

# BIYOKİMYASAL TESTLER

Yrd.Doç.Dr.Arzu FINDIK

# Katalaz Testi

**Prensip-** Katalaz enziminin varlığını belirlemek.Katalaz,hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene ayrışmasını katalize eder.

## **Metot**

**Lamda:** Lam üzerine bir damla %30 luk hidrojen peroksit damlatılır. Üzerine öze ile alınan koloni süspanse edilir.

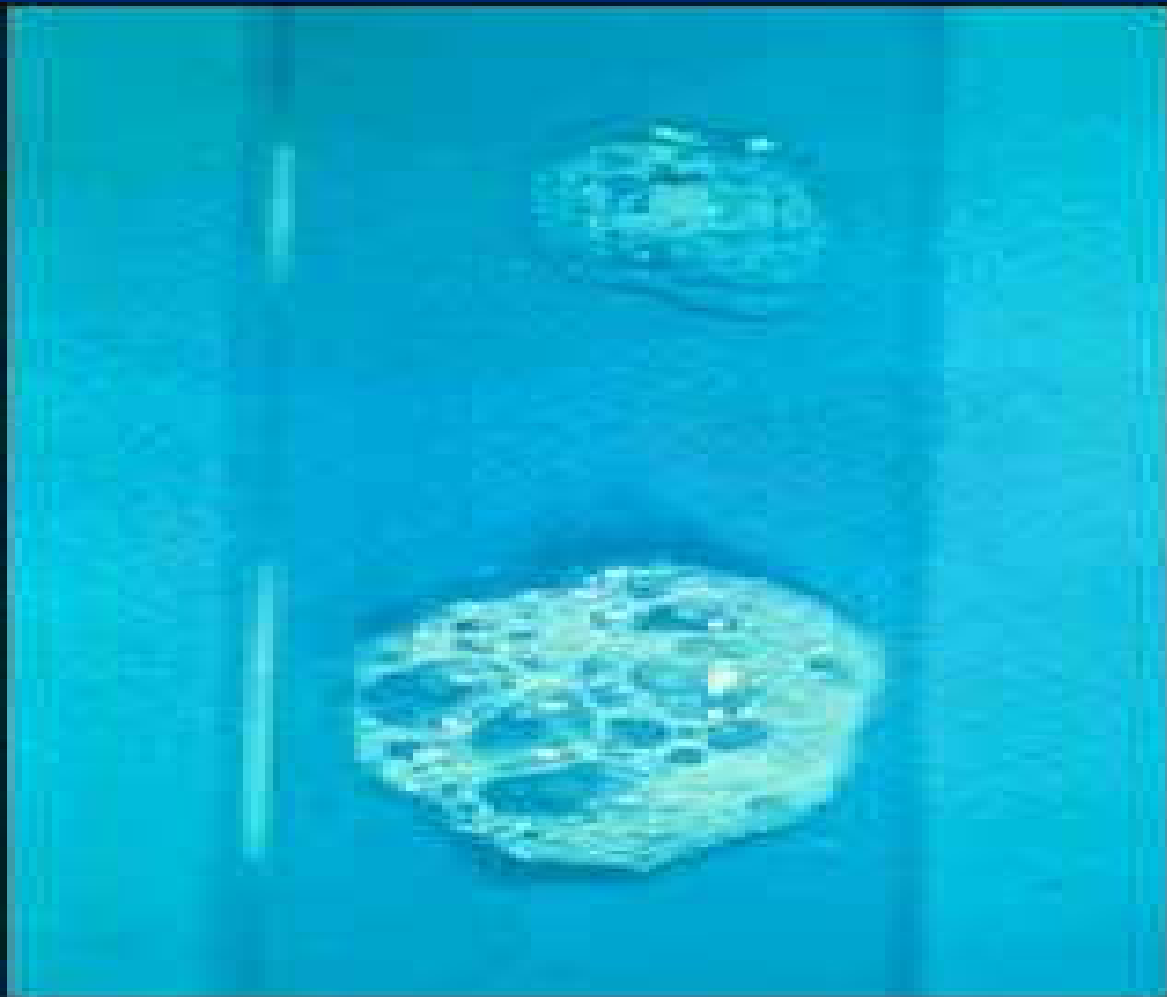
**Tüpte:** Test edilecek mikroorganizmanın sıvı kültürü üzerine %3'lük hidrojen peroksit damlatılır.

**Değerlendirme-** Kabarcıklar şeklinde gaz çıkışı testin (+) olduğunu gösterir.

Katalaz çoğu aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerde bulunur.  
**Streptococcus spp.türlerinde yoktur. Anaeroblarda yoktur.**

- Bakteri kolonisinin kanlı agarla bulaşmış olmamasına dikkat edilmelidir. Eritrositler katalaz içerir ve yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir.
- Eski kültürler katalaz aktivitesini kaybedebilir, yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir.

# Katalaz testi



**STAPHYLOCOCCUS → +**  
**STREPTOCOCCUS → -**

# DNase ve TNase Testi

**Prensip-** Isıya dayanıklı deoksiribonükleaz (DNase) enzimini sentezleme yeteneğini değerlendirmek, ısı karşısında *S. aureus* tarafından sentezlenen DNase'in varlığını ortaya koymak. Enzim, nukleustaki DNA'yı depolimerize ederek ayrıştırır. DNase aktivitesi özellikle koagulaz (-) *S. aureus*'ların patojenitelerini belirlemede yardımcı olur. *S. aureus* DNase (+), *S. epidermidis* (-)'dir.

**Metot-** Kültür filtratlarındaki ekstrasellüler DNase'ı belirlemek için:

DNA (2 mg/ml) ve toluidin mavisi (%1) içeren DNA Agar'a test ve kontrol bakterileri nokta veya çizgi tarzında ekilir. 37°C'de 2-3 gün inkubasyona bırakılır. Besi yerinde toluidin mavisi yoksa değerlendirme agar üzerine 1N HCl ilave edilerek yapılır.

**Değerlendirme-** Toluidin mavisi içeren DNA agardaki üremeler etrafında parlak pembe açık bir saha → test (+)

Besi yerinde toluidin mavisi yoksa agar üzerine 1 N HCl ilave edilir. DNase enzimi sentezleyen koloniler etrafında DNA parçalandığı için şeffaf bir alan oluşur (+). Parçalanmayan DNA'ların bulunduğu bölgelerde ise DNA denature olduğu için HCl den etkilenmez ve sadece bulanık bir görünüm alır(-).

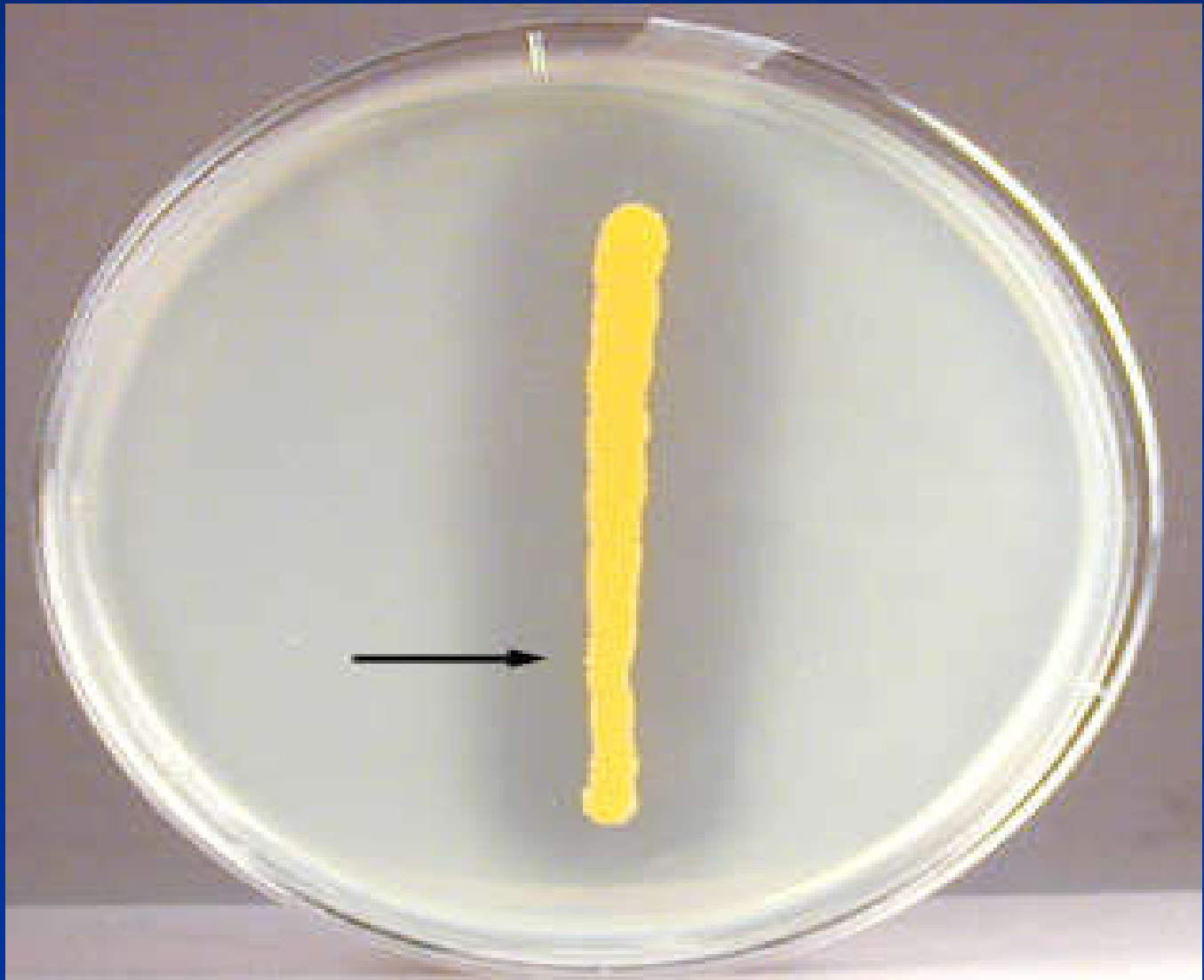
**Termonükleaz testinde** ise ; agar üzerinde açılan 5 mm'lik çukurlara ısıtılmış kültür konur. 37 derecede 2-4 saat sonunda , çukur etrafında pembe renk oluşmuşsa ( + ) denir. Pembe renk göstermeyenler ise ( - ) tir.

*Serriata marcescens* → ( - ) reaksiyon verir

# DNase ve TNase Testi

- Kültür taze, yeterli üreme olmalı
- Dnase ve TNase aktivite ölçümü paralel yapılmalı
- Besi yeri, gerekli divalen katyonları (Ca, Mg, Mn) içermeli
- Negatif durumlarda inkubasyon süresi uzatılabilir

# DNase Testi



# TNase Testi



TNase (+)



TNase (-)



# Koagulaz Testi

**Prensip-** Özellikle stafilokoklarda bulunan ve kan plazmasını pıhtılaştıran koagulaz enzimini belirleme, patojen ve nonpatojen Staph. ayrımı (patojen *S.aureus* koagulaz (+), *S. epidermidis* ve *S.saphrophyticus* (-))

## **Metot**

**Lamda:**Bağlı koagulazların (clumping factor) tespitinde kullanılır. Bağlı koagulaz plazmadaki fibrinojene bağlanır ve onun stafilokoklar üzerinde presipite olmasına, kümeleşmeye neden olur. Temiz bir lam üzerinde, bir damla sulandırılmış tavşan plazması ile test edilecek stafilokoklara ait bir iki koloni karıştırılır. 5-10 dakika içerisinde görülen partikülleşme ve kümeleşme, testin (+) olduğunu gösterir.

**Tüpte:** Serbest koagulaz tespiti için yapılır. Serbest koagulaz, coagulase-reacting factor adı verilen bir plazma komponenti ile reaksiyona girer ve plazma koagüle olur. Bir tüp içerisine 1/5 veya 1/10 sulandırılmış 0.5 ml tavşan plazması konur, üzerine 0.1 ml. kültür eklenir. 37

derecelik etüve kaldırılır. 1-3-6-24. Saatlerde kontrol edilir. Oluşan koagülasyonun şiddetine göre +1, +2, +3 ve +4 olarak değerlendirilir.

**S.aureus** → +      **S.epidermidis** → -

# Koagulaz Testi

- Taze ve iyi üremiş kültürler kullanılmalı
- Plazma taze ve oda ısısında olmalı
- Sitratlı plazma, sitratı kullanan herhangi bir m.o tarafından pıhtılaştırılabileceğinden EDTA veya heparinli plazma kullanılmalıdır.
- Kuvvetli çalkalama veya karıştırma yapılmamalı
- Uzun süre inkubasyon (37°C'de) pıhtının çözülmesine (stafilokinaz üretimi sonucu pıhtı lize olabilir) neden olabilir
- Lam testinde koloniler önce su ile süspanse edilerek oto aglutinasyon yönünden kontrol edilmeli

# Koagulaz Testi



Photo by Tom Barkman

**Koagulaz (+)**



Photo by Tom Barkman

**Koagulaz (-)**

# Oksidaz Testi

**Prensip-** M.o'n sentezledikleri intrasellüler oksidaz enzimini ortaya koymak. Oksidaz reaksiyonu bakterilerde (aerobik) sitokrom oksidaz sisteminin bulunduğunu ifade eder. Anaerobiklerde oksidaz sistemi yoktur.

**Metot-** Test edilecek bakterinin kolonileri üzerine birkaç damla %0.5 tetrametil-p-fenilendiamin damlatılır (veya bu ayıraçın emdirildiği hazır ticari test çubukları kullanılır)

**Değerlendirme-** 1-2 dk içinde oluşan kırmızı renk → (+). Okside olmuş sitokrom C, ayıraçtaki p-amino dimetilanilini okside ederek renkli bileşik oluşturur.

# Oksidaz Testi

- Ayıraç sadece koloni üzerine damlatılır
- Ayıraçlar taze olmalı

# Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

**Prensip-** M.o'ların çeşitli spesifik karbonhidratları ayrıştırma yeteneklerini (sakkarolitik aktivite) belirlemek. Enterobacteriaceae familyasındaki bakterilerin bu aktiviteleri oldukça yüksektir. Bakterilerin karbonhidratları kullanma şekilleri ve kullandıkları CHO'lar farklılık gösterir. Bu testlerin esası, CHO fermentasyonu sonucu açığa çıkan asit ürünler (asetik, bütirik, propiyonik, laktik asitler gibi) veya nötral ürünlerin (aseton,asetoin, alkol gibi) ve gazların ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2$  gibi) ortaya konulmasına dayanır. Oluşan asit ürünler ortama ilave edilen indikatörler ile ortaya konulurken, açığa çıkan gaz Durham tüpleri ile belirlenebilir.

# Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

## Metot

Sıvı besi yerinde: %1 CHO içeren indikatörlü (brom timol mavisi) sıvı besi yerine saf ve taze bakteri kültüründen 0.1 ml ekilir ve 37°C'de 1-10 gün inkube edilir. Oluşan sarı renk →(+), Durham tüpünde gaz →gaz oluşumu

# Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

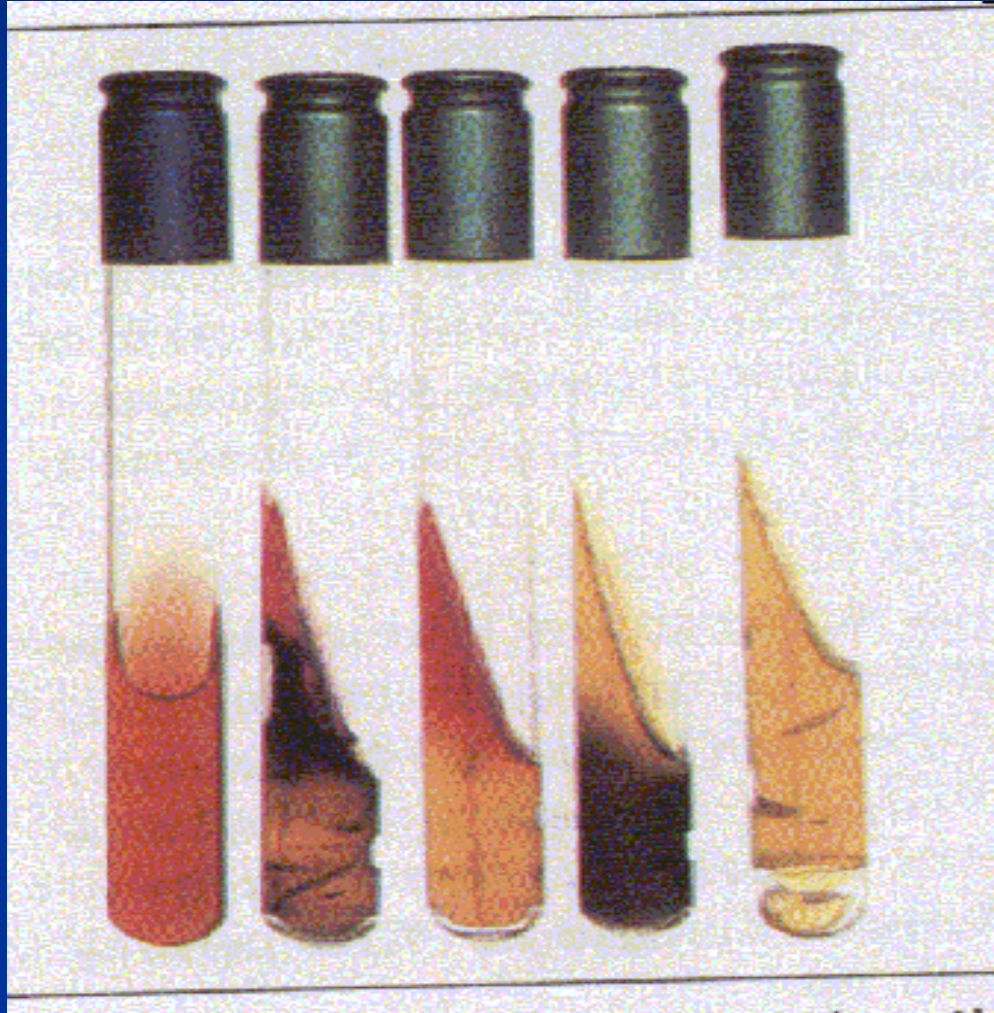
Katı besi yerinde: Özel besi yerleri.

**TSIA (Triple Sugar Iron Agar):**

içeriğindeki laktoz, sakkaroz ve glukozun fermentasyonu ile birlikte oluşan  $H_2S$  gazı ve diğer gazların oluşumu ortaya konulur. İçeriğindeki indikatör (fenol red) vasıtasıyla, asit oluşumu rengin kırmızı  $\rightarrow$  sarı ile anlaşılır.  $H_2S$  oluşumu besi yerinin kararması ile anlaşılır.



# Triple Sugar Iron Agar (TSI)'da *E. coli* kültürü



# Sıvı besi yerinde gaz oluşumu ve indol testi



# Karbonhidrat Fermentasyon Testleri

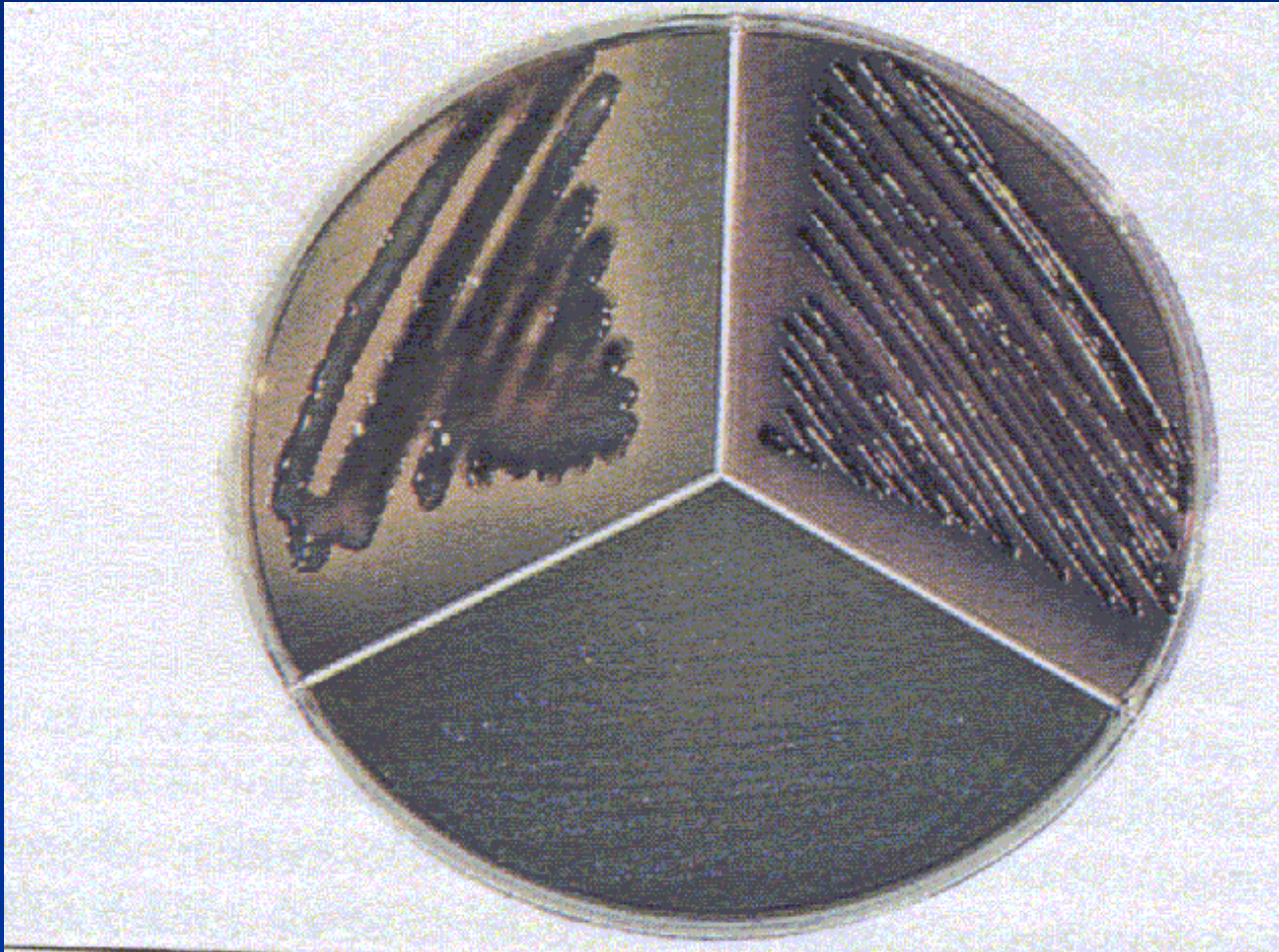
MacConkey Agar, EMB (Eosine Metylene Blue Agar), Endo Agar da bu amaçla kullanılan, CHO (laktoz) ve indikatör içeren besi yerleridir.

# MacConkey Agar'da pembe koloniler

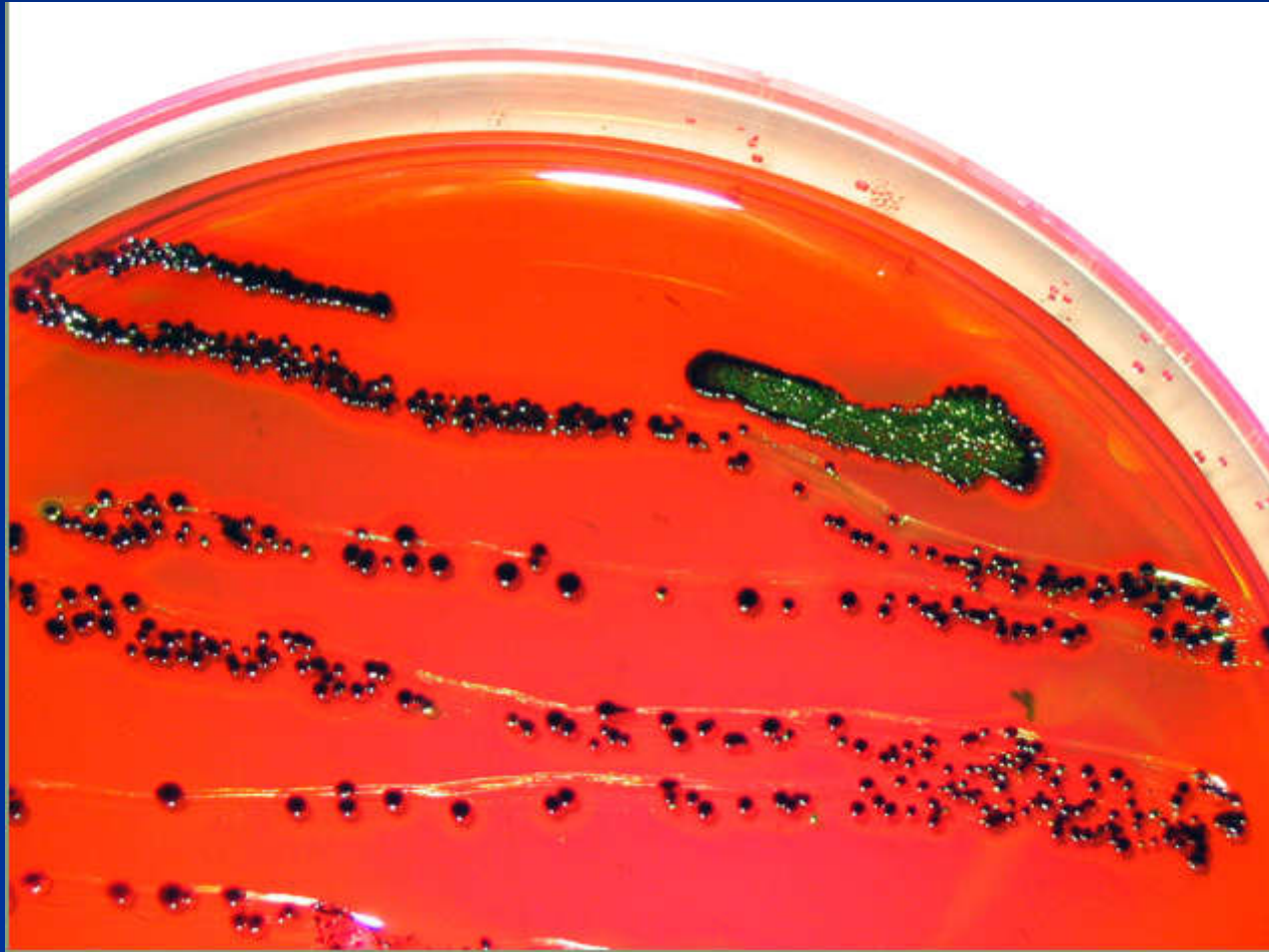




# EMB Agar'da metalik refle



# EMB Agar'da metalik refle



# H<sub>2</sub>S Testi

**Prensip-** M.o'ların bazı organik (sistin, sistein, methionin gibi) veya inorganik (tiyosülfat, sülfat, sülfid gibi) ayrıştırarak hidrojen sülfür oluşturma özelliklerini ortaya koyma. Ortamda metal veya metal tuzlarının (Pb, Fe, Bi, Ni) bulunması, çıkan H<sub>2</sub>S'ün bunlarla birleşip metal sülfidleri oluşturmaya ve ortamın siyah renk almasına neden olur. Besi yerinde açığa çıkan H<sub>2</sub>S'i belirlemede PB asetat emdirilmiş kağıt şeritler kullanılır (Ayrıca TSIA'da da test gerçekleştirilebilir).

# H<sub>2</sub>S Testi

**Metot-** Sıvı besi yerine ekim yapıldıktan sonra, Pb asetat emdirilmiş steril kağıt şerit besi yerine (sıvı ile temas etmeyecek şekilde) daldırılır.

İnkubasyona (2-7 gün, 37°C) bırakılır.

**Değerlendirme-** İnkubasyon sonunda kağıt şeritin ucunda gözlenen siyahlaşma (+) olarak kabul edilir.



# IMVIC Testi

İndol, Metil red, Voges-Proskauer ve Sitrat testlerini içermektedir. Özellikle Enterobacteriaceae familyasındaki bakteriler için standart biyokimyasal testlerdir.

# IMVIC Testi



# İndol Testi

**Prensip-** Bakterilerin triptofan aminoasitini ayrıştırarak indol meydana getirme yeteneklerini belirlemek.

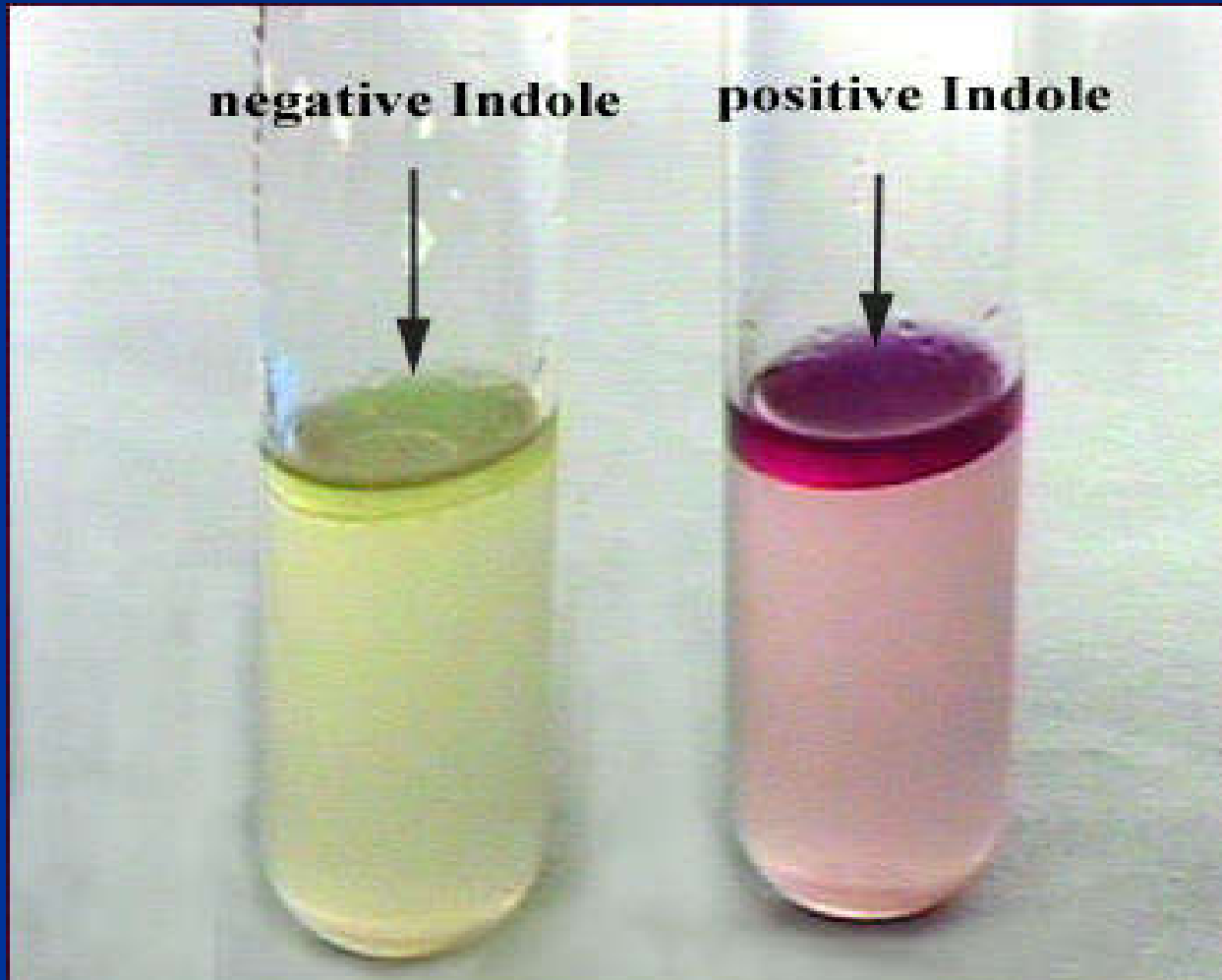
triptofanaz

triptofan  $\rightarrow \rightarrow \rightarrow$  indol+pirüvik asit+ $\text{NH}_3$

**Metot-** Nutrient buyyonda (veya triptofanca zengin sıvı besi yeri) üremiş kültür üzerine 0.5 ml Kovacs ayıracı ilave edilir.

**Değerlendirme-** 1-2 dk içinde tüpün üst kısmında oluşan kırmızı halka (+), sarı halka (-)

# Indol Testi



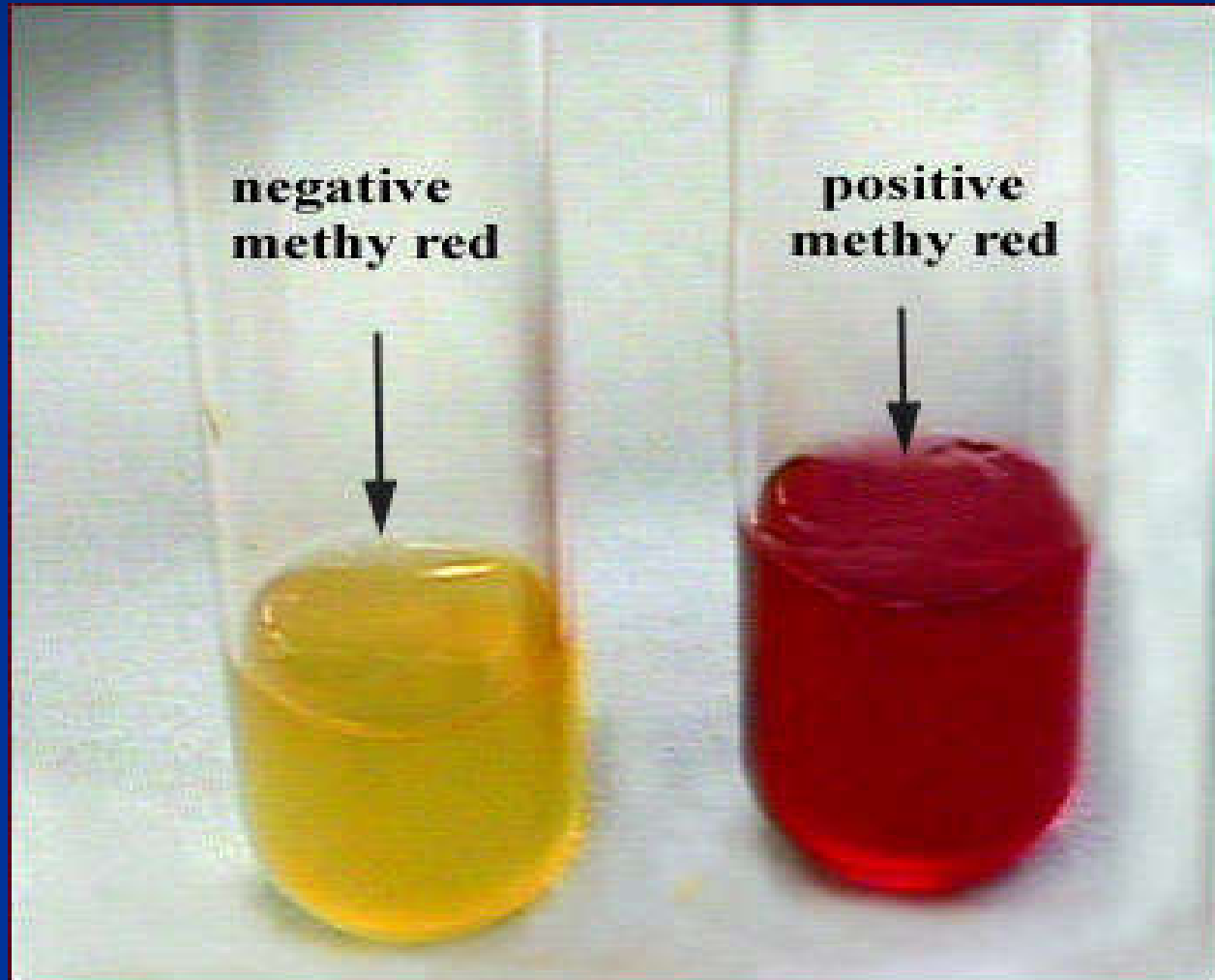
# Metil Red (MR) Testi

**Prensip-** glukozun fermentatif metabolizması sonucu ortaya çıkan asit ürünlerin ortamın pH'sını düşürdüğünü orta koyar. MR solusyonu pH 4.4 veya aşağısında kiraz kırmızısı, pH 6.3'te sarıdır.

**Metot-** Bakteri glukozlu buyyona ekildikten sonra, inkube edilir. Sonra MR solusyonu damlatılır.

**Değerlendirme-** Kırmızı renk (+), sarı renk (-)

# MR Testi



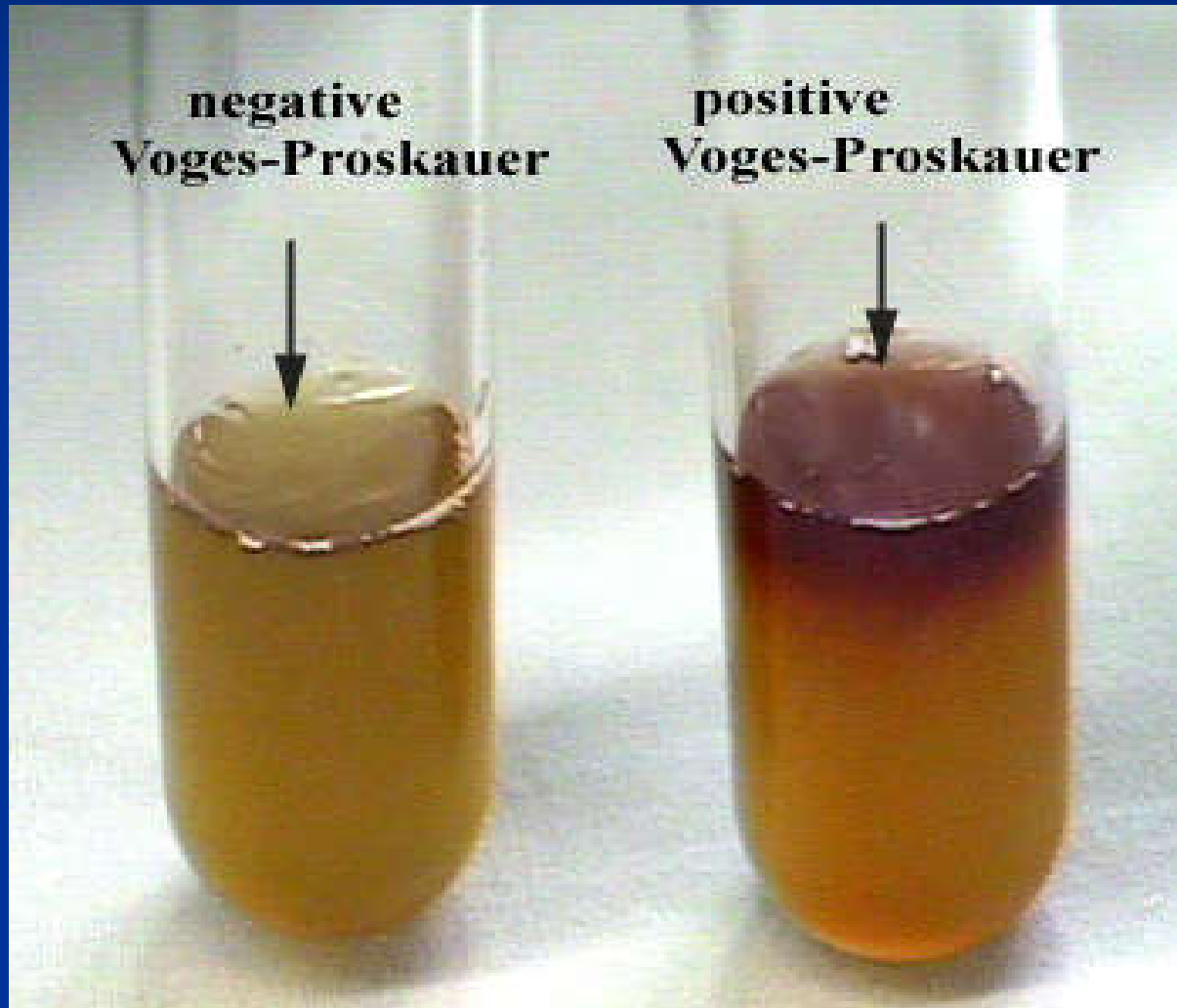
# Voges-Proskauer (VP) Testi

**Prensip-** Bazı bakterilerin glukozu ayrıştırmaları sonucu nötral ürünler meydana getirdiğini ortaya koyar.

**Metot-** Glukozlu besi yerinde üretilen kültür üzerine 3 ml alfa naftol ve ardından 1 ml % 40 KOH ilave edilir. İyice karıştırılır. 30 dk beklenir.

**Değerlendirme-** pembe renk (+)

# VP Testi





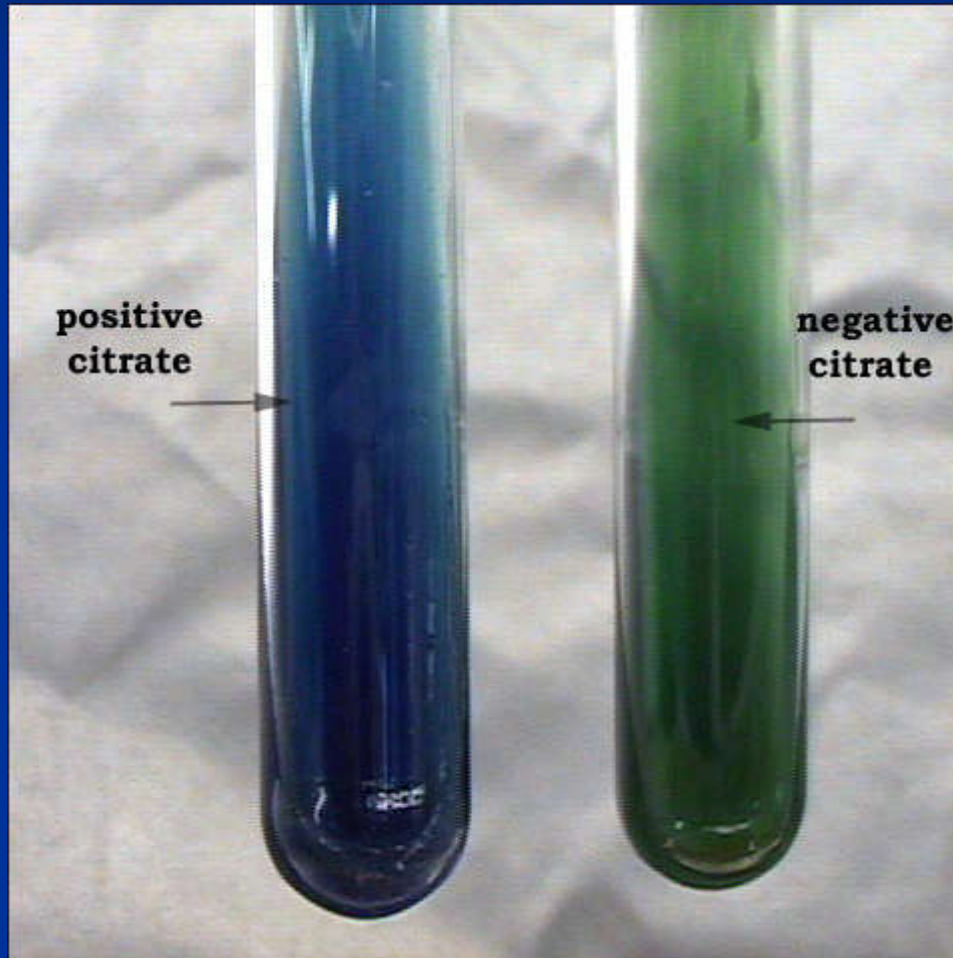
# Sitrat Testi

**Prensip-** Bakterilerin, besi yerindeki sitratı "C" kaynağı ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini ortaya koyar

**Metot-** Simmons Citrate Besi yerine ekim yapılarak inkube edilir.

**Değerlendirme-** Orijinal yeşil renk (-), koyu mavi renk (+)

# Sitrat Testi



# Oksidasyon-Fermentasyon Testi

**Prensip-** Bakterilerin CHO'ları ayrıştırmada oksidatif veya fermentatif metabolik yolu kullanma durumlarını saptar.

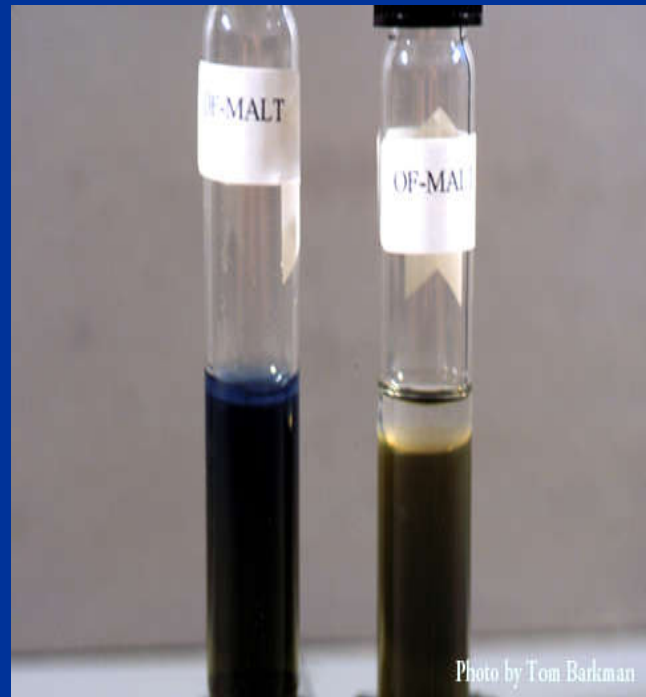
**Metot-** 2 adet OF besisi yerine taze sıvı kulture batırılmış iğne ile ekim yapılır. Tüplerden birine sıvı parafin konur.İnkube edilir.

**Değerlendirme-** Oksidatif glukoz ayrışması, açık tüpte rengin mavi-yeşil → sarı

fermentatif ayrışma; her iki tüpte de renk sarı

her iki tüpte de renk değişikliği (-) ise; glukoz metabolize olmamıştır

# Oksidasyon-Fermentasyon Testi



# Nitrat Redüksiyon Testi

**Prensip-** Bazı m.o'ların nitratları nitritlere redükte edebilme yeteneğini ortaya koyar. Nitrat redüktaz enzimi nitratı nitrite indirger. Bazı m.o'lar bu reaksiyonu daha ileri basamaklara kadar götürerek  $\text{NH}_3$  ve  $\text{N}_2$  gazı oluşturur.

**Metot-** Nitratlı sıvı besi yerine bakterinin sıvı kültüründen ilave edilir. İnkubasyondan sonra 50.5 alfa naftil amin ve %0.8 sülfanilik asitten 5'er damla ilave edilir.

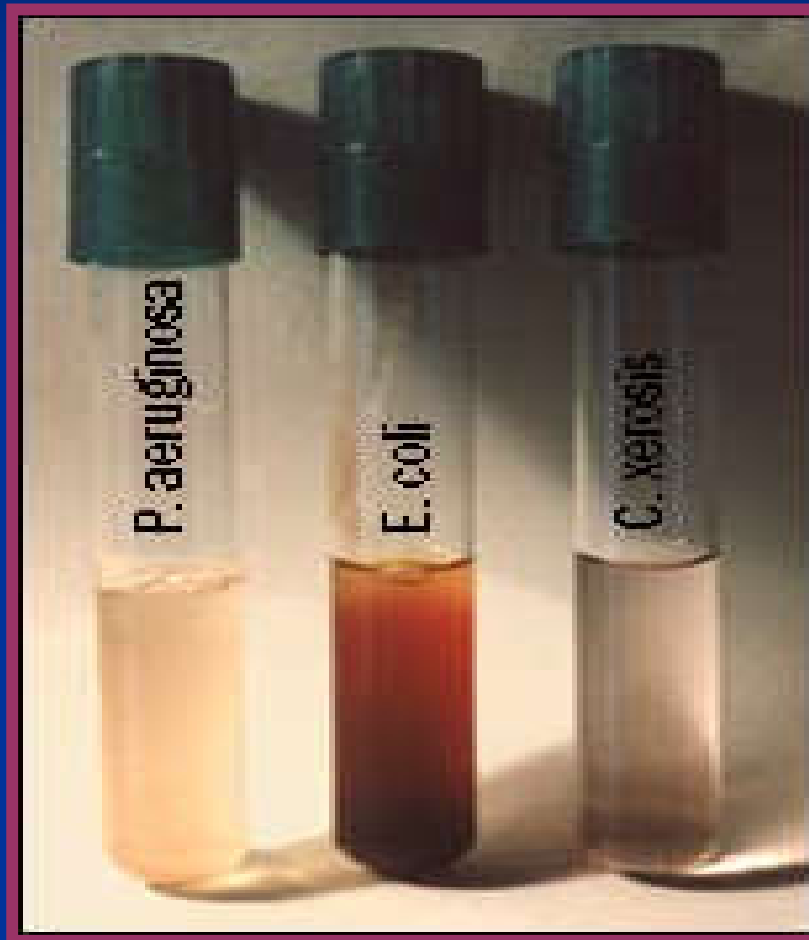
# Nitrat Redüksiyon Testi

**Değerlendirme-** Birkaç dk içinde kırmızı-k. rengi renk → nitratların nitritlere indirgendiğini gösterir. Renk yok ise;

a) Nitrat redükte olmamıştır

b) Nitrat redükte olmuş, ancak reaksiyon daha ileriye giderek amonyak ve azot oluşmuştur. Bu durumda kültüre az miktarda toz Zn ilave edilir. Eğer Zn ilavesinden sonra renk değişirse nitratlar nitritlere redükte olmamış demektir. Reaksiyon (-) kabul edilir. Oluşan amonyak Nessler ayıracı ile, nitrojen gazı ise Durrheim tüpü ile belirlenebilir.

# Nitrat Testi



# Üreaz Testi

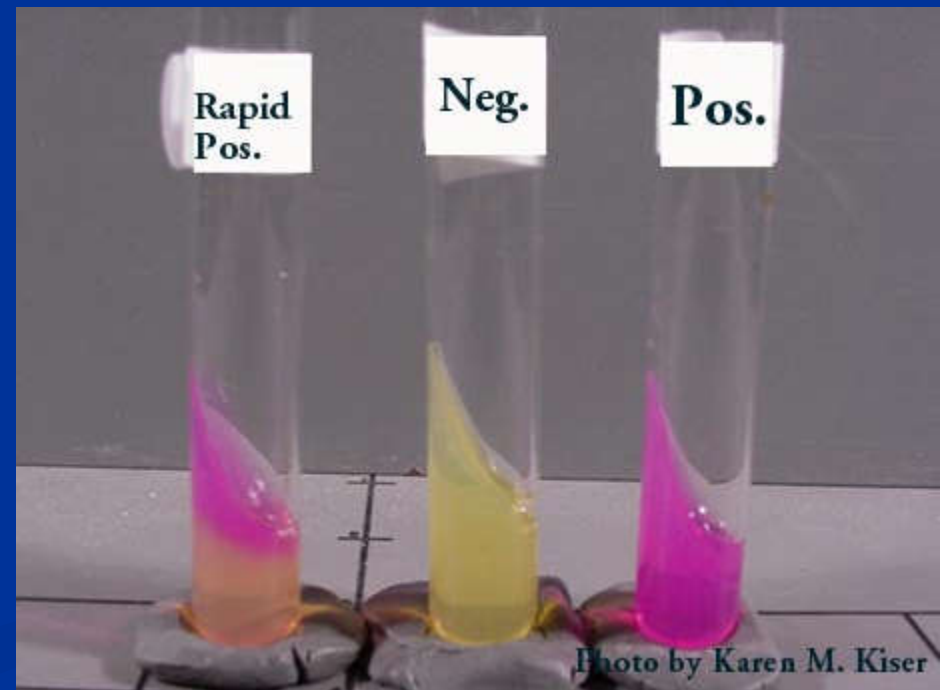
**Prensip-** M.o'ların üreyi hidrolize eden üreaz enzimini saptamak. Reaksiyon sonucu amonyak ve karbondioksit meydana gelir. Besi yerinde amonyak oluşması pH'yı yükseltir ve bu bir indikatör ile (Nessler ayıracı) ortaya konur.

**Metot-** Üreli ve indikatör içeren besiyerine bakteri ekilir ve inkube edilir.

**Değerlendirme-** Normalde portakal rengi olan besiyeri, amonyak oluşumu ile menekşe rengine döner. Christensen üreli besiyeri kullanılmışsa; renk kırmızı →(+)



# Üreaz Testi



Katkılarından dolayı  
Doç. Dr. Arzu FINDIK  
hocaya teşekkür ederim.