

Mikrobiyal Büyüme ve Kontrolü

Prof. Dr. Bektaş TEPE

Mikrobiyoloji

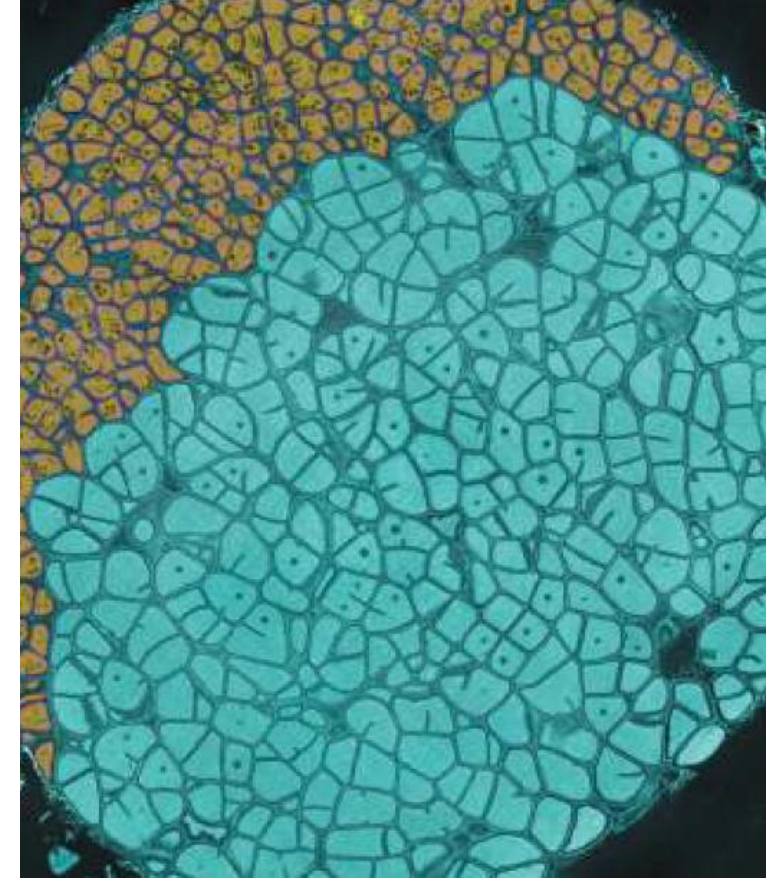
Bölüm 5

Mikrobiyal Konsorsiyumlara Giriş

- Doğada bazı metabolik süreçler, bir araya gelip iş birliği yapan mikroorganizmalar tarafından yürütülür ve bu düzen “konsorsiyum” olarak adlandırılır.
- Metan (CH_4) oksidasyonunun sülfat (SO_4^{2-}) indirgenmesiyle eşleştiği anoksik deniz tortullarındaki süreç bu tür bir konsorsiyuma örnektir.
- Bu reaksiyonda açığa çıkan az miktardaki enerji, iki farklı mikroorganizma arasında paylaşılır.
- Konsorsiyumun karbon döngüsündeki rolü nedeniyle çalışma mekanizmasının detaylı olarak anlaşılması önemlidir.

Konsorsiyumdaki İki Temel Mikroorganizma

- Konsorsiyumdaki metanı oksitleyen mikroorganizma, ANME olarak bilinen bir Archaea türüdür (fotoğrafta mavi).
- Sülfatı indirgemedden sorumlu olan ortak ise bir Bakteri türüdür (fotoğrafta kahverengi).
- ANME–Bakteri konsorsiyumu, büyük bir metan yatağı olarak küresel karbon ekonomisinde kritik kabul edilir.
- Bu nedenle, mekanizmanın çözömlenmesi iklim değışikliğı ve deniz biyokimyası açısından büyük önem taşır.



Konsorsiyumu Ayırma Çabaları

- Araştırmacılar uzun yıllar boyunca konsorsiyumu parçalamayı denemiş ancak metan oksidasyonunun iki organizmanın birlikte varlığını gerektirdiğini gözlemlemiştir.
- Bazı araştırmacılar, sülfat indirgeyicinin yapay bir elektron alıcısı ile değiştirilebileceğini öne sürmüştür.
- Bu yaklaşımın başarılı olması hâlinde, metanotrofun saf kültürde büyütülebileceği düşünülmüştür.
- Deneylerde AQDS adı verilen bir elektron alıcısı kullanılarak bu hipotez sınanmıştır.

Yapay Elektron Alıcıları ve ANME'nin Tepkisi

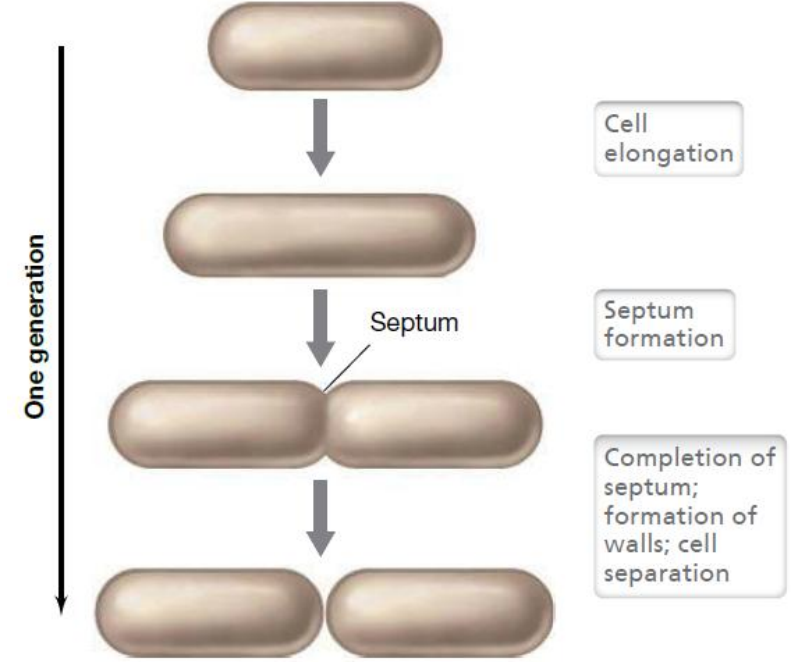
- AQDS kullanıldığında sülfat indirgenmesi devre dışı bırakılmış ancak CH_4 oksidasyonu devam etmiştir.
- Bu süreçte ANME, CH_4 'ten aldığı elektronları sülfat indirgeyici ortağına iletmek yerine AQDS'ye aktarmıştır.
- Anaerobik solunumu destekleyen başka elektron alıcılarının da metan oksidasyonunu sürdürebildiği gösterilmiştir.
- Bu bulgular, ANME'nin gelecekte saf kültürde elde edilebileceğine dair umut vermektedir.

Saf Kültürün Bilimsel nemi

- Bir mikroorganizmayı saf kültürde yetiştirmek, fizyolojisi ve biyokimyası gibi birçok yönünün ayrıntılı olarak incelenebilmesi açısından “altın standart” kabul edilir.
- ANME–sülfat indirgeyici konsorsiyumunda birden fazla fizyolojik süreç aynı anda aktif olduğundan bu reaksiyonları zmllemek büyük bir bilimsel zorluktu.
- ANME’nin konsorsiyumdan ayrılarak saf kültürde büyütülmesi başarıldığında, organizmanın pek çok biyolojik özelliği daha net alışılabilecektir.

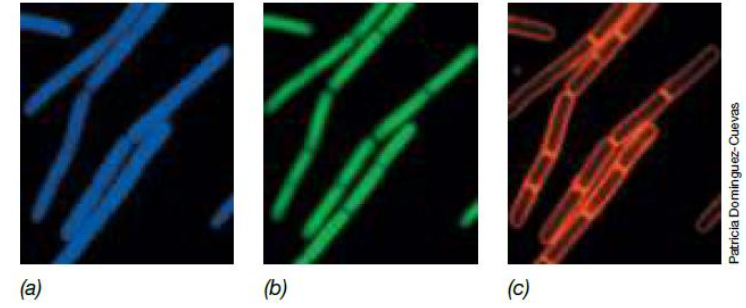
Hücresel Büyümenin Temeli: İkili Bölünme

- Mikrobiyal büyüme, hücre sayısındaki artış olarak tanımlanır ve hücre bölünmesinin sonucunda gerçekleşir.
- Hücrede makromoleküller biriktikçe hücre duvarı, zar, flagella ve ribozom gibi temel yapılar oluşur.
- Çubuk biçimli bakterilerde (örneğin *E. coli*) hücreler uzar ve ardından iki yavru hücre oluşacak şekilde bölünür.
- Bu bölünme şekli “ikili bölünme” olarak adlandırılır.



Septum (Bölme) Oluşumu ve Bölünme Çeşitleri

- Bölünme sırasında iki yavru hücreyi ayıran yapı “septum” olarak adlandırılır ve hücre zarı ile hücre duvarının içe doğru büyümesiyle oluşur.
- Septum oluşumu tamamlandığında hücreler birbirinden ayrılır.
- Bazı bakterilerde, örneğin *Bacillus subtilis*'te, hücre duvarı daralmadan septum oluşur (üstteki figür).
- *Caulobacter* gibi tomurcuklanarak çoğalan türlerde ise bölünmede daralma olur ancak septum oluşmaz (aşağıdaki figür).



I. Equal products of cell division:



Binary fission: most bacteria

II. Unequal products of cell division:

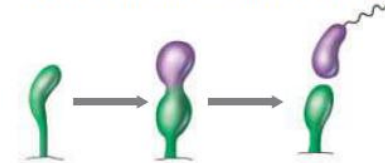
1. Simple budding: *Pirellula*, *Blastobacter*



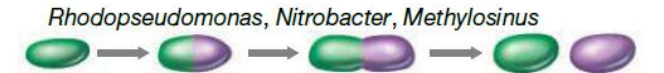
2. Budding from hyphae: *Hyphomicrobium*, *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*



3. Cell division of stalked organism: *Caulobacter*



4. Polar growth without differentiation of cell size:



Hücre Nesilleri ve Nesil Süresi

- Bir hücre iki hücreye ayrıldığında bir neslin gerçekleştiği kabul edilir ve bu sürenin tamamlanmasına nesil süresi denir.
- Bir nesil boyunca, hücrenin tüm bileşenleri orantılı biçimde artar ve her yavru hücre, yaşamına bağımsız başlayabilecek kadar makromolekül ve iyon alır.
- Replik olmuş DNA'nın iki yavru hücre arasında ayrılması, DNA'nın bölünme sırasında sitoplazmik membrana bağlı kalmasına dayanır.
- Hücre zarı boyunca oluşan boğumlanma, iki kromozomun ayrılmasını ve her bir yavru hücreye bir kopya geçmesini sağlar.

Nesil Süresini Etkileyen Faktörler

- Bir bakteri türünün nesil süresi; besinsel koşullar, genetik özellikler ve sıcaklığa bağlı olarak değişir.
- En iyi besinsel koşullarda, laboratuvar ortamındaki *E. coli* kültürleri yaklaşık 20 dakikada bir bölünebilir.
- Bazı bakteriler bu süreden daha hızlı bölünürken çoğu tür saatler veya günler süren nesil sürelerine sahiptir.
- Doğal ortamlarda ise bakteri büyümesi, laboratuvar ortamındaki maksimum hızdan çok daha yavaş gerçekleşir.

Doğal Ortamlarda Büyüme ve Rekabet

- Doğada, laboratuvar koşullarındaki kadar besin ve ideal çevresel faktörler bulunmadığından büyüme hızı sınırlıdır.
- Mikrobiyal hücreler, doğal habitatlarda genellikle mikrobiyal topluluklar içinde yaşar.
- Bu topluluklarda mikroorganizmalar, besin ve alan için komşuları ile rekabet etmek zorundadır.
- Dolayısıyla doğal ortam büyümesi, çoğu zaman potansiyel maksimum büyüme hızının oldukça altındadır.

Tomurcuklanarak Bölünme: Farklı Bir Hücresel Yaklaşım

- Çoğu bakteride hücre bölünmesi ikili bölünme ile olur; ancak bazı bakterilerde farklı bölünme biçimleri gözlenir.
- Tomurcuklanan bakterilerde hücre büyümesi eşit olmayan şekilde gerçekleşir ve ortaya tamamen yeni bir yavru hücre çıkar.
- İkili bölünmede iki eşdeğer hücre oluşurken, tomurcuklanmada ana hücre kimliğini korur ve yavru hücre ondan ayrılır.
- Bu mekanizma, belirli bakteri gruplarının yaşam döngülerinde önemli bir yere sahiptir.

I. Equal products of cell division:



Binary fission: most bacteria

II. Unequal products of cell division:

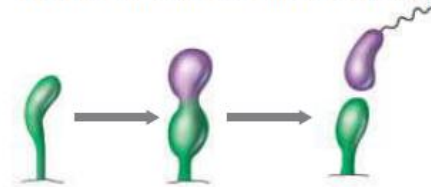
1. Simple budding: *Pirellula*, *Blastobacter*



2. Budding from hyphae: *Hyphomicrobium*, *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*



3. Cell division of stalked organism: *Caulobacter*



4. Polar growth without differentiation of cell size:

Rhodopseudomonas, *Nitrobacter*, *Methylosinus*



Tomurcuklanmanın Hücresel Özellikleri

- Tomurcuklanan bakterilerde, yeni hücre duvarı tek bir noktadan oluşturulur; bu olgu polar büyüme olarak adlandırılır.
- Buna karşılık ikili bölünmede hücre duvarı tüm hücre boyunca eklenir; bu süreç interkalar büyümedir.
- Polar büyümede büyük sitoplazmik yapılar, bölünme sırasında paylaştırılmadığı için gelişen tomurcukta yeniden sentezlenmelidir.
- Bu durum, tomurcuklanan bakterilere daha karmaşık iç yapılara sahip olabilme avantajı sağlar.

I. Equal products of cell division:



Binary fission: most bacteria

II. Unequal products of cell division:

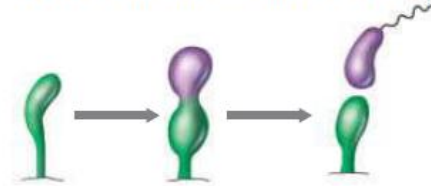
1. Simple budding: *Pirellula*, *Blastobacter*



2. Budding from hyphae: *Hyphomicrobium*, *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*



3. Cell division of stalked organism: *Caulobacter*



4. Polar growth without differentiation of cell size:

Rhodopseudomonas, *Nitrobacter*, *Methylosinus*



Tomurcuklanan Hücrelerde Uzantılar ve Yaşam Döngüleri

- Bazı tomurcuklanan bakteriler stalk veya hifa gibi sitoplazmik uzantılar oluşturur; klasik örnekler *Caulobacter* ve *Hyphomicrobium* türleridir.
- *Ancalomicrobium* gibi türler ise birden fazla kol benzeri eklentiler üretir ve bunlar hücreden dışarı doğru uzanır.
- Bu uzantılar, hücrenin yüzey/hacim oranını artırarak çok seyrek besin bulunan ortamdan daha verimli besin almasını sağlar.
- Birçok tomurcuklanan bakteri, oldukça ayrıntılı ve özgün yaşam döngülerine sahiptir.

I. Equal products of cell division:



Binary fission: most bacteria

II. Unequal products of cell division:

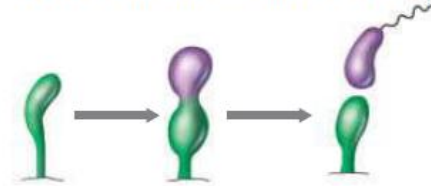
1. Simple budding: *Pirellula*, *Blastobacter*



2. Budding from hyphae: *Hyphomicrobium*, *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*



3. Cell division of stalked organism: *Caulobacter*



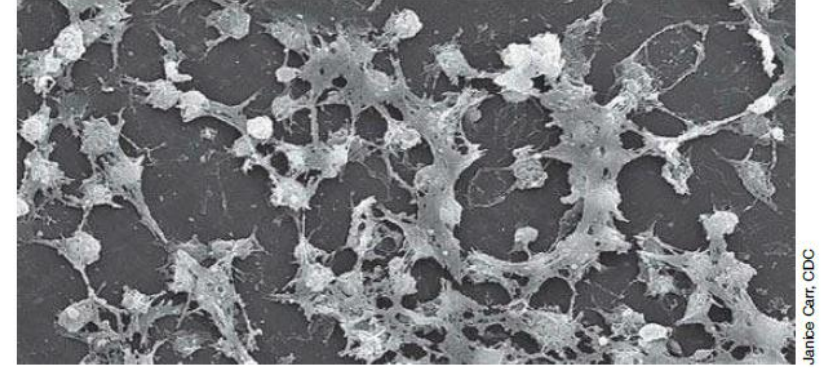
4. Polar growth without differentiation of cell size:

Rhodopseudomonas, *Nitrobacter*, *Methylosinus*



Mikrobiyal Yaşam Tarzları: Askıda veya Yüzeye Bağlı Büyüme

- Bakteriler ikili bölünme veya tomurcuklanma ile bölünseler de, büyümeleri iki yaşam tarzından biriyle gerçekleşir.
- Askıda büyüme (planktonik) özellikle su kolonunda yaşayan organizmalarda görülür.
- Bir diğer yaşam biçimi ise yüzeye bağlı (sessile) büyümedir; burada hücreler bir yüzeye tutunarak gelişir.
- Bu yüzeye tutunan hücreler zamanla biyofilm adı verilen yapılara dönüşebilir.



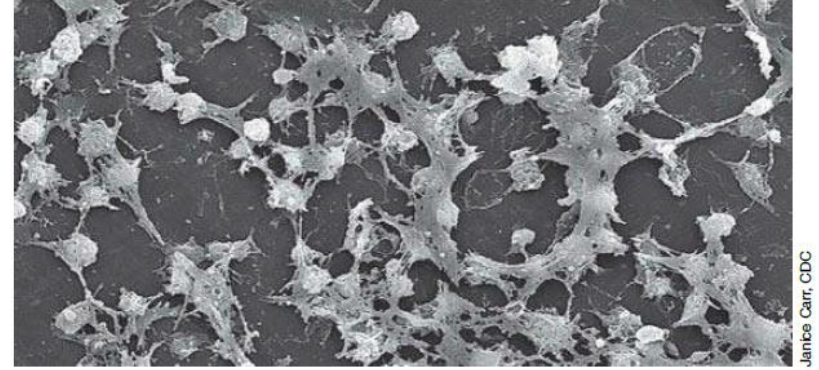
(a)



(b)

Biyofilm Oluşumunun Aşamaları

- Biyofilmler, hücrelerin yer aldığı ve polisakkarit ağırlıklı bir matriks içeren yapılardır (Figür a).
- Oluşum, planktonik hücrelerin yüzeye tutunmasıyla başlar ve ardından yapışkan bir matriks üretimi gerçekleşir.
- Matriks üretimini, hücrelerin büyüyüp gelişmesi ve dayanıklı, geçirimsiz bir biyofilm yapısının oluşması izler.
- Bazı biyofilmler, farklı organizmaların tabakalar halinde bulunduğu çok katmanlı mikrobiyal matlar hâline gelir (Figür b).



Janice Carr, CDC



Michael T. Madigan

Doğadaki Biyofilmler ve Koruyucu Etkileri

- Biyofilmler doğada yaygındır; çünkü sıkı dokulu yapıları toksik maddelerin (örneğin antibiyotikler) içeriye sızmasını engeller.
- Bu yapılar, protozoa gibi avcılarının bakterileri tüketmesini zorlaştırır.
- Aynı zamanda hücrelerin akıntı ile ortamdan taşınmasını engelleyerek daha elverişli olmayan bölgelere sürüklenmelerini önler.
- Bu nedenle, biyofilm oluşturma pek çok mikroorganizma için avantajlı bir yaşam stratejisidir.

Biyofilmlerin İnsan Sağlığı ve Teknoloji Üzerindeki Etkileri

- Tıbbi implantlar (yapay kalp kapakları, protezler) ve kateter gibi cihazlar üzerinde oluşan biyofilmler, tedavisi zor enfeksiyonlara yol açabilir.
- Kistik fibrozis hastalığındaki belirtilerin temelinde, akciğerleri doldurup gaz değişimini engelleyen yoğun bir biyofilm tabakası bulunur.
- Biyofilmler, su dağıtım sistemlerinde tıkanmalara ve yakıt depolarında H_2S gibi bozucu maddelerin üretimiyle kirlenmeye neden olabilir.
- Bu nedenle biyofilmler hem sağlıkta hem endüstride önemli etkiler yaratır.

Mikrobiyal Büyümenin Niceliksel Yönleri

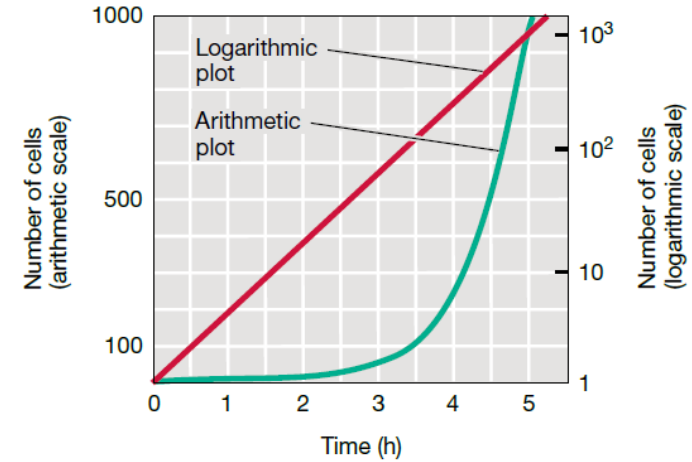
- Hücre bölünmesi sırasında tek bir hücre iki yeni hücre oluşturur ve bu süreçte toplam hücre sayısı ile hücre kütlesi iki katına çıkar.
- Bakteriyel kültürlerde hücre sayısı çok hızlı artabildiğinden mikrobiyal büyüme niceliksel yöntemlerle ele alınır.
- Bu kısımda, hücre çoğalmasının sayısal olarak nasıl değerlendirildiği açıklanacaktır.

Büyüme Verilerinin Grafiğe Aktarılması

- Tek bir hücreden başlayan ve nesil süresi 30 dakika olan bir büyüme deneyinde hücre sayısı sabit aralıklarla iki katına çıkar.
- Hücre sayısı zamana karşı aritmetik düzlemde çizildiğinde sürekli artan bir eğim görülür.
- Aynı veriler $\log_{10}$ ölçeğinde çizildiğinde noktaların düz bir doğru üzerinde toplandığı görülür.

Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256 (2^8)
0.5	2	4.5	512 (2^9)
1	4	5	1,024 (2^{10})
1.5	8	5.5	2,048 (2^{11})
2	16	6	4,096 (2^{12})
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576 (2^{20})

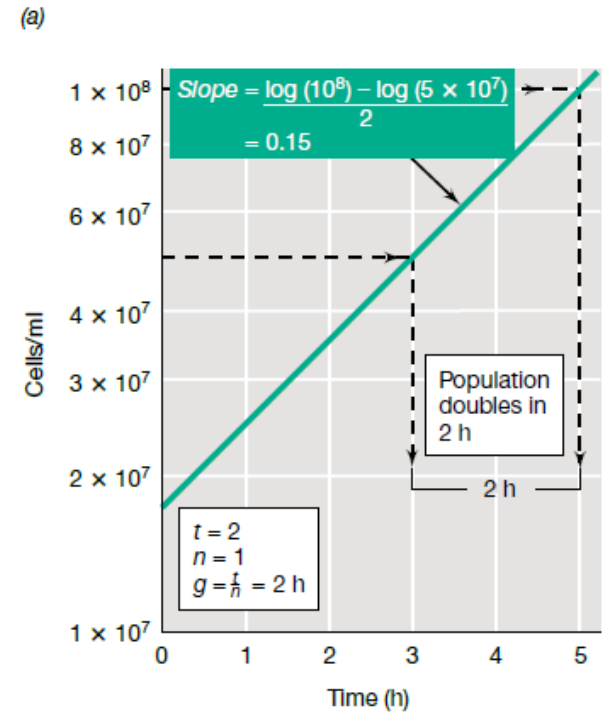
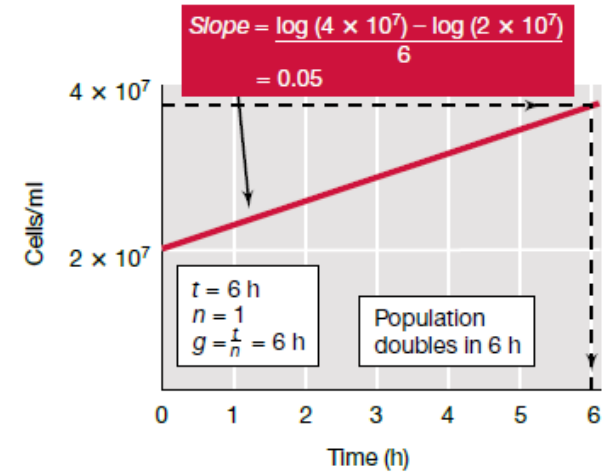
(a)



(b)

Üstel Büyümenin Grafiksel Yorumlanması

- Yarı-logaritmik grafikler, kültürün nesil süresini gerçek büyüme verilerinden doğrudan tahmin etmeyi kolaylaştırır.
- Y ekseninde hücre sayısının iki katına denk gelen iki nokta seçilir ve bu noktalardan X eksenine çizilen dikeylerin aralığı nesil süresini verir (Figür b).
- Bu grafiksel yaklaşım, üstel büyümenin düzenli ve sabit zaman aralıklarında gerçekleştiğini açıkça gösterir.



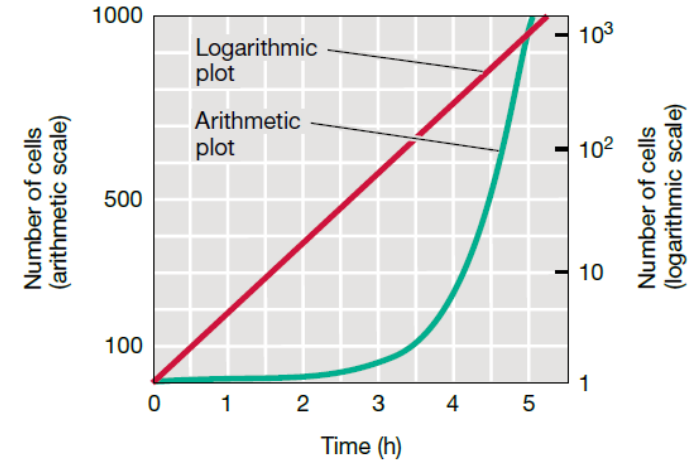
(b)

Bakteriyel Büyümenin Matematiksel İfadesi

- Üstel büyüme, 2 sayısının geometrik artışı olarak ifade edilir; örneğin 1 hücreden 2, sonra 4 hücreye geçiş (Figür a).
- Üstel büyüme sürecinde hücre sayısı $N = N_0 \times 2^n$ denklemiyle tanımlanır.
- Bu denklemde N son hücre sayısını, N_0 başlangıç hücre sayısını ve n ise gerçekleşen nesil sayısını ifade eder.

Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256 (2^8)
0.5	2	4.5	512 (2^9)
1	4	5	1,024 (2^{10})
1.5	8	5.5	2,048 (2^{11})
2	16	6	4,096 (2^{12})
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576 (2^{20})

(a)



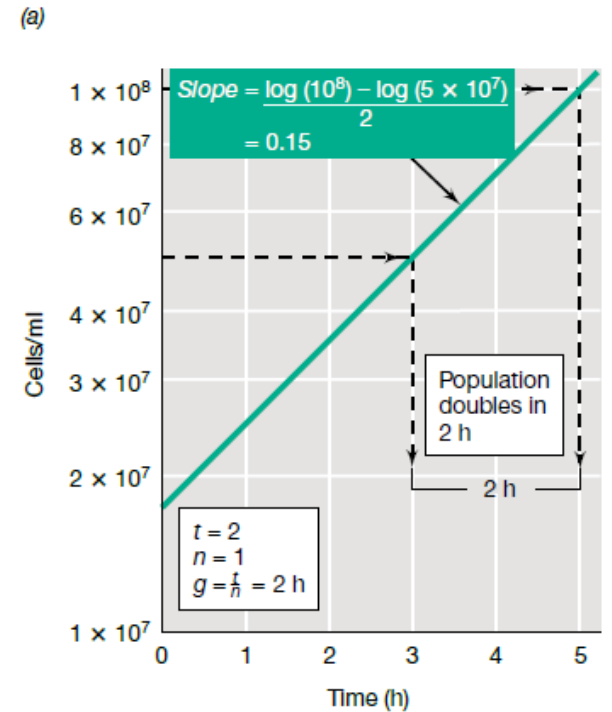
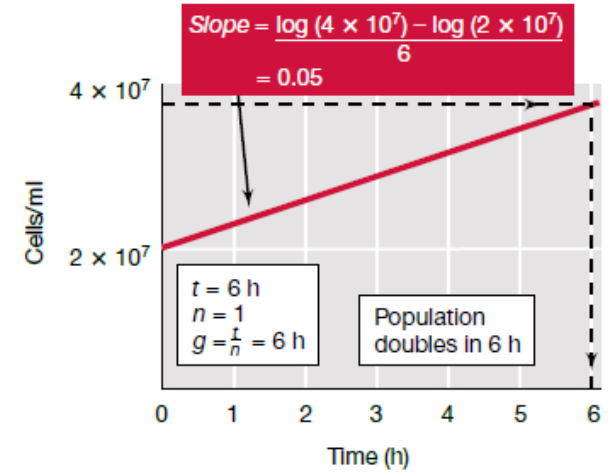
(b)

Nesil Sayısının ve Nesil Süresinin Hesaplanması

- Nesil süresi g , toplam üstel büyüme süresinin (t) gerçekleşen nesil sayısına (n) oranıdır.
- N ve N_0 bilindiğinde, n değeri logaritma kullanılarak $n = 3.3(\log N - \log N_0)$ şeklinde hesaplanır.
- Böylece, ölçülebilir hücre sayıları üzerinden üstel büyüyen bir kültürün nesil süresi belirlenebilir.

Sayısal Bir Örneğin İncelenmesi

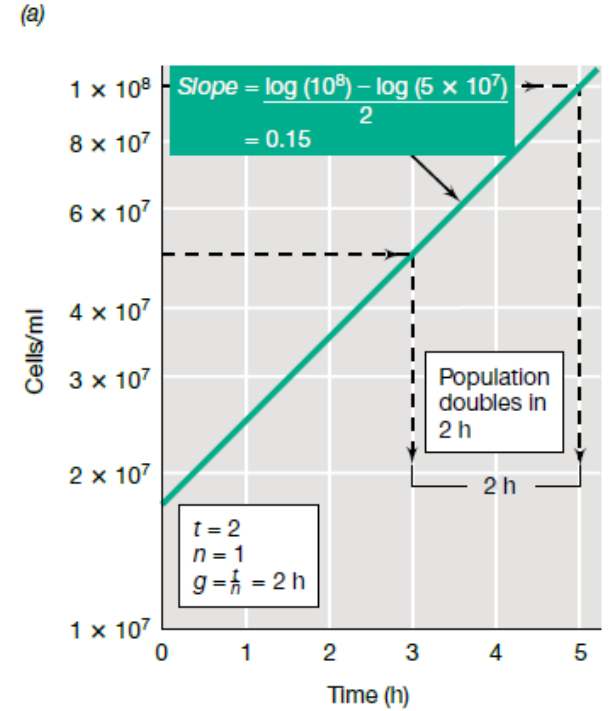
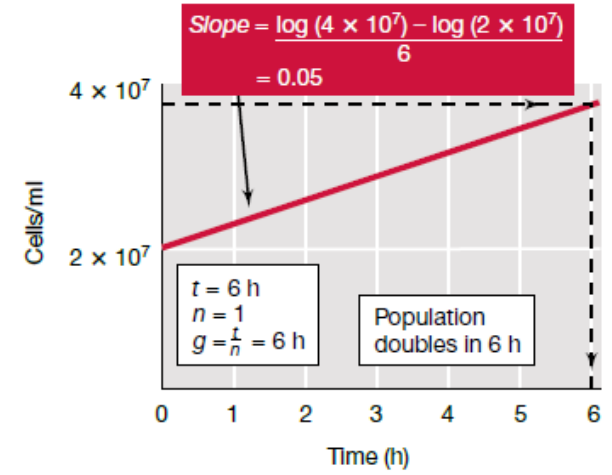
- Figür b'de verilen büyüme verilerinde $N = 10^8$, $N_0 = 5 \times 10^7$ ve $t = 2$ olarak alınmıştır.
- Bu değerlere göre $n = 1$ bulunur ve böylece nesil süresi $g = t/n = 2$ saat olarak hesaplanır.
- Üstel büyüme iki saat daha devam ederse hücre sayısı olan 2×10^8 , 4×10^8 'a ulaşır.



(b)

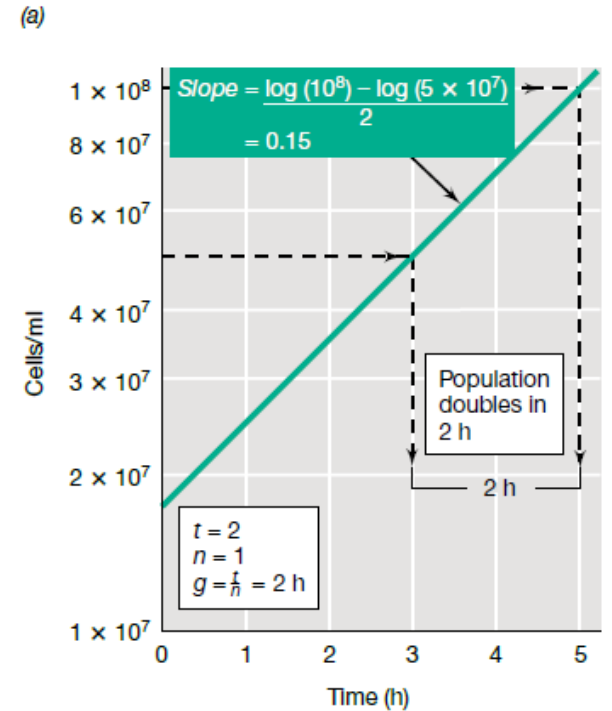
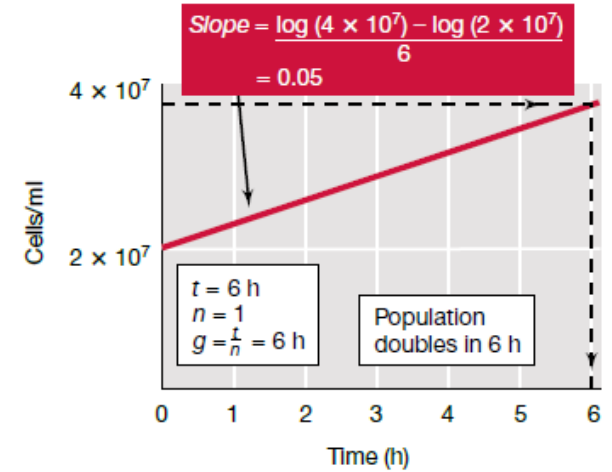
Yarı-logaritmik Doğrunun Eğimi ile g'nin Hesabı

- Üstel büyüme verileri yarı-logaritmik grafikte düz bir çizgi oluşturur ve çizginin eğimi $\log(\Delta N)/\Delta t$ değerine eşittir.
- Bu eğim $0.301 n/t$ (veya $0.301/g$) ile ilişkilidir ve böylece g değeri eğimden doğrudan hesaplanabilir.
- Figür b'deki örnekte eğim $0.301/2$ yani 0.15 olup g yine 2 saat olarak elde edilir.



Anlık Büyüme Hızı (k) Kavramı

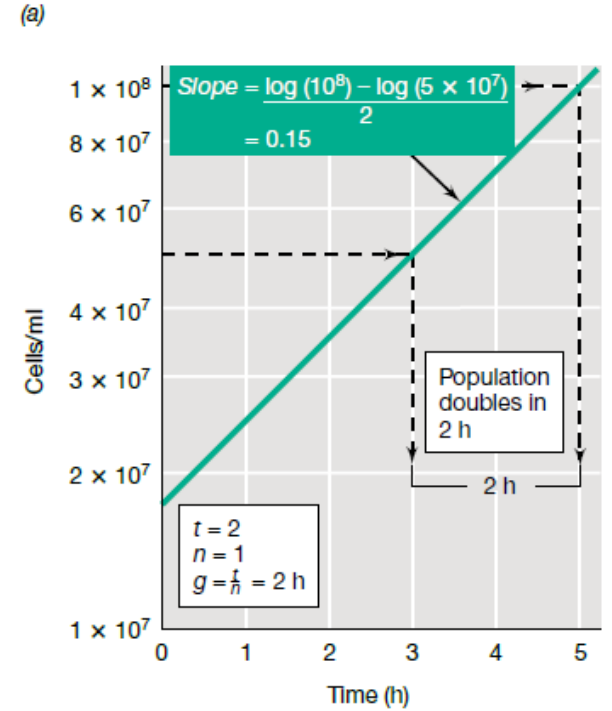
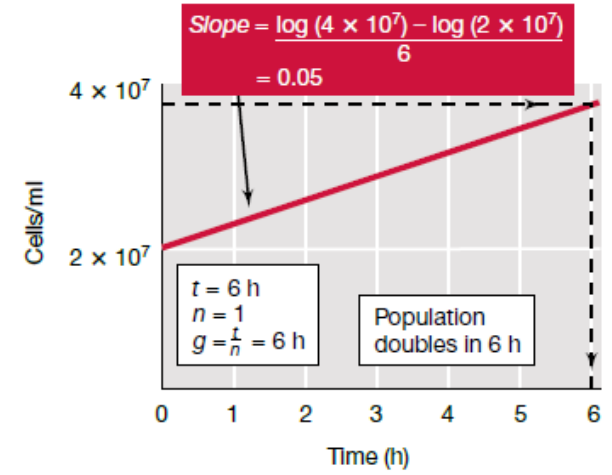
- Üstel büyümeyi tanımlayan bir diğer önemli ifade anlık büyüme hızıdır (k) ve birim zaman başına büyüme oranını gösterir.
- Anlık artış $dN/dt = kN$ şeklinde tanımlanır ve bu denklem entegrasyon ile $N = N_0 e^{kt}$ formuna dönüştürülür.
- Bu ifade $\log_{10}$ 'a çevrildiğinde $\log N = kt/2.303 + \log N_0$ elde edilir ve bu doğrusal form yarı-logaritmik grafiklerle uyumludur.



(b)

k ve g Arasındaki İlişki ve Uygulamalar

- Yarı-logaritmik doğrunun eğimi ($k/2.303$), $0.301/g$ ile eşdeğerdir ve böylece k değeri g üzerinden $k = 0.693/g$ şeklinde hesaplanır.
- n ve t değerleri bilindiğinde hem g hem de k hesaplanabilir ve bu, mikroorganizmaların farklı koşullarda büyüme performansını karşılaştırmada kullanılır.
- Bu parametreler, bir kültürde uygulanan bir işlemin büyümeyi artırıcı ya da azaltıcı etkisini değerlendirmek için özellikle yararlıdır.



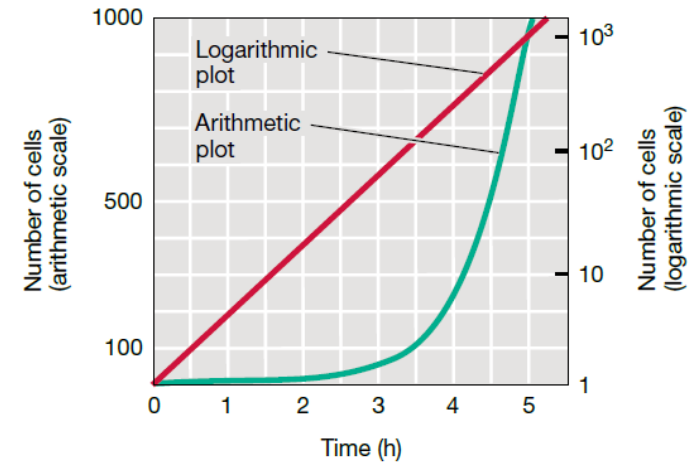
(b)

Üstel Büyümenin Sonuçları

- Üstel büyümenin ilk dönemlerinde hücre sayısındaki artış yavaştır ancak zamanla giderek hızlanır.
- Büyümenin ilerleyen safhalarında, hücre sayısı patlayıcı biçimde artabilir ve bu durum yandaki figürde gösterilen deneyde açıkça görülmektedir.
- Örneğin, ilk 30 dakikada hücre üretim hızı 30 dakikada 1 hücre iken, 4–4.5 saat arasında 30 dakikada 256 hücreye, 5.5–6 saat arasında ise 30 dakikada 2048 hücreye ulaşır.
- Bu nedenle, laboratuvar kültürlerinde bakteri popülasyonları çok kısa sürede çok yüksek değerlere ulaşabilir ve nihai popülasyonlar 7×10^9 hücre/ml düzeylerine çıkabilir.

Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256 (2^8)
0.5	2	4.5	512 (2^9)
1	4	5	1,024 (2^{10})
1.5	8	5.5	2,048 (2^{11})
2	16	6	4,096 (2^{12})
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576 (2^{20})

(a)



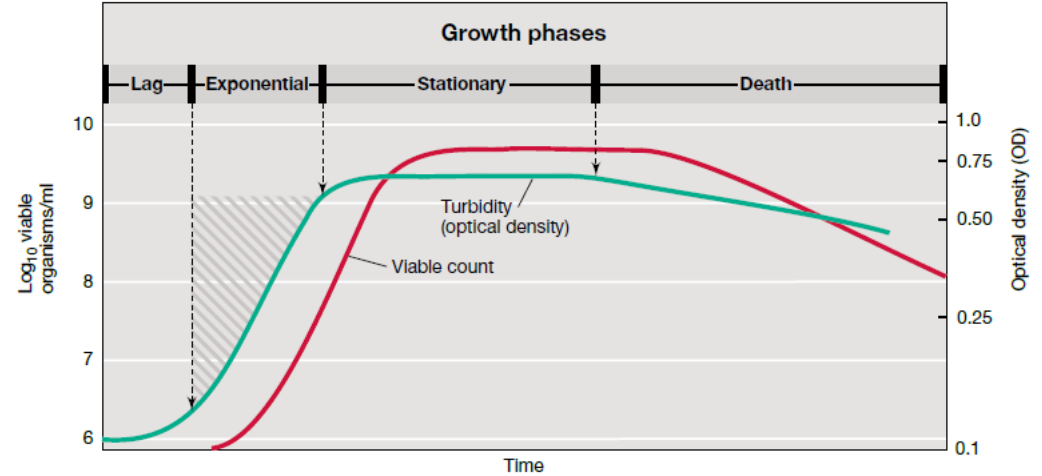
(b)

Üstel Büyümenin Günlük Hayatta Etkileri

- Üstel büyüme yalnızca teorik bir kavram değildir; günlük yaşamda da kendini gösterir.
- Örneğin, sütün bozulmasına neden olan laktik asit bakterileri taze süt içinde çok düşük sayıda bulunur ve buzdolabı sıcaklığında yavaş büyür.
- Oda sıcaklığında bırakılan taze süt az miktarda laktik asit üretir ve bu genelde kaliteyi bozmaz.
- Ancak bir haftalık süt aynı koşullara bırakıldığında, bir haftalık birikmiş büyümenin etkisiyle çok daha fazla laktik asit üretilir ve süt hızla bozulur.

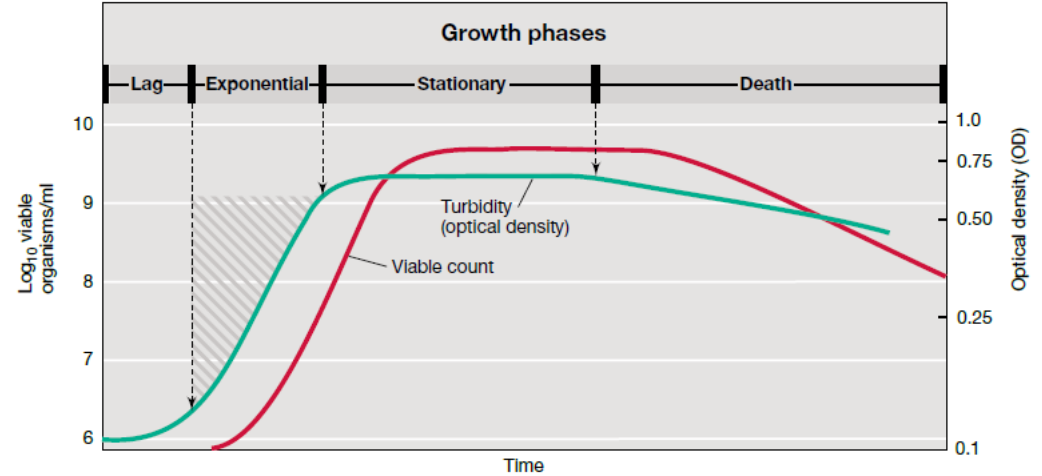
Mikrobiyal Büyüme Döngüsünün Genel Yapısı

- Mikrobiyal büyüme yalnızca üstel fazdan ibaret değildir.
- Kapalı bir kapta (tüp ya da flask) büyüyen mikroorganizmalar sınırsız şekilde üstel büyüme sürdüremez.
- Bunun yerine, aşağıdaki figürde gösterildiği gibi tipik bir büyüme eğrisi oluşur.
- Bu eğri, büyüme döngüsünün dört aşamasını içerir: gecikme (lag), üstel, durağan (stationary) ve ölüm fazları.



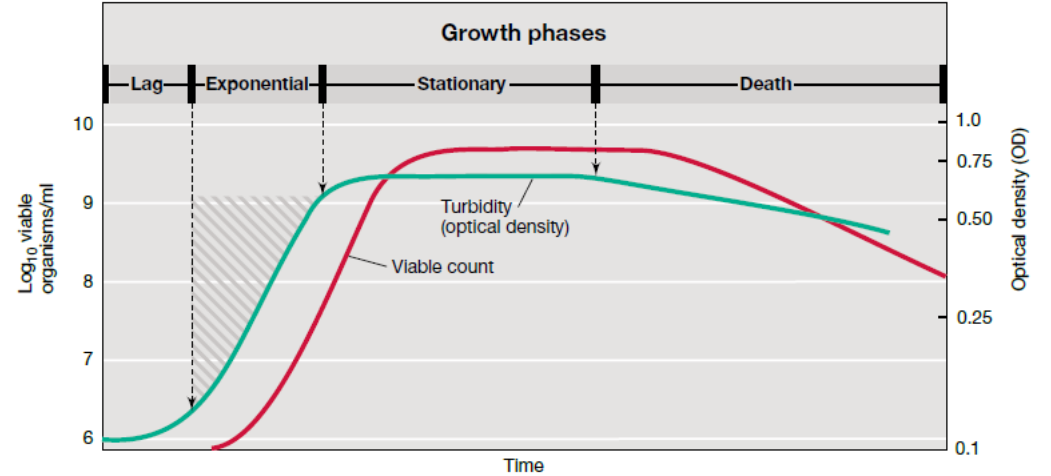
Gecikme (Lag) Fazının Özellikleri

- Taze bir besiyerine aktarılan kültürde büyüme hemen başlamaz; belirli bir gecikme dönemi görülür.
- Lag fazının süresi, inokulumun geçmişine, besiyerinin içeriğine ve büyüme koşullarına bağlı olarak değişir.
- Eğer üstel büyüyen bir kültür aynı ortam ve koşullara aktarılırsa lag fazı neredeyse hiç olmaz ve büyüme hemen başlar.
- Eski bir kültürden yapılan aktarımlarda ise hücrelerin bazı temel bileşenleri tükenmiştir ve bunları yeniden sentezlemek için zamana ihtiyaç duyulur.



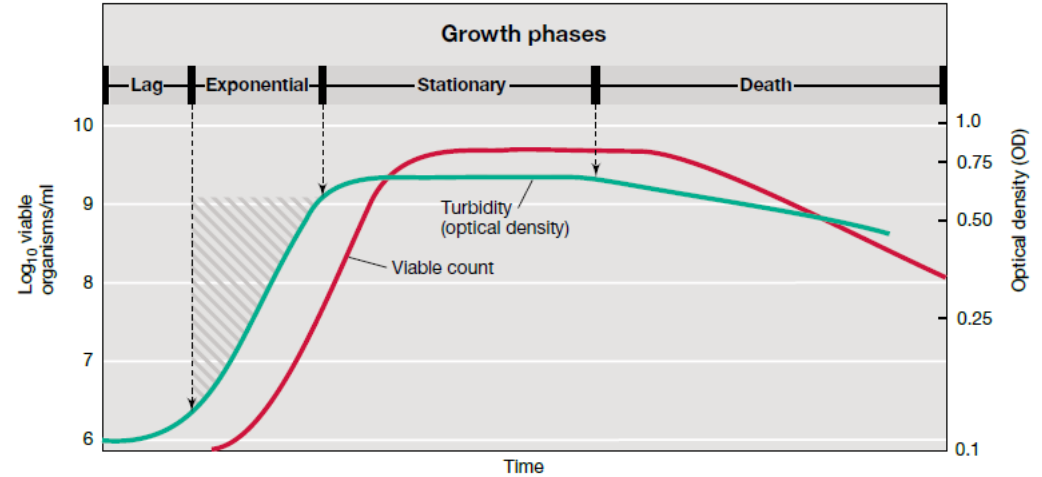
Besince Zengin ve Fakir Ortamlar Arası Transfer

- Besince zengin bir ortamdan besince fakir bir ortama aktarılan hücrelerde mutlaka lag fazı görülür.
- Bunun nedeni, ortamda bulunmayan temel metabolitleri sentezlemek için yeni enzimlerin üretilmesine ihtiyaç duyulmasıdır.
- Gerekli enzimlerin sentezi ve yeterli metabolit havuzunun oluşması için zamana ihtiyaç vardır.
- Bu süreçlerin tamamı lag fazı boyunca gerçekleşir.



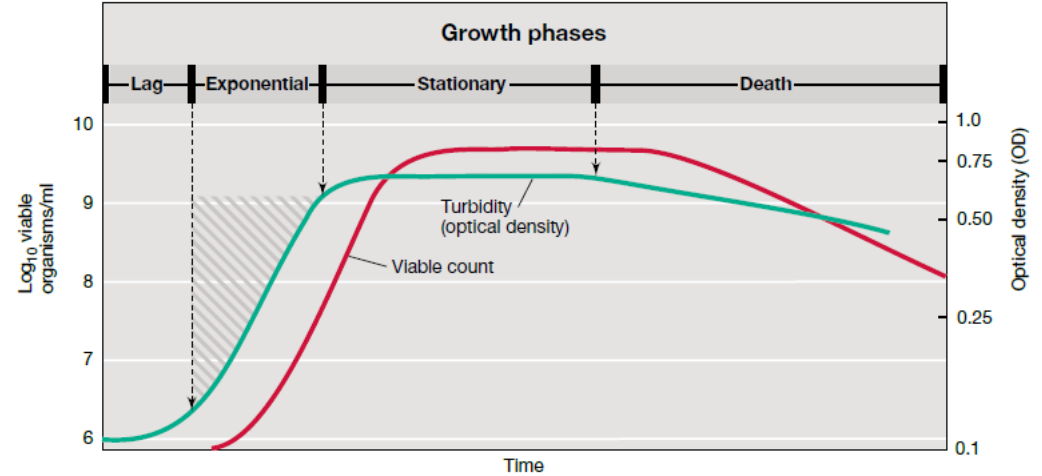
Üstel (Exponential) Fazın Başlaması ve Özellikleri

- Hücre popülasyonu düzenli aralıklarla ikiye katlandığında üstel faz başlamış olur.
- Üstel fazdaki hücreler en sağlıklı durumdadır ve enzim ya da diğer hücresel bileşenlerin çalışmaları için en uygun örneklerdir.
- Üstel büyüme hızı, hem büyüme ortamının özelliklerine hem de organizmanın genetik yapısına bağlı olarak büyük farklılıklar gösterir.
- Bu nedenle, bir organizmanın ne kadar hızlı büyüyebileceğini ancak laboratuvar koşulları sağlandığında öğrenmek mümkündür.



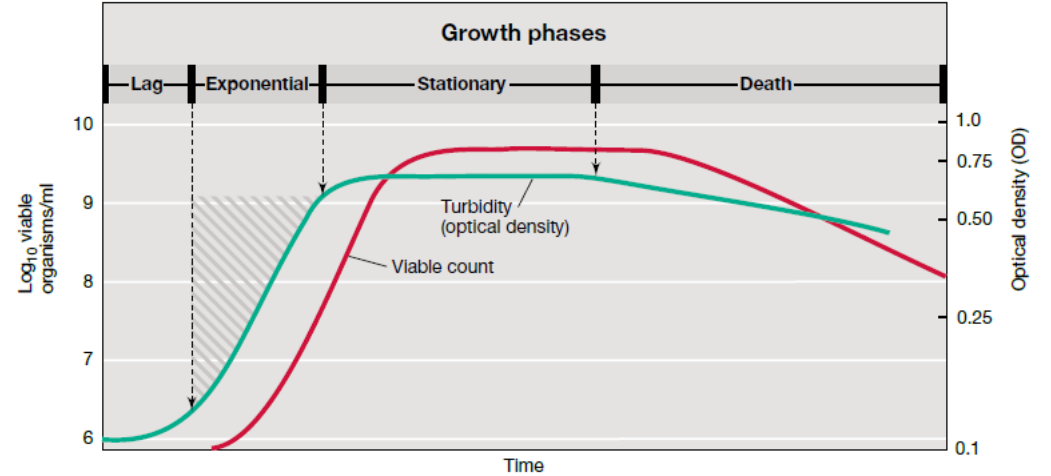
Farklı Organizmalarda Büyüme Hızları

- Genel olarak prokaryotlar, ökaryotlara kıyasla daha hızlı büyür.
- Küçük ökaryotlar büyük ökaryotlardan daha kısa sürede bölünme eğilimindedir.
- Üstel büyüme süreleri birkaç dakikadan birkaç haftaya kadar geniş bir aralıkta değişebilir.
- Dünya'nın derin, besince fakir bölgelerinde yaşayan bazı mikroorganizmalar ayda bir kez, hatta yılda bir kez bölünebilir.



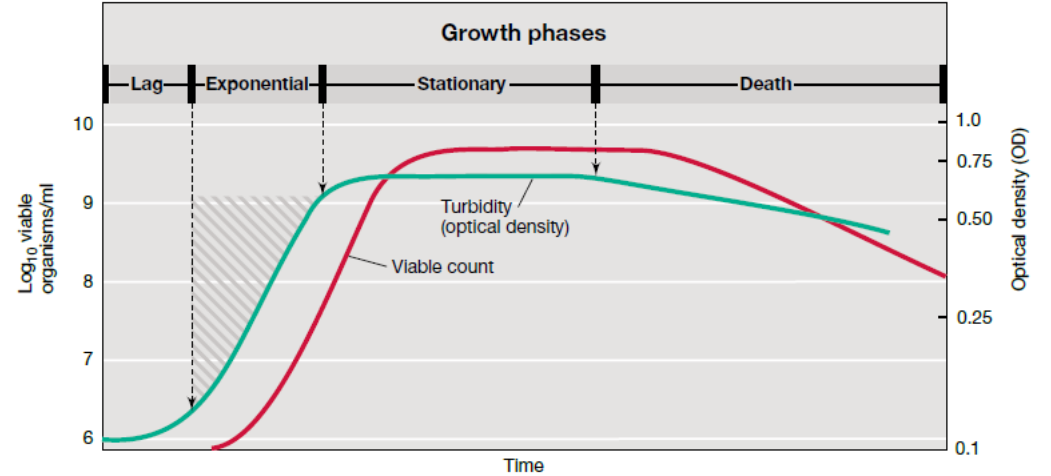
Üstel Büyümenin Sürdürülememesi

- Bir bakterinin 20 dakikalık bölünme süresiyle 48 saat boyunca üstel büyüme sürdürmesi teorik olarak Dünya'nın ağırlığının 4000 katı bir kütle oluştururdu.
- Bu durum pratikte mümkün değildir çünkü besiyerindeki temel besin maddeleri tükenir.
- Ayrıca hücrelerin oluşturduğu atık ürünler zamanla birikerek büyümeyi sınırlar.
- Bu nedenlerle kültür üstel büyümeyi bırakır ve durağan faza geçer.



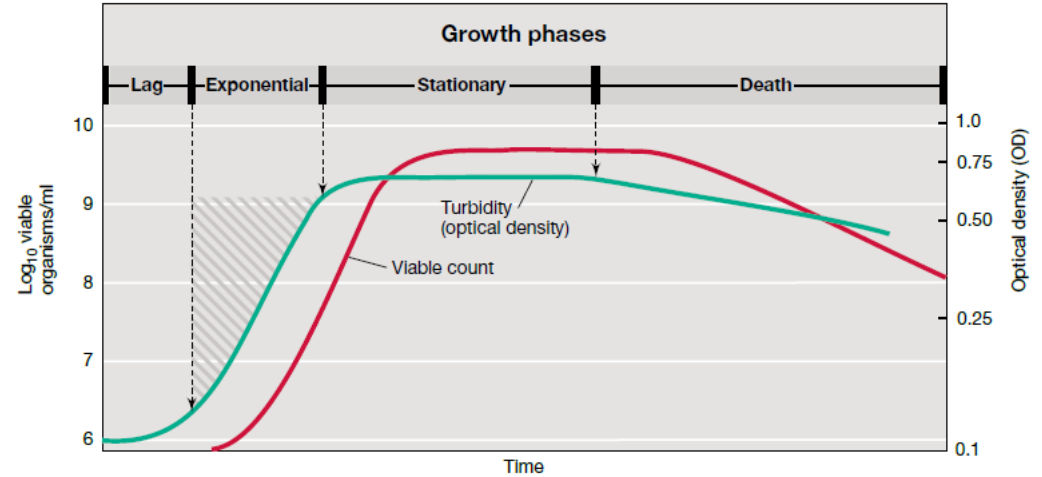
Durağan (Stationary) Fazın Özellikleri

- Durağan fazda popülasyonun net hücre sayısında artış ya da azalma olmaz; büyüme hızı sıfıra iner.
- Hücreler büyümeyi bıraksa da enerji metabolizması ve bazı biyosentetik süreçler düşük hızda devam edebilir.
- Bu fazda bazı hücreler bölünürken bazıları ölür ve bu iki süreç birbirini dengelediği için net artış olmaz (kriptik büyüme).



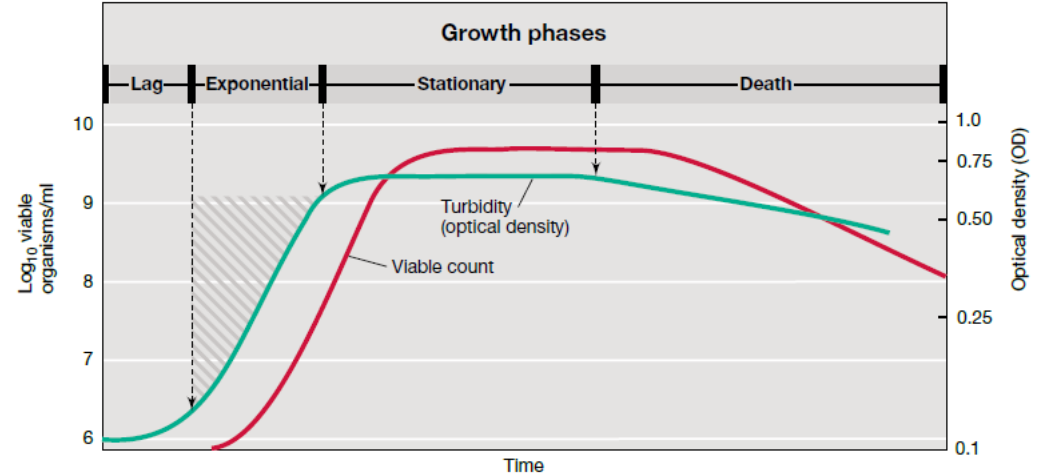
Ölüm (Death) Fazı ve Popülasyon Dinamikleri

- Zamanla popülasyon ölüm fazına girer ve hücre sayısı üstel bir hızla azalmaya başlar.
- Ancak ölüm hızı, üstel büyüme hızından çok daha düşüktür; pek çok hücre aylarca hatta yıllarca yaşayabilir.
- Büyüme eğrisindeki tüm fazların popülasyon düzeyinde tanımlandığı unutulmamalıdır.
- Lag, üstel, durağan ve ölüm fazları tek bir hücre için değil, hücre popülasyonları için anlam taşır.



Bireysel Hücre Büyümesi ve Ekolojik Önemi

- Tek bir hücrenin büyümesi, popülasyon büyümesinin ön koşuludur ancak büyüme fazları bireysel hücreler için geçerli değildir.
- Büyüme fazları, ancak çok sayıda hücre bir araya geldiğinde ölçülebilir hale gelir.
- Ekolojik açıdan anlamlı olan da popülasyon düzeyinde gerçekleşen mikrobiyal etkinliklerdir.
- Bu nedenle, yandaki büyüme eğrisi bir hücreyi değil, hücre topluluğunu temsil eder.

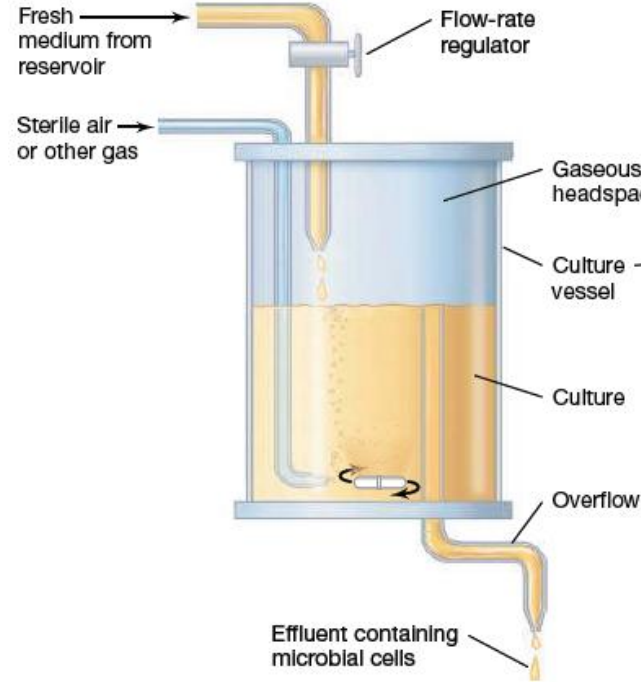


Sürekli Kültürün Temel Mantığı

- Sürekli kültürlerde ortam, taze besiyerinin sabit hızla eklenmesi ve eşit hacimde kültürün ortamdaki uzaklaştırılmasıyla sürekli dengede tutulur.
- Bu sistemde kültür hacmi, hücre sayısı ve besin–atık düzeyleri belirli bir eşikte sabitlenir ve kültür kararlı duruma (steady state) ulaşır.
- Sürekli kültürler, besinlerin tükenmesi ve atıkların birikmesi nedeniyle koşulların sürekli değiştiği batch kültürlerden farklı olarak açık sistemdir.

Kemostat: Temel Özellikler ve Kontrol Parametreleri

- Sürekli kültürlerin en yaygın tipi olan kemostat, hücrelerin büyüme hızının ve yoğunluğunun bağımsız şekilde kontrol edilebildiği bir düzendir.
- Kemostat'ta büyüme hızını belirleyen temel faktör seyreltme hızı ($D = F/V$) olup; taze besiyeri giriş ve çıkış hızını ifade eder.
- Hücre yoğunluğunu belirleyen bir diğer önemli faktör, besiyerine giren sınırlandırıcı besin maddesinin (örneğin C veya N kaynağı) miktarıdır.



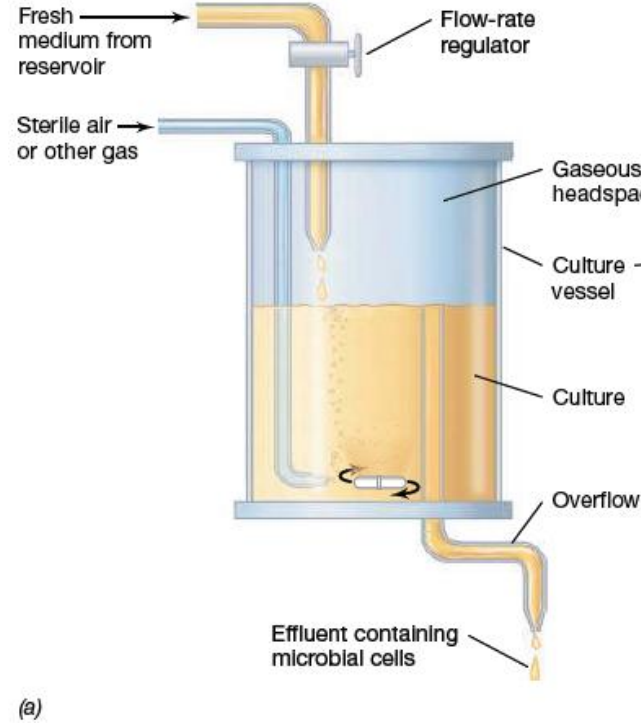
(a)



(b)

Kemostat'ta Başlangıç Büyümesi ve Geri Besleme Mekanizması

- Kültür ilk inoküle edildiğinde hücre sayısı hızlı artar ve artış hızı, dışarı taşınmayla kaybedilen hücrelerden fazladır.
- Hücre sayısı arttıkça besiyerindeki sınırlandırıcı besin hızla azalır ve bu azalma büyüme hızını düşüren doğal bir geri besleme oluşturur.
- Besin düzeyi, hücre kaybının telafi edildiği bir eşiğe düştüğünde sistem kararlı duruma gelir ve artık hücre yoğunluğu zamanla değişmez.

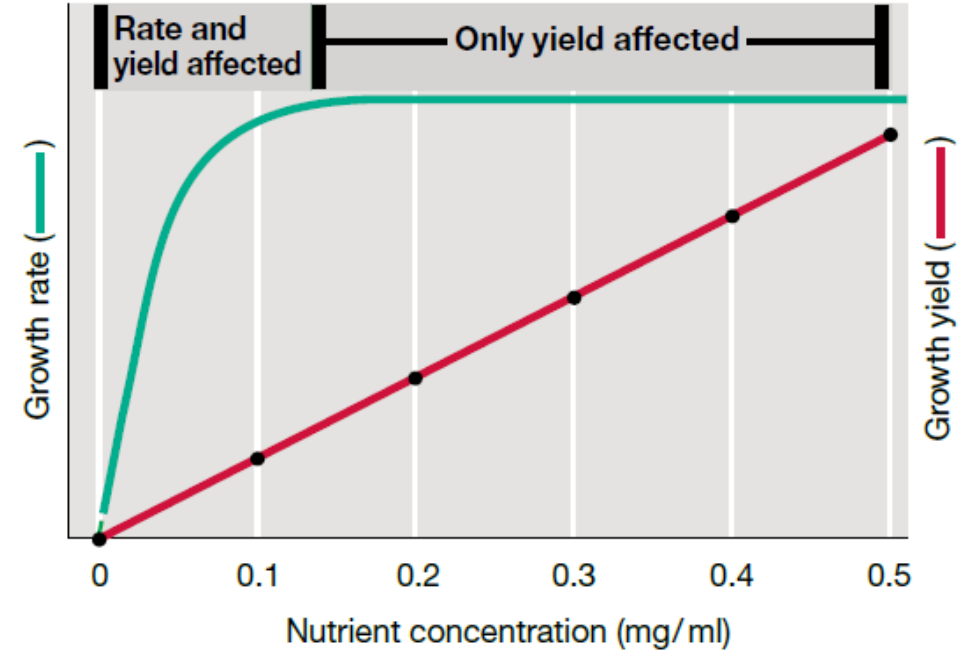


Hubert Bahl



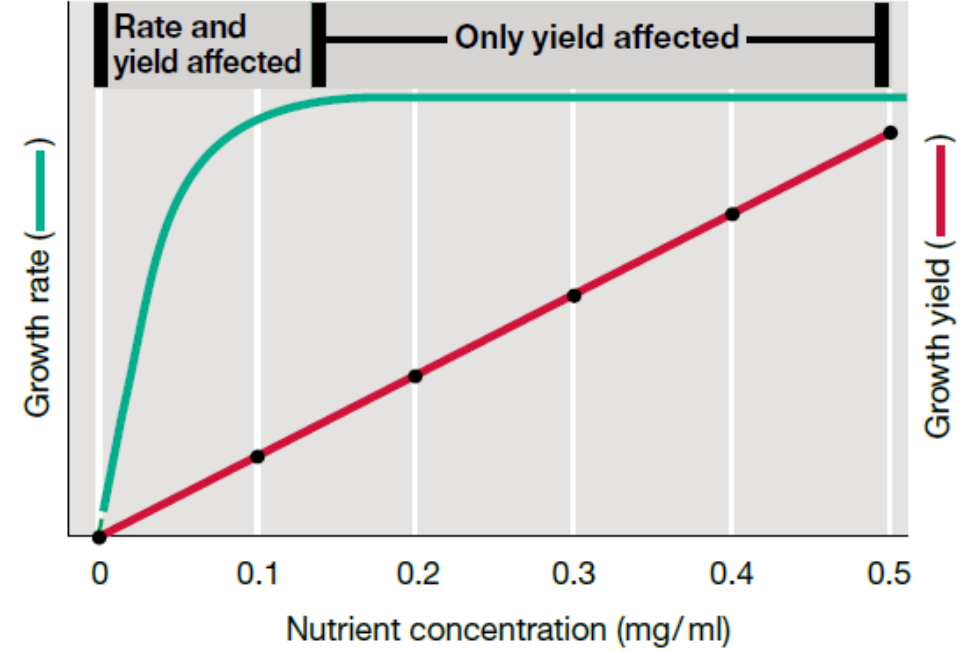
Kararlı Durumun (Steady State) Niteliği

- Kararlı durumda kültürün spesifik büyüme hızı, seyreltme hızına (D) eşittir; yani büyüme hızı ile dışarı taşınan hücre miktarı birbirini dengeler.
- Bu denge dinamik bir dengedir: hücreler sürekli büyürken aynı anda sistemden uzaklaştırılır.
- Büyüme hızının besin derişimine bağımlılığı ve geri besleme mekanizması, deneysel olarak pompa hızı ayarlanarak büyüme hızının seçilebilmesini sağlar.



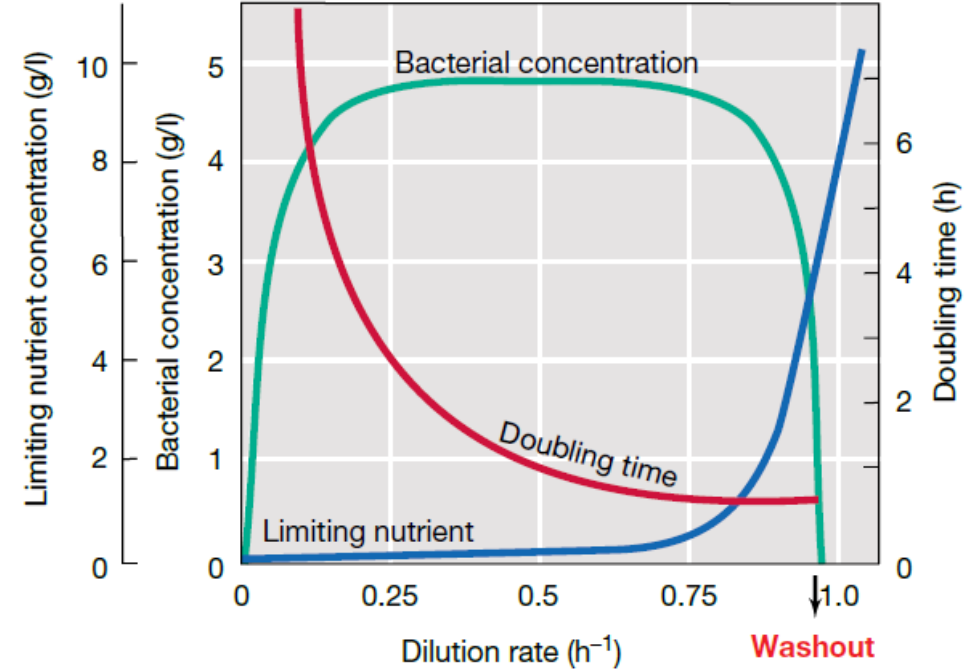
Batch Kültür ile Karşılaştırma

- Batch kültürde besin düzeyi hem büyüme hızını hem de hücre verimini etkilerken, besin miktarı maksimum büyüme hızını aşınca yalnızca hücre verimi artar.
- Kemostat'ta ise besin düzeyi ve seyreltme hızı ayrı ayrı kontrol edildiğinden büyüme hızı istenen değerde sabit tutulabilir.
- Bu yapı, kemostat'ı büyüme kinetiği çalışmalarında çok güçlü bir deneysel sistem hâline getirir.



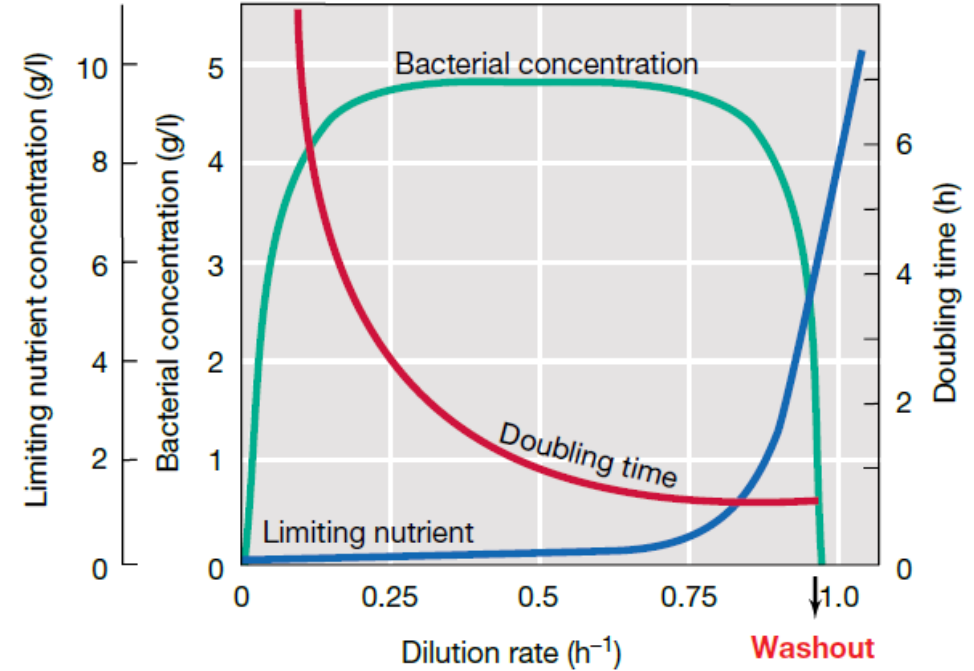
Seyreltme Hızının (D) Etkileri

- Seyreltme hızının değişimiyle büyüme hızı geniş bir aralıkta kontrol edilebilir.
- Çok düşük ya da çok yüksek D değerlerinde sistem kararlı durumu koruyamaz ve aktif büyüme sürdürülemez.
- Sınırlandırıcı besinin konsantrasyonu artırıldığında, hücre yoğunluğu artar; ancak büyüme hızı sabit D nedeniyle aynı kalır.



Farklı Yoğunluklarda Hücre Popülasyonları Oluşturma

- D ve sınırlandırıcı besin düzeyleri ayarlanarak 10^5 hücre/ml'den 10^9 hücre/ml'ye kadar çok farklı yoğunluklarda kültürler üretilebilir.
- Aynı büyüme hızında, yalnızca hücre yoğunluğu değiştirilerek ince ayarlı popülasyonlar elde edilebilir.
- Bu özellik, fizyolojik deneylerde standartlaştırılmış kültürlerle çalışmayı kolaylaştırır.



Kemostat'ın Deneysel Avantajı: Uzun Süreli Üstel Büyüme

- Kemostat, hücreleri üstel fazda haftalarca hatta aylarca tutabilir; bu faz, fizyolojik deneyler için en ideal olandır.
- Kültür istenildiği an örneklenebilir ve sürekli aynı büyüme hızında taze üstel faz hücrelerine erişilebilir.
- Bu sistem sayesinde ribozom içeriğinin büyüme hızına göre değişimi gibi temel fizyolojik ilkeler ortaya konulabilir.

Ekoloji ve Evrim Çalışmalarında Kemostat Kullanımı

- Kemostat, doğal ortamlardaki düşük besin derişimlerini taklit edebilir ve bu da türler arası rekabetin farklı büyüme hızlarında incelenmesine imkân sağlar.
- Seyreltme hızı (D) veya sınırlandırıcı besin değiştirilerek karışık kültürlerde hangi türün baskın çıktığı gözlemlenebilir.
- Saf kültürlerde büyüme baskısı oluşturularak, yeni fizyolojik özellikler geliştiren mutantların seçilimi hızlandırılabilir.

Doğadan İzolasyon ve Zenginleştirme İçin Kemostat

- Doğal bir örnekten, belirli besin ve seyreltme hızı (D) koşullarına uyum sağlayan stabil popülasyonlar seçilebilir.
- Başlangıç popülasyonu daraltmak için seyreltme hızı (D) yavaşça artırılarak tek bir organizma baskın hale getirilebilir.
- Bu yöntemle toprak bakterileri arasında 6 dakikalık bölünme süresine sahip, bilinen en hızlı büyüyen bakteri izole edilmiştir.

Mikroorganizmaların Kültürde Yetiştirilmesi

- Laboratuvar ortamında mikroorganizmaların nasıl yetiştirildiği ve büyümelerinin nasıl ölçüldüğü mikrobiyolojide temel bir çalışma alanıdır.
- Bu süreçler, hem mikrobiyologların hem de laboratuvarların günlük rutininde sıkça yer alan uygulamalardır.
- Kültürleme yöntemlerinin doğru anlaşılması, mikroorganizmaların biyolojisini ayrıntılı biçimde inceleyebilmek için zorunludur.

Kültür Ortamlarının Önemi

- Mikroorganizmalar, büyümelerini destekleyecek şekilde özel olarak hazırlanmış kültür ortamlarında yetiştirilir.
- Laboratuvar kültürü, herhangi bir mikroorganizmanın detaylı incelenebilmesi için gerekli olduğu için ortam seçimi ve hazırlanışı büyük özen gerektirir.
- Kültür ortamları kullanılmadan önce mutlaka sterilize edilir ve bu sterilizasyon tipik olarak basınç altında ısıtarak çalışan otoklav ile sağlanır.
- Otoklavın çalışma prensipleri ve sterilizasyonla ilgili diğer yöntemler bu bölümün ilerleyen slaytlarında ele alınacaktır.

Kültür Ortamı Sınıfları

- Mikrobiyolojide kültür ortamları genel olarak tanımlanmış (defined) ve kompleks (complex) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır.
- Tanımlanmış ortamlar, saf kimyasalların belirli miktarlarda eklenmesiyle hazırlanır ve bileşimleri hem niteliksel hem niceliksel olarak tam olarak bilinir.
- Her kültür ortamında karbon kaynağı kritik öneme sahiptir ve miktarı ile türü kültüre alınacak mikroorganizmaya bağlı olarak değişir.

Tanımlanmış Kültür Ortamlarının Özellikleri

- Bazı tanımlanmış ortamlar “basit” olarak kabul edilir çünkü sadece tek bir karbon kaynağı içerir ve bu duruma *E. coli* için verilen yandaki örnek ortam dahildir.
- Bu ortamda *E. coli*, glukozdan başlayarak gerekli tüm organik molekülleri kendisi sentezlemek zorundadır.
- Tanımlanmış ortamların tercih edilmesi, özellikle mikroorganizmanın metabolik gereksinimlerini ayrıntılı olarak bilmek isteyen araştırmacılar için avantaj sağlar.

Defined culture medium for *Escherichia coli*

K_2HPO_4 7 g

KH_2PO_4 2 g

$(NH_4)_2SO_4$ 1 g

$MgSO_4$ 0.1 g

$CaCl_2$ 0.02 g

Glucose 4–10 g

Trace elements (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo)
2–10 µg each

Distilled water 1000 ml

pH 7



(a)

Kompleks Kùltür Ortamları

- Pek çok mikroorganizmanın kùltüre alınması için ortamın tam bileşiminin bilinmesi gerekmediğinden, kompleks ortamlar çoğu zaman yeterli ve pratik bir seçenek oluşturur.
- Kompleks ortamlar; kazein, et ekstraktı, maya ekstraktı veya soya gibi mikroorganizma, hayvan ya da bitki kökenli ürünlerin hidrolizatlarından elde edilir.
- Bu ortamlar ticari olarak susuz (dehidre) halde bulunur ve sadece saf su ile karıştırılarak hazırlanabilir.
- Ancak bu ortamların dezavantajı, besinsel içeriklerinin tam olarak bilinmemesidir.

Complex culture medium for either E. coli or L. mesenteroides

Glucose 15 g

Yeast extract 5 g

Peptone 5 g

KH₂PO₄ 2 g

Distilled water 1000 ml

pH 7



Zenginleştirilmiş (Enriched) Ortamlar ve Özel Kullanımlar

- Zenginleştirilmiş ortamlar, besinsel açıdan yüksek gereksinimleri olan (fastidious) mikroorganizmaların, özellikle de birçok patojenin kültürlenmesi için kullanılan kompleks ortamlardır.
- Bu ortamlar, serum veya kan gibi ek besleyici maddeler içererek daha seçici bir büyüme sağlayabilir.
- Ayrıca, bazı kültür ortamları tanı amaçlı çalışmalarda kullanılmak üzere seçici, ayırıcı (differential) veya her ikisi birden olacak şekilde hazırlanır.
- Ayırıcı ortamlara eklenen indikatör boyalar, belirli metabolik reaksiyonların gerçekleşip gerçekleşmediğini renk değişimi ile gösterir.

Seçici ve Ayırıcı Ortamların Kullanımı

- Seçici ortamlar bazı mikroorganizmaların büyümesini baskılarken diğerlerinin büyümesine izin verir ve böylece hedef organizmaların izolasyonunu kolaylaştırır.
- *Salmonella* ya da gıda kaynaklı hastalıklara yol açan belirli *E. coli* suşları için geliştirilmiş seçici ortamlar buna örnektir.
- Ayırıcı ortamlar, büyüme sırasında gerçekleşen belirli metabolik olayları görünür kılan indikatörler içerir ve bu ortamlar klinik tanıda yaygın biçimde kullanılır.

Besin Gereksinimleri

- Yanda verilen dört kültür ortamından üçü tanımlanmış, biri ise komplekstir ve kompleks ortam hem *E. coli* hem de *Leuconostoc mesenteroides* için büyümeyi destekler.
- Basit tanımlanmış ortam *E. coli*'nin büyümesini desteklese de *L. mesenteroides* için yeterli değildir çünkü bu türün ek besinlere gereksinimi vardır.

Defined culture medium for <i>Escherichia coli</i>	Defined culture medium for <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Complex culture medium for either <i>E. coli</i> or <i>L. mesenteroides</i>	Defined culture medium for <i>Thiobacillus thioparus</i>
K ₂ HPO ₄ 7 g KH ₂ PO ₄ 2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g MgSO ₄ 0.1 g CaCl ₂ 0.02 g Glucose 4–10 g Trace elements (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7	K ₂ HPO ₄ 0.6 g KH ₂ PO ₄ 0.6 g NH ₄ Cl 3 g MgSO ₄ 0.1 g Glucose 25 g Sodium acetate 25 g Amino acids (alanine, arginine, asparagine, aspartate, cysteine, glutamate, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine) 100–200 µg of each Purines and pyrimidines (adenine, guanine, uracil, xanthine) 10 mg of each Vitamins (biotin, folate, nicotinic acid, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxine, riboflavin, thiamine, pantothenate, p-aminobenzoic acid) 0.01–1 mg of each Trace elements (as in first column) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7	Glucose 15 g Yeast extract 5 g Peptone 5 g KH ₂ PO ₄ 2 g Distilled water 1000 ml pH 7	KH ₂ PO ₄ 0.5 g NH ₄ Cl 0.5 g MgSO ₄ 0.1 g CaCl ₂ 0.05 g KCl 0.5 g Na ₂ S ₂ O ₃ 2 g Trace elements (as in first column) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7 Carbon source: CO ₂ from air



Besin Gereksinimleri

- *L. mesenteroides*'in tanımlanmış ortamda yetişebilmesi için birçok ek besinin tek tek ilave edilmesi gerekir ki bu oldukça zahmetli bir hazırlıktır.
- Kompleks ortam kullanmak ise bu tür için çok daha pratik bir çözüm sunar.

Defined culture medium for Escherichia coli	Defined culture medium for Leuconostoc mesenteroides	Complex culture medium for either E. coli or L. mesenteroides	Defined culture medium for Thiobacillus thioparus
K ₂ HPO ₄ 7 g KH ₂ PO ₄ 2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g MgSO ₄ 0.1 g CaCl ₂ 0.02 g Glucose 4–10 g Trace elements (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7	K ₂ HPO ₄ 0.6 g KH ₂ PO ₄ 0.6 g NH ₄ Cl 3 g MgSO ₄ 0.1 g Glucose 25 g Sodium acetate 25 g Amino acids (alanine, arginine, asparagine, aspartate, cysteine, glutamate, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine) 100–200 µg of each Purines and pyrimidines (adenine, guanine, uracil, xanthine) 10 mg of each Vitamins (biotin, folate, nicotinic acid, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxine, riboflavin, thiamine, pantothenate, p-aminobenzoic acid) 0.01–1 mg of each Trace elements (as in first column) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7	Glucose 15 g Yeast extract 5 g Peptone 5 g KH ₂ PO ₄ 2 g Distilled water 1000 ml pH 7	KH ₂ PO ₄ 0.5 g NH ₄ Cl 0.5 g MgSO ₄ 0.1 g CaCl ₂ 0.05 g KCl 0.5 g Na ₂ S ₂ O ₃ 2 g Trace elements (as in first column) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7 Carbon source: CO ₂ from air



Farklı Mikroorganizmaların Besinsel Kapasiteleri

- Yanda listelenen dördüncü ortam, *Thiobacillus thioparus*'un büyümesini destekler ancak diğer organizmaların hiçbirinin büyümesini desteklemez.
- Bunun nedeni *T. thioparus*'un hem kemolitotrof hem de ototrof olması ve bu nedenle organik karbon gereksiniminin bulunmamasıdır.

Defined culture medium for <i>Escherichia coli</i>	Defined culture medium for <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Complex culture medium for either <i>E. coli</i> or <i>L. mesenteroides</i>	Defined culture medium for <i>Thiobacillus thioparus</i>
K ₂ HPO ₄ 7 g KH ₂ PO ₄ 2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g MgSO ₄ 0.1 g CaCl ₂ 0.02 g Glucose 4–10 g Trace elements (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7	K ₂ HPO ₄ 0.6 g KH ₂ PO ₄ 0.6 g NH ₄ Cl 3 g MgSO ₄ 0.1 g Glucose 25 g Sodium acetate 25 g Amino acids (alanine, arginine, asparagine, aspartate, cysteine, glutamate, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine) 100–200 µg of each Purines and pyrimidines (adenine, guanine, uracil, xanthine) 10 mg of each Vitamins (biotin, folate, nicotinic acid, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxine, riboflavin, thiamine, pantothenate, p-aminobenzoic acid) 0.01–1 mg of each Trace elements (as in first column) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7	Glucose 15 g Yeast extract 5 g Peptone 5 g KH ₂ PO ₄ 2 g Distilled water 1000 ml pH 7	KH ₂ PO ₄ 0.5 g NH ₄ Cl 0.5 g MgSO ₄ 0.1 g CaCl ₂ 0.05 g KCl 0.5 g Na ₂ S ₂ O ₃ 2 g Trace elements (as in first column) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7 Carbon source: CO ₂ from air



Farklı Mikroorganizmaların Besinsel Kapasiteleri

- *T. thioparus* tüm karbonunu CO₂'den sağlar ve enerjisini tiyosülfatın (Na₂S₂O₃) oksidasyonundan kazanır.
- Bu özellikleri sayesinde, yanda yer alan organizmalar arasında en yüksek biyosentetik kapasiteye sahip türdür.

Defined culture medium for <i>Escherichia coli</i>	Defined culture medium for <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Complex culture medium for either <i>E. coli</i> or <i>L. mesenteroides</i>	Defined culture medium for <i>Thiobacillus thioparus</i>
K ₂ HPO ₄ 7 g KH ₂ PO ₄ 2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g MgSO ₄ 0.1 g CaCl ₂ 0.02 g Glucose 4–10 g Trace elements (Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni, Mo) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7	K ₂ HPO ₄ 0.6 g KH ₂ PO ₄ 0.6 g NH ₄ Cl 3 g MgSO ₄ 0.1 g Glucose 25 g Sodium acetate 25 g Amino acids (alanine, arginine, asparagine, aspartate, cysteine, glutamate, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine) 100–200 µg of each Purines and pyrimidines (adenine, guanine, uracil, xanthine) 10 mg of each Vitamins (biotin, folate, nicotinic acid, pyridoxal, pyridoxamine, pyridoxine, riboflavin, thiamine, pantothenate, p-aminobenzoic acid) 0.01–1 mg of each Trace elements (as in first column) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7	Glucose 15 g Yeast extract 5 g Peptone 5 g KH ₂ PO ₄ 2 g Distilled water 1000 ml pH 7	KH ₂ PO ₄ 0.5 g NH ₄ Cl 0.5 g MgSO ₄ 0.1 g CaCl ₂ 0.05 g KCl 0.5 g Na ₂ S ₂ O ₃ 2 g Trace elements (as in first column) 2–10 µg each Distilled water 1000 ml pH 7 Carbon source: CO ₂ from air

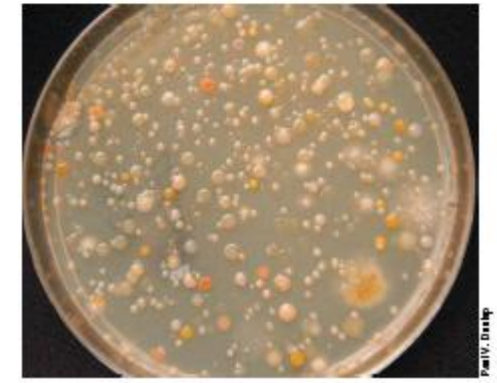
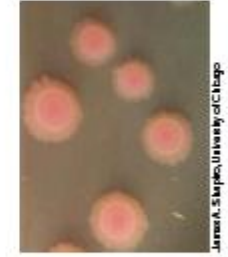
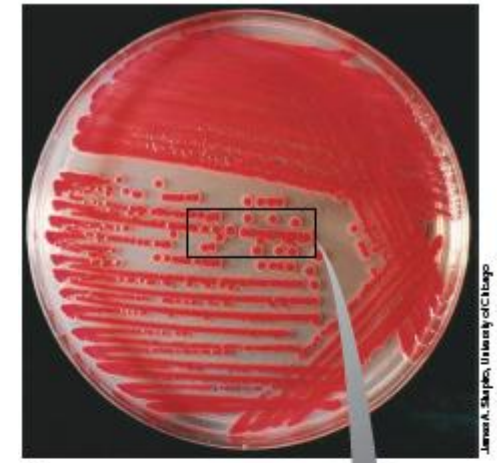


Genel Sonuç: Besin Gereksinimlerinin Önemi

- Mikroorganizmaların besinsel gereksinimleri birbirinden çok farklı olabilmektedir.
- Başarılı bir kültürleme için organizmanın fizyolojisini ve besinsel ihtiyaçlarını doğru anlamak büyük önem taşır.
- Mikroorganizmaya sağlanacak besinlerin türü ve miktarı, tamamen bu gereksinimlere uygun şekilde ayarlanmalıdır.
- Doğru besinsel koşullar sağlandığında, kültürleme süreci hem kolaylaşır hem de araştırma açısından daha güvenilir hale gelir.

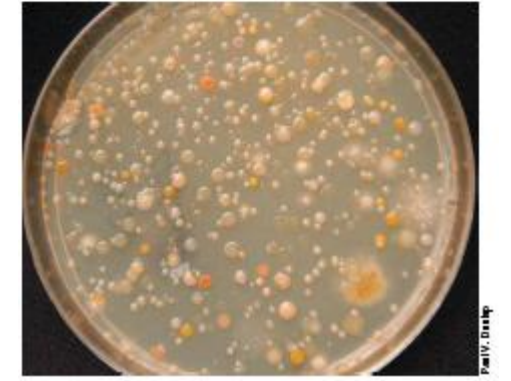
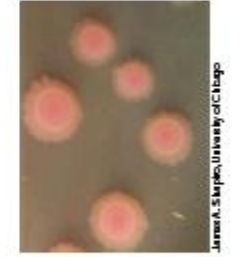
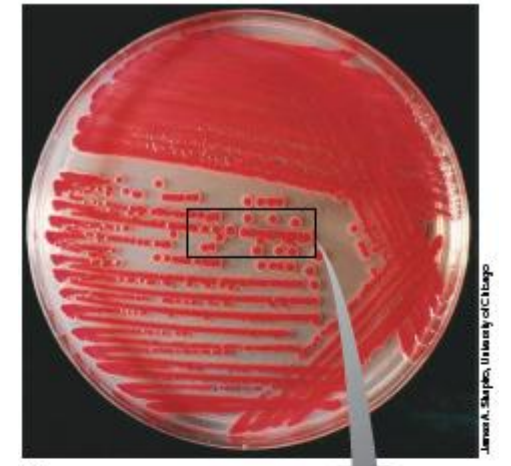
Laboratuvar Kùltürlerinin Temeli

- Steril bir kùltür ortamı hazırlandığında, mikroorganizmalar bu ortama inoküle edilerek uygun koşullarda inkübe edilir.
- Laboratuvar çalışmalarında inokülasyon genellikle saf kùltürlerle yapılır ve kùltür ortamı sıvı ya da katı olabilir.
- Katı ortamlar agar ile katılaştırılır ve hücreler burada koloniler adı verilen görünür, izole kitleler oluşturur.
- Koloni şekli, büyüklüğü ve rengi; organizmanın özelliklerine, besin durumuna ve kùltür koşullarına bağılı olarak değişir.



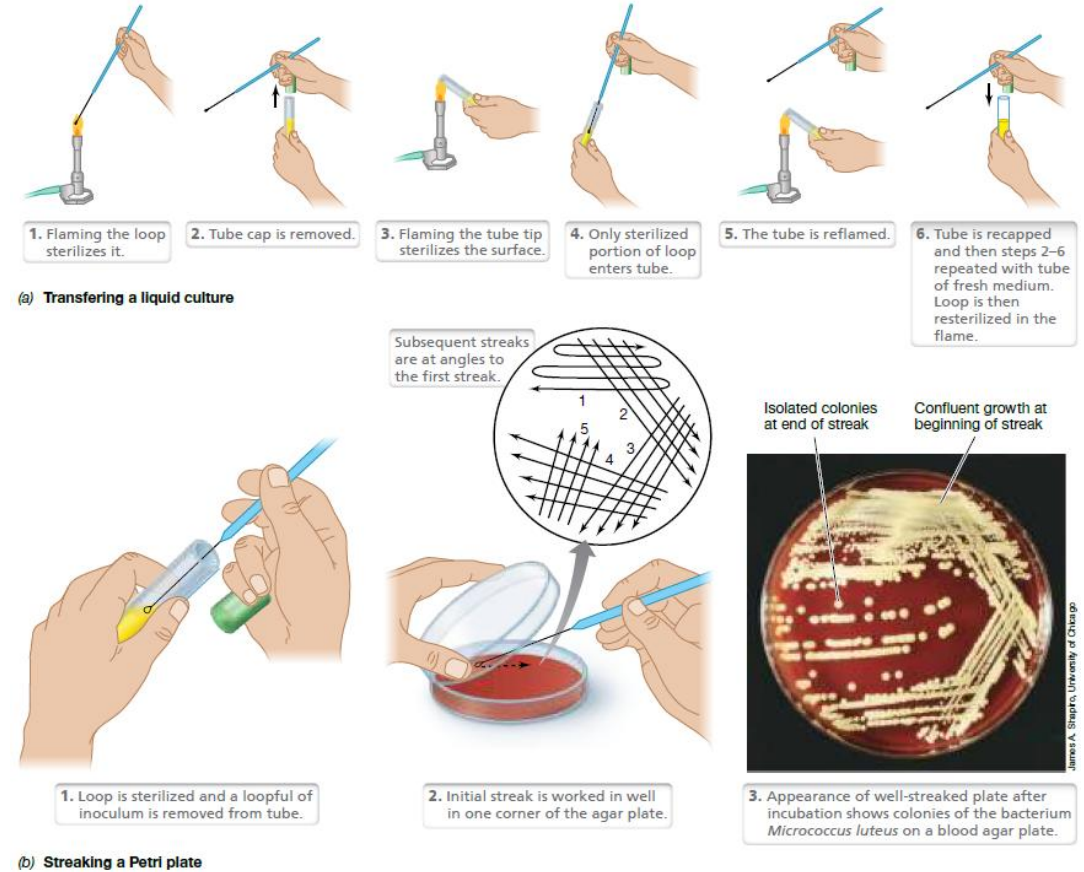
Kolonilerin İşlevi ve Koloni Çeşitliliği

- Bazı mikroorganizmalar pigment üreterek kolonilerin renk kazanmasına neden olur.
- Koloniler, bir kültürün yapısı ve olası saflığı hakkında mikrobiyoloğa görsel ipuçları sunar.
- Karışık kültürlerden (örneğin doğal örnekler, Figür e) ya da kontamine saf kültürlerden inoküle edilen plaklarda genellikle birden fazla koloni tipi görülür.
- Bu çeşitlilik, kültürün karışık olup olmadığı konusunda ön değerlendirme yapılmasını sağlar.



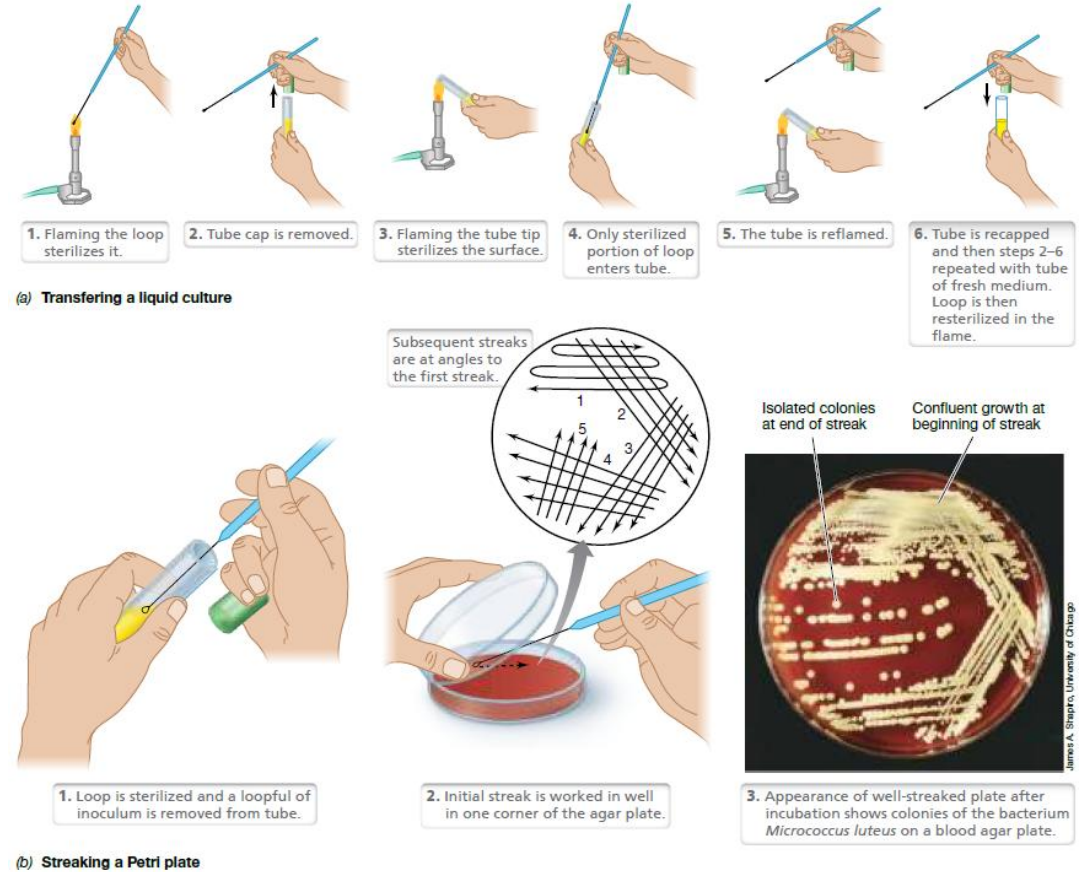
Aseptik Teknik: Üretim ve Koruma

- Steril bir kültür ortamı hazırlandıktan sonra, sonraki adım aseptik teknik gerektiren inokülasyondur.
- Aseptik teknik, kültürleri ve sıvı/katı steril ortamları manipüle ederken kontaminasyonu önlemek için uygulanan adımlar bütünüdür.



Aseptik Teknik: Üretim ve Koruma

- Sıvı kültürlerde amaç, tüp veya şişe ağzını hava akımlarından ve steril olmayan yüzeylerden koruyarak transfer yapabilmektir (Figür a).
- Agar plaklarında ise özellikle agar yüzeyini aerosollerden ve düşebilecek partiküllerden korumaya özen gösterilir (Figür b).



Saf Kültür Elde Etme ve Aseptik Teknik Becerisi

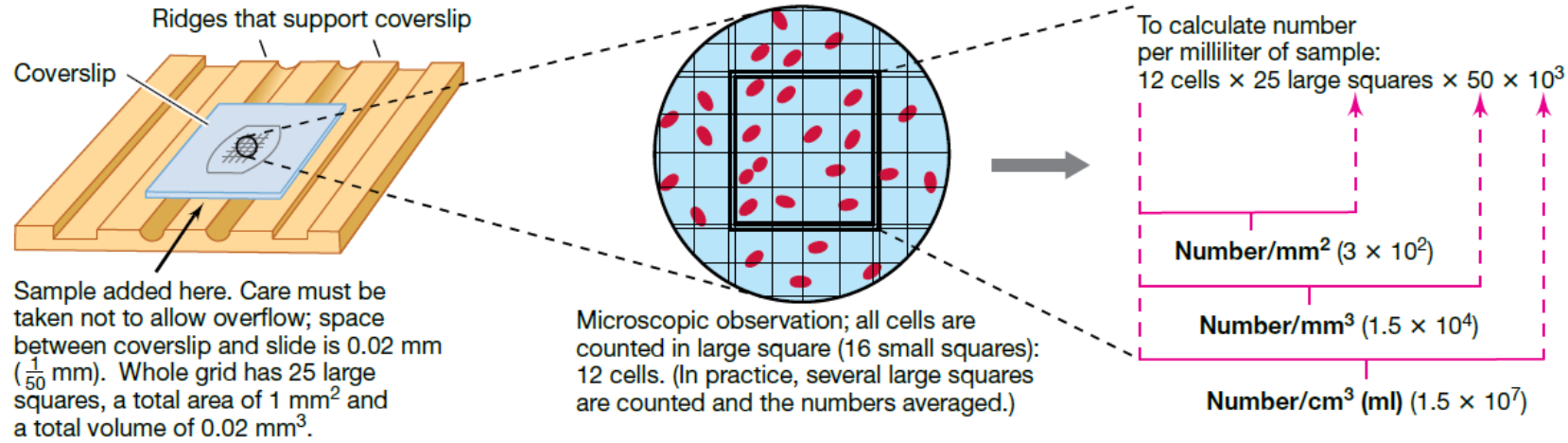
- Saf kültürlerin korunması için aseptik tekniğin iyi derecede uygulanması şarttır; çünkü havada oldukça fazla kontaminant bulunur.
- İzole bir koloniyi seçip yeniden çizerek saf kültür elde etmek, mikrobiyolojide temel uygulamalardan biridir.
- Farklı ve özel büyüme gereksinimleri olan bakteri grupları için geliştirilmiş başka saf kültür elde etme yöntemleri de vardır (ilgili yöntemler Bölüm 19'da tartışılmaktadır).
- Bu uygulamalar, laboratuvar ortamında kültürlerin doğruluğunu ve güvenilirliğini sürdürmek için kritik önem taşır.

Mikrobiyal Hücre Sayımı

- Hücre sayılarını belirlemek, bir kültürün ya da mikrobiyal topluluğun durumu hakkında nicel bilgi sağlar.
- Mikrobiyal popülasyonları saymak için çeşitli yöntemler geliştirilmiş olup her birinin avantajları ve sınırlılıkları bulunur.
- Klasik yaklaşım olan “toplam sayım” yöntemi, kültürlerin ya da doğal örneklerin mikroskopik incelemeyle değerlendirilmesine dayanır.
- Bu yöntem, hızlı bir genel değerlendirme sunması nedeniyle yaygın olarak uygulanır.

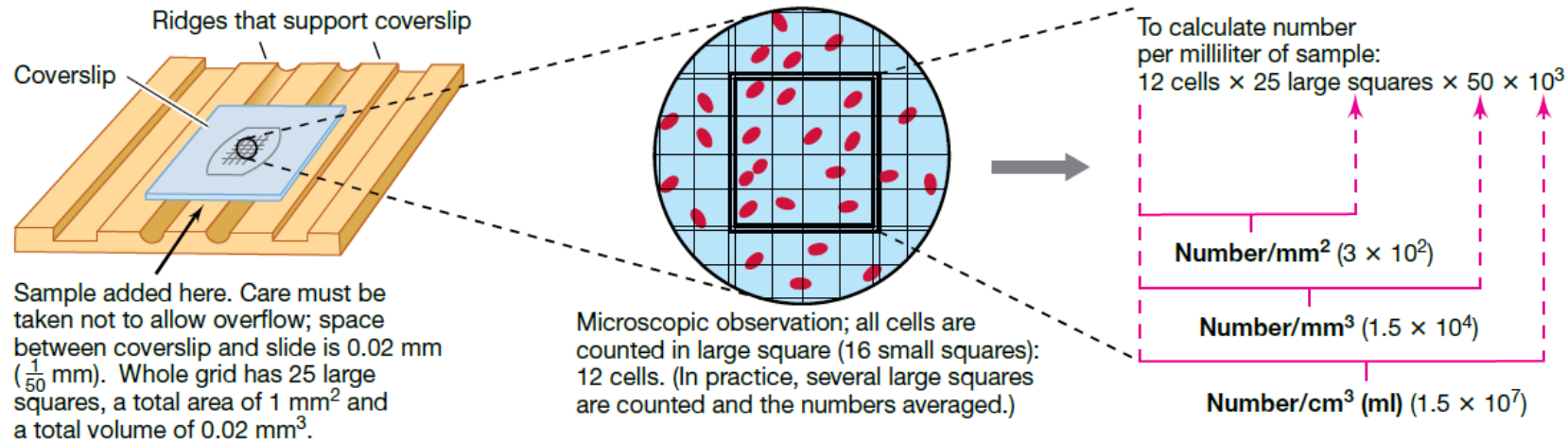
Toplam Hücre Sayımı: Mikroskobik İnceleme

- Toplam hücre sayımı, örnekteki hücrelerin mikroskop altında gözlenip sayılmasıyla yapılır.
- Sayımlar, lam üzerinde kurutulmuş örnekler veya sıvı örnekler üzerinden gerçekleştirilebilir; kurutulmuş preparatlar kontrast artırmak için boyanabilir.



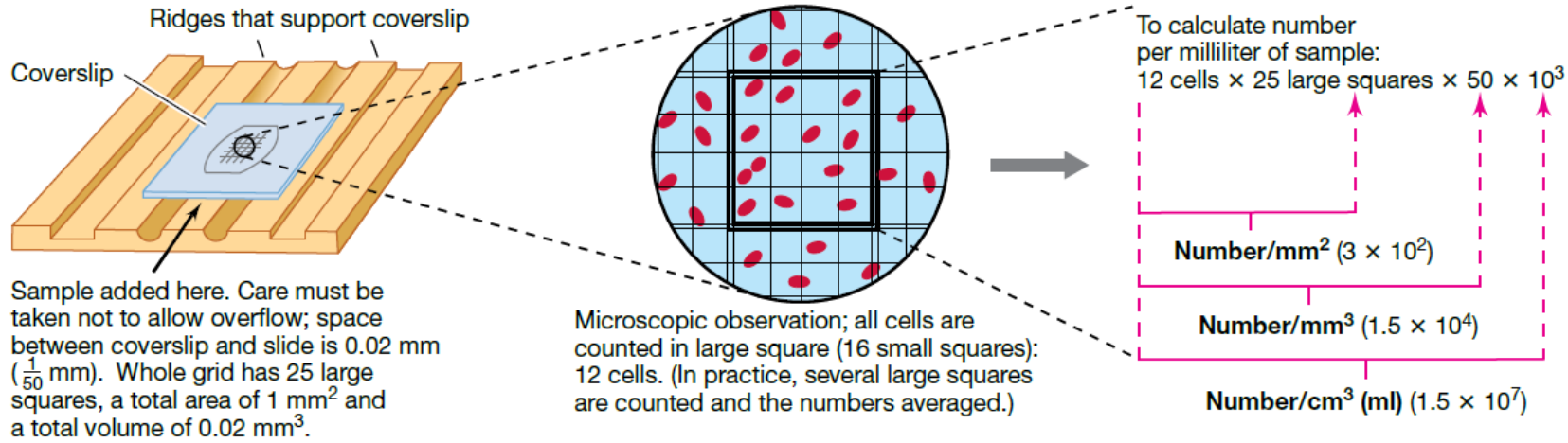
Toplam Hücre Sayımı: Mikroskobik İnceleme

- Sıvı örnekler için, yüzeyine karelerden oluşan bir ızgara kazınmış özel sayım odacıkları kullanılır.
- Kapak yerleştirildiğinde her kare belirli bir hacme karşılık gelir ve bu hacimdeki hücre sayısı mikroskopta sayılarak hesaplanır.



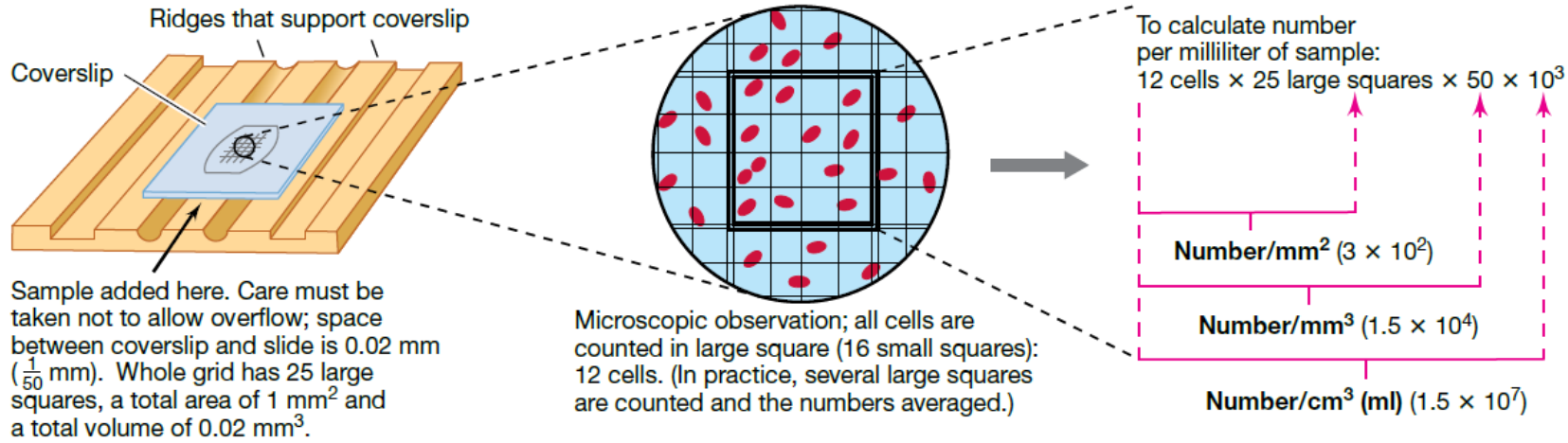
Hücre Yoğunluğunun Hesaplanması

- Izgara üzerindeki karelerde görülen hücre sayısı, odacığın tanımlı hacmine göre değerlendirilerek örneğin mililitre başına düşen hücre sayısı bulunur.
- Bu yöntem, hızlı ve temel bir nicel tahmin sağlar; özellikle yoğun örneklerde oldukça kullanışlıdır.



Hücre Yoğunluğunun Hesaplanması

- Ancak doğru sonuç için sayım odacığının özellikleri ve hesaplamada kullanılan dönüşüm faktörleri titizlikle uygulanmalıdır.
- Mikroskopik tekniklerin doğru kullanımı, sonuçların güvenilirliği açısından kritik öneme sahiptir.



Mikroskopik Sayımın Sınırlılıkları

- Özel boyama teknikleri uygulanmadıkça, canlı ve ölü hücreler birbirinden ayırt edilemez.
- Hücreler çok küçük olduğunda görüntülemek zorlaşabilir ve bu durum sayım hatalarına yol açabilir.
- Düşük yoğunluklu süspansiyonlarda (yaklaşık 10^6 hücre/mL'nin altı) mikroskop alanında hücre görülmesi güçtür; örnek çoğu zaman yoğunlaştırılıp küçük bir hacimde yeniden süspanse edilmelidir.
- Motil (hareketli) hücreler sayımdan önce öldürülmeli veya hareketsiz hâle getirilmelidir; ayrıca örnekteki partiküller hücrelerle karıştırılarak yanlış sayımlara neden olabilir.

Mikroskopik Hücre Sayımlarının Rolü

- Mikrobiyal ekolojide, bazı sınırlılıklarına rağmen doğal örneklerde mikroskopik hücre sayımları sıkça kullanılır.
- Bu yöntemde, hücrelerin görünür olmasını sağlamak için örnekler çeşitli boyalarla boyanır.
- Kullanılan bazı boyalar, hücrelerin filogenetik özellikleri veya metabolik durumları hakkında ek bilgiler sağlar.

Genel Kullanılan Boyalar

- DAPI boyası, DNA ile reaksiyona girdiği için tüm hücreleri boyar.
- Diğer bazı genel floresan boyalar, hücre zarının bütünlüğüne bakarak canlı ve ölü hücreleri ayırt edebilir.
- Bu sayede örnekteki canlılık durumu, doğrudan mikroskopik inceleme sırasında anlaşılabilir.

Filogenetik Olarak Spesifik Boyalar

- Belirli türleri ya da akraba grupları hedefleyen floresan boyalar, özgül nükleik asit problemlerine boya bağlanmasıyla hazırlanır.
- Örneğin, sadece Bacteria veya sadece Archaea türlerini boyayan filogenetik boyalar kullanılabilir.
- Bu tür boyalar, eş zamanlı kullanılan genel boyalarla birlikte örnekteki her bir domain'in oranını belirlemeyi mümkün kılar.

Metabolik Genleri Hedefleyen Problar

- Bazı floresan problar, belirli metabolik süreçleri katalizleyen enzimleri kodlayan genleri hedefler.
- Bir hücre bu özel problarla boyanmışsa, o hücrenin belirli bir metabolizmaya sahip olduğu sonucu çıkarılabilir.
- Bu yaklaşım, hücrenin mikrobiyal topluluk içindeki ekolojik rolünün anlaşılmasına katkı sağlar.

Seyrek Hücre Yoğunluklarında Filtreleme Kullanımı

- Okyanus suyu gibi düşük hücre yoğunluğuna sahip örneklerde doğrudan sayım güç olabilir.
- Bu durumda hücreler önce bir filtre üzerinde yoğunlaştırılır.
- Filtre üzerinde yoğunlaştırılan hücreler boyandıktan sonra mikroskopik olarak sayılabilir.

Ekolojik Çalışmalarda Mikroskopik Sayımların Önemi

- Mikroskopik hücre sayımları, kolay uygulanabilir olmaları nedeniyle ekolojik araştırmalarda sıklıkla tercih edilir.
- Bu yöntem, doğal mikrobiyal ortamlar hakkında temel düzeyde hızlı bilgi sağlar.

Yaşayan Hücre Kavramı ve Canlı Hücre Sayımı

- Viable (canlı) hücre, bölünebilme ve yavru oluşturabilme kapasitesine sahip hücre olarak tanımlanır.
- Çoğu durumda araştırmacıların asıl ilgilendiği hücre tipi canlı hücrelerdir.
- Bu nedenle, agar plaklarının kullanıldığı canlı hücre sayımı yöntemi, yani plak sayımı (plate count), tercih edilir.

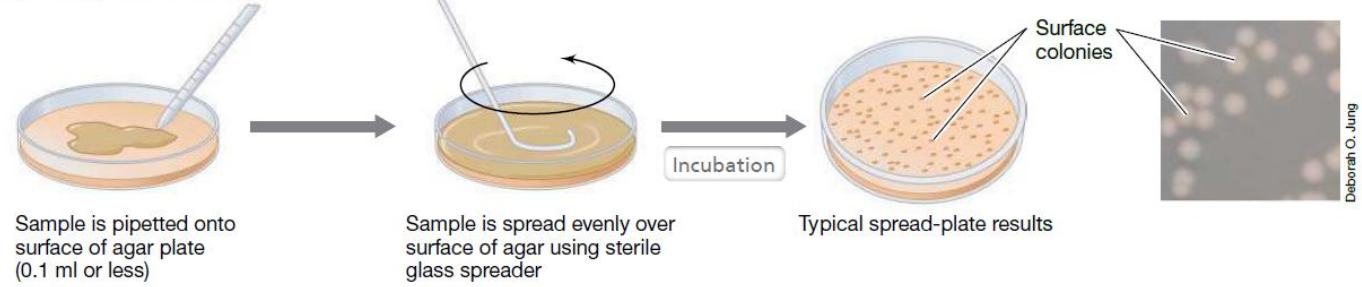
Plak Sayımı Yönteminin Temel Varsayımı

- Plak sayımı yaklaşımında, her canlı hücrenin bir koloni oluşturacağı kabul edilir.
- Bu nedenle koloni sayıları, doğrudan canlı hücre sayılarını yansıtır.
- Bu varsayım, yöntemin yorumlanmasında temel noktayı oluşturur.

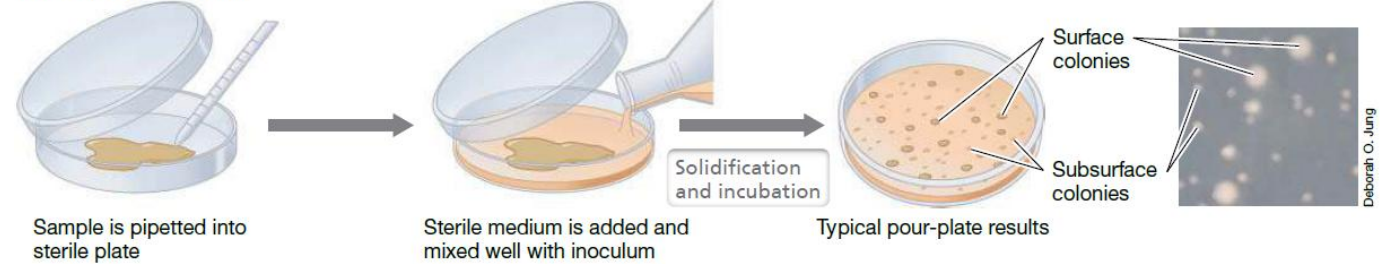
Canlı Hücre Sayımı Yöntemleri

- Plak sayımı için iki temel uygulama bulunur: spread-plate (yayma plak) yöntemi ve pour-plate (dökme plak) yöntemi.
- Spread-plate (yayma plak) uygulamasında, seyreltilmiş kültürün küçük bir hacmi agar yüzeyine yayılır.
- Pour-plate (dökme plak) yönteminde kültür hacmi steril Petri kabına eklenir ve üzerine $\sim 50^{\circ}\text{C}$ 'deki erimiş agar dökülerek karıştırılır.

Spread-plate method



Pour-plate method



Uygulamada Dikkat Edilmesi Gerekenler

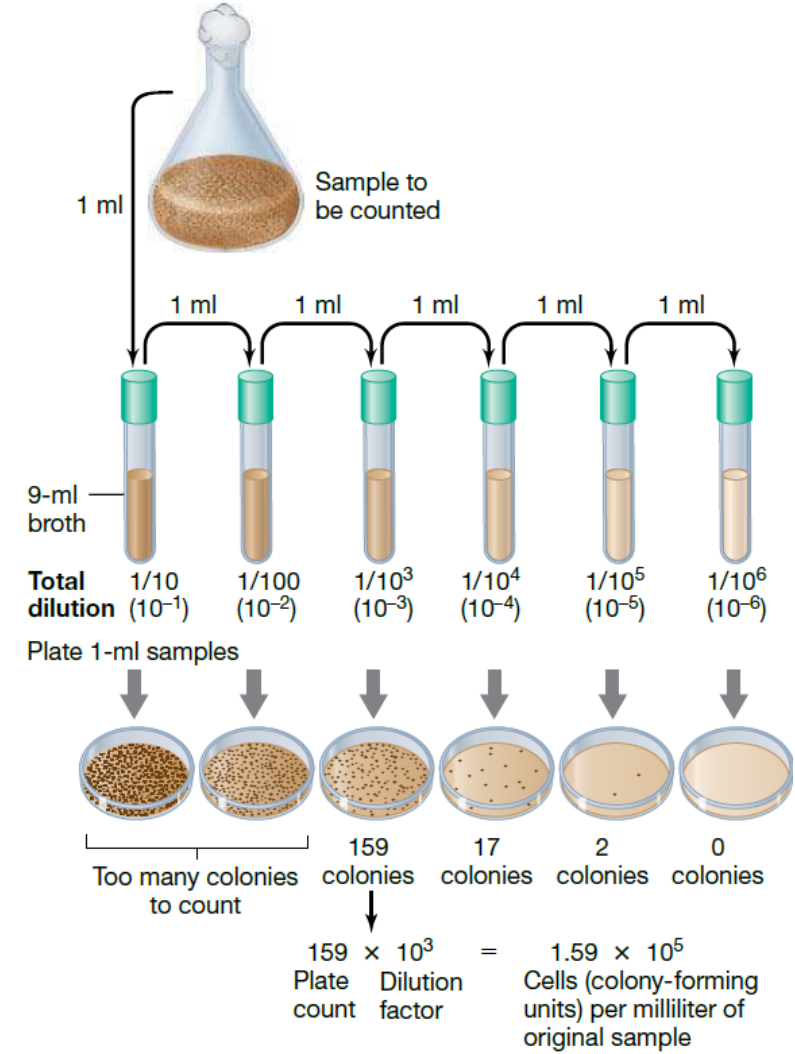
- Yayma plak ve dökme plak yöntemlerinde koloni sayısının çok fazla ya da çok az olmamasına dikkat edilmelidir.
- Aşırı yoğun plaklarda bazı hücreler koloni oluşturamaz ve koloniler birleşebilir.
- Çok az koloni varsa, elde edilen sonuçların istatistiksel güvenilirliği düşer.

Sayım Aralığının Önemi

- Plak sayımı için ideal ve geçerli sayım aralığı 30 ile 300 koloni arasındadır.
- Bu aralık, hem aşırı birleşme hem de düşük güvenilirlik sorunlarını azaltır.
- Bu nedenle, plak hazırlarken koloni sayısını bu aralığa getirecek uygun seyreltme yapılmalıdır.

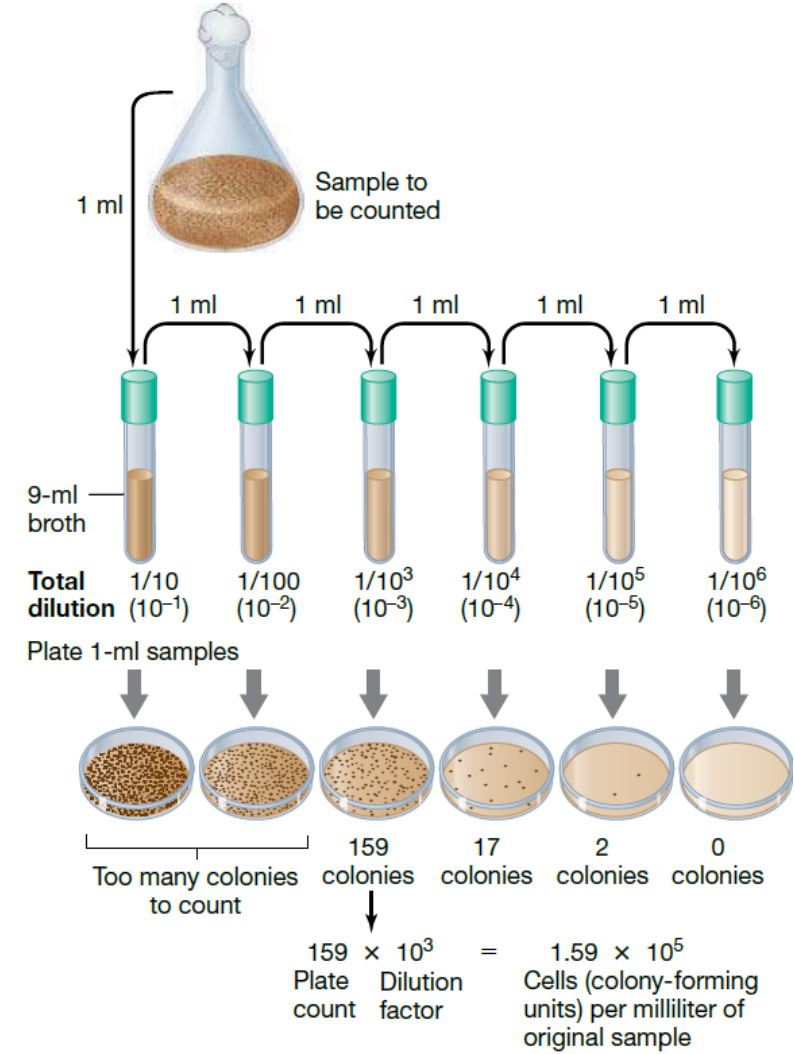
Seyreltme İşleminin Gerekliiliği

- Çoğu örnekte sayılabilir koloni sayısına ulaşmak için örnek mutlaka seyreltilir.
- Canlı sayım önceden bilinmediği için genellikle birden fazla seyreltme hazırlanır.
- Bu amaçla çoğunlukla ardışık 10 kat seyreltiler hazırlanır.



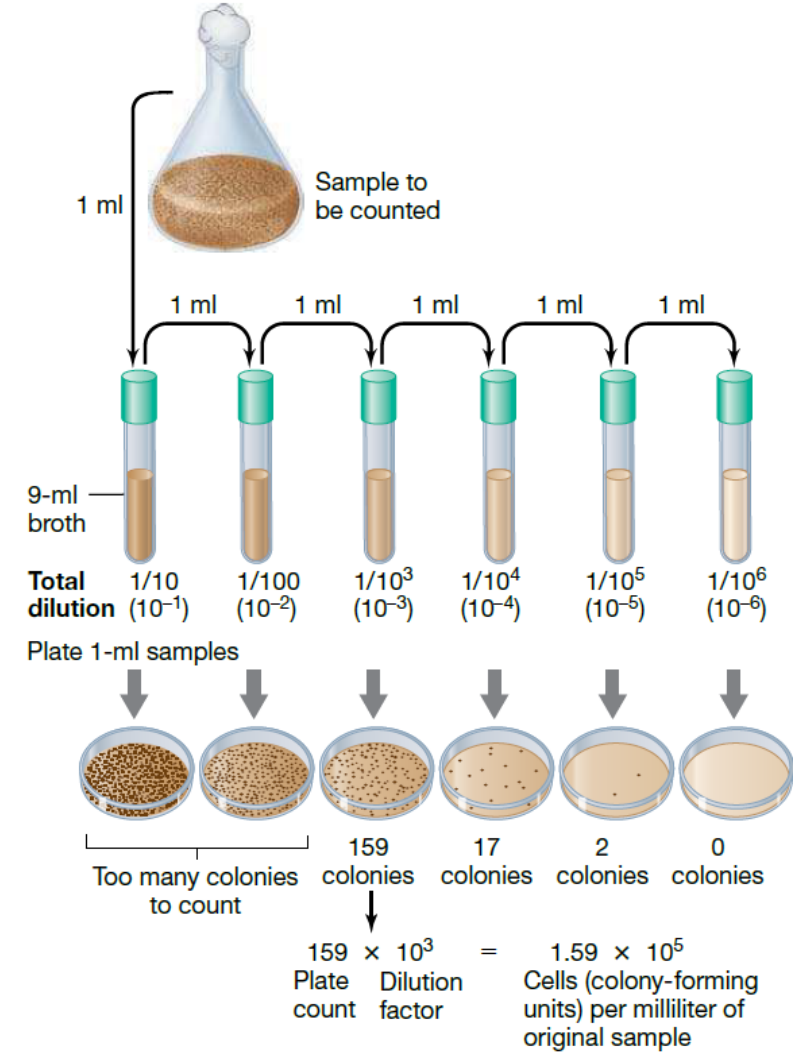
10 Kat ve 100 Kat Seyreltmeler

- 10 kat (10^{-1}) seyrelti hazırlamak için 0.5 ml örnek 4.5 ml seyrelticiyle karıştırılabilir.
- 100 kat (10^{-2}) seyrelti oluşturmak için 0.05 ml örnek 4.95 ml seyrelticiye eklenebilir.
- İki ardışık 10^{-1} seyreltme de aynı şekilde 10^{-2} toplam seyreltmeyi oluşturur.



Seri Seyreltmelerin Kullanımı

- Yoğun kültürlerde, ardışık seri seyreltmeler yapılarak uygun seyrelme düzeyine ulaşılır.
- Örneğin 10^{-6} seyreltmeye ulaşmak için üç ardışık 10^{-2} ya da altı ardışık 10^{-1} seyrelti yapılabilir.
- Bu işlem, plakta sayılabilir koloni aralığının elde edilmesini sağlar.



Plak Sayımı Kaynaklı Hata Türleri

- Canlı sayımda koloni sayısı, inokulum miktarı ve kültürün canlılığı kadar kullanılan ortam ve inkübasyon koşullarından da etkilenir.
- İnkübasyon süresi, özellikle karışık kültürlerde bazı kolonilerin geç gelişmesine bağlı olarak sonuçları değiştirebilir.
- Ayrıca, çok küçük koloniler gözden kaçabileceğinden sayım hataları oluşabilir.

Uygulama Hataları ve Örnek Özellikleri

- Pipetleme hatası, numunenin homojen olmaması veya yeterince karıştırılmaması önemli hata kaynaklarıdır.
- Dökme plak yönteminde sıcaklığa duyarlı hücreler zarar görebilir.
- Bu nedenle örnek hazırlama ve plaklama aşamalarında dikkatli ve tutarlı çalışmak gerekir.

Koloni-Oluşturan Birim (CFU) Kullanımı

- Plak sayımı verileri genellikle gerçek canlı hücre sayısı yerine koloni oluşturan birim (CFU) olarak ifade edilir.
- Bunun nedeni, bir koloninin birden fazla canlı hücre içeren bir kümecikten oluřabilmesidir.
- Bu ifade biçimi, olası hücre yığılmalarının yarattığı belirsizliği azaltır ve veriyi daha doğru temsil eder.

Plak Sayımı Yönteminin Kullanım Alanları

- Plak sayımı, bazı sınırlamaları olmasına rağmen hızlı ve kolay uygulanabildiği için birçok mikrobiyoloji alt alanında yaygın şekilde kullanılmaktadır.
- Gıda, süt ürünleri, tıbbi numuneler ve su analizlerinde canlı hücre sayımı rutin bir yöntem olarak uygulanır.
- Yöntemin yüksek duyarlılığı sayesinde, bir örnekte tek bir canlı hücre bile varsa plakada tespit edilebilir.
- Bu özellik, özellikle gıdalar veya diğer materyallerde mikrobiyal kontaminasyonun hassas biçimde belirlenmesine olanak sağlar.

Seçici Ortamların Plak Sayımındaki Rolü

- Seçici besiyerleri ve uygun inkübasyon koşulları, karışık örneklerde belli türlerin hedeflenerek sayılmasını mümkün kılar.
- Örneğin, %10 NaCl içeren kompleks bir ortam, çoğu deri bakterisini baskılarken potansiyel patojen *Staphylococcus* türlerinin izolasyonunu kolaylaştırır.
- Gıda endüstrisinde hem kompleks hem de seçici ortamların aynı örneğe uygulanması, kalite ve güvenliğin hem nicel hem nitel değerlendirilmesini sağlar.
- Kompleks ortam toplam hücre sayısını verirken, seçici ortam belirli bir patojenin o gıdada bulunup bulunmadığını gösterir.



Hedefli Plak Sayımı Uygulamaları

- Plak sayımı yöntemi atık su ve diğer su analizlerinde de yaygın olarak kullanılır.
- Örneğin, enterik bakteriler (*E. coli* gibi) seçici ortamlarda kolayca geliştiği için yüzme alanlarının güvenliğini değerlendirmede önemli göstergelerdir.
- Bir su örneğinde enterik bakteri tespiti, dışkısal kirliliğe işaret eder ve suyun insan teması için uygun olmadığını gösterir.

Büyük Plak Sayım Anomalisi (Great Plate Count Anomaly)

- Doğal örneklerin doğrudan mikroskopik sayımları, aynı örneğin kültür ortamında yetiştirilebilen hücre sayısından çok daha yüksek değerler verir.
- Bu durum, plak sayımı yönteminin toplam hücre sayısını belirlemede güvenilir olmayabileceğini gösterir.
- Mikrobiyolojide bu fark “büyük plak sayım anomalisi (great plate count anomaly)” olarak adlandırılır.

Plak Sayımı Neden Daha Düşük Hücre Sayısı Gösterir?

- Mikroskopik sayımlar, ölü hücreler dahil tüm hücreleri içerirken, canlı sayım yöntemleri yalnızca canlı hücreleri tespit eder.
- Asıl önemli olan, doğal ortamlardaki farklı mikroorganizmaların besin ve büyüme gereksinimlerinin çok çeşitli olmasıdır.
- Tek bir besiyeri ve büyüme koşulu, mikrobiyal topluluğun yalnızca belirli bir alt kümesini büyütebilir.
- Örneğin, toplam canlı hücre sayısı 10^9 hücre/g olsa bile ortam yalnızca 10^6 hücre/g'ı destekliyorsa plak sayımı gerçek sayının yalnızca %0.1'ini gösterebilir.

Plak Sayımı Sonuçlarının Sınırlılıkları

- Plak sayımı sonuçları önemli bir uyarı taşır: “toplam” hücre sayıları genellikle gerçek hücre sayısını ciddi şekilde az gösterir.
- Buna karşın, hedef organizmalara yönelik seçici ortamlarla yapılan sayımlar çoğu zaman oldukça güvenilir sonuçlar verir.
- Seçici ortamlarda, hedef mikroorganizmaların fizyolojisi bilindiği için canlı hücre toparlanma oranı neredeyse %100’e yakındır.
- Ancak tek bir ortamla yapılan toplam sayımlar genellikle gerçek değerlerden bir veya birkaç kat daha düşük çıkar.

Günümüzde Hücre Sayımında Alternatif Yaklaşımlar

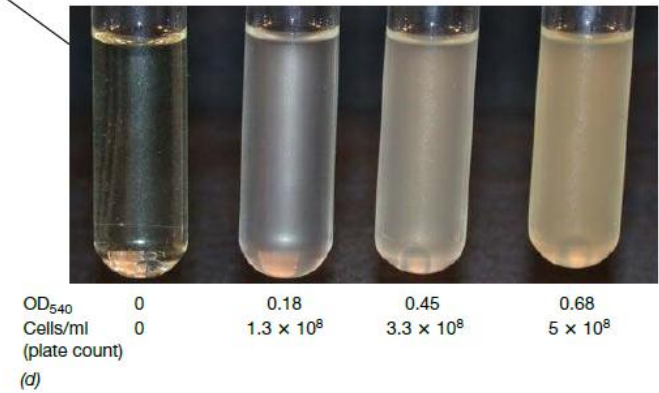
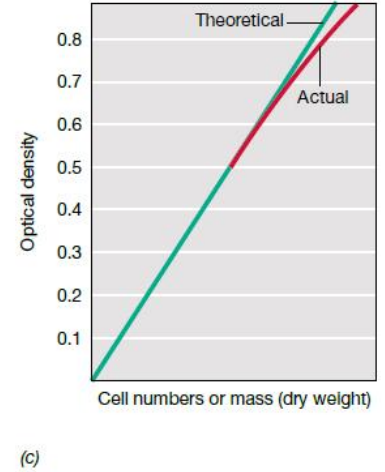
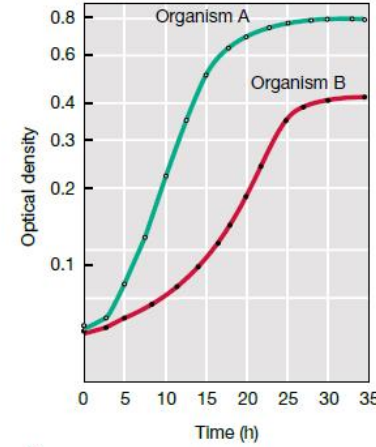
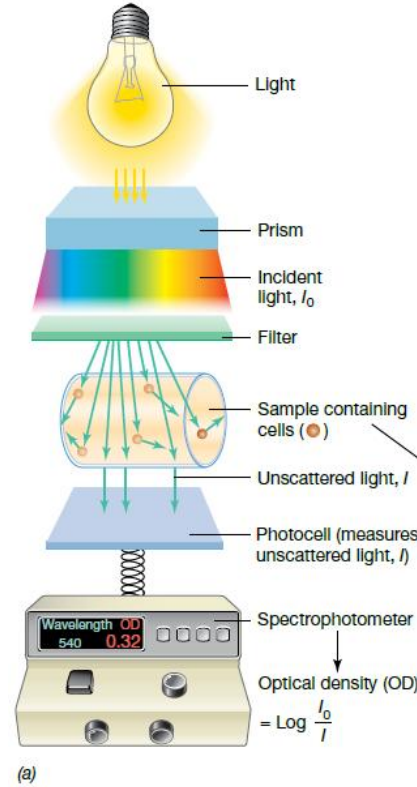
- Son yıllarda hücrelerin doğrudan sayılması yerine, hücreyi temsil eden moleküler “proxy” yaklaşımları yaygın olarak kullanılmaktadır.
- Geliştirilen birçok moleküler yöntem, doğal örneklerde belirli mikroorganizmaların hem tespit edilmesini hem de miktarının belirlenmesini mümkün kılar.
- Bu yöntemlerin detayları ve yorumlanması Bölüm 19’da detaylıca ele alınacaktır.

Turbidimetri: Hücre Kütlesine Dayalı Ölçüm

- Ekponansiyel büyüme sırasında hücrelerin tüm bileşenleri, hücre sayısındaki artışla orantılı olarak çoğalır.
- Hücre kütlesi de bu süreçte arttığı için, hücre süspansiyonlarının ışığı dağıtması turbidi ölçümüne temel oluşturur.
- Hücre süspansiyonu bulanık görünür, çünkü hücreler geçen ışığı saçar; hücre sayısı arttıkça bulanıklık (turbidite) artar.
- Bu nedenle, turbidite ölçümleri laboratuvar kültürlerinde hücre sayısını hızlı biçimde tahmin etmek için kullanılır.

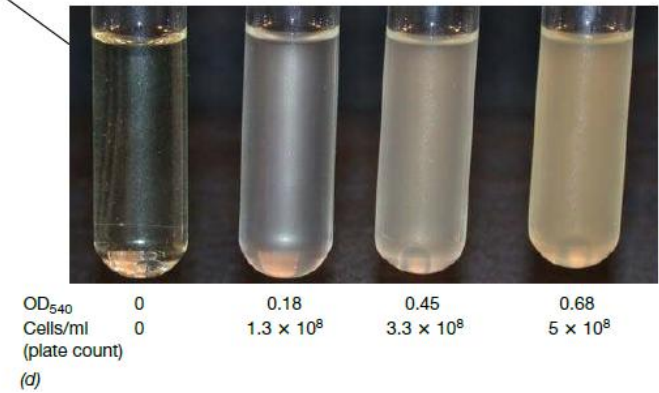
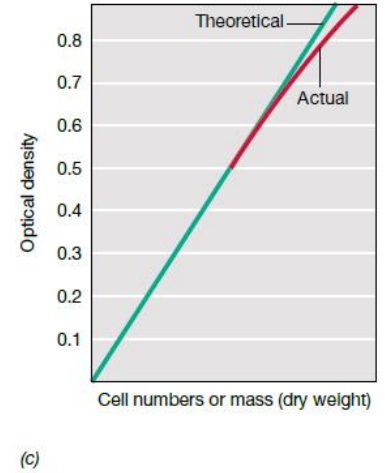
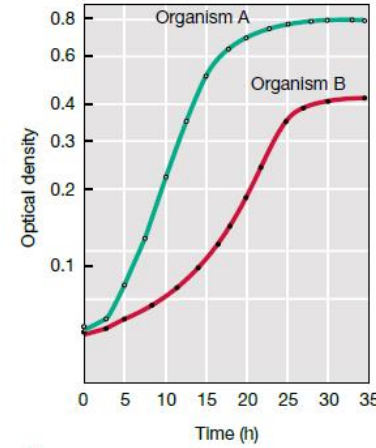
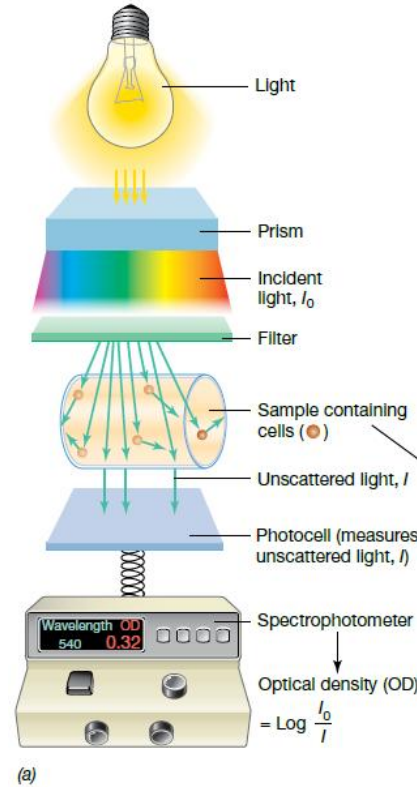
Spektrofotometre ile Turbidite Ölçümü

- Turbidite, ışığı süspansiyondan geçirip saçılmadan geçen miktarı ölçen spektrofotometre ile belirlenir.
- Spektrofotometre, prizma ya da kırınım ızgarasıyla belirli bir dalga boyunda ışık üretir (Figür a).



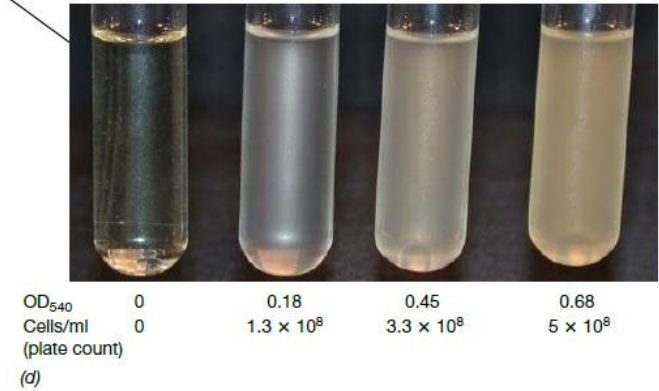
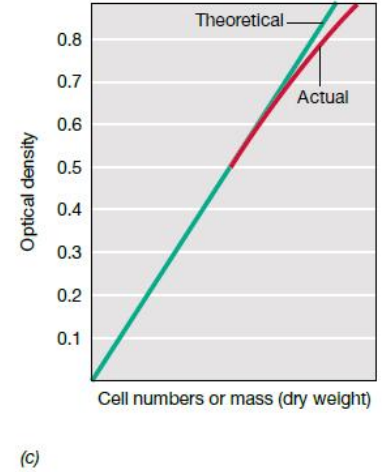
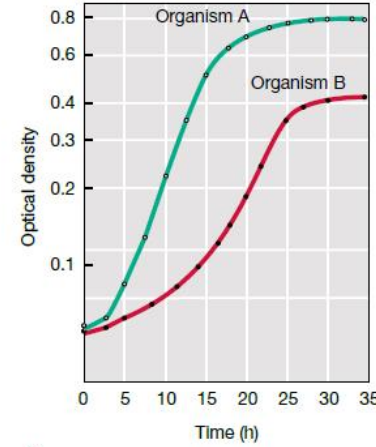
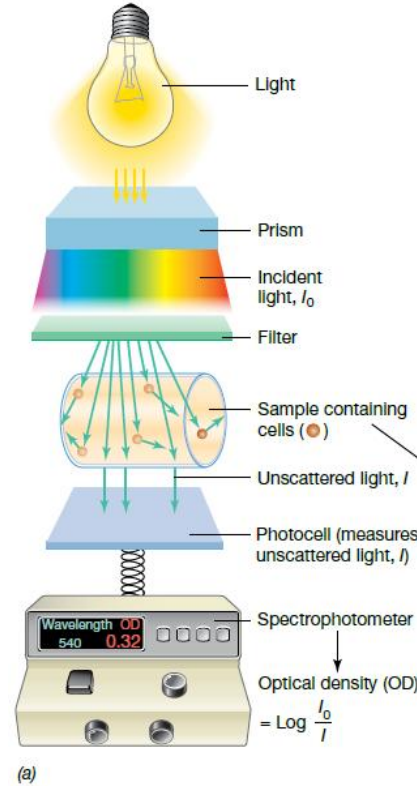
Spektrofotometre ile Turbidite Ölçümü

- Mikrobiyal turbidite ölçümlerinde 480 nm (mavi), 540 nm (yeşil) ve 660 nm (kırmızı) ışık yaygın olarak kullanılır.
- Kısa dalga boylarında duyarlılık daha yüksekken, yoğun hücre süspansiyonlarında daha uzun dalga boyları daha doğru sonuç verir.



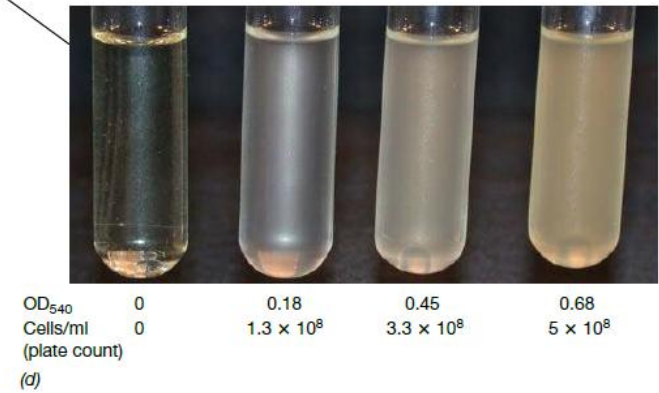
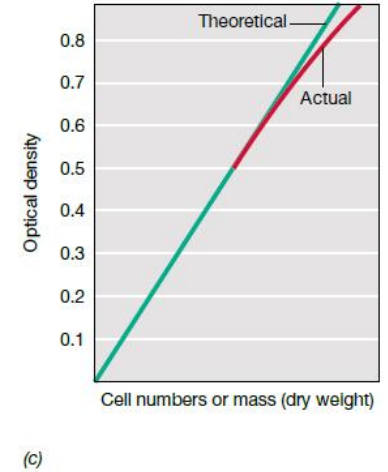
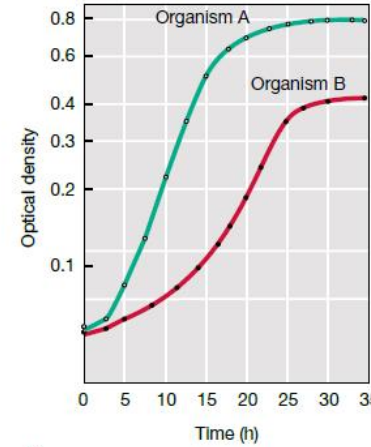
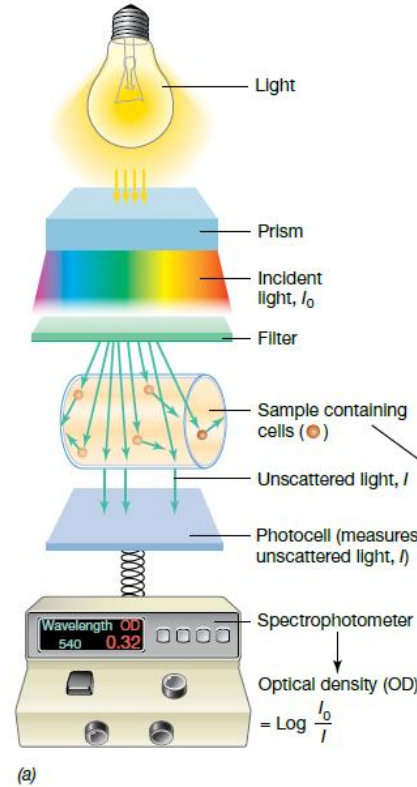
Optik Dansite (OD) ve Hücre Sayısı Arasındaki İlişki

- Turbiditenin birimi, kullanılan dalga boyuna göre belirtilen optik yoğunluktur (örneğin OD_{540}).
- Tek hücreli organizmalarda optik yoğunluk, belirli sınırlar içinde hücre sayısı ile orantılıdır.



Optik Dansite (OD) ve Hücre Sayısı Arasındaki İlişki

- Turbiditeyi gerçek hücre sayısına dönüştürmek için önceden hazırlanmış bir standart eğriye ihtiyaç vardır.
- Ancak yüksek hücre yoğunluklarında ışığın hücreler arasında geri saçılması lineerliği bozduğundan OD–hücre sayısı ilişkisi (Figür c) geçersiz hale gelir.

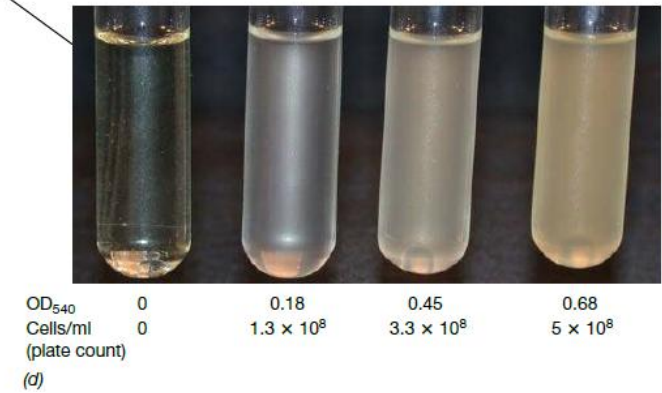
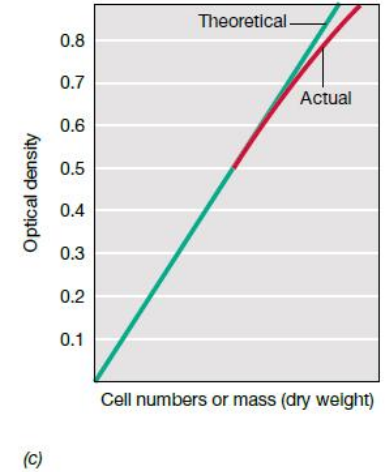
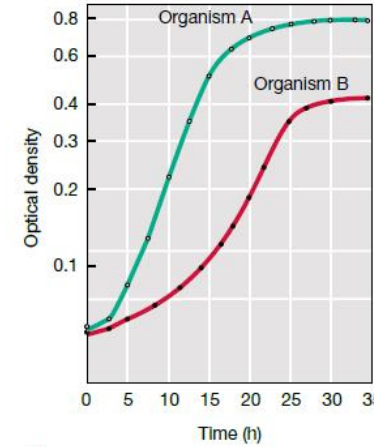
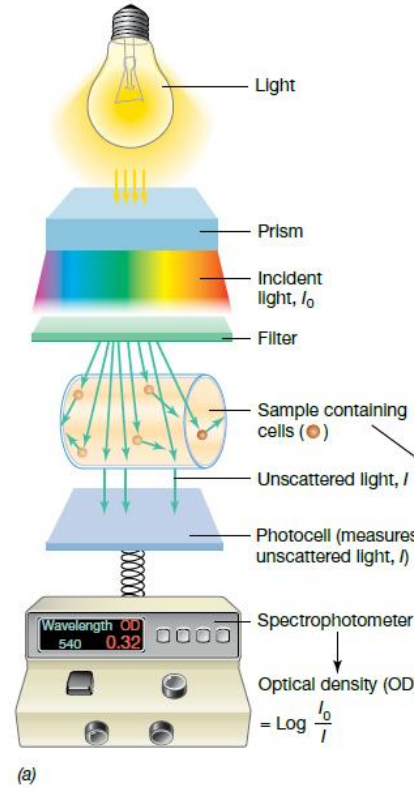


Turbidimetri Yönteminin Kullanışlılığı

- Uygun bir standart eğri oluşturulduğunda, turbidite ölçümleri bakteri bolluğunun hızla tahmin edilmesini sağlar.
- Bu yöntem hem toplam hücre sayımı hem de canlı hücre sayımı için pratik bir alternatif olabilir.
- Turbidimetri, özellikle hızlı büyüyen kültürlerde zaman kazanmak için yaygın şekilde tercih edilir.

Turbidimetri ile Büyüme Takibinin Avantajları

- Turbidite ölçümleri hızlı yapılabilen ve örneğe zarar vermeyen bir yöntemdir.
- Bu yöntem, bakteriler, arkeler ve birçok mikrobiyal ökaryotun saf kültürlerinde büyümeyi takip etmek için yaygın olarak kullanılır.
- Aynı örnek, büyüme süreci boyunca tekrar tekrar ölçülerek izlenebilir (Figür d).
- Ölçümler zamanla yarı-logaritmik grafiğe aktarılarak jenerasyon süresi ve diğer büyüme parametreleri hesaplanabilir (Figür b).



Turbidite Ölçümlerinin Sınırlılıkları

- Bazı mikroorganizmalar sıvı kültürde eşit dağılmadığından turbidite ölçümleri gerçek hücre kütlesini her zaman yansıtmayabilir.
- Birçok bakteri küçük veya büyük kümeler oluşturduğunda OD değerleri toplam biyokütleyi doğru temsil etmez.
- Bazı bakteriler, tüplerin ya da diğer kapların yüzeylerine biyofilm oluşturarak tutunabilir.
- Kümelenme ve biyofilm oluşumu engellenmediğinde OD ölçümleri hücre sayısını doğru belirlemekte yetersiz kalır.

Turbidite Ölçümlerinin Güvenilirliği Nasıl Artırılır?

- Kültürde hücrelerin karışık kalması için karıştırma, çalkalama veya benzeri yöntemlerle kümelenme azaltılmalıdır.
- Yüzeyle tutunan hücrelerin biyofilm oluşturmaları engellenerek ölçümlerin doğruluğu korunabilir.
- Bazı bakteriler doğal olarak planktonik yapıda olup uzun süre askıda kalabilir.
- Ancak çoğu bakteri uygun yüzey sağlandığında zamanla biyofilm oluşturur ve turbidite ile doğru hücre sayımı yapmak zorlaşır.

Çevresel Etkenlerin Büyüme Üzerindeki Rolü

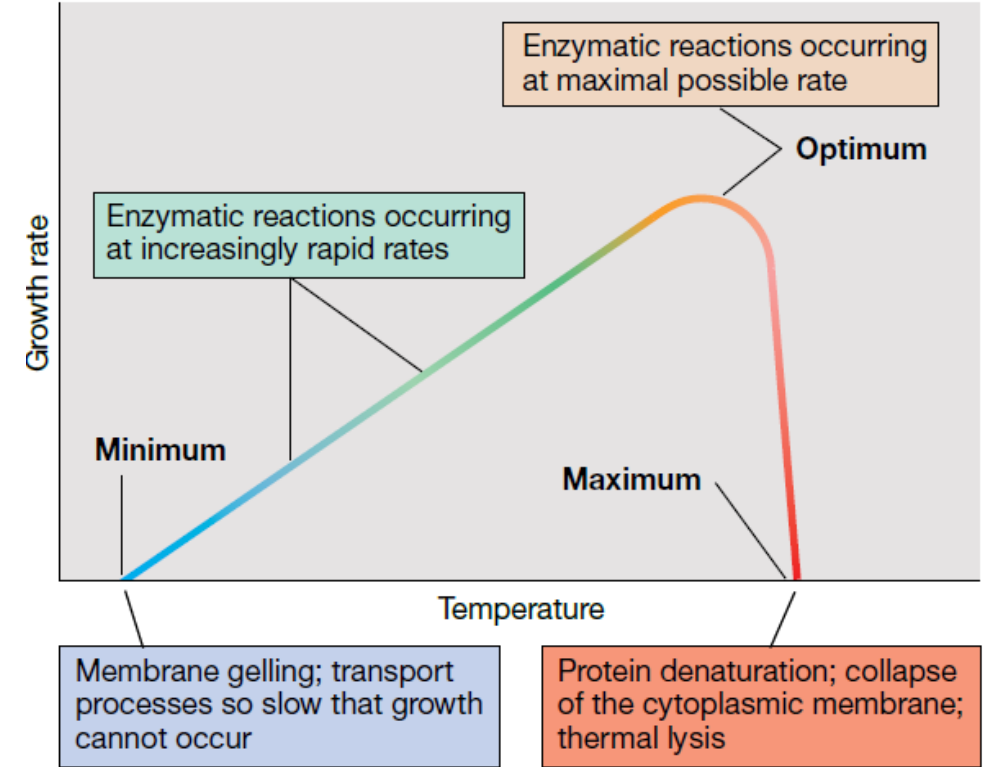
- Mikroorganizmalara ideal besinler sağlansa bile çevresel koşullar uygun değilse büyüme gerçekleşmez.
- Sıcaklık, pH, su aktivitesi ve oksijen, büyümeyi doğrudan belirleyen dört ana çevresel faktördür.
- Bu faktörlerden herhangi biri organizmanın dayanabileceği sınırların dışına çıkarsa büyüme durur.

Sıcaklığın Mikroorganizmalar Üzerindeki Çift Yönlü Etkisi

- Çok düşük ya da çok yüksek sıcaklıklarda mikroorganizmalar büyüyemez ve bazıları ölebilir.
- Her türün büyümeye izin veren minimum ve maksimum sıcaklıkları doğal habitatlarının sıcaklık özelliklerini yansıtır.
- Sıcaklık arttıkça enzimatik reaksiyonlar hızlanır ve büyüme daha hızlı gerçekleşir.
- Ancak belirli bir sıcaklığın üzerinde proteinler ve hücresel bileşenler geri dönüşümsüz şekilde zarar görebilir.

Mikroorganizmaların Kardinal Sıcaklıkları

- Her mikroorganizmanın büyüemeyeceği bir minimum, en hızlı büyüdüğü bir optimum ve büyüemeyeceği bir maksimum sıcaklığı vardır.
- Bu üç değer, yani kardinal sıcaklıklar, her tür için kendine özgüdür ve türler arasında büyük farklılıklar gösterebilir.
- Bazı mikroorganizmaların optimum sıcaklığı 0°C civarındayken bazıları 100°C'nin üzerinde optimuma sahiptir.
- Bir organizmanın büyüebildiği genel sıcaklık aralığı geniş olsa da tek bir tür genellikle 40°C'den daha geniş bir aralıkta büyüemez.



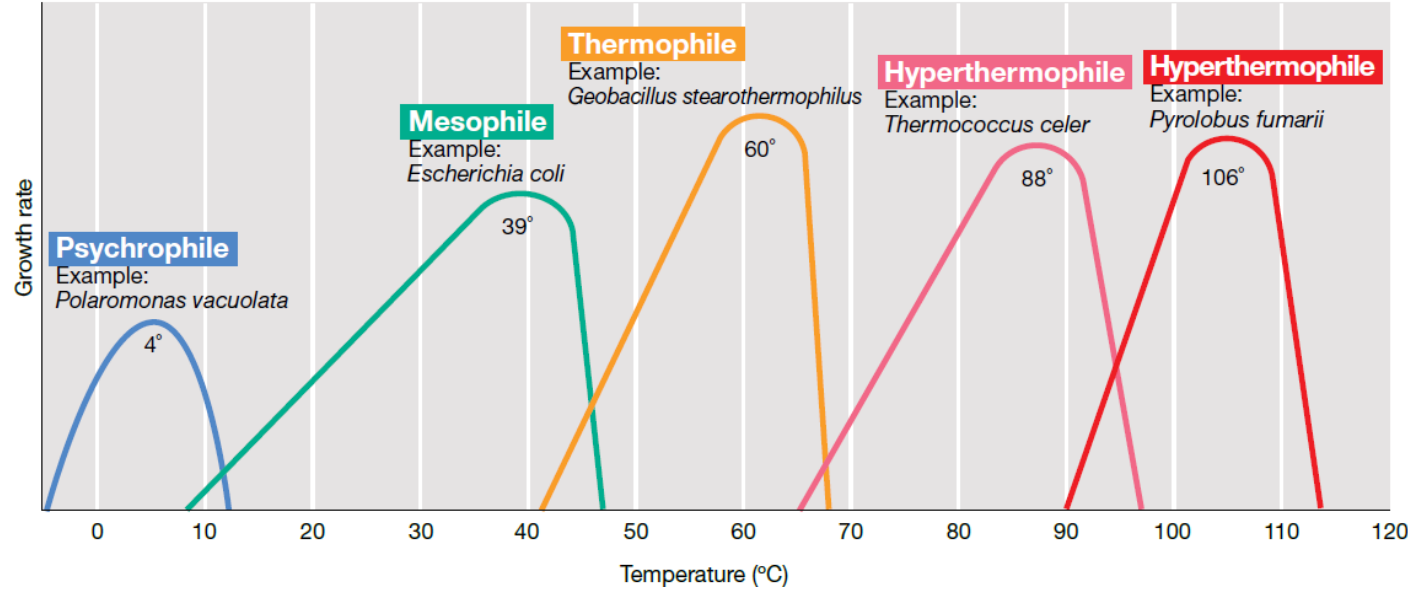
Minimum, Optimum ve Maksimum Sıcaklıkların Belirleyicileri

- Maksimum büyüme sıcaklığı, temel bir hücresel bileşenin, örneğin önemli bir enzimin, denatüre olduğu noktayı yansıtır.
- Minimum sıcaklığı belirleyen faktörler tam olarak bilinmemekle birlikte, zarın yarı akışkan yapısını koruması kritik önem taşır.
- Zar yeterince akışkan olmadığında madde taşınması ve enerji üretimine ilişkin süreçler gerçekleşemez.
- Optimum sıcaklık, hücresel bileşenlerin en yüksek verimle çalıştığı aralıktır ve genellikle maksimuma minimumdan daha yakındır.



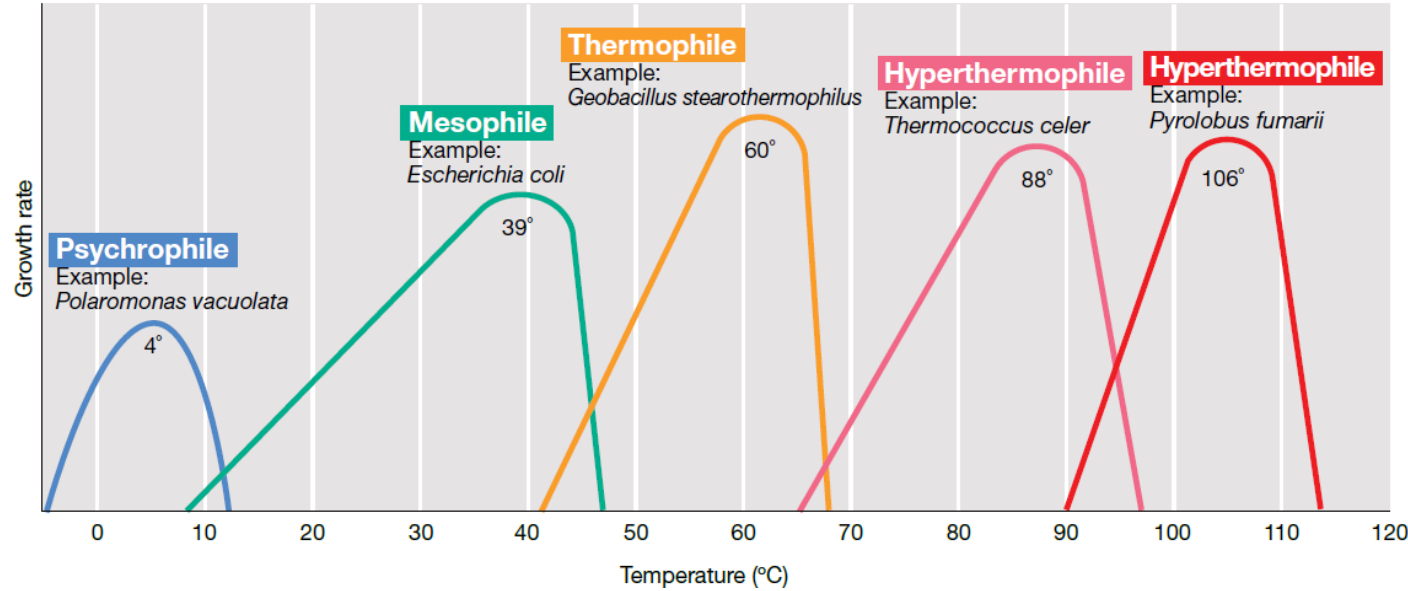
Sıcaklığa Göre Mikroorganizma Grupları

- Mikroorganizmalar büyüme optimumlarına göre dört geniş grupta incelenir: psikrofil, mezofil, termofil ve hipertermofil.
- Mezofiller yaygın olarak doğada bulunur ve en çok çalışılan mikrobiyal gruplardır.



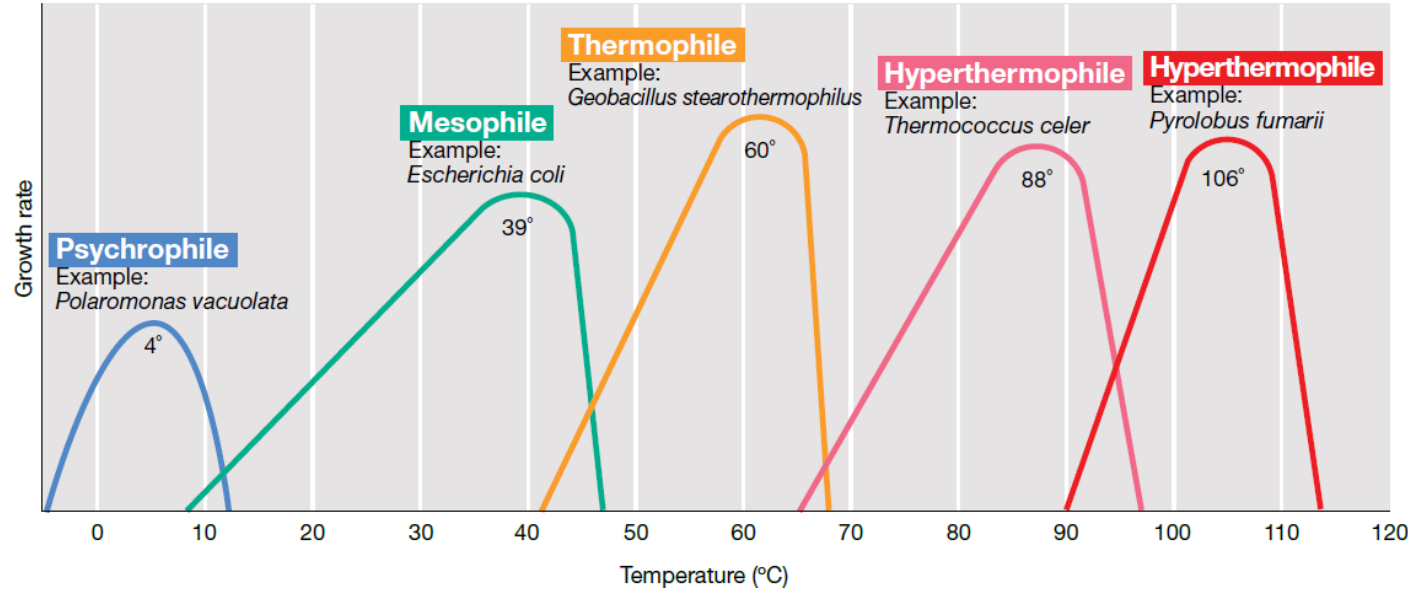
Sıcaklığa Göre Mikroorganizma Grupları

- Mezofiller, sıcak kanlı hayvanların bağırsaklarında ve ılıman ile tropik çevrelerde yaygındır.
- *Escherichia coli* tipik bir mezofile örnektir ve kardinal sıcaklıkları ayrıntılı biçimde tanımlanmıştır.



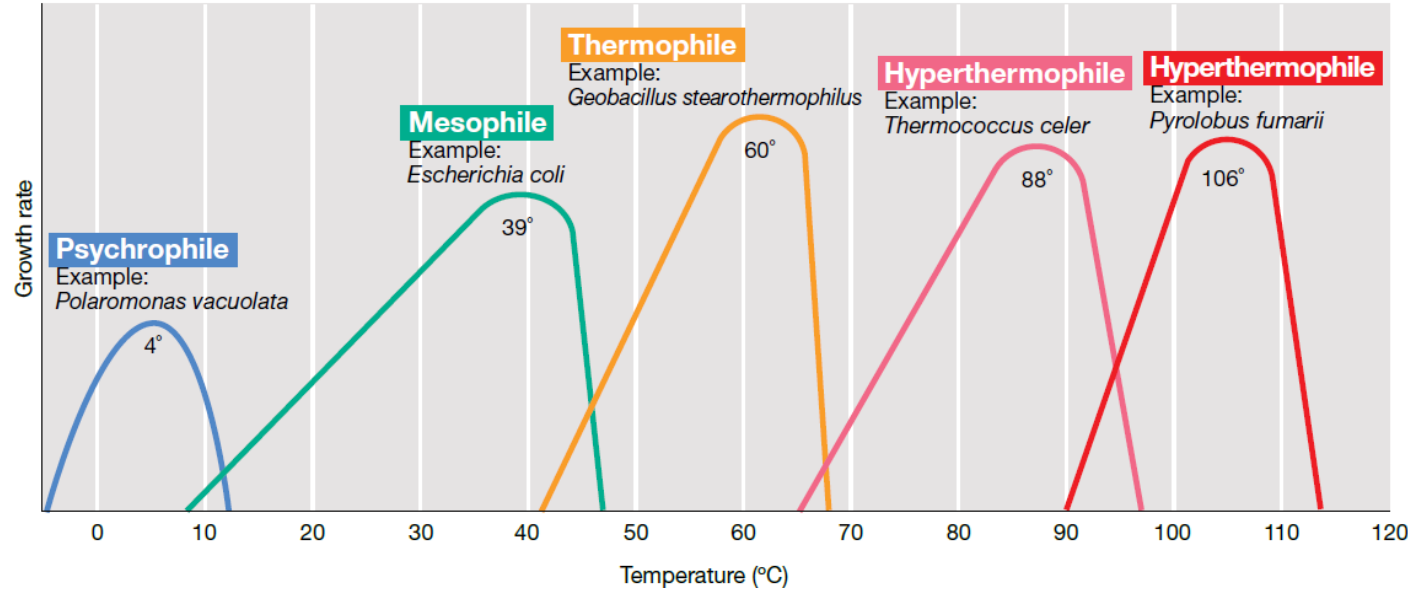
Mezofillerin Kardinal Sıcaklıkları: *E. coli* Örneği

- *E. coli*'nin optimum büyüme sıcaklığı yaklaşık 39°C civarındadır.
- Maksimum büyüme sıcaklığı 48°C, minimum sıcaklığı ise 8°C olarak belirlenmiştir.



Mezofillerin Kardinal Sıcaklıkları: *E. coli* Örneği

- Böylece *E. coli*'nin büyüme aralığı yaklaşık 40°C'lik bir sıcaklık genişliğine sahiptir.
- Bu sıcaklık aralığı, mezofillerin yaşam alanlarının çeşitliliğini yansıtır.



Ekstrem Ortamlarda Yaşayan Mikroorganizmalar

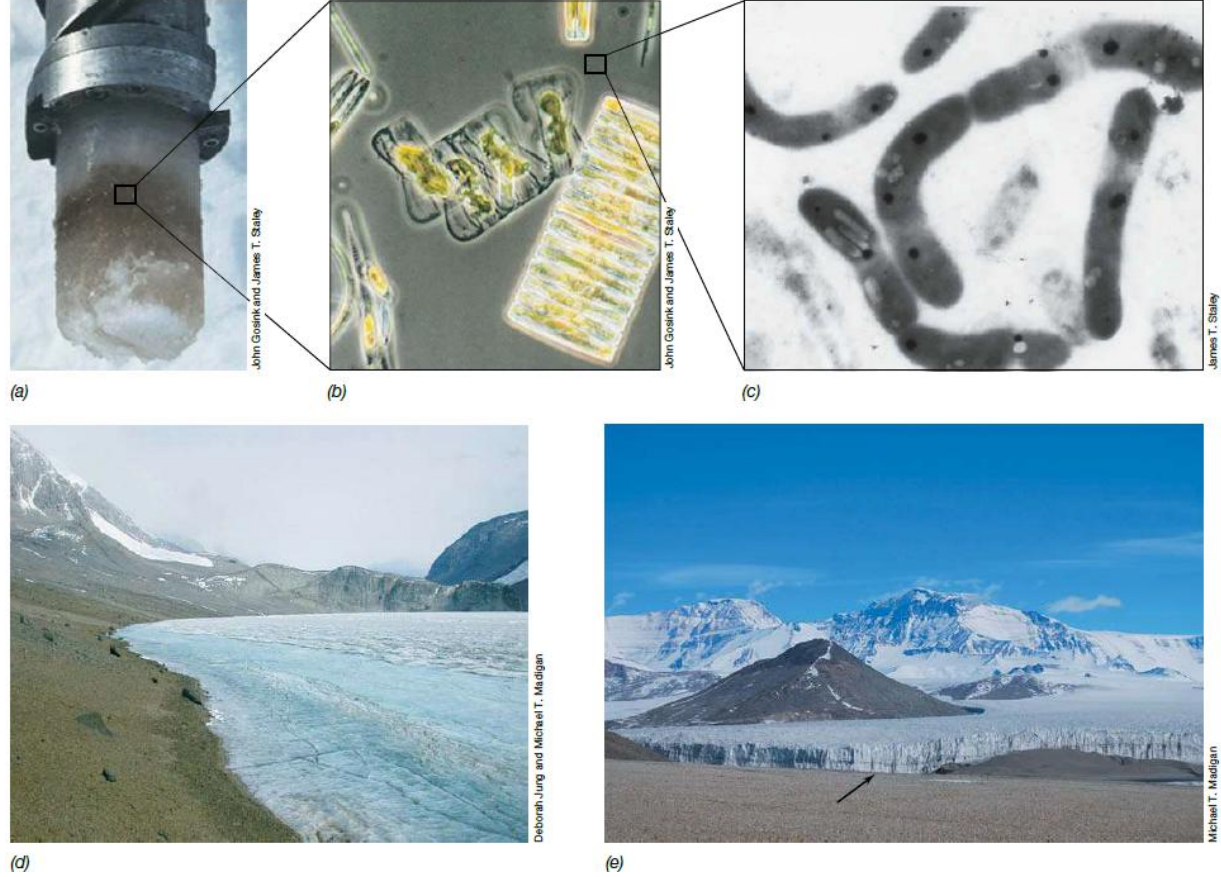
- Psikrofiller çok soğuk; termofiller ise çok sıcak çevrelerde bulunur.
- Hipertermofiller, sıcaklığın 100°C'ye ulaştığı sıcak su kaynaklarında yaşayabilir.
- Derin deniz hidrotermal bacalarında sıcaklık 100°C'yi aşabilir ve hipertermofiller bu koşullara uyum sağlamıştır.
- Bu organizmaların ekstrem koşullarda hayatta kalmak için geliştirdiği fizyolojik ve biyokimyasal uyarlamalar oldukça dikkat çekicidir.

Soğuk Ortamlarda Mikrobiyal Yaşamın Genel Çerçevesi

- Aşırı sıcak ve aşırı soğuk bölgeler, insanlar için “uç” koşullar gibi görünse de birçok mikrobiyal habitat aslında bu tür ortamlarla tanımlanmaktadır.
- Bu zorlu yaşam alanlarında gelişen canlılara ekstremofil adı verilir ve bu organizmalar bu sert koşullarda rahatlıkla yaşayabilir.

Dünya'nın Soğuk Bölgeleri ve Mikrobiyal Çeşitlilik

- Dünya yüzeyinin büyük bir kısmı soğuktur ve okyanusların ortalama sıcaklığı yaklaşık 5°C civarındadır.
- Açık okyanusların derinliklerinde sıcaklık yıl boyunca $1-3^{\circ}\text{C}$ arasında sabit kalır.
- Arktik ve Antarktik'in geniş alanları sürekli donmuş haldedir ya da yazın yalnızca birkaç hafta çözülür.
- Buzulların içindeki ve altındaki sıvı su kanalları ise yoğun bir mikrobiyal yaşama ev sahipliği yapar.



Donmuş Ortamlarda Sıvı Su ve Yavaş Metabolizma

- Tamamen donmuş görünen maddelerin içinde bile, çözünen maddelerin yoğunlaştığı küçük sıvı su cepleri bulunur.
- Mikroorganizmalar bu cepler içinde metabolizma ve büyüme faaliyetlerini sürdürebilir, ancak bu süreçler son derece yavaştır.
- Bu küçük su alanları, donmuş ortamlarda mikrobiyal yaşamın sürekliliğini mümkün kılar.

Sürekli Soğuk ve Mevsimsel Soğuk Ortamların Ayrımı

- Bir ortamın sürekli soğuk olup olmadığı, mikrobiyal yaşam için önemlidir; bazı bölgeler yalnızca mevsimsel olarak soğuktur.
- Ilıman bölgelerdeki göller kışın kısa süreli buzlanma yaşasa da su genellikle yalnızca kısa bir süre 0°C'de kalır.
- Antarktik göller ise birkaç metre kalınlığında kalıcı bir buz tabakası taşır ve altındaki su sütunu tüm yıl boyunca 0°C veya daha soğuktur.
- Deniz sedimanları, buzullar ve buz altı göller sürekli soğuk kabul edilir ve yoğun mikrobiyal yaşam barındırır.



Deborah Jung and Michael T. Madigan



Soğuğa Uyum Sağlamış Mikroorganizmaların Kaynağı

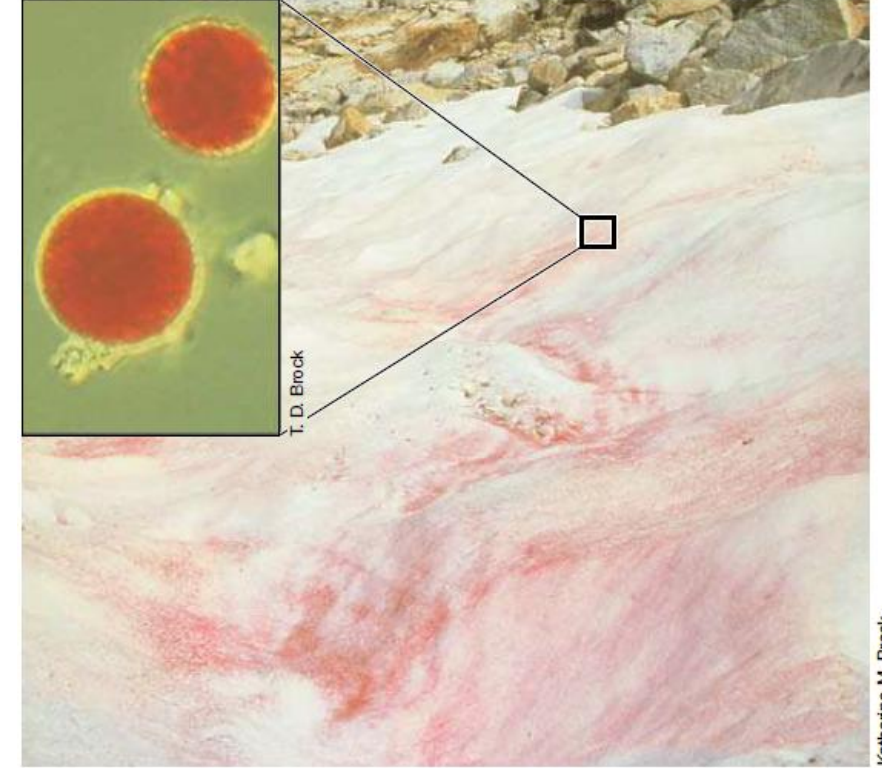
- Soğuk derecelere en iyi adapte olmuş mikroorganizmaların çoğu, sürekli soğuk ortamlardan elde edilmiştir.
- Bu bölgelerdeki uzun süreli düşük sıcaklıklar, psikrofilik organizmaların evrimleşmesi ve korunması için ideal koşullar yaratır.

Psikrofil ve Psikrotolerant Mikroorganizmalar

- Psikrofil, optimum büyüme sıcaklığı 15°C ve altı olan; maksimum büyüme sıcaklığı 20°C 'nin altında kalan; minimum büyüme sıcaklığı ise 0°C veya altına inebilen mikroorganizmalardır.
- 0°C 'de büyüeyebilen ancak optimum sıcaklıkları $20\text{--}40^{\circ}\text{C}$ arasında olan mikroorganizmalar psikrotolerant olarak adlandırılır.
- Psikrofiller genellikle sürekli soğuk ortamlarda bulunur ve ılıman sıcaklıklara ısıtılmaları onları öldürebilir.
- Bu nedenle laboratuvarı psikrofil çalışmaları sırasında örneklerin hiçbir aşamada ısınmamasına dikkat edilir.

Deniz Buzunda ve Kar Yüzeylerinde Psikrofilik Canlılar

- Psikrofilik alg ve bakteriler, kutup bölgelerinde mevsimsel olarak oluşan deniz buzunun içinde ve altında yoğun katmanlar hâlinde gelişir.
- Kalıcı kar örtüsü ve buzulların yüzeylerinde de gelişirler ve bulundukları yüzeye belirgin renkler kazandırırılar.
- Kar algi *Chlamydomonas nivalis*, sporlarında bulunan astaksantin pigmenti nedeniyle kar yüzeyine parlak kırmızı bir renk verir.
- İlgili diğer kar algleri farklı karotenoid pigmentler içerdiğinden, bu alanlar yeşil, turuncu, kahverengi veya mor renkte de görülebilir.



Psikrofilik Bakterilerden Önemli Örnekler

- Pek çok psikrofilik Bakteri ve az sayıda psikrofilik Archaea izole edilmiştir.
- Kalıcı don (permafrost) bakterisi *Planococcus halocryophilus*, -15°C'de yavaş da olsa büyüyebilir ve bu sıcaklık, herhangi bir bakteri için belgelenmiş en düşük büyüme sıcaklığıdır.
- Bununla birlikte teorik değerlendirmeler, mikrobiyal metabolizmanın bundan daha soğuk sıcaklıklarda da gerçekleşebileceğini düşündürür.



Aşırı Düşük Sıcaklıklarda Metabolik Faaliyet

- Tundra topraklarında mikrobiyal solunumun neredeyse -40°C 'de bile ölçülmüş olması, metabolik sınırların çok daha düşük olabileceğini gösterir.
- -20°C 'de, donmuş malzemelerde küçük sıvı su cepleri bulunur ve soğuğa uyumlu bakterilerin enzimleri bu sıcaklıklarda da işlev gösterebilir.
- Böylesine düşük sıcaklıklarda büyüme, mümkünse bile son derece yavaştır; ancak yavaş büyüme bile bir popülasyonun varlığını sürdürmesine yetebilir.

Psikrotolerant Mikroorganizmaların Yaygınlığı

- Psikrotolerant mikroorganizmalar doğada psikrofillere kıyasla çok daha geniş bir dağılıma sahiptir.
- Ilıman iklimlerdeki toprak ve su ortamlarından; buzdolabı sıcaklığında saklanan et, süt ürünleri, sebze, meyve ve elma şarabından sıklıkla izole edilirler.
- 0°C'de büyüyebilseler de çoğu bu sıcaklıkta iyi bir büyüme göstermez ve laboratuvar kültürlerinde gözle görülür gelişme haftalar sürebilir.
- Buna karşılık aynı organizmalar 30°C'de birçok mezofil kadar hızlı büyüyebilir.

Psikrotolerant Organizma Çeşitliliği

- Psikrotolerant canlılar Bacteria, Archaea ve mikrobiyal ökaryotları kapsayan geniş bir çeşitliliğe sahiptir.
- Bu çeşitlilik, soğuk ortamların yalnızca psikrofil değil aynı zamanda psikrotolerant türler tarafından da yoğun biçimde kolonize edildiğini gösterir.

Psikrofillerin Soğuk Ortamda Yaşama Uyumları

- Psikrofiller, düşük sıcaklıklarda işlev gösteren ve hatta optimum çalışan enzimler üretir; bu enzimler ılıman sıcaklıklarda kolayca denatüre olabilir.
- Bu özelliklerin moleküler temeli tam olarak bilinmemekle birlikte, protein yapısındaki özgün düzenlemelerle ilişkili olduğu anlaşılmaktadır.
- Bilinen bazı soğuk-aktif enzimlerin, soğukta etkin olmayan enzimlere kıyasla daha fazla α -heliks ve daha az β -tabaka içerdiği belirlenmiştir.
- Bu farklılıklar, düşük sıcaklıklarda reaksiyonları gerçekleştirmek için enzimlere daha fazla esneklik kazandırır.



Enzimlerde Yapısal Esneklik ve Amino Asit Kompozisyonu

- β -tabakaların α -helikslere göre daha sert yapılara sahip olması, soğuk-aktif enzimlerde α -heliks oranının artmasına bağlı olarak esnekliğin sağlanmasına olanak verir.
- Bu enzimler, polar amino asit bakımından daha zengin ve hidrofobik amino asit içeriği bakımından daha düşüktür.
- Mezofillerde bulunan homolog enzimlere kıyasla daha az sayıda zayıf bağ (hidrojen ve iyonik bağlar) içerirler.
- Bu özelliklerin tümü birlikte, enzimlerin düşük sıcaklıklarda esnek ve işlevsel kalmasına katkı sağlar.

Soğukta Zar Akışkanlığının Korunması

- Psikrofillerin sitoplazmik zarları düşük sıcaklıklarda dahi işlevsel kalacak şekilde uyum sağlamıştır.
- Bu zarlar, doymamış ve daha kısa zincirli yağ asitlerini yüksek oranda içerir ve bu durum zarı düşük sıcaklıklarda akışkan tutar.
- Bazı psikrofil bakterilerde, çoklu doymamış yağ asitlerinin bulunması zarın aşırı soğukta bile esnek kalmasına yardımcı olur.
- Böylece hücre, düşük sıcaklıklarda taşıma ve enerji üretimi gibi temel işlevlerini sürdürebilir.

Soğuk Şoku Proteinleri ve Kriyo-koruyucular

- Soğuk şoku proteinleri, bir tür moleküler şaperondur ve soğukta hassas proteinlerin aktif durumda kalmasına yardımcı olur.
- Bu proteinler ayrıca belirli mRNA'lara bağlanarak düşük sıcaklıklarda translasyonu kolaylaştırabilir.
- Kriyo-koruyucular ise antifriz proteinleri veya gliserol, bazı şekerler gibi özel çözücülerden oluşur; bunlar buz kristallerinin hücre zarını delmesini engeller.
- Çok soğuk seven bakterilerde bol miktarda üretilen hücre yüzeyi ekzopolisakkaritleri de ek bir kriyo-koruma sağlar.

Donmanın Bakteriler Üzerindeki Etkileri ve Kültür Saklama

- Donma, mikrobiyal büyümeyi durdurabilir ancak her zaman ölüme yol açmaz; hatta kimi durumlarda canlılığın korunmasına yardımcı olabilir.
- Bu özellik, bakteri kültür koleksiyonlarının korunmasında uzun süredir kullanılmaktadır.
- Hücreler, %10 DMSO veya gliserol içeren bir ortamda süspanse edilerek -80°C (ultra soğuk dondurucu) veya -196°C (sıvı azot) koşullarında yıllarca canlı kalabilir.
- Bu yöntem, mikroorganizmaların psikrofil özelliklerinden yararlanılarak geliştirilmiş etkili bir saklama stratejisidir.

Yüksek Sıcaklıkta Yaşam

- Mikroorganizmalar, güneşle ısınan topraklardan kaynaklanan sıcak su kaynaklarına kadar çok sıcak ortamlarda da yaşama uyumu geliştirmiştir.
- Bu ortamlarda yaşayan canlılar çevre sıcaklıklarına yüksek düzeyde adapte olmuşlardır ve çeşitli örnekleri ilerleyen bölümlerde tekrar ele alınacaktır.
- 45°C üzerinde optimuma sahip organizmalar termofil, 80°C üzerindeki ise hipertermofil olarak adlandırılır.
- Bu canlılar, bulundukları yüksek sıcaklıklı ortamların kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre özelleşmiştir.

Termal Ortamların Çeşitliliği

- Güneş ışığına açık toprak yüzeyleri öğle saatlerinde 50°C'nin üzerine çıkabilir ve bazı yüzeyler 70°C'ye kadar ısınabilir.
- Kompost ve silaj gibi fermantasyon ortamları da 70°C'ye ulaşabilir ve bu ortamlarda termofiller yaygın olarak bulunur.
- En uç yüksek sıcaklık ortamları ise sıcak su kaynaklarıdır; burada termofil ve hipertermofil çeşitliliği oldukça fazladır.
- Bu kaynaklar dünya genelinde bulunur ve sıcaklık özellikleri farklılık gösterebilir.

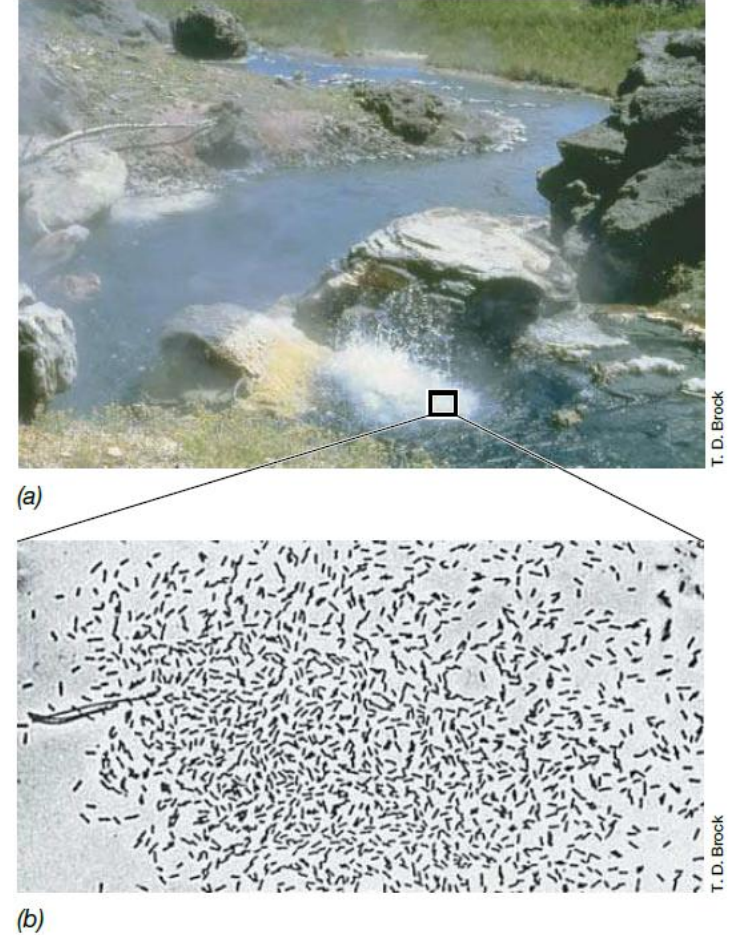
Sıcak Su Kaynaklarında Sıcaklık ve Kimyasal Çeşitlilik

- Kara kökenli pek çok sıcak su kaynağı kaynama noktasına yakın sıcaklıklara sahiptir.
- Okyanus tabanındaki hidrotermal bacalar ise 350°C ve üzeri sıcaklıklara ulaşabilir.
- Farklı sıcak su kaynakları yalnızca sıcaklık bakımından değil, kimyasal bileşim ve pH açısından da büyük çeşitlilik gösterir.
- 65°C'nin üzerindeki ortamlarda yalnızca prokaryotik hücrelerin gelişebilmesi mümkündür.

Presently known upper temperature limits for growth of living organisms	
Group	Upper temperature limits (°C)
Macroorganisms	
Animals	
Fish and other aquatic vertebrates	38
Insects	45–50
Ostracods (crustaceans)	49–50
Plants	
Vascular plants	45 (60 for one species)
Mosses	50
Microorganisms	
Eukaryotic microorganisms	
Protozoa	56
Algae	55–60
Fungi	60–62
Bacteria and Archaea	
Bacteria	
Cyanobacteria	73
Anoxygenic phototrophs	70–73
Chemoorganotrophs/chemolithotrophs	95
Archaea	
Chemoorganotrophs/chemolithotrophs	122

Hipertermofillerin Sıcak Kaynak Ekolojisi

- Kaynayan sıcak su kaynaklarında çeşitli hipertermofiller bulunur ve bunların arasında hem kemoorganotrof hem de kemolitotrof türler yer alır.
- Bu canlıların büyüme hızları, bir mikroskop lamının kaynağa daldırılması ve zamanla oluşan mikrobiyal kolonilerin incelenmesiyle belirlenebilir (Figür b).
- Lam yüzeyi mikroorganizmaların tutunması için uygun bir ortam sağlar ve hücre sayısı verilerinden jenerasyon süreleri hesaplanabilir.
- Bu tür ekolojik çalışmalar, kaynayan kaynaklarda büyüme hızlarının oldukça yüksek olabildiğini ve jenerasyon süresinin yaklaşık 1 saate kadar düşebildiğini göstermektedir.



Hipertermofillerin Çeşitliliği ve Sıcaklık Aralıkları

- Farklı morfolojik ve fizyolojik özelliklere sahip birçok hipertermofil hem Bacteria hem de Archaea üyeleri arasından kültüre edilmiştir.
- Bazı hipertermofilik Archaea türleri 100°C'nin üzerinde optimum büyüme sıcaklıklarına sahipken hiçbir Bacteria türü 95°C'nin üzerinde büyüme göstermez.
- Kaynama noktasının üzerindeki sıcaklıklarda kültür çalışmaları yapmak için basınçlı kaplar gerekir ve bu kaplar ortamın 100°C üstünde kaynamadan ısınmasını sağlar.
- Bilinen en ısı toleranslı canlılar hidrotermal bacalarda yaşar ve *Methanopyrus* cinsi Archaea 122°C'ye kadar büyüeyebilen en uç örneği temsil eder.

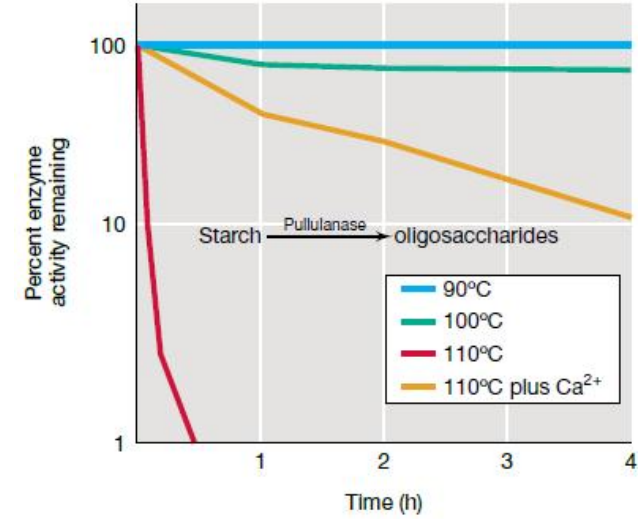


Termofillerin Doğal ve Yapay Ortamlardaki Dağılımı

- Termofiller, hipertermofillerin aksine 45–80°C arası sıcaklıklarda gelişir ve orta düzeyde sıcak ya da aralıklı olarak ısınan çevrelerde bulunur.
- Kaynar su kaynağından ayrılan suyun kademeli soğuması bir sıcaklık gradyanı oluşturur ve bu gradyan boyunca farklı türler farklı sıcaklık aralıklarında yerleşir (Figür a).
- Bu doğal sıcaklık gradyanları incelenerek çeşitli mikrobiyal grupların üst sıcaklık sınırları belirlenmiştir.
- Termofiller ayrıca sıcak su ısıtıcıları, enerji santrallerinin sıcak su çıkışları gibi yapay sıcak ortamlarda da yaygın olarak bulunur.



(a)



(b)

Yüksek Sıcaklıklarda Protein Stabilitesi

- Termofillerin ve hipertermofillerin enzimleri ile proteinleri, mezofillerdekine göre ısıya çok daha dayanıklıdır ve yüksek sıcaklıklarda en iyi performansı gösterir.
- Bu ısı dayanımı, amino asit dizilerindeki küçük değişikliklerin protein yapısını güçlendirmesi ve katlanmayı koruması ile ilişkilidir.
- Isıya dayanıklı proteinlerde bazik ve asidik amino asitler arasında daha fazla iyonik bağ ile oldukça hidrofobik protein iç kısımları bulunur.
- Bazı hipertermofillerde yüksek miktarlarda üretilen di-inositol fosfat, digliserol fosfat ve mannosilgliserat gibi çözünabilir bileşikler proteinleri ısıl denatürasyona karşı stabilize eder.

Isıya Dayanıklı Enzimlerin Biyoteknolojik Kullanımı

- Termofillerden ve hipertermofillerden elde edilen ısıya dayanıklı enzimlerin, yüksek sıcaklıklarda reaksiyon katalizleyebilmeleri sayesinde önemli ticari kullanım alanları vardır.
- Bu enzimler, mezofilik enzimlere kıyasla daha kararlıdır ve ticari preparatların raf ömrünü uzatır.
- *Thermus aquaticus*'tan izole edilen Taq polimeraz, PCR'ın otomatik döngülerle gerçekleşmesini sağlayan klasik bir örnektir.
- Endüstride belirli uygulamalar için kullanılan başka birçok ısıya dayanıklı enzim de ticari olarak temin edilebilmektedir.

Termofil ve Hipertermofillerde Zar Stabilitesi

- Yüksek sıcaklıklarda yaşam sürdürebilmek için hücre zarının da ısıya dayanıklı olması gerekir, çünkü ısı lipid çift tabakasını doğal olarak bozma eğilimindedir.
- Termofillerde ve birçok hipertermofilik Bacteria'da zar, mezofillerde bulunana kıyasla daha fazla uzun zincirli ve doymuş yağ asidi içerir.
- Doymuş yağ asitleri daha güçlü bir hidrofobik yapı oluşturur ve uzun zincirli yağ asitlerinin erime noktası daha yüksektir; bu özellikler zar dayanımını artırır.
- Hipertermofillerin çoğu Archaea'dır ve membranlarında yağ asitleri yerine izopiren birimlerinden oluşan ve gliserol fosfata eter bağıyla bağlanan C₄₀ hidrokarbonlar bulunur.



Hipertermofillerde Tek Tabakalı Zar Yapısı

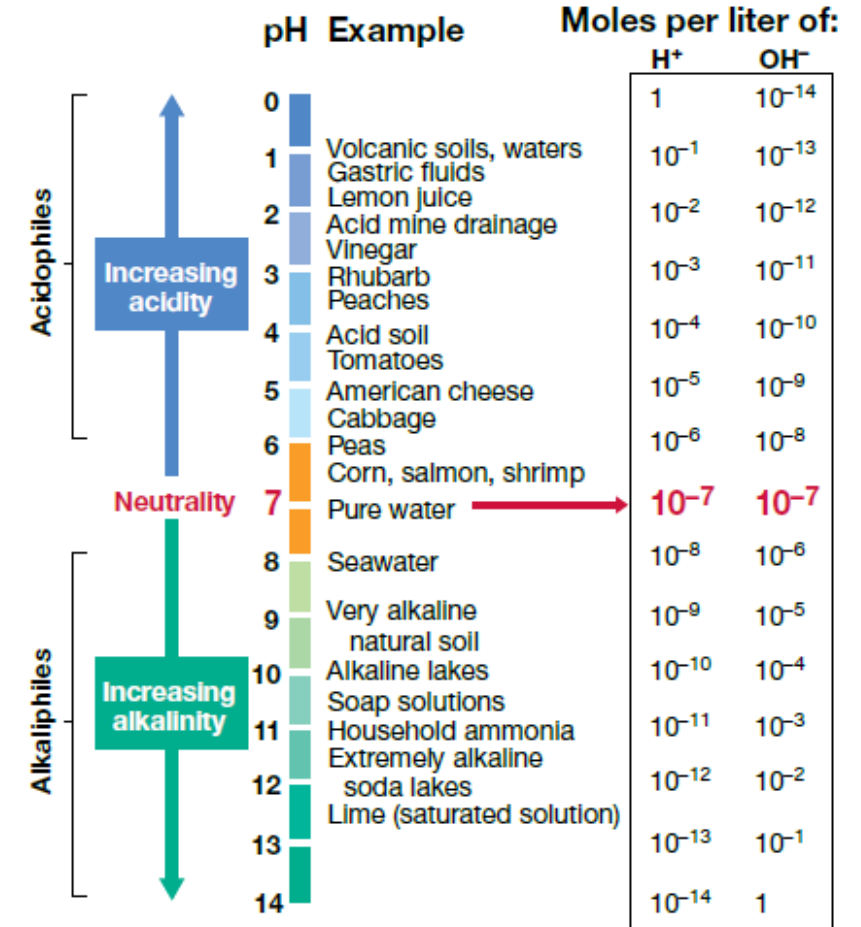
- Pek çok hipertermofil Archaea'nın zarı, diğer canlılardaki tipik çift tabakalı yapı yerine kovalent bağlı tek tabakalı bir lipid monolayer şeklindedir.
- Bu tek tabakalı yapı, zarın iki tarafını tek bir bütün olarak birleştirerek yüksek sıcaklıklarda erimeyi engeller.
- Bu benzersiz mimari, hipertermofillerin çok yüksek sıcaklıklarda bile zar bütünlüğünü korumasına olanak sağlar.
- DNA stabilitesi gibi diğer ısıl dayanım mekanizmalarına Bölüm 17'de değinilecektir.

Mikroorganizmaların Büyümesini Etkileyen Çevresel Faktörler

- Sıcaklığın büyüme üzerine belirgin etkisi olduğu gibi, pH, ozmolarite ve oksijen gibi birçok çevresel faktör de mikroorganizmaların büyümesini şekillendirir.
- Mikroorganizmalar çevresel değişimlere karşı belirli tolerans aralıkları geliştirir ve büyümeleri bu aralıkların dışına çıktığında sınırlanır.

pH Kavramı ve Mikroorganizmaların pH Aralıkları

- Bir çözeltinin asidik ya da bazik özelliği pH değeriyle ifade edilir ve nötralite pH 7 olarak kabul edilir.
- Her mikroorganizma yaklaşık 2–3 pH birimlik bir aralıkta büyüebilir ve en hızlı büyümeyi gösterdiği belirgin bir pH optimumu bulunur.
- Doğal ortamların çoğun pH 3 ile 9 arasındadır ve pH optimumu bu aralıkta olan organizmalar en yaygın olanlardır.



Nötrofiller ve Asidofiller

- pH 5.5–7.9 arasında en iyi büyüyen mikroorganizmalar nötrofil olarak adlandırılır ve *Escherichia coli* buna bir örnektir.
- Optimum büyüme pH'sı 5.5'in altında olan organizmalar asidofil olarak sınıflandırılır ve bazıları orta derecede, bazıları ise çok düşük pH'larda en iyi büyür.
- Pek çok bakteri ve mantar pH 5 veya daha altında büyürken, daha az sayıda organizma pH 3'ün altında optimum büyüme gösterir.
- pH 2'nin ve hatta pH 1'in altında büyüeyebilen asidofiller oldukça nadirdir.

Relationships of microorganisms to pH		
Physiological class (optima range)	Approximate pH optimum for growth	Example organism ^a
Neutrophile (pH > 5.5 and < 8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Acidophile (pH < 5.5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	1	<i>Picrophilus oshimae</i>
Alkaliphile (pH ≥ 8)	8	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
	9	<i>Bacillus firmus</i>
	10	<i>Natronobacterium gregoryi</i>

^a*Picrophilus* and *Natronobacterium* are Archaea; all others are Bacteria.

Asidofil Biyolojisi ve Zar Stabilitesi

- Güçlü asidofiller pH 7'de büyüyemez ve çoğu optimum aralıklarının iki pH biriminden daha yukarı değerlerde büyüme gösteremez.
- Bu organizmalarda sitoplazmik zarın stabilitesi kritik olup, pH nötr seviyelere yükseldiğinde zar yapısı bozulur ve hücreler parçalanır.
- Zar stabilitesinin korunması için yüksek proton konsantrasyonları gereklidir ve bu durum asidofil yaşamın temel bir özelliğidir.
- En bilinen örneklerden biri, pH 0.7 ve 60°C'de optimal büyüyen, pH 4'ün üzerinde kendiliğinden parçalanan *Picrophilus oshimae*'dir.



Asidofillerin Doğal Yaşam Alanları

- *Picrophilus oshimae*, aşırı derecede asidik ve volkanik aktivitelerle ilişkili jeotermal topraklarda yaşar.
- Bu ekstrem koşullarda bulunabilen asidofiller, çevresel proton yoğunluğu sayesinde zar bütünlüklerini koruyabilir.
- Asidofil ekosistemler, yüksek asiditeye uyum sağlamış sınırlı sayıda mikroorganizmanın yaşam alanını oluşturur.

Alkalifiller: Yüksek pH Ortamlarında Yaşam

- pH optimumu 8 ve üzerinde olan mikroorganizmalar alkalifil olarak tanımlanır ve bazıları pH 10'un üzerinde bile büyüme gösterebilir.
- Alkalifiller genellikle soda gölleri ve yüksek karbonatlı topraklar gibi oldukça bazik ortamlarda bulunur.
- Bu grupta en çok çalışılan türlerden biri *Bacillus firmus* olup pH 7.5–11 aralığında büyüeyebilen geniş toleranslı bir bakteridir.
- Bazı ekstrem alkalifiller aynı zamanda halofil özellik gösterir ve çoğu Archaea grubuna aittir.

Alkalifillerin Ekolojik ve Endüstriyel Önemi

- Bazı fototrofik mor bakteriler de güçlü alkalifil özellik taşır ve yüksek pH seviyelerine uyum göstermiştir.
- Belirli alkalifiller, alkali koşullarda aktif kalan proteaz ve lipaz gibi hidrolitik enzimler salgıladıkları için endüstride kullanılır.
- Bu enzimler özellikle deterjan sektöründe protein ve yağ lekelerinin uzaklaştırılmasında etkilidir.

Alkalifillerde Enerji Yönetimi ve Sodyum Motor Kuvvet

- Alkalifillerde zar biyonerjетиğinin sağlanması önemli bir sorundur, çünkü yüksek pH, proton gradyanının korunmasını zorlaştırır.
- *Bacillus firmus*, taşıma reaksiyonlarını ve kamçı hareketini proton gradyanı yerine sodyum iyonlarıyla sağlayarak sodyum motor kuvvet oluşturur.
- Buna karşın, ATP sentezi için hâlâ proton motor kuvveti kullanılır ve protonların zar yüzeyinde tutulduğu düşünülmektedir.

Sitoplazmik pH'nın Korunması

- Bir organizmanın büyüme için optimal pH değeri yalnızca dış ortamı ifade eder; hücre içi pH ise makromoleküllerin stabilitesi nedeniyle 5–9 arasında tutulur.
- Bu durum hem ekstrem asidofillerin hem de alkalifillerin sitoplazmalarını nötraliteye yakın bir aralıkta koruduğunu gösterir.
- Böylece hücresel yapıların ve enzimatik süreçlerin bozulmadan devam etmesi sağlanır.

pH Değişimlerine Karşı Tamponların Kullanımı

- Mikroorganizmalar sıvı kültürlerde çoğaldıkça ortam pH'sında büyük değişiklikler olabilir ve bunu önlemek için kültür ortamlarına tampon maddeler eklenir.
- Her tampon yalnızca dar bir pH aralığında etkili olduğundan, ihtiyaç duyulan aralığa uygun tampon seçimi yapılır.
- Nötrofil türlerin kültürlerinde potasyum fosfat (KH_2PO_4) veya sodyum bikarbonat (NaHCO_3) sıklıkla kullanılır.
- Asidofil ve alkalifiller için çeşitli organik tamponlar kullanılır ve özellikle hücrelerden elde edilen enzimlerin optimal pH'da tutulduğu enzim analizlerinde önemli rol oynar.



Su Aktivitesi ve Mikroorganizmalar İçin Önemi

- Su, yaşamın temel çözücüsü olduğundan, mikroorganizmaların büyüme hızını doğrudan etkiler.
- Bir ortamın su miktarı kadar, su içinde çözünmüş tuz ve şeker gibi çözünen maddelerin düzeyi de suyun kullanılabilirliğini belirler.
- Çözünen maddeler suyu bağladığı için, ortamda su olsa bile mikroorganizmalar için kullanılabilir su miktarı azalabilir.
- Su kullanılabilirliği, su aktivitesi (a_w) ile ifade edilir ve 0 ile 1 arasında değişen değerlerden oluşur.

Water activity of several substances		
Water activity (a_w)	Material	Example organisms ^a
1.000	Pure water	<i>Caulobacter</i> , <i>Spirillum</i>
0.995	Human blood	<i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i>
0.980	Seawater	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>
0.950	Bread	Most gram-positive rods
0.900	Maple syrup, ham	Gram-positive cocci such as <i>Staphylococcus</i>
0.850	Salami	<i>Saccharomyces rouxii</i> (yeast)
0.800	Fruit cake, jams	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (yeast), <i>Penicillium</i> (fungus)
0.750	Salt lakes, salted fish	<i>Halobacterium</i> , <i>Halococcus</i>
0.700	Cereals, candy, dried fruit	<i>Xeromyces bisporus</i> and other xerophilic fungi

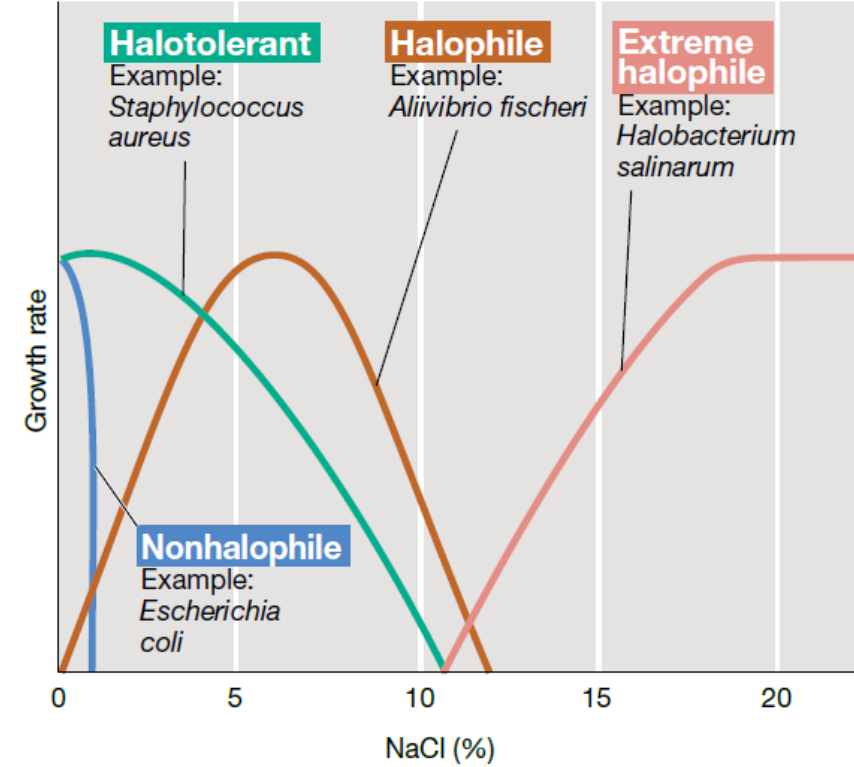
^aSelected examples of *Bacteria* and *Archaea* or fungi capable of growth in culture media adjusted to the stated water activity.

Su Aktivitesi ve Ozmotik Denge

- Yüksek su yoğunluğundan düşük su yoğunluğuna doğru gerçekleşen su geçişi osmoz ile sağlanır.
- Hücre sitoplazması genellikle dış ortama göre daha fazla çözünen madde içerdiği için suyun hücre içine doğru akması normal durumdur.
- Bu koşullarda hücre pozitif su dengesine sahip olur ve büyümesini sürdürebilir.
- Ancak çevre sitoplazmaya göre daha yüksek çözünen madde içerirse su hücre dışına çıkar ve hücre dehidrasyona uğrayarak büyüyemez.

Halofillerin Tuz Gereksinimi

- Doğal ortamlarda ozmotik baskı özellikle tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu bölgelerde önem kazanır.
- Deniz suyu yaklaşık %3 NaCl içerir ve denizel mikroorganizmalar genellikle bu tuz düzeyine ihtiyaç duyar.
- Denizel mikroorganizmalar $a_w = 0.98$ değerinde optimal büyüme gösterir.
- NaCl gereksinimi başka tuzlarla (KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$) karşılanamaz; bu nedenle bu organizmalar halofil olarak adlandırılır.

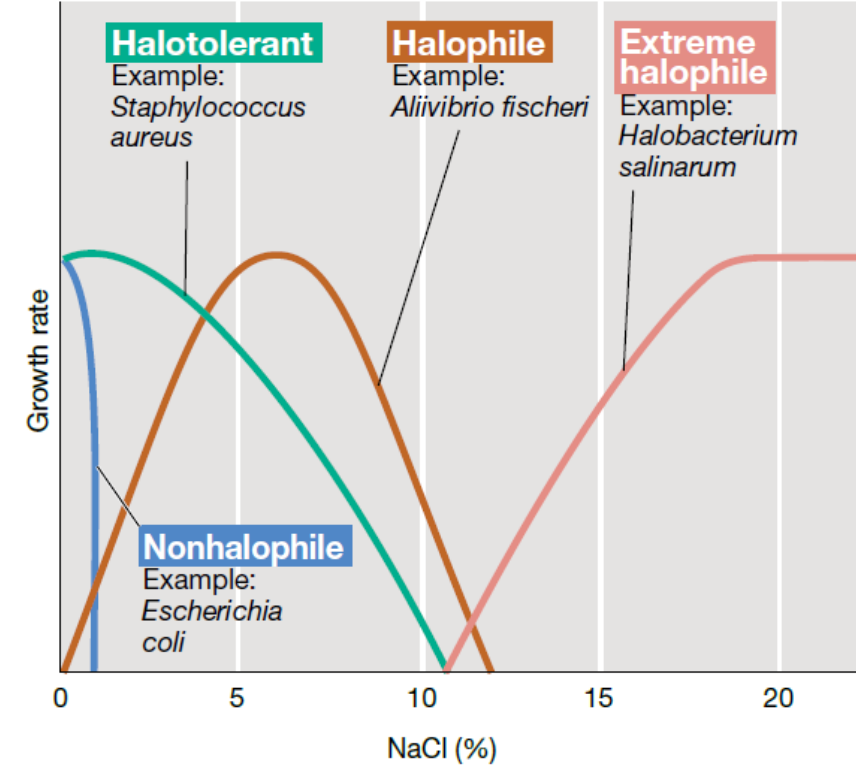


Habitatlara Göre Halofil Çeşitleri

- Farklı halofil türlerinin NaCl gereksinimleri bulundukları ortama göre değişir.
- Deniz mikroorganizmaları genellikle %1–4 NaCl, hipersalin ortamlardakiler %3–12 NaCl ile en iyi büyümeyi gösterir.
- Çok daha tuzlu ekstrem ortamlardan izole edilen türler daha yüksek NaCl düzeylerine ihtiyaç duyabilir.
- Acı su bölgelerinden elde edilen mikroorganizmalar halofil olabileceği gibi olmayabilir de.

Halotolerans, Ekstrem Halofiller ve Diğer Gruplar

- Halotolerant canlılar belirli düzeyde çözünmüş maddeye dayanabilir ancak en iyi büyümeyi tuz eklenmemiş ortamlarda gösterir.
- Ekstrem halofiller, büyüme için genellikle %15–30 NaCl gibi çok yüksek tuz düzeylerine gereksinim duyar.
- Ozmofiller, şekerce zengin ortamlarda yaşayabilir.
- Xerofiller, düşük su içeriğine sahip çok kuru ortamlarda büyüeyebilen canlılardır.



Su Aktivitesinin Mutlak Alt Sınırı

- Üç yaşam domain'inden ekstrem halofiller üzerinde yapılan çalışmalar, yaşamın alt aw sınırının 0.61 olduğunu göstermiştir.
- aw değeri 0.6'nın altındaki ortamlarda su, organizmalar için biyokimyasal yollarla bile elde edilemeyecek kadar bağlı hâle gelir.
- Buna karşın yüzeye bağlı suyu ifade eden matriks su aktivitesi daha düşük değerlerde bulunabilir ve yine de canlı toplulukları içerebilir.
- Örneğin hiper-arid çöl topraklarının aw değeri gündüz 0.1'e kadar düşebilir, ancak nem gece veya yağışla yükselerek 0.6'nın üzerine çıktığında mikrobiyal büyüme mümkün hâle gelir.

Uyum Mekanizması Olarak Compatible Solütler (Uyumlu Çözünenler)

- Bir organizma yüksek a_w ortamından düşük a_w ortamına geçtiğinde, su kaybını önlemek için iç solüt (çözünen) düzeyini artırarak pozitif su dengesini korur.
- Bu solütler ya ortamdan hücre içine alınır ya da hücre içinde sentezlenir.
- Hücre işleyişini bozmadıkları için bu maddelere compatible solüt (uyumlu çözünen) adı verilir.
- Compatible solütler şekerler, alkoller ve amino asit türevlerinden oluşan, yüksek çözünürlüğe sahip organik moleküllerdir.



Compatible Solüt Türleri ve Dağılımları

- Halofilik bakterilerde yaygın olarak bulunan glisin betain, glisinin bir analogudur ve önemli bir compatible solüttür.
- Diğer yaygın solütlere süktroz, trehaloz, deniz algleri tarafından üretilen dimetilsülfoniyopropiyonat ve gliserol örnek gösterilebilir.
- Xerofilik mantarlarda gliserol en sık kullanılan compatible solütlerden biridir.
- Bunun aksine, ekstrem halofilik Archaea ve bazı ekstrem halofilik Bacteria, compatible solüt olarak organik maddeler yerine KCl biriktirir.



Compatible Solütlerin Genetik Sınırları ve Ekolojik Yansımaları

- Bir hücrenin biriktirebileceği compatible solüt miktarı, dış ortamın oluşturduğu baskıya göre ayarlanır.
- Ancak bir organizmanın ulaşabileceği maksimum compatible solüt düzeyi genetik olarak belirlenmiştir.
- Bu nedenle farklı canlılar, farklı tuzluluk seviyelerine uyum sağlayacak şekilde evrimleşmiştir.
- Bu genetik kapasite, canlıların non-halotolerant, halotolerant, halofil veya ekstrem halofil olarak sınıflandırılmasına temel oluşturur.



Mikroorganizmaların Oksijenle İlişkisi

- Oksijenin (O_2) birçok mikroorganizma için temel bir besin olduğu ve bu organizmaların oksijen olmadan metabolizma ya da büyüme gerçekleştiremediği bilinir.
- Bazı mikroorganizmalar ise bunun tam tersine, O_2 varlığında büyüyemez ve hatta oksijen tarafından öldürülebilir.
- Bu nedenle mikroorganizmalar, oksijene olan ihtiyaçlarına veya oksijene karşı toleranslarına göre farklı gruplara ayrılır.
- Bu sınıflandırma, çevresel faktörlerin mikroorganizma büyümesini nasıl etkilediğine dair önceki kısımlarla paralellik gösterir.

Oksijen Gereksinimlerine Göre Mikroorganizma Sınıfları

- Mikroorganizmalar, O₂ ile ilişkilerine göre çeşitli gruplara ayrılır.
- Aeroblar, havada bulunan %21'lik O₂ seviyesinde büyüebilir ve metabolizmalarında O₂ kullanarak solunum yapar.
- Mikroaerofiller, yalnızca havadakinden daha düşük O₂ seviyelerinde büyüeyebilen aerob organizmalardır.
- Birçok aerob tür aynı zamanda fakültatiftir ve uygun kültür koşullarında O₂ bulunmadığında da büyüeyebilir.



Anaerobların Alt Sınıfları

- Oksijenle solunum yapamayan organizmalar anaerob olarak adlandırılır.
- Anaeroblar iki gruptur; aerotolerant anaeroblar oksijeni soluyamamaları bile varlığında büyüyebilirken, zorunlu anaeroblar O₂ tarafından inhibe edilir veya öldürülür.
- Doğada O₂ içermeyen (anoksik) habitatlar yaygındır ve çamurlar, bataklıklar, suyla doymuş topraklar, hayvan bağırsakları ve derin yeraltı ortamları gibi alanları içerir.
- Bu nedenle anaerob mikroorganizmalar doğada hem çok yaygın hem de oldukça çeşitlidir.

Zorunlu Anaeroblar ve Örnek Mikroorganizmalar

- Zorunlu anaerob özellik yalnızca üç grup organizmada bilinmektedir; çok çeşitli Bakteriler ve Archeae'lar, bazı mantarlar ve bazı protozoonlar.
- Prokaryotik anaerobların bilinen örnekleri arasında gram-pozitif endospor oluşturan *Clostridium* türleri ve metan üreten metanojen Archeae'lar bulunur.
- Zorunlu anaerobların O₂ duyarlılığı türden türe oldukça değişir; bazı *Clostridium* türleri eser miktarda O₂'ye dayanabilir.
- Buna karşılık, metanojenler O₂'ye maruz kaldıklarında hızla ölür.

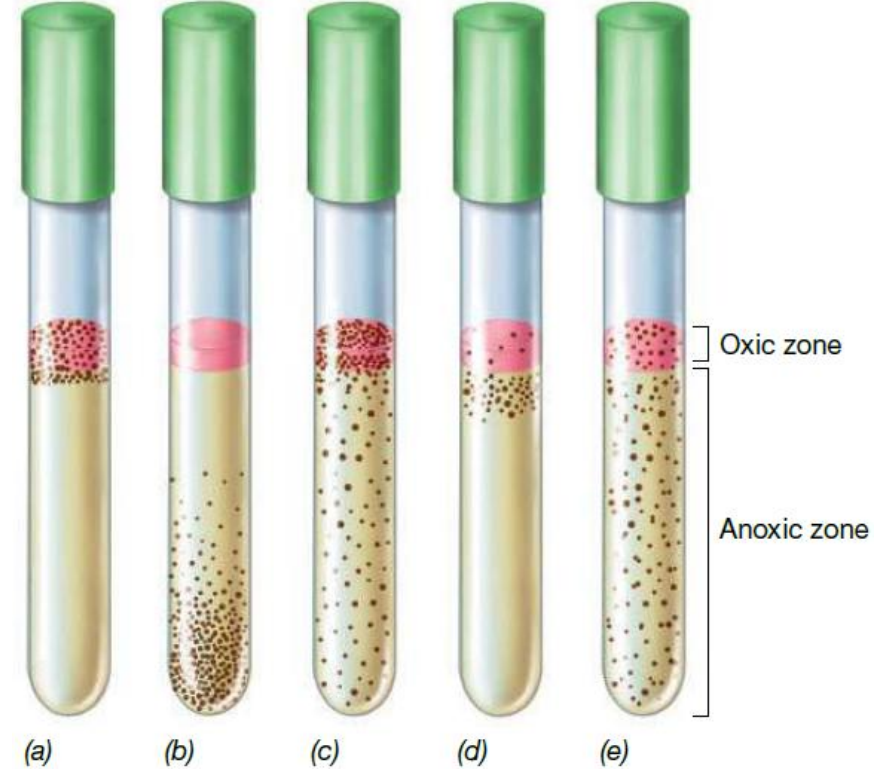


Aeroblar İçin Kültür Koşulları

- Aerobların büyümesi için kültür ortamında yoğun bir havalandırma sağlanması gerekir.
- Organizmalar büyürken ortamdaki O₂ hızla tüketildiğı için yalnızca difüzyon yoluyla gelen oksijen yeterli olmaz.
- Bu nedenle kültür kaplarının kuvvetlice çalkalanması ya da steril hava kabarcıklarının ince cam tüpler veya gözenekli cam disklerle ortama verilmesi gerekir.
- Bu işlemler, aerob kültürlerde sürekli ve yeterli oksijen seviyesini korur.

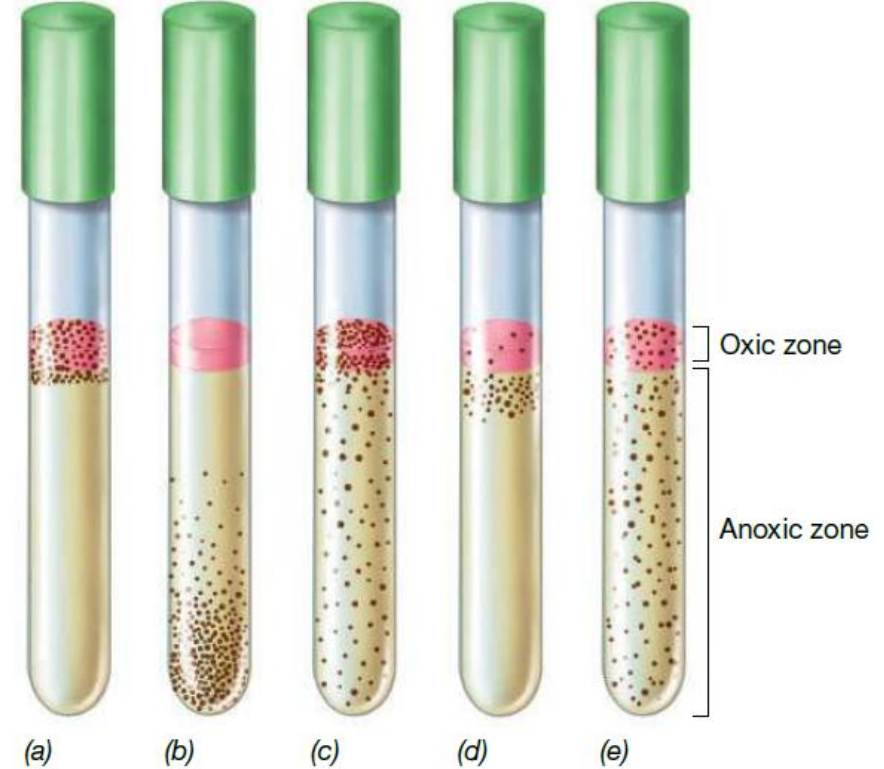
Anaeroblar İçin Oksijensiz Ortam Oluşturma

- Anaerob kültürlerde temel amaç O_2 sağlamak değil, tamamen uzaklaştırmaktır.
- Üstüne kadar doldurulmuş ve sızdırmaz kapaklarla kapatılmış kültür şişeleri, az duyarlı anaeroblar için yeterince anoksik koşullar sağlar.
- Ortamda eser miktarda O_2 kalmasını engellemek için indirgen ajanlar eklenebilir; bunlardan biri, O_2 'yi suya indirgeyen tiyoglikolattır.
- Tiyoglikolat içeren tiyoglikolat besiyeri, bir organizmanın O_2 gereksinimini test etmek için yaygınca kullanılan bir ortamdır.



Tiyoglikolat Besiyerinde Oksijen Dağılımı

- Tiyoglikolat besiyeri, az miktarda agar içerdiğinden viskoz fakat akışkan bir yapıdadır ve O₂'nin tüp boyunca sınırlı şekilde yayılmasını sağlar.
- Tiyoglikolat ortam O₂ ile reaksiyona girdikten sonra, oksijen yalnızca tüpün hava ile temas eden üst kısmına nüfuz edebilir.
- Zorunlu aeroblar sadece tüpün üst kısmında, fakültatifler tüm tüpte fakat en çok üst bölgede büyür.
- Mikroaerofiller tepeye yakın ama tam tepe noktasında olmayan yerde, anaeroblar ise yalnızca O₂'nin ulaşamadığı dip kısımda büyür.



Redoks İndikatörü ve Anoksik Kültür Yöntemleri

- Tiyoglikolat besiyerinde bulunan rezazurin, ortamın oksik bölgelerini gösteren bir redoks indikatörüdür ve oksitlenmiş hâlde pembe, indirgenmiş hâlde renksiz görünür.
- Zorunlu anaeroblar için tüm O_2 'nin uzaklaştırılması gerekir ve tüpler ya da plaklar O_2 'siz gazla doldurulmuş kavanozlarda inkübe edilebilir (Figür a).



Deborah O. Jung and M. T. Medigan

(a)



Coy Laboratory Products

(b)

Redoks İndikatörü ve Anoksik Kültür Yöntemleri

- Tamamen anoksik bir atmosferde çalışmak gerektiğinde, özel anoksik eldiven torbaları kullanılarak açık kültürlerle güvenli şekilde çalışılabilir (Figür b).
- Bu yöntemler, O_2 'ye aşırı duyarlı mikroorganizmaların güvenli biçimde kültüre alınmasını sağlar.



Deborah O. Jung and M. T. Medigan

(a)

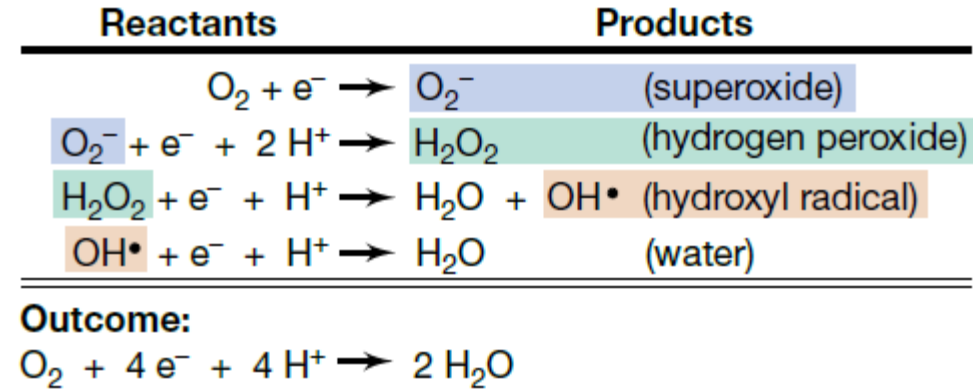


Coy Laboratory Products

(b)

Oksijen Neden Toksikdir?

- Anaerob mikroorganizmaların O_2 varlığında büyümemesinin sebebi, moleküler oksijenin kendisi değil, O_2 'nin dönüşebildiği toksik yan ürünlerdir.
- Oksijen temasında ortaya çıkabilen bu yan ürünler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH\cdot$) bulunur.
- Bu moleküller, O_2 'nin suya indirgenmesi sürecinde oluşan ara ürünlerdir ve hücre içinde ciddi zararlara yol açabilir.
- Flavoproteinler, kinonlar ve demir-kükürt proteinleri gibi çoğu hücrede bulunan elektron taşıyıcıları da bu indirgeme reaksiyonlarını katalizleyebilir.



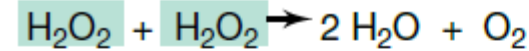
Oksijen Türevlerinin Hücrede Yarattığı Hasarlar

- Bir organizma O_2 'ye maruz kaldığında, solunum yapamasa bile bu toksik oksijen formlarına mutlaka maruz kalır.
- Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali güçlü oksitleyicilerdir ve hücredeki makromolekülleri oksitleyerek ciddi hasarlar oluşturabilir.
- Hidrojen peroksit de hücre bileşenlerine zarar verebilir fakat O_2^- ve $OH\cdot$ kadar toksik değildir.
- Bu nedenle, bu toksik molekülleri etkisiz hâle getiremeyen hücreler O_2 varlığında hayatta kalmakta zorlanır.

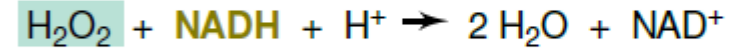


Toksik Oksijen Moleküllerinin Kontrol Altında Tutulması

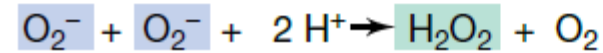
- Yaşamın oksijenli bir ortamda sürdürülebilmesi, hücrelerin toksik oksijen türlerini etkili biçimde kontrol edebilmesine bağlıdır.
- Mikroorganizmalar, süperoksit anyonu (O_2^-) ve H_2O_2 gibi toksik molekülleri yok eden enzimlere sahiptir.
- Bu enzimler, oksijen kökenli zararların hücresel yapılara ulaşmasını engelleyerek temel koruma sağlar.
- Bitkiler ve hayvanlarda olduğu gibi mikroorganizmalar da bu moleküllerin dönüşümünde benzer mekanizmalar kullanır.



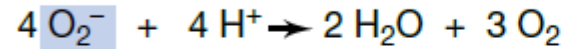
(a) **Catalase**



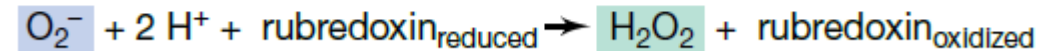
(b) **Peroxidase**



(c) **Superoxide dismutase**



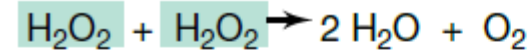
(d) **Superoxide dismutase/catalase in combination**



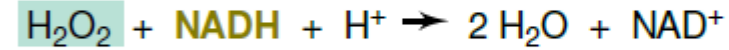
(e) **Superoxide reductase**

Katalaz ve Peroksidaz: H₂O₂'nin Zararsızlaştırılması

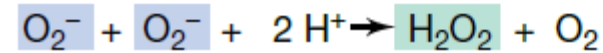
- Katalaz enzimi, H₂O₂'yi parçalayarak O₂ oluşumuna aracılık eder.
- Peroksidaz ise H₂O₂'yi suya dönüştürerek hücreyi toksik etkiden korur.
- Bu iki enzim, H₂O₂ birikiminin hücresel yapılara zarar vermesinin önüne geçer.
- Her iki enzim de aerobik yaşam için kritik bir koruma hattı oluşturur.



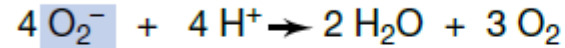
(a) **Catalase**



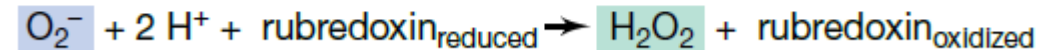
(b) **Peroxidase**



(c) **Superoxide dismutase**



(d) **Superoxide dismutase/catalase in combination**

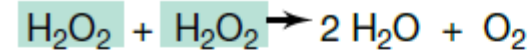


(e) **Superoxide reductase**

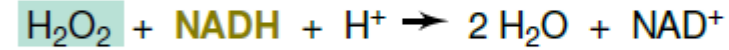


Süperoksit Dismutazın Rolü

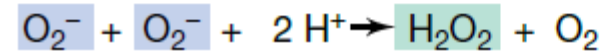
- Süperoksit dismutaz, iki O_2^- molekülünü H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürerek süperoksit radikallerini etkisiz hale getirir.
- Böylece süperoksit dismutaz ile katalaz/peroksidaz ardışık bir sistem oluşturarak O_2^- 'u tamamen zararsız ürünlere çevirir.
- Aeroblar ve fakültatif aeroblar genellikle her iki enzim tipini de içerir.
- Süperoksit dismutaz aerobik organizmalar için vazgeçilmezdir.



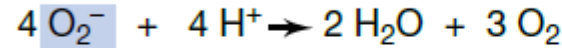
(a) **Catalase**



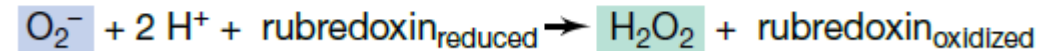
(b) **Peroxidase**



(c) **Superoxide dismutase**



(d) **Superoxide dismutase/catalase in combination**

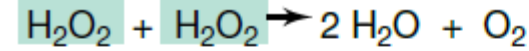


(e) **Superoxide reductase**

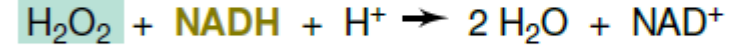


Anaeroblarda Alternatif Korunma Sistemleri

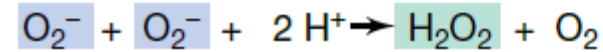
- Bazı aerotolerant anaeroblar süperoksit dismutaz içermez; bunun yerine O_2^- 'u H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştüren mangan kompleksleri kullanır.
- Bu mangan sistemleri enzimsizdir, süperoksit dismutaz kadar etkili olmasa da hücre için yeterli koruma sağlar.
- Bazı katıksız anaerob Archaea ve Bacteria türleri süperoksit dismutaz bulundurmaz.
- Bu organizmalarda süperoksit, oksijen üretmeden H_2O_2 'ye indirgenen süperoksit redüktaz ile uzaklaştırılır.



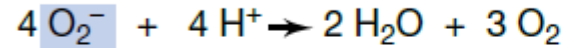
(a) **Catalase**



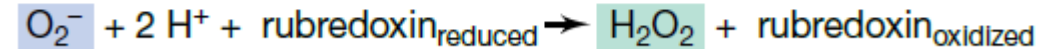
(b) **Peroxidase**



(c) **Superoxide dismutase**



(d) **Superoxide dismutase/catalase in combination**



(e) **Superoxide reductase**



Mikrobiyal Büyümenin Kontrol Edilmesi

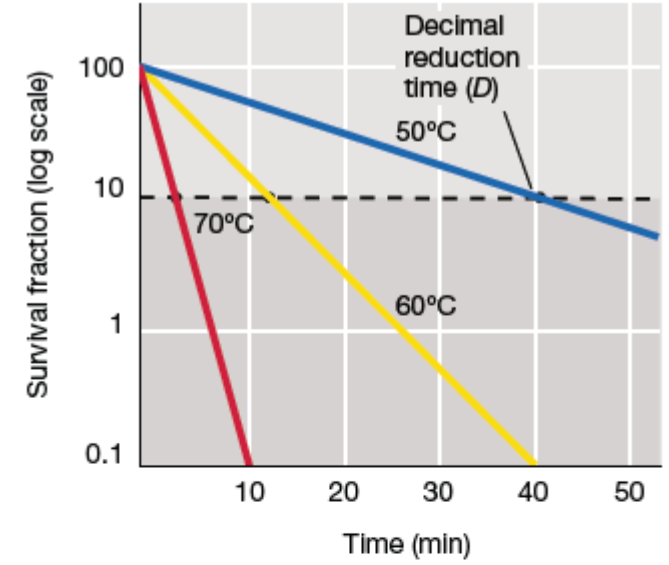
- Mikrobiyal büyüme kontrolü, günlük yaşamda ve endüstriyel uygulamalarda önemli pratik sonuçlara sahiptir.
- Örneğin, sebzeleri yıkamak veya vücut yüzeyini temizlemek mikrobiyal yükü azaltır ancak tüm mikroorganizmaları ortadan kaldırmaz.
- Sterilizasyon, virüsler dahil tüm mikroorganizmaların tamamen ortadan kaldırılmasıdır ve bazı durumlarda kesinlikle gereklidir.

Dezenfeksiyon, Dekontaminasyon ve Büyümenin Sınırlandırılması

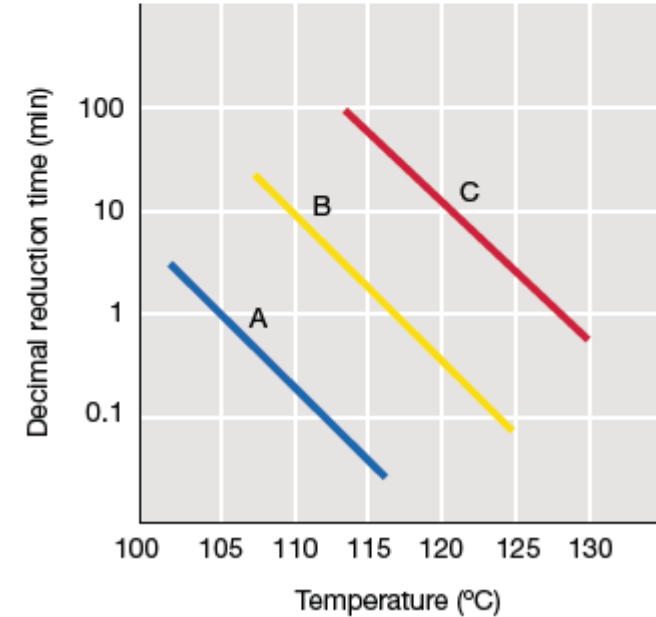
- Mikrobiyal büyüme çoğu zaman yalnızca sınırlanarak veya yavaşlatılarak kontrol edilebilir.
- Dekontaminasyon, bir yüzeyi ya da nesneyi güvenle kullanılabilir hâle getirmek için yapılan işlemleri ifade eder.
- Dezenfeksiyon, özellikle patojenleri hedef alır ancak tüm mikroorganizmaları ortadan kaldırmak zorunda değildir.
- Isı, radyasyon ve filtrasyon gibi fiziksel yöntemler yaygın biçimde kullanılır.
- Bu kısımda özellikle ısı üzerinde durulacaktır.

Isı ile Sterilizasyonun Temel Prensipleri

- Isının sterilizasyon etkisi, belirli bir sıcaklıkta mikrobiyal canlılığın 10 kat azaltılması için gereken süreyle tanımlanır; bu süre decimal reduction time (logaritmik azaltma süresi) (D) olarak adlandırılır.
- D değeri ile sıcaklık arasındaki ilişki üstel niteliktedir; $\log_{(D)}$ -sıcaklık grafiği doğrusal bir çizgi oluşturur.
- Sıcaklık arttıkça ısıya bağlı ölüm hızı da artar.
- Isının türü önemlidir: Nemli ısı daha iyi nüfuz eder ve aynı sıcaklıkta kuru ısıya göre mikroorganizmaları daha hızlı etkisiz hale getirir.



(a)



(b)

Termal Ölüm Zamanı ve Nüfus Büyüklüğünün Etkisi

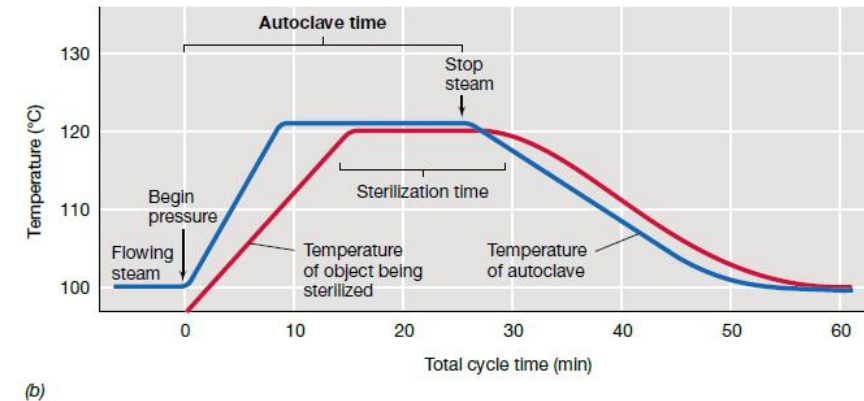
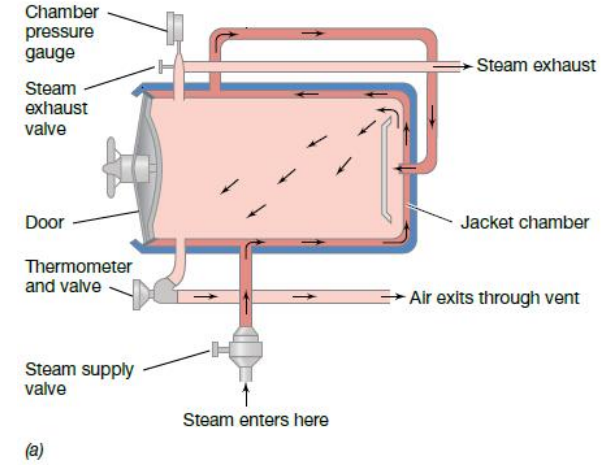
- Bir organizmanın ısıya duyarlılığının bir diğer ölçütü termal ölüm zamanıdır; bu, belirli bir sıcaklıkta tüm hücreleri öldürmek için gereken süredir.
- Bu süre, farklı inkübasyon zamanlarında ısıtılan örneklerin kültürde büyüüp büyümediğine bakılarak belirlenir.
- Termal ölüm zamanı, başlangıçtaki hücre sayısından büyük ölçüde etkilenir; yüksek yoğunluklu örneklerin tamamen öldürülmesi daha uzun sürer.
- D değerinden farklı olarak, termal ölüm zamanı popülasyon büyüklüğüne bağlıdır.

Endosporlar, Ortam Koşulları ve Isı Direnci

- Endospor oluşturan bakterilerin varlığı hem logaritmik azaltma hem de termal ölüm zamanlarını uzatabilir.
- Olgun endosporların su içeriği düşüktür ve kalsiyum dipikolinat ile SASP'ler (Small Acid-Soluble Spore Proteins) ısıya karşı yüksek dayanıklılık sağlar.
- Isı uygulanan ortamın özellikleri öldürme oranını etkiler; bu durum özellikle konserve gibi gıdaların sterilizasyonlarında önemlidir.
- Asidik ortamda mikrobiyal ölüm daha hızlıdır; konserve (örn; salça), meyveler ve turşular nötr pH'lı yiyeceklere kıyasla daha kolay sterilize edilir.
- Şeker, protein ve yağ gibi maddeler ısının nüfuzunu azaltarak mikroorganizmaların direnç göstermesine neden olabilir; tuz ise organizmaya bağlı olarak direnci artırabilir veya azaltabilir.

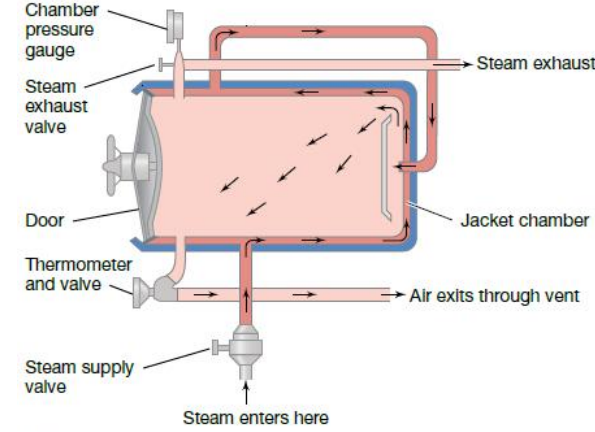
Otoklavın Temel Mantığı

- Otoklav, içinde basınçlandırılmış buhar kullanılan kapalı bir ısıtma sistemidir.
- Dayanıklı endosporların öldürülebilmesi için suyun 1 atm'deki kaynama noktasının üzerinde sıcaklıklara çıkılması gerekir.
- Otoklav, buharı 1.1 kg/cm^2 (15 lb/in^2) basınca çıkararak 121°C sıcaklığa ulaşır.
- İçerideki mikroorganizmaları öldüren şey basınç değil, basınç altında oluşan yüksek sıcaklıktır.



Otoklavda Sterilizasyon Süresi

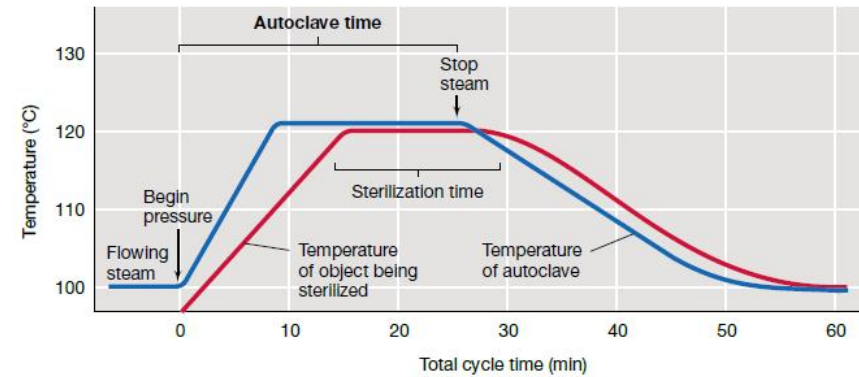
- 121°C'de, az miktardaki endospor içeren materyalin steril olması için yaklaşık 15 dakika gerekir (Figür b).
- Nesne hacimli veya sıvı miktarı fazla olduğunda, ısıнын merkeze ulaşması geciktiği için toplam süre uzatılır.
- Otoklavlama süresi materyalin büyüklüğüne ve ısı geçiş hızına bağlı olarak değişir.
- Yüksek sıcaklık, bu işlemin antimikrobiyal etkinliğinin temel belirleyicisidir.



(a)



(c)



(b)

Pastörizasyonun Amacı

- Pastörizasyon, adını Louis Pasteur'den alır ve sterilizasyonla aynı şey değildir.
- Pastörizasyon, sıvılardaki mikroorganizmaları tamamen yok etmek yerine önemli ölçüde azaltmayı hedefler.
- Bu işlem, tüm bilinen patojen bakterileri öldürecek sıcaklık ve sürelerde uygulanır.
- Mikrobiyal yük azaltıldığı için bozulabilir sıvıların raf ömrü uzar.

Süt Pastörizasyonu ve Flash Yöntemi

- Süt, bir tübüler ısı değiştiricisinden geçirilerek pastörize edilir.
- Akış hızı ile ısı kaynağının sıcaklığı ve büyüklüğü dikkatle kontrol edilir.
- Standart flash pastörizasyonunda süt 15 saniyeliğine 71°C'ye ısıtılır (veya daha kısa süreler için daha yüksek sıcaklıklar uygulanır).
- Isıtmanın ardından süt hızla soğutulur.

Ultra-Yüksek Sıcaklık (UHT) Pastörizasyonu

- UHT yönteminde süt 135°C'de 1–2 saniye tutulur.
- Bu süreç pastörizasyondan farklı olarak sütü tamamen steril hale getirir.
- UHT süt, açılmadıkça oda sıcaklığında uzun süre bozulmadan saklanabilir.
- Bu yöntem özellikle uzun raf ömrü gerektiren ürünler için tercih edilir.

Diğer Fiziksel Kontrol Yöntemleri

- Isıya ek olarak radyasyon ve filtrasyon da mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan fiziksel yöntemlerdir.
- Özellikle UV ışık, X-ışınları ve gama ışınları etkili mikrobiyal öldürücülerdir.
- Her bir radyasyon türü farklı bir etki mekanizmasına ve öldürücülük derecesine sahiptir.
- Bu nedenle uygulama alanları da birbirinden oldukça farklıdır.

UV Işıklarının Etkisi

- 220–300 nm arasındaki UV ışınları DNA tarafından absorbe edilir ve ölümcül mutasyonlara neden olabilir.
- UV, yüzeylerin ve havanın dezenfeksiyonunda yaygın olarak kullanılır.
- Laboratuvarlardaki laminar akış kabinlerinin yüzeyi ve iç havası “germisidal” UV ışığı ile dezenfekte edilir.
- UV, zayıf nüfuz gücü nedeniyle yalnızca yüzey ve hava dezenfeksiyonunda etkilidir; kutulanmış gıdalar gibi hacimli nesnelerde kullanılamaz.



J. Martinko

İyonize Radyasyonun Tanımı

- İyonize radyasyon, çarpıştığı moleküllerden iyonlar ve reaktif molekül türleri oluşturacak kadar enerjiktir.
- Bu radyasyonun birimi röntgen; sterilizasyonda kullanılan doz birimi ise rad veya gray'dir ($1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$).
- X-ışını kaynakları veya ^{60}Co ve ^{137}Cs gibi radyoaktif maddeler iyonize radyasyon üretir.
- Gama ışınları ve X-ışınları yüksek enerji ve derin nüfuz gücü sayesinde hacimli materyallerdeki mikroorganizmaları öldürebilir.

İyonize Radyasyonda D10 Değeri

- Yanda, bazı mikroorganizmaların sayısında 10 kat azalma (D10) için gereken radyasyon dozları gösterilmiştir.
- D10 değeri, ısı ile yapılan sterilizasyondaki “logaritmik azaltma zamanı” kavramına benzer.

Radiation sensitivity of some representative microorganisms		
Type of microorganism	Characteristics	D10 ^a (Gy)
Bacteria		
<i>Clostridium botulinum</i>	Gram-positive anaerobe; forms endospores	3,300
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Gram-negative, radiation-resistant coccus	2,200
<i>Lactobacillus brevis</i>	Gram-positive, rod-shaped	1,200
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positive aerobe; forms endospores	600
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negative, rod-shaped	300
<i>Salmonella enterica</i> (typhimurium)	Gram-negative, rod-shaped	200
Fungi		
<i>Aspergillus niger</i>	Common mold	500
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Baker's and brewer's yeast	500
Viruses		
Foot-and-mouth	Pathogen of cloven-hoofed animals	13,000
Coxsackie	Human pathogen	4,500

^aD10 is the amount of radiation necessary to reduce the initial population or activity level 10-fold (1 logarithm, see Figure 5.33). Gy, grays. 1 Gy is equivalent to 100 rads. The lethal dose for humans is 10 Gy.



İyonize Radyasyonda D10 Değeri

- İyonize radyasyonun öldürme eğrisi yanda verilmiştir.
- Endosporlar radyasyona karşı daha dirençlidir; virüsleri öldürmek ise çoğu bakteriye göre daha zordur.



İyonize Radyasyona Karşı Direnç

- Mikroorganizmalar genel olarak çok hücreli canlılara kıyasla daha fazla radyasyon direncine sahiptir.
- İnsanlar için ölümcül radyasyon dozu kısa sürede verildiğinde yalnızca 10 Gy kadar olabilir.
- Bu nedenle sterilizasyon dozları çok daha yüksek seviyelerdedir.
- Radyasyonun etkisi hem enerji düzeyi hem de maruz kalma süresiyle ilişkilidir.

Radyasyonun Uygulama Alanları

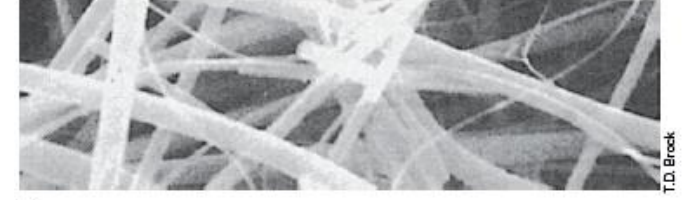
- ABD’de cerrahi malzemeler, plastik laboratuvar gereçleri, ilaçlar ve doku greftleri radyasyonla sterilize edilir.
- Bazı gıdalar ve baharatlar patojenlerden ve böceklerden arındırılmak için rutin olarak ışınlanır.
- Taze ürünler, kümes hayvanları, et ve baharatlar bu yöntemle güvenli hale getirilir.
- Bu işlem, ürünlerin steril olmasını ya da en azından patojen açısından güvenli olmasını sağlar.

Isı ile Sterilizasyonun Sınırları

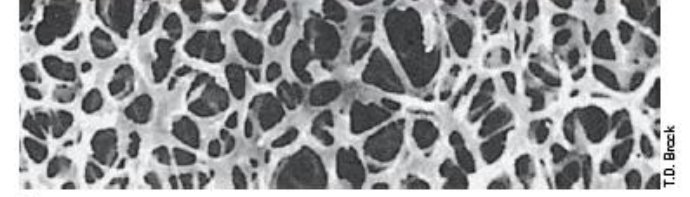
- Isı çoğu sıvının dekontaminasyonu için etkili olsa da ısıya duyarlı sıvılar genellikle filtre edilerek sterilize edilir.
- Sterilizasyon için filtre gözenek boyutunun ortalama 0.2 μm olması asgari gerekliliktir.
- Bu kadar küçük gözenekler bile çoğu virüsü tutamaz ve virüsler genellikle filtrasyona karşı geçirgendir.
- Laboratuvar çözeltileri gibi küçük hacimler için 0.45 μm ve 0.2 μm gözenekli filtreler yaygın olarak kullanılır.

Mikrobiyolojide Kullanılan Filtre Tipleri

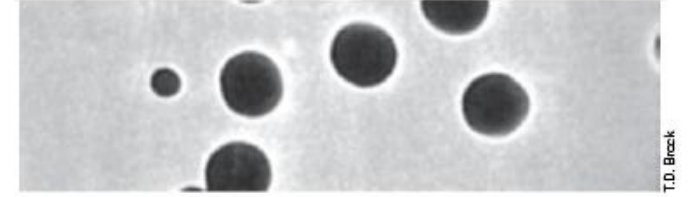
- Mikrobiyolojide rutin olarak derinlik filtreleri, membran filtreleri ve nükleopor filtreleri kullanılır.
- Derinlik filtresi, üst üste gelen kâğıt ya da cam liflerinden oluşan bir tabakadır ve parçacıkları lif ağı içinde tutar (Figür a).
- Derinlik filtreleri, özellikle biyogüvenlik kabinlerinde hava giriş ve çıkışını temizleyen HEPA filtreleri oluşturarak önemli bir rol oynar (Figür a).
- HEPA filtreler, 0.3 μm veya daha büyük parçacıkları %99.9'dan fazla verimle uzaklaştırır fakat bu işlem sterilizasyon sağlamaz.



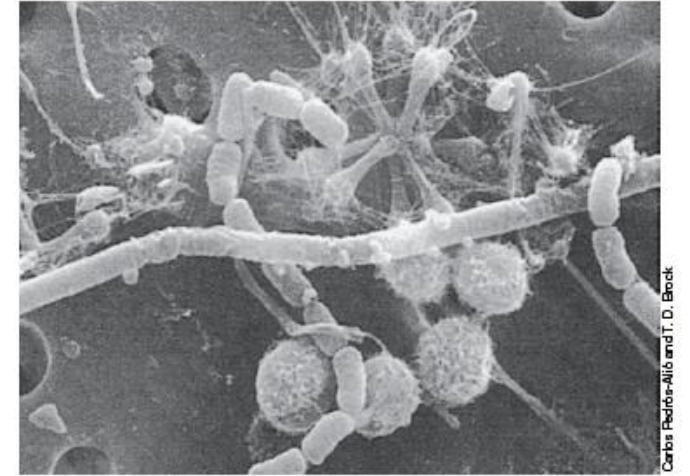
(a)



(b)



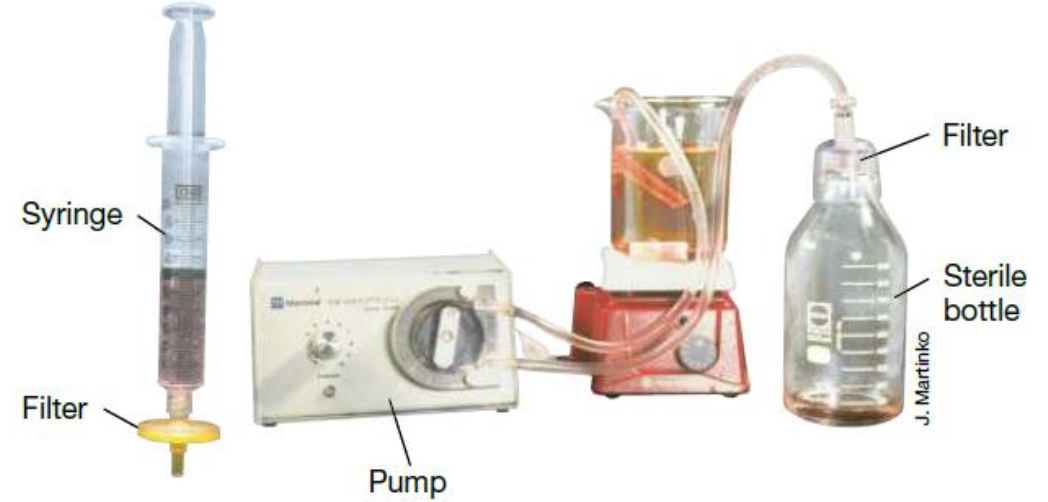
(c)



(d)

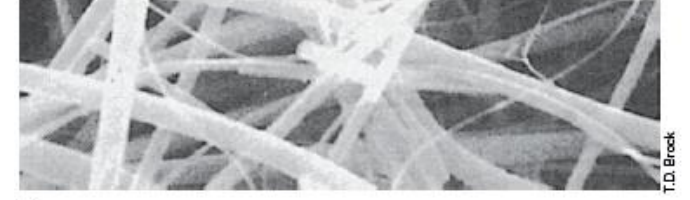
Membran Filtreleri ile Sıvı Sterilizasyonu

- Membran filtreleri, mikrobiyoloji laboratuvarında sıvı sterilizasyonunda en sık tercih edilen filtre tipidir.
- Bu filtreler, yüksek çekme dayanımlı polimerlerden üretilir ve çok sayıda küçük gözenek içerir.
- Filtrasyon, bir şırınga veya pompa yardımıyla sıvının filtre aparatından geçirilmesiyle gerçekleşir.
- Steril sıvı, filtrasyonun ardından doğrudan steril bir toplama kabına aktarılır.

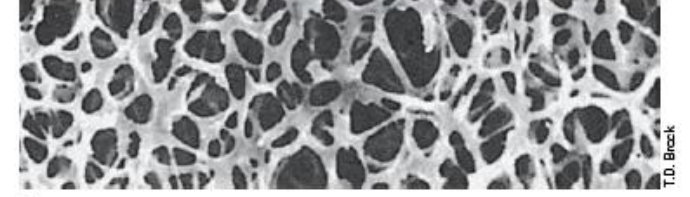


Nükleopor Filtreler ve Kullanım Alanları

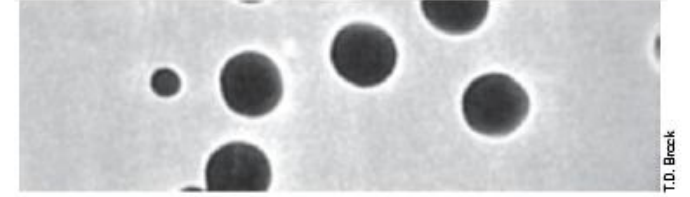
- Nükleopor filtreler, ışınlama ile işlem görmüş ve ardından kimyasal olarak aşındırılmış ince bir polikarbonat filminden üretilir (Figür c).
- Bu işlem, filtre üzerinde son derece düzgün ve eş büyüklükte gözenekler oluşturur.
- Nükleopor filtreler, özellikle taramalı elektron mikroskopisi (SEM) için örnek izolasyonunda sıklıkla kullanılır.
- Sıvılardan veya doğal örneklerden (ör. göl suyu) filtre ile ayrılan mikroorganizmalar doğrudan filtre üzerinde gözlemlenebilir (Figür d).



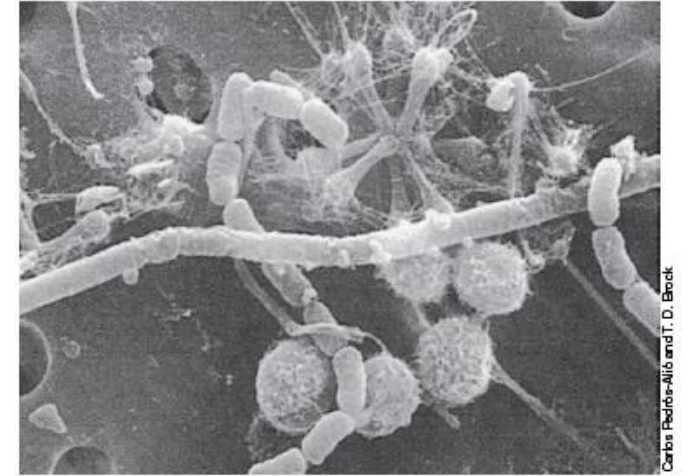
(a)



(b)



(c)



(d)

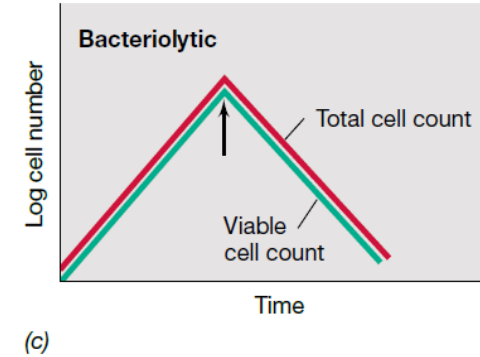
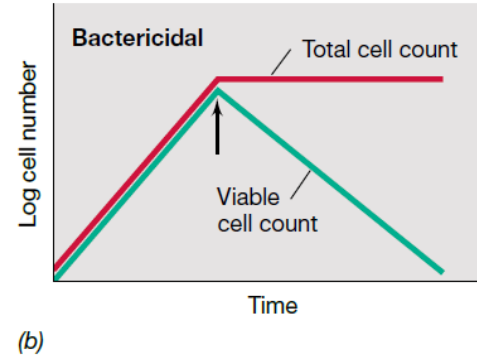
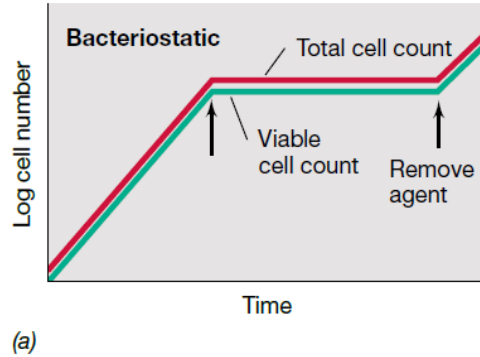
Antimikrobiyal Kimyasalların Genel Özellikleri

- Mikrobiyal büyümeyi kontrol etmek için kimyasallar yaygın olarak kullanılır ve bu maddelere antimikrobiyal ajanlar denir.
- Mikroorganizmaları öldüren maddeler -sidal ajanlar olarak adlandırılır (bakterisidal, fungisidal, virisidal).
- Sadece büyümeyi durduran maddeler ise -statik ajanlar olarak sınıflandırılır (bakteriostatik, fungistatik, viristatik).
- Bu kısımda dezenfektan olarak kullanılan kimyasallara odaklanacağız; antibiyotikler daha sonraki bölümlerde ele alınacaktır.



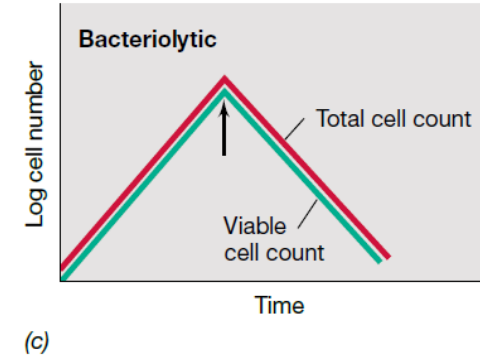
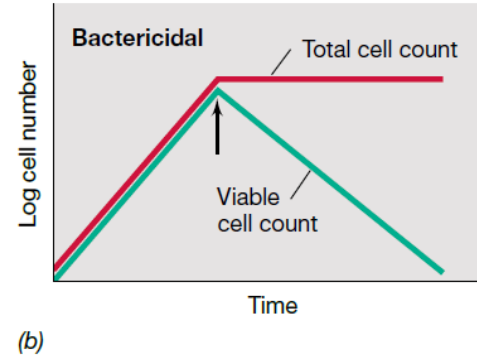
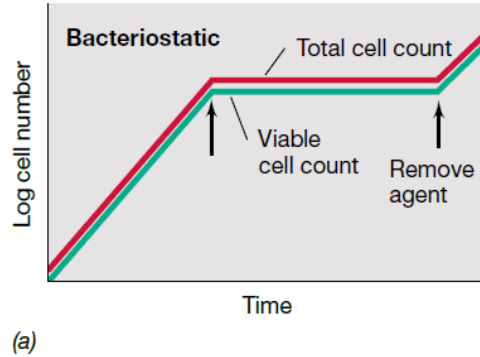
Antimikrobiyal Ajanların Büyüme Üzerindeki Etkileri

- Antibakteriyel ajanlar, kültürler üzerinde yaptıkları etkilere göre -statik, -sidal veya -litik olarak sınıflandırılır.
- Bakteriostatik ajanlar genellikle protein sentezi gibi önemli bir biyokimyasal süreci zayıf bağlanmalarla inhibe eder ve uzaklaştırıldıklarında hücreler büyümeye devam edebilir (Figür a).



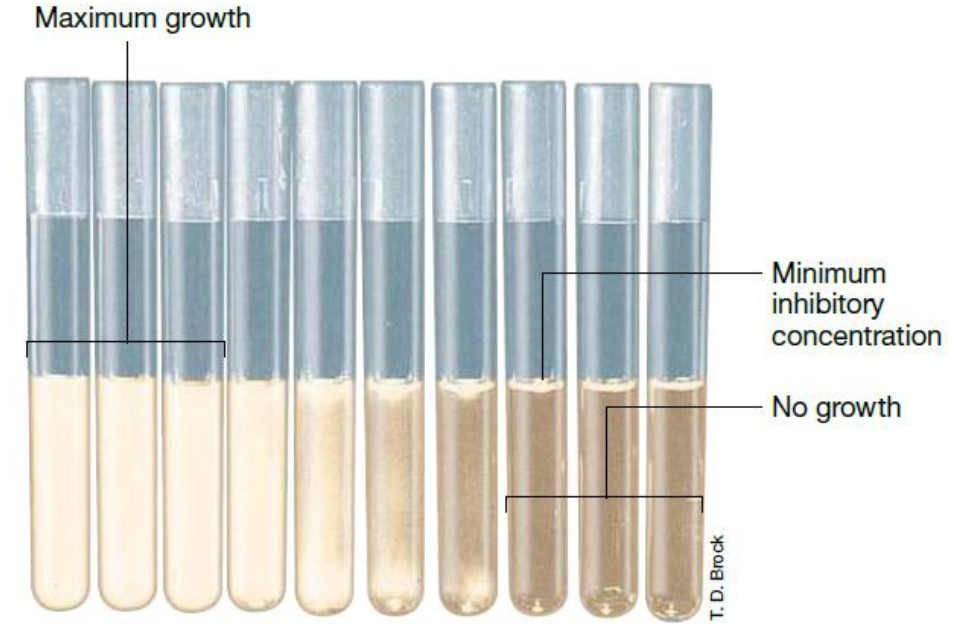
Antimikrobiyal Ajanların Büyüme Üzerindeki Etkileri

- Bakterisidal ajanlar (ör. formaldehit) hedeflerine sıkı bağlanarak hücreleri öldürür fakat ölü hücreler lizise uğramaz, bu yüzden kültür bulanıklığı değişmez (Figür b).
- Bakteriolitik ajanlar hücreleri parçalayarak öldürür ve hem canlı hem de toplam hücre sayısı azalır; bir deterjan buna örnek olabilir (Figür c).



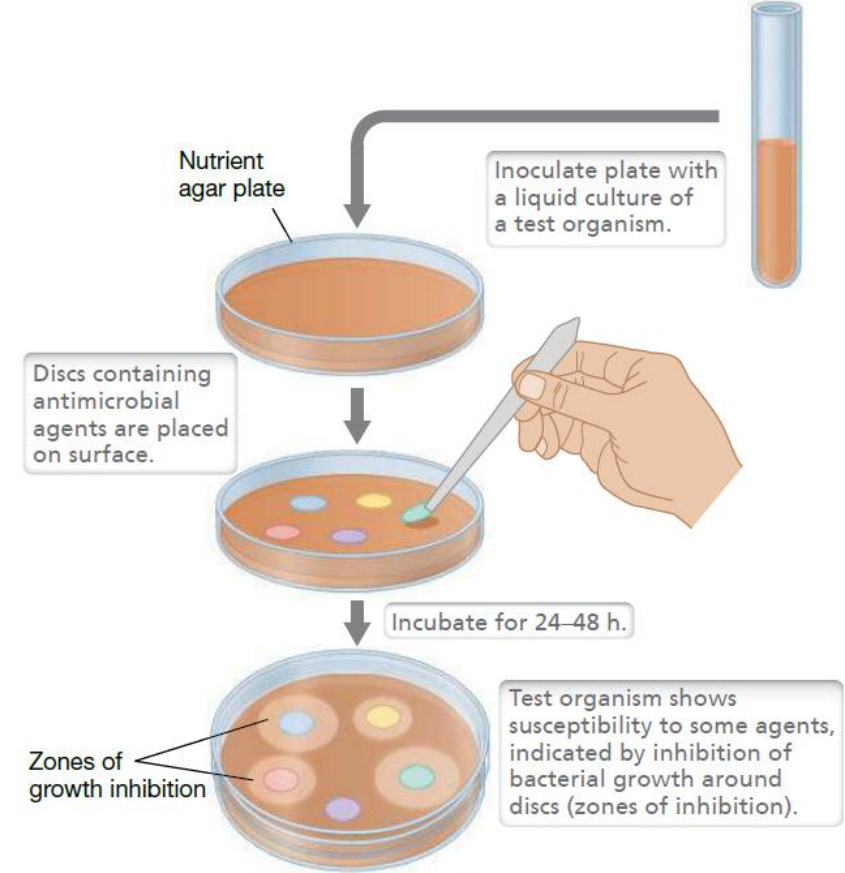
Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC) Testi

- Bir antimikrobiyal maddenin etkinliğini değerlendirmek için, test organizmasının büyümesini durdurmak için gereken en düşük miktar yani MIC belirlenir.
- MIC'i belirlemenin bir yolu, test organizması içeren sıvı besiyerlerine ajanın farklı derişimlerinin eklenmesidir.
- İnkübasyon sonrası tüpler bulanıklığa göre değerlendirilir ve tamamen inhibisyon görülen en düşük derişim MIC olarak belirlenir.
- Bu yöntem, sıvı ortamdaki antimikrobiyal etkinliği değerlendirmede standart bir yaklaşımdır.



Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkinlik Analizi

- Antimikrobiyal etkinlik, katı besiyerlerinde yapılan disk difüzyon testi ile değerlendirilebilir.
- Bilinen miktarlarda antimikrobiyal ajan içeren diskler, eşit şekilde inoküle edilmiş agar yüzeyine yerleştirilir.
- İnkübasyon sırasında kimyasal diskin çevresine doğru difüze olur ve uzaklaştıkça derişimi azalır.
- Etkili kimyasal içeren disklerin etrafında bir büyüme inhibisyon zonu oluşur; zonun genişliği ajanın miktarına, çözünürlüğüne, difüzyon katsayısına ve etkinliğine bağlıdır.



Disk Difüzyon Testinin Klinik Uygulamaları

- Disk difüzyon yöntemi, klinik olarak izole edilen patojen bakterilerin antibiyotik duyarlılığını test etmek için rutin olarak kullanılır.
- Her diskin oluşturduğu inhibisyon zonu, hangi ajanın etkili olduğunu belirlemede temel ölçüttür.
- Bu test, farklı antibiyotiklere karşı duyarlılık profilinin hızlı şekilde ortaya çıkarılmasını sağlar.
- Klinik mikrobiyolojide, tedavi seçiminde kritik öneme sahip bir değerlendirme aracı olarak kabul edilir.

Kimyasal Antimikrobiyal Ajanlara Genel Bakış

- Kimyasal antimikrobiyal ajanlar, cansız yüzeylerde ve vücudun dış yüzeylerinde patojenlerin çoğalmasını önlemek için kullanılır.
- Bu ajanlar arasında sterilantlar, dezenfektanlar, sanitizörler ve antiseptikler yer alır.
- Farklı ajan türleri, farklı etki güçlerine ve kullanım alanlarına sahiptir.
- Uygulamada amaç, yüzeydeki ya da dokudaki mikroorganizmaları kontrol etmek ve bulaş riskini azaltmaktır.

Sterilantların Tanımı ve Kullanım Alanları

- Sterilantlar, endosporlar dahil tüm mikroorganizmaları yok eden kimyasal maddelerdir.
- Isı veya radyasyon kullanımının mümkün olmadığı durumlarda dekontaminasyon ve sterilizasyon amacıyla tercih edilir.
- Hastaneler ve laboratuvarlar; termometreler, lensli aletler, polietilen tüpler ve kateterler gibi ısıya duyarlı materyalleri düzenli olarak bu yöntemle işleminden geçirir.
- Bu işlem, soğuk sterilizasyon olarak bilinir ve etilen oksit gibi gazlar veya formaldehit ve glutaraldehit gibi aldehitler kullanılarak gerçekleştirilir.

Dezenfektanların Özellikleri ve Kullanımı

- Dezenfektanlar mikroorganizmaları öldürür ancak endosporları tümüyle ortadan kaldırmayabilir.
- Daha çok yüzeylerde kullanılır; fenol ve katyonik deterjanlar buna örnektir.
- Zeminler, masalar, tezgâh yüzeyleri ve duvarlar gibi alanlarda yaygın olarak uygulanır.
- Tıbbi ortamlar için önemli bir enfeksiyon kontrol aracıdır.

Sanitizörlerin Rolü

- Sanitizörler dezenfektanlara göre daha hafif etkilidir ve mikroorganizma sayısını azaltır ancak sterilizasyon sağlamaz.
- Gıda endüstrisinde karıştırma ve pişirme ekipmanları, tabaklar ve gereçler üzerinde yaygın kullanılır.
- Su olmayan durumlarda kuru el temizliği amacıyla da kullanılabilir.
- Kontaminasyon riskini azaltan yardımcı bir temizlik aracıdır.

Antiseptikler ve Kullanım Alanları

- Antiseptikler, mikroorganizmaları öldüren veya büyümelerini durduran; aynı zamanda canlı dokulara uygulanabilecek kadar düşük toksisiteye sahip maddelerdir.
- Genellikle el yıkamada veya yüzeysel yaraların temizlenmesinde kullanılır.
- Bazı antiseptikler aynı zamanda etkili birer dezenfektan olabilir.
- Etanol, konsantrasyon ve temas süresine bağlı olarak hem antiseptik hem dezenfektan görevi görebilir.

Antimikrobiyal Ajanların Etkililiğini Belirleyen Faktörler

- Organik maddeler birçok antimikrobiyal ajanı bağlayıp etkisiz hâle getirebilir; bu nedenle kirli yüzeyleri dezenfekte etmek temiz yüzeylere göre daha zordur.
- Bakteriler, özellikle dokuların yüzeylerinde veya kirli tıbbi cihazlarda polisakkarit yapılı biyofilmler oluşturabilir.
- Biyofilmler, antimikrobiyal maddelerin yüzeye nüfuzunu yavaşlatabilir veya tamamen engelleyebilir.
- Bu nedenle bir antimikrobiyal ajanın gerçek etkisi, mutlaka kullanım koşulları altında deneysel olarak test edilmelidir.

Etkililik Testinin Gerekliliđi

- Antimikrobiyal ajanın etkisinin doğrulanması, uygulama öncesi ve sonrası mikrobiyal büyümenin ölçülmesiyle mümkündür.
- Bu testler yapılmadıkça ajanın beklenen şekilde çalıştığından emin olunamaz.
- Gerçek koşullarda etkinlik değerlendirmesi, güvenli kullanım için temel bir gerekliliktir.
- Uygulanan kimyasalın performansı ancak bu tür karşılaştırmalı testlerle netleştirilir.

Teşekkür ederim

Prof. Dr. Bektaş TEPE

