

BAKTERİLERİN İDENTİFİKASYON YÖNTEMLERİ

KAPSÜL BOYAMA

SPOR BOYAMA

- Bir bakterinin identifikasyonunun yapılabilmesi için; onun önce kültürünün yapılması ve daha sonra çeşitli deneylerle cinsinin ve türünün tesbiti gerekir.
- İçerisinde bulunan m.o.ları üretmek veya m.o. bulunup bulunmadığını araştırmak amacıyla, klinik materyalden alınan örneklerin özel aletler kullanılarak uygun besiyerine aktarılmasına **ekim** denir.
- Bir besiyerinde üremiş olan m.o.ların çoğaltmak, saf kültür halinde elde etmek, biyokimyasal özelliklerini incelemek vb. amaçlarla başka besiyerine aktarılmasına **pasaj** denir.
- M.o.ların çeşitli özelliklerinin incelenmesi tek koloni veya saf kültür halinde elde edilmesine bağlıdır.

Karışık kültürden saf kültür elde etmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

Bunlar:

1. Tek Koloniden Üretme ile Saf Kültür Eldesi:

- Petri kutusunda azaltma
- Dilüsyon Yöntemi (tüpte ve petride sulandırım)
- Özel besiyeri kullanma

2.Kimyasal Yöntemlerle Saf Kültür Eldesi: Kimyasal maddeler kullanarak, bunlara duyarlı olan mikroorganizmaların üremesini elimine ederek dirençli olanların saf kültürlerinin elde edilmesi amaçlanır.

3.Fiziksel Yöntemlerle Saf Kültür Eldesi: Çeşitli fiziksel etkenlere duyarlılıktan yararlanarak saf kültür eldesidir.

4.Deney Hayvanlarının Kullanılması: Bazı mikroorganizmalar, karışık kültürlerin duyarlı hayvanlara enjeksiyonları sonunda saf olarak elde edilir.

EKİM YÖNTEMLERİ

Alınan örnekler

sıvı (idrar, kan, BOS vs.),

viskoz (tükürük, balgam, irin vs.),

kati (doku örnekleri, biyopsi materyalleri vs.) olabilir.

Katı Besiyerlerine Ekim

1. Sürme Yöntemiyle Ekim: İncelenecek materyal eküvyonla steril katı besiyeri üzerinde belli bir bölgeye yayılır. Daha sonra alevde yakılıp soğutulmuş bir öze yardımıyla besiyeri üzerine tek koloni düşecek şekilde ekilir.

2. Batırma Yöntemiyle Ekim: Dik şeklindeki tüplerde dondurulmuş besiyerlerine, düz iğne özeler yardımıyla yapılır.

3. Çalkalama Yöntemi: Seri dilüsyonlar hazırlanır, steril petri veya tüplere belirli miktarlarda konular, 42 - 45 °C'ye kadar soğutulmuş besiyeri ilave edilir.

Sıvı Besiyerlerine Ekim

Tüp, balon, erlenmayerlerdeki sıvı besiyerlerine, öze veya pipet yardımı ile katı ve sıvı besiyerlerinden yapılan çeşitli amaçlara yönelik ekim şeklidir.

SAF KÜLTÜRÜN TEŞHİSİ

Saf kültürü elde edilen bir mikroorganizmanın cinsini ve türünü teşhis etmek için bazı özelliklerinin incelenmesi gerekir. Bunlar:

1. **Morfolojik İnceleme**: Bakterinin hücre şekli, büyüklüğü ve boyanma özelliklerinin incelenmesidir.
2. **Kültür Morfolojisi**: Bakterinin üremesi için gerekli sıcaklık, oksijen, besiyerinin pH'sı, koloni pigmenti ve şekli gibi özelliklerinin incelenmesidir.

3. **Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi**: Kimyasal maddeler ilave edilmiş besiyerinde üreyen bakterinin burada meydana getirdiği reaksiyon sonuçlarının incelenmesidir.

4. **Antijen Yapılarının İncelenmesi**: Çeşitli serolojik reaksiyonlarla antijenik özelliklerin incelenmesidir.

5. **Patojenliğin Tayini**: Belirli mikroorganizmalar, çeşitli deney hayvanlarında patojen özellik gösterir.

BİYOKİMYASAL TESTLER

OKSİDAZ TESTİ

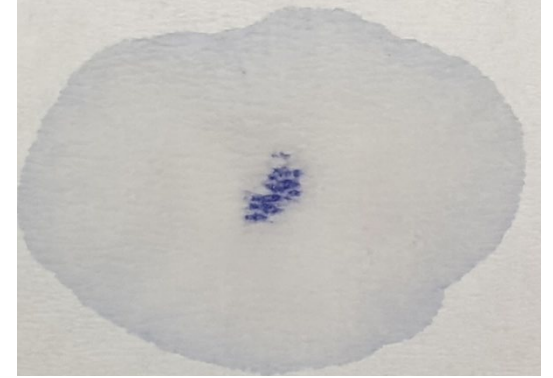
Sitokrom oksidaz, oksidatif fosforilasyon yapan bakterilerin kullandıkları enzimdir.

Sitokrom oksidaz, **fenilendiamin** bileşiklerini okside ederek **indofenole** dönüştürür.

2-3 damla oksidaz ayıracı üzerine, öze ile şüpheli koloniden bir miktar alınarak sürülür.

Kahverengi, siyah – Mor renk testin pozitif olduğunu gösterir.

Neisseria türleri oksidaz +,
Enterobacteriaceae türleri oksidaz -'tir.



Oksidaz +



Oksidaz -

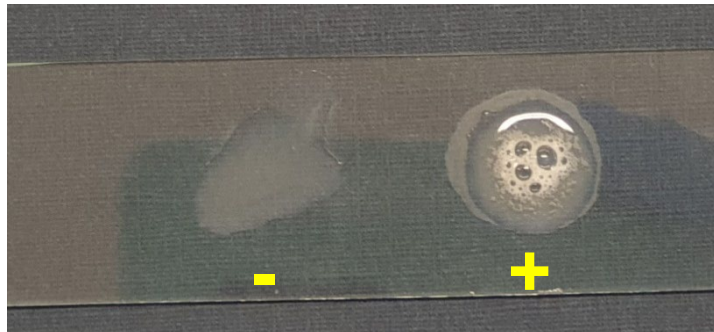
KATALAZ TESTİ

Katalaz, **hidrojen peroksit** (H_2O_2)'i parçalayarak su ve oksijene dönüştüren enzimdir.

Şüpheli bakteri kolonisinden alınan bir parça, temiz bir lam üzerinde bir damla SF içerisinde süspanse edilir ve üzerine 1-2 damla %3'lük H_2O_2 damlatılır. **Oksijen kabarcıklarının** oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

*Eritrosit içermeyen besiyeri

Staphylococcus türleri katalaz +, *Streptococcus* türleri katalaz –'tir.



KOAGÜLAZ TESTİ

Koagülaz, **fibrinojeni fibrine** dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırıcı enzimdir.

Test lam üzerinde ya da tüp içerisinde yapılabilir.

Staphylococcus'lar için önemli test.

Lam deneyinde bakteri hücreleri yüzeyinde bulunan "bağlı koagülaz" araştırılır.

Şüpheli bakteri kolonisinden bir parça öze ile alınarak lam üzerinde bir damla **sitratlı tavşan plazmasıyla** karıştırılır.

10-30 sn içinde gözle görülür kümeleşmelerin oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

Tüp deneyinde, bakterilerin buldukları ortama saldıkları "bağlı olmayan koagülaz" araştırılır.

Şüpheli bakteri kolonisi 1/5 oranında sulandırılmış **sitratlı tavşan plazması** içerisinde süspansiyon edilir ve 37 °C'lik su banyosunda 1-4 saat inkübe edilir.

Pıhtı oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

IMVIC

İndol

Metil kırmızısı

Voges Proskauer

Sitrat (**C**itrate)

Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan türlerin identifikasyonu için kullanılan birkaç farklı reaksiyondan oluşur.

a. İndol Testi:

İndol, triptofan'ın triptofanaz enzimi ile parçalanması sonucu oluşur.

İncelenecek bakteri % 1 **triptofan** içeren bir sıvı besiyerine ekilir (buyyon ya da peptonlu su). En az 24 saatlik inokülasyondan sonra üzerine, tüpün kenarından yavaşca akıtmak suretiyle, 0.5ml **Kovaks ayıracı** ilave edilir.

Besiyerinin üst kısmında parlak **kırmızı** bir halka oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

E.coli indol +, *Salmonella typhi* indol -



b. Metil Kırmızısı Testi:

Bakterilerin glukozu fermente ederek ortamın pH'ını 4.4'ün altına düşürmeleri esasına dayanır.

İncelenecek bakteri pepton ve glukoz içeren tamponlanmış **Clark-Lubs besiyerine** ekilir. En az 48 saatlik inkübasyon sonrası 5-6 damla **Metil kırmızısı ayıracı** ilave edilir.

Kırmızı renk testin pozitif, **sarı** renk negatif olduğunu gösterir.

E.coli metil red +

Klebsiella pneumoniae metil red -



c. Voges-Proskauer Testi:

Bazı bakteriler karbonhidratları parçalayarak **asetoin** (asetil metil karbinol) oluşturur.

Asetoin oluşumunu araştırmak için, **Clark-Lubs besiyerine** ekim yapılır ve 48 saatlik inkübasyondan sonra ortama

Voges Proskauer ayıraçları (α -naftol ve KOH) ilave edilir. Asetoin KOH varlığında diasetile dönüşür ve α -naftol varlığında renk kırmızıya döner.

Kırmızı renk testin pozitif olduğunu gösterir.

E.coli VP -,

Klebsiella pneumoniae VP +.



d. Sitrat Testi:

Karbon kaynağı olarak tek sitratı kullanabilen bakterileri ayırt etmek amacıyla yapılır.

Bu amaçla sitrat ve bromtimol mavisi içeren **Simmons sitrat agar** besiyeri kullanılır.

Sitratın tüketimi sonucu alkali karbonatlar ve bikarbonatlar oluşursa, pH yükselir, besiyerinin renginin **mavi**ye dönüşmesi testin pozitif olduğunu gösterir.

E.coli sitrat -

Klebsiella pneumoniae sitrat +

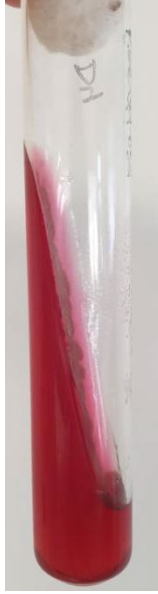


TSI (Triple sugar iron) agar:

Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerini tanımlamak amacıyla kullanılır.

Besiyerinde şekerlerin (laktoz:sükroz:glukoz – 10:10:1) fermentasyonu ve fermentasyon sonucu gaz ve hidrojen sülfid (H_2S) oluşturmaları temeline dayanır.





- Besiyerinin dip kısmı kırmızı ise bakteri glukozu fermente edememiştir.



- Glukozu fermente edip, laktoz ve sü krozu parçalayamayan bakteriler, dipte sarı, üst tarafta kırmızı renk oluştururlar. Çünkü üst kısımda yeterince asit üretilememiştir.

Fenol kırmızısı bazik ortamda **kırmızı**, asidik ortamda **sarı**dır.



- Besiyerinin tümü sarı ise glukoz, laktoz ve süktroz bakteri tarafından kullanılmış ve çok miktarda asit üretilmiştir.
- Şekerlerin fermentasyonu sonucu gaz oluşumu besiyerinin yukarı doğru itilmesi, besiyerinin yer yer parçalanmasıyla anlaşılır.



- H₂S oluşturan bakteriler besiyerinin dip kısmının siyahlaşmasına yol açarlar.

Fenol kırmızısı bazik ortamda **kırmızı**, asidik ortamda **sarı**dır.

ÜREAZ TESTİ:



Bakterilerin üreaz aktivitesini araştırmak için yapılır.

Ürenin hidrolizi sonucu ortaya çıkan amonyak alkali bir üründür ve besiyerinin rengini pembeye dönüştürür.



KARBONHİDRAT FERMENTASYONU:

Birçok bakteri karbonhidratları parçalayarak asit oluşturur.

Bazıları hem asit hem gaz oluşturur.

İçerisinde substrat olarak bir karbonhidrat, pH indikatörü olarak Andrade ayıracı ve gaz oluşumunu göstermek için “Durham tüpü” bulunan karbonhidrat besiyerleri kullanılır.

Besiyeri renginin kırmızıya dönüşü asit oluşumunu, Durham tüpünde gaz kabarcığı görülmesi gaz oluşumunu gösterir.

NİTRAT REDÜKSİYONU:

Nitrat redüktaz enzimine sahip bakteriler nitratı redükte ederek nitrite dönüştürürler.

Besiyeri renginin kırmızıya dönüşmesi, ortamda nitrit varlığını gösterir.

Enterobacteriaceae ailesinin üyeleri genel olarak nitratları redükte eder.

DİĞER BİYOKİMYASAL REAKSİYONLAR:

-Oksidasyon fermentasyon testi

-Arginin dihidrolaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz testleri

-Jelatinaz testi

-Eskülin hidrolizi testi

-Fenilalanin deaminaz testi vb.

KAPSÜL

Bazı bakterilerde hücre zarfının en dış kısmını oluşturur.

Hücre duvarının etrafında bulunan genellikle polisakkarit yapısındaki tabakadır. Bazı bakterilerde kapsül maddesi mukoid görünümündedir.

0.2 – 10 µm kalınlığında olabilir.

Yapısı gevşek olup %95-98 oranında su içerir. Bu yüzden hücre zarının geçirgenliğini engellemez.

Bacillus anthracis
kapsülü

D-glutamik asit
ünitelerinden
oluşan polipeptit
yapıdadır.

- Bazı bakteri kapsülleri yoğun bir katman halinde değil, fibrillerden oluşmuş gevşek bir ağ şeklinde bulunur, bu tür kapsüllere “**glikokaliks**” denir. Örn; *Streptococcus mutans*
- Patojen bakterilerin virulansı genellikle kapsül oluşturma yetenekleriyle direkt ilişkilidir.
- Kapsül, bakteriyi fagositoza karşı korur, patojen bakterilerin dokuda yayılımını kolaylaştırır.
- Kapsül, canlılığın devamı için zorunlu bir yapı değildir.
- Çevresel faktörlerin etkisiyle ortadan kaldırılabilirdiği gibi, uygun koşullarda yeniden oluşabilir.
- İyi antijenik yapı gösterirler.
- Kapsül bazik boyalarla kolay boyanmadığından basit boyamalarda görülmez. Negatif boyamalarla gösterilir.

SPOR

Protoplast
Peptidoglikan içeren spor kılıf
Kabuk(korteks)
Protein kılıf
Eksosporium (kh.lı protein zar)
Kalsiyum dipikolinat

Bazı bakterilerin uygun olmayan çevre şartlarında oluşturduğu, ısı ve kuruluk gibi fiziksel faktörlere karşı ve yetersiz beslenme şartlarında dayanıklılığını arttıran yapıdır.

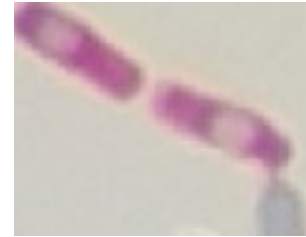
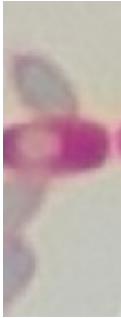
Üreme elemanı değildir.

Uygun olmayan koşullarda spor oluşması – sporulasyon

Uygun koşullarda sporun açılıp vejetatif bakterinin ortaya çıkması-
jerminasyon.

Bakteri sporları protoplasma ve kalın bir kılıftan oluştuğu için kuvvetli boya çözeltileri ile ve alttan ısıtmak suretiyle boyanırlar.

- Sporlar yuvarlak veya oval şekilli olabilir.
- Bazı bakteri sporları, bakterinin kendisinden daha geniş olup şişkinliğe yol açarken (Örn; *Clostridium tetani*), bazıları hücrenin genişliğini aşmazlar (Örn; *Bacillus anthracis*).
- **Bakterideki yerleşim bölgelerine göre sporlar;**
Bakterinin bir ucunda ise **Terminal**
Ortasında ise **Santral**
Ucu ile ortası arasında ise **Subterminal**



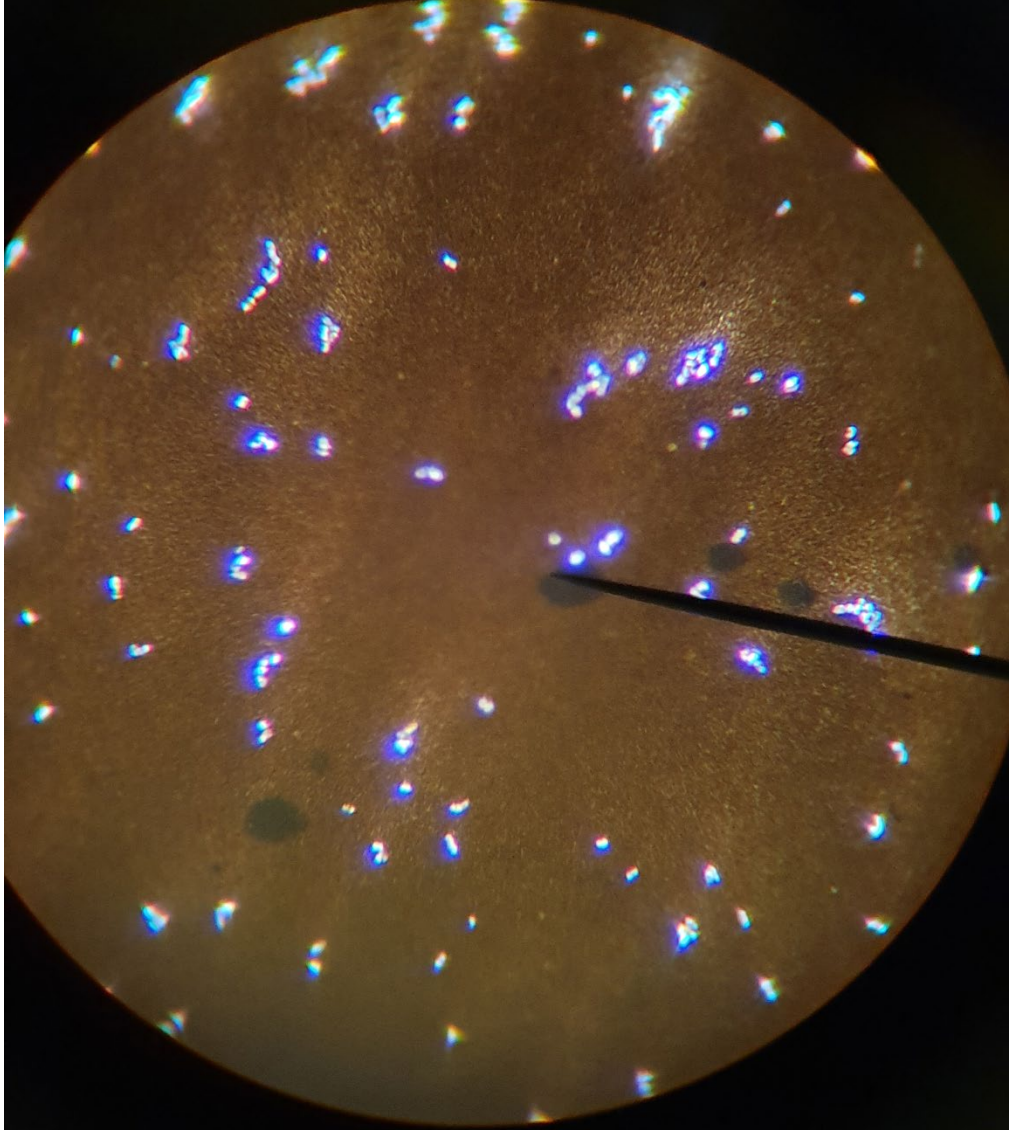
Konu: Kapsül Boyama

Yöntem: Kapsül Boyama (Gins Yöntemi)

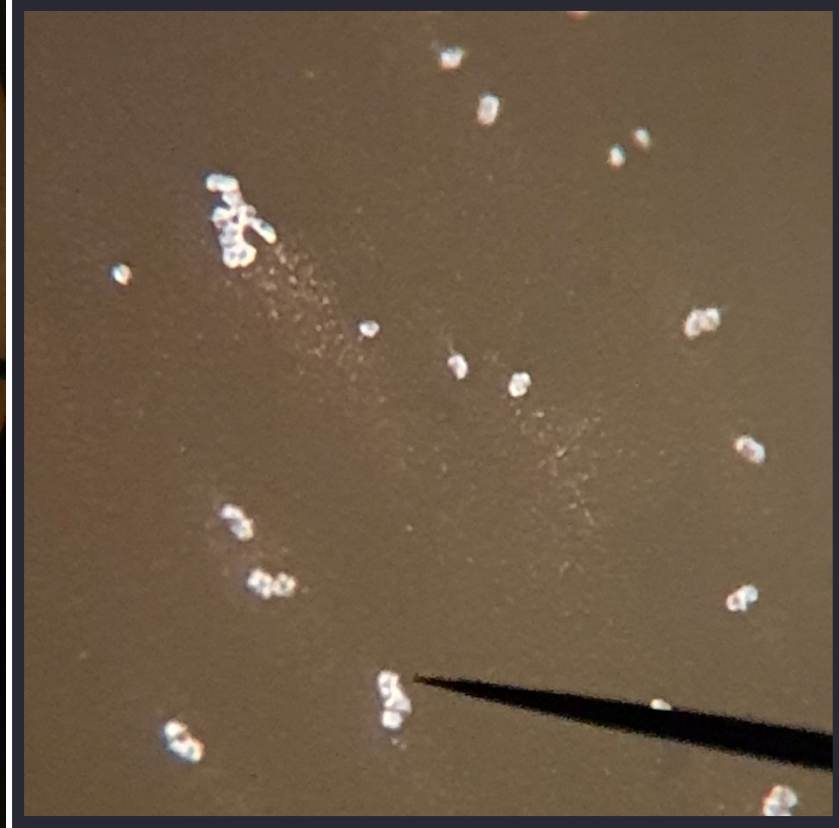
- Preparat tesbit edilir
- Metilen mavisi (sulu fuksin) dökülür
- 1 dakika beklenir
- Su ile yıkanır ve kurutulur
- 100X'lük objektifle incelenir



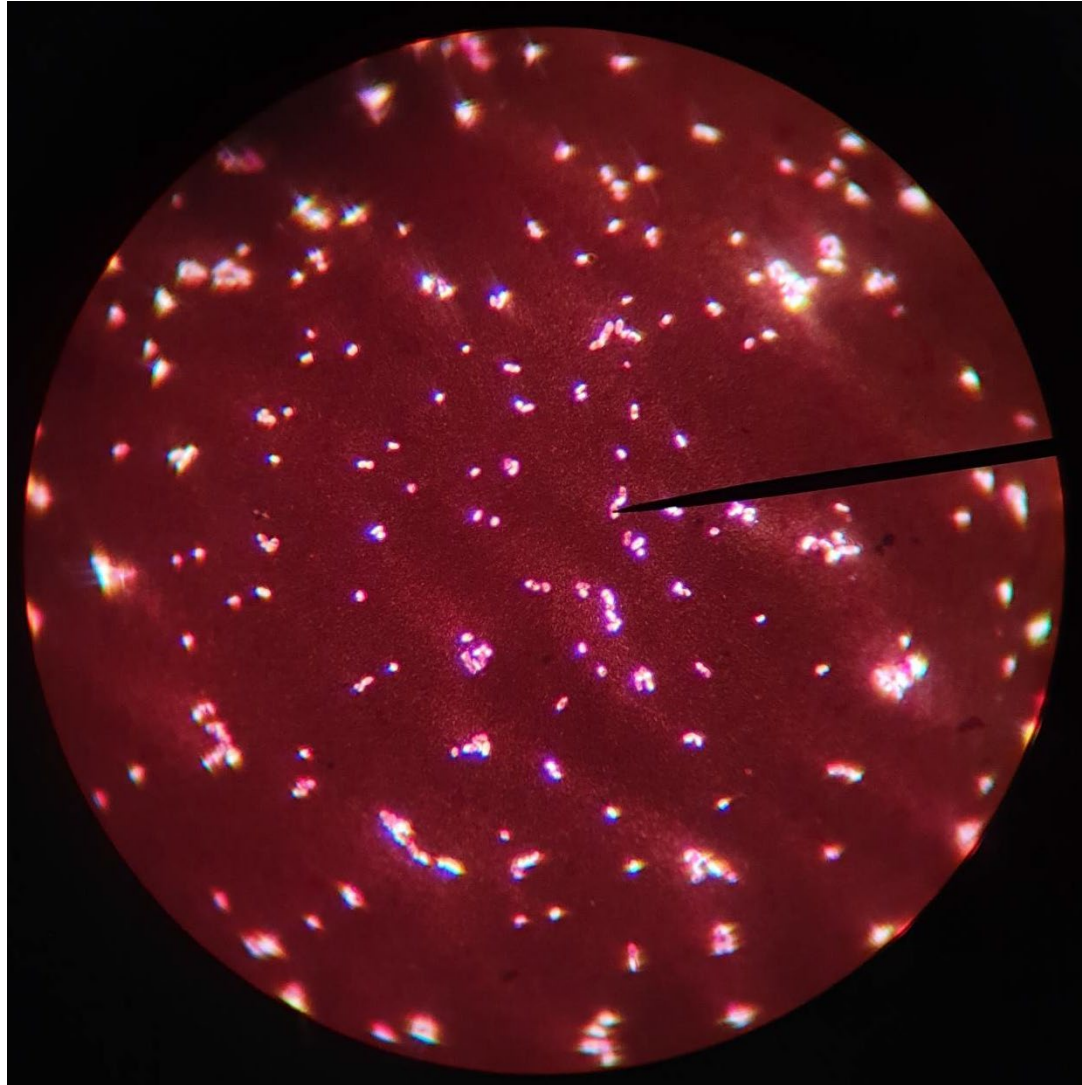
Kapsül Boyama Mikroskop Görüntüsü



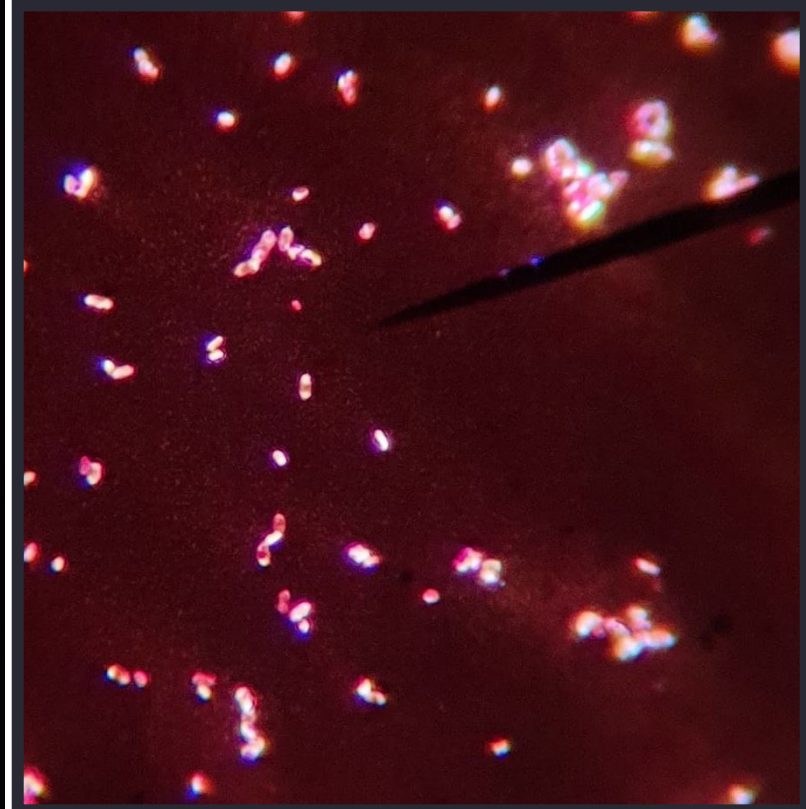
Metilen mavisi



Kapsül Boyama Mikroskop Görüntüsü



Sulu fuksin



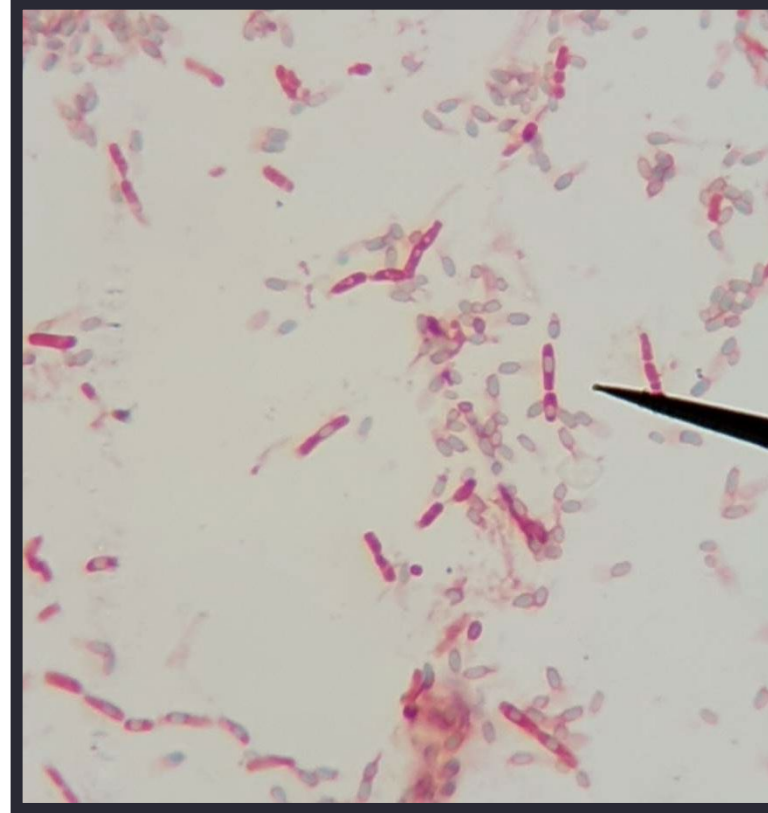
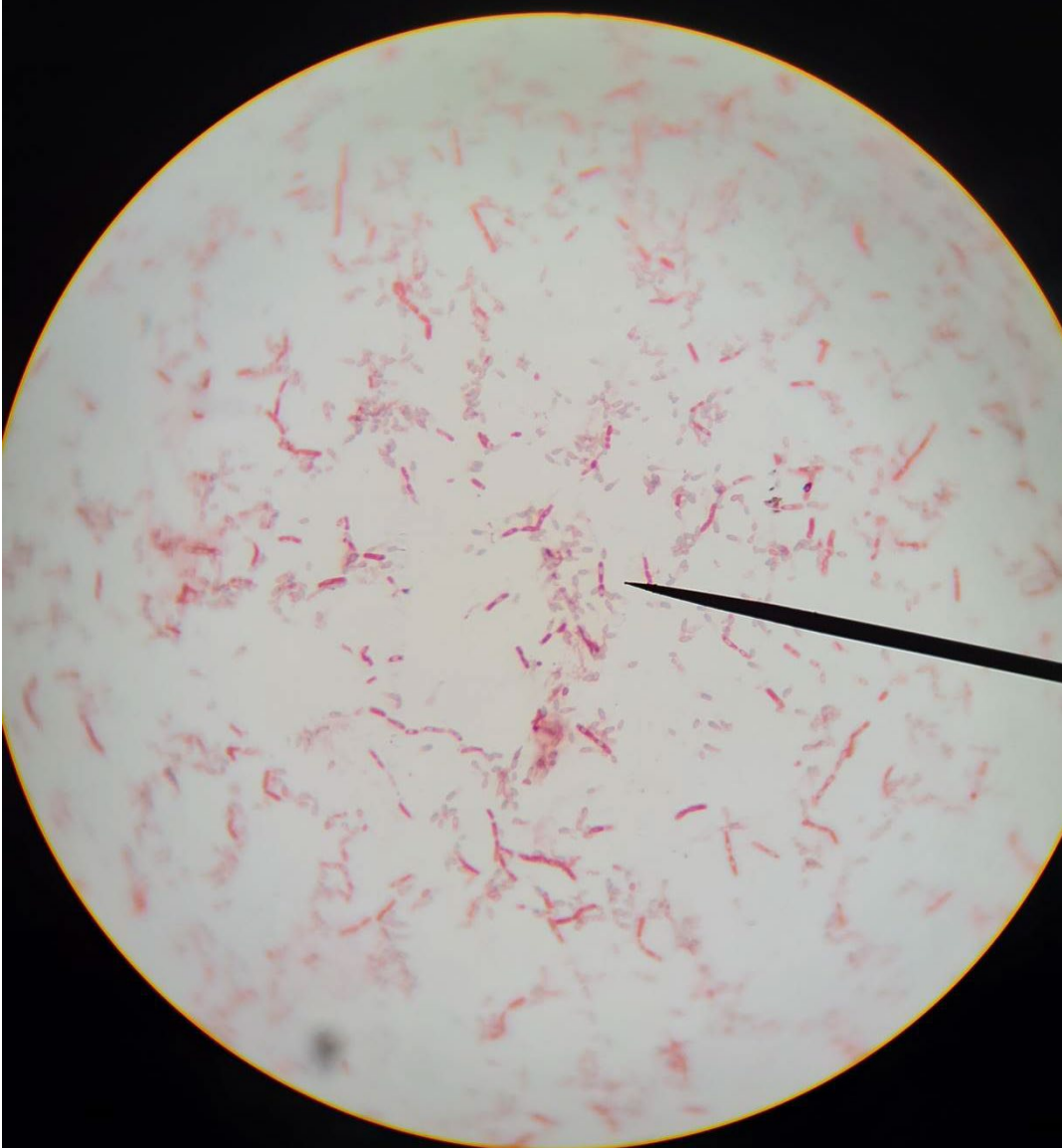
Konu: Spor Boyama

Yöntem: Spor Boyama (Wirtz-Conklin Yöntemi)

- Preparat tesbit edilir
- Malaşit yeşili dökülür
- 6-7 dakika alttan kaynatmadan ısıtılır
- Su ile yıkanır
- %0,5'lik safranin dökülür
- 1 dakika beklenir
- Su ile yıkanır ve kurutulur
- 100X'lük objektifle incelenir



Spor Boyama Mikroskop Görüntüsü



REFERANSLAR

- Diagnostic Microbiology 4th edth. Bailey&Scott. 1974, 414 p.
- Klinik mikrobiyolojik Tanı. Prof.Dr. Hakkı Bilgehan. 1992, 680 p.
- Principles of Microbiology, 2th edth. Ronald M. Atlas.1997, 1298 p.
- Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Prof.Dr.Hakkı Bilgehan, 2000.
- Mikrobiyoloji Pratik Kitabı, Editör A. Tevfik Cengiz, 2001.