

## MİKROORGANİZMA GELİŞMESİ

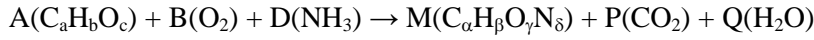
Mikroorganizmalarda gelişme denilince büyümeyle, hücre bölünmesi veya tomurcuklanmasına bağlı olarak hücre sayısının artmasıyla ortaya çıkan ve geri dönüşümü olmayan canlı madde artışı anlaşılmaktadır. Çok hücreli canlılarda kütleli büyüklük artarken, tek hücrelilerde hücre sayısı da artış gösterir. Doğal olarak tek hücrelilerde de hücrenin hacim olarak büyüme göstermesi gelişmenin kapsamı içerisindedir. Bu nedenle, mikroorganizmaların gelişmelerinde bu farklılıkları belirtebilmek için mikroorganizma konsantrasyonu, yoğunluğu, bölünme veya tomurcuklanma değeri, büyüme değeri, jenerasyon süresi ve ikilenme süresi gibi farklı tanımlamalar kullanılmaktadır.

Mikroorganizma sayısı (adet/mL) veya bununla ilgili diğer tanımları oluşturan hücre sayısı, değişik sayım yöntemleri ile belirlenebilir. Mikroorganizma yoğunluğu (g/L) ve buna bağlı tanımlamalarda ise, doğrudan veya dolaylı olarak yoğunluk saptamaya yönelik yöntemlerden yararlanılır.

Bakterilerin gelişmesi, genellikle, hücre kütlesi veya hücre sayısının iki katına ulaşması için gerekli zamanla karakterize edilir. Kütleli ikilenme süresi hücre sayısının ikilenme süresinden farklı olabilir. Çünkü hücre kütlesi hücre sayısında bir artış olmaksızın artabilir. Buna karşın, eğer belirli bir çevre koşulunda hücre kütlesi ve sayısının ikilenmesi arasında bir benzerlik söz konusu ise, organizma üs cinsinden (eksponensiyel hızda) çoğalıyordu.

### Mikrobiyel Çoğalmanın Kimyasal Tanımı

Çoğalma, hücre kütlesinin sentezi ile ilgili bir seri kimyasal reaksiyonlar olarak görülebilir. Çoğalma için genelleştirilmiş sitokiyometrik bir formül şöyle yazılabilir.



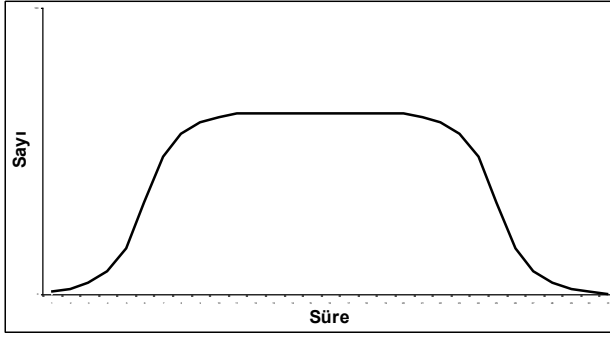
Burada A, B, D, P ve Q ilgili bileşenlerin mol'leridir.  $C_aH_bO_c$  karbon enerji kaynağı olarak genelleştirilmiştir. M ise bir birim hücrenin mol sayısıdır ( $C_\alpha H_\beta O_\gamma N_\delta$ ).

Örneğin; tipik bir maya  $C_6H_{11}NO_3$  şeklinde gösterilebilir. Böylece hücrenin organik fraksiyonunun bir biriminin molekül ağırlığı 145 olacaktır. Eğer hücre %90 organik fraksiyon ve %10 kül içeriyorsa, bir birim hücrenin yaklaşık olarak tüm formül ağırlığı  $145/0,9 = 161$ 'dir.

Bu sitokiyometrik ilişkiye dayanarak, oluşan her hücre kütlesinin tüketilen her substrat kütlesine oranı (M/A), hücre verimi olarak belirtilir. Bu verim, hem hücre kütlesinde birleştirilmiş, hem de çoğalmak için enerji sağlamak amacıyla  $CO_2$  veya  $H_2O$ 'ya parçalanmış olan karbon kaynağının kullanım etkinliğine bağlıdır.

### 02.03. Gelişme Eğrisi (Kurvesi)

Kimyasal yönden belirli bir ortamda ve belli koşullarda gelişen bir bakterinin, kesikli kültürdeki, tipik bir gelişim kurvesi aşağıdaki evreleri kapsamaktadır (Şekil ). Gelişme, genellikle hücre kütlesi esas alınarak belirlenmektedir ve aksi belirtilmedikçe bu geçerli olacaktır.



Şekil 02.05. Bir bakterinin kesikli kültürdeki gelişme kurvesi

**A. Adaptasyon evresi (Lag Faz):** Belirli bir besi ortamına inoküle edilen bakterinin yeni ortama uyum gösterip çoğalmaya başlayana kadar belirli bir süre geçer. Bakteri kültürü bu süreyi, makro ve mikro moleküler bileşimini yeniden düzenlemek, substrata bağlı olarak enzimlerini sentezlemek için kullanır. Bu sürede hücre sayısında hemen hemen hiçbir artış gözlenmez. Fakat hücre kütlesi artabilir.

Moleküler düzeyde devam eden reaksiyonlar çok iyi anlaşılabilir, fakat hücrede önemli ölçüde RNA sentezinin gerçekleştiği bilinmektedir.

Lag fazın süresi bakterinin fizyolojik durumuna ve inoküle edildiği besiyerinin doğasına bağlı olarak değişir. Mikroorganizmanın yaşı, hasarlı olup olmaması, daha önce geliştirildiği ortam ve muhafaza edildiği sıcaklık lag faz süresine etki eden faktörlerdir.

Lag aşamasında bakteri bir anlamda çoğalma için kendini hazırlar, gerekli enzimlerini sentezler. Bakteri bu ortama aşılardan önce aktif durumda ise ve besiyeri basit bileşenlerden oluşuyorsa lag süresi kısa olur. Tersine olarak, örneğin glikozlu bir ortamda geliştirilen laktöz<sup>+</sup> bakteri laktözlu bir ortama aktarırsa bakterinin gerekli enzimleri sentezlemesi için daha uzun bir süre gerekir.

Mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilen endüstriyel üretimlerde bu sürenin kısaltılması ekonomik yönden büyük yararlar sağlar. Bu süreyi kısaltmak için;

- İnokülasyon oranı yüksek tutulmalı (örneğin; mayalarda %5),
- İnokülasyonda yüksek oranda canlı hücreler kullanılmalı,
- Ortamda çözünmeyen substratlar bulunmamalı (Örneğin; şekerlerle fosfatlar birlikte sterilize edilirse bu maddeler suda çözünmeyen, mikroorganizmaların yararlanamayacağı bir form oluştururlar),
- Ortamda toksik maddeler bulunmamalıdır.

Matematiksel olarak, lag fazın süresi yalnızca inokülüm miktarına ( $X_0$ ) bağlı olup, substrat konsantrasyonuna ( $S_0$ ) bağlı değildir. Fakat bu süreye yalnızca inoküle edilen hücre sayısı değil, hücrelerin yaş ve fizyolojik durumları da etkili olacağından, logaritmik çoğalma evresindeki hücrelerin kullanıldığı inokülant en uygun önkültürü oluşturacaktır.

Lag süresinin kısa ya da uzun olması, analiz edilen numunedeki mikroorganizma sayısı hakkında bilgi verebilir. Empedans/ kondüktans yöntemi ile yapılan analizler bu sürenin kısa ya da uzun olması esasına dayanır (bkz 08.04. bölüm).

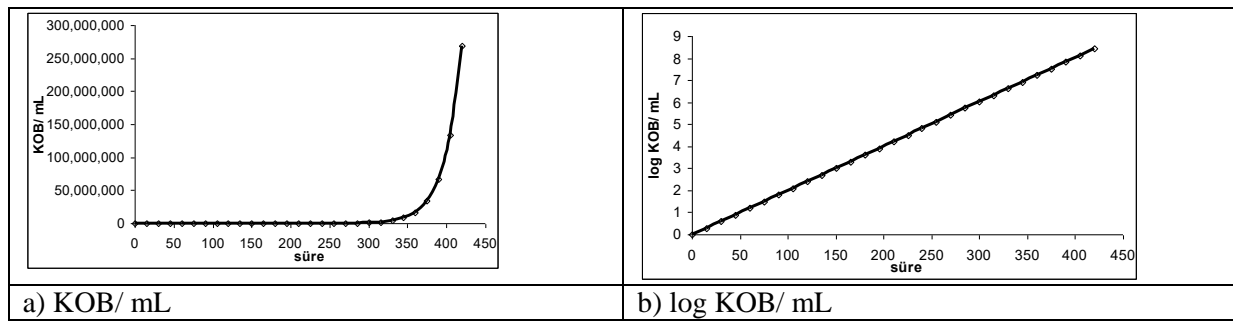
**B. Hızlanma evresi:** Lag faz ile logaritmik faz arasında yer alan bu evre, genellikle kısa bir süreyi kapsar. Matematik ve biyolojik olarak iyi açıklanamaz. Oğul hücrelerin oranı toplam popülasyonun yarısına ulaşma çabasıdır.

**C. Logaritmik (Üs cinsinden) çoğalma evresi:** Bu evrede mikroorganizmanın canlı, genç ve dinç olduğu kabul edilir. Hücreler en yüksek hızla bölünme yeteneğindedir. Ortamda besin fazla olup,

gelişmeyi engelleyici maddeler yoktur. Bu durumda özgül gelişme hızı maksimumdur ( $\mu = \text{sabit} = \mu_{\text{max}}$ ). Mikroorganizmaların ölümü yok sayılabileceğinden kinetik hesaplamalarda bu etmen göz önüne alınmaz.

Bu evrede hücre sayısındaki artışın, hücre kütleindeki artış ile benzer olduğu gözlenir.

Logaritmik gelişme evresinde zamana bağlı olarak sayı artışı standart şekilde KOB/ mL olarak grafiğe aktarılacak olursa (a) sağlıklı bir grafik elde edilemez (Şekil 02.06). Aynı sayıların logaritması alınarak Log KOB/ mL olarak grafiği çizilirse (b) anlamlı bir grafik elde edilir. Bu evrede de sayı artışı geometrik olup 2'ye katlanma şeklindedir. Logaritmik bir artış yoktur, sayıların logaritmaları alınarak grafiğe işlendiğinde düz bir hat elde edildiği için bu isimle anılır.



Şekil 02.06. Gelişme kurvesinin grafiksel ifadesi

**D. Yavaşlama evresi:** Mikroorganizmalar hızla çoğalarak en yüksek sayıya (genellikle  $10^9$  hücre/mL) ulaştıklarından, kültür ortamında besinler giderek azalmaktadır. Aynı zamanda ortamda toksik etkenler olabilecek metabolik ürünler birikmektedir. Sonuç olarak, çevre koşulları mikroorganizma aleyhine değişmektedir. Hücre popülasyonu hâlâ artmaktadır (çoğalma hızı > ölüm hızı), fakat özgül gelişme hızı giderek küçülmekte ( $\mu < \mu_{\text{max}}$ ), gelişme gerçekten yavaşlamaktadır. Bu evrede, hücrelerin biyokimyasal ve morfolojik yapıları farklılaşmaktadır. Yeni oğul hücrelerin oluşumu azalır ve durur.

**E. Durma evresi (Sabit evre):** Besinlerin çoğu kullanıldıktan sonra, gittikçe kısıtlanan koşullar ile gelişme daha fazla süremez. Hücreler bölünmeyi durdurur ve canlı hücreler ölü hücrelerle dengeye ulaşırlar (gelişme hızı = ölüm hızı). Mikroorganizmanın durma evresi, gelişme eğrisinde, oldukça düz seyreden yatay bir çizgi şeklindedir. Net gelişme hızı durmuş olsa da ortamda veya hücrede metabolizma faaliyetleri sürmektedir.

**F. Azalma ve ölüm evresi:** Mikroorganizmaların ölüm hızları arttığı için zamanla konsantrasyonlarında bir azalma görülür. Otoliz ürünleri ortamda birikmektedir. Özgül gelişme hızı negatif olup ( $\mu < 0$ ), tüm hücreler öldükten sonra sıfır olur. Çok uzun süre inkübasyonda kalmış kültürlerde bu nedenle canlı hücre alınamaz ve bu durum otosterilizasyon olarak tanımlanır.

Mikroorganizmaların gelişmeleri sırasındaki evrelere göre enzimlerin oluşumları da farklı olur. Örneğin; *Bacillus subtilis* gibi bazı mikroorganizmalarda; proteinaz enzimlerinin oluşumu hemen hemen yalnız logaritmik evrede, amilazların oluşumu ise sabit evrede görülür. Hücrelerarası (intracellular) enzimler, genellikle, logaritmik evrede oluştuğu halde, bunların ortama salgılanması azalma evresinde olur. Bu evrede hidrolitik ve lipolitik enzimlerin hücre zarlarında meydana getirdiği parçalanma olayı olan "liziz" gözlenir.

## 02.04. Gelişme Kinetiği

Gelişme kinetiği; mikroorganizmanın üremesini ve ürün oluşturmasını matematiksel bağıntılarla tanımlar. Bu yalnızca aktif hücre gelişmesini değil, aynı zamanda dinlenen veya gelişmesini durduran hücrelerin aktivitelerini de içermektedir. Çünkü, ticari önemi olan birçok fermantasyon ürünü, hücre gelişmesi tamamlandıktan sonra meydana gelir. Bazı endüstriyel üretimlerde hücre öldükten sonra ortaya salınan enzimler gerekli biyodönüşümleri gerçekleştirerek ürün oluşumunu sağlarlar.

Tüm gelişme parametrelerinin (fiziksel, kimyasal, biyolojik) optimize edilmesinden sonra limitsiz bir gelişme düşünülebilir. Koşulları en uygun hale getirebilmek için, yani sınırlanmamış bir gelişmenin olması için;

- Gereksinim duyulan besinlerin, ortamda talep edilenlerden fazla bulunması,
- Ortamda çözünmeyen elementlerin bulunmaması,
- Hücrelerin aktif olması,
- Ortamda gelişmeyi engelleyici inhibitörlerin bulunmaması

gereklidir. Bu koşulda hücre üs cinsinden (eksponensiyel hızda) çoğalıyordur ve çoğalma şöyle tanımlanır:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

$$\frac{dN}{dt} = \mu_n N$$

Burada;

X ; Hücre konsantrasyonu (g/L)

N ; Hücre konsantrasyonu (adet/mL)

t ; Zaman (h)

$\mu$  ; Özgül gelişme hızı ( $h^{-1}$ ) (kütle)

$\mu_n$  ; Özgül gelişme hızı ( $h^{-1}$ ) (sayı)

- 1. Eşitlik zamana bağlı olarak hücre kütlesindeki artışı,
- 2. Eşitlik zamana bağlı olarak hücre sayısındaki artışı gösterir.

Bu eşitliğin integrali alındığında;

$$\int_{x_1}^{x_2} \frac{dX}{X} = \int_{t_1}^{t_2} \mu dt$$

elde edilir.

Eğer özgül gelişme hızı sabitse,

$$\ln \frac{X_2}{X_1} = \mu \Delta t$$

veya;

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{\Delta t}$$

Mikroorganizma sayısı olarak ifade edildiğinde ise,

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{\Delta t}$$

eşitliği elde edilir.

$X_2 = X_1$  olması durumunda  $\Delta t$ ;  $(t_2 - t_1) = t_d$ , yani ikilenme süresini gösterir ve buradan;

$$t_d = \frac{\ln(X_2/X_1)}{\mu} = \ln \frac{2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}$$

şeklinde gösterilir.

**Problem 02.01:** Bir mikroorganizma gelişme ortamından belirli aralıklar ile alınan örneklerde ölçülen hücre konsantrasyonu aşağıda verilmiştir. Bu mikroorganizmanın maksimum özgül gelişme hızını hesaplayınız.

Zaman (h)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
X (g/L)	0,95	1,063	1,513	2,010	2,313	2,550	2,750	2,906	3,060	3,068

**Çözüm:** Öncelikle, zamana karşı hücre konsantrasyonundaki artışı gösteren gelişme kurvesi çizilir. Bu kurve üzerinde, en dik eğim ile belirlenen hücre artışının görüldüğü evre logaritmik evreyi işaret eder. Bu evreyi kapsayan iki zaman aralığında (örneğin; 6-8. saatler arası) hesaplanacak özgül gelişme hızı ise, maksimum özgül gelişme hızını verecektir.

$$\mu = \frac{\ln(X_2/X_1)}{\Delta t} = \frac{\ln(2,010/1,513)}{2} = \frac{\ln 1,328}{2} = \frac{0,284}{2} = 0,142 \text{ h}^{-1}$$

$$\mu_{\max} = 0,142 \text{ h}^{-1}$$

**Problem 02.02:** Belirli kültür koşullarında özgül gelişme hızı  $\mu = 0,462 \text{ h}^{-1}$  olan mikroorganizmanın ikilenme süresi ( $t_d$ ) ne kadardır?

$$t_d = \frac{0,693}{\mu} = \frac{0,693}{0,462} = 1,5 \text{ h} = 90 \text{ dakikadır.}$$

Logaritmik evrede mikroorganizmaların çoğalmaları üssel,

$$N = N_0 e^{\mu t}$$

ya da

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

eşitlikleri ile verilmektedir. Burada  $N_0$  veya  $X_0$  ortamda başlangıçta bulunan hücre konsantrasyonu,  $N$  veya  $X$  ise herhangi bir  $t$  anındaki mikroorganizma konsantrasyonunu göstermektedir. Bu eşitliğin logaritması alınarak;

$$\ln N = \ln N_0 + (\mu t)$$

ya da

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu t$$

şeklinde, daha önce de verilen 2.4 eşitliğine benzer bir eşitlik elde edilir.

**Problem 02.03:** Bir ortamda bakteriler sürekli olarak ve her saatte mevcut sayılarının % 20'si oranında artıyorlar. Başlangıçtaki hücre sayısı  $10^3$  KOB/mL ise 6 saat sonra bakteri sayısı ne olur?

**Çözüm:**  $N = N_0 \times e^{\mu \times t}$   
 $= 1000 \times e^{0,20 \times 6}$   
 $= 1000 \times e^{1,2}$   
 $= 1000 \times 3,320$   
 $= 3320 \text{ KOB/mL} = 3,3 \times 10^3 \text{ KOB/mL}$

**Problem 02.04:** Bir sıvı kültürde canlı bakteri sayısı  $N_0 = 2,5 \times 10^3$  KOB/mL kadardır. Bu bakterinin ikilenme süresi 17 dakika ise 3,5 saat sonra bakteri sayısı kaç olur?

**Çözüm:** Önce özgül gelişme hızı ( $\mu = 0,693/t_d$ ), sonra N hesaplanır ( $N = N_0 \times e^{\mu t}$ ). Ancak ikilenme süresi genelde saat (h) olarak verildiğinden  $t_d$ 'nin de saate çevrilmesi gerekir.

$$t_d = 17 \text{ dakika} = 17/60 \text{ h} = 0,28 \text{ h}$$

$$\mu = \frac{0,693}{0,28} = 2,47 \text{ h}^{-1}$$

$$N = 2,5 \times 10^3 \times e^{2,47 \times 3,5} = 1,3 \times 10^7 \text{ KOB/mL}$$

**Problem 02.05:** Oda sıcaklığında ve süt ortamında ikilenme süresi  $t_d = 25$  dakika olan gıda bozulma etmeni bir bakterinin sütteki düzeyi başlangıçta  $N_0 = 10^4$  KOB/mL olsun. Bu bakterinin sütte bozulma düzeyini  $10^7$  KOB/mL kabul edersek, bozulma düzeyine ne kadar zamanda ulaşır?

**Çözüm:** Önce ikilenme süresinden özgül gelişme hızı hesaplanır ( $t_d = 25$  dakika = 0,417 h)  
 $\mu = 0,693/0,417 = 1,66 \text{ h}^{-1}$

Sonra ilgili eşitlik kullanılarak süre bulunur.

$$N = N_0 e^{\mu t} \rightarrow N/N_0 = e^{\mu t} \rightarrow \ln \frac{N}{N_0} = \mu t \rightarrow t = \frac{\ln(N/N_0)}{\mu} = \frac{\ln(10^3)}{1,66} = 4,16 \text{ h}$$