

# Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvar Dersi

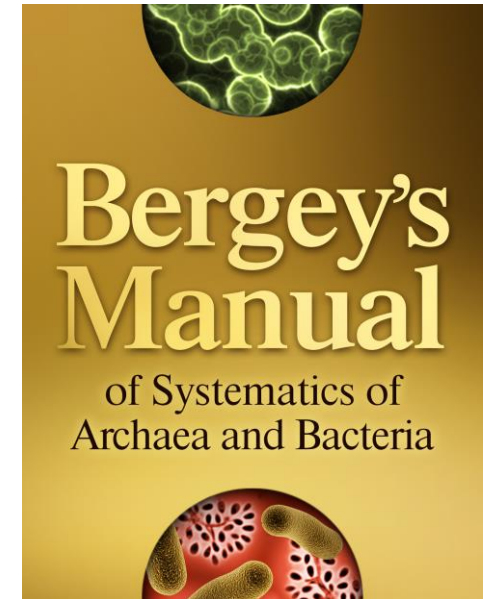
## 10.HAFTA BİYOKİMYASAL TESTLER

# BİYOKİMYASAL TESTLER

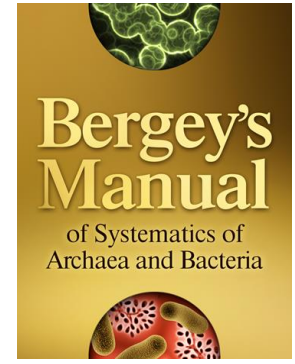
- Mikroorganizmalara uygulanan biyokimyasal testler ile, mikroorganizmaların çeşitli enzim varlıklarının ortaya konması veya çeşitli yıkım (**katabolizma**) yada yapım (**anabolizma**) ürünlerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

# Biyokimyasal testlerin mikroorganizmaların tanımlanmasında çok önemli bir yeri vardır;

- Her mikroorganizma veya mikroorganizma grubunu kendine özgü bir biyokimyasal özelliği bulunmaktadır.
- Bakteriler için örnek verecek olursak; her bakteri kendine özgü enzimlere sahip olup, belirli maddeleri yine kendine özgü bir biçimde metabolize ederek, çeşitli yıkım ve yapım ürünleri meydana getirmektedir.
- Bakterilerin bu özelliklerinin tek tek veya listeler halinde çeşitli kaynaklarda (kitap, araştırma makalesi, derleme vb. ) bulmak mümkündür.
- Ancak bu konu başvurulacak temel kaynak Bergey's Manual of Systematic Bacteriology dir.
- Bergey's manual, doğadaki bilinen bakterilerinin tümünü, belli taksanomik gruplar halinde inceleyerek, biyokimyasal özellikleri de dahil olmak üzere, pek çok özelliğini tek tek ve liste halinde açıklamaktadır.



Biyokimyasal testlerin mikroorganizmaların tanımlanmasında çok önemli bir yeri vardır;

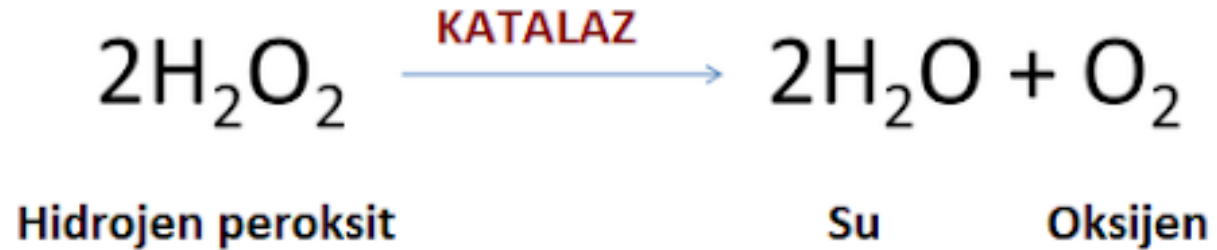


- Bilinmeyen ve tanımlanmak istenen bir bakteriye, belirli biyokimyasal testler uygulanır ve elde edilen sonuçlar, Bergey's manual ve diğer ilgili kaynaklardaki bilgiler ve listelerle karşılaştırılarak bu bakterinin tanımlanmasında önemli bir adım atılmış olur.
- Bakterilerin tanımlanmasında onların diğer bazı özelliklerinin de belirlenmesi gerekmektedir. Bu yöntemlerden başka laboratuvar otomasyonu üzerine cihazlar üreten bazı şirketlerin geliştirdiği cihazlar veya test kitleri (API, Biolog vb. ) kullanılarak da daha hızlı bir şekilde bakteriler tanımlanabilir. **Yada saflaştırılan mikroorganizmanın direkt DNA'sı kullanılarak, çok daha hızlı bir şekilde ribozomal RNA'ya göre tanımlama yapılabilir.**



# KATALAZ TESTİ

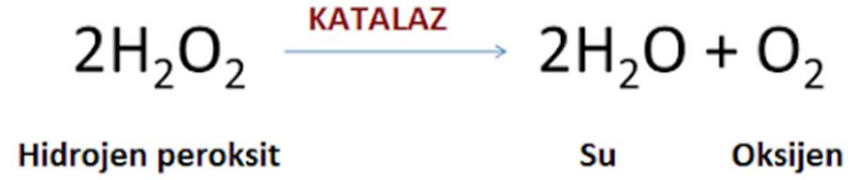
- Katalaz bir enzim olup, çoğunlukla **aerobik** mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. Bu enzim, ortamdaki hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırır.



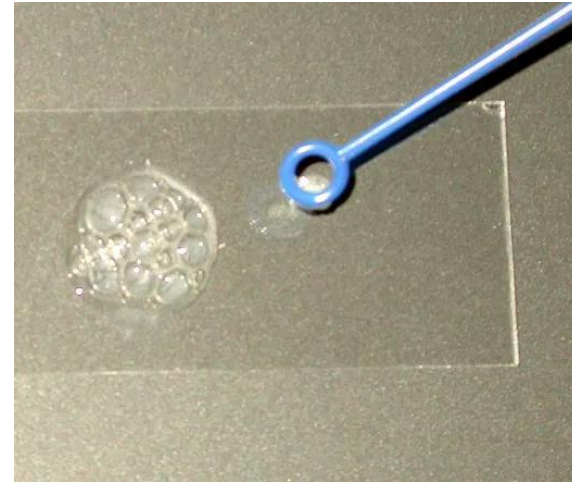
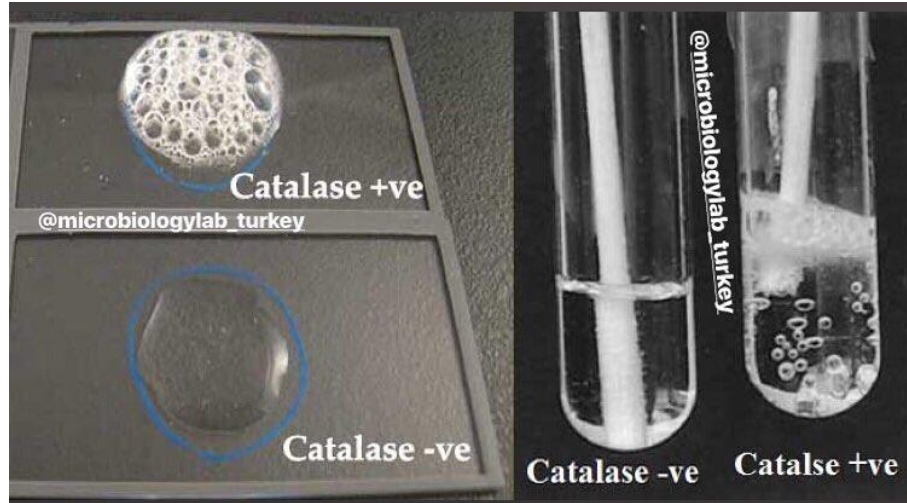
# KATALAZ TESTİ

- Aerobik ve pek çok fakültatif anaerobik mikroorganizma katalaz enzimine sahiptir. *Stapylococcus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *E.coli*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* katalaz pozitif bakterilere örnek gösterilebilir. *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* gibi Laktik asit bakterileri ve *Clostridium*'lar genelde katalaz negatif bakterilerdir (bazı laktik asit bakteri suşlarının özellikle kan içeren besiyerinde katalaz testine pozitif netice verdiği bilinmektedir).

# KATALAZ TESTİ



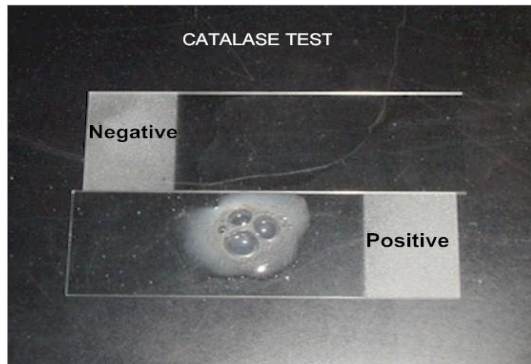
- Sıvı veya katı bakteri kültürlerine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenir hale gelmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını, dolayısıyla da katalazın varlığını gösterir.



# Testin uygulanışı

## Katalaz testi üç farklı şekilde gerçekleştirilebilir;

1. Tüpteki veya petrideki agarlı kültür yüzeyine 1ml %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktarılır. Hava kabarcıklarının görülmesi sonucun pozitif olduğunu gösterir.
2. İncelenecek kültürden öze ile örnek alınarak, bir lam üzerinde damıtık su ile süspanse edilir. Bunun üzerine bir öze dolusu %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilip karıştırıldığında, hava kabarcıklarının çıkışı testin pozitif olduğunu gösterir. Şüpheli durumlarda inceleme, mikroskop altında en küçük büyütme objektif kullanılarak yapılabilir.



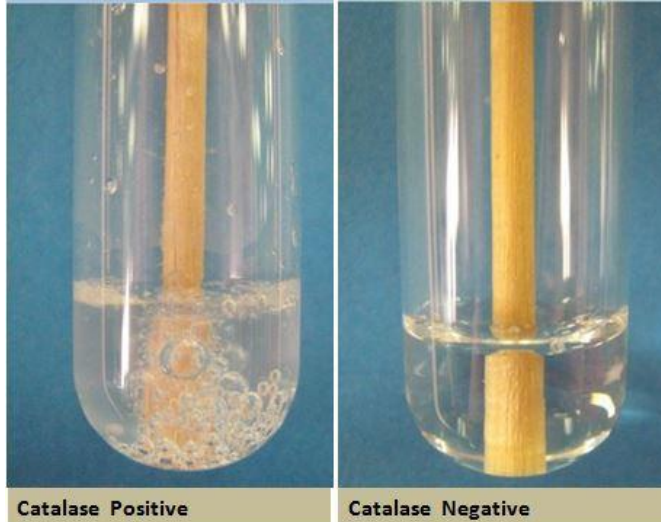
Lam üzerinde yapılan testler, dikkatli olunmazsa sağlık açısından sakıncalar yaratabilir. Bakterilerin hava kabarcıklarıyla birlikte sıçrayarak çalışanları enfekte etme tehlikesi vardır.



# Testin uygulanışı

## Katalaz testi üç farklı şekilde gerçekleştirilebilir

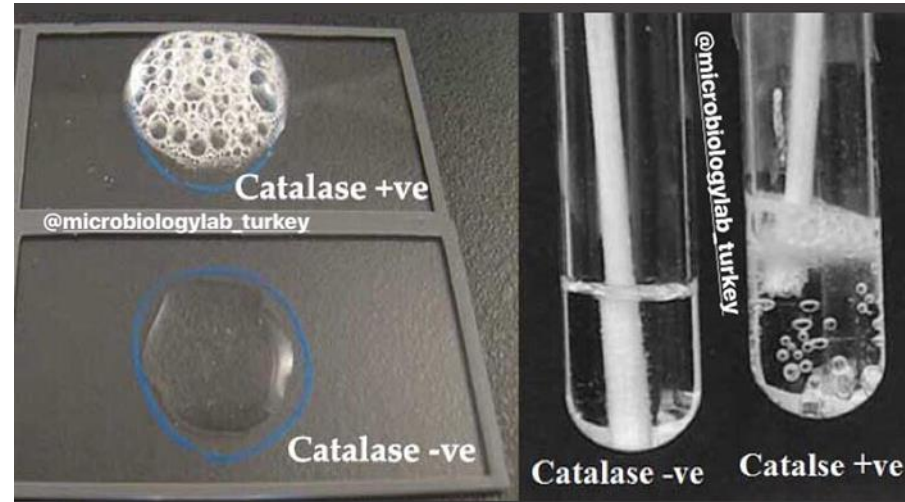
3. Temiz bir test tüpüne %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 1ml aktarılır ve üzerine 1ml sıvı kültür eklenir. Hava kabarcıklarının çıkışı gözlenerek karara varılır. Hidrojen peroksit çözeltilerinin günlük olarak hazırlanıp kullanılması ve kullanım aralarında buzdolabında muhafaza edilmesi gerekmektedir.



# Katalaz Testi

## Sonuç Değerlendirme

- Hidrojen peroksid katılmasından sonra kabarcıkların görölmesi veya çıkması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Şüpheli durumlarda mikroskop altında muayene yapılabilir. Reaksiyon en iyi pH 7.0 da meydana gelir ve oda sıcaklığında yapılır. Sonuçlar, negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) pozitif olarak derecelendirilir.



# Katalaz Testi

## Dikkat edilecek hususlar

- 1) Mikroorganizmaları üretmede kullanılan katı besi yerinde kan bulunmamalıdır. Bunun yerine, eğer zorunlu ise, çikolata agar denenebilir.
- 2) Lam üzerinde uygulanan yöntemde, aerosol infeksiyonlara veya deri-göz konjonktivasına etkenin sıçraması sonu hastalanmalara rastlanabilir. Bu yönden dikkatli bulunulmalıdır.
- 3) Hidrojen peroksit dayanıksızdır. Bu nedenle taze hazırlanmalı ve kullanılıncaya kadar buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmelidir.
- 4) Testte kontrol mikroorganizmalar bulundurulmalıdır (*S. aureus* ve *S. epidermidis* gibi).
- 5) **Muayene edilecek kültürler 18-24 saatlik olmalıdır. Eski kültürler yalancı negatif reaksiyon verebilirler.**

# Katalaz Testi

## Dikkat edilecek hususlar

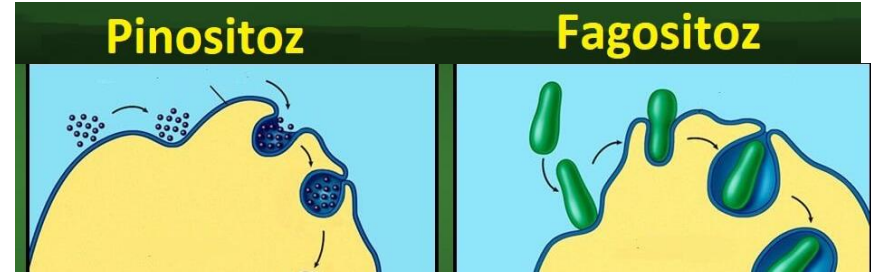
- 6) Hidrojenperoksid (% 30) deri için zararlı bir etkiye sahiptir. Bu nedenle, % 70'lik alkol daima hazırda bulundurulmalı ve gerektiği zaman deriye sürülmelidir.
- 7) Test oda sıcaklığında yapılmalıdır. Asit ortamlar, katalaz aktivitesini önlediğinden, nötr pH 7.0 tercih edilmelidir.
- 8) Yalancı pozitif reaksiyonlar, kirli malzeme kullanılmadığında görülebilir. Bu nedenle bütün cam malzemenin kimyasal yönden temiz olması gereklidir.
- 9) Eğer, **anaerobik koşullarda üretilmiş** kültürlerin yoklaması söz konusu ise, bu takdirde, kültürler teste tabi tutulmadan önce 30 dakika açık havada bulundurulmalıdırlar.

# KOAGÜLAZ TESTİ

- Koagülaz enzimi kan plazmasını koagüle eder (pıhtılaştırır). Bu nedenle, koagülaz testi için kan plazması kullanılmaktadır. Kan plazması; sodyum sitrat, oksalat, heparin veya EDTA (etilendiamid tetraasetik asit) gibi antikoagülant bir madde eklenmiş taze, kanın santrüfujlenmesi sonucu elde edilir.



# KOAGÜLAZ TESTİ



- Koagülaz enziminin, bakterileri bulunduğu vücut dokusunda fagositoza karşı koruduğuna inanılmaktadır. Fagositoz, bilindiği gibi, kandaki fagositik hücreler (akyuvarlar) tarafından gerçekleştirilmektedir. Koagülaz enzimi kanı pıhtılaştırmakta ve bakterilerin çevresinde, fagositik hücrelerin ulaşamayacağı bir duvar oluşmaktadır. Bu bakımdan koagülaz pozitif bakterilerin koagülaz negatiflere göre daha **virulent** olduğu kabul edilmektedir. *S. aureus*'un diğer **virulanslık faktörleri** ise; hepsi birer ekstraselüler enzim olan fibrinolizinler, hemolizinler ve enterotoksinlerdir.

# KOAGÜLAZ TESTİ

- Koagülaz enzimi bir çok bakteri tarafından oluşturulmasına karşılık, koagülaz testi daha çok patojen ve patojen olmayan stafilokokların birbirinden ayırt etmek için kullanılmaktadır.
- *Staphylococcus aureus* ve *S.epidermidis* insanla çok sık ilişkisi olan iki stafilokok türüdür. *S.epidermidis*; non-hemolitik, non-patojenik, nadiren pigment oluşturan ve koagülaz negatif bir bakteridir. Buna karşın, *S. aureus* ise, patojenik, hemolitik, genellikle pigment oluşturan (kolonileri altın sarısı renğinde) ve koagülaz pozitif bir bakteridir.

# Koagülaz Testi

## Testin uygulanışı:

- Koagülaz testi tüpte veya lam üzerinde gerçekleştirilebilmektedir.

Tüpte koagülaz testi:

1. İki tane küçük test tüpünün her birine, aseptik koşullarda 0.5 ml tavşan veya at kan plazması aktarılır. Kan plazmaları, ticari olarak kuru formda üretilebilmektedir. Bu şekildeki kan plazmaları genel olarak 1/5 veya 1/10 oranında sulandırılarak kullanılır.
2. Birinci tüpe test edilecek bakteri kültüründen, ikinci tüpe ise koagülaz negatif olduğu bilinen bir bakteri kültüründen, aseptik koşullarda, aktarmalar yapılır. İncelenen kültürlerin 18-24 saatlik genç kültürler olmasına özen gösterilmelidir. Aktarmada aşağıdaki şekillerde hareket edilebilir;
  - Yatık agarlı kültürden, öze ile çok bol olacak şekilde örnek alınır ve tüpe aktarılır.
  - Bulanıklılığı çok olan sıvı kültürden, steril bir pipetle 0,1 ml örnek aktarılır.
  - Petri kutusundaki kültürden bir koloninin tümü öze ile alınarak aktarılır





# Koagülaz Testi

## Testin uygulanışı:

3.Tüp içerikleri ayrı ayrı olmak üzere, bir öze yardımıyla homojen bir süspansiyon elde edilecek şekilde karıştırılır.

4.Tüplerin ağız kısımları parafilm ile kaplanır. ,

5.Tüpler 37°C de 24 saat süreyle inkübasyona alınır. Daha düşük inkübasyon sıcaklıklarında, inkübasyon süresi daha uzun tutulmalıdır.

6.Tüpler, 6 saat süresince, 1 saat aralıklarla koagülasyon yönünden incelemeye alınır. Bu süre sonunda koagülasyon görülmezse, tüplerin inkübasyonuna devam edilir.

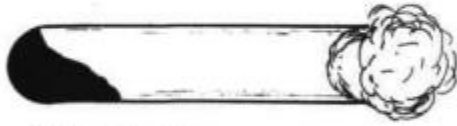
inkübasyonun 6. ve 24. saatleri sonunda koagülasyon kontrolleri tekrarlanmalıdır. Negatif sonuç alınan tüpler, oda sıcaklığında 12 saat kadar tutularak, kesin sonuç alınmaya çalışılır.

# Koagülaz Testi

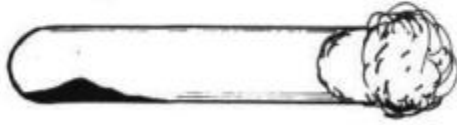
## Sonuç Değerlendirme



Negatif sonuç



Sıkı pıhtı



Gevşek pıhtı

Pozitif sonuç

Coagulase

+ *Staphylococcus aureus*

- CNS

- Staphylococcus epidermidis*
- Staphylococcus haemolyticus*
- Staphylococcus saprophyticus*

**Negative**

**Positive**

Slide method

Tube method

**Positive**

**Negative**

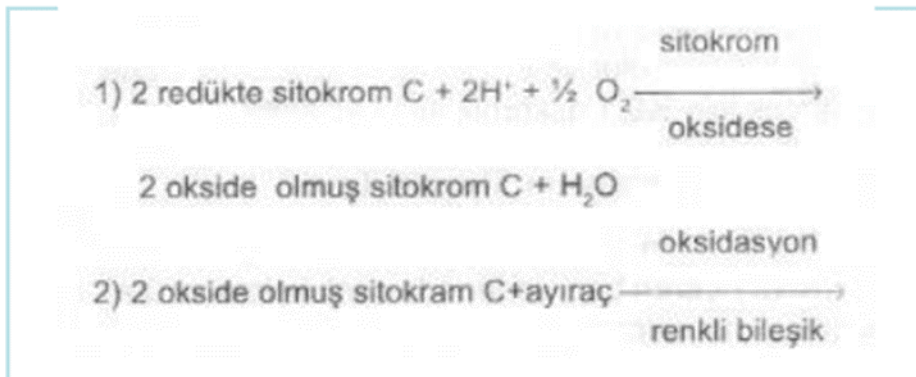
Coagulase test

# Oksidase Testi

- Bu test, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan oksidase enziminin (sitokrom C oksidase) varlığını ortaya koymada kullanılır.
- Deneyden aynı zamanda cinslerin (*Moraxella* (+), *Neisseria* (+), *Yersinia* (-), *Acinetobacter* (-), ve türlerin (*Brucella. ovis* (-), *B.neotomae* (-) ve *B. abortus* ( + ) ayırımında yararlanır.

# Oksidase Testi

- Oksidase reaksiyonu, bakterilerde (aerobik olanlarda) sitokrom oksidase sisteminin bulunduğunu ifade eder. Bu sistem reaksiyonda son hidrojen alıcısı olarak oksijenin kullanımını sağlayarak moleküler oksijeni hidrojen perokside redükte eder. **Anaerobik mikroorganizmalarda oksidase sistemi yoktur.** Oksidase testi bakterilerde sitokrom C 'nin varlığını ortaya koyar



- Reaksiyonda da görüldüğü gibi (2. basamak) okside olmuş sitokrom C, ayıraçta bulunan p-amino dimetilanilini okside ederek, renkli bileşik oluşturur (kırmızı - mavi renk).

# Oksidase Testi

## Testin uygulanışı:

### Materyal

- 1) Petri kutusunda veya tüplerde katı besi yeri (sıvı besi yeri de kullanılabilir).
- 2) Mikroorganizmanın saf ve taze kültürleri .
- 3) Kontrol pozitif (*P.aeruginosa*) ve negatif (*E. coli* ) suşlarının kültürleri
- 4) **Ayıraç** ( %0.5, tetrametil-p-fenilendiamin )

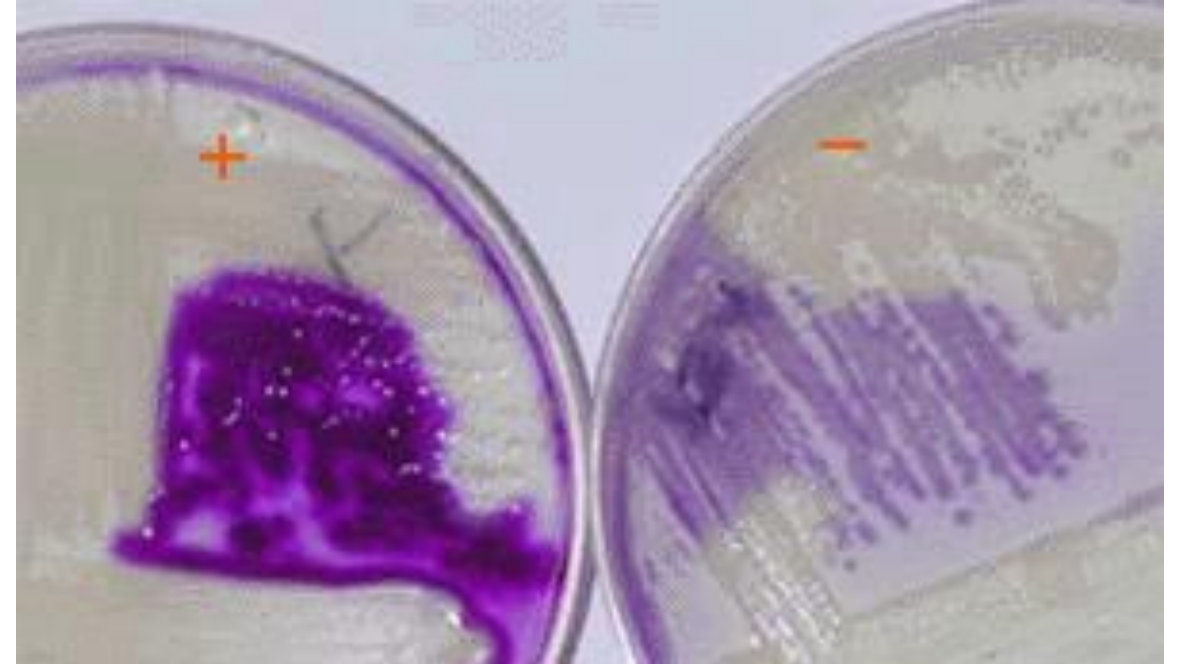
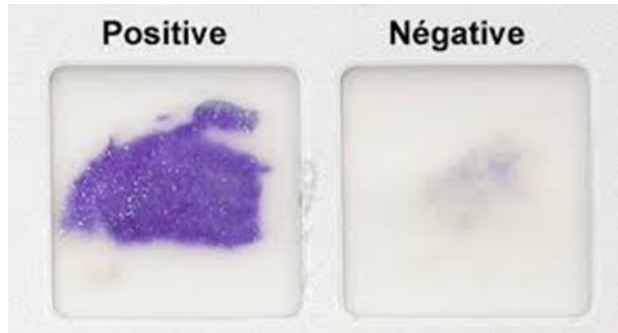
### Metot

Mikroorganizmalar katı besi yerine ekildikten sonra **37** °C de 1-5 gün inkubasyona bırakılır. Üremiş koloniler üzerine ayıraç damlatılır.

# Oksidase Testi

## Sonuç Değerlendirme

- Üzerine ayıraç damlatılan kolonilerin 1-2 dakika içinde kırmızı mavi renk almaları pozitif oksidase testi olarak kabul edilir. Hiç bir renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirilir. Kolonilerin siyah renk alması öldüklerini ifade eder.



# Oksidase Testi

## Dikkat edilecek noktalar !!!

- 1) Ayıraç sadece kolonilerin üzerine damlatılır. Bütün plate veya tüpe yayılmaz.
- 2) Ayıraçlar taze hazırlanmalıdır. Gerektiğinde buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilebilirler.
- 3) Gerektiğinde test filtre kağıt şeritlerinde de yapılabilir. Ayıraca emdirilmiş kağıt şeritler üzerine mikroorganizma kolonileri konur. Kısa bir süre içinde (10-15 saniye ) kırmızı rengin oluşumu pozitif olarak dikkate alınır.
- 4) Besi yerlerinde **glikoz ve nitrat** bulunmamalıdır. Triptikase soy agar (TSA), nutrient agar (NA) uygundur.
- 5) Koloni alınırken platin öze veya cam çubuk kullanılmalıdır.
- 6) Oksidase ayıracı, serbest oksijen tarafından kolayca okside olur ve duyarlılığını kaybeder. Bunu azaltmak için %0.1 askorbik asit katılabilir.

# Üreaz testi

**Helicobacter pylori (H. pylori)**, insanlarda, gastrit, peptik ülser, gastrik kanser ve mukoza ilintili lenfoid doku lenfoması gibi ciddi mide hastalıklarına yol açan önemli bir hastalık etkenidir. H. pylori, ürettiği üreaz enzimleri sayesinde üreyi, karbondioksit ve amonyağa parçalayarak mide çeperinin asidik koşullarını normal pH'ya getirip hayatta kalabilir.



- Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden **ürease** enzimini saptamak amacıyla yapılır.
- Ürease hidrolizasyon testi bakterilerin cins ve türlerini tayinde işe yarar.
- Üre, karbonik asit'in bir diamid'idir. Bütün amidler de kolayca hidrolize olurlar. Ürenin hidrolizasyonu da spesifik bir enzim olan ürease tarafından katalize edilir. Reaksiyonun sonunda 2 molekül amonyak ve karbondioksit meydana gelir.



# Üreaz testi

- Ürease aktivitesi için optimal pH 7.0 dir.
- Besiyerinde amonyak meydana gelmesi pH nın yükselmesine neden olur.
- Amonyakın meydana geldiği de indikatör boya ve Nessler ayıracı ile ortaya konur.
- Ürease testi için bazı yöntemler (Christensen, Stuart, vs.) geliştirilmiştir.
- Christensen Metodu bildirilmiştir.

# Üreaz testi

## Testin uygulanışı:

### **Materyal**

- 1) Christensen'in üreli agarı (tüp veya petri kutusunda) veya üreli broth
- 2) Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- 3) Kontrol mikroorganizmalar. *Proteus vulgaris* (+) ve *E. coli* (-) proteus

### **Metot**

Petri kutusu üzerine fazla miktarda mikroorganizma ekildikten sonra 37°C de 1-5 gün bırakılır. Her gün kontrol edilen kültürlerde (kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif reaksiyon) renk değişmelerine dikkat edilir. Bazı durumlarda renk değişikliği 5-6 saat içinde meydana gelebilir.

# Üreaz testi

## Sonuç Değerlendirme

- Kültürde kırmızı rengin meydana gelmesi (amonyak oluşumu nedeniyle pH'nın yükselmesi sonu indikatörün renginin ortaya çıkması) pozitif reaksiyon olarak ve hiçbir değişikliğin olmaması de negatif olarak değerlendirilir.

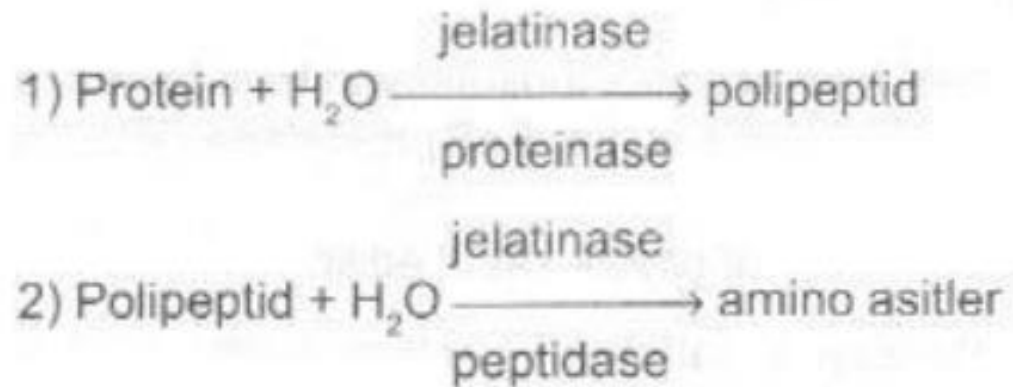


# Jelatin Hidrolizasyon Testi

- Bu test, mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinase enzim sentez yeteneğini ölçmede kullanılır.
- Jelatin protein karakterinde bir madde olup kollajenin hidrolizasyonundan elde edilir. Büyük moleküllü olduğundan bakteri hücre duvarından geçemez. Bu nedenle daha küçük moleküllere katalize edilir. Bu görevi de ekstra sellüler bir enzim olan jelatinase yapar.

# Jelatin Hidrolizasyon Testi

- Jelatinase tarafından proteinlerin katabolizması iki aşamalıdır



# Jelatin Hidrolizasyon Testi

## Testin uygulanışı:

### Materyal

- Jelatinin hidrolizasyonunu saptamak için bir çok besi yerleri geliştirilmiştir. Bunlardan basit olanı tüplerde uygulanmaktadır.
  - 1) İçinde % 10 oranında jelatin bulunan broth (5 ml tüplerde).
  - 2) Denenecek mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri.
  - 3) Kontrol pozitif (*S. aureus*) ve negatif (*A. hydrophila*) mikroorganizma kültürleri.

# Jelatin Hidrolizasyon Testi

## Testin uygulanışı:

### **Metot**

- Mikroorganizma kültürlerinde değdirilmiş olan iğne, dik olarak jelatinli besi yerlerine daldırılır (yeterince ekim yapılmalıdır).
- Tüpler 37°C de 15 gün kadar inkube edilir. Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buz dolabı sıcaklığında 1-2 saat bırakılır.
- Erimenin olup olmadığına dikkat edilir. Bu besi yerinde mikroorganizmalar iyi üremez ise diğer testler denenebilir (Frazier jelatin agar besi yeri).

# Jelatin Hidrolizasyon Testi Sonuç Değerlendirme

- Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda, buzdolabından çıkarılınca, jelatinli ortamın sıvı halinde ve katılaşmadığı görülür (pozitif jelatin hidrolizasyonu). Negatif durumlarda tüpteki sıvı jelatinli besi yeri katılaşır.

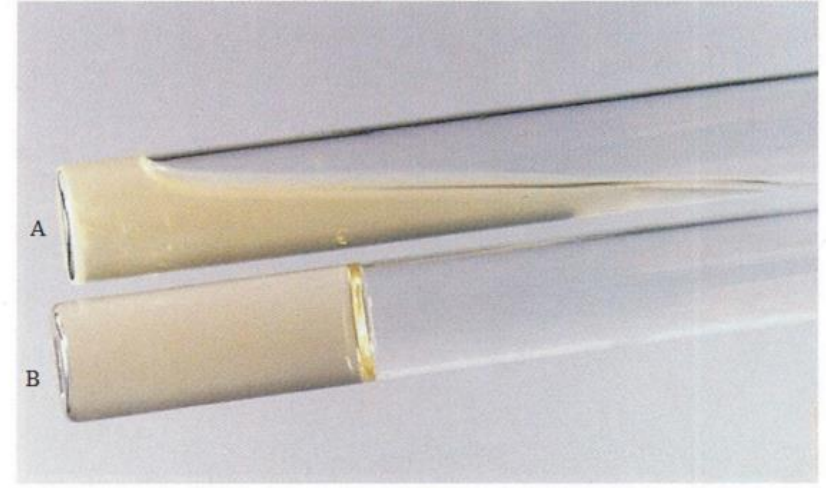
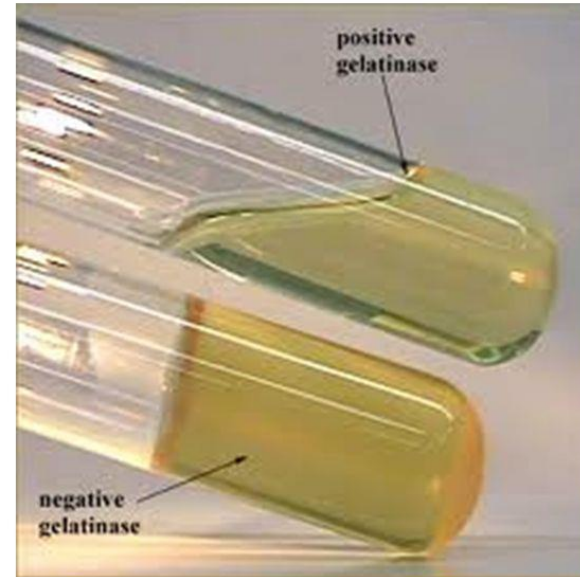


Fig. Nutrient Gelatin Stabs.  
A. Positive: *Aeromonas hydrophila*  
B. Negative: *Escherichia coli*



## Gelatin Hydrolysis

*C.perfringens* produce proteolytic enzyme (gelatinase) that liquefy gelatin.



# Jelatin Hidrolizasyon Testi

## Dikkat edilecek noktalar

- 1) İçinde % 12-14 jelatin bulunan broth oda sıcaklığında katı olmasına karşın 37°C de sıvı haline dönüşür. Bu nedenle, değerlendirmeyi buzdolabında tutulduktan sonra yapmak gerekir.
- 2) Kontrol tüpler çok önemlidir. Bunlara bakarak karar verilmelidir.
- 3) Kontrol mikroorganizmaların özellikle pozitif olan aktivitesi fazla olmalıdır.
- 4) Jelatin kültürleri çalkalanmamalıdır. Çünkü bazı mikroorganizmalar yüzeyde üreyip hidrolizasyonu burada yapabilirler.

# Jelatin Hidrolizasyon Testi

## Dikkat edilecek noktalar

- 5) Besi yerindeki jelatinin de iyi kalitede olması ve iyi hazırlanması gerekir. Fazla ısı, aktivitesini bozar ve yanlış sonuçlara götürür.
- 6) Bazı bakterilerin (stafilokok, salmonella, serratia) jelatinase aktivitesi için kalsiyum tuzlarına ihtiyaç vardır. Bu nedenle ortama 0.01 M CaCl<sub>2</sub> katılabilir.
- 7) Mezofilik bakterilerin bir kısmı 22° - 25°C de üremektedirler. Bu durum dikkate alınmalıdır.
- 8) Bazı mikroorganizmalarda % 12-15 jelatinin üreme üzerine olumsuz etkisi olabilmektedir. Bu nedenle test değişikliği yapılmalıdır. Bu takdirde % 0.4 oranında jelatin içeren agar besiyeri kullanılmalıdır (Fraziler jelatin agar besiyeri).

# Kazein Hidrolizasyon Testi

- Bu test, sütün proteinini oluşturan ve kolloidal karakterde bulunan kazeinin, bakterilerce sentezlenen, proteolitik ve ekstrasellüler bir enzim olan protease tarafından hidrolize edilebilme durumunu saptamak için kullanılır.
- Mikroorganizmaların türlerinin identifikasyonunda işe yarar.

# Kazein Hidrolizasyon Testi

## Testin uygulanışı

### Materyal

- 1) İçinde % 10 yağsız süt bulunan agar (sütlü agar)
- 2) Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (*B. subtilis*) ve negatif (*E. coli*) mikroorganizma kültürleri

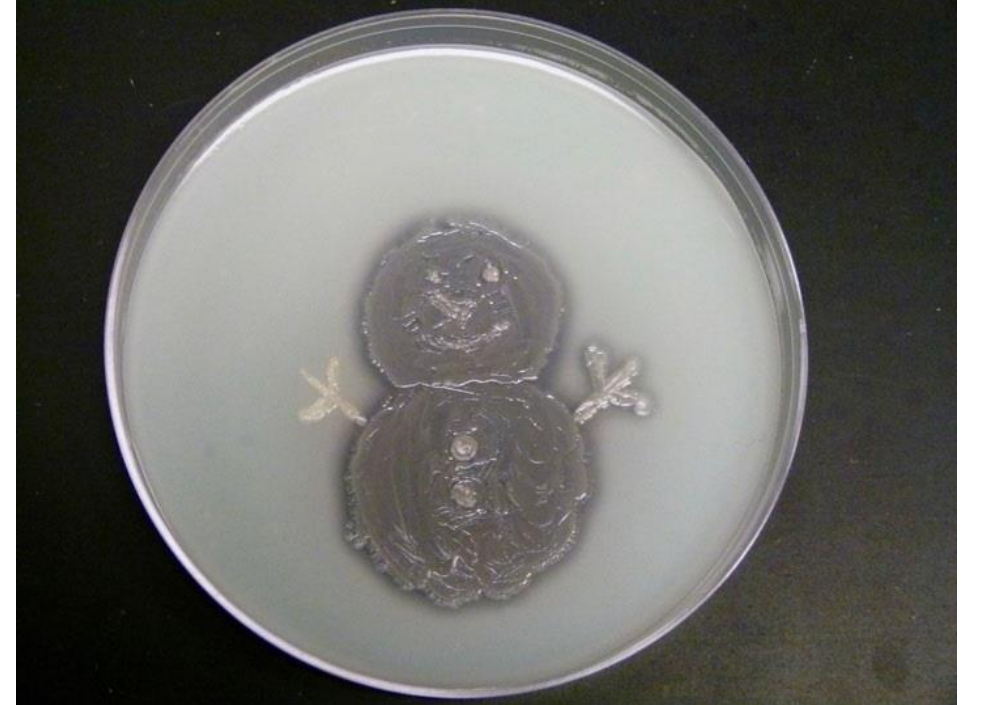
### Metot

- Sütlü agar besisi yerine çizgi tarzında mikroorganizmalar ekilir ve petri kutusu 37°C de 2-14 gün kadar inkubasyona bırakılır.
- Petri kutuları her gün, kontrollerle karşılaştırılarak, muayene edilirler



# Kazein Hidrolizasyon Testi Sonuç Değerlendirme

- Süre sonunda koloniler etrafında oluşan açık alan, sütteki kazeinin hidrolize olduğunu ifade eder (pozitif reaksiyon). Negatif durumlarda koloni etrafında hafif opaklaşma görülür.



# Kazein Hidrolizasyon Testi

## Dikkat edilecek noktalar

1) Sonucu iyi deęerlendirmek için Petri kutuları siyah bir zemin üzerine konulur.

2) Sütte bulunan laktozu fermente eden mikroorganizmalar asit oluşturmaları nedeniyle sütün proteininde değişmeler meydana getirebilir ve açılmalara yol açabilir.

✓ Bunu anlamak için, petri kutusuna % 1 HCl veya % 1 Cıva klorür solusyonundan konur. Eğer açılan sahaların rengi kaybolursa, kazein hidrolize olmamıştır.

# Karbonhidrat Fermentasyon Testi

- Bu test, mikroorganizmaların çeşitli spesifik karbonhidratları ayrıştırma yeteneklerini (sakkarolitik aktivite) belirlemek amacı ile yapılmaktadır. Mikroorganizmalar karbonhidratları, kendileri tarafından sentezlenen hidrolase (karbohidrase) enzimleri yardımı ile ayrıştırırlar. Ancak bu yetenek mikroplar arasında oldukça fazla değişiklik gösterdiği gibi, bir türe ait mikroorganizmalar arasında da ayrı fermentasyon özelliği gösteren variant suşlar da meydana çıkmaktadır.

# Karbonhidrat Fermentasyon Testi

- Bazı mikroorganizmaların fermentasyon özelliği yok denecek kadar az olmasına karşın Enterobacteriaceae familyasına ait olanlarda bu aktivite oldukça yüksektir. Karbonhidratlar (monosakkarid, polisakkarid ve alkoller), bakteriler tarafından değişik tarzda (aerobik ve anaerobik) ayrıştırılarak çeşitli ürünler, organik asitler (asetik asit, butirik asit, formik asit, laktik asit, propionik asit, suksinik asit, vs.), nötral ürünler (Asetilmetilkarbinol, 2,3-butilenglikol, aseton, etil alkol, isopropil alkol, butil alkol, vs.) ve gazlar (hidrojen, oksijen, metan, karbondioksit) meydana gelirler. Bu maddeler çeşitli testler yardımı ile ortaya konabilir ve mikroorganizmaların identifikasyonunda önemli göreve sahip olurlar



# Karbonhidrat Fermentasyon Testi

- Laboratuvarlarda kullanılan besi yerleri ve diğer koşulların etkisi altında, mikroorganizma türlerine göre değişmek üzere, karbonhidratların ayrışması, genellikle, 1-10 gün arasında değişmektedir. Bazen daha uzun bir süreye gereksinim duyulabilir.
- Ayrışmayı ortaya koyabilmek için besi yerlerine üreme üzerine olumsuz etkisi olmayacak yoğunlukta bazı indikatörler (Andrade, bromkrezol moru, brom timol mavisi, fenol kırmızısı, vs.) katılır. Bunların özelliklerine göre renklerinde meydana gelen değişmeler ayrışmayı ve derecesini belirtir.

# Karbonhidrat Fermentasyon Testi

## Testin uygulanışı

- Materyal

- 1) İçinde % 1 oranında çeşitli karbonhidratları içeren indikatörlü ve Durham tüplü steril peptonlu su veya uygun bir sıvı besi yeri (4-5 ml). Durham tüpleri genellikle glikoz'lu besi yerine konmaktadır (Salicin % 0.5, olarak hazırlanır).

- 2) Muayenesi yapılacak mikroorganizmanın taze saf kültürü.

✓ Besi yerlerinde gaz oluşumunu saptamada, tersine yerleştirilmiş küçük Durham tüplerinden yararlanır. Gaz, bu tüpün üst tarafında birikir. Bu amaçla özel Smith tüpleri de kullanılabilir. Nötral ürünlerden asetoin'i (asetil metilkarbinol) saptamada Voges Proskauer (VP) reaksiyonu laboratuvarlarca benimsenmektedir.

# Karbonhidrat Fermentasyon Testi

## Testin uygulanışı

- **Metot**

- İyi üremiş saf kültürlerden 0.1 ml kadar alınarak ayrı ayrı karbonhidrat içeren tüplere ekilir ve iyice karıştırıldıktan sonra tüpler 37 °C de inkubasyona (1-10 gün) bırakılırlar.
- Tüpler her gün sabah-akşam, gaz ve asit oluşumu önünden muayene edilerek, kontrollerle birlikte, gözle değerlendirilirler. Gerektiği hallerde okuma süresi uzatılabilir.

# Karbonhidrat Fermentasyon Testi Sonuç Değerlendirmesi

İndikatör	Asit	Nötr	Alkali
Andrade	kırmızı	sarı	renksiz
Bromtimol mavisi	sarı	hafif mavi	mavi – koyu mavi
Bromkresol moru	sarımsı	morumsu	mor
Fenol Kırmızısı	sarı	renksiz	pembe

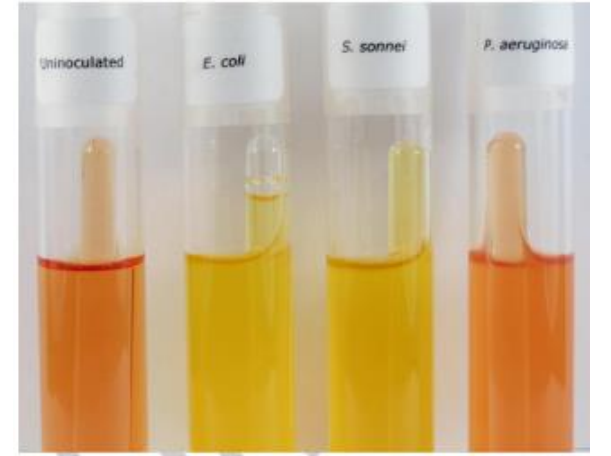
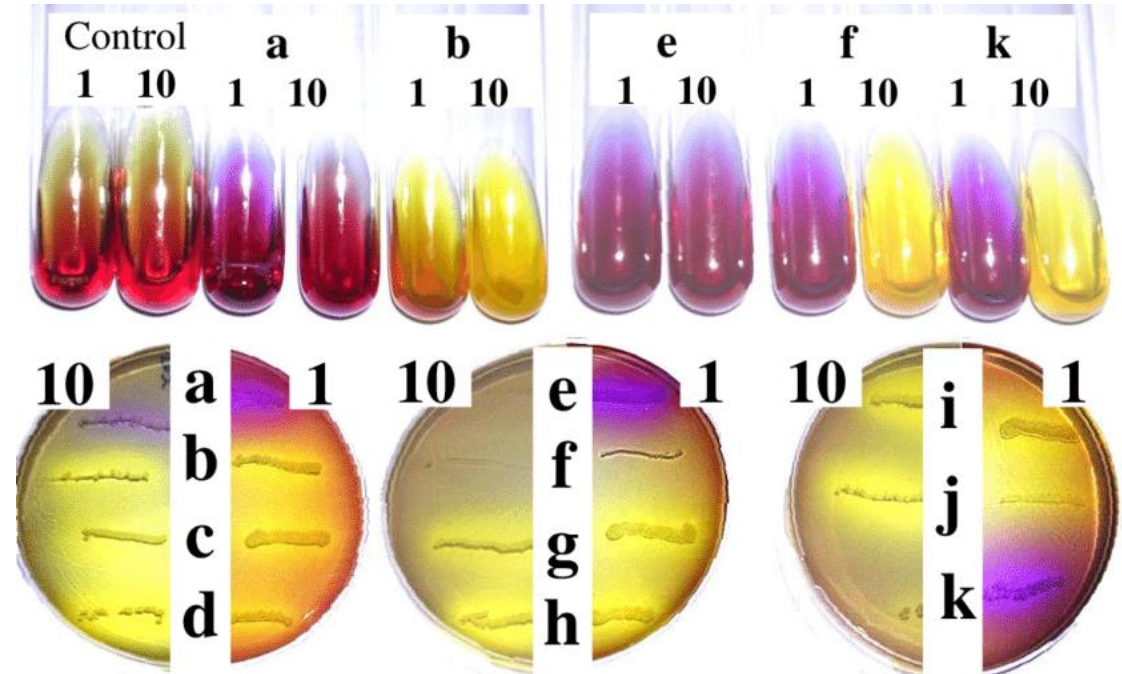
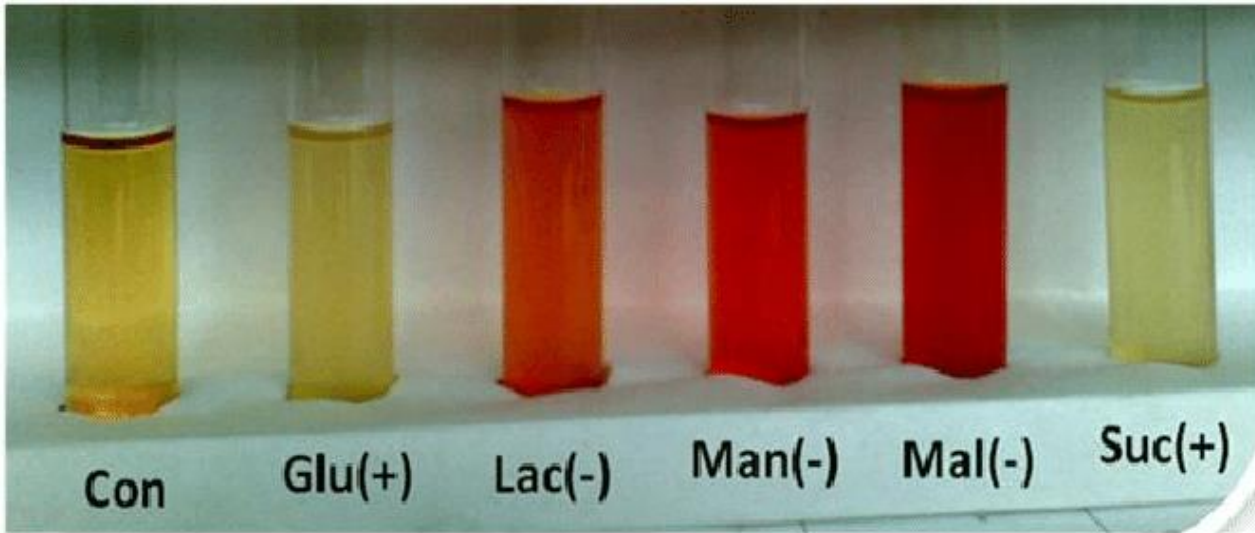


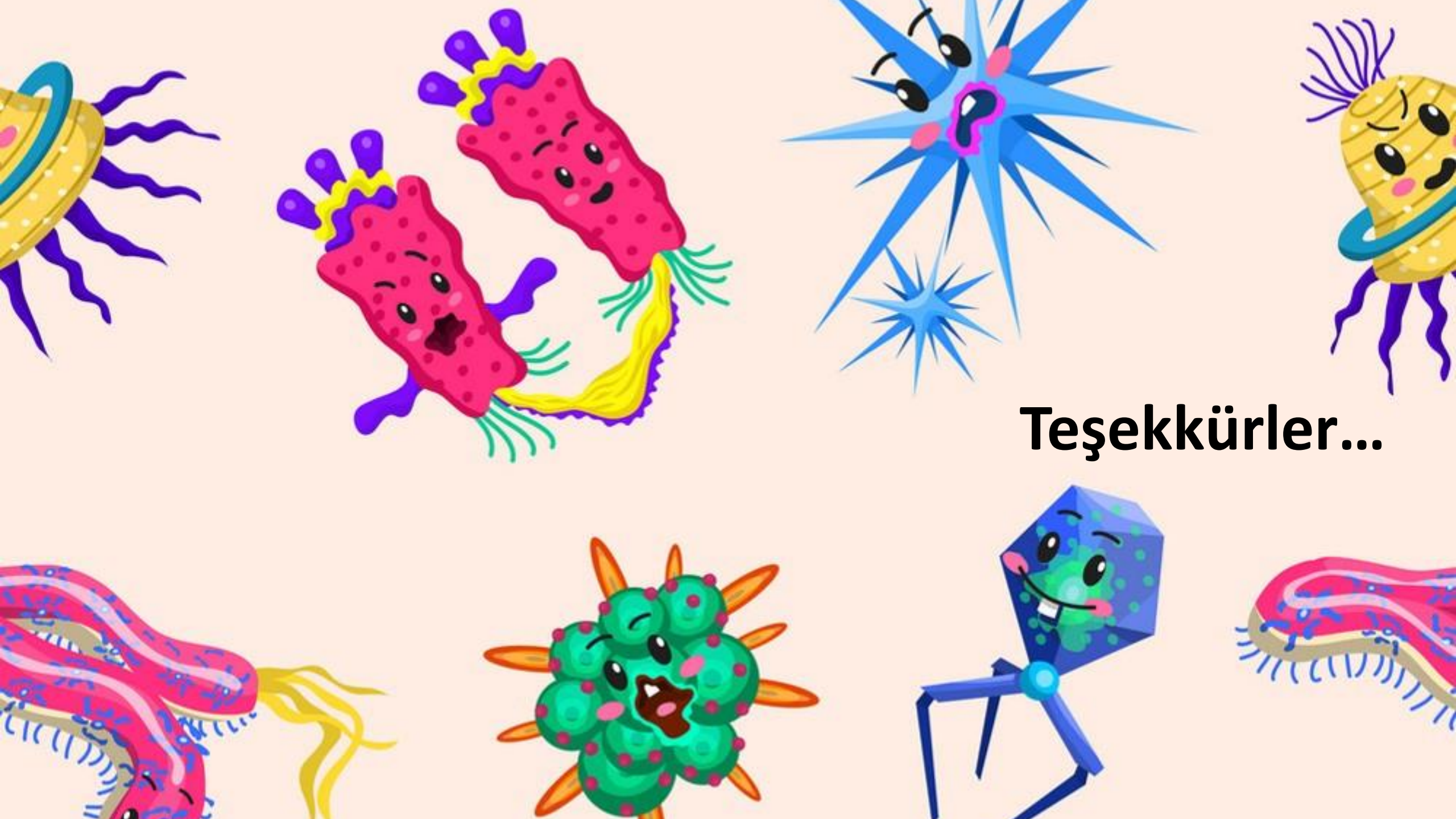
Figure 1. Peptone media with phenol red indicator. From left to right: Uninoculated tube; glucose fermenter with gas production (visible air bubble in the inverted Durham tube); glucose fermenter without gas production (no visible air bubble in the inverted Durham tube); non-fermenter.



# Karbonhidrat Fermentasyon Testi

## Dikkat edilecek noktalar

1. Test için kullanılacak ortamlarda nitrat da bulunmamalıdır. Bu maddenin varlığı gaz üretimini önleyebilir.
2. Karbonhidratlar filtrasyonla sterilize edildikten sonra tavsiye edilen miktar ve konsantrasyonlarda besiyerlerine katılırlar.
3. Anaerobik mikroorganizmalar için anaerobik koşullar sağlanmalı ve yeterli süre ayrılmalıdır.
4. Değerlendirilmelerde kullanılan indikatörün pH limitlerine göre aldığı renk değişimlerini çok iyi bilmek gerekir



**Teşekkürler...**