen bakterinin tanımlaması)

- **Bakterilerin tanımlanmasında birçok biyokimyasal reaksiyondan yararlanılır.**
- **Bu amaçla kullanılan biyokimyasal testlerin birçoğunda testin sonucu, oluşan renk değişikliği ile değerlendirilir.**
- **Besiyerinde renk değişikliğini sağlayan indikatörler (ayıraçlar)'dir.**
- **İndikatörler, ortam şartlarındaki değişikliklere bağlı olarak renk değiştiren maddelerdir.**
 - **pH indikatörleri, ortamdaki pH değişikliklerine göre renk değiştirirler.**



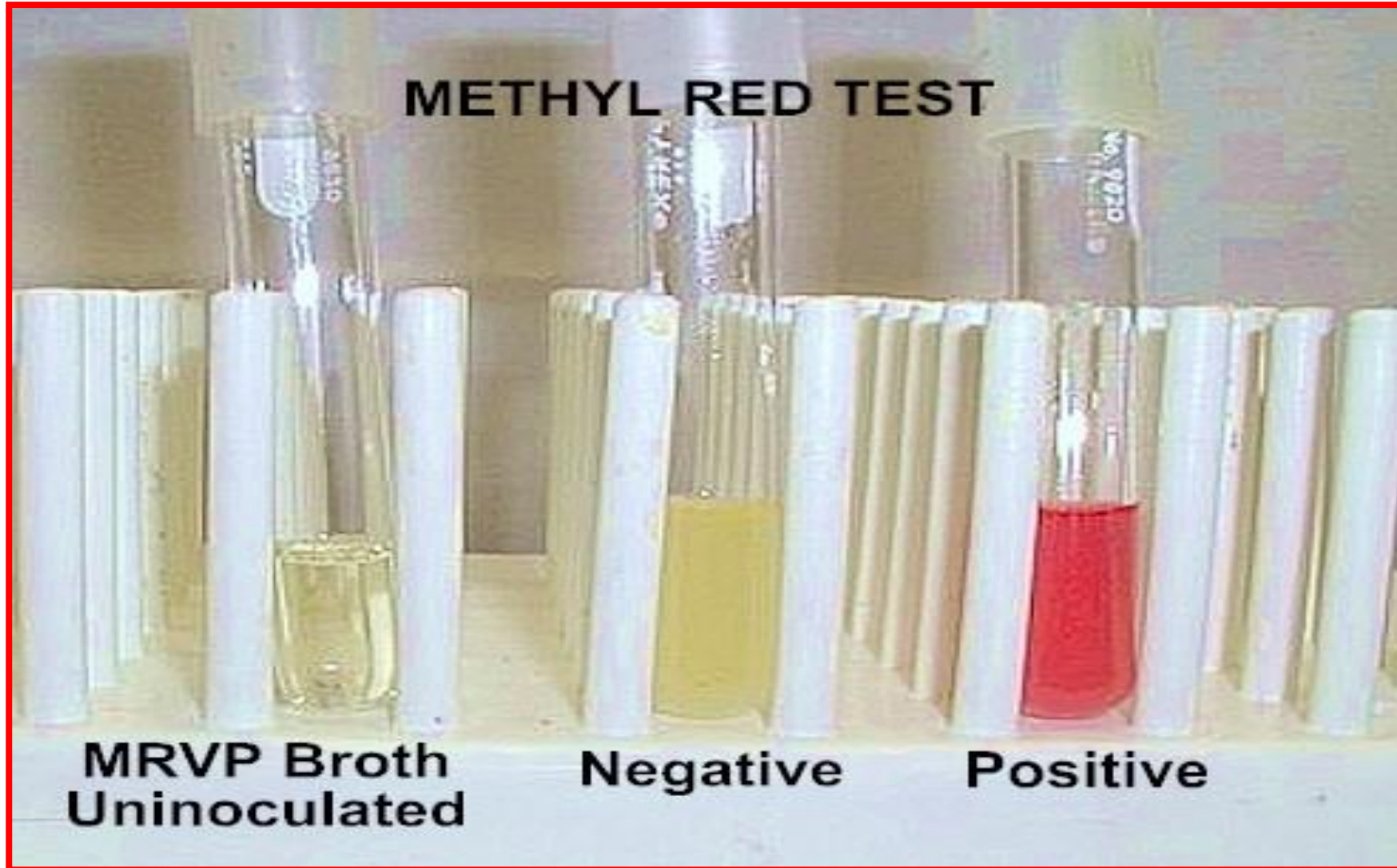
Identifikasiyon

Indol testi



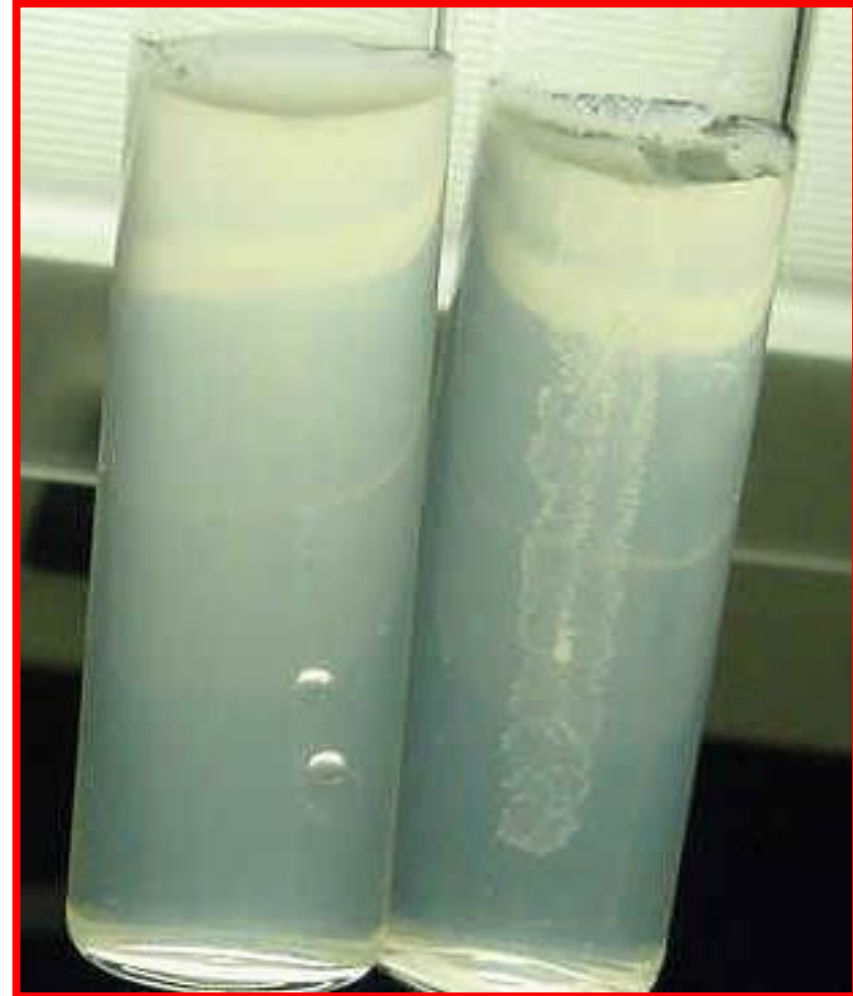
İdentifikasyon

Metil kırmızısı testi



Identifikasiyon *Urease*

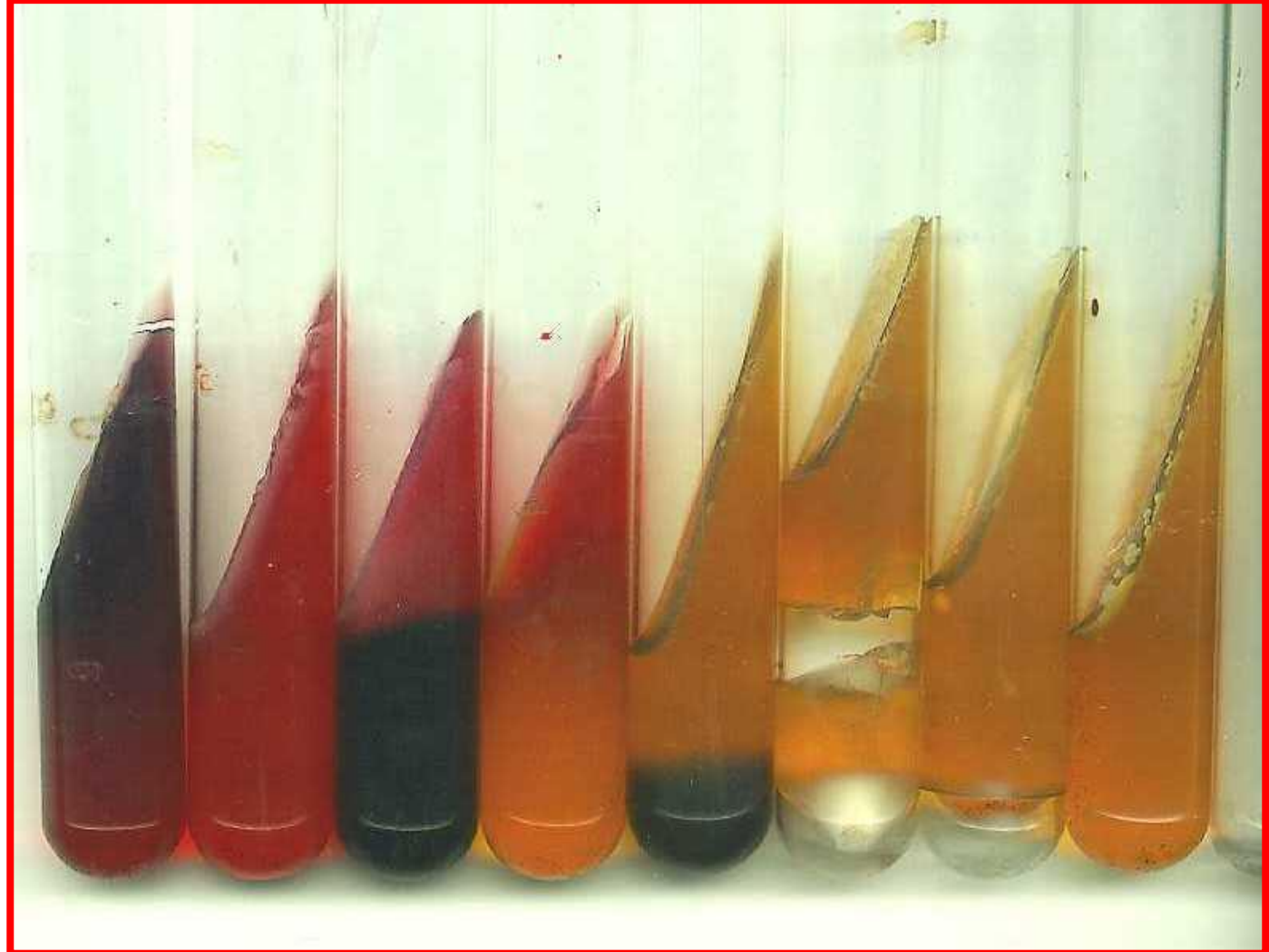
Hareket



İdentifikasyon

TSI besiyeri

- *Laktoz*
- *Glukoz*
- *Sukroz*
- *H₂S yapma*
- *Gaz oluşturma*



İdentifikasyon

Tek şeker besiyeri

- ***Asit
oluşturma***
- ***Gaz
oluşturma***

