

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

LABORATUVAR HİZMETLERİ

BİYOKİMYASAL TESTLER

Ankara, 2015

-
- Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
 - Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.
 - **PARA İLE SATILMAZ.**

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR	iii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. BİYOKİMYASAL TESTLER	3
1.1. Biyokimyasal Testlerin Özellikleri ve Kullanım Yerleri	3
1.2. Biyokimyasal Testlerin Sınıflandırılması	4
1.3. Renk Değişimine Bağlı Biyokimyasal Testler	4
1.3.1. İndol Testi	4
1.3.2. Metil Kırmızısı Testi	5
1.3.3. Sitrat Testi	6
1.3.4. Voges - Proskauer (VP) Testi	7
1.3.5. Fosfotaz Testi	8
1.3.6. Üre Testi	8
1.3.7. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Testi	9
UYGULAMA FAALİYETİ	11
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	12
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	13
2. GAZ VEYA HAVA KABARCIĞI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER	13
2.1. Katalaz Testi	13
2.2. Eijkman Testi	14
2.3. Karbonhidrat Fermantasyon Testi	14
UYGULAMA FAALİYETİ	16
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	17
ÖĞRENME FAALİYETİ-3	18
3. PIHTI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER	18
3.1. Koagülaz Testi	18
3.2. Aglutinasyon Testi	20
3.3. Jelatin Hidroliz Testi	21
UYGULAMA FAALİYETİ	22
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	23
MODÜL DEĞERLENDİRME	24
CEVAP ANAHTARLARI	26
KAYNAKÇA	27

AÇIKLAMALAR

ALAN	Laboratuvar Hizmetleri
DAL	Gıda, Tarım ve Hayvan Sağlığı Laboratuvarı
MODÜLÜN ADI	Biyokimyasal Testler
MODÜLÜN SÜRESİ	40/16
MODÜLÜN AMACI	Bireye / öğrenciye tekniğine uygun olarak biyokimyasal testleri yapma işlemlerine yönelik bilgi ve becerileri kazandırmaktır.
MODÜLÜN ÖĞRENME KAZANIMLARI	<ol style="list-style-type: none">1. Çalışma amacına ve tekniğine uygun olarak renk değişimine bağlı biyokimyasal testleri yapabileceksiniz.2. Çalışma amacına ve tekniğine uygun olarak gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testleri yapabileceksiniz.3. Çalışma amacına ve tekniğine uygun olarak pıhtı oluşumuna bağlı biyokimyasal testleri yapabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Ortam: Mikrobiyoloji Laboratuvarı Donanım: Laboratuvar ortamı, etüv, besiyeri, indikatör/ayıracı, pipet/damlalık, öze, lam, saf su, hidrojen peroksit, hazır kültür, deney tüpü, pipet, etüv, cam yazar, tavşan veya at kanı plazması vb.
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	Modül içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen ölçme araçları ile kendinizi değerlendireceksiniz.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Bakteriler, doğada bulunan mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğunu oluşturur. Atmosfer katmanlarında, toprağın beş metre altında ve canlılarda bulunur.

İnsan vücudunda bulunan bakteri sayısı, insan hücre sayısının on katı kadardır. Özellikle deride ve bağırsaklarda çok sayıda bakteri bulunur. Bunların büyük bir kısmı bağışıklık sisteminin koruyucu etkisiyle zararsız hale getirilir. Bunun dışında, vücutta bulunan bazı bakteriler yararlı bazıları da patojen bakterilerdir ve genellikle bağırsak enfeksiyonlarına; basilli dizanteri, şarbon, tüberküloz, veba gibi hastalıklara neden olur. Bunlardan bazıları ağır seyirli ve ölümcüldür. Bu tür hastalıkların etkeninin bulunması için, neden olan mikroorganizmanın araştırılması ve kimliğinin belirlenmesi gerekir.

Bu modülde kazanacağınız yeterlikle bakteri genetiğini öğrenerek, kültür kolonisi ve çeşitli mikrobiyolojik örneklerden etkenleri izole edip saf kültür elde edebilecek ve gerekirse identifikasyon testlerini yapabilecek ve böylece patojen bakterileri tanımlayabileceksiniz.

Siz bu modülde kazandığınız yeterlikle renk değişimi, gaz ve pıhtı oluşturan biyokimyasal testleri yapma teknik ve becerilerini kazanarak elde edeceğiniz sonuçlarla insan ve hayvan hastalıklarının tanı ve tedavisinde büyük katkı sağlayacaksınız.

ÖĞRENME FAALİYETİ-1

ÖĞRENME KAZANIMI

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle çalışma amacına ve tekniğine uygun olarak renk değişimine bağlı biyokimyasal testleri yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Veteriner biyokimya laboratuvarına giderek renk değişimine bağlı biyokimyasal testlerin önemi ve yöntemleri hakkında bilgi edininiz.
- Laboratuvarda yapılan indol testi, metil kırmızısı testi, sitrat testi ve fosfotaz testini inceleyiniz.
- Edindiğiniz bilgileri arkadaşlarınızla paylaşınız.

1. BİYOKİMYASAL TESTLER

Mikroorganizmaların, özellikle enterik bakterilerin cins ve türlerini tanımlamada kültür, serolojik ve patojenik testlerin yanı sıra biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi de çok önemlidir. Mikroorganizmalar bu testlerin sonucuna göre belirlenir. Biyokimyasal testlerin çabuk yapılması, ucuz olması ve kısa zamanda sonuçlanması gibi özellikleri vardır. Hatta tür tespiti sadece biyokimyasal testlere göre de yapılır. Bundan dolayı, testlerin uygun ayıraçlar kullanılarak çok dikkatli, tekniğine uygun yapılması gerekir.

1.1. Biyokimyasal Testlerin Özellikleri ve Kullanım Yerleri

Bakteriler biyokimyasal aktivite yönünden oldukça farklıdır; sahip oldukları enzim aktivitesi, karbonhidratlardan ve aminoasitlerden yararlanma gibi biyolojik özelliklerinin test edilmesi sonucu biyokimyasal testler yapılır.

Biyokimyasal testlerde temel prensip; bakterinin oluşturduğu reaksiyonların, ayıraçlar ya da besiyerindeki indikatörler yardımıyla renk değişiklikleri gözlenerek tanı konulabilmesidir.

Enterobacteriaceae adı verilen enterik bakteriler 0,6 µm büyüklüğünde, aerob, fakültatif anaerob, sporsuz, basil şeklinde, genelde hareketli, katalaz pozitif, çoğu glikozu fermente eden, gram negatif (-) bakterilerdir. Genelde insan ve hayvan bağırsak florasında bulunur. *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia* gibi türleri başta olmak üzere enteropatojen bakteriler olup gastrointestinal sistem hastalıklarına neden olur. *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* gibi türleri genelde salgın bağırsak enfeksiyonları yapar.

Enterik patojenlerin klinik örneklerden izolasyon ve tanımlanmasında; MacConkey Agar, Salmonella Shigella Agar (SS), Eozin Metilen Bleu (EMB), Hektoen Enterik Agar (HE), Alkış Besiyeri, Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar), Selenit F gibi besiyerleri kullanılarak kültür ve saf kültür (tek koloni) hazırlanır. Bu şekilde kesin tanı konulamazsa enterik bakterilerin çeşitli karakteristik özelliklerinden yararlanılır. Koloni morfolojisi, pigment oluşumu, hareket özelliği, laktoz fermantasyonu, üreaz enzim aktivitesi, H₂S yayımı, asit gaz yapımı gibi reaksiyonlar tanı koymak için yararlanan bazı özelliklerdir. Bu özelliklerin tespiti, basit biyokimyasal testlerle yapılır.

1.2. Biyokimyasal Testlerin Sınıflandırılması

- Renk değişimine bağlı biyokimyasal testler; indol testi, metil kırmızısı testi, sitrat testi, voges - proskauer testi, fosfotaz testi, üre testi ve triple sugar iron agar testi vb.
- Gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testler; katalaz testi, eijkman testi ve karbonhidrat fermantasyon testi vb.
- Pıhtı oluşumuna bağlı biyokimyasal testler; koagülaz testi, aglütinasyon testi ve jelatin hidroliz testi vb.

1.3. Renk Değişimine Bağlı Biyokimyasal Testler

Renk değişimine bağlı biyokimyasal testler aşağıda açıklanmıştır.

1.3.1. İndol Testi

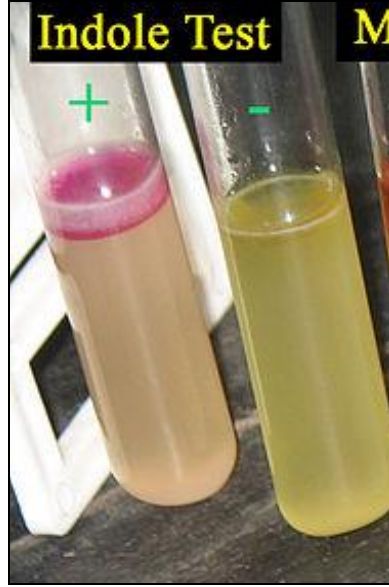
İndol, IMViC test grubu içinde yer alan testlerden biridir. IMViC testi; Indol, Metil kırmızısı, Voges - proskauer ve Sitrat (Citrat) testlerinin ilk harflerinden oluşur. Vi 'deki "i" küçük harf olarak yazılır ve sadece okuma kolaylığı sağlar. Bu testler, koliform grup bakterilerin (enterik bakterilerin) ayrımı için kullanılır.

İndol testi; bakterilerin, bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılır. Aynı zamanda, bakterilerin cins ve tür ayrımında kullanılır. İndol, bakterilerde bulunan triptofanaz enzimiyle bir aminoasit olan triptofanı parçalanması ve hidrolize etmesi sonucu oluşan nitrojenli bir bileşiktir ve aldehidlerle reaksiyona girdiğinde, kırmızı renkli bir ürün oluşturur. Salmonella'da indol pozitif, Proteus mirabilis'de negatiftir.

Testin yapılış tekniği;

- İncelenecek bakteri kolonisinden özeyle alınarak temiz bir tüp içinde bulunan triptofan bulunan bir sıvı besiyerine ekim yapılır (buyyon veya peptonlu su).
- Tüpler etüvde, 37°C'de 1-5 gün inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyondan sonra üzerine, tüpün kenarından yavaşça akıtmak suretiyle 0,5 ml kovaks ayırıcı ilave edilir ve tüp çalkalanır. Kovaks yerine Ehrlich ayırıcı da kullanılabilir.

- Renk değişimi gözlenir; 1-2 dakika içinde besiyerinin üst kısmında, parlak kırmızı bir halka oluşması, testin pozitif olduğunu (indol formasyonunu), sarımsı halka ise testin negatif olduğunu (indol oluşmadığını) gösterir.



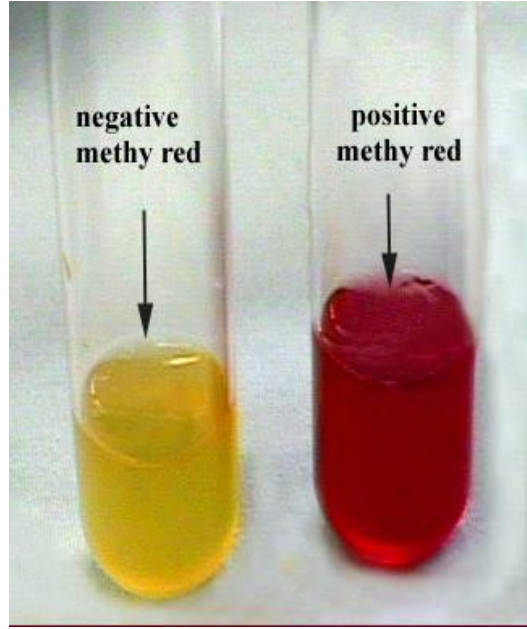
Resim 1.1: İndol test sonucu (+) ve (-)

1.3.2. Metil Kırmızısı Testi

Metil kırmızısı testi, besiyerinde bakterilerin glukozu fermente edip organik asit oluşturarak **besiyerinin pH'ını düşürme (4.4'ün altına) esasına** dayanır. Bu test, bakterilerin cins ve türlerinin ayırt edilmesinde kullanılır. Metil kırmızısı testinde; *Escherichia coli*'de pozitif, *Klebsiella pneumoniae*'da negatiftir.

Testin yapılış tekniği;

- İncelenecek bakteri kolonisinden öze ile alınarak Glukoz-Fosfat Broth besiyerine ekim yapılır.
- Tüpler etüvde, 37oC'de 1-7 gün inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyondan sonra üzerine 4-5 damla metil kırmızısı ayıracı damlatılır ve iyice karıştırılır.
- Besiyerinde; kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu, sarı renk oluşması ise testin negatif olduğunu gösterir.
- Metil kırmızısı ayıracı; pH 4.4 ve altında kırmızı renk, pH 6.0 ve üzerinde ise sarı renk verir.



Resim 1.2: Metil kırmızısı test sonucu (-) ve (+)

1.3.3. Sitrat Testi

Bazı bakteriler karbon-enerji kaynağı olarak sitrat kullanır. Sitrat testi, **bakterinin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığını**, aynı zamanda bakterinin cins ve türlerini belirlemek için yapılır. Bakteriler tarafından sitratın metabolizması, citritase veya citrate demolase adı verilen enzimleriyle gerçekleşir. *Klebsiella pneumoniae*'da sitrat pozitif, *Escherichia coli*'de negatiftir.

Testin yapılış tekniği;

- İncelenecek bakteri kolonisinden iğne öze ile alınarak tüpteki Simon's Sitrat Yatkı Agar besiyerinin yüzeyine ekim yapılır.
- Tüpler etüvde, 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonunda, orijinal rengi yeşil olan ve indikatör olarak %0,2'lik Bromo timol mavisini kullandığımız besiyerinde, besiyerinin rengi maviye dönüşür ve pozitif olarak değerlendirilir.



Resim 1. 3: Sitrata test sonucu (+) ve (-)

1.3.4. Voges - Proskauer (VP) Testi

Bu test, bakteri türlerini belirlemede kullanılır. Bazı bakteriler, **glikozu parçalayarak nötral bir ürün olan asetil metil karbinol (acetoin)** oluşturur. Nötral ürünler identifikasyonda önemli göreve sahiptir. Asetil metil karbinol, potasyum hidroksid (KOH) varlığında okside olarak diasetil meydana getirir. Bu ürün ise alfa naftol (kreatin, arginin veya kreatinin) ile reaksiyona girdiğinde kırmızı renk oluşturur. *Klebsiella pneumoniae*'da pozitif, *Escherichia coli*'de negatiftir.

Testin yapılış tekniği;

- İncelenecek bakteri kolonisinden öze ile alınarak tüpteki Glukoz-Fosfat Broth besiyerine ekim yapılır.
- Tüpler etüvde, 37oC'de 1-7 gün inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyondan sonra üzerine, 1 ml %40'lık KOH, daha sonra 3 ml %5'lik alfa naftol ilave edilir ve karıştırılır.
- Besiyerinin hava ile temas etmesi için kuvvetli çalkalandıktan sonra 2-5 dakika içinde pembe-kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.



Resim 1. 4: Voges-Proskauer test sonucu (+) ve (-)

1.3.5. Fosfotaz Testi

Bu test, özellikle **stafilokokların (koagülaz pozitif) sentezledikleri fosfataz enzimini belirlemek** amacıyla yapılır.

Reaksiyon, ortamda indikatör olarak bulunan fenolftalein difosfat'ı fosfatase enzimi yardımıyla ayrıştırarak serbest fenolftalein meydana getirir. Bu da alkali ile birleşince parlak pembe-kırmızı renk oluşur.

Testin yapılış tekniği;

- Mikroorganizma kültürlerinden fenolftalein fosfatlı agara tekniğine uygun ekim yapılır.
- Etüvde, 37°C'de 1-2 gün inkübe edilir.
- Bu sürenin sonunda, koloniler amonyak buharına tutulur; petri kutusunun kapağına %40'luk amonyum hidroksit ayırıcından 1 ml konur ve kültür ters olarak kapatılır. Eğer sıvı besiyeri kullanılmışsa tüplere, %40'luk sodyum hidroksitten bir damla damlatılır.
- Kolonilerde veya tüpte kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif reaksiyonu gösterir. Negatif durumda renk değişikliği olmaz.

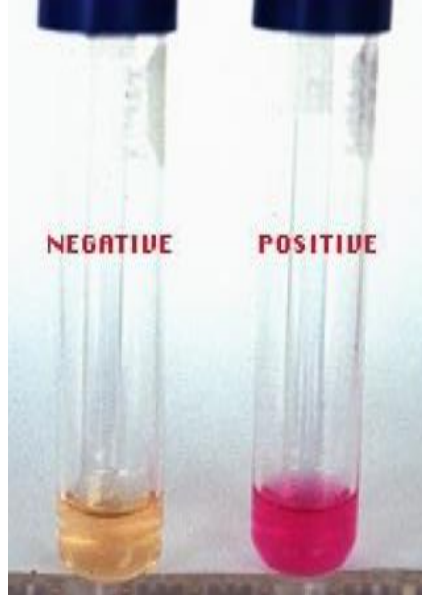
1.3.6. Üre Testi

Bu test, **bakterilerin üreyi hidrolize eden üreaz (urease) enzimini belirlemek** amacıyla yapılır. Bu bakteriler, üreaz enzim aktiviteleri ile üreyi parçalayarak karbondioksit ve amonyak oluşturur. Oluşan alkali ortamda, besiyerinin kırmızıya dönmesine neden olur.

Testte Christensen'in üre içeren besiyerleri (ürelü buyyon veya agar) kullanılır. *Proteus mirabilis* ve *Klebsiella* üreaz pozitif *Escherichia coli* negatif bakterilerdir.

Testin yapılış tekniği;

- Mikroorganizma kültürlerinden, petri kutusu veya tüpteki Christensen'in ürelü agar yüzeyine tekniğine uygun ekim yapılır.
- Etüvde, 37°C'de 1-5 gün inkübe edilir.
- Renk değişmelerine dikkat edilerek her gün kontrol edilir. (Bazı durumlarda renk değişikliği 5-6 saat içinde meydana gelebilir.)
- Kolonilerde veya tüpte kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif reaksiyonu gösterir. Negatif durumda renk değişikliği olmaz.



Resim 1.5: Üre testi (-) ve (+)

1.3.7. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Testi

TSI, özellikle **Salmonella gibi bazı enterik bakterileri tanımlamak** amacıyla kullanılan üç şekerli-demirli bir besiyeridir. Bu besiyerinde; şekerlerin fermantasyonu, fermantasyon sonucu gaz ve hidrojen sülfid (H_2S) oluşumu olmak üzere, bakterilerin üç temel özelliği incelenir. Besiyeri glukoz, laktoz ve sükroz olmak üzere üç farklı şeker, pH indikatörü olarak fenol kırmızısı ve H_2S oluşumunun göstergesi olan ferrik amonyum sülfat içerir.

Testin yapılış tekniği;

- Katı besiyerinde üremiş olan kolonilerden *Salmonella* olduğu tahmin edilenler, TSI agara ekilir.
- Etüvde, 37°C'de 24 saat inkübe edilir.

- İnkübasyon sonucunda siyah renkli koloni gözlenmesi durumuna göre Salmonella olup olmadığına karar verilir.



Resim 1.6: TSI agar testinde, *Salmonella*'nın ürememiş (pembe) ve üremiş (siyah) görünümü

UYGULAMA FAALİYETİ

Renk değişimine bağlı biyokimyasal testleri yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
İndol testi ➤ Peptonlu su ve indol ayıracı hazırlayınız.	➤ Ayıracın taze olup olmadığını kontrol ediniz. ➤ Ayıracı buzdolabında 4°C'de saklayınız.
➤ Kültürden peptonlu suya ekim yapınız.	➤ İncelenecek kültürlerin 18-24 saatlik olmasına dikkat ediniz. ➤ Bakteri kolonisinden özeye alarak tüpteki sıvı besiyerine ekim yapınız.
➤ 37°C'de 1-5 gün inkübasyon yapınız.	➤ Kültürleri, aerobik koşullarda inkübe ediniz. ➤ İnkübasyon derece ve süresine uyunuz.
➤ Kültüre 3-5 damla indol ayıracı ilave ediniz.	➤ Bileşiminde glikoz bulunan peptonları indol testinde kullanmayınız. ➤ Tüpün kenarından yavaşça akıtmak suretiyle (0,5 ml) kovaks ayıracı ilave ediniz.
➤ Çalkalayarak karıştırınız.	
➤ 1-2 dakika içinde meydana gelen renk değişimini gözlemleyiniz.	➤ Sonucu dikkatlice değerlendiriniz.
➤ Renk değişikliğini kaydediniz.	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdaki biyokimyasal testlerin hangisinde, potasyum hidroksit ve alfa naftol reaktif olarak kullanılır?
A) Metil Kırmızısı Testi
B) Fosfotaz Testi
C) Voges - Proskauer Testi
D) Üre testi
2. Aşağıdakilerden hangisi, enterik bakterilerden Salmonella'yı tanımlamak amacıyla kullanılan testtir?
A) Metil Kırmızısı Testi
B) Triple Sugar Iron Agar Testi
C) Voges - Proskauer Testi
D) Sitrat Testi
3. Aşağıdaki testlerden hangisinde, sonucun pozitif olduğunu gösteren renk, kırmızı olmaz?
A) Sitrat Testi
B) Metil Kırmızısı Testi
C) Voges - Proskauer Testi
D) Fosfotaz Testi
4. Mikroorganizma kültürlerinden, petri kutusu veya tüpteki Christensen agar yüzeyine tekniğine uygun ekilen, 37°C'de 1-5 gün inkübe edilen ve kırmızı renk meydana gelmesi halinde pozitif olarak değerlendirilen test aşağıdakilerden hangisidir?
A) İndol Testi
B) Sitrat Testi
C) Üre Testi
D) Fosfotaz Testi

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

ÖĞRENME KAZANIMI

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle çalışma amacına ve tekniğine uygun olarak gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testler yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Laboratuvara giderek gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testlerin önemi ve tayin yöntemleri hakkında bilgi edininiz.
- Katalaz ve karbonhidrat fermantasyon testleri yapılırken gözlemleyiniz.

2. GAZ VEYA HAVA KABARCIĞI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER

Bazı biyokimyasal testlerde bazı bakteriler, enzimleriyle ortamdaki kimyasal maddeleri ayrıştırarak reaksiyon sonucunda gaz oluşumuna neden olur. Bu özellikleri dikkate alınarak değerlendirme yapılır.

2.1. Katalaz Testi

Stafilakokları, streptokoklardan ayırt edebilmek için besiyerinde oluşan hemoliz, koloni ve gram boyamanın özellikleri yeterli değildir. Bu ayrımı yapabilmek için katalaz testi kullanılır. Katalaz, streptokokların dışında birçok aerobik ve fakültatif bakteri tarafından üretilen bir enzimdir. Katalaz enzimi, eritrositlerde de bulunduğundan dolayı; test edilecek bakteri kolonisi, kan içermeyen bir besiyerinden alınır.

Katalaz testinde, **süspansne bakteri kolonisine hidrojen peroksit (H₂O₂), damlatarak katalaz enzimini tespit etmek** amaçlanmaktadır. Sıvı ve katı besiyerlerinde üremiş bakterilere H₂O₂ ilave edildiğinde, oksijenin kabarcıklar halinde çıkması H₂O₂'nin ayrıştığını, dolayısıyla katalaz enziminin varlığını gösterir. *Stafilokoklar*'da katalaz pozitif, *Streptokoklar*'da ise katalaz negatiftir.

Test, tüpte veya lamda olmak üzere iki şekilde yapılır.

- **Tüpte katalaz testi**
 - İncelenecek bakteri kolonisinden özeyele alıp temiz bir tüp içinde, bir damla serum fizyolojik ile süspansne edilir.
 - Üzerine %3'lük H₂O₂ damlatılır ve karıştırılır.
 - Karışım içinde oksijenin açığa çıkması yani, hava kabarcıklarının oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

➤ Lamda katalaz testi

- İncelenecek bakteri kolonisinden özeyle alınarak temiz bir lam üzerinde, bir damla distile su ile süspansedilir.
- Üzerine %3'lük H₂O₂ damlatılır ve karıştırılır.
- Karışım içinde oksijene bağlı köpürme-hava kabarcıklarının oluşması, testin pozitif olduğunu gösterir.



Resim 2.1: Katalaz test sonucu (+) ve (-)

2.2. Eijkman Testi

Hayvanların bağırsağında bulunan *Escherichia coli*'nin tanısında, biyokimyasal idenfifikasyon için saf kültürden Eijkman testi yapılır. Bakterinin tanımlanmasında Eijkman testinden daha çok İMVİC testi yapılır; sonuç (+ + - -) şeklinde çıkar yani *Escherichia coli*'de, indol testi (+), Metilen kırmızısı testi (+), Voges-Proskauer agar testi (-), sitrat testi (-)'dir.

2.3. Karbonhidrat Fermantasyon Testi

Fermantasyon, anaerobik bir biyolojik oksidasyondur; anaerob, fakültatif anaerob ve mikroofil bazı bakteriler tarafından gerçekleşir. Bakteriler, ortamda bulunan glikoz, laktoz ve sükröz gibi karbonhidratları metabolize ederek, parçalayarak geliştikleri ortamda; organik asitler (asetik, butirik, laktik asit vb.), gaz (CO₂, H₂, O₂ vb.) ve nötral ürünler (aseton, asetoin, alkoller vb.) gibi fermantasyon ürünleri oluşur. Karbonhidrat metabolizması, bakterilerin sahip olduğu hidrolase (karbohidrase) adı verilen enzimle gerçekleşir. Bakteri türlerinin, oluşan bu son ürünlerdeki farklılıklar yardımıyla identifikasyonları (tanımlanması) yapılır. Besiyerinde glikozun parçalanması sonucu asit oluşumu ve indikatörün renginin açılmasıyla gaz oluşumu ise besiyeri içine yerleştirilen Durham tüpünün üst kısmında gaz birikmesi ile anlaşılır. Karbonhidrat fermantasyonu için, TSI ve EMB besiyerleri kullanılır.

➤ TSI besiyerine ekim

Karbonhidrat fermantasyonu testinde reaksiyon, her gün izlenir ve pozitif sonuç alındığında analize son verilir. Aksi halde karbonhidratın tüketiminden sonra besiyeri bileşimindeki peptonların kullanımına bağlı olarak pH yükselir ve renk kırmızıya dönüşür.

Testin yapılış tekniği;

- İncelenecek bakteri kolonisinden öze ile 0.1 ml alınıp yatık karbonhidrat içeren TSİ besiyerine ekim yapılır.
- Etüvde, 37°C’de 24-48 saat inkübe edilir.
- Her gün besiyeri, asit oluşumu (renk değişimi yeşilden sarıya) ve gaz oluşumu yönünden incelenir. Tüpün dibindeki sarıya dönen renk değişimi, glikozun kullanıldığını gösterir. Yatık yüzeydeki sarıya dönen renk değişimi ise laktozun kullanıldığını gösterir. Laktozun kullanımı birçok bakteri identifikasyonunda önemlidir.



Resim 2.2: Besiyerlerinde karbonhidratın kullanımı sonucu oluşan renkler

➤ EMB besiyerine ekim

EMB, içinde laktoz ve eozin metilen mavisi (pH indikatörü) bulunduran; gram pozitif bakterileri inhibe eden (engelleyen) ve gram negatif bakterilerin üremesini sağlayan seçici besiyeridir. Aynı zamanda, gram negatif bakterilerin laktozu kullanıp kullanmadığını test eden ayırıcı besiyeridir. EMB besiyerine ekilen bir bakteri laktozu kullanabiliyorsa fermentasyon sonucu oluşan asit, ortamın pH'ını düşürür ve indikatörün renk değiştirmesiyle koyu renkli koloniler oluşur. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* **laktoz pozitif** bakterilerdir. *Escherichia coli*, metalik refle veren koloni oluşturur. Eğer bakteri laktozu fermente edemezse asit oluşmaz ve ortamın pH'ı değişmez ve oluşan koloniler renksiz ve şeffaf görünür. *Salmonella*, *Shigella* ve *Proteus* **laktoz negatif** bakterilerdir.

UYGULAMA FAALİYETİ

Gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testleri yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
Lamda katalaz testi ➤ % 30'luk H ₂ O ₂ çözeltisi hazırlayınız	➤ Hidrojen peroksit dayanıksız olduğundan günlük hazırlayınız. ➤ Kullanıncaya kadar buzdolabında saklayınız.
➤ Bir tüpe bir damla serum fizyolojik koyunuz.	➤ Tüplerin temizliğine dikkat ediniz.
➤ İncelenecek bakteri kolonisinden özeyle alıp tüp içinde, bir damla serum fizyolojik ile karıştırınız.	➤ Kolonileri özenle alınız.
➤ Üzerine % 3'lük H ₂ O ₂ çözeltisi damlatınız.	➤ Mutlaka gözlük ve eldiven kullanınız.
➤ İyice karıştırınız.	➤ H ₂ O ₂ çözeltisinin deriye temas etmemesine dikkat ediniz.
➤ Hava kabarcığı oluşup oluşmadığını kontrol ediniz.	➤ Sonucu rapor ediniz.
Lamda katalaz testi ➤ % 30'luk H ₂ O ₂ çözeltisi hazırlayınız.	
➤ Lam üzerine 1 damla saf su koyunuz.	➤ Temiz lam kullanınız.
➤ Kültürden bir öze alıp lam üzerindeki suyla karıştırınız.	➤ İncelenecek kültürlerin 18-24 saatlik olmasına dikkat ediniz.
➤ Lam üzerindeki karışımın üzerine öze ile H ₂ O ₂ çözeltisinden ekleyiniz.	➤ Gözlük ve eldiven giyiniz.
➤ Hava kabarcığı oluşup oluşmadığını kontrol ediniz.	➤ Sonucu rapor ediniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi, gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testlerden biri değildir?
A) Eijkman testi
B) Karbonhidrat fermantasyon testi
C) Katalaz testi
D) Koagülaz testi
2. Aşağıdakilerden hangisi, bakterilerde katalaz enziminin fonksiyonudur?
A) Hidrojenin parçalanması
B) Tuzların parçalanması
C) Toksik hidrojen peroksidin parçalanması
D) Su kaybının önlenmesi
3. Karbondidrat fermantasyon testinde, hangi bakteri laktozu fermente eder ve laktoz pozitif olarak sonuçlanır?
A) Escherichia coli
B) Shigella
C) Proteus
D) Salmonella
4. Aşağıdaki bakteri gruplarından hangisi, biyolojik bir olay olan fermantasyonu gerçekleştiremez?
A) Anaerob bakteriler
B) Aerob bakteriler
C) Mikroofil bakteriler
D) Fakültatif anaerob bakteriler

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-3

ÖĞRENME KAZANIMI

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle çalışma amacına ve tekniğine uygun olarak pıhtı oluşumuna bağlı biyokimyasal testleri yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Laboratuvara giderek pıhtı oluşumuna bağlı biyokimyasal testler hakkında bilgi edininiz.
- Koagülaz, Aglütinasyon ve Jelatin hidrolaz tayin yapılışını gözlemleyiniz.

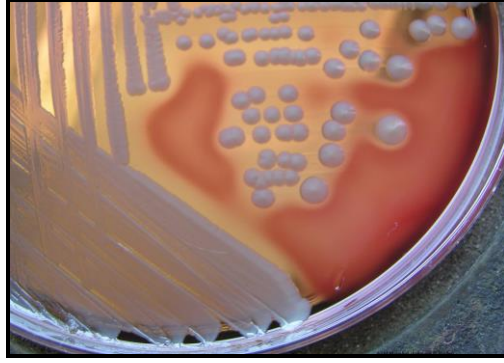
3. PIHTI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER

Bazı biyokimyasal testlerde bazı bakteriler, enzimleriyle buldukları ortamdaki maddeleri etkileyerek koagülasyona yani pıhtı oluşumuna neden olur. Bu özellikleri dikkate alınarak değerlendirme yapılır.

3.1. Koagülaz Testi

Koagülaz, özellikle patojen Stafilokoklar tarafından üretilen ve fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırıcı bir enzimdir. Koagülaz testi, Staphylococcus aureus'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde kullanılan en önemli, enzimatik bir testtir. Stafilokoklarda; serbest koagülaz ve bağlı koagülaz olarak iki enzim türü vardır. Serbest koagülazın varlığı tüpte koagülaz testiyle, bağlı koagülazın varlığı ise lamda koagülaz testiyle tespit edilir. Tüpte koagülaz testi, lamda koagülaz testine göre daha güvenilir sonuç verdiği için tercih edilir.

Testlerde reaktif olarak taze hazırlanmış ya da ticari olarak dondurularak kurutulmuş tavşan plazması kullanılır. Tavşan plazması, bazı patojenik bakteri türleri tarafından sentezlenen ve koagülaz enzimi tarafından fibrine dönüştürülen fibrinojeni içerir.



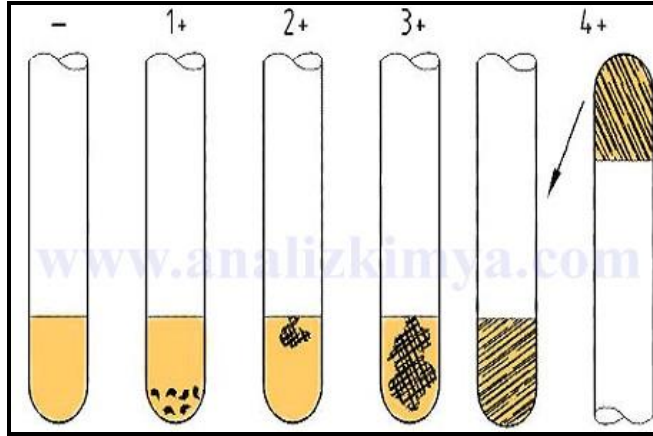
Resim 3.1: Staphylococcus aureus kolonileri

➤ **Tüpte koagülaz testi**

Bu yöntemde amaç, bakterilerin buldukları ortama saldıkları “bağlı olmayan-serbest koagülaz” enzimini tespit etmektir.

Testin yapılaş tekniği;

- Stafilokok şüphesi olan kolonilerden 0,5 ml alınıp tüpteki tavşan plazmasına eklenir.
- Etüvde, 37°C’de 1- 4 saat süreyle bekletilir.
- Plazmanın pıhtılaşıp akışkanlığını kaybetmesi yani, belirgin pıhtı oluşması pozitif, akışkanlığını sürdürmesi ise negatif olarak değerlendirilir. Pıhtı oluşmaması halinde süspansiyon oda ısısında 24 saate kadar bekletilir. Çünkü nadiren de olsa bazı izolatlar, geç dönemde plazmanın pıhtılaşmasına yol açabilir.



Şekil 3.1: Koagülaz testinde belirgin pıhtının oluşumu (3 ve 4 pozitif)



Resim 3.2: Koagülaz test sonucu (+) ve (-)

➤ Lamda koagülaz testi

Bu yöntemde amaç, bakterinin yüzeyinde bulunan bağlı koagülazı tespit etmektir.

Testin yapılış tekniği;

- Lam üzerine bir damla distile su konur.
- Üzerine özeyle şüpheli bakteri kolonisinden alınıp karıştırılır.
- Daha sonra bir öze dolusu tavşan plazması ilave edilerek karıştırılır.
- 1-2 dakika içinde kümeleşme-pıhtılaşma olup olmadığına bakılır.
- Pıhtılaşma oluşması pozitif, oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilir.

3.2. Aglütinasyon Testi

Kültürlerde, bir bakterinin *sallmonella* veya *shigella* türlerinden biri olarak karar verilmesi için mutlaka lam aglütinasyonu yapılması gerekir. Ayrıca, *Escherichia coli*'nin serotipleri de (Serotip, özellikle bakteri ve virüslerde, antijen karakterleri ile belirlenen türün alt tür kümesidir.) ancak, lam aglütinasyonu yapılarak tespit edilir. Lam aglütinasyonu aynı zamanda bir serolojik doğrulama testidir.

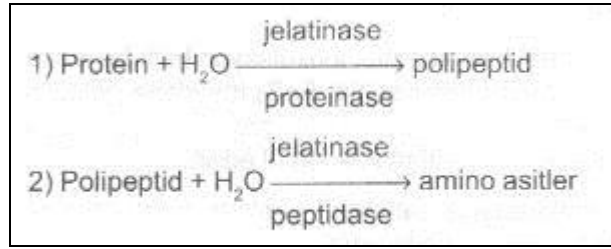
Testin yapılış tekniği;

- Öncelikle bakteri süspansiyonu hazırlanır; bir tüpe konulan birkaç damla tuzlu suya, katı besiyerinde oluşmuş kolonilerden özeyle birkaç tane alınıp ezilerek süt görünümünde karışım oluşturulur.
- Kullanılacak antiserumlar, 1/5 ya da 1/10 oranında sulandırılarak kullanılır. (Antiserum; enfeksiyon yapıcı mikroorganizmalara ya da zehirli maddelere karşı etkili özgül antikorları içeren kan serumudur.)

- Temiz bir lam alınır. Pastör pipetiyle lamın bir ucuna bir damla serum fizyolojik, diğer ucuna bir damla antiserum damlatılır.
- Her iki damla üzerine, ince bir pastör pipetiyle bakteri süspansiyonundan birer damla damlatılır.
- Lam elle tutulup eğdirilerek bir dakika beklenir.
- Sonuç, siyah zemin üzerine tutularak değerlendirilir. Kümeleşerek parçacıkların oluşması, aglütinasyonun olumlu sonuçlandığını gösterir.

3.3. Jelatin Hidroliz Testi

Bu test, mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinase enzim sentez yeteneğini ölçmede kullanılır. Bakterilerin identifikasyonunda yararlanır. Jelatin, protein karakterinde bir madde olup kollagenin hidrolizasyonundan elde edilir. Büyük moleküllü olduğundan bakteri, hücre duvarından geçemez. Bu nedenle daha küçük moleküllere katalize edilir; bunu ekstra sellüler bir enzim olan jelatinase yapar. Jelatinase tarafından proteinlerin katabolizması iki aşamalıdır.



Uzun süre yüksek ısıda bulunan jelatin kısmen hidrolize olur ve katılaşma özelliğini kaybeder.

Testin yapılış tekniği;

- İncelenecek bakteri kolonisinden iğne öze ile alınıp dik olarak jelatinli besiyerine ekim yapılır.
- Tüpler, 37°C'de 15 gün kadar inkube edilir.
- Bu süre sonunda kontrollerle birlikte buzdolabı sıcaklığında 1-2 saat bırakılır.
- Erimenin olup olmadığına dikkat edilir. Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda, buzdolabından çıkarılınca, jelatinli ortamın sıvı halinde ve katılaşmadığı görülür (pozitif jelatin hidrolizasyonu). Negatif durumlarda tüpteki sıvı jelatinli besiyeri katılaşır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Pıhtı oluşumuna bağlı biyokimyasal testleri yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
Tüpte koagülaz testi ➤ Stafilokok şüphesi olan kolonilerden 0,5 ml alıp tüpteki tavşan plazmasına ekleyiniz.	➤ Testte, eski ve zayıf üreyen kültürler kullanmamaya dikkat ediniz ➤ Tavşan kanı plazması kuru formda ise sulandırıldıktan sonra sıvı hâlde ise direkt olarak kullanmaya özen gösteriniz.
➤ Etüvde, 37°C 1-4 saat süreyle bekletiniz.	
➤ Pıhtılaşma olup olmadığına bakarak değerlendirme yapınız.	➤ Tüpü hafifçe öne eğerek pıhtı oluşumunu gözlemleyiniz. ➤ Pıhtı oluşmaması halinde süspansiyonu oda ısısında 24 saate kadar bekletiniz.
Lamda koagülaz testi ➤ Lam üzerine bir damla distile su koyunuz.	
➤ Sonucu rapor ediniz. ➤ Üzerine, özeye şüpheli bakteri kolonisinden koyup karıştırınız.	➤ Tüp veya lamları hiçbir zaman kuvvetlice çalkalamayınız.
➤ Daha sonra bir öze dolusu tavşan plazması ilave ederek karıştırınız.	
➤ 1-2 dakika içinde kümeleşme-pıhtılaşma olup olmadığına bakınız.	➤ Karşım içinde hızla başlayan ve kısa sürede kaybolmayan hava kabarcıklarını dikkatlice takip ediniz.
➤ Pıhtılaşma olup olmadığına bakarak değerlendirme yapınız.	➤ Sonucu rapor ediniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdaki biyokimyasal testlerin hangisinde, reaktif olarak tavşan plazması kullanılır?
A) Katalaz Testi
B) Koagülaz Testi
C) Jelatin Hidroliz Testi
D) Karbonhidrat Fermantasyon Testi
2. Aşağıdakilerden hangisi, aglütinasyon testi için yanlış bir ifadedir?
A) Kültürlerde, bir bakterinin salmonella veya shigella türlerinden biri olarak karar verilmesi için mutlaka lam aglütinasyonu yapılması gerekir.
B) Escherichia coli'nin serotipleri lam aglütinasyonu yapılarak tespit edilir.
C) Lam aglütinasyonu aynı zamanda bir serolojik doğrulama testidir.
D) Lam aglütinasyonu, bakteri enzimlerini belirleyen testtir.
3. Aşağıdakilerden hangisi, patojen stafilokoklar tarafından üretilen ve fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırıran bir enzimdir?
A) Koagülaz
B) Katalaz
C) Üreaz
D) Hidrolaz
4. Aşağıdakilerden hangisi, jelatin hidroliz testinin özelliklerinden değildir?
A) Jelatin hidroliz testi mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinase enzim sentez yeteneğini ölçmede kullanılır.
B) Jelatin, protein karakterinde bir madde olup kollagenin hidrolizasyonundan elde edilir.
C) Jelatin, küçük moleküllü olduğundan bakteri, hücre duvarından geçer.
D) Jelatin, Jelatinase tarafından daha küçük moleküllere katalize edilir.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise “Modül Değerlendirme”ye geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. IMViC testi, hangi testlerin ilk harflerinden oluşur?
A) Indol testi
B) Fosfotaz testi
E) Metil kırmızısı testi
D) Voges – Proskauer testi
2. Aşağıdakilerden hangisi, bakteriler tarafından ortama salgılanan enzimlerden biri değildir?
A) Hidrolaz
B) Koagülaz
C) Üreaz
D) Sitrat
3. Aşağıdakilerden hangisi, aminoasit olan triptofanı parçalayarak bakterilerin tanımlanmasını sağlayan bir testtir?
A) Indol
B) Sitrat
C) Metil kırmızısı
D) Üreaz
4. Staphylococcus aureus'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde kullanılan test hangisidir?
A) Katalaz
B) Koagülaz
C) Sitritaz
D) Hidrolaz
5. “Bakteriler, ortamda bulunan glikoz, laktoz ve sükrözü parçalayarak organik asit, gaz ve nötral ürünler gibi fermantasyon ürünlerini meydana getirir” olayı hangi biyokimyasal testte gerçekleşir?
A) Karbonhidrat Fermantasyon Testi
B) Koagülaz Testi
C) Katalaz Testi
D) Voges - Proskauer Testi

6. Bir bakterinin salmonella veya shigella türlerinden biri olarak karar verilmesi için mutlaka yapılması gereken ve aynı zamanda bir “serolojik doğrulama testi” olarak da bilinen test hangisidir?
A) Koagülaz Testi
B) Jelatin Hidroliz Testi
C) Lam Aglütinasyonu
D) Metil Kırmızısı Testi
7. Aşağıdaki biyokimyasal testlerin hangisinde, Kovacs veya Ehrlich reaktif olarak kullanılır?
A) Metilen Kırmızı Testi
B) Voges-Proskauer Testi
C) İndol Testi
D) Katalaz Testi
8. Aşağıdakilerden hangisi, besiyerinde bakterilerin glukozu fermente edip organik asit oluşturarak besiyerinin pH'ını 4.4'ün altına düşürme esasına dayanan bir testtir?
A) Hidrojen Sülfür Testi
B) Voges-Proskauer Testi
C) Katalaz Testi
D) Metilen Kırmızı Testi

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki modüle geçmek için öğretmeninize başvurunuz.

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ 1'İN CEVAP ANAHTARI

1	C
2	B
3	A
4	C

ÖĞRENME FAALİYETİ 2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	C
3	A
4	B

ÖĞRENME FAALİYETİ 3'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	B
2	D
3	A
4	C

MODÜL DEĞERLENDİRMENİN CEVAP ANAHTARI

1	B
2	D
3	A
4	B
5	A
6	C
7	C
8	D

KAYNAKÇA

- **SAREYÜPOĞLU Barış, Temel Veteriner Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, (5. Ünite), Anadolu üniversitesi Web-Ofset Tesisleri, Eskişehir, 2011.**
- **ARDA Mustafa, Temel Mikrobiyoloji, (3.Baskı) Medisan Yayın, Ankara, 2006.**
- **BİLGEHAN Hakkı, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, (11 Baskı) İzmir, 2005.**
- **TEMİZ Ayhan, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 2000.**
- **Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıkları Araştırma Müdürlüğü, Mart, 2008.**
- **Klinik ve Uygulamalı Mikrobiyoloji, Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi Sağlık Personeli Önlisans Eğitimi, Eskişehir, 1993.**
- **İMREN A. H., Orhan TURAN, Klinik Tanıda Laboratuvar, BE-TA Basım Yayım, İstanbul, 1985.**
- www.mikrobiyoloji.org