



BAKTERİLERDE ÜREME

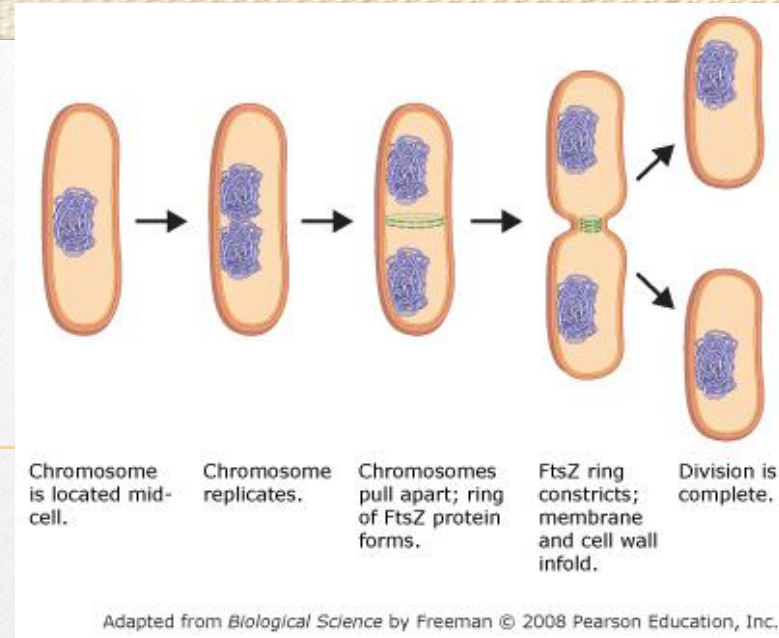
Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ

Sunum Hedefleri

- a. Bakterilerde hücre bölünmesinin nasıl olduğunu açıklayabilmeli
- b. Bakterilerin sıvı besiyerinde nasıl ürediklerini açıklayabilmeli
- c. Bakterilerin katı besiyerinde üreme şekillerini açıklayabilmeli
- d. Bakteri üremesine etki eden etkenleri ve çevre faktörlerini listeleyebilmeli ve açıklayabilmeli
- e. Bakterilerde üremenin nasıl ölçüldüğünü açıklayabilmeli

Bakterilerde Üreme

- ortadan ikiye bölünme
- basit bir aseksüel işlem
- her hücre boyut olarak artar
- hücresel yapılarda ve komponentlerde düzenli, logaritmik bir artış (2^n)
- bakteriyel DNA'nın replikasyonu
- bir septum oluşumu
- hücrenin iki kardeş hücreye bölünmesi



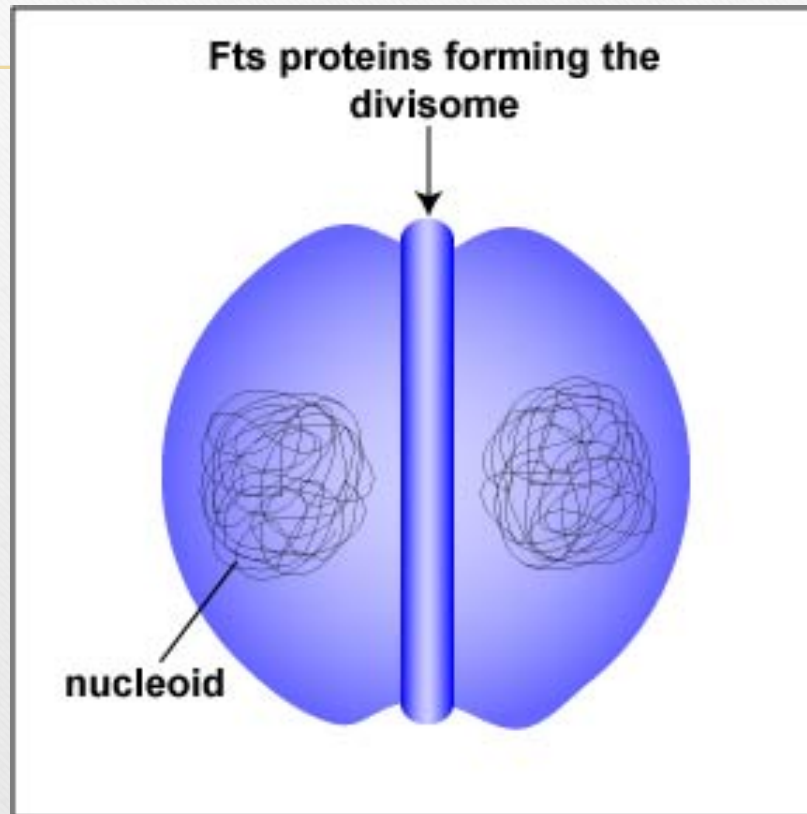
Bölünme Sırasında

- Sitoplazma rasgele ayrılır
- Komponentler iki kardeş hücreye ayrılır
- Replike olan DNA rasgele değil, *eşit şekilde*
- Peptidoglikan, sentezlenmiş peptidoglikanın sabitlenmiş yerleşimine uygun şekilde ayrılır

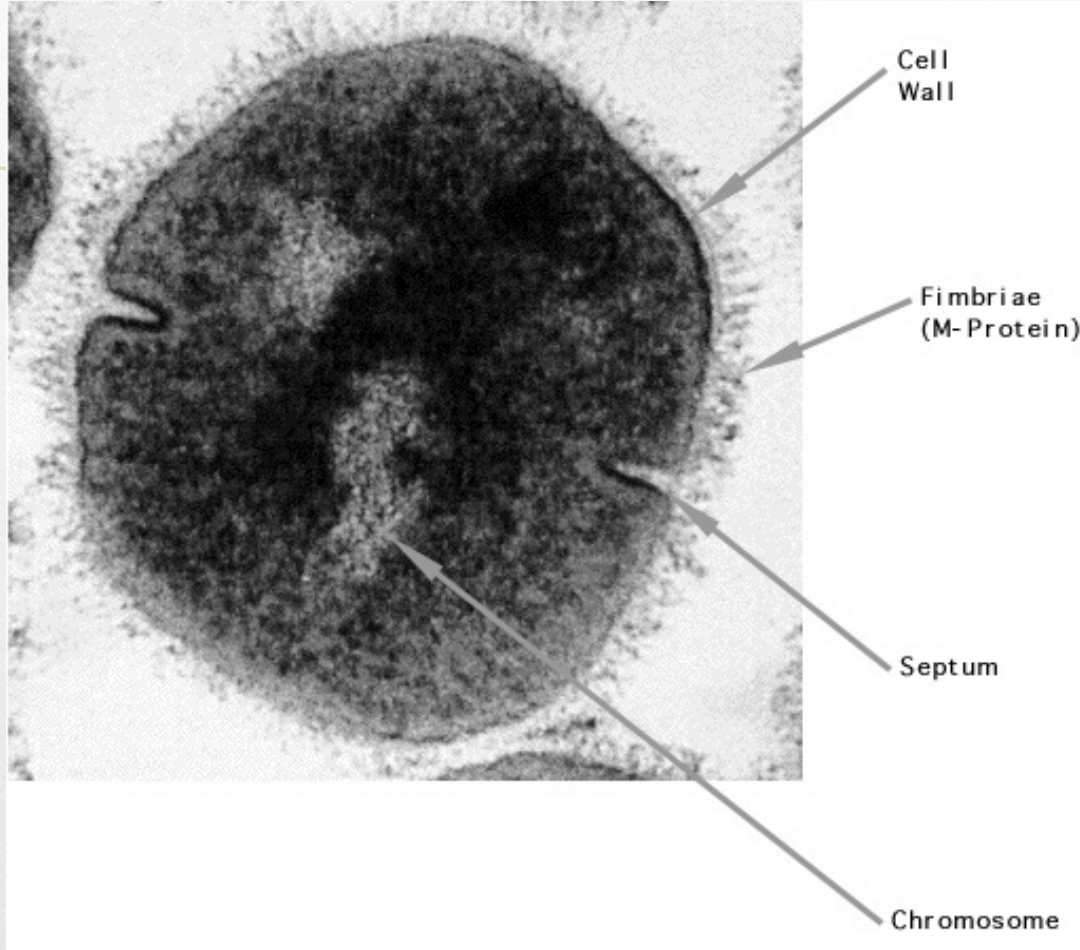
Fts Proteinleri ve Divizom

- Bakteri tam büyüklüğüne ulaşırken, yeni replike olan kromozomlar ayrılır
- Bakterinin merkezinde, **Fts proteinleri** olarak adlandırılan bir grup protein, hücre bölünme düzleminde bir halka oluşturmak üzere etkileşime girer
- Bu proteinler, “**divizom**” olarak bilinen hücre bölünme aparatını oluştururlar.
- Divizomdaki proteinlerin, peptidoglikanı ve yeni membranı sentezlediği düşünülmektedir

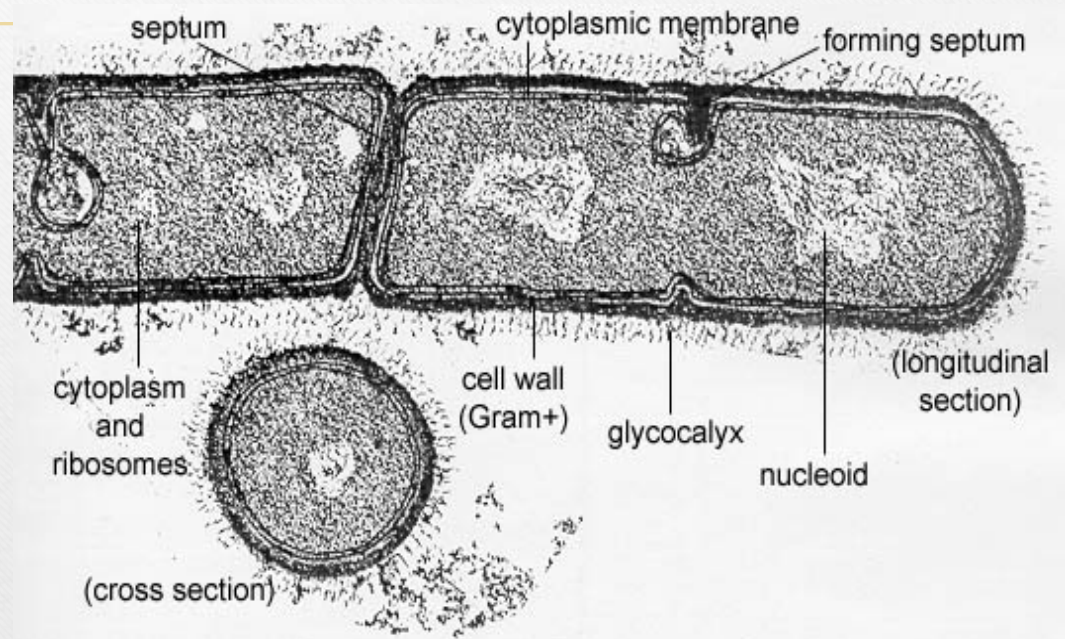
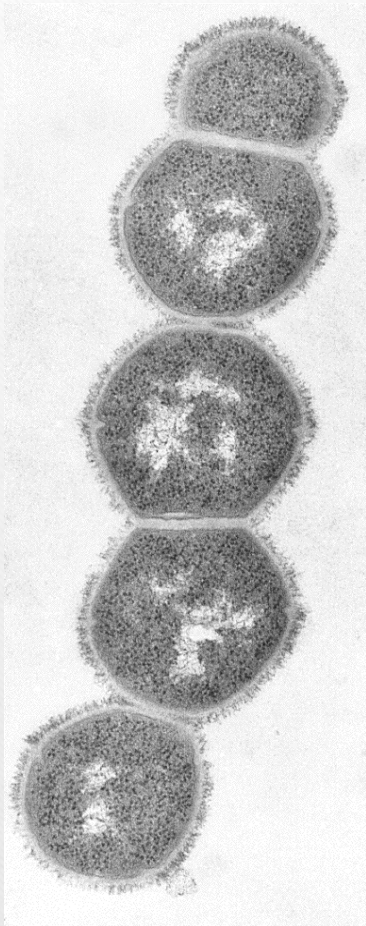
Divizom oluşumu



Bir Bakteri Bölünmesinin Elektron Mikroskopik Görünümü



Septum Oluşumu



Sıvı Ortamda Üreme

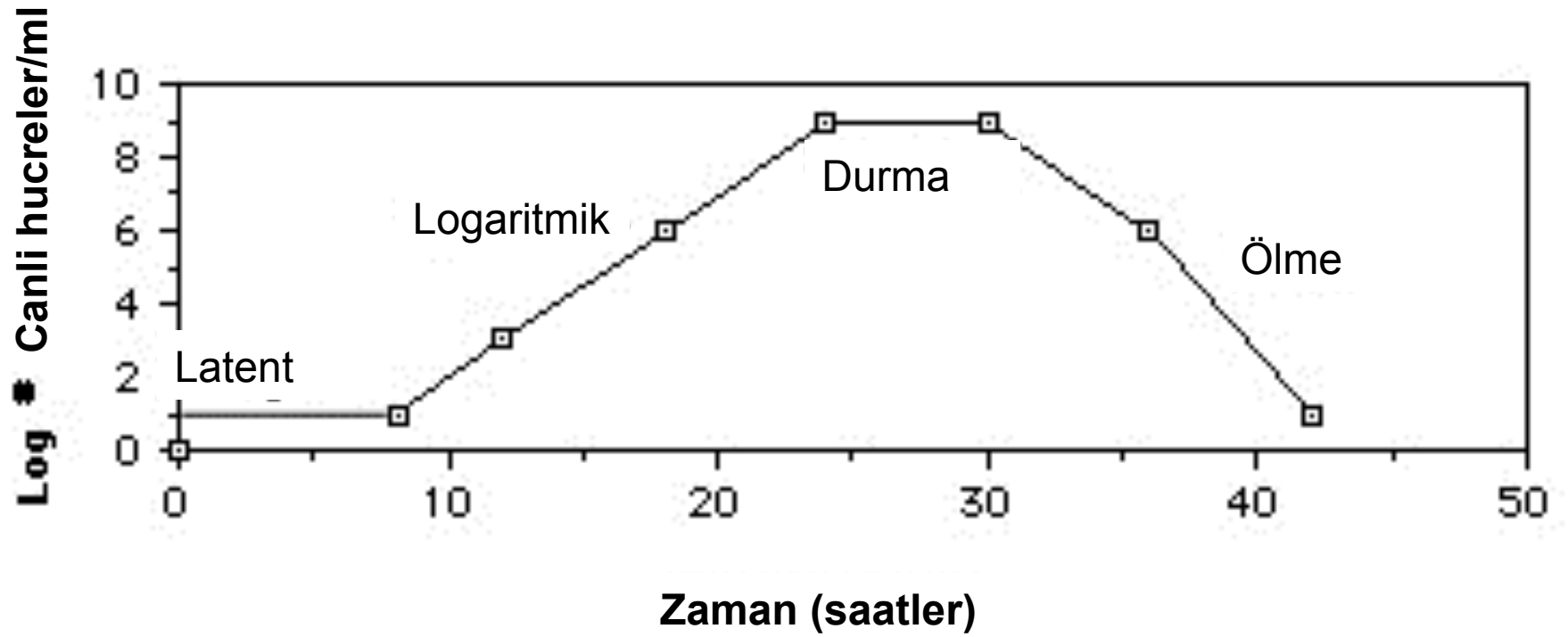
- optimal şartlarda sıvı besi yerinde, katı ortamlardakinden daha çabuk üreme
- üreme hızı mikroorganizma türüne özgü genetik bir özelliktir
- besi yeri bileşimi ve diğer çevresel koşullardan etkilenir

Sıvı Ortamda Üreme

Bakteriyel Üreme Eğrisi

- Laboratuvarı, uygun koşullar altında, üreyen bir bakteri populasyonu düzenli aralıklarla iki kat artar
- Logaritmik (1, 2, 4, 8,...)

Üreme Eğrisi



Bakterilerin Sıvı Besiyerinde Üreme Dönemleri

- **1. Latent Dönem:** Besiyerine yeni ekilen bakterilerde üreme gözlenmez.

Metabolizma artmıştır (gerekli enzimler ve diğer maddelerin sentezi).

Ortama adapte olan mikroorganizmalar belli bir latent dönemden sonra bölünerek üremeye başlarlar.

Bu devrenin uzunluğu belli koşullara bağlıdır

Sıvı Besiyerinde Üreme Dönemleri

- **2. Logaritmik Dönem**
- Bakteriler kendi türlerine özgü generasyon süresinde bölünerek çoğalırlar.
- Üreme eğrisi dik yönde artıştadır.
- Fizyolojik olarak çok aktif
- Fiziksel ve kimyasal etkenlere çok duyarlı

- Besiyerinde üreme sonucu gıda maddeleri azalır, metabolizma artıkları ve toksik maddeler birikir,

ozmotik basınç değişir, yüzey gerilimi değişir
- Sonuç olarak Üreme yavaşlar
- **3. Durma Dönemi** Bozulan optimal üreme koşulları sonucu Üreme Yavaşlar.
- Bakteri popülasyonu sayısal bir süre değişmez.
- Daha sonra azalmaya başlar.
- Bakterilerin bir kısmı bölünmeye devam eder.

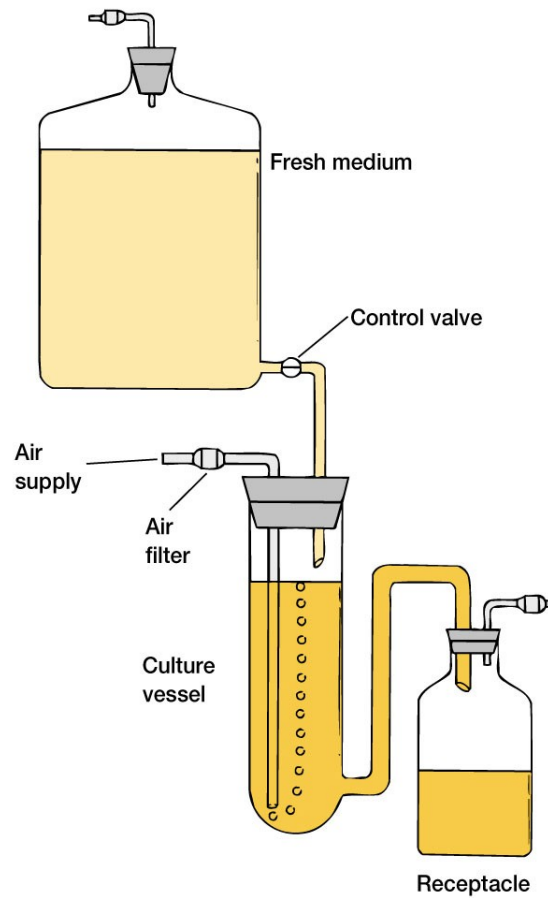
- Durma dönemi uzadığında
 - Mikroorganizmaların morfolojilerinde değişme (involusyon formları)
 - Kültürel özelliklerinde (R formlarının artması)
 - Fizyolojik özelliklerinde (boyama reaksiyonları, pigment oluşumu) değişiklikler oluşur
-
- **4. Ölme Dönemi** Bakterilerde ölümler başlar. Canlı bakteri sayısı azalır. Logaritmik tarzda ölümler gerçekleşir
 - Bütün bakteriler ölmeyebilir.
 - Canlılık eğrisi sıfıra ulaşmaz.

Mikroorganizmaları sürekli Üreme Döneminde tutabilmek amaçlı yöntem: **Kemostat**

Devamlı Hücre Kültürü

- Açık bir sistemde üreme
 - Devamlı besin sağlama
 - Atıkların devamlı uzaklaştırılması
- Sabit bir biyokütle konsantrasyonunda hücreleri log fazda tutma

Kemostat



Devamlı Hücre Kültürünün Çalışma Alanları

- Belli bir hızda üreyen logaritmik fazdaki hücreler için sabit kaynak
- Doğal ortamda bulunana benzer şekilde, çok düşük besin konsantrasyonunda mikrobiyel üreme çalışması
- Aquatik çevredekine benzer koşullar altında mikrobiyel etkileşimlerin çalışılması
- Gıda ve endüstriyel mikrobiyoloji alanlarında

- **Senkron Üreme**

- Saf kültürlerde normal koşullarda bir kısım bakteri bölünürken, diğerleri olgunlaşma dönemindedir.
-

- **Senkron Üremede**

- Bakterilerin üremeleri kısa bir süre durdurulur ve aynı anda bölünmeleri sağlanır.
- Örn: Bakteri kültürü düşük ısıda (15°C) 15-20 dakika tutulur. Birden 37°C 'de üremeye alınır.

KATI ORTAMLARDA ÜREME

- * Sıvı besiyerine göre daha sınırlı koşullar nedeniyle üreme kısıtlanır.
- * Gıda maddelerinin diffüzyonla ulaşması zorlaşır.
- * Hücre metabolik artıklarını ve toksik maddeleri dışarı atamaz.
- Üreyen diğer koloniler nedeniyle beslenme alanı daralır
- Kolonilerin alt kısmında bulunan bakterilerin basınçtan etkilenmemeleri için petri kutusu etüvde ters tutulur.

- İnkubasyon ısısı nedeniyle su kaybı olur.
- Etüv içerisine bir kap içerisinde su konulmalıdır.
- **Gözle görülebilir düzeyde koloniler türe özgü olarak farklı sürelerde oluşur.**
- *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* 24 saat
- *Salmonella Enteritidis* 48 saat
- *Brucella abortus*, Mycoplasmalar 4-5 gün
- *Mycobacterium tuberculosis* 15-20 gün

Bakteri kolonilerinin morfolojik ve fizyolojik özellikleri cinse, türe, besiyerine ve çevre şartlarına göre farklılık gösterir.

- Bakterilerin yoğun ürediği katı besiyerinde koloniler daha küçüktür. Birbirlerine bitişik durumda üreme kısıtlanır.

Jenerasyon Süresi

Bir bakteri hücresinin bölünmesi için veya bir bakteriyel hücre popülasyonunun ikiye katlanması için gerekli zaman aralığıdır

Jenerasyon süreleri bakteriler arasında değişiklik gösterir

12 dakika'dan 24 saate kadar, hatta daha uzun bile olabilir.

Tablo. Optimal koşullar altında bazı bakterilerin jenerasyon süreleri

Bakteri	Besi yeri	Jenerasyon süresi
<i>Escherichia coli</i>	Glukoz-tuzlar	17
<i>Bacillus megaterium</i>	Sukroz-tuzlar	25
<i>Streptococcus lactis</i>	Süt	26
<i>Streptococcus lactis</i>	Lactoz buyyon	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kalp infüzyon buyyon	27-30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Süt	66-87
<i>Rhizobium japonicum</i>	Mannitol-tuzlar-maya ekstrakt	344-461
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Sentetik	792-932
<i>Treponema pallidum</i>	Tavřan Testisleri	1980

Jenerasyon Süresinin Hesaplanması

G = jenerasyon süresi, T = saat veya dakika olarak zaman aralığı

A = başlangıçtaki bakteri sayısı, B = son bakteri sayısı

N = jenerasyon sayısı

$$N = (\log B - \log A) / \log 2 \longrightarrow (9 - 3 : 0.3 = 20)$$

$$N = T / G \longrightarrow (20 = 960 / G, G = 48)$$

$$T / G = (\log B - \log A) / \log 2$$

$$G = (T \times \log 2) / \log B - \log A$$

Katı Ortamda Üreme

- Uygun besiyeri, inkubasyon, koloni oluşumu
- Kolonilerin rengi, kokusu, yapısı, şekli, büyüklüğü, parlaklığı, besi yerine yapışma durumu, hemoliz yapma özelliği,vb birçok özellikleri mikroorganizmalar arasında değişiklik gösterir
Bu özellikler mikroorganizmanın cinsine ve türüne bağlı olduğu gibi çeşitli çevresel koşullara da bağlı olabilir.

Katı Ortamda Üreme

- koloni şekli ve büyüklüğü:
yuvarlak,düzensiz, nokta şeklinde (ince)
- sınırları: bütün (düzgün), dalgalı,loblu
- yüksekliği:konveks,düz, kabarık
- rengi: renk veya pigment, opak veya saydam,
parlak veya mat
- yapısı:nemli,mukoid,kuru

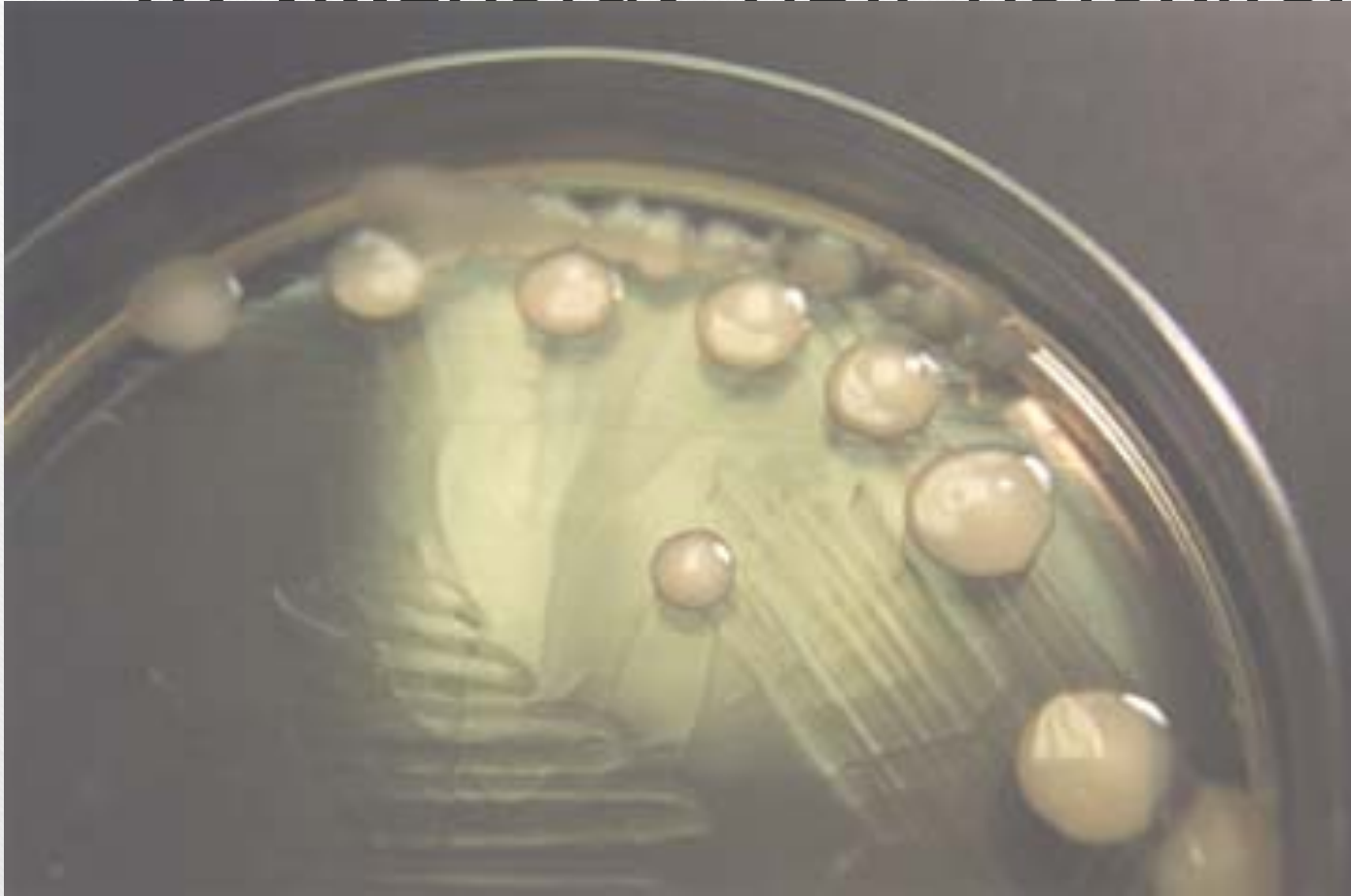
S (Smooth) tipli koloniler



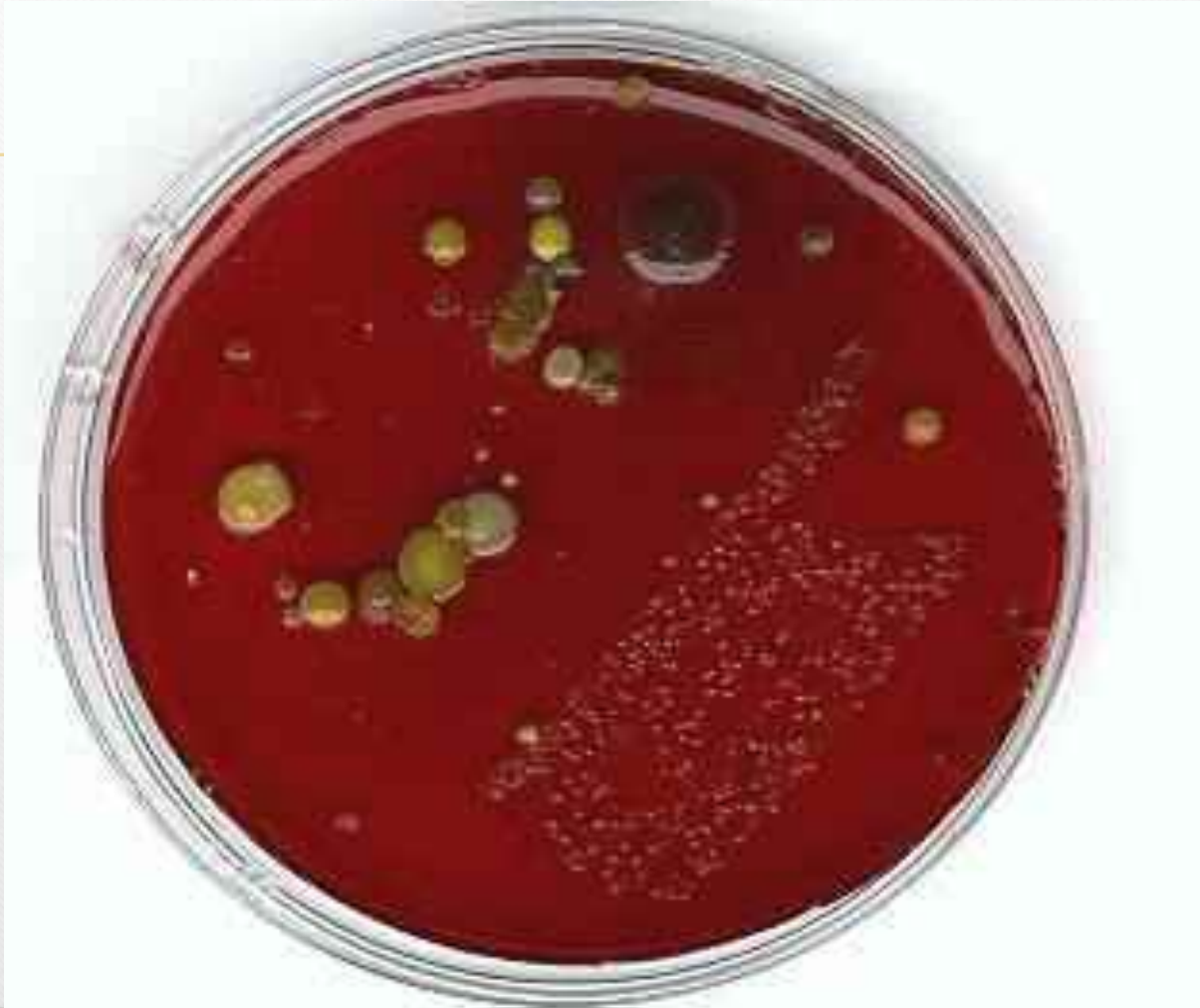
R (Rough) tipli koloniler



M (mukoid) tipli koloniler



Kanlı Agar'da çeşitli koloniler



Üremenin Ölçülmesi

- çeşitli parametreler kullanılmaktadır:
 - Hücre sayısındaki değişiklik
 - Kültürün türbidite (bulanıklık) veya ışık yaymasındaki değişiklik
 - Bir hücre komponentinin miktarındaki değişiklik

Üremenin Ölçülmesi

- Direkt Ölçümler

- *Direkt hücre sayımı*

- *Electronic counters*

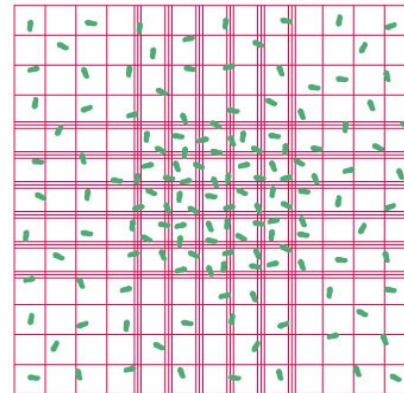
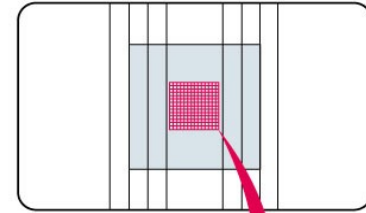
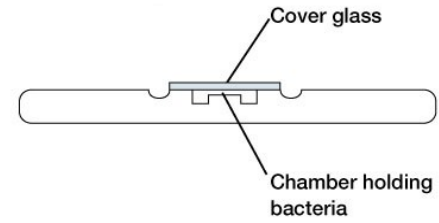
- canlı hücreleri ölülerden ayırt edemez
 - kullanımı hızlı ve kolaydır
 - büyük mikroorganizmalar ve kan hücrelerinin sayımı için elverişli, ancak prokaryotlar için değildir

Direkt Ölçümler

- *Plak sayımı*- Bakteri kolonileri, Qubec koloni sayıcı adı verilen özel bir lamda görüntülenebilir. Canlı hücre sayısını verir.
- *Sayma karesi (kamarası)*-
 - kolay, ucuz ve hızlı
 - hem ökaryotik hem de prokaryotik sayımı için kullanışlı
 - canlı hücreleri ölü hücrelerden ayırt edemez

Direkt Ölçümler

Sayma kamerası



Direkt Ölçümler

Membran filtrelerde direkt sayım

- hücreler özel membrandan filtre edilerek hücrelerin gözlenmesi için karanlık arka plan sağlanır
- hücreler fluoresans boyalarla boyanır
- bakteri sayımı için kullanışlıdır
- bazı boyalarla, canlı ve ölü hücreler ayrılabilir

Direkt Ölçümler

Canlı hücre sayımı

- *Plak yöntemleri*
 - canlı hücre sayımı
 - popülasyonun büyüklüğü, koloni oluşturan birim (colony forming unit-cfu) şeklinde ifade edilir

Direkt Ölçümler (Plak Metotları)

Uygun katı besi yeri üzerindeki populasyonun plak
sulandırmaları



kolonilerin sayılması



populasyondaki hücre sayısının hesaplanması

plak metotları...

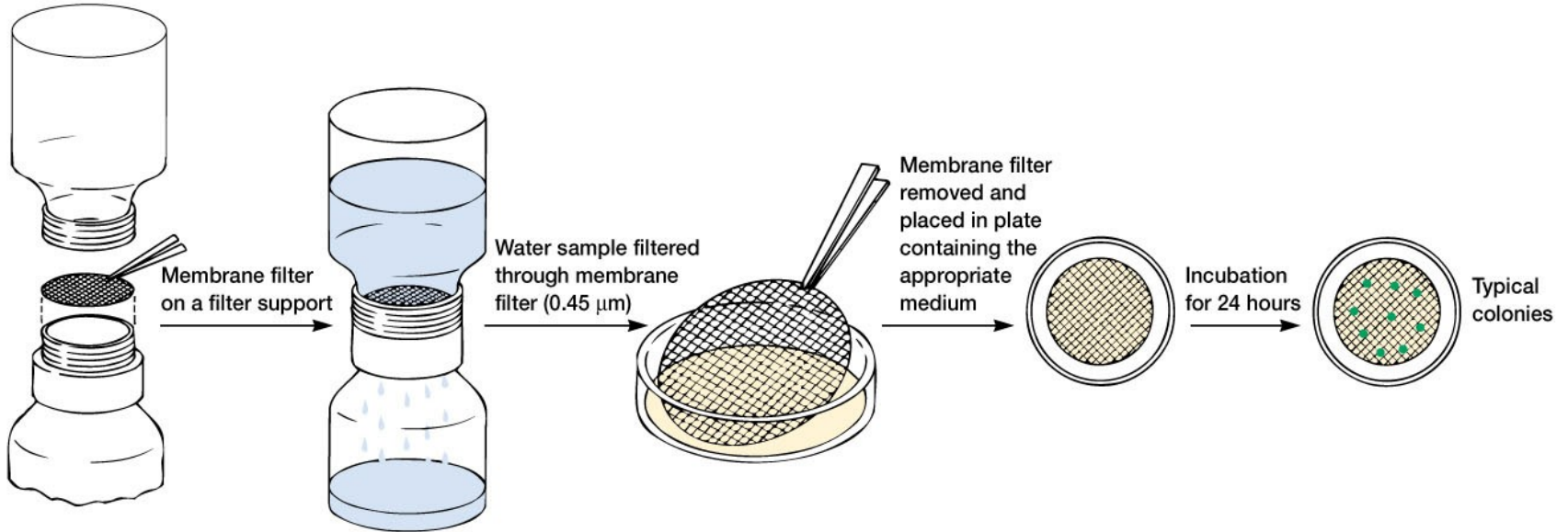
- basit ve duyarlıdır
- gıda, su ve topraktaki canlı mikroorganizma sayısının belirlenmesinde sıklıkla kullanılır
- hücreler kümeler halinde ise yanlış sayım olabilir

Direkt Ölçümler

Membran filtrasyon metotları

- Bilinen hacimde bir sıvı veya hava bir membran filtreden vakum ile filtre edilir.
- Filtre uygun bir katı besi yerine konur ve inkube edilir
- Gelişen kolonilerin sayısı, filtre edilen belli hacimdeki sıvıda bulunan canlı mikrobiyel hücre sayısıdır
- Bu teknik, bir örneğin (örn; yüzme havuzu, su örneği) konsantre edilmesinde önemlidir.
- Canlı hücre sayısını verir.

Direkt Ölçümler (Membran Filtrasyon Metodu)



İndirekt Ölçümler

hücre kütlesinin ölçümü ve sonra
mikroorganizma sayısının tahmini

Kuru Ağırlık-Yaş Ağırlık

- zaman alıcı olup fazla duyarlı değildir

Belirli Bir Hücre Unsurunun Miktarı

- örn., protein, DNA, ATP, veya klorofil
- her hücredeki substansların miktarı sabit olduğunda kullanışlıdır

İndirekt Ölçümler

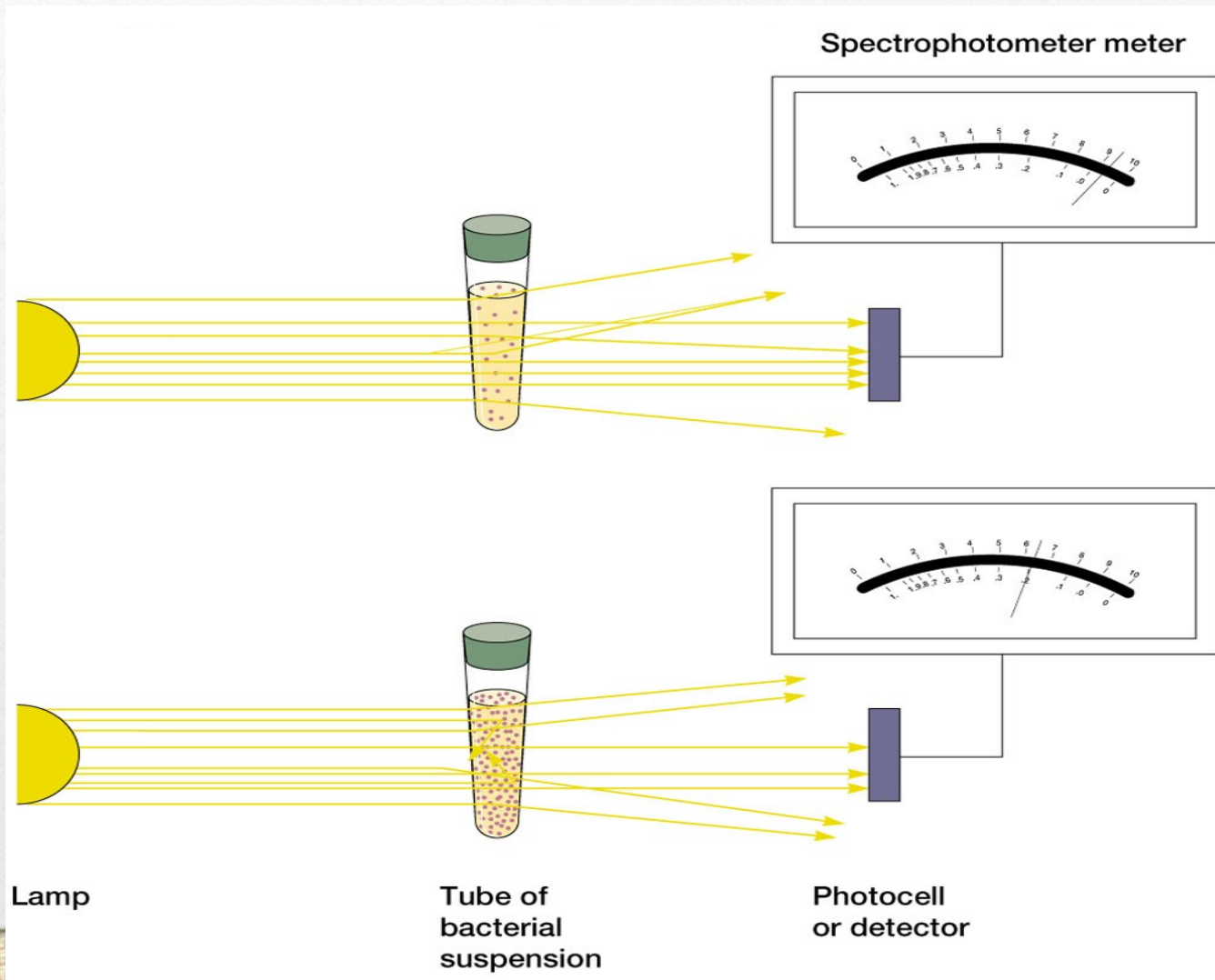
Turbidometrik Ölçümler (Spektrofotometrik Yöntem)

- hızlı, kolay ve duyarlı
- Spektrofotometre

Metabolik Aktivite

- 3 yol söz konusudur;
 - Kültürde üretilen, gazlar veya asitler gibi metabolik ürünlerin oluşum oranı
 - Oksijen veya glukoz gibi bir substratın kullanılma oranı
 - Bazı boyaların redüksiyon oranı, örn., metilen mavisi indirgendiğinde renksizleşir.

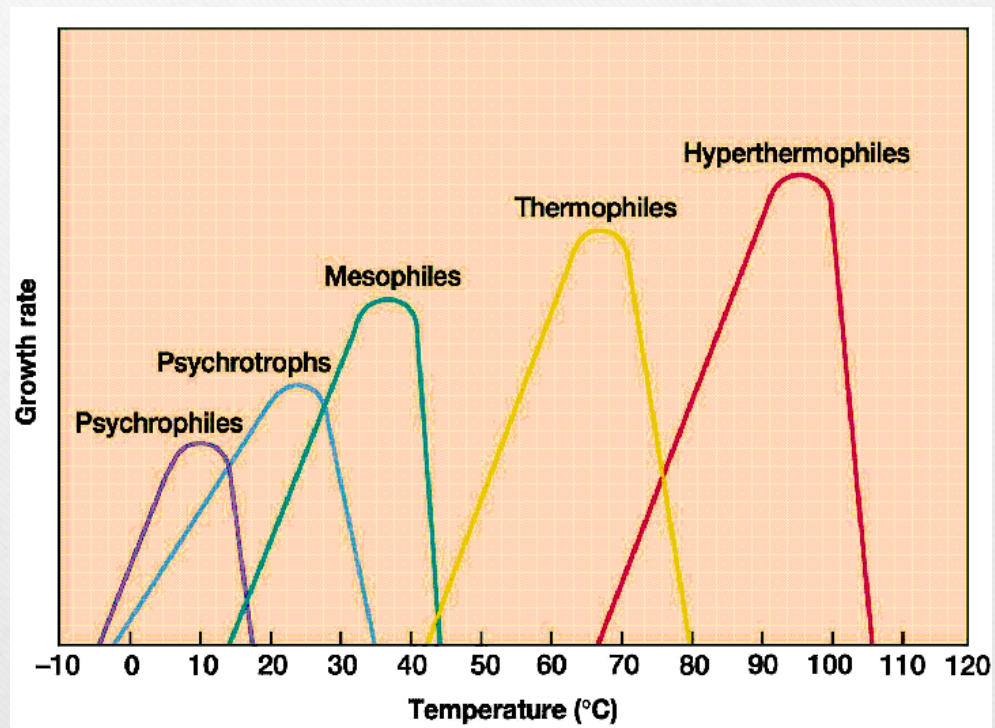
İndirekt Ölçümler (Spektrofotometre)



Üremeyi Etkileyen Faktörler

- Isı
- Oksijen
- pH
- Besin gereksinimleri
- Su
- Ozmotik basınç
- Basınç
- Radyasyon

ISI



T_o

Üreme Isıları (°C)

Grup	Minimum	Optimum	Maksimum	Yorum
Psikrofil	0'ın altında	10-15	20 altında	Grow best at relatively low T
Psychrotroph	0	15-30	25 üstünde	Able to grow at low T but prefer moderate T
Mesophile	10-15	30-40	45 üstünde	Most bacteria esp. those living in association with warm-blooded animals
Thermophile*	45	50-85	100 üstünde (kaynama)	Among all thermophiles is wide variation in optimum and maximum T

Tablo. Üreme ısılarına göre gruplandırılan mikroorganizmaların minimum, optimum ve maksimum üreme ısı dereceleri ve yorumu

Oksijen Konsantrasyonu

- **Obligat aeroblar**
 - fermentasyon yapamazlar, enerjilerini aerobik respirasyondan elde ederler.
- **Obligat anaeroblar**
 - oksidatif fosforilasyonu gerçekleştiremez, oksijenli ortamda ölürler
 - katalaz ,peroksidaz ve süperoksit dizmutaz gibi enzimleri yoktur

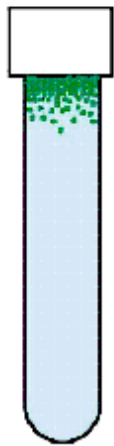
Oksijen Konsantrasyonu (Anaerobik Jar)



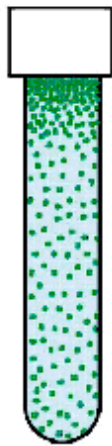
Oksijen Konsantrasyonu

- **Aerotolerantlar (oksijeni tolere edebilen)**
 - anaerobik respirasyona sahiptir, ancak oksijen varlığında canlı kalabilirler
- **Fakültatif anaeroblar**
 - hem fermentasyon hem de aerobik respirasyon gerçekleştirebilirler
- **Mikroaerofilik**
 - düşük oksijen konsantrasyonunda (2% - 10%) iyi bir şekilde ürerler ancak daha yüksek konsantrasyonlarda ölürler, enerjilerini aerobik respirasyondan elde ederler.

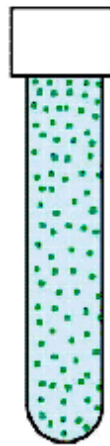
Oksijen Konsantrasyonu



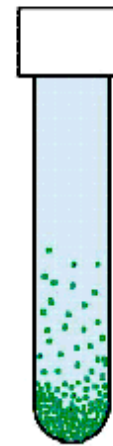
**Obligate
aerobe**



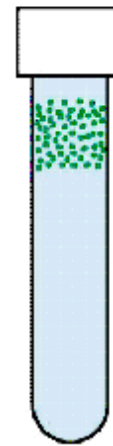
**Facultative
anaerobe**



**Aerotolerant
anaerobe**



**Strict
anaerobe**

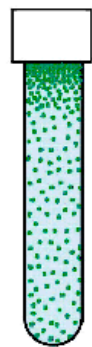


Microaerophile

Oksijen Konsantrasyonu



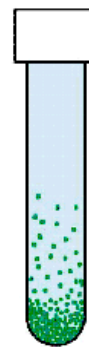
**Obligate
aerobe**



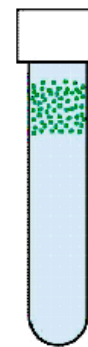
**Facultative
anaerobe**



**Aerotolerant
anaerobe**



**Strict
anaerobe**



Microaerophile

Enzyme content

**+ SOD
+ Catalase**

**+ SOD
+ Catalase**

**+ SOD
- Catalase**

**- SOD
- Catalase**

**+ SOD
+/- Catalase
(low levels)**

pH

- **asidofiller**

-
- optimum üreme pH 0 ve pH 5.5

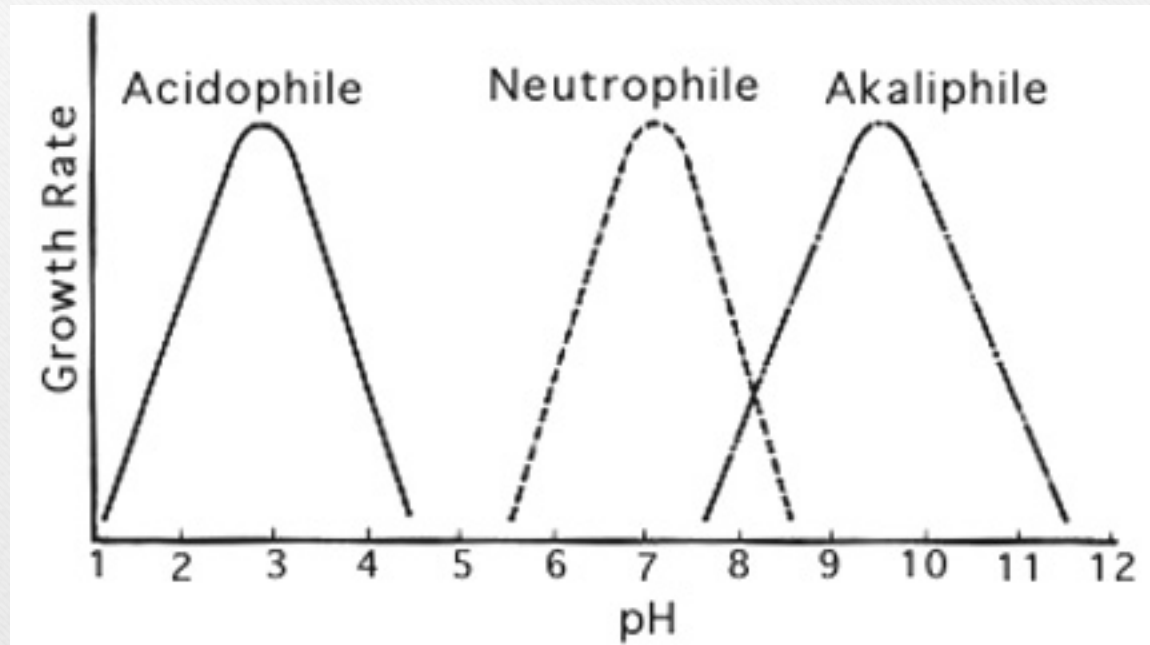
- **nötrofiller**

- optimum üreme pH 5.5 ve pH 7

- **alkalofiller**

- optimum üreme pH 8.5 ve pH 11.5

pH



pH

Table 8. Bazı prokaryotların üremeleri için minimum, maksimum ve optimum pH

Organizma	MinimumpH	OptimumpH	MaximumpH
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	0.5	2.0-2.8	4.0-6.0
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	1.0	2.0-3.0	5.0
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	2.0	4.0	6.0
<i>Zymomonas lindneri</i>	3.5	5.5-6.0	7.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4.0-4.6	5.8-6.6	6.8
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.2	7.0-7.5	9.3
<i>Escherichia coli</i>	4.4	6.0-7.0	9.0
<i>Clostridium sporogenes</i>	5.0-5.8	6.0-7.6	8.5-9.0
<i>Erwinia caratovora</i>	5.6	7.1	9.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.6	6.6-7.0	8.0
<i>Thiobacillus novellus</i>	5.7	7.0	9.0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6.5	7.8	8.3
<i>Nitrobacter</i> sp	6.6	7.6-8.6	10.0

Besin Gereksinimleri

- organik karbon, nitrojen, fosfor, sülfür ve metal iyonları (demir dahil) kaynaklar.
- mikroorganizmalar genellikle enerji kaynaklarına ve karbon kaynaklarına göre gruplandırılırlar

Besin Gereksinimleri

- **Enerji kaynağına göre**
 - **Fototroflar (Phototrophs)**- radiant enerji (ışık)
 - **Kemototroflar (Chemotrophs)**- kimyasal bileşiklerin oksidasyonu ve redüksiyonu
- **Karbon kaynağına göre**
 - **Ototroflar**- sadece karbondioksit
 - **Heterotrof**- organik karbonlar

Besin Gereksinimleri

Nutrisyonel modeller kombine edildiğinde, doğadaki tüm organizmalar 4 ayrı gruptan birinde yer alır:

- **Fotoototroflar;** enerji:ışık –karbon kaynağı:karbon dioksit

 - Fotosentetik bakteriler (yeşil sülfür bakterileri,mor sülfür bakterileri ve siyanobakteriler), algler ve yeşil bitkileri içerir. Fototroflar, karbon dioksit ve suyu, fotosentez yoluyla karbonhidratlar ve oksijene çevirirler.
- **Fotoheterotroflar;** enerji:ışık-karbon kaynağı:organik bileşikler(karbon dioksiti enerjiye çeviremez)
 - Yeşil nonsülfür bakterileri ve mor nonsülfür bakterilerini içerir.
- **Kemolitotroflar;** enerji:hidrojen sülfid, sülfür, amonyak, nitritler, hidrojen gazı veya demir gibi inorganik bileşikler-karbon kaynağı:karbon dioksiti
- **Kemoorganoheterotroflar;** her iki kaynak :organik bileşikler

Besin Gereksinimleri

Saprofitler, ölü organik maddeler üzerinde yaşarken, **parazitler**, besin maddelerini canlı konakçıdan karşılarlar

Bakterilerin çoğu ve tüm protozoonlar, mantarlar ve hayvanlar kemoorganoheterotrofturlar.

Besin Gereksinimleri

Nitrojen (azot) kaynağına göre

- azot amino asitler, DNA, RNA ve ATP gibi moleküllerin sentezi için gerekli
- organizmaya bağlı olarak, nitrojen, nitratlar, amonyak veya organik nitrojen bileşikleri, bir nitrojen kaynağı olarak kullanılabilir

Besin Gereksinimleri

Mineraller

- **Sülfür**

- sülfür içeren amino asitler ve bazı vitaminlerin sentezi için gereklidir.
- sülfatlar, hidrojen süfit veya sülfür içeren amino asitler, sülfür kaynağı

- **Fosfor**

- fosfolipidler, DNA, RNA ve ATP'nin sentezi için gerekli
- fosfat iyonları fosforun primer kaynakları

- **Potasyum, magnezyum ve kalsiyum**

- bazı enzimlerin fonksiyonu için ve ilave bazı fonksiyonlar için gerekli

- **Demir**

- bazı enzimlerin bir parçasıdır.

Besin Gereksinimleri

İz elementler

- çok az miktarlarda ihtiyaç duyulur
- genellikle enzim reaksiyonlarında **kofaktör** olarak görev yaparlar
- sodyum, çinko, bakır, molibden, manganez ve kobalt iyonları
- kofaktörler genellikle, enzim reaksiyonları süresince elektron vericileri veya alıcıları olarak görev yaparlar

Besin Gereksinimleri

Üreme faktörleri

- amino asitler, pürinler, primidinler ve vitaminler gibi üreme için gerekli ancak hücrenin kendisinin sentezleyemediği organik bileşikler
- fastidious

Su Aktivitesi (a_w)

- organizmaların kullanabileceği su miktarı
- ozmotik etki ile azalır
 - yüksek eriyik konsantrasyonu $\Rightarrow$ düşük a_w

Ozmotik Basınc

- **ozmotolerant**

- nispeten yüksek tuz konsantrasyonunda (10% üzerinde) üreyebilen organizmalara **ozmotolerant** denilmektedir.
- bazıları, stabilite ve aktivite için gerekli protein ve membranlara sahiptir

- **halofilik**

- üreme için yüksek tuz konsantrasyonu gerekir

Basınç

- **barotolerant organizmalar**
 - basınç artışından olumsuz olarak etkilenirler ancak nontolerant organizmalar kadar ciddi etkilenmezler
- **barofilik organizmalar**
 - yüksek (artırılmış) basınca ihtiyaç duyan veya daha hızlı üreyebilen organizmalar
 - Örn; okyanus, deniz ve göllerin diplerinde bulunan *B. submarinus* gibi bakteriler

Radyasyon

- **iyonizan radyasyon**

- **Elektromanyetik radyasyonlar**

- x ışınları ve gamma ışınları
 - mutasyonlar→ ölüm
 - birçok molekülün, DNA dahil, kimyasal yapısını bozarlar
 - hasar DNA tamir mekanizmaları ile onarılabilir

- **Partiküler radyasyonlar**

- Alfa ışınları
 - Beta ışınları
 - Gamma ışınları

Radyasyon

- iyonizan olmayan radyasyon
 - ultraviyole (UV) ışını
 - mutasyonlar→ ölüm
 - DNA'da timin dimerlerinin oluşumuna neden olur
 - DNA hasarı iki mekanizma ile onarılabilir
 - fotoreaktivasyon— ışık varlığında dimerler ayrılır
 - karanlık reaktivasyonu— karanlıkta dimerler kesilir ve yer değiştirir
 - infrared (kızıl altı)
 - ultrasonik (ses ötesi) dalgalar