

MİKROORGANİZMALARIN KULLANILAN KRİTERLER:

KLASİFİKASYONUNDA

(SINIFLANDIRILMASI)

- 1-Kültürel özellikler
- 2-Morfolojik özellikler
- 3-Biyokimyasal (Metabolik) özellikler
- 4-Kimyasal özellikler
- 5-Antijenik özellikler
- 6-Genetik özellikler

1-KÜLTÜREL ÖZELLİKLER: Laboratuvar koşullarında mikroorganizmaların geliştirildiği ortamlara kültür ortamları denilmektedir. Mikrobiyel kültür ortamları geliştirilmesi düşünülen mikroorganizmanın besinsel gereksinimlerine göre oluşturulur. Mikroorganizma gelişimlerinin sağlanması için bulunduğu ortamın bazı fiziksel/çevresel koşulları taşıması gerekmektedir.

Bu koşullar da şu şekilde sıralanabilir:

- Hava (Oksijen) varlığı
- Sıcaklık
- Ortam pH'ı (Asitlik düzeyi)
- Ozmotik konsantrasyon
- Su aktivitesi

1.1. Hava (Oksijen) Varlığı: Mikroorganizmalar oksijen isteklerine göre 4 grup altında sınıflandırılır.

-Aerob mikroorganizmalar: Gelişebilmeleri için mutlak oksijen varlığına ihtiyaç duyarlar.

-Anaerob mikroorganizmalar: Mutlak anaerob şeklinde de söylenebilir. Gelişebilmeleri için ortamda oksijen bulunmaması gerekir.

-Fakültatif anaerob mikroorganizmalar: Oksijen varlığında veya yokluğunda gelişme gösterebilirler. Ortamda oksijen varsa oksijenli solunum yaparlar ancak oksijen yokluğunda oksijensiz solunuma (fermentasyon) geçebilir.

-Mikroaerofilik mikroorganizmalar: Düşük miktarda serbest oksijen varlığında gelişebilirler.

1.2. Sıcaklık: Mikroorganizmalar sıcaklık isteklerine göre 3 grup altında sınıflandırılırlar.

-Psikrofil (soğuk seven) mikroorganizmalar: Optimum 5-20°C arasında gelişebilirler. Buzdolabı sıcaklığında gelişebilen, gıda mikrobiyolojisi açısından önemli pek çok mikroorganizma bu grupta sınıflandırılır. Soğuğa karşı toleranslıdır. Minimum 0 °C'de gelişebilirler. Enzim üreten bakterilerinin enzimleri -5 -+20 °C arasında aktivite gösterebilirler.

-Mezofil mikroorganizmalar: Optimum gelişme sıcaklıkları 25-45 °C arasında olan mikroorganizmalardır. Doğadaki mikroorganizmaların çoğu ve patojen mikroorganizmaların bir çoğu mezofiliktir.

-Termofil (sıcak seven) mikroorganizmalar: Optimum gelişme sıcaklıkları 45-60 °C arasında olan mikroorganizmalardır. 60 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda optimum gelişim gösteren türler ‘‘ekstrem termofil mikroorganizmalar’’ olarak tanımlanır. Bu grup bakterilerin ve sporlarının pastörizasyon sıcaklığına dayanıklı olabileceği bilinmektedir.

1.3. pH gereksinimi: Her mikroorganizmanın gelişebildiği minimum ve optimum bir pH değeri vardır. Bakteriler çoğunlukla nötr ve hafif asidik pH'da gelişebilir. Bakterilerin optimum gelişme pH'ları 6.5-7.5 arasında iken gelişebildikleri pH aralığı 4.5-9.0'dur. Küf ve mayalar daha geniş bir pH aralığında gelişebilirler.

1.4. Ozmotik konsantrasyon: Mikroorganizma gelişiminde sağlanması gereken bir diğer çevresel koşul ortamın ozmotik konsantrasyonu'dur. Genellikle tuz ve şeker ortamın ozmotik konsantrasyonunu dengede tutar. Ozmotik konsantrasyon isteklerine göre mikroorganizmalar ikiye ayrılır.

-Yüksek tuz konsantrasyonunda gelişebilenler (Halofiller): %10-15 tuz konsantrasyonunda gelişebilirler. Örneğin; Halobacterium

-Yüksek şeker konsantrasyonunda gelişebilenler (Ozmofiller): %70'e varan şeker konsantrasyonlarında gelişebilirler. Örneğin; ozmofilik mayalar

1.5. Su aktivitesi: Su aktivitesi, ürün içerisindeki suyun buhar basıncının aynı sıcaklıktaki saf suyun buhar basıncına oranıdır. Gıdalarda bahsedilen su aktivitesi, gıdanın yüzeyinde mikroorganizmaların kullanabileceği su miktarıdır. Su aktivitesi ozmotik basınç ile ters orantılıdır. Eğer ortam yüksek ozmotik basınca sahipse ortamın su aktivitesi düşüktür.

Su aktivitesi 0-1 arasında değişir. Gıdalarda bozulmalara neden olan bakterilerin su aktivitesi 0.90, halofilik mikroorganizmaların 0.75 değerlerindedir. Su aktivitesi değeri 0.60'ın altında olan gıdalarda mikrobiyel gelişim görülmez.

Beslenme tiplerine göre ise mikroorganizmaların sınıflandırılmasında 3 temel enerji kaynağı esas alınmaktadır:

1-Karbon (C) kaynağına göre:

-Ototrof mikroorganizmalar: Karbon kaynağı olarak inorganik C'lu bileşikler (ör. CO₂) kullanırlar. Çoğunlukla toprak ve suda yaşarlar.

-Heterotrof mikroorganizmalar: Karbon kaynağı olarak organik bileşikler (karbonhidrat, aminoasit, vitamin, yağ vb.) kullanırlar. Mikroorganizmaların çoğunluğu (patojenler dahil) bu gruptandır.

2-Enerji kaynağına göre:

-Kemotrof mikroorganizmalar: Enerji kaynağı olarak inorganik bileşikler (NH₃, NO₂, H₂S, Fe, S₂O₃ gibi) kullanırlar.

-Fototrof mikroorganizmalar: Enerji kaynağı olarak ışık enerjisini (güneş ışığı), kullanırlar.

-Fotolitotrof mikroorganizmalar: Işık enerjisini inorganik bileşiklerden yararlanmak için kullanırlar.

-Fotoorganotrof mikroorganizmalar: Işık enerjisini organik bileşiklerden yararlanmak için kullanırlar.

3- Hidrojen /elektron kaynağına göre:

-**Litotrof mikroorganizmalar:** Metabolizmaları için inorganik bileşikleri (NH₃, NO₂, H₂S, Fe, S₂O₃ gibi) elektron vericisi olarak kullanırlar.

-**Organotrof mikroorganizmalar:** Organik bileşikleri elektron vericisi olarak kullanırlar.

2-MORFOLOJİK ÖZELLİKLER: Mikroorganizmaların mikroskoptaki görünüşlerini esas alarak yapılan sınıflandırmadır.

Bakteriler 3 farklı şekildedir:

1-Yuvarlak (kok) şekilli bakteriler:

-Monokok (tekli): Bölündükten sonra birbirlerinden tam olarak ayrılan koklara denir.

-Diplokok (ikili): Bölündükten sonra iki hücre arasında bağ oluşturarak yapışık kalan koklar diplokok'tur.

-Streptokok (zincir): Bölündükten sonra birbirlerine paralel veya devamlı zincir şeklinde dizilen hücrelere streptokok denir.

-Sarsina: Paket biçiminde kübik hücre yığılı koklardır.

-Stafilokok (üzüm salkımı):Hücre bölünmesi bir çok yönde düzensiz veya irili-ufaklı gruplar haline ise stafilokok denir.

2-Çubuk (basil) şekilli bakteriler:

-Kokobasil: Çomak şeklinde boyları enlerine yakın olan elipsoid bakterilerdir.

-Difteroid:Uçları veya ortaları şişkin çubuk şeklinde bakterilerdir.

-Streptobasil: Birbirlerine degecek şekilde tek tek zincir oluştururlar.

3-Sarmal (spirillum veya spiroket): Yalnız bir kıvrımlı olabildiği gibi 10-15 kıvrımlı olanları da vardır.

-**Spiroket:** Vücutları kıvrılabilen, bükülebilen, yılanı şekilli sarmal bakterilerdir.

-**Vibrio:** Sert vücutlu, kıvrılmayan sarmal bakterilerdir.

4- Pleomorfik bakteriler: Bazı koşullar altında, değişik morfolojik özellikler gösteren bakterilere rastlanmaktadır. Bu bakteriler 3 grupta toplanabilir:

- **PPLO (Pleuro pneumonia like organism) – formu bakteriler :** İnsan ve hayvanlarda birçok hastalıklara neden olan mikoplazmaların hücre duvarları yoktur. Bu nedenle sıvı kültürlerinden hazırlanan preparatlarında oval, yuvarlak, yıldız, halka, yüzük vb değişik morfolojik özellik gösterenlerine rastlanır (örneğin; *Mycoplasma pneumonia* gibi).

- **L – formu bakteriler:** Bakteriler, hücre duvarı sentezini engelleyen kimyasal maddelerin (penisilin gibi) bulunduğu ortamlarda üretilirse, hücre duvarına sahip olmayan formları meydana gelir. Oval, yuvarlak, disk, yıldız vb biçimler gösteren bu formlara L - formları adı verilir.

Değişken ve değişken olmayan L-formları olmak üzere iki tipe olurlar. Değişken L-formundaki bakteriler ortamdaki kimyasal etken uzaklaştırıldığında tekrar eski şeklini alır ve hücre duvarını sentezlerler. Değişken olmayan L-formundaki bakteriler ise bu anormal yapıda üremelerini sürdürürler.

- **İnvolyon formları (atipik veya düzensiz hücre formları)** : Mikroorganizmaların üretildikleri besi ortamının karakterinin değişmesi (besin maddesi, pH, ozmotik basınç ve oksijenin azalması; metabolitlerin birikmesi gibi) halinde morfolojik şekillerinde değişimler meydana gelir. Uzun, oval, filamentli, dallanmış, şişmiş, köşelenmiş formlar, bölünmenin gecikmesi gibi anormallikler bu tip değişimler arasındadır. Besi ortamında optimal koşullar sağlanırsa, bakteriler eski normal biçimlerine kavuşurlar.

Mikroskop: Mikroorganizmaların genel yapısı, organizasyonu, boyutlarının tanımlanmasında, çalışma alanına yönelik olarak değişik mikroskoplar kullanılmaktadır.

-Oküler: Tüpün üst kısmında objektiflerin bulunduğu kısımdır.

-Objektifler: Okülere bağlı değişik büyütme oranlarına sahip (10X, 40X, 100X gibi) merceklerdir.

-Diyafram: Işığın sağlandığı kısımdır.

-Kondansör: Işığın yoğunluğunun ayarlandığı kısımdır.

-Kaba ve ince ayar düğmeleri: Sırayla, kaba görüntünün bulunması ve daha net görüntünün elde edilmesi için kullanılan düğmelerdir.

Mikroskop Çeşitleri

- **Parlak alan Işık Mikroskobu:** Bu tip mikroskoplarda, mikroskopik alana parlak ışığın düşmesi esastır. İncelenen objeler mikroskopik alan zemininde (saha) daha parlak görünür. Maximum büyütme gücü x1000'dir. Genel mikroorganizma morfolojisinin incelenmesine uygundur.
- **Karanlık alan Işık Mikroskobu:** Araştırılan obje dışında kalan alan tamamen karanlık, objeler ise parlak şekilde görülür. Normal ışık mikroskobuna özel kondanser ilavesi ile oluşturulur. Özellikle boyanmamış mikroorganizmaların morfolojik incelenmesinde kullanılır.
- **UV-Işık Mikroskobu:** UV ışığın dalga boyu görünen ışıktan düşük olduğu için bu mikroskop ile daha yüksek oranda çözme gücü (ışık mikroskobunun x2 katı) elde edilir. Hücre ince yapılarının incelenmesinde kullanılır.
- **Fluoresans-Işık Mikroskobu:** Bazı kimyasallar UV ışığı absorbe ederek, görülebilir dalga boyunda verme özelliğine sahiptir. Bu ışık değişik renklerde oluşur. Bu özelliğinden yararlanarak mikroorganizmalar söz konusu boyalarla boyanarak incelenebilir. Özellikle immünolojik araştırmalarda kullanılmaktadır.
- **Faz-Kontrast Mikroskobu:** Bu mikroskopta esas, ışığın objeler üzerine farklı kırınımlarla gönderilmesidir. Bu sayede objenin değişik bölgelerinde farklı ışıklandırma sağlanarak detayların görünmesi mümkün olur. Mikroorganizmaların hücre yapılarının görülmesini sağlar.
- **Elektron Mikroskobu:** Bu mikroskopta 60.000 voltta hızlandırılmış ve etkin dalga boyu 0.05 Angstrom ($A^\circ:10^{-8}cm$) olan elektronlar kullanılır. Çok küçük dalga boyu kullanılmasından dolayı büyütme güçleri ışık mikroskoplarında > 1000 kez daha yüksektir. Virüsler gibi çok küçük boyutlu (bakterilerden x100 kat daha küçük) mikroorganizmaların incelenmesini mümkün kılar.

3-METABOLİK (BİYOKİMYASAL) ÖZELLİKLER: Mikroorganizmaların metabolik özellikleri kültür ortamına ilave edilen substratları kullanma yetenekleri takip edilerek belirlenir.

4-KİMYASAL ÖZELLİKLER (KEMOTAKSONOMİ): Mikroorganizmaların hücre duvarı yapısı, çekirdek materyali, ve sitoplazmalarında bulunan organeller ayrı ayrı izole edilerek proteinler, aminoasitler, yağ asidi profili, enzim yapısı gibi ana bileşenleri belirlenebilmektedir. Örneğin; bakteri hücre duvarının kimyasal yapısı, algler ve funguslardan önemli ölçüde farklılık gösterir. Hücre duvarı bileşimi bakterilerin içindeki gruplar arasında da ayırt edici özelliğe sahiptir. Bu özelliklerden yararlanılarak bakteriler Gram pozitif ve gram negatif olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Virüslerde de içerdikleri nükleik asitlerin türüne göre gruplandırma yapılabilmektedir (DNA veya RNA virüsleri gibi)

5-ANTİJENİK ÖZELLİKLER: Antijen antikor üretimini tetikleyen toksin veya enzim halindeki herhangi bir unsurdur (farklı bir organizmaya verildiğinde antikor oluşumuna yol açan madde). Bir maddenin antijenik özelliğe sahip olması molekül yapısının başka bir organizmanın bağışıklık sistemi için yabancı olması anlamına gelir. Bir bakterinin hücre duvarı, pillus, flagella, kapsül gibi bölümlerinde antijenik özellik gösteren moleküller vardır. Antijen-antikor ilişkisinin oldukça spesifik bir reaksiyon olması nedeniyle bu mikroorganizma gruplarının antijenik özelliklerinden yararlanılarak tanımlanması güvenilir yöntemlerden biridir.

6-GENETİK ÖZELLİKLER: Mikroorganizmaların genetik materyalleri, özellikle de deoksiribonükleik asitleri (DNA) arasındaki homojenlik (benzerlik) durumlarına dayanan bir sınıflandırma şeklidir.

Homoloji çalışmalarında iki özellikten faydalanılabilir:

1-Araştırılan türlerin % DNA baz kompozisyonlarının belirlenmesi:

Bütün nükleik asitlerin yapısında pürin (adenin, guanin) ve pirimidin (sitozin, timin, urasil) bazları ile pentozlar (riboz, deoksiriboz) bulunmakta, ribozlar fosforik asitlerle fosfat-di-ester bağı yaparak birbirlerine bağlanmaktadır. DNA'nın yapısında adenin, guanin, timin, sitozin bazları ile deoksiriboz şekeri bulunmaktadır. Ribonükleik asitte (RNA) ise timinin yerine urasil, deoksiribozun yerine de riboz geçmiştir. DNA moleküllerinin hepsinde adenin miktarının sitozin miktarına eşit olduğu gösterilmiştir. Diğer bir ifadeyle, adeninin timine, guaninin sitozone oranları aynı ve 1'e eşittir. Buradan da, pürin bazları toplamının pirimidin bazları toplamına eşit olduğu anlaşılmaktadır.

$$A=T \quad G=C \quad A \div T = G \div C = 1 \quad \text{veya} \quad (A+G) = (T+C) \quad (A+G) \div (T+C) = 1$$

Fakat, DNA molekülündeki adenin ve timin toplamının, guanin ve sitozin toplamına oranı 1'den büyük ya da küçük olup, nadiren 1'e eşit bulunmaktadır.

$$(A+T) \div (G+C) > 1; \quad (A+T) \div (G+C) < 1; \quad (A+T) \div (G+C) = 1$$

Bu oran bakteri türleri arasında farklılık gösterir, fakat her bir bakteri türünde sabittir.

Taksonomik çalışmalarda, hücre DNA'sında saptanan G+C toplamının % oranı dikkate alınarak bakterilerin akrabalık dereceleri saptanmaya çalışılır. DNA homolojisi adı verilen teknikte, bilinmeyen bakteri DNA sarmalının bir polinükleotid iplikçığı, bilinen bakterilerden ayrı ayrı elde edilen DNA'ların tek polinükleotid iplikçikleri ile karşılaştırılır ve DNA homologluğunun % oranına bakılır. Hesaplamalar sonucunda % G + C oranı bakımından aralarında %10'dan fazla fark olan bakterilerin aynı türden olmadığına karar verilir.

$$\%(G+C) = \frac{G+C}{A+T+G+C} \times 100$$

2-Türlerin DNA baz dizilimlerinin benzerliğinin tanımlanması:

Türlerin baz dizilimlerinin benzerliğinin saptanmasında kullanılan DNA hibridizasyonunda esas; DNA moleküllerinin denatüre edilerek tek zincir haline getirilmesi ve bu tek zincirlerin uygun reaksiyon koşullarında rekombine edilmeleridir. Benzer bölgeler eşlenecek benzemeyen bölgeler arasında ise bağ oluşmayacaktır. Hibridizasyon (eşleme) oranı esas alınarak türler arasındaki benzerlik saptanmaktadır.

7-SAYISAL (NÜMERİK) SINIFLAMA: Görünüm, hücre yapısı, boyanma özellikleri, hareket, spor, üreme özelliği, koloni görünümü, metabolizma, enzimler vb gibi kimyasal, biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik pek çok özellik incelenir. Çoğunlukla bakteriler için kullanılır. Değerlendirme yapabilmek için, her iki bakteride benzer olan özelliklerin toplamı ve benzer olmayan özelliklerin toplamı belirlenir. Bulunan değerler incelenen toplam özellik sayısına oranlanarak suretiyle iki mikroorganizma arasındaki benzerlik indeksi (% S) veya benzerlik katsayısı hesaplanır. İncelenen iki bakteri arasında %90 ve daha yüksek oranda benzerlik bulunursa bu iki bakterinin aynı türe ait olduğuna karar verilir.

Kaynaklar:

- 1- Akçelik, M. 1999. Genel Mikrobiyoloji Ders Notları. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- 2- Erkmen, O., Gıda Mikrobiyolojisi, Efil Yayınevi, Ankara, 2011.
- 3- Gürsel, A. (Editör). 2015. Mikrobiyoloji, Ankara Üniversitesi Yayınları No:449, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, Türkiye, 206 sayfa. ISBN: 978-605-136-189-5.