

## Konu 11

## BAKTERİ İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILAN STANDART, BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK TESTLER

*Aydın M. Bakteri identifikasyonunda kullanılan standart biyokimyasal ve fizyolojik testler. Ed. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel Mikrobiyoloji. Konu 11. Sa:91-110. Güneş yayınevi, Ankara, 2004.*

Birçok infeksiyon hastalığında patojen mikroorganizmanın kimliğinin tespit edilmesi tedavinin ilk basamaklarından birisini oluşturur. Bir mikroorganizmanın kimliklendirilmesi **identifikasyon** adını alır. İdentifikasyon işlemleri, o bakterinin ait olduğu genusun ve spesifik epitelinin belirlenmesine kadar devam ettirilir. Gerektiğinde tiplerine (serotip, genotip.. vs) ve varyetelerine kadar ilerletilir.

Bir bakterinin taksonomik cetvelde doğru adresini tespit etmek, ancak hangi ortak atayı paylaştığına bakarak mümkün olur. Bir bakterinin soy ağacının tespit edilmesi, o bakterinin atasından getirdiği genetik mimariyi (DNA homolojisi ve rRNA oligonükleotit kataloğunu) esas alır ve herhangi bir sebeple geçici olarak edinmiş olabileceği fenotipik özelliklerinden bağımsızdır. Fakat her laboratuvarında rutin olarak yapılamayacak kadar zor, zaman alan ve pahalı işlemler gerektirir. Bu nedenle incelenecek bakterinin fenotipik profiline bakılarak identifikasyonunun yapılması günceldir, hızlı sonuç verir ve gereklidir. Bu amaçla, incelenen bakteri örneği laboratuvarında çeşitli (biyokimyasal ve fizyolojik) testlere tabi tutularak hangi testlere nasıl reaksiyon verdiği tespit edilir. Test sonuçları, önceden hazırlanmış tablolar ile karşılaştırılarak, o bakterinin genus ismi ve spesifik epiteli bulunur.

İdentifikasyona fenotipik profilin esas alınması monotetik bakterilerin identifikasyonu için yeterlidir. Fakat politetik bakteriler için aşağıdaki sebeplerle bazen yanıltıcı olabilmektedir:

- bakteriyel taksonominin kalabalık olması,
- bazı türlerin varyetelerinin (biyovar, serovar, patovar, fagovar, morfovar) bulunması,
- fenogramın hiyerarşik yapısı,
- incelenecek bakteri örneğinde herhangi bir zamanda olabilecek fenotipik (ve hatta genotipik) adaptasyonel değişimler,
- bakterilerin konjugasyon ve transdüksiyon yolu ile birbirlerine bazı biyokimyasal davranışları aktarabiliyor olması, (örneğin proteaz, üreaz, aminoasit kullanımı, laktoz, sukroz, rafinoz, galaktoz, ksiloz ve sitrat kullanımı aktarılabılır özelliklerdir. Ayrıca streptokoklar ve stafilokoklar arasında hemolizin ve koagülaz yapımı da aktarılabilmektedir),
- her bakterinin birden fazla fenonunun bulunabileceği ,
- spontan pleiotrofik mutasyonlar olabileceği,
- aynı laboratuvarında aynı bakteri örneğine yapılan her 100 testten 5 tanesinin aykırı sonuç verdiği,

gözönüne alındığında doğru identifikasyon yapmanın zor olduğu daha iyi anlaşılır. Bu fenotipik karakter değişimleri, tahminlerin ve bilinenin çok üzerindedir. Bir bakterinin mevcut fenotipik kimliğini yeni mi kazandığını yoksa atasal kimliği mi olduğunu DNA homoloji testleriyle bile anlamak zordur. Bakteriler arasında aktarılan bir özellik, identifikasyonda rehber alınan bir özellik ise kusurlu sonuçlara kaynak teşkil edebilir. Ayrıca 9 numaralı kaynakta yazdığına göre, identifikasyon testlerinde nerede durulacağını bilmek zordur. İncelenen her bakteri örneği aynı konağın başka florasından izole edildiğinde, hatta aynı konağın aynı florasından başka bir tarihte yeniden izole edildiğinde bile farklı bir fenotip gösterebilmektedir. Her bakteri suşu kendine has ve ansiklopedik olmayan karmaşık bir doğaya sahiptir. İdentifikasyonu yapılan herhangi bir bakteri suşu herhangi bir zamanda kendi genusuna özgül olan biyokimyasal kuralları ihlal edebileceği

gibi, kural ihlal etmeyi alışkanlık haline getiren bakteriler de vardır (*Franciella novicida* gibi).

Bütün bu bilgiler doğrultusunda ortaya çıkan gerçek odurki; incelenecek mikroorganizmaya laboratuvar koşullarının elverdiği en çok sayıda testi yapmak ve tek bir test sonucuna gereğinden fazla bağlı kalmamak gerekir. Ayrıca, mümkün olursa bakteriyel identifikasyonu bilgisayar yardımı ile ve taksometrik esaslar doğrultusunda yapmak en doğru sonucu verebilir.(Bkz. Ek-4).

### **FİZYOLOJİK TESTLER:**

Bakteri hücrelerinin metabolik faaliyetlerine dışardan hiçbir müdahale yapılmadığı ve sadece gözlem esaslı testlerdir, başlıcaları şunlardır:

#### **Anaerop üreme:**

**Tanım:** Bu test, bakterinin zorunlu anaerop mu olduğunu ifade eder.

**Prensip:** Bakteri kendisine en uygun iki ayrı besiyerine ekilerek birisi aerop, diğeri anaerop olarak inkübe edilir.

**Değerlendirme:** Anaerop besiyerinde olmasına rağmen aynı bakteri kolonisinin aerop besiyerinde bulunmaması o bakterinin zorunlu anaerop olduğunu gösterir.

Subpasajlara bu testi yapmak güvenli sonuç vermeyebilir. Çünkü birkaç pasajdan sonra birçok anaerop bakteri oksijen toleransı geliştirebilir ve aerop ortamda kısmen üremeye başlayabilir.

Yanlış pozitif sonuçlar *Haemophilus* genusunda olabilir. Bu bakteriler aerop ortamda faktör X (*Protoporphirin IX*) gereksindiği halde anaerop ortamda buna gereksinim göstermez. *Haemophilus*'lar çukulata agar dışında bir besiyerine ekilerek bu test yapıldıysa anaerop ürer ama aerop üremeyebilir. Böyle bir yanlış pozitif sonuca karşı dikkatli olmak gerekir.

Yanlış negatif sonuçlar ise disgonik anaerop genoslarda olur. Bazı anaeroplarda 4-7.inci günden sonra üreyebilirler (*Actinomyces* gibi). Bu nedenle besiyerleri 2.inci günde yoklanarak, 7.inci gün sonuna kadar bekletilmelidir.

#### **Gram boyama :**

**Tanım:** Boya maddesine geçirgen olan hücre duvarının mimarisi hakkında bilgi verir. (Gram kelimesi özel isimdir, büyük harf ile başlayarak yazılmalıdır).

**Prensip:** Kristal viyole hücre duvarındaki peptidoglikan kompleksine penetre olur. Eğer hücrede dış duvar yok ise (yani incelenen bakteri Gram negatif ise), kristal viyole *magnezyum ribonukleat* kristalleri halinde gücre içerisine çöker. Bu çökelti, alkolde çözünmez, dekolorizasyon ile giderilemez. Eğer, hücrede bir dışduvarı var ise (yani incelenen bakteri Gram pozitif ise), uygulanan kristal viyole hücre içerisinde alkolde çözünebilir bileşikler halinde kalır. Bu boyanın bu özelliği sayesinde bakteri membranları hakkında fikir sahibi olunur.

**İşlem:** Bkz. Konu-7 Mikrobiyolojide boyama yöntemleri.

**Koopler's Gram modifikasyonu** (anaerop Gram boyama): Anaerop bakteriler narindir ve ısı ile kolayca deforme olabilecekleri için, materyalin fiksasyonu metanol yada aseton ile yapılır. Dekolorizasyona direnç gösteremeyen anaerop Gram pozitif bakterilerin Gram pozitif boyanmış olarak kalmalarını sağlamak için kristal viyole ile muamele sırasında preparat üzerine 3-5 damla taze hazırlanmış 5% lik sodyum bikarbonat damlatılır. Ayrıca sulu fuksin içerisine safranin ilave edilir. Diğer işlemler Konu-7'de anlatıldığı gibi yapılır.

Bu test anaerobik bakterilere uygulandığında şunlar hatırlanmalıdır=

1. Eğer incelenen anaerop bakteri Gram negatif ise renkleri genellikle, bir Gram negatif bakteri için olması beklenenden daha solgun ve daha açık pembedir. Bu nedenle, mikroskop sahasında ilk bakışta boya artifaktı veya besiyeri kalıntısı gibi görünen oluşumların bir anaerop Gram negatif bakteri hücre kümesi olup olmadığı dikkatle incelenmelidir, (*Bacteroides pneumosintes* böyledir).

2. Anaeroplarda dekolorizasyona direnç gösteremezler. Gram pozitif anaeroplarda daima Gram negatif boyanmaya meyil gösterirler, bu nedenle Gram pozitif boyananlar genellikle Gram pozitiflerdir, ancak Gram negatif boyananların belkide Gram pozitif olabileceği hatırlanmalıdır. Bir anaerobun Gram pozitif olduğu, Tween-80 içeren agarda üremesinin artması, brucella agarda inhibe olması ve vankomisin diski ile inhibe olması ile doğrulanabilir.

3. Aynı mikroskop sahasında aynı hücreler farklı renk tonunda boyanabilirler, saf kültürden alınan anaerob bakterilerinin bu görüntüleri bir kontaminasyonu düşündürülebilir.

4. Aynı hücrenin bir yarısı başka renk olabilir. Bu boyanma spor veya metakromatik cisim olarak yanlış yorumlanabilir (taze materyalde spor bulunmayacağı hatırlanmalıdır).

**Değerlendirme:** Bkz. Konu-7 Mikrobiyolojide boyama yöntemleri.

Gram boyama için kültürlerin daima taze olması uygundur, eskimiş kültürler ve zorunlu anaerobların Gram negatif boyanmaya meğilli olduğu hatırlanmalıdır, yanlış negatif sonuç verebilirler. Protoplastlar daima Gram pozitifdir.

Boya solusyonlarının içerisinde kontaminasyona bağlı üreme olmaması için içerisinde 1 ml kloroform katılır veya  $CCl_4$  konur. Bu madde solusyonu muhtemel bir kontaminasyondan korur.

Pozitif kontrol için stafilokoklar, negatif kontrol için *E. coli* aynı lam üzerinde işleme tabi tutulabilir.

### **Hareket muayenesi:**

**Tanım:** Bakteri hücresinin hareket organeli flajelladır. Ancak bunun dışında da hareket edebilmeleri mümkündür. Boyasız taze preparat 40x büyütme ve asılı damla tekniği ile incelendiğinde başlıca şu tip hareketler gözlenebilir:

1. Titreşim hareketi (Twitching Motility): Bu gerçek bir hareket şekli olmayıp hücrenin bulunduğu mikroskop sahasından başka bir sahaya doğru yol almasını sağlamaz, *Streptococci* ve *Staphilococci* dahil olmak üzere pek çok türde bulunur. Bu bakteriler hareketsiz kabul edilir.

2. Ameboid Hareket (Ameboid Movement): Hücrenin hareket edeceği yöne doğru sitoplazmasını sol-gel kıvamına getirme yeteneği vardır, bu durumda hücre gideceği yönde bir pseudopod (yalancı ayak) oluşturur ve sitoplazma sol kıvamına gelerek pseudopod içine doğru akar. Daha sonra sitoplazma eski kıvamına döner. Böylece hücre yer değiştirmiş olur.

3. Akarak hareket (Gliding Movement): Hücre, katı yüzeye temasında iyi açıklanmamış bir mekanizma ile hiçbir salınım yapmadan "kayar şekilde" yer değiştirebilir. Bu bakteriler hareketsiz kabul edilir.

4. Sarmal hareket (Oscillatory Movement): Tipik olarak *Spirochetales*'de görülür. 3 ayrı hareket gurubunu kapsar, i) Hücre bir ucundan asılarak pandül gibi salınır, ii) Saat yönünde yada tersi yönde spiral şeklinde döner. (spiroketler, *Cristaspira*, *Treponema*, *Borrelia* genusları saat istikameti tersine dönerler. *Leptospira*'lar saat istikametine dönerler.) iii) Hücre endoflajelleriyle sıkışır, sonrada boşalmış yay gibi öne doğru fırlar. Bu bakteriler hareketli kabul edilir.

5. Flagellar hareket (Flagellum Mediated Locomotion): Hücre, peritriköz yada monotriköz flajelleriyle aktif şekilde hareket edebilir. Aksi belirtilmemişse hareketlilik bu anlamda alınır. Bu bakteriler hareketli kabul edilir.

6. Dalgalanmalar (Metachronal Waving): Silya esasına dayandığı düşünülmektedir. Hücrenin dalgalanma frekansı genellikle 15 Hz (1 saniyede 15 defa) civarındadır. Bu bakteriler hareketsiz kabul edilir.

**Prensip:** Mikroskop ile bakteri hücresinin hareketliliğinin göz ile tespitinden ibarettir. Bu testin esası flajellar hareketin tespit edilmesidir.

**İşlem:** (Asılı damla tekniği) Bunun için bir koloni materyali bu iş için yapılmış özel bir lam üzerinde ezilir, üzerine bir damla steril tuzlu su konulur. Lam ters çevrilerek damlanın yüzey gerilimi ile lamın yüzeyinde asılı kalması sağlanır. Mikroskopun kondansörü aşağı çekilir, lamın ıslak yüzü kondansöre doğru çevrilerek yavaşça tablaya yerleştirilir, 40x büyütme ile incelenir.

Hareket tespiti için indirekt yöntemlerde vardır, Hareket besi yeri bunun için uygundur. %3-5 agar içeren pekçok yarı katı besiyerinin bir ucuna ekim yapılarak inkübasyonu takiben yayılma olup olmadığına bakılır.

**Değerlendirme:** Lamın önceden ısıtılıp soğutulmuş olması varsa hareketi kamçılar. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* veya *Proteus* türleri kullanılabilir. Negatif kontrol için bir stafilokok kullanılır.

### **Kapsül muayenesi:**

**Tanım:** Bakteri hücresinin dış duvarını örten glikokaliks yapıdaki mukoid örtü (kapsül)nün varlığını aramak için yapılan bir testtir. Ancak taze izolatlar için varlığının ya da yokluğunun

identik değeri olabilir. Çünkü bakteriler pasajlar sırasında kapsüllerini kaybederler. Bu test, *Pneumococci*, *Meningococci* ve *Klebsiella*'lar için identiktir ve aslında virülans faktörü olarak değerli bir bulgudur. Üç türlü kapsül bulunur. 1) Makrokapsül= negatif boyama ile kolayca izlenir, 2) Mikrokapsül ancak serolojik tekniklerle gösterilir 3) Slim tabaka tam bir kapsül değildir daha çok bakterinin adezinleri (dekstran, seluloz, glukan)dir.

Prensip: Bu test, makrokapsülün boyama yöntemleri ile gösterilmesi esasına dayanır.

İşlem: 1) Bir kapsül boyası veya basitçe çini mürekkebi ile boyanır. 2) Canlı bakteri örneği özgül kapsül antikoru ile muamele edilerek kapsül şişme reaksiyonu aranır.

Değerlendirme: Boyanan kapsül 40x büyültme ile ışığı kıran geniş parlak bir tabaka olarak görülür. Tipe özgül standart antikolar ile muamele edilen bakterinin genişleyen kapsülü şişerek mikroskopta görülebilir hale gelir.

### **Selüler morfoloji:**

Tanım: Bakteri hücresinin morfolojisi genus seviyesinde identifikasyona yardımcı olur.

Prensip: Hücre şeklinin laboratuvar şartlarında tespiti esasına dayanır.

İşlem: İncelenecek bakteri örneği, türüne uygun katı besiyerinden alınmalıdır. Türüne uygun bir boyama metodu ile boyanır ve mikroskopta incelenir. Daha iyisi canlı boyalarla boyamak veya materyali doğrudan mikroskopta incelenmektir.

Değerlendirme: Bkz. Konu.5 Bakterilerin sınıflandırılmaları.

Materyali alevden geçirerek değil, aseton ya da alkolde bekleterek tespit etmeli, böylece bakteri hücresinin deformasyonuna engel olunmalıdır. Ayrıca kullanılan tuzlu suyun izotonik olması şarttır. Sıvı besiyerinde üretilen bakteri hücresinin uzamaya meğilli olduğu hatırlanmalıdır. Hücre duvarının bulunmadığı bakterilerde (*Mycoplasma* gibi) labil morfolojiler bulunabilir.

### **Spor muayenesi:**

Tanım: Bazı genuslar (*Bacillus* ve *Clostridium* gibi) uygun olmayan yaşam koşullarında spor yapabilirler, böyle bir özelliğin gösterilmesi sadece genus ve hatta familya seviyesinde ayırma yardımcı olabilir. Sporun yapısında dipikolinik asit (*pyridine 2,6-dicarboxylic acid*), keratin ve kitin'e benzer proteinler gibi normalde bakteri hücresinde bulunmayan kompleks yapılar bulunur.

Prensip: Spor gelişimi yalnızca fena ortam koşullarında mümkündür. Bakteri logaritmik üremenin sonunda karbon, azot, fosfat kaynaklarının tükenmesi ile fena koşullara doğru zorlanır.

İşlem: Saf bakteri kültüründen alınan çok miktarda materyal küçük hacimde bir besiyerine ekilerek 7-10 gün etüvde ve 4-6 gün oda ısısında bekletilir. Sporülasyonu tahrik amacı besiyeri içerisine bakteri suşuna özgül mineraller ilave edilebilir. CO<sub>2</sub> gazının ortamdaki konsantrasyonu azalır *Clostridium*'lar daha kolay sporlanırlar. Doğrudan yada boyanarak mikroskopta incelenir.

Değerlendirme: Sporlar değişik terkipteki spor boya ile boyanabileceği gibi olgunlaşmış sporlar direkt mikroskopi ya da Gram boyası ile de gözlenebilir. Hücre içerisinde olabilecek metakromatik cisimcikler ile karıştırmamak için spor boya yardımı ile tanı koymak daha doğrudur. *Erllich-Ziehl-Neelsen* boyası ile sporlar kırmızı renkte boyanırlar. Malaşit yeşili de kullanılabilir.

Klinik materyalden hazırlanmış taze preparatta spor aranmaz (yoktur). Logaritmik üreme fazındaki genç kültürden yapılan preparatlarda da spor aranmaz.

### **Değişik sıcaklıklarda üreme (5, 22, 42°C de üreme) :**

Tanım: Testin anlamı, uygun olmayan sıcaklıklarda bakteri hücresinin metabolik faaliyetlerin devam edip etmeyeceğinin belirlenmesidir.

Prensip: Bazı bakterilerin konak doku dışında yüksek veya düşük ısıda metabolik faaliyetlerine devam edebiliyor olması, o suşun kimliği hakkında bilgi vericidir.

İşlem: Türe uygun vasat içerisine inoküle edilen bakteri 22 veya 42 °C'ye ayarlanmış etüvde veya buzdolabında 24-48 saat inkübe edilir.

Değerlendirme: Koloni gelişimi, pozitif test sonucu olarak yorumlanır. 22 ve 42°C için pozitif kontrol *Pseudomonas aeruginosa* , 5°C için *Listeria monocytogenes* kullanılabilir.

Yukarıda anlatılanlar dışında bakteri fizyolojisini tanımaya yarayan başka bazı uygulamalar da vardır. Örneğin koloni morfolojisi, kaç günde ürediği, koloninin floresan verip vermediği gibi. Besiyerini koklamak 16 numaralı kaynakta yazdığına göre ciddi sorunlara sebep olmaktadır. Koklanmamalıdır. Ancak kültür plağının uzaktan duyulan bir kokusu varsa not edilebilir.

## **BIYOKİMYASAL TESTLER:**

### **Şeker fermentasyon testleri:**

**Tanım:** Bir bakteri hücresinde hangi şekerleri fermente edebilen metabolizmanın bulunduğu o bakteri suşu için identik değer taşır.

**Prensip:** Esas itibarı ile, bu test, incelenecek bakterinin üreyebileceği besiyerinin terkibine sadece denenecek olan karbonhidratın ilave edilerek, fermente olup olmadığı izlenmesinden ibarettir. Bakteri, inkübasyon dönemi sonunda bu şekeri fermente edip asit oluşturabilmiş ise ortamın pH'sı 5.5 sınır değerinin altına düşecektir. pH indikatörü veya bir pH-metre yardımı ile asidite tespiti yapılır. Burada dikkat edilecek nokta besiyeri içerisinde denenecek şekerden başka karbonhidrat bulunmaması gerektiğidir. Böylece bakteri ortamdaki yegane karbonhidratı kullanmaya zorlanır. Bakterinin ve karbonhidratın türüne göre laktik, süksinik, asetik, formik asitler oluşabilirler. Hangi asit(ler)in oluştuğunun bir önemi yoktur.

**İşlem:** Saf kültüründen bir öze dolusu koloni materyali, bakteri için uygun olan ve içerisinde sadece karbonhidrat bulunan besiyerine ekilir. Bakterinin üreyebilmesi için özel besiyeri gereksinimi yok ise, bir genel kullanım sıvı besiyerine ekilir. Bakterinin türüne uygun sıcaklıkta uygun süre inkübe edilir.

#### **Şeker fermentasyon bazal medium:**

Pepton	5 g
Brom-Timol Mavisi	0.001 g
Distile Su	1 lt
Denenecek şeker	1 g

(Denenecek şeker; Arabinoz, dekstroz, glukoz, ksiloz, sukroz, laktoz, maltoz, mannoz, mellibiyoz, rafinoz, ramnoz, sellobiyoz, trehaloz... olabilir)

Bu besiyeri içerisine şeker ilavesi yapıldıktan sonra Durham tüpü ters çevrilerek havası alınmalı ve tindalizasyon ile sterilize edilmelidir.

Anaeroplara yapılacak testlerde ise PY-Broth besiyeri kullanılır, ekimden önce kaynatılıp soğutulmalıdır. Gerekirse içerisine anaerop bakterinin ihtiyaçları (vit K<sub>1</sub>, sistein, lizin veya hemin) ilave edilir. Ekimi takiben yüzeyi 1 ml steril mineral yağı ile kapatılmalıdır.

**Değerlendirme:** İnkübasyon dönemi sonunda oluşan sarı renk ortamdaki şekerin fermentasyonu sonucunda asit oluştuğunu ve pozitif test sonucunu işaret eder. Kontrol olarak ekim yapılmamış bir tüp besiyeri ile birlikte inkübe edilmelidir.

Brom-timol mavisi pH=7'de açık yeşildir, pH≤5.5'de sarı renk alır, ancak pH≥7.5'de ise koyu yeşil yada mavi renk alır. Karar verilemeyen durumlarda bir pH-strip ya da pH-metre ile pH'ın 5.5'un altında olduğunu doğrulamak gerekir. 5.5 - 6.5 arası pH dereceleri "zayıf asit" şeklinde yorumlanmalıdır. *Alcaligenes* gibi bazı bakteriler ve bazı anaeroplarda ortamdaki peptondan amonyak oluşturarak asit vasatı tamponlayarak, pH tespitini maskeleyebilirler. Bu nedenle uzun inkübasyondan kaçınılmalıdır, ayrıca inkübasyon boyunca tüpler belirli aralıklarla yoklanmalıdır. Herhangi bir anda pH'nın 5.5'un altına düşmesi ve besiyerinin sarı renk alması pozitif sonuç için yeterlidir. pH'nın yeniden yükselmesi ve yeniden açık yeşil renk oluşumu test sonucunu negatif yapmaz.

Bilhassa anaerop olan bazı bakteriler, inkübasyon dönemi boyunca şekeri değil ama renk indikatörünü degrade edebilmektedir. Ortamda asit bulunmadığı halde renk indikatörü sarı renk alabilir. Yanlış pozitif sonuç verebilir. Besiyerine 1 damla bromtimol mavisi damlatarak pH'ın gerçekten asit olup olmadığını doğrulamak gerekebilir.

Durham tüpleri içerisinde oluşmuş gaz kabarcıkları fermentasyon sonucu oluşan katabolik gaz ürünlerin (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S) bulunduğunu kalitatif olarak gösterir.

Anaeroplara için gaz yapımının tespiti amacı ile Durham tüpleri kullanılmaz, GLC (Gas-Liquid Chromatography) yöntemi kullanılır.

### **Aminoasit (*Arginin-Lysin-Ornithin*) dekarboksilasyonu:**

**Tanım:** Dekarboksilazlar aminoasitlerin karboksil kısmı ile reaksiyona girebilen bir grup enzim substratlarıdır. CO<sub>2</sub> açığa çıkaran bu reaksiyon dekarboksilasyon olarak isimlendirilir. Her bir dekarboksilasyon enzimi yalnızca bir aminoasit için spesifiktir. *Arginin*, *Lysin* ve *Ornithin* dekarboksilasyonu 3 ayrı testtir ve bu aminoasitlerin bir bakteri örneği tarafından kullanılması genus bazında identiktir.

**Prezips:** Dekarboksilasyon testleri için Moeller decarboxylase buyyon kullanılır. Eğer incelenen bakteri örneği besiyerine konulan aminoasiti kullanıyorsa alkali aminler ortaya çıkar ve pH yükselir. *Arginin*, önce *citrullin*'e ve sonra *agmatin* 'e hidrolize olur. Bu bir dihidroliz olayıdır. *Lysine*, *cadaverin*'e; *ornithin*, *putrescine*'e deamine olur. Hepsisi alkalik aminlerdir. pH indikatörü besiyerinin alkali olduğunu gösteriyorsa olumlu sonuç anlamına gelir.

**İşlem:** Moeller decarboxylase buyyon içerisine denenecek amino asitlerden bir tanesi ilave edilir ve incelenecek bakteri ekilir. Amino asit ilavesi yapılmamış bir besiyeri kontrol için kullanılmalıdır. İnkübasyonun ilk saatlerinde besiyeri sarı renk alabilir. Bunun sebebi ortamda bulunan glukozun fermentasyonudur. Eğer inkübasyon sonunda amino asit dekarboksile olursa ortaya çıkan alkalik aminler pH'ı 7 nin üzerine çıkarır. pH indikatörü mavi-yeşil renk alırsa sonuç pozitifdir.

#### **Moeller decarboxylase broth:**

Pepton	5 g
Beef extract	5 g
Bromcresol purple	0.01 g
Cresol red	0.005 g
Glucose	0.5 g
Pyridoxal	0.005 g
Amino asit	10 g ( <i>L-arginin</i> , <i>L-lysine</i> veya <i>L-ornithin</i> )
Distile su	1 lt pH = 6.0 ayarlanır.

(Aminoasitlerin D- formu kullanılacaksa 2 katı miktarda kullanılmalıdır.)

**Değerlendirme:** İlk saatlerde oluşması beklenen sarı renk değerlendirilmez. İnkübasyon sonunda besiyeri renginin koyu yeşil olması pozitif, sarı olarak kalması negatif sonucu gösterir. Hiçbir sararma olmadan orijinal renginde kalıp kalmadığı ekim yapılmamış kontrol tüpü ile karşılaştırılarak yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak gerekir.

Negatif kontrol olarak *Enterobacter aerogenes*, pozitif kontrol olarak ise *Enterobacter cloacae* kullanılabilir.

### **DNAz testi:**

**Tanım:** Bazı bakteriler *deoksiribonuclease* enzimi yaparlar. Bu test bakteride böyle bir enzimatik aktivitenin mevcudiyetinin araştırılmasıdır. Bu test, *Staphylococci* içerisinde *S.aureus*'u ayırabilmek için plazma koagülaz testinden daha kıymetlidir.

**Prezips:** Burada kullanılan besiyerinde DNA vardır. Bakterinin DNAz aktivitesi varsa koloni çevresinde bulunan DNA parçalanacaktır. İnkübasyonu takiben uygulanan ayıraç bir DNA boyasıdır. Koloni etrafında DNA bulunup bulunmadığı ortaya çıkarır.

**İşlem:** İncelenecek bakterinin saf kültüründen bir koloni DNAz besiyerine ekilir, uygun süre inkübe edilir. İnkübasyonu takiben oluşan koloniler üzerine 1 damla ayıraç uygulanır. Şeffaf zon aranır.

#### **Deoksiribonüklaz Agar:**

Desoxyribonucleic acid	2 g
Phytone	5 g
Sodium chloride	5 g
Trypticase	15 g
Agar	15 g
Distile su	1 lt pH=7.3 ayarlanır.

**Ayıraç:**

1N HCl veya %0.1 Toluidin Mavisi

**Değerlendirme:** İncelenen bakteri DNAz pozitif ise koloni etrafında berrak ve şeffaf bir zon görülür. Toluidin mavisi kullanılmış ise bu saha parlak pembe renk alacaktır. Bu görüntü testin sonucunun pozitif olduğu anlamına gelir. DNAz aktivitesini tahrik edebilmek için besiyerine  $Ca^{++}$  katılması önerilmiştir. Ancak besiyerine Trypticase Soya Agar katılırsa buna gerek kalmaz. Pozitif kontrol *S. aureus*'tur.

**Eskulin hidrolizi :**

**Tanım:** Eskulin (*aesculin*) bir glikozittir. *6,7-dihydroxycoumarin*'in *6-β-D-glucosyl* derivatıdır. Eskulinin hidrolizlenmesi ve fermentasyonu farklı iki kimyasal reaksiyondur. Eskulin fermentasyonunun mikrobiyolojik önemi yoktur ama eskulinin hidrolizlenmesi testi bilhassa bazı anaeroplara ve streptokoklara için identiktir.

**Prezipsiyon:** Eskulin, hidrolize olunca *6-7-dihydroxycoumarin* açığa çıkar, bu madde ortamda bulunan ferrik sitrat ile reaksiyona girer. Ferrik sitrat ultra viyole ışıkta floresans verdiği halde reaksiyona girdikten sonra floresans vermez hale gelir.

**İşlem:** İncelenecek bakterinin saf kültüründen bir öze dolusu materyal 5 ml eskulin buyyona ekilir. Ekilmemiş kontrol buyyon ile birlikte türe uygun süre boyunca inkübe edilir ve hergün ultraviyole ışık altında yoklanır.

**Eskulin Buyyon:**

Aesculin	1 g
Ferric citrate	0.5 g
Peptonlu su	1 lt

**Değerlendirme:** Ekim yapılmamış buyyon, ekim yapılmış buyyon ile yanyana getirilerek ultraviyole lambaya yaklaştırılır. Ekim yapılmamış buyyon floresans verirken, ekim yapılmış buyyon ışımıyor ise pozitif test sonucu olarak yorumlanır.

Buyyondaki siyah kahverengi renk  $H_2S$  ve demir sülfürlerin oluşumuna bağlı olup eskulinin hidrolizlendiği anlamını taşımaz.

Anaeroplara için eskulin hidrolizi bakılacaksa, anaerop atmosferden çıkarıldıktan sonra ilk 15-20 dakika içerisinde bakılmalıdır. Aksi halde yanlış pozitif sonuç verirler.

**Fenil alanin deaminasyonu:**

**Tanım:** *Phenylalanine*, fosfofenolpiruvattan sentezlenen fenil pirüvat'ın aminlenmiş bir derivasyonudur. Aromatik bir amino asittir. Bazı bakteriler bundan fenil pirüvik asit elde edebilirler.

**Prezipsiyon:** Bu test, içerisinde fenil alanin bulunan bir ortamda fenil pirüvik asit oluşup oluşmadığının, ayıraç ilavesi ile tespit edilmesi esasına dayanır.

**İşlem:** İncelenecek bakteri tüpte hazırlanmış *Phenylalanine* agar'a ekilip türe uygun süre inkübe edilir. Üremeyi takiben koloniler üzerine 1 damla ayıraç damlatılarak yeşil renk aranır.

**Phenylalanine agar**

<i>D-</i> veya <i>L-</i> Phenylalanine	2 g
Yeast extract	3 g
Sodium chloride	5 g
Sodium phosphate	1 g
HCl	2.5 ml
Agar	12 g
Distile su	1 lt

**Ayıraç:**

Ferric chloride	12 g	
Distile su	100 ml	pH = 7.3 ayarlanır.

**Değerlendirme:** Hemen oluşan koyu yeşil renk ortamda fenil pirüvik asit bulunduğunu yani pozitif test sonucunu gösterir. Besiyeri içerisinde karbonhidrattan zengin bir katkı kullanılmamalıdır. Negatif kontrol için *E. coli*, pozitif kontrol için herhangi bir *Providencia*, *Proteus* veya *Morganella* suşu kullanılır.

### **Tirozin saydamlaştırma:**

**Tanım:** Tirozin, fosfofenolpiruvat'tan sentezlenen hidrosifenilpiruvat'ın aminlenmiş bir derivasyonudur. Aromatik bir amino asittir. Bilhassa *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* ve eugonic *Mycobacteria*'lar bu aminoasitten melanin oluşturabilir.

**Prencip:** Tirozin'in deamiasyonu *tyrosinase* enzimi ile olur ve bu test, ortaya çıkan siyah renkli melanin'in tespit edilmesine dayanır.

**İşlem:** Tirozin agar içine veya et infuzyon buyyon içerisinde 0.1% *tyrosine* ilave edilerek ekim yapılır. Türe uygun süre kadar inkübe edilerek her gün siyah renk aranır.

#### **Tyrosine agar (Gordon&Smith, 1955):**

Pepton	5 g
Sığır et özeti	3 g
Agar	15 g
L-Tyrosine	5 g
Distile su	1 lt

*Tyrosine* agar'a ekim yapılmışsa siyah koloni oluşumu yanında, koloni çevresinde ve altında (agar içerisinde) saydamlaşma görülmesi beklenir.

**Değerlendirme:** Koloni çevresinde hem siyah pigmentasyon ve hem de agarda saydamlaşma pozitif test sonucu olarak yorumlanır. İnkübasyon ısı mümkün olduğu kadar düşük (30 °C civarında) tutulmalıdır. Besiyerine karbonhidrat ilave edilmemelidir.

### **İndol testi (Triptofan'dan indol yapımı):**

**Tanım:** İndol bir *benzyl pyrrole* olup, fosfofenolpiruvattan sentezlenen indolgliserolfosfat'ın aldehite bağlanmasıyla ortaya çıkar. Aromatik bir aminoasittir. *Tryptophanase* enzimine sahip olan bakteriler triptofanı önce deamine, sonra hidrolize ederek indol oluştururlar.

**Prencip:** İndol, *p-dimethylaminobenzaldehyde* (*Kovac's* ve *Ehrlich's* ayıracı) 'nın aldehit kökü ile reaksiyona girmeye isteklidir. Bu reaksiyon gerçekleşirse besiyeri kırmızı renk alır.

**İşlem:** Bakteri örnekleri triptofan'dan zengin bir besiyerinde inkübe edilmelidir. Bu amaç ile, Sulfide İndole Motility (SIM), Motility İndole Ornithine (MIO) veya İndol Nitrat besiyerleri kullanılabilir. İndol deneyinde şu besiyeri de kullanılır:

#### **Tryptophan buyyon (1% tryptophan) besiyeri:**

Pepton veya pancreatic casein digest	2g
Sodium chloride	0,5g
Distile su	100ml

#### **Kovac's ayıracı**

Saf amyl veya isoamyl alkol	150ml
p-Dimethylaminobenzaldehyde	10g
HCl	50ml

#### **Ehrlich's ayıracı**

p-Dimethylaminobenzaldehyde	2g
Etil alkol	190ml
HCl	40ml

Triptofan içeren besiyerinde bakteri örneğinin 18-20 saatlik kültürü yapılır. *Kovac's* ayıracı kullanılacaksa 10-15 damla ayıraç tüpün iç duvarından yavaşça akıtılır. Eğer *Ehrlich's* ayıracı kullanılıyor ise, önce 1 ml ksilen (*xylene*) konularak besiyeri muhteviyatının tüpün dibine çökmesi beklenir ve tüp sarsılmadan *Ehrlich's* ayıracı konur. Renk değişimi gözlenir.



**Değerlendirme:** Birkaç saniye içerisinde, ayıraç ile buyyon arasında veya ayıraç ile ksilen tabakası arasında oluşan parlak kırmızı renk pozitif sonucu bildirir. Besiyerine karbonhidrat ilave edilmemelidir.

Hızlı tanı amacı ile filtre kağıdına *p-dimethylaminocinnamaldehyde* emdirilerek indol yapımı aranabilir. Bu madde karsinojendir, dikkatli çalışmak gerekir.

Pozitif kontrol için *E.coli*, negatif kontrol için *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* veya *Serratia* grubu bakteriler kullanılabilir.

### **Hidrojen sülfid (H<sub>2</sub>S) yapımı:**

**Tanım:** Bazı bakteriler içerisinde kükürt bulunan (gibi) aminoasit yada başka sülfatlı bileşikler kullanılarak hidrojen sülfid (H<sub>2</sub>S) oluşturabilirler.

**Prensip:** İncelenecek bakteri, karbonhidrattan fakir, kükürtlü aminoasitten zengin bir besiyerinde üretilerek, aminoasitleri kullanmaya zorlanır. H<sub>2</sub>S oluşuyorsa demirli veya kurşunlu indikatörler ile tespit edilir.

**İşlem:** İncelenecek bakteriden bir koloni amaca en uygun olarak Demir-Klorürlü-Jelatin Besiyerine ekilir. İnkübasyonu takiben oluşan demir sülfür (FeS) sebebiyle siyah koloni oluşumu aranır.

**Değerlendirme:** İncelenen bakteri daha kolay üreyebileceği başka bir katı besiyerine ekilecekse bu besiyeri tüp içerisine dökülmeli ve karbonhidrattan fakir olmalıdır. İnkübasyondan önce kurşun asetat emdirilmiş steril süzgeç kağıdı, besiyerine değmeyecek şekilde tüpün ağzına sıkıştırılarak yerleştirilir. H<sub>2</sub>S volatildir. İnkübasyonu takiben oluşan H<sub>2</sub>S, kağıt üzerinde siyah renkli kurşun sülfür (PbS) oluşturur. İyi oksijenlendirilmiş ortamda H<sub>2</sub>S oluşmayacağı hatırlanmalıdır. Bu test anaeroplara yapıldığında anaerobik atmosfer bozulduktan sonra ilk yarım saat içerisinde koloni etrafında siyah bir renklaşme pozitif sonuç anlamına gelir.

Pozitif kontrol olarak *E.coli*, *B.subtilis* kullanılabilir.

### **Hemoliz testi:**

**Tanım:** 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.

**Prensip:** Eritrositlerin parçalanması *haemolysin* enzimi ile olur. Bu test esas itibarı ile bakterinin bu enzimi yapıp yapmadığının tespitidir.

**İşlem:** Bir öze dolusu bakteri, 50 ml/l koyun kanı içeren kanlı agara ekilerek türüne uygun sıcaklıkta ve süre inkübe edilir. Koloni çevresinde eritrositlerin lizis olduğu bir zon oluşumu aranır.

**Değerlendirme:** Koloninin çevresi mikroskopta 10x büyültme ile daima kontrol edilmeli ve agar derinlikleri dahil olmak üzere eritrositlerin bulunmadığı bir zonen varlığı aranmalıdır (β Hemoliz). Koloni çevresinde kısmen parçalanmış eritrositlerin mevcudiyetinde demirli bileşiklerin oluşturduğu yeşil renkli bir zon gözlenecektir (α Hemoliz). Koloni çevresinde eritrositlerin parçalanmadığı durum ise negatif test sonucu olarak yorumlanır (γ hemoliz).

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 *B. cereus* veya A grubu streptokok, negatif kontrol için *S. epidermidis* kullanılabilir.

### **Jelatinaz testi:**

**Tanım:** Jelatin, kollajenin kaynatılması ile ortaya çıkan bir proteindir. Sıcak suda bekletildiğinde jel kıvamına gelir. 28-35 °C arasında sol kıvamındadır. Bilhassa *Clostridium* türleri başta olmak üzere bazı bakteriler jelatinaz (bazen kollajenaz) enzimleri ile jelatini parçalar.

**Prensip:** Jelatinli besiyerinde üreyen bakterinin jelatinaz enzimi varsa kolonisi etrafında sol kıvamında bir zon gelişmesi esasına dayanır.

**İşlem:** İncelenecek bakteri iğne öze ile agar yüzeyine batırılarak ekim yapılmalıdır. 24.üncü saatten itibaren her gün yoklanmalıdır. Koloninin etrafında jelatinin dekompoze olarak sol kıvamına gelmesi incelenir.

**Jelatin Agar:**

Pepton	5 g	
Sığır et özeti	3 g	
Agar	15 g	
Gelatin	4 g	
Distile Su	1 lt	pH =7.4 ayarlanır

**Değerlendirme:** Jelatinde böyle bir sulanma pozitif test sonucunu gösterir. Besiyerinin her tarafında sol kıvamında çözülme olmuşsa 1-2 saat buzdolabında bırakılarak tekrar kontrol edilmelidir. Bu durumda besiyerindeki jelatin yeniden jel kıvamına geçer ama koloni etrafında dekompoze jelatin varsa hala sol kıvamında kalacaktır.

Besiyerine karbonhidrat konulmamalıdır. Bakteri, kolay enerji temin edebileceği karbonhidratları bulursa jelatini sindirmeye gereksinim duymayabilir. Bu durumda yanlış negatif sonuçlar alınabilir. Besiyerine  $Ca^{++}$  ilave edilmesi ve üreme ısısının biraz altında inkübe edilmesi bakterinin (varsa) jelatinaz aktivitesini kamçılar. Kollajenaz aktivitesi fazla olan proteolitik türler jelatini de parçalayarak yanlış pozitif sonuç verebilir.

Anaeroplara bu veya başka besiyerinde test edilebilir. Bir alternatif metot olarak uygun süre inkübe edildikten sonra, koloniler üzerine *mercuric chloride* ( $Hg_2Cl_2$ ) damlatılır. Bu madde serbest jelatin tarafından bağlanarak renk değiştirecektir. Dolayısı ile koloni etrafında renksiz bir zon görülmesi pozitif jelatinaz aktivitesini işaret eder.

**Katalaz testi:**

**Tanım:** Katalaz (*catalase*) bakterilerin ürettiği bir enzimdir. Aslında bir hemoproteindir. Süperoksit dismutaz ve indirgenmiş flavoproteinlerin oksitlenmesi sırasında bakteri hücresi içerisinde açığa çıkan toksik hidrojen peroksiti su ve oksijene kataliz eder. Katalaz, streptokoklar hariç pekçok aerobik ve fakültatif mikroorganizma tarafından üretilir. Bu nedenle katalaz testi sıklıkla *Micrococcaceae* ve *Streptococcaceae* ayırımında kullanılır.

**Prencip:** İncelenecek bakterinin katalaz üretimini tespit etmek amacı ile bakteri kolonisine  $H_2O_2$  damlatılır. Bakterinin katalaz enzimi varsa kabarcıklar şeklinde  $O_2$  gazı çıkışı tespit edilir. Reaksiyon şöyledir:  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ .

**İşlem:** İncelenecek bakteri kolonisi kürdan kullanarak lam üzerinde ezilir. Üzerine 1 damla hidrojen peroksit (%3) damlatılır. Gaz kabarcıkları aranır.

**Değerlendirme:** Hızla başlayan ve kısa süre içerisinde kaybolmayan kabarcıklar pozitif reaksiyon anlamına gelir. Bazı bakteriler katalazdan başka (Non-hem katalaz) enzimler ile hidrojenperoksiti dekompoze edebilir. Bu nedenle 20-30 saniye sonra oluşan veya bir kaç küçük kabarcık şeklinde oluşarak hemen kaybolan gaz kabarcıkları pozitif test sonucu olarak yorumlanmaz.

Kanlı besiyerinden alınan koloniler yanlış pozitif sonuç verebilir, çünkü, eritrositlerin içerisinde de katalaz enzimi mevcuttur ve öze ile koloni materyali alınırken besiyerine temas ederek yanlışlıkla oradan eritrositleri almak mümkündür.

Anaerob bakteriler için test öncesi materyal yarım saat kadar hava ile temasta bırakılmalı ve kullanılan peroksit solüsyonu %15 lik olmalıdır.

$H_2O_2$  stok solüsyon ışık almayan kahverenkli bir şişe içerisinde ve buzdolabında saklanmalıdır. Aksi halde inaktive olarak yanlış negatif sonuç verebilir. Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus*, negatif kontrol olarak herhangi bir *Streptococcus* kullanılabilir. Burada anlatılan katalaz test standartları ve yöntemleri *Mycobacterium*'lar için geçerli değildir.

**Potasyum siyanit (KCN)'te üreme:**

**Tanım:** Potasyum siyanit solunum fermentlerini (*cytochrom*, *porphyrin*) bloke eder. Bir bakterinin KCN içeren bir besiyerinde üreyebilmesi, hücrenin nonfermentatif yol dışında bir solunum mekanizmasının bulunduğunu gösterir ve bilhassa *Arizona* ve *Salmonella* genuslarının *Citrobacter* genusundan ayırımında önem taşır.

**Prencip:** İncelenecek bakteri örneği KCN içeren besiyerine ekilerek inkübe edilir. Üreyebiliyorsa o bakterinin fermentatif solunum mekanizması var demektir.

**İşlem:** Aşağıdaki bazal buyyona KCN ilave edilmeden bir tüpe ayrılır ve kontrol besiyeri olarak kullanılır. KCN ilave edilmiş buyyon ile birlikte ekim yapılarak türüne uygun süre kadar inkübe edilir. Her gün yoklanır.

**KCN Buyyon (Moeller, 1954):**

Pepton	10 g
Sodium Chloride NaCl	5 g
Potassium Phosphate, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Disodium Phosphate, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	5.64 g
Distile su	1 lt
Potassium Cyanide, KCN %5	15 ml

**Değerlendirme:** KCN içeren ve içermeyen besiyerinin herikisinde de üreme tespit edilirse test sonucu pozitif olarak yorumlanır. KCN'li buyyonda üreme yok iken kontrol buyyonda üreme varsa negatif test sonucu olarak yorumlanır. Her ikisinde de üreme yok ise o bakterinin üremesi için mutlak gereksindiği özel besiyerine, son konsantrasyonu 1:13300 olacak şekilde KCN katılarak test tekrarlanmalıdır. Test kalitatiftir, üremenin az yada fazla olması test sonucunu etkilemez.

Pozitif kontrol olarak *Citrobacter*, *Providencia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Serratia*, *Enterobacter* kullanılabilir. Negatif kontrol olarak *Shigella*, *Salmonella*, *Arizona* veya *E.coli* kullanılabilir.

KCN toksik olup kilit altında bulunmalıdır ve buharlaşmasının engellenmesi için lastik kapaklı tüplerde saklanmalıdır. KCN içeren besiyerleri kullanıldıktan sonra doğrudan otoklava konulmaz. Laboratuvar güvenliğini sağlamak için atılacak besiyerleri içerisine önce %4 KOH'den en az 0.1 ml konulmalı ve tüpe bir parça kristalize FeSO<sub>4</sub> atılarak siyanürün tamamen bağlanması sağlanmalıdır.

**Koagülaz (Coagulase) test:**

**Tanım:** 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.

**Presep:** İncelenecek bakteri lamda ve tüpte tavşan plazması ile muamele edilip plazmada koagülasyon aranır.

**İşlem ve değerlendirme:** Deneyde sitratlı veya okzalatlı tavşan veya insan plazması kullanılır. Plazma sitratlı ise, sitratı kullanan bakteriler, plazma içerisinde bulunan sitratı kullanarak koagülasyon yapabilir ve yanlış pozitif sonuç verebilirler. Bu sebeple pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus*, negatif kontrol olarak *Staphylococcus epidermidis* kullanılmalıdır, veya antikoagülaz olarak sitrat yerine okzalat kullanılmalıdır.

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. Pozitif test sonuçları, lam üzerinde plazma ihtiva etmeyen koloni ile daima karşılaştırılmalıdır. Her ikisinin de pozitif olduğu durumlarda bir değerlendirme yapmaktan kaçınılmalıdır, çünkü izotonik olsa bile tuzlu su ile temas eden bazı bakteriler spontan aglütine olabilir.

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 plazmasınının kullanılması bu testi daha duyarlı ve güvenli yapar.

Yoklamalar sırasında bir defa koagülasyon görülmesi, ilerleyen yoklamalarda koagülasyon kaybolursa bile pozitif sonuç anlamına gelir. Çünkü, inkübasyon sırasında oluşabilecek pıhtı, aynı bakterinin oluşturabileceği fibrinolizin enzimi ile tekrar yok edilebilir. Bu sebeple daha uzun inkübasyondan kaçınılmalıdır.

Negatif lam test gösteren bütün suşlar tüp testine alınmalıdır. Çünkü bağlı koagülazı olmayan bakterilerin serbest koagülazları bulunabilir. Ama bir bakterinin serbest koagülazları varsa genellikle bağlı koagülazları da vardır.

### **Lipaz ve Lesitinaz testi:**

**Tanım:** Lipolitik bakteriler lipaz enzimleri ile yağları parçalayabilirler. Bazı bakterinin identifikasyonunda önemli bir kriterdir.

**Prensip:** Yağlar lipoliz ya da hidroliz ile gliserin ve yağ asitlerine parçalanır. Deneyin prensibi besiyerinde bu maddelerin pH indikatörü ile tespit edilmesine dayanır.

**İşlem:** Bakterinin saf kültüründen lipaz besiyerine ekim yapılarak türüne uygun süre inkübe edilir.

#### **Lipaz Besiyeri (Davis & Ewing, 1964):**

Pepton	10 g
Yeast Extract.	3 g
Sodium Chloride, NaCl	5 g
Agar	20 g
Victoria Blue, 1:1500 aq.sol.,	100 ml
Mısır yağı %5 v/v	50 ml
Distile su	900 ml

**Değerlendirme:** Koloni etrafında oluşan mavi renk yağın parçalandığını dolayısı ile o bakterinin lipazları olduğunu ve pozitif test sonucunu işaret eder. Yandan beyaz ışık ile aydınlatıldığında koloni bir inci tanesi gibi parlıyor ise lipaz aktivitesi vardır. Renk oluşmaması veya kırmızı renk oluşması negatif test sonucu olarak değerlendirilmelidir.

Agar içerisinde ve koloni çevresinde presipitatların bulunması bakterinin lesitinaz aktivitesini gösterir. Koloni üzerine 1 damla su konularak bakıldığında koloni etrafında presipitat ihtiva etmeyen parlak geniş bir zon var ise bu, lesitinaz pozitif anlamına gelir.

### **Malonat fermentasyonu :**

**Tanım:** Bazı bakteriler *sodyum malonat*'ı kullanma ve fermentleme özelliğine sahiptir. *Salmonella - Arizona* ve *Klebsiella - Aerobacter - Serratia* ayırımında faydalıdır.

**Prensip:** Malonat'ın yıkım ürünleri baziktir. Bu test bakteri üreyen ve içerisinde malonat bulunan besiyerinin pH sınırın tespiti esasına dayanır.

**İşlem:** İncelenecek bakteri türüne uygun süre malonat buyyonda inkübe edilir, pH indikatörü ile alkali değişim aranır.

#### **Modifiye Malonat Buyyon:**

Ammonium sulphate	2 g
Dipotassium phosphate, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6 g
Potassium phosphate, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4 g
Sodium chloride	2 g
Sodium malonate	3 g
Brom-timol mavisi, %5 alk.sol	5 ml
Distile su	1 lt

**Değerlendirme:** Mavi ve koyu yeşil renkleşme pH'ın yükseldiğini yani pozitif test sonucunu gösterir. Rengin değişmemesi ya da sarıya dönüşmesi negatif test sonucunu gösterir. Daima ekim yapılmamış bir buyyon ile birlikte inkübe edilmelidir. Besiyerine karbonhidrat konulmaz. Çünkü

karbonhidrat fermentlenerek asit oluşturur ve varsa alkali maddeleri tamponlayarak yanlış negatif sonuçlara sebebiyet verebilir. *Serratia*'lar negatif kontrol olarak kullanılabilir.

### **Mukat fermentasyonu:**

**Tanım:** Mukat bazı bakteriler tarafından fermentlenir. *Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Arizona* ve *Citrobacter* ayırımında önem taşır.

**Prensip:** Mukat (mukik asit) fermente olabilir yapıdadır ve son ürün kuvvetli bir asittir. Bu test, mukat bulunan besiyerinde, son ürün olan asitlerin oluştuğunu gözleme prensibine dayanır.

**İşlem:** Bakterinin saf kültürün organik asit besiyerine ekilerek türüne uygun süre inkübe edilir. İndikatör ile pH tespit edilir.

#### **Organik Asit Besiyeri (Ellis et al., 1957):**

Pepton	10 g	
Brom-timol mavisi %2	12 ml	
Mukat	10 g	
Distile su	1 lt	pH=7.4 ayarlanır

(Bu besiyeri, D-Tartarat ve sitrat kullanımını tespit etmek için de kullanılabilir. Bu durumda, besiyerine kullanılan mukat yerine tartarat veya sitrat konur)

**Değerlendirme:** Karbonhidrat fermentasyon testlerinde olduğu gibi pH indikatörünün koyu yeşilden sarı renge doğru dönüşmesi pH'ın 5.5 altına düşerek asit oluştuğu anlamına gelir, pozitif sonucu işaret eder. Bu besiyerine karbonhidrat ilavesinden kaçınmak gerekir.

Bazı kaynaklar sonucun doğrulanması amacı ile, hem kontrol tüpüne ve hem de ekim yapılmış tüpüne nötral kurşun asetat eriyiğinin 0.5 ml ilavesini gerekli görmektedirler.

Pozitif kontrol olarak *E.coli*, negatif kontrol olarak da herhangi bir *Shigella* veya *Edwardsiella* üyesi kullanılabilir

### **Metil kırmızısı testi:**

**Tanım:** Karbonhidratlardan ileri seviyede (pH≤4.4) asit oluşumunu tesbit için kullanılır. Bu durum ancak karışık asit fermentasyon yolunu kullanan bakterilerde mümkündür.

**Prensip:** Her bakterinin rahatça fermente edebileceği bir şeker (mesela glukoz) bulunan besiyerinde üretilen bakterinin pH 'ı 4.4'ün altına düşürecek kadar kuvvetli asit yapıp yapmadıklarının pH indikatörü veya pH-metre ile aranması esasına dayanır.

**İşlem:** Bu test için Voges-Proskauer (MR/VP) buyyon kullanılır. En az 48 saat inkübe edilir, sürenin uzun olması bilhassa gereklidir, 48 saat dolmadan okuma yapılmaz. Tüpe 5 damla metil red ayırıcı (besiyerinin her mililitresine 1 damla ayırıcı) ilave edilir ve kırmızı renk aranır.

#### **Methyl-Red/Voges-Proskauer (MR/VP) buyyon**

MR/VP broth Polypepton	7 g	
Glucose	5 g	
Dipotassium phosphate	5 g	
Distile su	1 lt	pH = 6.9 ayarlanır

#### **Metil red ayırıcı**

Methyl red	0.1 g
Ethyl alcohol 95%	300 ml
Distile su	200 ml

**Değerlendirme:** Besiyeri yüzeyinde (tamamında olmayabilir) kırmızı bir renk oluşumu pozitif sonuçtur, turuncuya doğru giden ara renkler pozitif değildir. Daha iyisi bir pH-metre ile besiyeri pH sının 4.4 sınırının altında olup olmadığının okumaktır.

Pekçok bakteri basit bir şeker olan glukozu fermente edebilir diye düşünülerek bu besiyerine karbonhidrat olarak glukoz seçilmiş ve yeterli görülmüştür. Halbuki, *Gardnerella vaginalis* ve *Eubacterium* türleri gibi bazı bakteriler glukozu kullanmadığı halde başka karbonhidratlardan çok kuvvetli (pH<4.4) asit oluşturabilir. Belkide bu test için kullanılan MR/VP

buyyon, karbonhidrat bakımından daha zengin hale getirilmelidir. Böylece potansiyel yanlış negatif sonuçlar engellenmiş olacaktır.

Pozitif kontrol amacı ile *E.coli*, negatif kontrol amacı ile *Enterobacter aerogenes* veya *Klebsiella pneumonia* kullanılabilir.

Bu test bu safhada Voges-Proskauer testi ile devam ettirilebilir:

### **Voges-Proskauer testi:**

(Bu testi uygulamak için yukarıda anlatılan Metil kırmızı testinin yapılmış olması gerekir.)

**Tanım:** Bazı bakteriler, karbonhidratı butanediol fermentasyon yolu ile fermente ederler. Sonuçta, *acetyl-methyl carbinol*, veya onun kursörleri *acetoin* ve *2,3,butanediol* oluşur. Bazı enterobakteriler (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*) için identiktir.

**Prensip:** İncelenen bakteri butanediol fermentasyon yolunu kullandıysa ortamda bulunan *acetoin* ve *2,3,butanediol* ayıraçların ilavesiyle diasetile oksitlenir ve  $\alpha$ -*naphthol* ile birleşip kırmızı renk verir. Testin amacı bu kırmızı rengin aranmasıdır.

**İşlem:** Metil red testinde anlatıldığı gibi üretilen bakteri örneği üzerine, besiyerinin her mililitresine 0.6 ml ayıraç-1 ve 0.2 ml ayıraç-2 ilave edilir. Tüp kuvvetle çalkalanıp yatık pozisyonda yarım saat beklenir. Kırmızı renk aranır. Bu yöntem Barritt metodudur. O'meara metodunda ise  $\alpha$ -*naphthol* yerine *creatine* kullanılır.

#### Ayıraç-1

$\alpha$ -Naphthol (5%)	5 g
Ethyl alcohol	100 ml

#### Ayıraç-2

Potassium hydroxide (40%)	40 g
Distile su	100 ml

**Değerlendirme:** Ayıraç ilavesinden 15-30 dakika sonra oluşan kırmızı renk pozitif sonuç anlamına gelir. Değerlendirme 1 saatten sonra yapılmamalıdır, çünkü negatif sonuçlanan testlerde bile yaklaşık bir saat sonra bakır rengi oluşur.

### **Nitrat redüksiyonu:**

**Tanım:** Bakterinin nitratdan oksijen koparabildiğinin araştırılmasıdır. Nitratları nitrite indirgeyen *nitrate reductase* enzimleri *Pantoea agglomerans*, bazı *Serratia* ve *Yersinia* türleri hariç bütün *Enterobacteriaceae* familyasında ve anaeroplarda nitrat redüktazlar genellikle bulunur. Bu test *Haemophilus*, *Neisseria* ve *Branhamella* genusuna ait üyelerin de birbirlerinden ayırımlarının yapılabilmesi için faydalı bir testtir.

**Prensip:** Reaksiyonun kimyasal profili şöyledir:  $\text{NO}_3^- + 2e^- + 2\text{H} \longrightarrow \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

Testin prensibi incelenen bakterinin üretildiği nitratlı ortamda nitrit aranmasıdır. Bakteri kolonisi üzerine veya buyyona ayıraçlar damlatıldığında ortamda nitrit varsa *p-sulfobenzene-azo- $\alpha$ -naphthylamine* oluşur. Bu madde kırmızı renkli bir diazonium boyasıdır.

**İşlem:** Bu test için bakteri örneği aşağıdaki besiyerinde türüne uygun süre inkübe edilir. Her iki ayıraç sırasıyla 0.5 ml damlatılır. Renk değişimi gözlenir.

#### Nitrate Broth or Nitrate Agar:

Beef extract	3 g
Pepton	5 g
Potassium nitrate (KNO <sub>3</sub> )	1 g
Agar (nitrit içermeyen)	12 g
Distile su	1 lt.

#### Ayıraç A:

Sulfanilic acid	8 g
Acetic acid 5N,30%	1 lt

#### Ayıraç B:

$\alpha$ -Naphthylamine	5 g
Acetic acid (5 N),30%	1 lt

**Değerlendirme:** 30 saniye içerisinde kırmızı renk oluşması pozitif sonuç anlamına gelir. Besiyerinin renginde bir değişim olmaması şu sonuçlardan birisini ifade eder: 1) Bu bakteri nitratı nitrite redüklememiştir, bu halde testin sonucu gerçekten negatiftir. 2) Bu bakteri nitratı nitrite redüklemiş, ama nitrit süratle başka komponentlere bağlanarak ayıraçlardan gizlenmiştir. Testin sonucu pozitif ama negatif görünmektedir. (Örneğin nitrat iki defa redüklenirse sonuçta nitrit değil,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  veya *hydroxylamine* şekline dönüşür. Ayıraçlar bunları tespit edemez). Bunu anlamak için, negatif sonuç veren besi yeri içerisine küçük bir metalik çinko parçası atılarak nitratlar manuel olarak nitrite indirgenmeli ve kırmızı renk oluşumu aranmalıdır. Bu doğrulama işleminin sonucunda kırmızı renk görülmesi, ortamda indirgenmemiş nitrat bulunduğunu ve bakterinin nitrat redüktazlarının bulunmadığını yani testin sonucun negatif olduğunu gösterir.

Kontrol amacı ile negatif testler tekrarlanabilir veya negatif kontrol olarak *Acinetobacter baumannii*, pozitif kontrol olarak ise *Escherichia coli* kullanılabilir.

Bu test *Mycobacterium*'lar için yapılacaksa besiyeri modifiye edilmeli, laktik asit ilave edilmeli ve inkübasyon süresi türe uygun olarak uzatılmalıdır.

### **Oksidaz testi:**

**Tanım:** *Cytochrome C oxydase* enziminin varlığını arayan bir testtir. Bu enzim demir içeren bir hemoproteindir, nonfermentatif (aerobik) solunuma katılır. *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Vibrio* ve *Pasteurella*'larda bulunur zorunlu anaeroplarda genellikle bulunmaz.

**Prensip:** İncelenen bakteride bu enzim bulunuyorsa ayıraç indofenol mavisine oksitler ve mavi renk açığa çıkar.

**İşlem:** %1 lik Kovac's oksidaz ayırıcı (*Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride*) veya Gordon - McLeod's oksidaz ayırıcı (*Dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride*) veya ticari oksidaz disk ve ayıraçları kullanılabilir. **Direkt Plak Teknik:** 2-3 damla ayıraç doğrudan bakteri kolonisi üzerine damlatılır. **İndirekt Strip Teknik:** Ayıraçlardan birisi bir süzgeç kağıdına emdirilir ve üzerine bakteri kolonisi tatbik edilir. Önerilen metot budur.

**Değerlendirme:** 10 saniye içerisinde bakteri kolonisinin temas ettiği süzgeç kağıdının veya üzerine ayıraç damlatılan koloninin koyu mavi renk alması pozitif sonuçtur. 60 saniye içerisinde oluşan renkleşme durumunda test tekrarlanmalıdır, daha geç oluşabilecek renkleşmeler değerlendirilmez. Nikel, krom ve paslanmaz çelikden yapılmış özeler yerine ağaçtan yapılmış kürdanlar kullanılmalıdır. Çünkü metal yüzeyinde oluşan oksitler testin sonucunu yanlış pozitif yapar. Negatif kontrol olarak *E. coli*, pozitif kontrol için ise *P. aeruginosa* kullanılabilir.

### **$\beta$ -D-galaktozidaz (ONPG) testi:**

**Tanım:** Bakteri hücresi laktozu kullanabilmek için önce: 1) Laktozu bir *permease* enzimi ile hücre içerisine alır, daha sonra, 2) hücre içerisine aldığı laktozu intraselüler bir enzim olan  $\beta$ -galaktozidaz ile hidrolize eder. Bu test,  $\beta$ -galaktozidaz'ın varlığını yani laktoza potansiyel etkili bakterileri ortaya çıkartır. Bu test sonucu pozitif olan bir bakteri laktozu fermente etmek zorunda değildir.

**Prensip:** Eğer bakteride  $\beta$ -galaktozidaz enzimi varsa ortamda bulunan *O-Nitrophenyl- $\beta$ -D Galactopyranoside* (ONPG) parçalanacaktır. Sonuçta galaktoz ve *O-Nitrophenyl* açığa çıkacaktır. Bunlardan *O-Nitrophenyl* sarı renklidir.

**İşlem:** İncelenecek bakterinin saf kültüründen bir koloni ONPG buyyona ekilerek türüne uygun süre inkübe edilir. Sarı renk aranır.

#### **ONPG Buyyon:**

Peptonlu su	750 ml
ONPG stok solusyonu	250 ml

#### **ONPG Stok Solusyonu:**

ONPG	6 g
0.01M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1 lt

**Değerlendirme:** İnkübasyonu takiben oluşan sarı renk pozitif test sonucunu verir. ONPG stok solusyonu buzdolabında ve karanlıkta saklanmalıdır.

### Safra tolerans:

**Tanım:** Bazı bakteriler barsağın doğal konakçısı olup bir karaciğer salgısı olan safranın %40 konsantrasyonlarına bile tolerans gösterirler. Bu test o bakterinin safrada yani barsakta yaşayıp yaşayamadığını tespit eder. *B. fragilis*'in diğer Gram negatif anaeroplardan ayırımında ve bazı enterobakteriler ve D grubu streptokokların ayırımında anahtar testtir. Bu test, *Pneumococcus* genusuna uygulanan safrada lizis testinden bağımsızdır.

**Prencip:** İçerisinde %40 safra bulunan bir besiyerinde üreme olup olmadığına bakılmasından ibarettir.

**İşlem:** İncelenecek bakterinin saf kolonisi safralı agar içerisine ekilir, türüne uygun sıcaklıkta uygun süre inkübe edilir, üreme aranır.

#### Safralı Agar:

Kurutulmuş öküz safrası	40 g
At serumu	50 ml
Et infuzyon agar(veya türe uygun besiyeri)	1 lt

**Değerlendirme:** İnkübasyonu takiben sadece üreme aranır. Koloni morfolojisi, koloni rengi veya mikroskopi bakılmaz. Bakteri kolonisinin mevcudiyeti pozitif test sonucu için yeterlidir.

Ticaretten temin edilebilen safra diskleri de vardır, antibiyotik diskleri gibi ekim yapılmış agar yüzeyine bırakılıp zon ölçümü yapılabilir. Disk kullanımı anaeroplara için tercih edilir.

### Safrada lizis :

**Tanım:** Pnömokokları diğer streptokoklardan ayırmak için yapılan bir testtir. Pnömokoklar enterik ekolojiye (safra) fazla duyarlıdır. Ortamda safra mevcudiyetinde pnömokok otolizini (*alanin-muramyl-amidase*) aktive olur ve bakteri hücresi parçalanır. Bu test safraya tolerans testi değildir ve bu test için safrada erime ifadesi makul bir terim değildir.

**Prencip:** Bakteri kültürü üzerine safra eklenir, buyyonun optik geçirgenliğine bakılarak lizis aranır. Otolizise direnen pnömokokların yanlış negatif sonuçlarını engellemek için ve bakterinin otolizini aktive etmek için buyyona *sodium deoxylate* eklenebilir.

**İşlem:** Pnömokok olduğundan şüphelenilen streptokok örneği iki ayrı buyyonda bolca üretilip pH sı 7.4-7.6 ya ayarlanır, %10 luk *sodium deoxylate* solüsyonu eklenir. Bir tanesinin üzerine %9-11 lik öküz safrası (veya onun yerine ona eşdeğer olarak safra asiti olan *sodium taurocholate*) eklenir. 15 dakika etüvde bırakılır. Her iki tüp, optik okuyucuda veya göz ile bakılarak mukayese edilir, kontrol tüpüne kıyasla kültür sıvısının renginin açılıp açılmadığı yoklanır.

**Değerlendirme:** Safra ilave edilen buyyonda, kontrol tüpüne kıyasla renk açılması pozitif test sonucudur. Negatif kontrol olarak enterokok kullanılabilir.

### Sitrat kullanımı :

**Tanım:** *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.

**Prencip:** Bu test yapılırken bakteri örneği protein ve karbonhidratlardan yoksun bir ortama ekilerek sitrati kullanmaya zorlanır. Eğer bakteri sitrati kullanabilirse bazik ürünler açığa çıkarır. Çünkü, besiyeri içerisinde sitrata bağlı olarak bulunan katyonlar, sitrat ayrılınca amonyağa, amonyuma ( $\text{NH}_4^+$ ) ve amonyum hidroksit'e ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) dönüşür. Oluşan alkali ortamda bulunan bromtimol mavisini pH indikatörü olarak baz oluşumunu gösterir.

**İşlem:** Denecek 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.

#### Simmons Citrate agar:

Ammonium dihydrogen phosphate	1 g
Dipotassium phosphate	1 g
Sodium chloride	5 g
Sodium citrate	2 g



Magnesium sulfate	0.20 g
Agar	15 g
Bromthymol blue	0.08 g
Distile su	1 lt

**Değerlendirme:** 48 saatlik inkübasyonu takiben koloni gelişmesi pozitif test sonucu için yeterlidir. Çünkü bu besiyerinde bakterinin kullanabileceği sitrattan başka bir karbon kaynağı yoktur. Koloni geliyorsa sitrati kullanabiliyor demektir. Koloniler etrafında koyu mavi renk oluşumu pozitif sonucu destekler. Koloni gelişmiş ancak mavi renk almamış besiyerlerinin, daha uzun süre inkübasyonu yapılarak renk oluşumu aranmasına gerek yoktur. Ancak beklenirse mavi renk oluşacaktır.

Pozitif kontrol için *Enterobacter aerogenes*, negatif kontrol için *Escherichia coli* kullanılabilir.

### Üreaz testi:

**Tanım:** Üre ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ ), karbonik asitin bir *diamide* türevidir. Bütün diamitler kolayca amonyak ve  $\text{CO}_2$ 'e hidrolize olurlar, daha sonra amonyum karbonata dönüşürler. Bazı bakteriler üreaz (*urease*) enzimleri ile şu reaksiyonu katalizlerler:  $(\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2) + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{urease} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NH}_3 \leftrightarrow (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$

**Prensip:** Bakteri, içerisinde üre bulunan besiyerinde üretilerek üre'nin bazik yıkım ürünleri pH indikatörü ile izlenir.

**İşlem:** İncelenecek bakterinin saf kültüründen bir öze dolusu *Stuart's* üre buyyona veya *Christensen's* üre agar'a ekim yapılarak türüne uygun süre inkübe edilir. pH indikatöründeki renk değişimi gözlenir.

#### Stuart's Urea Broth

Yeast extract	0.1 g	
Monopotassium phosphate	9.1 g	
Disodium phosphate	9.5 g	
Urea	20 g	
Phenol red	0.01 g	pH = 6.8 ayarlanır

#### Christensen's Urea Agar

Pepton	1 g	
Glucose	1 g	
Sodium chloride	5 g	
Monopotassium phosphate	2 g	
Urea	20 g	
Phenol red	0.012 g	
Agar	15 g	pH = 6.8 ayarlanır

**Değerlendirme:** Bazı mikroorganizmalar (*Proteus* ve *Actinobacillus* gibi) 1-2 saat içinde üreyi hidrolize edebilir, daha az aktif türler ise 2 veya 3 gün gereksinir. Her iki besiyeri de alkali pH'da kırmızı renk alır. Bu renk değişimi pozitif reaksiyon anlamına gelir. Besiyeri sarı rengini korumuş ise negatif reaksiyon olarak yorumlanır.

Pozitif kontrol için *Proteus*'lar, negatif kontrol için *Escherichia coli*, zayıf pozitif kontrol için ise *Klebsiella* türleri kullanılabilir.

### Diğer biyokimyasal testler :

**Adanitol (ribitol):** Riboz'un indirgenme ile yıkılmış ürünüdür. Bazı bakteriler bunu polihidrik bir alkole dönüştürebilir.

**Dulsitol (galactitol) ve sorbitol (glucitol):** Glukozun aldehit gurubunun indirgenmesi sırasında ortaya çıkan polihidrik alkollerdir. C grubu streptokoklar, *E. coli*, *K. pneumonia* ve birçok *Salmonella* için identiktir.

**Mannitol'e etki:** Mannoz veya fruktozun yıkım ürünlerinden olup polihidrik bir alkoldür. *E. coli*, bazı *Salmonella*, *Mycobacterium* ve *Bacillus* türleri tarafından metabolize edilir.

**Eritritol:** Eritroz (*erythrose*) isimli şekerin parçalanması ile ortaya çıkan bir alkoldür. Kimyasal yapısı;  $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_2\text{CH}_2\text{OH}$  dir. Bazı bakteriler eritritolu metabolize edebilirler.

**İnositol'e etki:** İnositol, *hexahydroxycyclohexane* genel ismi ile bilinir. Bakterilerin fosfolipitlerinde yer alır. Dokuz farklı stereokimyasal formu bulunur. Başlıcaları şunlardır: *Myo-inositol*, *scyllitol* (aminoglikozit antibiyotiklerin çekirdeğini oluşturur), *d-inositol*, ve *l-inositol* vs. Bazı bakterilerin beslenme gereksinimidir. Bilhassa *K. pneumonia* ayırımında faydalıdır.

**Salisin'e etki:** *O-Hydroxymethyl-Phenyl-β-D-glucopyranoside*. Bu maddenin bakteri tarafından metabolize edilip edilmediği bilhassa *S.pyogenes*, *K.pneumonia* ve *S.marcences* için identiktir.

**Gliserol fermentasyonu:** Gliserol bir alkoldür. Alkolik fermentasyonun bir minör ürünüdür. Fakat alkali ortamda veya ortamda bisülfid mevcudiyetinde çok miktarda dihydroxyacetone phosphate açığa çıkar ve  $\text{NADH}_2$  tarafından *glycerol-3-phosphate*'a dönüştürülür. Daha sonra bu madde defosforile edilerek enerji açığa çıkarılır ve gliserol meydana gelir. Bu yolu kullanarak enerji temin bazı bakteriler için bu test identiktir. (*Bacillus* gibi).

**Nişasta hidrolizi:** Bakterinin türüne uygun, proteinden zengin ama karbonhidrattan fakir bir besiyerine nişasta ilave edilir. İnokülasyonu takiben, uygun süre inkübe edilir, kolonilerinin üzerine *Gram's* iodine solusyonundan 1-2 damla bırakılır. Renksiz kalması nişastanın hidrolize olduğunu gösterir.

**Kazein hidrolizi:** Bakterinin türüne uygun, karbonhidrattan zengin ama proteinden fakir bir besiyerine inek sütü ilave edilir. Uygun süre inkübe edilir, kazein hidrolize olmuşsa koloni çevresi şeffaftır.

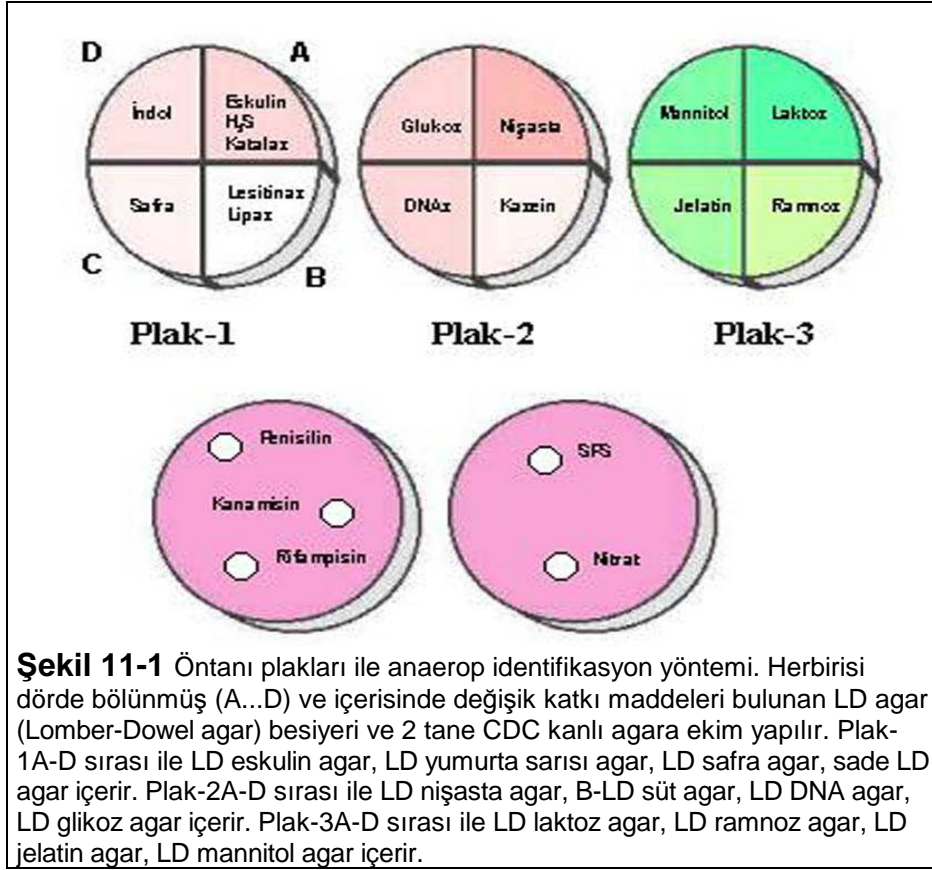
### ANAEROPLARIN İDENTİFİKASYONU:

Yukardaki testler anaerobik atmosfer altında anaeroplara için de yapılabilir. Eğer testin anaerobik bakteriler için yapılması bir özellik arz ediyorsa, bu durum test anlatılırken açıklanmıştır. Klinik önemi olan bazı anaerobik bakterilerin koloni morfolojisi, pigment ve floresans özellikleri Tablo 11-1 'de verilmiştir.

**Tablo 11-1** Klinik önemi olan bazı anaerop bakterilerin kültür özellikleri.

Kültür özelliği	Muhtemel bakteri çeşidi
Agarı delen koloni	<i>Bacteroides ureolyticus</i> grubu, <i>Ekinella</i>
Siyah pigmentli koloni	<i>Bacteroides levii</i> , <i>B. macacae</i> , <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> , <i>P.gingivalis</i> ve <i>P. endodontalis</i> , <i>Prevotella corporis</i> , <i>P. loeschii</i> , <i>P. denticola</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. nigrescens</i> veya herhangi bir anaerop Gram negatif çomak.
Kırmızı floresans	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella loeschii</i>
Yeşilimsi floresans	<i>Fusobacterium</i> türleri
Besiyerinin yeşillenmesi	<i>Fusobacterium</i> türleri
Çift zonlu β hemoliz	<i>Clostridium perfringens</i>
Sahanda yumurta görünümü	<i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Fusobacterium varium</i>
İri ve çentikli koloni	<i>Clostridium</i> türleri
Medüz başı koloni	<i>Clostridium septicum</i>
Azı dişi görüntüsü	<i>Actinomyces</i> türleri
Benekli koloni	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Buyyonda kümeleşme	<i>Clostridium septicum</i> , <i>Clostridium sordelli</i>

### Ön Tanı Plakları (Presumpto plates, 3 lü kvadrant plaklar):



**Tanım:** Lombard ve Dowell tarafından geliştirilmiş ve CDC tarafından kabul görüp standardize edilmiş bir anaerop identifikasyon prosedürüdür. Bu işlem için her birisi dörde bölünmüş üç tane standart petri kutusu kullanılır. Bu plaklar 1 den 3 e kadar numaralandırılır. Herbir petri kutusu sağ üstten başlayıp, saat istikametine doğru dönecek şekilde A harfinden D harfine kadar isimlendirilir (1A,1B,1C,1D; 2A,2B,2C,2D; 3A,3B,3C,3D) ve her birisine LD agar (Lomber-Dowel agar) ve farklı katkı maddeleri içeren besiyerleri konular. Böylece birbirinden farklı özellikte olan 12 tane plak serisi oluşturulur. Bu üç petri kutusundan başka 2 adet CDC anaerop kanlı

agar da kullanılır. Bkz. Şekil 11-1.

**Prensip:** Tanımlanan bu yöntemde anaerop identifikasyona pratik bir yaklaşım esas alınmıştır. Tek bir bakteri örneğine 24 tane biyokimyasal ve fizyolojik testi tek bir inkübasyonda yapmak mümkündür. Besiyeri modifiye edilebilir. LD agar yerine örneğin PY agar kullanılabilir veya besiyeri sayısı amaca özel şekilde artırılabilir. Böylece anaerop identifikasyona bir esneklik ve çabukluk getirilmiştir.

**İşlem:** İncelenecek bakterinin sıvı besiyerindeki 24 saatlik saf kültürü McFarland No.3 bulanıklık seviyesine ayarlanır ve her plaktaki 4 çeyreğe ve 2 tane kanlı agara eşit miktarda ekim yapılır. Birinci plağın D çeyreğine ekim yapıldıktan sonra (LD agar bulunan sol-üst çeyrek) agar yüzeyine steril bir kurutma kağıdı yerleştirilir, bu kağıt daha sonra indol testinde kullanılacaktır.

CDC kanlı agar üzerine 2 IU penisilin, 1000 µg/ml konsantrasyonda kanamisin, 15 µg/ml konsantrasyonda rifampin emdirilmiş diskler yerleştirilir. Bunların ticari olanları da vardır (Becton Dickinson, MD).

İkinci CDC anaerop kanlı agar üzerine SPS ve nitrat emdirilmiş diskler yerleştirilir. SPS disk hazırlamak için %5lik SPS solusyonundan 20 µl alınır, standart antibiyotik duyarlık diskine (¼ inch) emdirilir, kurutulur. Ticarete Grobax diskleri adı ile bilinir (Roche diagnostic, Nutley, NJ). Bunlar oda ısısında 6 ay, buzdolabı ve karanlıkta daha uzun süre stabildir. Nitrat diski hazırlamak için, 30g KNO<sub>3</sub> ve 0.1g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (*sodium molybdate*) 100 ml distile su içerisinde çözülür. Por çapı 0.45 µm olan filtre kullanılarak steril edilir, kurutma kağıdı diskine 20 µl olarak emdirilir ve kurutulur.

İnoküle edilen plaklar, bakterinin türüne uygun süre inkübe edilir.

**Değerlendirme:** 2 tane CDC kanlı agarda hemoliz, pigment, floresans, Gram reaksiyon, hareket ve penisilin, rifampin, kanamisin direnci bakılır. SPS, Penisilin ve kanamisin diski için 12 mm, rifampin diski için 15 mm den dar zonlar dirençli, daha geniş zonlar ise duyarlı olarak not edilir. Nitrat diski üzerine, nitrat redüksiyon testinde anlatılan ayıraçlar damlatılır ve orada anlatıldığı şekilde değerlendirilir. Antibiyotik duyarlılık disklerinin yorumu Tablo 11-2'de verilmiştir. Plak-1'in A çeyreği şu testlere hizmet eder: eskulin hidrolizi, H<sub>2</sub>S oluşumu ve katalaz. Plak-1B çeyreğinde lipaz ve lesitinaz aktivitesi bakılır. Plak-1C ve D çeyreklerinde sırası ile safra tolerans

ve indol bakılır. Plak-2'de sıra ile nişastanın hidrolizi, kazein hidrolizi, DNAz aktivitesi ve glukoz fermentasyonu bakılır. Plak-3'te A,B ve D çeyreklerinde sırası ile laktoz, ramnoz fermentasyonu ve mannitol'u kullanma araştırılır. C çeyreğinde jelatin hidrolizi incelenir. Bu testlerin teker teker nasıl yorumlanacağı bu konunun içerisinde ilgili başlık altında anlatılmıştır. Bakteri identifikasyon tabloları Ek-4 te verilmiştir.

**Tablo 11-2** Ön tanı plaklarında kullanılan antibiyotik disklerinin yorumlanması. {**R**, dirençli; **S**, duyarlı;  $\pm$ , değişken sonuçları ifade eder.}

Üretilen anaerop mikroorganizma	Denenen antibiyotik		
	Colistin (10 $\mu$ g)	Kanamisin (1 mg)	Vancomycin (5 $\mu$ g)
Bütün Gram pozitifler	R	R	S
Gram negatif koklar	S	S	R
<i>Bacteroides fragilis</i> grubu	R	R	R
<i>Bacteroides ureolyticus</i> grubu	S	S	R
Diğer <i>Bacteroides</i> ler	$\pm$	R	R
<i>Fusobacterium</i> lar	S	S	R
<i>Prevotella</i>	$\pm$	R	R

### Anaerop identifikasyon kitleri:

İdentifikasyonda kullanmak üzere laboratuvarında hazırlanan bütün kimyasal maddeler, besiyerleri ve ayrıçlar, küçük ampullere ve şişelere doldurularak kutu içerisinde kullanıma hazır bir şekilde satılır. Bunlara identifikasyon kitleri denir. Ticari identifikasyon kitlerinin sayısı 24 ün üzerindedir, ancak üzerinde en çok çalışma yapılan API-20A (Analytab,NY) ve Minitek (Becton Dickinson, MD)'tir. Her ikisi de asakkarolitik anaeroplara ve Gram negatif koklar için yetersiz görünmektedirler. Yapılan karşılaştırmalı çalışmalar Presumpto Plates (Öntanı Plakları) yönteminin her türlü identifikasyon kitinden daha değerli olduğunu göstermiştir. Bir çalışmada API-ZYM (Analtab, NY), API An-IDENT (Analytab,NY), IDS RapID-ANA II (Innovate Diagnostic, GA), Vitek Anaerobe Identification ANI (Vitek Systems, MO), MicroScan Rapid Anaerobe Identification System (American MicroScan CA) ve ATB 32A Anaerobes ID (bioMerieux, France) isimli kitler karşılaştırılmış, sonuçta bu kitlerin identifikasyon doğruluk değerinin ortalama %60-70 arasında olduğu bulunmuştur. Yazarlar bu ve benzer kitlerin kullanımdan kaldırılması temennisinde bulunmuşlardır.

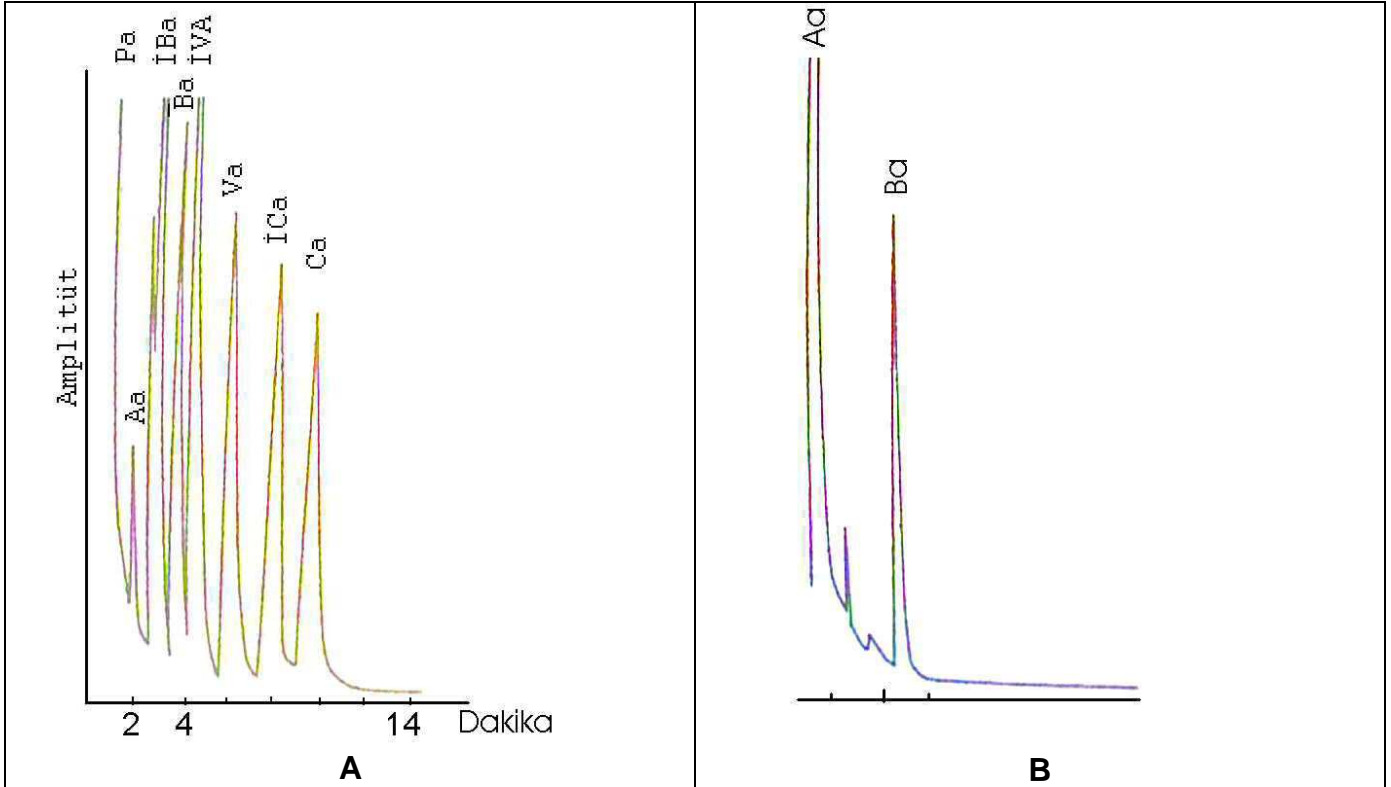
RapID ANA II kiti kullanarak daha önceden ne olduğu bilinen 300 anaerobun %87'sini doğru olarak tanımlanmıştır. Bir başka çalışmada ise 566 anaerop bakteri kullanılmış ve aynı kit ile ancak %68 bakteri örneği doğru olarak tanımlanmıştır.

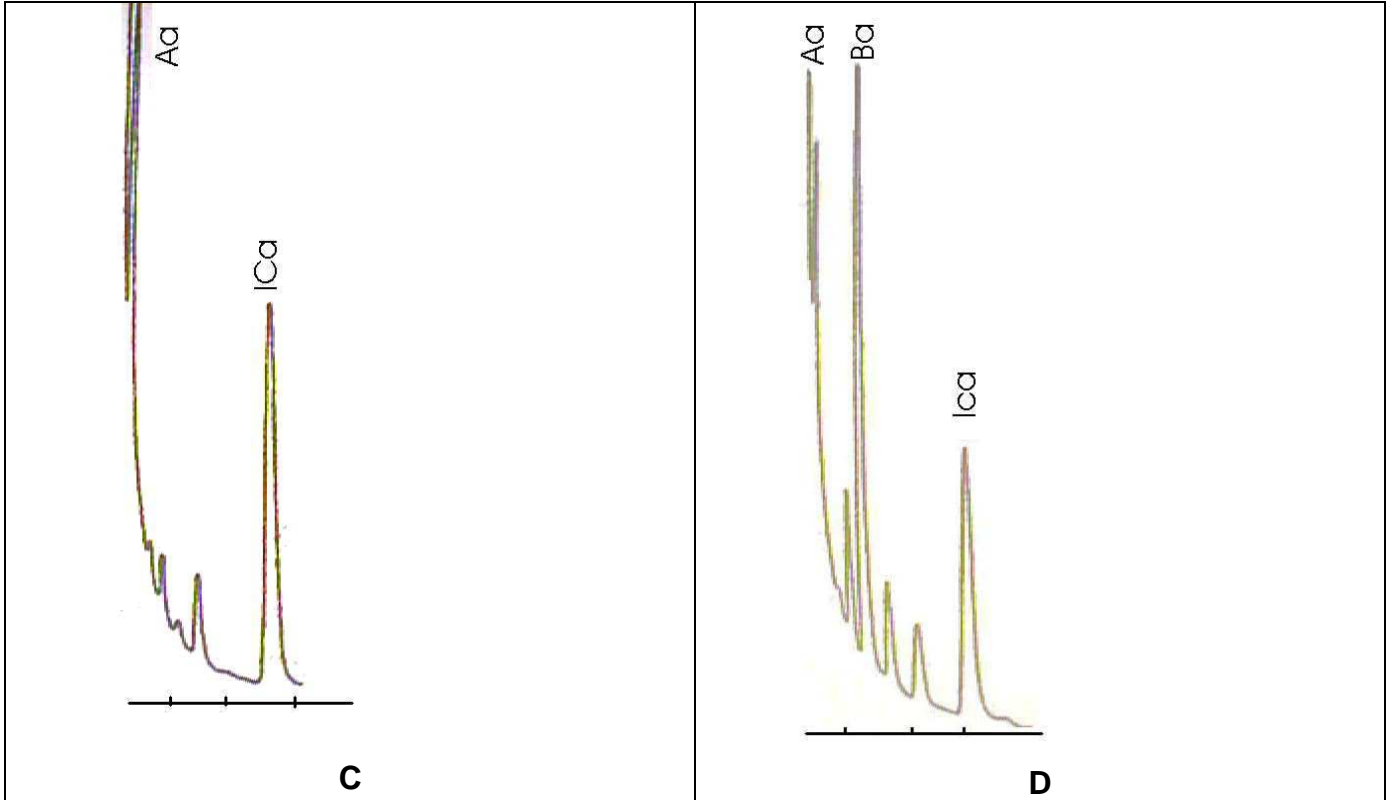
Bazı anaerop identifikasyon kitleri, yoğun inokulum (MacFarland No.5) kullanmak sureti ile 4 saatlik inkübasyon dönemi sonunda bakterinin enzimatik (*glycosidase*, *aminopeptidase*) aktivitesine dayanarak identifikasyon yapabilmektedir. 24-48 saatlik inkübasyon dönemi olan kitler ile bu 4 saatlik kitler arasında karşılaştırma yapan bir çalışmada 563 anaerop bakteri kullanılmıştır. Bu bakterilerden 268 tane *Bacteroides* ve *Fusobacterium*'ün %74'ü, 97 tane anaerobik kokun %81'i, 78 tane sporsuz Gram pozitif anaerobik çomağın %55'i, 120 tane *Clostridium*'ün %64'ü doğru tanımlanmıştır. Sonuçta anlaşılması her iki şekilde elde edilen sonuçlar birbirine anlamlı şekilde yakın çıkmaktadır ama doğrulukları tartışmalıdır. Yazarların ortak düşüncesi ilave testler gerektiği ve hızlı sonuç gereksinimi dışında hiçbir kitin anaerobik identifikasyon amacı ile kullanılmaması gerektiğidir. Ayrıca, kitlere inoküle edilecek bakteri örneğinin üretici firmaların belirlediği besiyerlerinde hazırlanması gerekmektedir. Örneğin incelenecek bakteri örneği Schaedler Blood Agar veya Cycloserine-Cefixitin Fructose Agar içerisinde üretilmişse kitler hatalı sonuçlar vermektedir. Doğru identifikasyon amacıyla üretici firmalar kitlerin içerisine gereğinden fazla çeşitlilikte besiyerleri ilave etmektedir, bunlar identifikasyon kitinin maliyetini artırmaktadır ve üretici firmaya bağımlı hale getirmektedir. Bir başka problem zamanla bozunabileceği haklı

gerekçesi ile vit K<sub>1</sub>, L-cystine ve yeast extract kitlere eklenememiştir. Oysaki bunlar bazı *Bacteroides* ve *Porphyromonas* türlerinin bağımlı olduğu maddelerdir.

### Gaz likit kromatografisi (Gas-Liquid-Chromatography, GLC):

**Tanım:** Anaerobizm konusunda anlatıldığı üzere, anaerob bakterilerin, Embden-Meyerhof-Parnas yolu ile elde ettikleri heksoz yıkım ürünleri kendi türlerine özgüdür ve bu kimyasal maddeleri üredikleri ortama salarlar. GLC ile bakteri identifikasyonu, bakteriyi değil, bakterinin ürettiği ortamdaki heksoz yıkım ürünlerini tespit etme esasına dayanır. Bu ürünler, volatil veya nonvolatil yağ asitleridir. GLC ile incelenen bakterinin genusu tam olarak söylenebilir ama spesifik epitetini kesin olarak söylemek zordur. Örneğin bir bakterinin ürettiği ortama bütirik asit verdiği tespit edilirse, bunun hangi *Clostridium* olduğunu söylemek zordur. Çünkü *Clostridium*'lar içerisinde 14 tanesi ürettiği ortama bütirik asit salar. *Propionobacterium* genusundaki bütün bakteriler ortama propiyonik asit salar. GLC bulguları ile diğer standart biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçları birleştirildiğinde daha doğru bir identifikasyon yapılabilir. Kabul gören 2 tane GLC standardı vardır: Thermal Conductivity Detectors (TCD) (He gazı basıncı 75 lb/in<sup>2</sup>, kolon ısısı 115 °C, enjektör ısısı 180 °C, dedektör ısısı 200 °C.) ve Hydrogen Flame Ionization Detectors (FID) (He gazı basıncı 40 lb/in<sup>2</sup>, kolon ısısı 145 °C, enjektör ısısı 180 °C, dedektör ısısı 190 °C). Her ikisinde de taşıyıcı gaz helyum'dur ve okumalar 1 saniyede 1 mV seviyesindedir. FID, nonvolatil asitlerin tayini için önerilmez.





**Şekil 11-2** Gaz likit kromatografi yönteminde kalibrasyon solüsyonunun verdiği pikler (A), muhtelif bakteri örneklerinin PYG buyyonda, 35 °C de ve 48 saatlik kültürünün Thermal Conductivity Detector cihazı ile verdiği pikler (B,C,D). Bakteriler tarafından hangi yağ asitlerinin besiyerine salındığı tespit edilir ve identifikasyon yapılır.

*Pa*, propionic acid; *Aa*, acetic acid; *IBA*, isobutyric acid; *Ba*, butyric acid; *IVa*, isovaleric acid; *Va*, valeric acid; *ICa*, isocaproic acid; *Ca*, caproic acid.

**Prensip:** Bakterinin ürettiği sıvı besiyeri, ısıtılmış helyum gazı içerisinde geçirilir bu sırada oluşan sıcaklık değişimleri cihaz tarafından elektriksel sinyallere dönüştürülür, amplifiye edilerek kayıtlarır. Besiyerindeki her yağ asiti belirli sürelerde yanar ve voltaj sıçralamaları (pik) yapar. Kaçıncı dakika bu elektrik sinyal değişimi meydana geldiyse, o sırada yanmakta olan yağ asitinin ne olduğunu kantitatif olarak ifade eder. Bunun için önceden içerisinde bilinen miktarda bilinen yağ asitleri bulunan bir sıvı cihazda okunup kayıt edilerek cihaz kalibre edilmelidir. Volatil asit kalibrasyon solüsyonu için bir tüpe *acetic, formic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric, valeric, isocaproic, caproic* asitler ve distile su sırasıyla 0.037, 0.057, 0.075, 0.092, 0.091, 0.109, 0.109, 0.126, 0.126, 100 ml konur. Hazır satılanı da vardır (Supelco, Inc.). Nonvolatil asit kalibrasyon solüsyonu için bir tüpe *pyruvic, lactic* (%85), *succinic, phenylacetic* asitler ve distile su sırasıyla 0.068, 0.084, 0.06, 0.08, 100 ml konur ve cihaza okutturulur. Şekil11-2A'daki gibi voltaj pikleri elde edilir. Her bir pik hangi yağ asitinin ne miktarda bulunduğunu anlatır.

**İşlem:** Bakterinin kültürünün yapıldığı ortamda volatil yağ asitleri (*acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric, valeric, isocaproic* ve *caproic* asitler)in varlığını tespit etmek için : İncelenecek bakteri 8 ml PYG buyyona ekilir, anaerobik şartlarda uygun süre inkübe edilir, 2 ml PYG buyyon, 13x100 mm lik temiz bir vida kapaklı tüpe alınır, pH = 2 veya altında oluncaya kadar %50 (V/V) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilir, bu işlem eterde çözünürlüğü artıracaktır. 1 ml *ethyl ether* ilave edilir, tübün kapağı sıkılır ve kuvvetle çalkalanır, bu sırada uçucu yağ asitleri eter içerisinde çözünecektir, daha az parlayıcı olduğundan eter yerine *Metyl-tert-butyl* kullanılabilir. 1500-2000 rpm 15 dakika santrifüjlenerek eter-kültür emülsiyonu çöktürülür, tüp, -20°C de bekletilir, bu işlem sırasında besiyeri donar ama eter sıvı halde kalacaktır. Tübün kapağı açılarak eter bir başka tüpe alınır ve istenirse üzerine birkaç parça CaCl<sub>2</sub> parçası atılarak varsa kalıntı su bağlanır. GLC paketi (Sp-1220) içerisine 14 µl enjekte edilir.

Nonvolatil yağ asitleri (*Pyruvic, lactic, fumaric, succinic, hydrocinnamic* ve *phenylacetic* asitler)in tespiti için, 1 ml PYG buyyondaki saf kültürden temiz bir vida kapaklı tüpe alınır, 0.4 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 2 ml metanol eklenir, 55 °C lik su banyosunda en az 1 saat ve hatta mümkünse bir gece bekletilir, 1 ml distile su ve 0.5 ml kloroform eklenir, bu safhada yağ asitleri kloroform içerisinde çözünecektir, santrifüjlenerek kloroform emülsiyonunun tüpün dibine çökmesi sağlanır. Enjektör ile tüpün dibindeki kloroform alınır, enjektör iğnesinin dış yüzeyi distile su ile yıkanır, 14 µl emülsiyon GLC paketine (SP-1000) enjekte edilir.

**Tablo 11-3** Klinik önemi olan bazı anaeroplardan ve gaz likit kromatografisi ile identifikasyonunu sağlayan yağ asiti profili. Peptone-Yeast-Extract-Glucose buyyonda, 35 °C de ve 48 saatlik kültür kullanılmış, ölçümler Thermal Conductivity Detector cihazı ile yapılmıştır.

	Acetic acid	Propionic acid	Isobutyric acid	Butyric acid	Isovaleric acid	Valeric acid	Isocaproic acid	Caproic acid	Lactic acid	Succinic acid	Phenyl acetic acid
<i>Bacteroides capillosus</i>	+	±	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>Bacteroides distasonis</i>	+	±	-	-	±	-	-	-	±	+	+
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	±	±	-	±	-	-	-	+	+	+
<i>Bacteroides ovatus</i>	+	+	±	-	±	-	-	-	±	+	+
<i>Bacteroides splanchnicus</i>	+	+	+	+	±	-	-	-	±		
<i>Bacteroides thetaiomicron</i>	+	±	±	-	±	-	-	-	±	+	+
<i>Bacteroides uniformis</i>	+	±	±	-	±	-	-	-	+	+	
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>Bacteroides vulgatus</i>	+	+	±	-	-	±	-	-	+	+	-
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	+	+	+	+	+	-	-	-		+	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Prevotella bivia</i>	+	-	±	-	±	-	-	-	-	+	
<i>Prevotella disiens</i>	+	±	±	-	±	-	-	-	-	+	
<i>Prevotella intermedia</i>	+	±	±	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	+	±	-	+	-	±	-	-	-	-	
<i>Fusobacterium naviforme</i>	+	±	-	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Fusobacterium nechroforum</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	±	
<i>Fusobacterium varium</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	+	±	

**Değerlendirme:** Elde edilen pikler kalibrasyon pikleri ile mukayese edilerek incelenen anaerob bakterinin ortama saldıgı heksoz yıkım ürünlerinin ne olduğu not edilir ve Tablo 11-3 ile karşılaştırılır. Diğer test sonuçları da uyumluysa identifikasyon tamamlanır.

Kontrol amacıyla ekilmemiş bir PYG buyyona aynı işlemler yapılarak çalışmaya dahil edilmelidir.

PYG buyyon yerine Chopped-Meat-Glucose buyyon kullanılırsa, sürpriz asetik ve laktik asit pikleri verebilir. Ekili olmasa bile bekletilmiş besiyerleri önceden kestirilemeyen pikler verir. Ekilmemiş buyyon pikleri varsa, ekili buyyondan elde edilen piklerden bu piklerin büyüklüklerini

çıkarmak gerekebilir. Örneğin ekilmiş buyyonda butirik asit piki 6 mV, ekilmemiş buyyonda 2 mV ise, gerçek pik aslında 4 mV'tur.

**KAYNAKLAR:**

1. Akan E. *Staphylococcus*. In. Akan E. ed. Tıbbi Mikrobiyoloji. İzmir: Saray Kitapevi 1993: 1-19.
2. Aydın M, Günay İ, Köksal F, Serin MS. Taksometri ve bakteriyel identifikasyonda bilgisayar kullanımı. *Mikrobiyol Bült.*, 1996; 30:281-287.
3. Ballows A, Hausler WJ, Herrman KL, Isenbirt HD, Shadomy HJ(ed.). Manual of Clinic Microbiology, 4.th ed., American Society for Microbiology, Washington D.C. 1991.
4. Barry AL. Improved 18-hour methyl red test. *Appl Microbiol*, 1970; 20: 866-870.
5. Elmer WK, Stephen DA, William MJ, Paul CS, Washington CW (eds). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4.th ed, Lippincott JB Company, Philadelphia, 1992.
6. Finegold SM, Martin WJ, Scoot EG. Bailey and Scoott's Diagnostic Microbiology, 5th ed, St.Louis, CV Mosby, 1978:490-.
7. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, Shadomy EJ(eds). Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1985.
8. MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2nd ed, Baltimore, Williams&Wilkins, 1980:78-.
9. Michael JJ, Abbott SL. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? *J. Clin. Microbiol.*, 2002; 40:1887-1891.
10. Miller JM, Wright JW. Spot indole test: Evaluation of four reagents. *J Clin Microbiol*, 1982; 15:589-592.
11. Noel RK, John GH. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Barbara Tansill, Vol.1,2,3 1984.
12. Norell SA, Messley KE. Microbiology Lab Manual: Principles ans Applications. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. 1997: 54-.
13. Sarkonen N, Könönen E, Summanen P, et al. Phenotypic Identification of *Actinomyces* and Related Species Isolated from Human Sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001; 39(11): 3955-3961.
14. Selvakumar N, Rahman F, Rajasekaran S, et al. Inefficiency of 0.3% Carbol Fuchsin in Ziehl-Neelsen Staining for Detecting Acid-Fast Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40(8):3041-3043.
15. Singleton P, Sainsbury D. Dictionary of Microbiology. NewYork, Johns WileySons, 1978.
16. Timothy B, Taylor MB. Sniffing Bacterial Cultures on Agar Plates: a Useful Tool or a Safety Hazard? *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:3877-.