GIDA VE KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

GENEL DOĞRULAMA TESTLERİ VE BOYAMA

UYGULANMASI KILAVUZU

(EK-6)

2022

Genel Doğrulama Testleri ve Boyama Yöntemlerinin Uygulanması Kılavuzu

1. AMAÇ ve KAPSAM

Bu talimatın amacı, mikrobiyoloji laboratuvarında mikroorganizmaları doğrulamak için kullanılan genel doğrulama testlerinin ve boyama yöntemlerinin nasıl uygulanacağının gösterilmesidir.

Genel bir talimat olduğundan spesifik doğrulamaları kapsamamaktadır**.**

2. SORUMLULUKLAR

Bu talimatın yürütülmesinden yetkili tüm laboratuvar personeli sorumludur.

3. TANIMLAR ve KISALTMALAR

MKB: Mikrobiyoloji Laboratuvarı

3.1. Biyokimyasal Testlerin Özellikleri ve Kullanım Yerleri

Biyokimyasal testler, bakterilerin enzim aktiviteleri, karbonhidratlardan ve aminoasitlerden yararlanma gibi biyolojik özelliklerinin test edilmesi ile yapılır.

Biyokimyasal testlerde temel prensip; bakterinin oluşturduğu reaksiyonların, ayıraçlar veya besiyerindeki indikatörler yardımıyla renk değişikliklerinin gözlenerek tanı konulmasıdır.

3.2. Biyokimyasal Testlerin Sınıflandırılması

- Renk değişimine ilişkin 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 ilişkin biyokimyasal testler; katalaz testi, eijkman testi ve karbonhidrat fermantasyon testi vb.
- Pıhtı oluşumuna ilişkin biyokimyasal testler; koagülaz testi, aglütinasyon testi ve jelatin hidroliz testi vb.

4. UYGULAMA

4.1. Genel Doğrulama Testleri

4.1.1. Oksidaz testi

Amaç

Bakteriyel elektron transport zincirinde görevli olan sitokrom C oksidaz enzimini üreten bakterileri tespit etmek için kullanılan bir testtir.

Prensip

Sitokrom C oksidaz enziminin tetrametil-p-fenilendiamin bileşiklerini okside ederek koyu mavi renkli indofenole dönüştürmesi prensibine dayanır.

Test 18/24 saatlik taze kültürle yapılır.

NOT: Oksidaz pozitif olan tüm bakteriler aerobik olup solunumda son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanır. Oksidaz negatif aeroblar elektron transportunda diğer oksidazlarını kullanarak solunum yapar.

NOT: Oksidaz testi % 5 koyun kanlı agar ve fermente olabilen şekerleri içermeyen besiyerlerinden alınan kolonilerde yapılmalıdır. Aksi takdirde fermentasyonla düşen pH ile oksidaz reaksiyonu inhibe olur ve yanlış negatif sonuç oluşabilir.

Neisseria spp., *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp. ve *Vibrio cholerae* oksidaz pozitif, *Enterobacteriaceae* türlerinde ise negatiftir.

Oksidaz testi için ticari olarak satılan hazır solüsyon veya stripler kullanılabilir. Ticari kit kullanılıyorsa, üreticinin talimatlarına uyulur.

- Oksidaz Solüsyonu

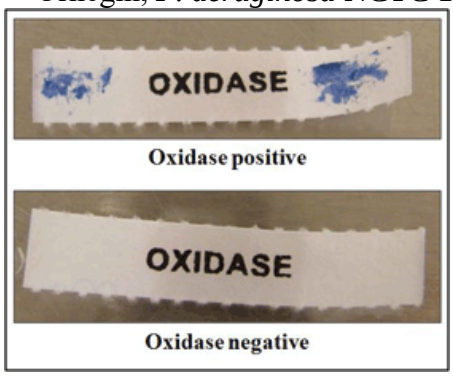
Formül:

Tetrametil-p-fenilendiamin dihİdroklorit	1 g
Su	100 mL

Kullanımdan hemen önce bileşim su içinde çözündürülerek kullanılır.

Testin Yapılışı

- Steril bir petri kutusu içine filtre kağıdı yerleştirilir ve üzerine 2- 3 damla oksidaz reaktifi damlatılır.
- Oksidaz ayracı damlatılan filtre kağıdı üzerine, cam çubuk veya öze ile şüpheli koloniden bir miktar alınarak sürülür.
- 10- 60 sn içinde açık mor, mor veya mavimsi renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilir.
- Sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerle doğrulanmalıdır.
- Örneğin, *P. aeruginosa* NCTC 10662 (pozitif kontrol), *E. coli* NCTC 9001 (negatif kontrol).



Resim 1. Oksidaz test sonucu

(**Kaynak:** http://microbeonline.com/wp-content/uploads/2012/12/Oxidase-test-result.gif)

4.1.2. Katalaz Testi

Amaç

Oksijen metabolitlerinin toksik formlarının (hidrojen peroksit) nötralizasyonunu sağlayan ve bazı bakteriler tarafından sentezlenen katalaz enzimi varlığını tespit etmek için yapılır.

Prensip

Bazı bakterilerde bulunan katalaz enzimi üzerine hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatıldığında oksijen (O_2) ve su (H_2O) açığa çıkması prensibine dayanır.

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{Katalaz}} 2\ H_2O + O_2$$

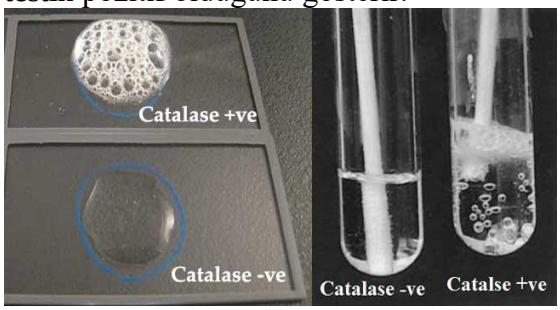
NOT: Katalaz enzimi, eritrositlerde de bulunduğundan; test edilecek bakteri kolonisi kan içermeyen bir besiyerinden alınmalıdır.

Staphylococcus spp., *Bacillus* spp. ve *Enterobacteriaceae* katalaz pozitif, *Streptococcus*, *Enterococcus* spp., aeorotolerant *Clostridium* spp. ise katalaz negatiftir.

Testin Yapılışı

Test; tüpte, lamda, tüp veya petri kutusundaki besiyerinde yapılabilir.

- Tüpte katalaz testi için; besiyerinden bakteri kolonisi özeyle alınarak temiz bir tüp içinde, bir damla serum fizyolojik ile süspanse edilir. Üzerine % 3'lük H_2O_2 damlatılır ve karıştırılır. Karışım içinde oksijenin açığa çıkmasıyla oluşan hava kabarcıkları testin pozitif olduğunu gösterir.
- Lamda katalaz testi için; besiyerinden bakteri kolonisi özeyle alınarak temiz bir lam üzerinde, bir damla distile su ile süspanse edilir. Üzerine % 3'lük H_2O_2 damlatılır ve karıştırılır. Karışım içinde oksijenin açığa çıkmasıyla oluşan hava kabarcıkları testin pozitif olduğunu gösterir.
- Tüp veya petri kutusundaki besiyerinde katalaz testi için; besiyerinde geliştirilen bakteri kültürü yüzeyine, % 3'lük H_2O_2'den 1 mL damlatılıp karıştırılır. Karışım içinde oluşan hava kabarcıkları testin pozitif olduğunu gösterir.



Resim 2. Katalaz test sonucu (+) ve (-)

Kaynak: http://www.microbiologyinfo.com/catalase-test-principle-uses-procedure-result-interpretation-with-precautions/

4.1.3. Koagulaz Testi

Koagulaz, özellikle patojen stafilokoklar tarafından üretilen ve fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştıran bir enzimdir. Serbest koagulaz ve bağlı koagulaz olmak üzere iki türü vardır.

Amaç

Bazı bakterilerin "bağlı olmayan-serbest koagulaz" enziminin tespit edilmesini amaçlar. Genellikle *Staphylococcus aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde kullanılır.

Prensip

Bakterilerin koagulaz enzimi ile plazmada bulunan fibrinojenin fibrine dönüşerek pıhtı oluşması esasına dayanır.

Fibrinojen $\xrightarrow{\text{Koagulaz}}$ Fibrin

Test, tüpte ve lamda olmak üzere iki şekilde yapılır. Tüpte koagülaz testi, lamda koagülaz testine göre daha güvenilir sonuç verdiği için tercih edilir.

➢ BEYİN-KALP İNFÜZYON BROTH (BHI)

Formül:

Hayvansal dokuların enzimatik parçalanma ürünü	10 g
Kurutulmuş buzağı beyni infüzyonu	12,5 g
Kurutulmuş sığır kalbi infüzyonu	5 g
Glukoz	2 g
Sodyum klorür	5 g
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) susuz	2,5 g
Su	1000 mL

Bileşenler veya kurutulmuş komple besiyeri gerekiyorsa ısıtarak suda çözündürülür. Sterilizasyondan sonra pH 7,4 ±0,2'ye ayarlanır. 5-10 mL olacak şekilde uygun kapasitede tüplere konulur. 121 ^{o}C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.

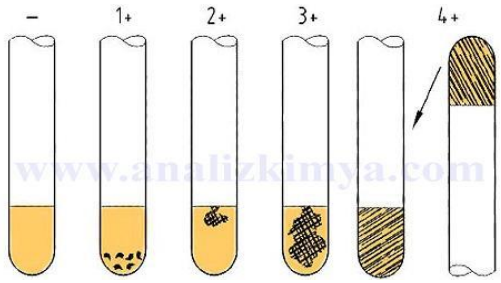
Testin Yapılışı

- Teste alınacak koloninin yüzeyinden, öze ile inokulum alınır ve beyin–kalp infüzyonu sıvı besiyeri (BHI) tüpüne aktarılır ve 35-37 °C'de 24 ±2 saat süre ile inkübe edilir.
- Steril hemoliz tüplerinde bulunan 0,3 mL tavşan plazması (imalatçı firma tarafından başka miktarlar bildirilmemişse) üzerine her kültürden 0,1 mL konulur ve 35- 37 °C'de inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyonun 4. saati ile 6. saati arasında plazmanın pıhtılaşıp pıhtılaşmadığı; tüp yana eğilerek incelenir.
- Pıhtılaşma yoksa inkübasyonun 24. saatinde inceleme tekrarlanır.
- Pıhtı hacminin işgal ettiği yer, sıvının orijinal hacminin yarısından fazla ise, koagulaz testinin pozitif olduğuna karar verilir.
- Negatif kontrol olarak her plazma kütlesi için tavşan plazmasının tavsiye edilen miktarı üzerine 0,1 mL steril beyin–kalp infüzyonu sıvı besiyeri ilave edilir ve aşılama yapılmadan inkübasyona terk edilir. Deney doğru yapıldıysa, kontrol plazma pıhtılaşmaya dair bir işaret göstermeyecektir.



Resim 3. Koagulaz testi

Kaynak: http://microbeonline.com/diagnostic-tests-biochemical-tests-coagulase-test/



Resim 4. Koagulaz testinde farklı derecelerde pıhtının oluşumu (3 ve 4 pozitif)

Lamda Koagülaz Testi

Amaç, bakterinin yüzeyinde bulunan bağlı koagülazı (clumping factor-kümeleştici faktörü) tespit etmektir.

Testin Yapılışı

- Lam üzerine bir damla sitratlı tavşan plazması konur.
- Üzerine özeyle şüpheli bakteri kolonisinden alınıp karıştırılır.
- 10-30 saniye beklenir.
- Pıhtılaşma olup olmadığına bakılır. Pıhtılaşma oluşması pozitif, oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilir.

4.1.4. Hemoliz Testi

Eritrositlerin parçalanması hemolizin enzimi ile olur.

Amaç

Bakterilerin kanlı agarda oluşturdukları hemolizin tipi ile identifikasyonunu sağlamak için yapılır.

Prensip

Bazı bakterilerin kandaki hemoglobini hemoliz etme derecesinin tespit edilmesi esasına dayanır.

Testin Yapılışı

- İncelenecek bakteri kolonisinden öze ile alınıp % 5 koyun kanlı agara ekim yapılır.
- Aynı anda pozitif ve negatif kontrol kültürlerinden de benzer tarzda ekim yapılır.
- Deney suşları ve kontroller, 37 °C'de 24 ±2 saat inkübe edilir.
- Kanlı agarda koloniler etrafında oluşan hemoliz zonları, aşağıdaki hemoliz çeşitleri göz önünde bulundurularak değerlendirilir.

Beta (β) hemoliz: Koloni etrafındaki eritrositler tamamen parçalandığında **tam hemoliz** oluşur. Bakteri kolonisinin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve tamamen şeffaf bir halka ile karakterizedir.

Alfa (α) hemoliz: Koloni etrafındaki eritrositler tam olarak parçalanmadığında **tam olmayan hemoliz** oluşur. Koloni etrafında demirli bileşiklerin oluşturduğu yeşil renkli, tam şeffaf olmayan bir halka şeklinde görülür.

NOT: *C. perfringens* çift hemoliz alanı oluşturur (iç dar alanda θ toksinin oluşturduğu tam lizis, dış geniş alanda α toksinin oluşturduğu kısmi hemoliz alanı görülür).

Gama (γ) hemoliz: Koloni etrafındaki eritrositler parçalanmadığında hemoliz olmaz ve test, negatif olarak değerlendirilir. Bu gruptaki bakteriler, hemolizin enzimine sahip değildir.

4.1.5. CAMP Testi

CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson) testinin ismi, bu testi bulan bilim adamlarının ilk harfleri alınarak oluşturulmuştur.

Amaç

B grubu streptokokların (ör: *Streptococcus agalactia*) oluşturdukları CAMP faktörü ile identifiye edilmesini sağlar. Ayrıca *Listeria* spp. identifikasyonunda da kullanılır.

Prensip

B grubu streptokoklar tarafından sentezlenen CAMP faktör ve *Staphylococcus aureus*'un çoğu suşu tarafından sentezlenen beta hemolizin kesiştiği bölgede artan sinerjistik hemoliz alanının tespiti esasına dayanır.

CAMP Reaksiyonu Suşları

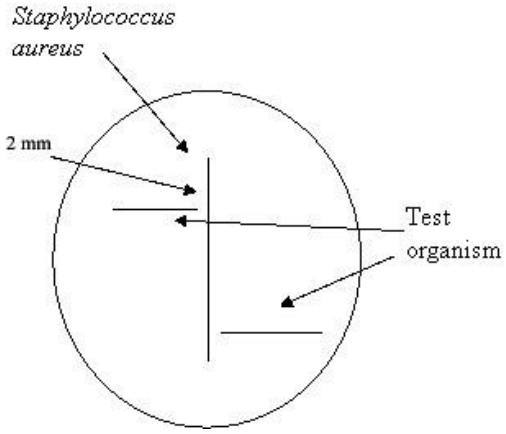
CAMP deneyinin yapılması için *Staphylococcus aureus*'un bir β-hemolitik suşu (ör; ATCC 25923) ve bir *Rhodococcus equi* suşuna (ör: ATCC 6939) ihtiyaç duyulur.

S. aureus, R. equi, L. monocytogenes, L. innowa ve *L. ivanovii* stok kültürlerini sürdürmek için, bu suşlar eğik Tripton Soya Yeast Extract Agar'a inoküle edilir. 35 °C veya 37 °C'de 24- 28 saat veya üreme oluncaya kadar inkübe edilir ve 3 °C'de ±2°C'de muhafaza edilir. Kültürler ayda en az bir defa pasajlanır.

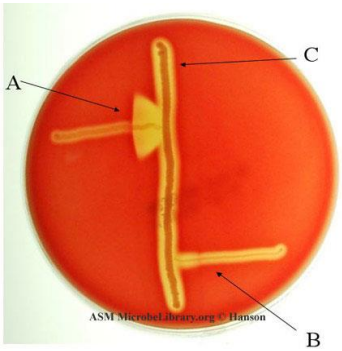
Testin Yapılışı

B grubu Streptokokların Tespiti için CAMP Testi

- % 5 koyun kanlı agarda B grubu streptokok olduğundan şüphelenilen test organizması beta hemoliz oluşturan *S. aureus*'a 2 mm kalacak mesafede ve dik olacak şekilde çizme ekim yapılır. 35 C'de 24 saat inkübasyondan sonra değerlendirme yapılır. Yarım ay şeklinde oluşan hemoliz alanı CAMP testi pozitif olarak değerlendirilir.



Resim:5 CAMP Testi

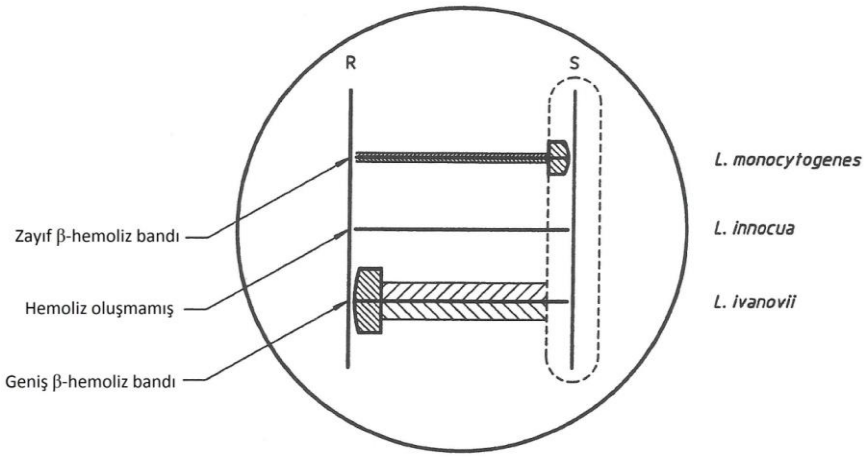


Resim 6: *S. agalactia*'nın tanımlanmasında kullanılan CAMP testi: A: *Streptococcus* (grup B); CAMP pozitif, B: *Streptococcus pyogenes* (*g*roup A); CAMP negatif, C: *Staphylococcus aureus.*

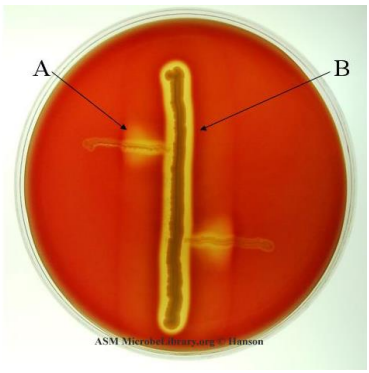
Kaynak: American Society for Microbiology, Created: Monday, 09 October 2006 Author • Anne Hanson

<u>*Listeria* spp Tespitinde CAMP Testi</u>

- *S.* aureus ve *Rhodococcus equi* kültürleri koyun kanlı agara, birbirine paralel ve zıt kutuplarda olacak şekilde, çizgi ekim tarzında bir hat boyunca ekilir. İnokulum ince ve düz olmalıdır. Bunun için inokülasyon özesi agara dik açı yapacak şekilde tutulur.
- İzole edilmiş deney suşları benzer şekilde dik açıyla ve çizgi ekim tarzında ekilir.
- Deney kültürü ile *S. aureus* ve *R. equi* kültürleri birbirine temas etmemeli, ancak 1-2 mm ayrı olacak şekilde çok yakın olmalıdır.
- Birkaç deney suşu aynı plağa ekilebilir. Aynı zamanda *L. monocytogenes*, *L. innocua* ve *L. ivanovii* kontrol kültürleri de çizgi ekim tarzında ekilir. Kanlı agar kullanılmışsa plaklar 37 °C'de 18-24 saat, çift katlı plaklar kullanılmışsa 37 °C'de 12-18 saat inkübe edilir.
- *S. aureus* ve *R. equi* kültürleri ile deney kültürlerinin kesiştiği noktada β hemoliz zonunun artması, pozitif bir reaksiyon olarak kabul edilir.
- *R. equi* ile pozitif bir reaksiyon; geniş (5-10 mm) ve ok başı şeklinde bir hemoliz olarak görülür. *R. equi* kültürü ile deney suşlarının kesiştiği noktada yaklaşık 1 mm genişliğinde küçük ve zayıf bir hemoliz zonu gelişmişse, reaksiyon negatif olarak kabul edilir.
- *S. aureus* ile pozitif bir reaksiyon; *S. aureus* kültürünün üremesinden kaynaklanan zayıf bir hemoliz zonu içerisinde yaklaşık 2 mm genişliğinde artmış, küçük bir hemoliz zonu görülür. *S. aureus* ve *L. monocytogenes* bölgesinde daha büyük bir hemoliz zonu oluşmaz.
- Burada *S. aureus,* içerdiği sfingomiyelin-fosfohidrolaz enzimi ile eritrositlerin membranında bulunan sfingomiyelinleri çözmekte ancak eritrositleri lize etmemektedir. Bu şekilde eritrositler *Listeria* suşlarından β hemolitik olan *L. monocytogenes'in* ve *L. seeligeri'nin* işini kolaylaştırır ve şuşlar hemolizinleriyle eritrositleri kolayca parçalar. *L. ivonovii* ise benzer yardımı *R. equi'*den alır. Böylece yardım alınan bakteri tarafından kuvvetli bir hemoliz görülür.



Resim 7: *L. monocytogenes* tespitinde kullanılan CAMP testi: R: *R. equi*, S: *S. aureus*



Resim 8: Kanlı agarda CAMP Testi A: *Listeria monocytogenes;* CAMP pozitif, B: *Staphylococcus aureus.*

Kaynak: American Society for Microbiology, Created: Monday, 09 October 2006 Author • Anne Hanson

4.1.6. Reverse CAMP Test

Amaç

C. perfringens'in tanımlanması amacıyla yapılan bir testtir.

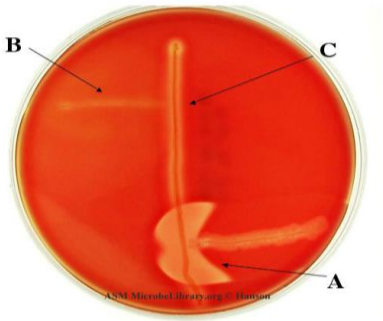
Prensip

Kanlı agarda S*treptococcus agalactiae* (group B) ve *Clostridium perfringens* birbirine dik açıyla yakın mesafede çizgi ekim yapıldığında oluşan sinerjistik hemoliz alanı ile ok başı veya papyon şeklinde hemoliz alanı tespiti esasına dayanır.

Testin Yapılışı

- S. *agalactiae* (group B) suşu % 5 koyun kanlı ağara kalın bir çizgi şeklinde sürülür.
- *C. perfringens* olduğundan şüphelenilen koloni steril öze yardımıyla alınarak önceden çizilen S. *agalactiae* ekimi ile arada 1-2 mm boşluk kalacak şekilde dik bir çizgi şeklinde ekim yapılır.
- Ekim yapılan kanlı agar anaerobik ortam sağlanarak 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılır.

• S. *agalactiae* ile *C.m perfringens* arasında oluşan ok başı veya papyon şeklindeki sinerjistik hemoliz alanı reverse CAMP testinin pozitif olduğunu gösterir.



Resim 9: *C. perfringens*'in identifikasyonunda kullanılan reverse CAMP testi. A: *C. perfringens*; CAMP testi pozitif, B: *C. septicum*; CAMP testi negatif, C: *Streptococcus agalactiae* (grup B).

Kaynak: American Society for Microbiology, Created: Monday, 09 October 2006 Author • Anne Hanson

4.1.7. IMViC Testleri

IMViC testi; indol, metil kırmızısı, Voges- Proskauer ve sitrat, testlerinin ilk harflerinden oluşur. Vi'deki "i" küçük harf olarak yazılır ve sadece okuma kolaylığı sağlar. Bu testler, enterik bakterilerin ayrımı için kullanılır.

Mikroorganizmaya özgü besiyerinde üreyen tipik kolonilerinden identifikasyon için tek koloni alınarak Nutrient Agar'a ekim yapılır ve 35 °C'de 24±2 saat inkübasyonla zenginleştirme yapılır. Zenginleştirilen kolonilere IMViC testi uygulanır:

4.1.7.1. İndol testi

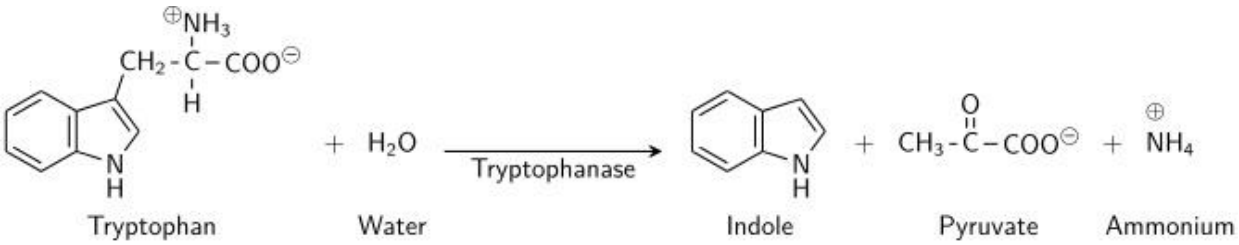
Amaç

İndol testi, bakterilerin bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılır.

NOT: *Escherichia coli*'de indol pozitif (+), *Salmonella* Typhi'de negatif (-)'tir.

Prensip

Bakterilerde bulunan triptofanaz enzimiyle triptofanın parçalanıp hidrolize olması sonucu oluşan nitrojenli bir bileşik olan indolün aldehitlerle reaksiyona girdiğinde, kırmızı renkli bir ürün oluşturmasıdır.



- **İNDOL BESİYERİ (TRYPTONE BROTH)**

Formül:

Tripton	10 g
NaCl	5 g
DL-Tryptophan	1 g
Distile su	1000 mL

Tartılan besiyeri içeriği ısıtılarak çözündürülür. pH 7,5 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 5 mL olarak tüplere bölünür. 121 °C'de 15 dakika otoklav edilir.

- **KOVAKS AYIRACI**

Formül:

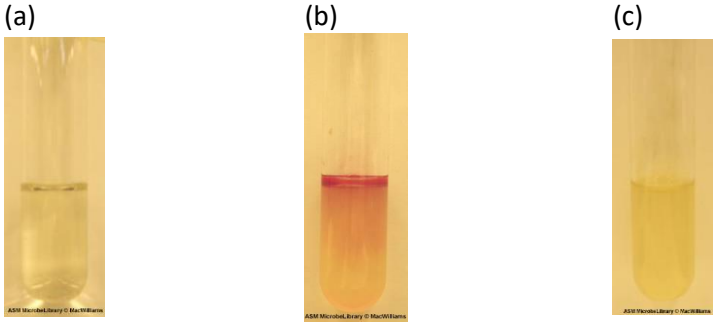
4-dimetilaminobenzaldehit	5 g
HCl (ρ=1,18g/mL veya 1,19 g/mL)	25 mL
2-metilbutan-2-ol	75 mL

4-dimetilaminobenzaldehit, gerekirse 45-47°C'ye ayarlı su banyosunda ısıtılarak, alkolde çözündürülür. Oda sıcaklığına kadar soğutulur ve hidroklorik asit ilave edilir. Karışım, kahverengi bir cam şişede ışıktan korunur ve 3 ±2 °C'de muhafaza edilir. Reaktifin rengi, açık sarıdan açık kahverengiye kadar olmalı ve çökelti içermemelidir.

Testin Yapılışı

Nutrient agardaki şüpheli koloni 5 mL tripton-triptofan besiyeri içeren bir tüpe inoküle edilir ve 37±1°C'de 24±3 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra 1 mL Kovaks reaktifi ilave edilir. Tüpün yüzey kısmında kırmızı bir halkanın oluşumu pozitif reaksiyonu, sarı-kahverengi bir halkanın oluşumu negatif reaksiyonu gösterir.

(a) (b) (c)



Resim 10: İndol testi a) İnokulasyon yapılmamış triptofan besiyeri, b) Pozitif indol testi, *Escherichia coli* c) Negatif indol testi, *Enterobacter aerogenes*

Kaynak: American Society for Microbiology, Created: Tuesday, 08 December 2009 Author • Maria P. MacWilliams

4.1.7.2. Metil-red (MR) ve Voges-Proskauer (VP) Testi

Bu testler, *E. coli* ve *Salmonella*'nın doğrulanmasında kullanılır.

- **MR-VP BROTH**

Pepton	7 g
Glukoz	5 g
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	5 g
Distile su	1000 mL

Tartılan hazır besiyeri içeriği distile su ile ısıtılarak çözündürülür. 10 mL olarak tüplere bölünür.121 °C'de 15 dakika steril edilir. pH 6,9 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır.

Testlerin Yapılışı

Karakteristik koloniler öze ile MR-VP Broth besiyerine inokule edilir. 35 °C'de 48 ±2 saat inkübe edilir. İnkübe edilen sıvı besiyerinden alınan bir miktar ile MR testi ve 1 mL ile VP testi uygulanır.

4.1.7.2.1. Metil Kırmızısı Testi

Prensip

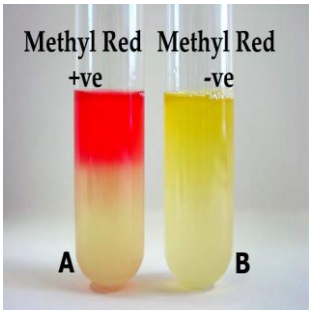
Metil kırmızısı testi, besiyerindeki bakterilerin glukozu fermente edip organik asit oluşturmasıyla pH indikatörü olan metil red ile ortam pH'sının 4.4'ün altına düştüğünde kırmızı renk oluşması esasına dayanır.

MR Testi Yapılışı

Metil Kırmızısı Solüsyonu

% 0,04'lük metil kırmızısı kullanılır (0,2 g metil kırmızısı 300 mL % 95'lik etil alkol içinde eritilir). Distile su ile 500 mL'ye tamamlanır.

Kontrol ve kültür konmuş tüplere 5-6 damla metil-red damlatılır ve tüpler çalkalanır. Parlak kırmızı renk oluşursa test pozitiftir. Metil kırmızısı ayıracı pH 6.0 ve üzerinde sarı renk, pH 4.4 ve altında ise kırmızı renk verir. Kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.



Resim 11: MR test sonuçları

A. MR pozitif: ör; *E. coli*, *Yersinia* spp. B. MR negatif: *Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae*

Kaynak: http://www.microbiologyinfo.com/methyl-red-mr-test-principle-procedure-and-result-interpretation/

4.1.7.2.2. Voges-Proskauer (VP) testi

Prensip

Bakterilerin glukoz fermentasyonu sonucunda asetilmetil karbinol üretimi tespiti esasına dayanır. Ortamda asetil metil karbinol oluşmuşsa alfa naftol, güçlü bir alkali olan KOH ve atmosferik oksijen ile diasetile dönüşerek pembeden kırmızıya renk değişiminin tespiti esasına dayanır.

Testin Yapılışı

- VP 1 ve VP 2 ayraçları hazırlanır (taze olmalıdır).

➢ VP 1 Ayracı: Alfa Naftol Solüsyonu

Formül:

Alfa naftol	5 g
Saf alkol	100 mL

NOT: Bu solüsyon saman sarısı renginde olmalıdır.

➢ **VP 2 Ayracı: KOH Solüsyonu**

Formül:

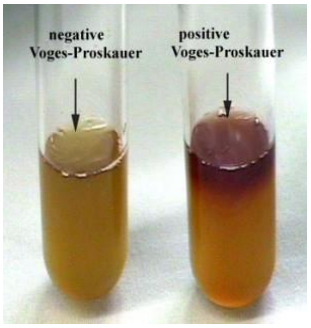
KOH	40 g
Distile su	100 mL

NOT: KOH distile suda eritilerek hazırlanır.

VP testi;

- MR-VP brothdan inkübasyon sonunda tüplere 1 mL kültür konulur ve üzerine 0,6 mL α-naftol solüsyonu ve 0,2 mL KOH solüsyonu ilave edilerek çalkalanır. 15 dakika içinde pembeden parlak kırmızıya kadar bir rengin oluşumu pozitif reaksiyonu gösterir.

NOT: Tüpe reaktifler ilave edildikten sonra yaklaşık 1 dk süresince çalkalanması önemlidir. Bu sayede atmosferik oksijen ile karışım içinde oluşan asetoinin oksidasyonu ve renk oluşumu gerçekleşir.



Resim 12: VP test sonucu; sarımsı renk: negatif (*E. coli*), kırmızımsı renk: pozitif (*Enterobacter aerogenes*)

Kaynak: http://microbeonline.com/voges-proskauer-test-principle-procedure-results/

4.1.7.3. Sitrat testi

Amaç

Bakterinin karbon ve enerji kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığını tespit ederek cins ve türlerini belirlemek için yapılır.

Klebsiella pneumoniae sitrat pozitif, *Escherichia coli* negatiftir.

Prensip

Bakterinin besiyerindeki tek karbon kaynağı olan sitratı ve nitrojen kaynağı olarak inorganik amonyum tuzlarını kullanması sonucunda oluşan amonyak ile pH artışının, brom timol mavisi renk indikatörü aracılığıyla besiyerinin rengini yeşilden maviye dönüştürmesi esasına dayanır.

- **SIMMONS SITRATE MEDIUM**

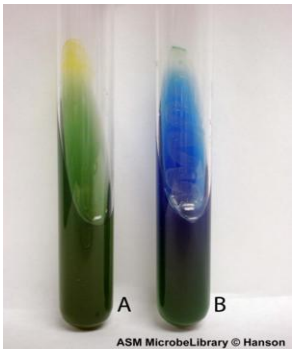
Formül:

Magnezyum sülfat (heptahidrat)	0,2 g
Amonyum dihidrojen fosfat	1 g
Dipotasyum fosfat	1 g
Sodium citrate (dehydrate)	2 g
Sodyum klorit	5 g
Agar	15 g
Bromtimol mavisi	0,08 g
Distile su	1000 mL

Tuzları distile suda çözündürüp pH 6.9'a ayarlanır. Agar ve brom timol mavisini ilave edip agar eriyinceye kadar ısıtarak karıştırılır. Tüplere 4-5 mL kadar dağıtılır ve 121 °C'de 15 dk otoklavlanır. Tüplerin eğik pozisyonda donmaları sağlanır.

Testin Yapılışı

Zenginleştirilen karekteristik kolonilerden öze ile sitrat besiyerine inoküle edilir. 35 ±2 °C'de 96 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonucu negatif kültürlerde üreme görülmezken pozitif kültürlerde üreme ve besiyerinde mavi renge dönüşüm gözlenir.



Resim 13: Sitrat testi; A: yeşil renk (-), B: mavi renk (+)

Kaynak: http://microbeonline.com/citrate-utilization-test-principle-procedure-expected-results-and-positive-organisms/

IMVIC Testi değerlendirme şeması:

	Tip	İndol	Metil Red	Voges-Proskauer	Citrat
Escherichia coli	Biotip 1	+	+	-	-
Escherichia coli	Biotip 2	-	+	-	-

4.1.8. Karbonhidrat Fermentasyonu

Fermentasyon, anaerobik bir biyolojik oksidasyondur; anaerob, fakültatif anaerob ve mikroeofil bazı bakteriler tarafından gerçekleştirilir.

Amaç

Bakterilerin besiyerindeki glukoz, laktoz ve sükroz gibi karbonhidratları metabolize ederek organik asit, gaz ve nötral ürünler gibi fermentasyon ürünlerini meydana getirip getirmediğini saptayarak identifiye edilmesini sağlar.

Prensip

Bakterilerin hidrolaz (karbohidrase) enzimleriyle besiyerindeki karbonhidratları parçaladıktan sonra asit oluşumunun renk indikatörü aracılığıyla saptanması ve asit- gaz oluşumunun saptanması esasına dayanır.

NOT: Karbonhidrat fermentasyon testinde çeşitli renk indikatörleri kullanılabilir (Tablo 1).

Tablo 1. Karbonhidrat besiyerinde kullanılan pH indikatörleri

pH indikatörü	**İnokulasyon yapılmamış besiyeri**		**Asit (fermentasyon pozitif)**		**Alkali (fermentasyon negatif)**	
	pH	**Renk**	**pH**	**Renk**	**pH**	**Renk**
Andrade's	7.1-7.2	Açık pembe	5	Pembe-kırmızı	12- 14	Sarı, renksiz
Bromkresol moru	7.4	Koyu mor	5.2	Sarı	6.8	Mor
Bromtimol mavisi	7	Yeşil	6	Sarı	7.6	Koyu mavi
Fenol kırmızısı	7.4	Kırmızımsı-turuncu	6.8	Sarı	8.4	Pembe-kırmızı

Fermentasyon sonucunda gaz oluşumunu tespit etmek için Durham tüpleri kullanılır.

- **PHENOL RED KARBONHİDRAT BROTH**

Formül:

Trypticase veya proteose pepton	10 g
Sodyum klorit (NaCl)	5 g
Beef extract (opsiyonel)	1 g
Fenol kırmızısı	0.018 g

Karbonhidrat	10 g
Distile su	1000 mL

NOT: Karbonhidrat fermentasyon testi için farklı şekerler tek başına kullanılmalı ve besiyerinde kullanılan karbonhidrat konsantrasyonunun % 0.5-1 olması yeterlidir.

NOT: Halofilik *Vibrio* spp.'de fermentasyon testi yapmak için broth bileşiminde % 2-3 NaCl olması önerilir.

Besiyeri bileşenleri distile su ile çözündürülüp karıştırıldıktan sonra Durham tüpü konulan tüplere 5'er mL dağıtılır ve otoklavlanır. Arabinoz, laktoz, maltoz, sükroz, trehaloz, veya ksiloz kullanıldığında 121 °C'de 3 dk otoklavlamak yeterlidir. Broth açık kırmızı renkte olmalı ve son pH 7,4 ±0.2 olmalıdır.

Testin Yapılışı

- Şüpheli koloni öze yardımıyla alınarak karbonhidrat besi yerine aktarılır.
- Besiyeri 35 ±2°C'de 24-48 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon sonunda Durham tüplerinde gaz oluşumu besiyeri renginin değişmesi, asit oluşumunu, dolayısıyla karbonhidratın kullanıldığını gösterir.
- Tüpün dibindeki sarıya dönen renk değişimi pozitif olarak değerlendirilir.



Resim 14: Solda fenol red, sağda brom creosol moru kullanılan karbonhidrat besi yeri: sarı renk kullanılan şekerin fermente olduğunu gösteren pozitif sonuçtur.

(**Kaynak:** American Society for Microbiology).

NOT: Karbonhidrat fermentasyonu 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.

4.1.9. TSI (Triple Sugar Iron) Besiyeri Testi

Amaç

Enterik bakterileri (örneğin; *Salmonella, E. coli*) tanımlamak amacıyla yapılan bir testtir.

Prensip

Bakterilerin üç şekerli ve demir içeren besiyerinde; şekerlerin fermentasyonu, fermentasyon sonucu gaz ve hidrojen sülfid (H_2S) oluşumu tespiti ile identifiye edilmesi esasına dayanır.

Besiyeri glukoz, laktoz ve sükroz olmak üzere üç farklı şeker, pH indikatörü olarak fenol kırmızısı ve H_2S oluşumunun göstergesi olan ferrik ammonyum sülfat içerir.

➢ TRIPLE SUGAR IRON AGAR (TSI)

Formül:

Et ekstraktı	3 g
Maya ekstraktı	3 g
Pepton	20 g
NaCl	5 g
Laktoz	10 g
Sükroz	10 g
Glukoz	1 g
Demir (III) sitrat	0,3 g
Sodyum tiyosülfat	0,3 g
Fenol kırmızısı	0,024 g
Agar	9- 18 g (agarın jel gücüne bağlı olarak)
Distile su	1000 mL

Tartılan hazır besiyeri içeriği distile su ile ısıtılarak çözündürülür. pH 7,4±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 10 mL olarak tüplere bölünür. 121 ºC'de 15 dakika otoklavlanır. Tüpler; 2,5- 5 cm derinlik oluşturacak şekilde yatırılarak yatık tüp besiyeri oluşturulur.

NOT: TSI'de glukoz % 0.1, sükroz % 1 ve laktoz % 1 oranlarında bulunur.

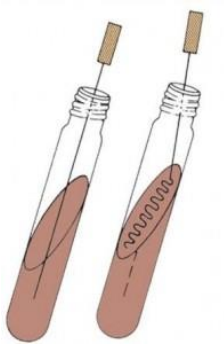
Testin Yapılışı

Nutrient agarda gelişen tipik kolonilerden TSI yatık agarı yüzeyine sürme ekim yapılır. Ayrıca dip kısma daldırma ile ekim yapılır. 37 ±1 ºC'de 24 ±3 saat inkübe edilir. Besiyerinde aşağıdaki değişiklikler görülebilir.

Dip kısımda	
Sarı	Glukoz pozitif (glukoz fermentasyonu var)
Kırmızı veya değişiklik yok	Glukoz negatif (glukoz fermentasyonu yok)
Siyah	Hidrojen sülfür oluşumu
Kabarcıklar veya çatlama	Glukozdan gaz oluşumu
Yatık yüzeyde	
Sarı	Laktoz veya sakaroz pozitif (laktoz/sakaroz kullanılmış)
Kırmızı veya değişiklik yok	Laktoz veya sakaroz negatif (laktoz/sakaroz kullanılmamış)

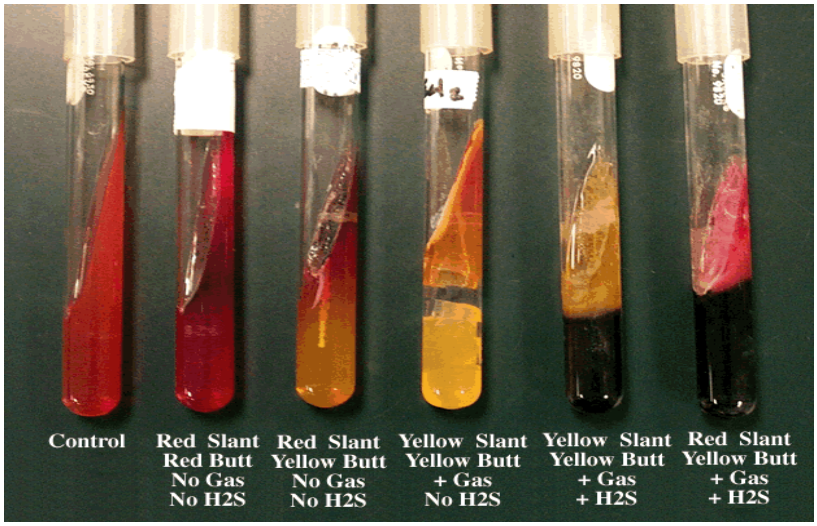
Tipik *Salmonella* kültürleri, yüzeyde alkali (kırmızı), dip kısımda gaz ve asit (sarı) ile yaklaşık % 90 oranında hidrojen sülfür (siyahlaşma) oluşumunu gösterir. Laktoz pozitif *Salmonella* ayrıldığında TSI besiyerinin yüzeyi sarı renkli olur.

NOT: TSI testi ile *Salmonella* kültürlerinin ilk doğrulaması yapılır. Ancak doğrulama sadece TSI agar deneyi sonuçlarına dayandırılmamalıdır.



Resim 15: TSI Agar'a inokulasyon

Kaynak: http://microbeonline.com/triple-sugar-iron-agar-tsi-principle-procedure-and-interpretation/



Resim 16: Triple Sugar Iron besiyerinde pozitif ve negatif sonuçlar

Kaynak: http://microbeonline.com/triple-sugar-iron-agar-tsi-principle-procedure-and-interpretation/

NOT: H_2S oluşumu siyah rengin oluşumu ile karakterize olup sodyum tiyosülfattan ferrik amonyum sülfatın siyah demir sülfite dönüşmesi sonucunda oluşur.

Mikroorganizma	**Eğimli yüzey (O_2 mevcut)**	**Dip kısım O_2 az/yok**	**Gaz**	**H_2S**
Escherichia, Klebsiella, Enterobacter	Asit	Asit	Pozitif (+)	Negatif (-)
Shigella, Serratia	Alkali	Asit	Negatif (-)	Negatif (-)
Salmonella, Proteus	Alkali	Asit	Pozitif (+)	Pozitif (+)
Pseudomonas	Alkali	Alkali	Negatif	Negatif

4.1.10. Üreaz Testi

Amaç

Üreyi hidrolize ederek amonyak ve CO_2 oluşturan bakterilerin tanımlanması için yapılan bir testtir. Üreaz testi özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanmasında IMViC test paketini tamamlayıcıdır. Ayrıca diğer birçok bakteri ve mantar türünün tanımlanmasında da üreaz testi kullanılır.

Prensip

Üreaz enzimine sahip bakteriler, üreyi hidrolize ederek alkali bir ürün olan amonyak oluşumuna neden olur. Amonyak çıkışı ortamın pH'sının yükselmesine neden olur. Besiyerindeki renk indikatörü fenol kırmızısı ortamın rengini sarıdan kırmızıya dönüştürür. *Proteus mirabilis*'de üreaz pozitif, *Escherichia coli*'de negatiftir

Testin Yapılışı

Üre besi yeri broth veya agar olarak hazırlanabilir. Besiyerinde üre % 2 oranında bulunmalıdır.

- **ÜRE AGAR**

Formül:

Pepton	1 g
Glukoz	1 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	2 g
Fenol kırmızısı	0,012 g
Agar	9- 18 g (ağarınjel gücüne bağlı olarak
Distile su	1000 mL

Tartılan hazır besiyeri içeriği distile su ile ısıtılarak çözündürülür. Otoklav sonrası pH 7,0 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır. 121 ºC'de 15 dakika otoklav edilir.

- **Üre solüsyonu**

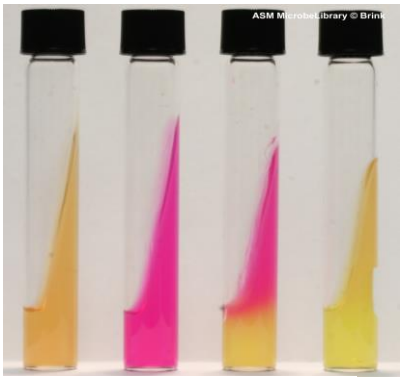
Formül:

Üre	400 g
Distile su	1000 mL'ye tamamlanır.

Filtrasyon yöntemiyle sterilize edilir.

Hazırlanan üre agar besiyeri içeriği	950 mL
Üre solüsyonu	50 mL

Hazır besiyeri içeriğine sterilizasyondan sonra 44 °C'de üre solüsyonu eklenir ve aseptik koşullarda 10 mL olarak tüplere bölünür. Yatık tüp besiyeri olarak soğutulur.



a b c d

Resim 17: Üreaz test sonuçları

a. İnokulasyon yapılmamış, b. *Proteus mirabilis* (hızlı üreaz pozitif), c. *Klebsiella pneumoniae* (gecikmiş üreaz pozitif), d. *Escherichia coli* (üreaz negatif) (Kaynak: American Society for Microbiology)

4.1.11. Hareket Muayenesi ve Nitrat Testi

Amaç

Bakterilerin hareket muayenesi genellikle *Enterobacteriaceae*, *Listeria* spp. ve *Clostridium* spp. tanımlanmasında kullanılır.

Prensip

Yarı katı besi yerine dik açıyla bakteri inokulasyonu sonrasında flagellaya sahip olan bakterilerin ekim hattından farklı yönlerde üreme göstermesinin tespitine dayanır.

- **HAREKET TESTİ BESİYERİ**

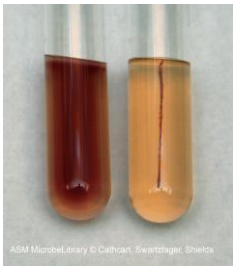
Formül:

Sığır eti özütü	3 g
Pankreatik kazein	10 g
Sodyum klorür	5 g
Agar	4 g
Distile/deiyonize su	1000 mL

Agar eriyene kadar bir litre suda karışımı çözündürün. Daha sonra bu karışıma % 1'lik trifeniltetrazolium klorit solüsyonundan 5 mL ilave edin. Tüplere paylaştırdıktan sonra 121 °C'de 15 dk steril edin ve soğuduktan sonra kullanın.

Testin Yapılışı

- Test uygulanacak saf kültürden aseptik olarak öze ile alınan kültür ile besi yerinin ortasından dibine 5 mm kalacak şekilde dik açıyla ekim yapılır.
- Kültürü 35 ±2 °C'de 24-48 saat inkübe edilir.
- Hareket pozitif kültürlerde tüpteki besi yerinin her tarafında üreme olacağından besi yeri bulanık bir hal alır. Hareket negatif kültürlerde sadece ekim çizgisi boyunca üreme görülür, ortam parlak rengini korur.



Resim 18: Hareket muayenesi testi: solda hareket pozitif; *P. mirabilis*, sağda hareket negatif *S. aureus* (**Kaynak**: American Society for Microbiology)

➢ TAMPONLANMIŞ HAREKETLİLİK- NİTRAT BESİYERİ

Formül:

Kazein peptonu	5 g
Et ekstraktı	3 g
Potasyum nitrat (KNO_3)	1 g
Disodyum hidrojen ortofosfat (Na_2HPO_4)	2,5 g
Agar	5 g
Galaktoz	5 g
Gliserol	5 g
Distile su	1000 mL

Tartılan hazır besiyeri içeriği distile su ile ısıtılarak çözündürülür. Otoklav sonrası pH 7,3 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır. Tüplere 10 mL olarak bölünür. 121 ±1 ºC'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Kullanıma kadar 5 ºC ±3 ºC'de 4 hafta muhafaza edilebilir.

- **Nitrat Testi Solüsyonu**

Eşit hacimde 5-2-ANSA solüsyonu (0,1 g 5 amino-2-naphtalenesulfonic asit, 100 mL % 15'lik asetik asit solüsyonu içinde çözündürülür ve filtrasyonla steril edilir) ve sülfanilik asit solüsyonu (0,4 g sülfonilik asit, 100 mL % 15'lik asetik asit solüsyonu içinde çözündürülür ve filtrasyonla steril edilir) karıştırılır.

- **Çinko Tozu**

<u>Testlerin Yapılışı</u>

− Her bir şüpheli koloni sıvı thioglycollate besiyerine inoküle edilir ve anaerobik şartlarda 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilir. Daha sonra TSC besiyerine öze ile geçiş yapılır ve üzerine 10 mL TSC besiyerinden dökülür. anaerobik şartlarda 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilir.

− İnkübasyon sonunda saf kültürlerden alınarak tamponlanmış hareketlilik-nitrat besiyerine daldırma yöntemi ile inoküle edilir ve 37 °C'de 24 ±2 saat inkübe edilir.

− Tamponlanmış hareketlilik-nitrat besiyeri incelenirken geçirgen ışık altında daldırılan bölgedeki gelişmelerine bakılır.

− Hareketsiz organizmalar sadece daldırılan yerin içinde veya daldırılan yer boyunca çizgi halinde gelişir.

- Hareketli organizmalar daldırılan yerin etrafına diffüz ederek gelişirler.

- **Nitrat Testi**

- Nitrat testi için tamponlanmış hareketlilik-nitrat besiyerine 0,5 mL nitrit çözeltisi eklenir. 15 dakika içinde kırmızı renkte bir reaksiyon verdiği durumda ortamda nitrit var demektir.
- Hiç renk yoksa çinko metal tozundan birkaç tanecik ilave edilir ve 10 dakika beklenir. Eğer yine renk gözlenmiyorsa ortamdaki nitrat tamamen indirgenmiştir.
- Turuncuya doğru bir renk değişimi gözleniyorsa organizmanın nitrat indirgeme gücünün olmadığı görülür.

4.1.12. Nitrat Redüksiyon Testi

Amaç

Bakteriler nitratları nitritlere veya daha ileri yıkım ile amonyak, nitrojen gazı (N_2), hidroksilamin gibi maddelere dönüştürebilir. Nitrat redüksiyonu organizmanın oksijenini nitratlardan temin etmek durumunda kaldığını (anaerob solunum) gösterir. Bir organizmanın nitrat redüksiyon yeteneğini saptamak için nitrat buyyon kullanılır.

Prensip

Nitritlerin varlığı, ortama sülfanilik asit ve α-naftilamin eklendiğinde kırmızı diazonyum bileşiğinin oluşumu ile anlaşılır. Gaz üretimi, eğer besiyeri içinde durham tüpü mevcut ise gözlenebilir.

Testin Yapılışı

Nitrat redüksiyon testi uygulanacak kültür nitrat besiyerine inoküle edilerek bir gece 37 °C 'da inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri üzerine A ve B indikatörlerinden 4'er damla damlatılır. Besiyeri içindeki nitrat, bakteri tarafından nitrite indirgenmişse pembe kırmızı bir renk oluşur.

A indikatörü: Sülfanilik asit (1 g asit 100 mL 1 N asetik asit içinde eritilir)

B indikatörü: Dimetil alfa naftilamin (0,6 mL si 100 mL 1 N asetik asit ile karıştırılır)

Kırmızı renk oluşmadığı durumda iki olasılıktan söz edilebilir: i) nitrat indirgenmemiştir veya ii) bu reaktiflerin gösteremeyeceği ileri son ürünler meydana gelmiş, yani nitrat tam indirgenmiştir. Olasılıklardan hangisinin geçerli olduğunu anlamak için tüpe çinko tozu eklenir ve indirgenmemiş nitrat ile reaksiyona girmesi beklenir; çinko tozu kalan nitratı nitrite indirgeyecek ve kırmızı renk gelişir. Bu durumda organizma için nitrat testi negatif demektir. Ortamda nitrat kalmamışsa bakteri tarafından yıkımlanmış demektir. Bu durumda çinko tozu eklenmesi ile kırmızı renk oluşmaz; bu da testin nitrat ve nitrit redüksiyonu için pozitif olduğunu gösterir.

4.1.13. ONPG Testi (o-Nitrofenil- β -D-Galaktopiranozid)

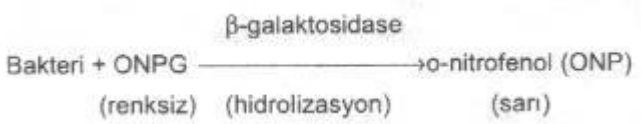
Amaç

Bu test, ortho-nitrophenyl - beta-D-galactoside'in (ONPG) ayrışmasını katalize eden beta-galaktosidase enziminin varlığının belirlemek için yapılır. Beta galaktosidase ortamda bulanan basit galoktozidleri (laktoz dahil) ayrıştıran ve indüklenebilen intrasellüler bir enzimdir. ONPG testi, özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinden bakterilerin laktozu fermente etme yeteneğine göre ayırt edilmesinde kullanılır.

Prensip

Laktozun fermentasyonu için organizmada permeaz ve β-galaktozidaz enzimi bulunmalıdır. Permeaz, laktozun hücre duvarını aşmasını, hücre içine girmesini sağlar. β -galaktozidaz hücre içine girmiş

laktozu galaktoz ve glukoza yıkar. Laktozu fermente etmeyen bakterilerde bu iki enzim de yoktur. Bazı organizmalarda ise permeaz enzimi bulunmaz ve bunlar geç laktoz pozitif reaksiyon verirler veya laktoz negatif olarak değerlendirilir. ONPG testi organizmalardaki β-galaktozidaz enzimini tespit ederek bu enzimi taşıyan organizmaların gerçek laktoz negatif bakterilerden ayırt edilmesini sağlar. ONPG yapısal olarak laktoza benzeyen renksiz bir maddedir ve testte β-galaktozidazın substratı olarak kullanılır. ONPG hücre içine laktozdan daha kolay geçebilir; permeazın etkin olmadığı hallerde dahi bakteri hücresi içine alınır; hücrede β-galaktozidaz mevcutsa hidrolize edilir; galaktoza ve sarı renkli bir madde olan o-nitrofenole ayrılır. Serbest kalan o-nitrofenol, alkali bir solüsyonda bulunursa, tautometrik değişmelere maruz kalarak sarı renk meydana getirir.



- **ONPG Solüsyonu**

ONPG	0.15 g
Sodyum fosfat tamponu (0.01 M, pH 7.5)	25 mL

ONPG sodyum fosfat tamponuna eklenir, karıştırılır. Solüsyon filtre ile steril edilir.

➢ ONPG SIVI BESİYERİ

Formül:

Peptonlu su	75 mL
ONPG solüsyonu	25 mL

ONPG solüsyonu aseptik olarak Peptonlu su ile karıştırılır. 2-3 mL'lik alikotlar halinde burgu kapaklı tüplere dağıtılır. Besiyerinin raf ömrü 2-8 °C'de 30 gündür.

Testin Yapılışı

1- ONPG brothda mikroorganizmalar bolca ekildikten sonra (McFarland No:2) 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılır. Sürenin sonunda kültürler santrifuj edilerek üst taraf atılır. Bakteri tortusuna 0.25 mL fizyolojik su ilave edilerek homojen bir suspansiyon yapılır. Buna bir damla toluene konularak iyice çalkalanır. Tüp 37 °C de 5-10 dakika su banyosuna bırakılır. Sonra, buna 0.25 mL ONPG solüsyonu katılır ve tekrar su banyosuna 20 dakika ile 24 saat süre ile konulur. Tüplerdeki renk değişimine dikkat edilir. Tüplerde 20 dakika içinde bir değişiklik yoksa inkübasyona devam edilir.

Tüplerde sarı rengin meydana gelmesi ONPG'nin hidrolize edildiğini (pozitif reaksiyon) ve renksiz olması da negatif reaksiyonu gösterir.

2- ONPG (ortonitrofenil-β-D galaktopiranozit) hazır disk küçük deney tüpüne konur. Üzerine 0.1 mL fizyolojik tuzlu su eklenir. Test edilecek suşdan bir öze konur. 37 °C'de 6-24 saat inkübasyona bırakılır. Sarı renk oluşumu ONPG pozitif olarak değerlendirilir.

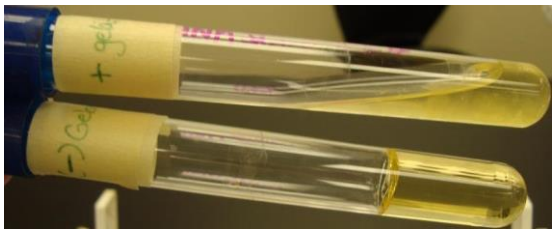


Resim 20: ONPG Testi. Pozitif sonuç: tüpteki sıvıda sarı renk (laktoz fermente eden bakteri), negatif sonuç: renksiz veya hafif sarı renk (laktozu fermente etmeyen bakteri)

Kaynak: https://microbeonline.com/onpg-test-%CE%B2-galactosidase-principle-procedure-results

4.1.14. Jelatin Hidroliz Testi

Jelatin, protein karakterinde bir madde olup kollajenin hidrolizasyonundan elde edilir. Büyük moleküllü olduğundan bakteri hücre duvarından geçemez. Bu nedenle daha küçük moleküllere katalize edilir; bunu hücre dışı bir enzim olan jelatinaz yapar. Jelatinaz tarafından proteinlerin katabolizması iki aşamalıdır.



Resim 21: Jelatinaz tarafından proteinlerin katabolizması

Kaynak:
http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeKardes.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FF6F57F2D04F86C330

Amaç

Bakterilerin, jelatini hidrolize eden jelatinaz enzimi sentez yeteneğini tespit ederek identifikasyonunu sağlar.

Prensip

Jelatinaz enzimi varlığında jelatinin parçalanarak besiyerinin sıvılaşması esasına dayanır. Besiyerinin üreme ısısının biraz altında inkübe edilmesi bakterinin (varsa) jelatinaz aktivitesini kamçılar. Bu nedenle test sonunda jelatin besiyerinin buzdolabında 1-2 saat bekletilmesi gerekir.

Testin Yapılışı

- İncelenecek bakteri kolonisinden iğne öze ile alınıp dik olarak jelatinli besiyerine ekim yapılır.
- Tüpler, 37 °C'de 1 gün inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrasında kontrollerle birlikte buzdolabı sıcaklığında 1-2 saat bırakılır.
- Jelatinin hidrolize edildiği durumlarda, buzdolabından çıkarılan jelatin besiyerinin sıvı hale geçip geçmediği kontrol edilir.

- Besiyeri sıvı hale dönüşmüşse jelatin hidrolizi pozitif, katı halde ise jelatin hidrolizi negatiftir.

➢ **LAKTOZ- JELATİN BESİYERİ**

Formül:

Kazein peptonu	15 g
Maya ekstraktı	10 g
Laktoz	10 g
Jelatin	120 g
Fenol kırmızısı	0,05 g
Distile su	1000 mL

Laktoz ve fenol kırmızısı dışındaki bileşenler karıştırılıp pH 7,5 ±0,1'e ayarlanır. Daha sonra bunlar da ilave edilerek vidalı kapaklı tüplere 10 mL hacimlerde dağıtılır. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Kullanıma kadar 5 ±3°C'de 4 hafta muhafaza edilebilir.

Testin Yapılışı

- Laktoz jelatin besiyerinde ise gaz ve renk değişimine bakılır. Eğer kırmızıdan sarıya doğru bir renk değişimi gözleniyorsa bu durum laktozun fermente olduğunu ve asit oluştuğunu gösterir.
- Bir saat 5 °C'de soğutulan tüplerden jelatinin sıvılaşıp sıvılaşmadığı incelenir. Eğer besiyeri katılaşmış ise ek olarak 35 °C'de 24±2 saat yeniden inkübe edilir ve jelatini sıvılaştırma durumu test edilir.

➢ **GLUKOZ OF MEDIUM**

Formül:

Enzymatic digest of casein	2,0g
Dipotassium hydrogen phosphate (K2HPO4)	0,3 g
Glucose	10,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Bromthymol blue	0,08 g
Agar	3 g to 4 g
Distile su	1 000 mL

Besiyeri içeriği aseptik koşullarda steril erlen mayer içerisine tartılır. pH 6,8 ±0,2'e ayarlanır. Su banyosunda ısıtılarak çözündürülür. 10 mL besiyeri cam deney tüplerine konularak, otoklava vertikal bir şekilde yerleştirilir. 121±3 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Kullanıma kadar 5 ±3°C'de 4 hafta muhafaza edilebilir.

Testin Yapılışı:

İnkübe edilmiş petrilerde görülen şüpheli 5 adet koloni Nutrient agar besiyerine geçilerek, 37 °C'de 24±2 saat yeniden inkübe edilir. İnkübasyon sonunda üreyen kolonilere oksidaz testi uygulanır. Oksidaz testi sonucunda negatif olduğu belirlenen kolonilere fermentasyon testi uygulanır. Bunun için 10 dk sıcak su banyosunda bekletilip soğutulan glukoz agar tüplerine öze ile şüpheli koloni daldırılır ve 37 °C'de 24±2 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında sarı renk oluşturan tüpler glukoz pozitif olarak değerlendirilir. Çoğunlukla Enterobacteriacea familyasının doğrulanmasında kullanılmaktadır.

➢ **BRILLANT GREEN LACTOSE BILE BROTH (BGLB)**

Formül:

Peptone	10,0g
Laktoz	10,0 g
Sığır safrası (Oxbile)	20,0 g
Brillant Yeşili	0,0133 g
Distile su	1 000 mL

Besiyeri içeriği aseptik koşullarda steril erlen mayer içerisine tartılır. Su banyosunda ısıtılarak çözündürülür. Otoklav sonrasında pH 6,8 ±0,2'e ayarlanır. İçerisinde durham tüpü bulunan 10 mL besiyeri cam deney tüplerine 10 mL konularak, 121±3 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir. Kullanıma kadar 5 ±3°C'de 4 hafta muhafaza edilebilir.

Testin Yapılışı:

İnkübe edilmiş petrilerde görülen şüpheli kolonilerin herbirinden steril bir öze ile BGLB brotha inokülasyon yapılır. 30-35-37°C'lerden birinde 24±2 saat inkübasyona bırakılan tüplerde inkübasyon sonunda gaz oluşumu kontrol edilir. Gaz oluşumu oluşmayan tüpler için bir 24±2 saatlik inkübasyon süresi daha uygulanabilir.

➢ **LAKTOZ SÜLFİT (LS)**

Formül:

Enzimatik olarak parçalanmış kazein	5,0 g
Maya ekstraktı	2,5 g
Sodyum klorür	10,0 g
Laktoz L-Sistein hidroklorür	0,3 g
Su	1 000 Ml

Bileşenler kaynatılarak (gerektiğinde) suda çözülür. Sterilizasyondan sonra 25°C'da pH= 7,1 ± 0,2 olacak şekilde ayarlanır. Çözeltiden 8 Ml içerisinde ters çevrilmiş durham tüpleri içeren deney tüplerine konulur ve 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Besiyeri 3 °C ± 2 °C'da 4 haftaya kadar muhafaza edilir.

- **Disodyum Disülfit Çözeltisi**

  Formül:

Disodyum disülfit (Na2S2O5), susuz	1,2 g
Su	100 mL

  Disodyum disülfit suda çözündürülürek, çözelti filtrasyonla sterilize edilir. Çözelti bir gün içinde kullanılmalıdır.

- **Amonyum demir (III) sitrat çözeltisi**

  Formül:

Amonyum Demir (III) Sitrat	1 g
Su	100 mL

  Amonyum Demir Sitrat suda çözündürülürek, çözelti filtrasyonla sterilize edilir. Çözelti bir gün içinde kullanılmalıdır.

LS Tam Besiyeri:

Temel besiyeri hazırlandığı gün kullanılmayacaksa, tam besiyeri işlemine geçmeden hemen önce ısıtma ve sonra hızlı bir şekilde soğutma işlemi ile havası çıkarılır. Eğer besiyeri vidalı kapaklı şişelerde ise, ısıtmadan önce kapaklar gevşetilir ve soğutmadan önce sıkıştırılır. Daha sonra, temel

besiyerinin her 8 mL'sine 0,5 mL disodyum disülfit çözeltisi ve 0,5 mL amonyum demir (III) sitrat çözeltisi ilâve edilir. Tam besiyeri bir gün içinde kullanılmalıdır.

Testin Yapılışı:

Şüpheli koloniler sıvı tiyoglikolat besiyerine ekilir. Anaerobik şartlarda 37°C'de 18 - 24 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra, steril pipet kullanılarak beş damla tiyoglikolat kültürü alınır ve hemen LS besiyerine aktarılır. 46 °C'daki su banyosunda 18 - 24 saat oksijenli ortamda inkübe edilir. LS besiyeri tüpleri, gaz oluşumu ve siyah renk varlığı (demir sülfit tortusu) yönünden incelenir. Siyah tortu içeren ve içindeki durham tüpünün dörtte birinden fazlası gaz dolu olan tüpler pozitif kabul edilir. Siyahlaşmış besiyeri içindeki durham tüpünün dörtte birinden azının gaz ile dolmuş olduğu şüpheli durumlarda, LS besiyerindeki kültürün 5 damlası steril bir pipetle başka bir LS besiyeri tüpüne aktarılır. 46 °C'daki su banyosunda 18 - 24 saat inkübe edilir. Bu tüp yukarıda açıklandığı gibi incelenir (SC besiyerindeki karakteristik koloniler şeklindeki bakteri ve LS besiyerinde pozitif bir doğrulama veren bakteri *C. perfringens* olarak kabul edilir. Diğer bütün durumlarda tüpler negatif olarak değerlendirilmelidir).

4.2. Antiserum ile Doğrulama (Özellikle *Salmonella* spp. için)

Salmonella için tipik biyokimyasal reaksiyonları gösteren saf koloniler ayrıca Salmonella O- ve H-antijenlerinin varlığı açısından da test edilir (*Salmonella* Typhi'nin beklendiği alanlarda, ayrıca Vi-antijen), polivalent antiserumlar kullanılarak slayt aglütinasyonu ile. saf koloniler, seçici olmayan bir agar ortamında kültürlenir ve aglütinasyon için test edilir. Kendiliğinden yapışan suşlar, Salmonella antijenlerinin varlığı açısından test edilemez. Salmonella O- ve H-antijenlerinin varlığını tespit etmek için aşağıda açıklanan yöntemden farklıysa (ve gerekirse Vi-antijen için de) antiserumu üreticinin talimatlarına göre kullanılmalıdır.

Oto- Aglütinasyon Yapan Suşların Elimine Edilmesi: Alkollü pamuk ile temizlenmiş bir lam üzerine 1 damla FTS çözeltisi konulur. Homojen ve bulanık bir süspansiyon elde etmek için (denemeye alınan kültürlerden) NA katı besiyerinde üremiş olan kolonilerden herhangi biri, steril öze ile alınarak, bu tuz çözeltisi içine dairesel hareketler ile süspanse edilir. Test edilecek koloniyi 1 damla suda dağıtıp, daha sonra 1 damla tuz çözeltisi ile karıştırmak da mümkündür. Lam 30 ile 60 sn. yavaş yavaş sallanır. Reaksiyon siyah bir zemin üzerinde (koyu renkli bir fon) takip edilir. Eğer bakteri farklı birimlerde kümelenmiş ise suşun oto-aglütinasyon özelliği olduğu kabul edilir ve bu durumda antiserumlar ile testlere geçilmez. Bu tip oto-aglutinasyon yapan türlerin antiserumlar ile serolojik doğrulamaların yapılması mümkün değildir. Eğer oto- agglutine tür değil ise teste devam edilir.

O ve Vi Antijenlerinin İncelenmesi: Oto aglütinasyon yapmayan saf koloniler FTS çözeltisi yerine O antijeni için bir damla Salmonella Polyvalent O Antiserum, Vi antijeni için ise bir damla Salmonella Vi Antiserum kullanarak yapılır. Eğer aglütinasyon görülürse durumunda reaksiyon pozitif olduğu kabul edilir.

H-Antijenlerin İncelenmesi: NA katı besiyerinden, yarı katı nutrient agar'a saf, oto- aglütinasyon yapmayan bir koloni inoküle edilir. Besiyeri ters çevrilmeden 24 ± 3 saat 37 ± 1 °C 'de inkübe edilir. Bu kültür H-antijenlerinin incelenmesi için FTS çözeltisi yerine bir damla Salmonella H Antiserum kullanılırak uygulama yapılır. Eğer aglütinasyon varsa reaksiyon pozitif olarak kabul edilir.

4.3. Boyama Yöntemleri

Mikrobiyolojide kullanılan boyama yöntemleri başlıca 2 gruba ayrılır.

1. Basit boyamalar: Bu tarz boyamada, preparatlardaki mikroorganizmalar hakkında kısa sürede bilgi edinmek için tek boya solüsyonu kullanılır. Bu amaçla karbol fuksin, kristal violet ve metilen mavisi gibi genellikle bazik boya solüsyonlarından birisi seçilir.

2. Bileşik boyamalar: Birden fazla boya ile yapılan boyama yöntemleridir. Bunlar arasında:

a) Diferansiyel boyamalar: Mikroorganizmaları birbirinden ayırmada kullanılır (Gram, Ziehl-Nielsen).
b) Strüktürel boyamalar: Bakterilerin iç ve dış yapıları hakkında bilgi edinmek için kullanılan bileşik boyama yöntemleridir (spor, kapsül, flagella, çekirdek, lipid, vb.).

4.3.1.Basit Boyama Yöntemleri

4.3.1.1. Karbol fuksin ile boyama

Karbol fuksin solüsyonu filtre kağıdından süzülerek hazırlanan preparatlar üzerine konur ve 5-10 saniye boyama için bırakıldıktan sonra, boya dökülür ve hafif akan su ile yıkanır. Kurutulduktan sonra, üzerine sedir yağı konularak immersiyon objektifi ile bakılır. Mikroorganizmalar kırmızı renkte görülür.

4.3.1.2. Kristal violet ile boyama

Hazırlanan preparat üzerine boya solüsyonundan (kristal violet) konarak 20-30 saniye kadar bekletilir. Sürenin sonunda boya dökülür, preparat su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroorganizmalar mor renkte görülür.

4.3.1.3. Metilen mavisi ile boyama

Bu amaçla Löffler metilen mavisi solüsyonu preparat üzerine konularak 5-8 dakika bekletilir. Boya dökülür, yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroorganizmalar mavi renkte görülür.

4.3.1.4. Negatif Boyama

Bu tür boyama yönteminde mikroorganizmalar değil, saha boyanır. Karanlık olan sahada mikroorganizmalar renksiz veya parlak olarak görülür. Bu amaçla nigrosin veya çin mürekkebi kullanılır. Lam üzerine bir damla boya ve sonra bir damla kültür konularak yayılır ve ince bir froti hazırlanır. Kuruduktan sonra muayene edilir. Bu yöntem kapsül ve spiroketleri görmek için kullanılır.

4.3.2. Bileşik Boyamalar

4.3.2.1.Gram Boyama Tekniği

Gram tekniği, mikrobiyolojide çok kullanılan bir boyama yöntemi olup mikroorganizmaların klasifikasyon ve identifikasyonunda kullanılır.

Gram pozitif türler hücre duvarlarında kalın bir peptidoglikan tabaka ile büyük miktarda teikoik asitlere sahiptir. İşlem için uygulanan ilk madde "kristal viyole" boyasıdır ve bu boya, takiben eklenen zayıf iyot solüsyonunun sabitleştirici etkisiyle bakteri hücre duvarına tutunur; öyle ki, renk giderme işleminden etkilenmez, boya hücrede kalır ve bakteri koyu-menekşe rengi görünür.

Gram negatif türler ise proteinler de içeren bir lipopolisakkarit-fosfolipid dış membrana yapışık ince bir peptidoglikan tabakaya sahiptir. Gram boyama sırasında dış membran renk giderme işleminde

alkol etkisi ile hasar görür ve kristal viyole-iyot kompleksini bırakır; hücre renksizleşir. Hücre son işlem adımında kullanılan bir zıt boya (safranin, karbol fuksin vb.) ile boyanır ve zıt boyanın renginde (pembe) görünür.

Birçok Gram boyama tekniği bulunmasına karşın hepsinde aşağıdaki yol izlenmektedir.

4.3.2.2. Modifiye Hucker Tekniği ile Gram Boyama

Ticari olarak üretilen boyalar kullanılabilir. Bu durumda üretici talimatlarına uyulmalıdır.

UYARI: Kristal viyole, potasyum iyodür ve etanol tahriş edicidir. Etanol yanıcı-parlayıcı ve hepatotoksiktir. Kristal viyole kanserojen ve kısmen toksiktir. Gram boyama sırasında canlı organizmalarla temas ve aerosollere maruz kalma riskleri vardır. Aerosolizasyon özellikle yaymanın alevde sabitlenmesi sırasında olur. Bu nedenle, sabitleme işlemi için lam ısıtıcılarının kullanılması önerilir.

Boyaların Hazırlanması

- **Kristal Violet Solüsyonu**

Kristal viyolet	2 g
Etanol (% 95)	20 mL
Amonyum okzalat ($C_2H_8N_2O_4$)	0,8 g
Distile su	80 mL

Kristal viyolet etonelde, amonyum okzalatı distile suda çözündürülür. İki solüsyon karıştırılır ve kullanmadan önce karışım 24 saat bekletilir.

- **İyot Solüsyonu**

İyot	1 g
Potasyum iyodür (KI)	2 g
Su	100 mL

Potasyum iyodür 10 mL su içinde eritilir ve kısım kısım iyot eklenir. Çözündükten sonra volumetrik bir şişede 100 ml'ye tamamlanır.

- **Safranin Solüsyonu**

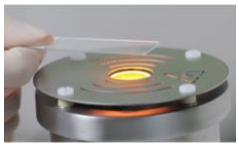
Safranin	0,25 g
Etanol (% 95)	10 mL
Su	100 mL

Etanolde safranin çözündürüldükten sonra 100 mL'ye tamamlanır.

<u>Testin Yapılışı</u>

- Katı besiyerlerinde üreyen kolonilerden ideal sonuç almak için besiyeri inhibitör içermemeli ve taze koloniler (<24 saat) seçilmelidir. Morfoloji önemli ise (örneğin; streptokoklar ve Gram pozitif çomaklar) sıvı kültürler tercih edilmelidir.
- Sıvı kültürden örnek alınıyorsa steril pastör pipeti ile sıvı kültürden bir damla lam üzerine aktarılır.

- Agar petrisinden örnek alınıyorsa lam üzerine bir damla steril su veya serum fizyolojik konulur. Distile su frajil organizmaların hücre morfolojisini bozabilir. Steril öze ile koloniden küçük bir kısım alınarak nazik bir şekilde damlaya karıştırılır. Hafif bulanık, homojen bir görünüm elde edilmelidir.
- Sabitleme işlemi lamlar tam olarak kuruduktan sonra yapılır.
- Lamlar, biyolojik güvenlik kabininin içinde düz bir zemin üzerinde kurumaya bırakılabileceği gibi özel lam kurutma ısıtıcıları üzerinde de 55-60 °C'de kurutulabilir.
- Pensetle kurumuş lamın rodajlı kısmından tutulur ve bunzen beki alevi üzerinden 2-3 kez geçirilir veya mikroinsineratör5-10 saniye tutulur. Her iki işlemde de lamı aşırı ısıtmaktan kaçınılmalıdır.



Resim 22: Mikroinsineratörde lam kurutma işlemi

- Boyamaya geçmeden önce lamın soğuması beklenir.
- Bu bakteri filmi kristal viyolet ile kaplanır ve 1 dakika beklenir.
- Lam eğik tutularak yavaşça akan suyun altında birkaç saniye yıkanır. Alternatif bir yol olarak; akan çeşme suyunun altına konulmuş bir behere lamı 5 saniye daldırarak yıkama yapılabilir.
- İyot solüsyonu ile lam kaplanır ve 1 dakika beklenir.
- Lam eğik tutularak yavaşça akan suyun altında birkaç saniye yıkanır.
- Etanol (% 95) eğik tutulan lam üzerine 30 saniye boyunca menekşe rengi kaybolana kadar dökülür (dekolorizasyon).
- Lam suyun altında durulanır.
- Lam safranin solüsyonu ile kaplanarak 10 sn bekletilir.
- Lam suyun altında yıkanır.
- Lam kurulanır ve mikroskoba yerleştirilir.
- Mikroskopta 10X objektif ile inceleme (ön değerlendirme) yapılır.

− Preparat önce mikroskobun düşük büyütmesinde (10X objektif) incelenir; boyamanın kalitesine, kristaller olup olmadığına, hücrelerin düzgün dağılım gösterip göstermediğine bakılır.

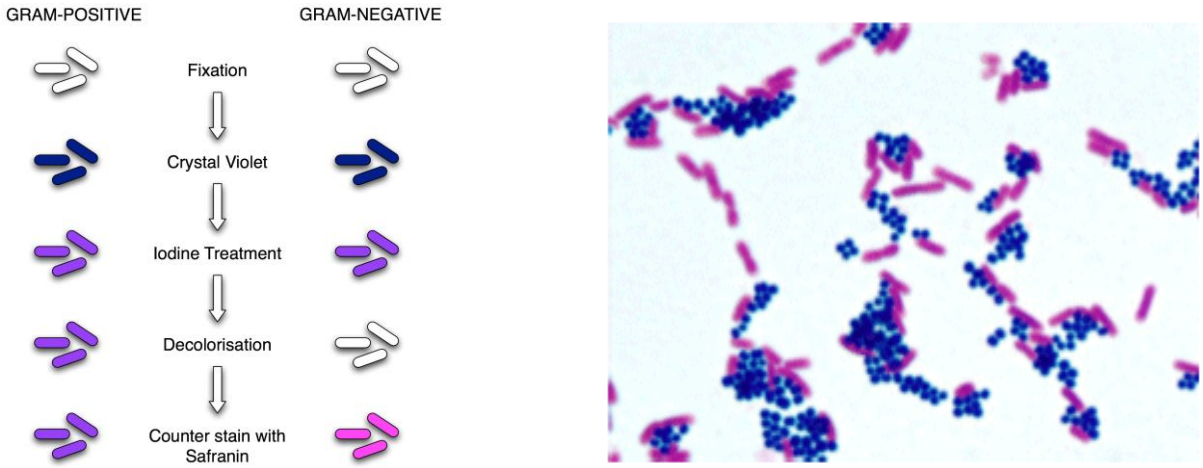
− Eğer aşırı kristal görülüyorsa yeni bir preparat hazırlanmalı ve taze filtre edilmiş kristal viyolet ve zıt boya ile boyanmalıdır. Alternatif olarak preparata renk giderme işlemi uygulanır ve yeniden boyanır.

− Renk giderme işleminin uygun yapılıp yapılmadığı değerlendirilir. Lam aşırı soluk görünüyorsa, renk giderme işlemi tekrarlanır ve lam yeniden boyanır.

− Yayma kalınlığı değerlendirilir. Yayma değerlendirilemeyecek kadar kalın ise yeni preparat hazırlanmalıdır.

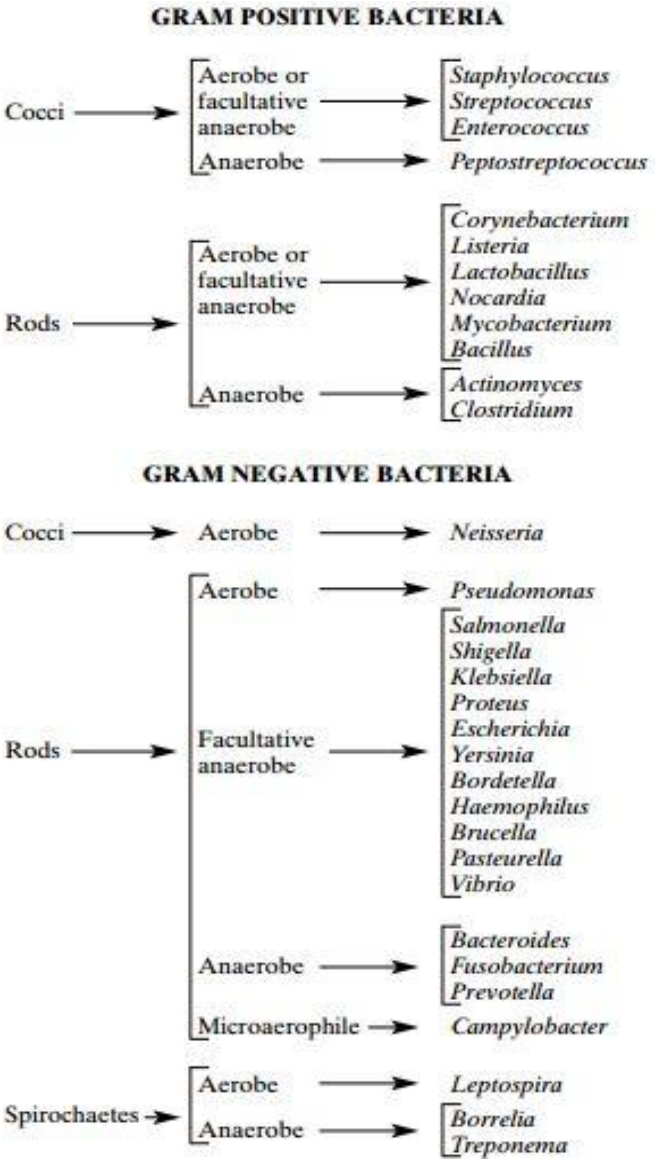
- Gram boyama yapılmış preparatın son incelemesi mikroskobun 100X immersiyon objektifi (1000X büyütme) ile yapılır.

- Mikroskopta görülen mor-menekşe rengi bakteriler Gram pozitif, koyu pembe-kırmızı koloniler ise Gram negatif olarak değerlendirilir.



Resim 23: Gram Boyama: Mor renk: Gram pozitif, pembe renk Gram negatif

Kaynak: http://microbeonline.com/g ram-staining-principle-procedure-results/



Resim 24: Bazı bakterilerin Gram boyama özelliklerine göre sınıflandırılması

- Diğer birleşik boyama teknikleri
- Asidorezistans etkenleri boyama tekniği
- Spor boyama
- Kapsül boyama
- Flagella boyama
- Lipid boyama
- Polisakkarit boyama
- Nukleer materyalin boyanması
- Hücre duvarı boyama

- Spiroketa boyanması
- Mantar boyama
- Riketsiya boyama
- Klamidia boyama

Ancak bunlar gıda mikrobiyolojisinde yaygın olarak kullanılmamaktadır.

5. KAYNAKLAR (REFERANSLAR)

- TS EN ISO 6579-1: 2017/AMD 1:2020 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp. — Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC
- ISO 13720:2010 Meat and meat products. Enumeration of presumptive Pseudomonas spp.
- TS EN ISO 6888-1: 1999/ Amd 2:2018- Gıda ve Hayvan Yemlerinin Mikrobiyolojisi- Koagulaz PozitifStafilokokların (Staphylococcus aureus ve diğer türler) Sayımı İçin Yatay Metot- Bölüm 1- Baird Parker Agar Besiyeri Kullanarak.
- ISO 11290-1: 2017- Microbiology of food and animal feding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes-Part 1: Detection method.
- http://www.microbiologyinfo.com/category/biochemical-test/
- FDA/BAM, Chapter 4
- ISO 7937:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for the enumeration of Clostridium perfringens- Colony count technique.
- ISO 21528-2:2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count technique .
- ISO 4832: 2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coliforms -- Colony-count technique (29.04.2010)
- http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3203-citrate-test-protocol
- http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2842-triple-sugar-iron-agar-protocols
- http://microbeonline.com/triple-sugar-iron-agar-tsi-principle-procedure-and-interpretation/
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi Sendromik Tanı Yaklaşımı, Örnek Yönetimi, Test Prosedürleri ve Mikrobiyolojik Tanı/Tanımlama, Ankara, 2014