

## **YENİ METODLARLA MİKROP KÜLTÜRLERİNİN ÜRETİLMESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

**Ömer Ertürk(\*)**

**Salahattin Can (\*\*)**

### **G i r i Ő**

Heterotroph gruba dahil bir çok bakteriler, uygun miktarda karbon, nitrojen ve mineral tuzlar bulunduğu halde bile üreme kabiliyetine malik değildirler. Bu mikroorganizmalar maya ekstraktı veya kan serumu ile de temin edilebilen üreme faktörlerine veya vitaminlere ihtiyaç gösterirler. Bu vitaminlerin ekserisi B. Complex grubuna dahildir. (12). Bundan başka staphylococ ve diphtheri basili gibi bir çok mikroplar üremeleri için nicotinic aside ihtiyaç vardır. Yine bazı bakteriler üremeleri için saf halde thianine moleküllerine ihtiyaç gösterirler. Bağzılarında pyrimidine ve thiazole molekülleri muacesinde iyi ürerler (12).

Mikroorganizmalar her hangi bir üreme faktörü olmadan da üreyebilirler. Fakat bunlar ilâve edildiğinde bu üremeleri bollaşır, fazlaşır. Bu faktörlerin mikroorganizmaların üremelerinde stimulan bir etkileri vardır. Bu nokta göz önünde tutularak, çeşitli maksatlar için bakteriyoloji laboratuvarlarında çeşitli mikroorganizmaların kültürleri hazırlanırken, bu maksatlara daha iyi ve elverişli bir şekilde erişebilmek için kültür vasatlarına değişik maddeler ilâve edildiğinde bir fark meydana gelip gelmeyeceğini ortaya koymak amacıyla bu araştırma yapılmıştır.

Mikroorganizmaların üreme faaliyetlerinde çeşitli şekilde etkileri olan başlıca maddeler şunlardır:

B- Complex vitaminleri, Riboflavin, Vitamin B<sub>6</sub>, nicotinic asid ve nicotinamide, Pantothenic asid, Biotin, Amino benzoic asid, Vitamin B<sub>12</sub>. (12).

\* A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü Profesörü, Ankara-Türkiye.

\*\* A.Ü. Etlik Veteriner Bakteriyoloji ve Seroloji Enstitüsü Uzman, Vet.Hek. Ankara-Türkiye.

Yukarıda adı geçen maddelerden başka, bazı nevi mikroorganizmaların üremelerinde başka diğer maddelerin de aktiviteleri olduğu yapılan araştırmalar sonucunda anlaşılmıştır (6,9). Her ne kadar hakikî vitaminlere nazaran daha fazla miktarda istenilmelerine ve müşterek bir etkileri belirtmemelerine rağmen, inositol ve, choline bazen B-Complex grubuna dahil edilirler. Haemophilus'ların bazı neveleri tarafından hemin'e karşı bir ihtiyaç duyulur ve bu madde cytochrome ve demir-porphyrin ihtiva eden enzimlerle birleşirler. Bundan başka coprogen, demir ihtiva eden bir pigment olup bir çok funguslar için yüksek derecede aktivitedir (7). Diğer bir demir bileşimi de ferrichrome'dir. Buna karşı da bazı mikroorganizmalar ihtiyaç hissederler (10).

Yapılan araştırmalar, tabiatda oksidativ enzimlerle birleşmiş lipoic asid veya thioctic aside de mikroorganizmaların ihtiyaçları olduğunu meydana çıkarmıştır (11). Yine bazı mikroorganizmaların vitamin K ile birleşik oleic asid (2,-8), bir veya daha fazla purine ve pyrimidine bazları veya bunların derivatlarına ihtiyaçları vardır(6). Asparagin, glutamin ve putrescine de yine bazı neveler için lüzumlu olan maddelerdendir.

Bir çok bakteriler amonyum tuzları ve glikozlu vasatlarda üremeleri için bir veya daha fazla amino asitlere ihtiyaçları vardır. Sentez yapamayan mikroorganizmalar için bu aminoasitler esas üniteleri temsil ederler. Bazı mikroorganizmalarda sentez kapasitesi o kadar tahdit edilmiştir ki sentetik bir kùltür vasatına 17 veya 18 amino asidinin ilâvesi zarureti vardır. Bilhassa gram pozitif bakteriler amino asitleri sentez yapmak kabiliyetleri bakımından tahdit edilmişlerdir ve bunlar dış bir kaynaktan bu ihtiyaçlarını gidermek zorundadırlar (12).

Amino asid ihtiyacı ekseriyetle kùltür vasatının terkinin tesiri altında bulunur. Bir mikroorganizmanın vitamin ve amino asid ihtiyacı arasındaki münasebet ekseriyetle birbiriyle karşı karşıya gelmektedir. Bu durum bilhassa pyridoxal, biotin, folik asid ve vitamin B<sub>12</sub> de görölür.

Bakteriler, oksijen ihtiyaçları bakımından dört gruba ayrılırlar. Obligat anaeroblar yalnız yüksek derecede oksijen kesafetinin azaltıldığı durumlarda üreyebilirler. Fakültetiv anaeroblar hem de anaerob şartlarda üreyebilirler. Obligat aerob'lar üremeleri için oksijene ihtiyaçları vardır. Micro-aerophilic olanlar da en iyi şekilde düşük oksijen kesafetinde ürerler (12). Yüksek oksijen kesafeti bunların üremelerine mani olmaktadır. Aerob olanlar kendilerine lüzum-

lu olan enerjiyi karbon hidratların tam bir şekilde parçalanması suretiyle temin ederler. Anaerob'lar hidratların kısmi olarak parçalanmasına veya fermentasyonuna tesir ederler. Aerob bakterilerde bulunan katalase ve tam cytochrome sistemi anaerob bakterilerde nok-sandır.

Çeşitli araştırmacılar patogen leptospiralar için kullanılan kültür vasatlarındaki seruma az miktarda hemoliz olmuş eritrositlerin hemoglobin kaynağı olarak ilâve edilmesini lüzumlu görmüşlerdir. C 1 - 13). Bununla beraber diğer araştırmacılar arasında hemoglobinin üzerinde bir fikir birliği yoktur. Faine (3, 4, 5) yaptığı araştırmada, virulan ve avirulan *Leptospira icterohaemorrhagae* suşlarının korthof vasatında az ürediğini, buna karşılık vasata Fe Cl<sub>3</sub> veya demir porphyrin ihtiva eden preparatların ilâve edildiğinde bu üremenin faz lalaştığını tesbit etmiştir. Fe Cl<sub>3</sub> veya hematin ilâve edildiği zaman üremenin, demir porphyrin ihtiva eden preparatların ilâve edildiği zamana nazaran daha yavaş olduğu tesbit edilmiştir.

### M a t e r y a l v e M e t o t

Denemeler kullandığımız mikroorganizmalar laboratuvarlarımızda mevcut stok suşlardan olup aşağıdaki türlerden ibarettir.

- 1- *Pasteurella aviseptica*
- 2- Br. *Abortus Bang*
- 3- " *Melitensis*
- 4- " *Suis*
- 5- *Mycobacterium tuberculosis bovim*
- 6- " " *humanus*
- 7- " " *avium*

Denemelerimizde mikroorganizmaların sayımı için (Faine) metodundan yararlandık (3).

#### *Kültür vasatları:*

*Pasteurella* kültürleri için âdi agar ve buyyon, *Mycobacterium tuberculosis* kültürleri için % 4 gliserinli buyyon, *Brucella* grubu mikroorganizmalar için âdi agar kültür vasatları kullanılmıştır. Yukarıda adı geçen kültür. vasatlarında demir bulundurulmasını sağlamak amacı ile Fe Cl<sub>3</sub>, hematin ve hemoglobin çeşitli nisbetlerde Seitz filitrclelerinden süzölmek suretiyle sterilizasyon yapıldıktan sonra katı ve sıvı vasatlara ilâve edildi. Bunun için Fe Cl<sub>3</sub> ün 1/100, 1/1000, 1/2000, 1/5000 dilüsyonları yapıldı. Bu dilüsyonların her birinden 1

cc. ikişer adet petri kutusu na döküldü. 24 saatlik pasteurilla avisepticum kültüründen 0.1 cc ekim yapıldı. Denemelerde hemoglobin kullanıldığı zaman bunun agarda 1/1000, 1/10000, 1/20000 mahlül-leri yapıldı ve petri kutularına döküldü. Her dilüsyondan ikişer kutuya 24 saatlik pasteurilla avisepticum kültüründen 0.1 cc ekildi. Ayrıca iki adet âdi agarda da ekim yapıldı.

Hematin'in jelözde 1/2000, 1/5000, 1/10000 dilüsyonları yapıldı ve petri kutularına döküldü. Her dilüsyondan ikişer tanesine 24 saatlik pasteurilla kültüründen 0.1 cc miktarında ekim yapıldı. 5 gün süre ile etüvde bırakıldı. Bu ekimin âdi jelöz ve kanlı jelöz de kontrolları yapıldı. Yukarıda açıklandığı gibi, Fe Cl<sub>3</sub>, hametin ve hemoglobin aynı nisbetlerde sulandırılarak aynı şekilde Brucella ve tüberküloz mikropları için hazırlanan kültür vasatlarına ilâve edilmiş ve kontrollarla birlikte ekimleri yapılmıştır.

### S o n u ç l a r

Aşağıdaki cedvellerin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi, denemelerimizden şu sonuçlar elde edilmiştir:

1) Fe Cl<sub>3</sub> ile yapılan denemelerde, Pasteurella aviseptica ekilen vasatlarda kontrollarda üreme görüldüğü halde, Fe Cl<sub>3</sub> in çeşitli dilüsyonlarından ilâve edilen vasatların hiç birinde üreme tesbit edilememiştir. Buna karşılık gerek üç nevi Brucella gerekse tüberküloz mikropları ile yapılan ekimlerde kontrollara nazaran Fe Cl<sub>3</sub> ilâve edilen vasatlarda bol üreme görülmüştür.

2) Hematin ile yapılan denemelerde, Pasteurella aviseptica ekilen vasatlarda kontrollarda üreme görüldüğü halde hematinin

Cedvel I

Fe Cl<sub>3</sub> ile yapılan denemelerde alınan sonuç

| Mikrob nevi                        | Çeşitli sulandırmalarda üreme |        |        |        |      |
|------------------------------------|-------------------------------|--------|--------|--------|------|
|                                    | 1/100                         | 1/2000 | 1/2000 | 1/5000 | Kont |
| Pasteurella aviseptica             | -                             | -      | -      | -      | +    |
| Br. Abortus Bang                   | ++++                          | +++    | ++     | +      | +    |
| Br. Melitensis                     | ++++                          | +++    | ++     | +      | +    |
| Br. Suis                           | ++++                          | +++    | ++     | +      | +    |
| Mycobacterium tuberculosis bovum   | ++++                          | +++    | ++     | +      | +    |
| Mycobacterium tuberculosis humanus | ++++                          | +++    | ++     | +      | +    |
| Mycobacterium tuberculosis avium   | ++++                          | +++    | ++     | +      | +    |

Cedvel 2

Hematin ile yapılan denemelerde alınan sonuç

| Mikrob Nevi                               | Çeşitli sulandırmalarda Üreme |        |        |         |         |
|---|-------------------------------|--------|--------|---------|---------|
|   | 1/1000                        | 1/2000 | 1/5000 | 1/10000 | kontrol |
| <i>Pasteurella aviseptica</i>             | -                             | -      | -      | -       | ++      |
| Br. Abortus Bang                          | +++ -                         | ++++   | ++++   | ++++    | ++      |
| Br. Melitensis                            | ++++                          | ++++   | ++++   | ++++    | ++      |
| Br. Suis                                  | +++ +                         | +++ +  | +++ +  | ++++    | ++      |
| <i>Mycobacterium tuberculosis bovium</i>  | -                             | -      | -      | -       | ++      |
| <i>Mycobacterium tuberculosis humanus</i> | -                             | -      | -      | -       | ++      |
| <i>Mycobacterium tuberculosis avium</i>   | -                             | -      | -      | -       | ++      |

Cedvel 3

Hemoglobin ile yapılan denemelerde alınan sonuç.

| Mikrob Nevi                               | Çeşitli sulandırmalarda üreme |         |         |         |         |
|---|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|
|   | 1/1000                        | 1/10000 | 1/20000 | 1/20000 | kontrol |
| <i>Pasteurella aviseptica</i>             | ++++                          | ++++    | +++ +   | ++++    | ++      |
| Br. Abortus Bang                          | +++ +                         | +++ +   | +++ +   | +++ +   | ++      |
| Br. Melitensis                            | ++++                          | ++++    | +++ +   | ++++    | ++      |
| Br. Suis                                  | +++ +                         | +++ +   | ++++    | +++ +   | ++      |
| <i>Mycobacterium tuberculosis bovium</i>  | ++++                          | +++ +   | +++ +   | +++ +   | ++      |
| <i>Mycobacterium tuberculosis humanus</i> | +++ +                         | +++ +   | ++++    | +++ +   | ++      |
| <i>Mycobacterium tuberculosis avium</i>   | +++ +                         | +++ +   | +++ +   | +++ +   | ++      |

çeşitli dilüsyonlarında ilâve edilen vasatların hiç birinde üreme tespit edilememiştir. Aynı sonuç tüberküloz mikrobları ile yapılan denemelerde de elde edilmiş, buna karşılık her nevi *Brucella* mikrobları ile yapılan ekimlerde kontrollara nazaran hematin ilâve edilen vasatlarda koloni sayımı bakımından bol bir üreme tesbit edilmiştir.

3) Hemoglobin ile yapılan denemelerde, *Pasteurella aviseptica* ekilen vasatlarda, hemoglobin çeşitli dilüsyonlarından ilâve

edilen vasatlarda kontrollara nazarân gerek koloni gerekse mikrob sayımı bakımından daha bol üreme tesbit edilmiştir. Her nevi tüberküloz ve *Brucella* mikrobları ile yapılan denemelerden de aynı sonuçlar elde edilmiş ve hemoglobinin bu mikroblar içinde bir üreme faktörü olduğu anlaşılmıştır.

### T a r t ı Ő m a

Bu günkü bilgilcrimize göre mikroorganizmalar her hangi bir üreme faktörü olmadan da değişik derecelerde üreyebilirler. Fakat bazı üreme faktörleri kültür vasatlarına ilâve edildiğinde mikroorganizmaların üremeleri fazlalaşmaktadır. (9,6). Son zamanlarda bazı demir bileşiklerinin de üreme faktörü olarak kullanıldıkları bildirilmektedir (3, 4, 5, 7, 10). Bazı araştırmacılar hemoliz olmuş eritrositlerin hemoglobin kaynağı olarak kullanılabileceğini ileri sürmektedirler (1, 13) Bununla beraber diğer başka araştırmacılar arasında hemoglobinin üreme faktörü olduğu hakkında bir fikir birliği yoktur. Kanaatımızca ayrılıkları, her araştırmacının denemelerinde çeşitli mikroorganizmalar kullanmalarından ileri gelmektedir. Eğer her araştırmacı denemelerinde aynı mikroorganizma ve aynı kültür vasatlarını kullanmış olsalardı bu ayrımlar meydana gelmeye bilirdi. Çünkü her bir üreme faktörü her mikroorganizmaya karşı aynı tesire malik olamaz. Bu konu üzerinde yaptığımız ve yapacak araştırmalar ancak hangi maddeyi hangi mikroorganizmaya karşı ve hangi şartlar altında kullanabileceğini meydana çıkaracaktır ki, esasen gerek bizim ve gerekse diğer araştırmalardan beklenen amaçta tburdur. Yaptığımız bu araştırma, bu konuda bu güne kadar üzerinde denemeler yapılmayan mikroorganizmalar üzerinde çeşitli maddelerin ne gibi etkiler husule getirdiğini meydana çıkarmıştır.

### Ö z e t

1) Fe Cl<sub>3</sub> ile yapılan denemelerde, *pasreurella avisepctica* ekilen kültür vasatlarının kontrollerinde üreme tespit edildiği halde Fe Cl<sub>3</sub> in çeşitli dilüsyonlarından ilâve edilen kültür vasatlarının hiç birisinde üreme tesbit edilememiştir. Buna karşılık, *Brucella* grubu ve üç nevi tüberküloz mikropları ile yapılan ekimlerde kültür vasatlarında kontrollara nazarân Fe Cl<sub>3</sub> ilâve edilenlerde bol bir üreme meydana geldiği görülmüştür.

2) Hematin ile yapılan denemelerde, *pasteurella avisepctica* ekilen kültür vasatlarında kontrollerde üreme görüldüğü halde he-

matinin çeşitli dilüsyonlarından ilâve edilen kültür vasatlarının hiç birinde üreme görülmemiştir. Aynı sonuç üç nevi tüberküloz mikropları ile yapılan denemelerden de elde edilmiştir. Buna karşılık Brucella grubu mikroorganizmaları ile yapılan denemelerde kontrollara nazaran hematin ilâve edilen kültür vasatlarında koloni sayımı bakımından bol üreme tespit edilmiştir.

3) Hemoglobin ile yapılan denemelerde, *Pasteurella aviseptica* ekilen vasatlardan hemoglobinin çeşitli dilüsyonlarından ilâve edilenlerde kontrollara nazaran koloni sayımı bakımından daha bol bir üreme görülmüştür. Her üç nevi tüberküloz ve Brucella grubu mikroorganizmaları ile yapılan denemelerden de aynı sonuçlar elde edilmiş ve hemoglobinin bu mikroorganizmalar için de bir üreme faktörü olduğu tesbit edilmiştir.

4) Yaptığımız denemeler sonucunda, çeşitli mikroorganizmaların kültür vasatlarında üretilmelerinde hemoglobinin daha elverişli bir şekilde üreme faktörü olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır.

### S u m m a r y

#### Researches on the Growing of Culture Media Using New Methods

1) In experiments made with  $Fe Cl_3$  the microorganisms of *Pasteurella aviseptica* did grow in control media, but not grow in media prepared with different solutions of  $Fe Cl_3$ . However, the microorganisms of Brucella group and *Mycobacterium tuberculosis* did grow abundant in media prepared with  $Fe Cl_3$ , if compared with controls.

2) In experiments made with Haematin, the microorganisms of *Pasteurella aviseptica* did grow in control media, but did not in media prepared with different Solutions of haematin. Same results were obtained with group of *Mycobacterium tuberculosis* microorganisms. However, the microorganisms of Brucella group did grow abundant in median prepared with haematin, if compared with controls.

3) In experiments made with haemoglobin, the microorganisms of *Pasteurella aviseptica* did grow abundant in media prepared with different solutions of Haemoglobin, if compared with controls. Same results was obtained with groups of Brucella and *Mycobacterium tuberculosis* microorganisms it is also understood that haemoglobin is a growth factor for these groups.

4) It was understood with results of our experiments, that haemoglobin is the best of growth factor for obtaining abundant growth in culture media of different kind microorganisms.

### L i t e r a t ü r

- 1 - **Alston, j.M. and Broom, j. C.** (1958): Leptospirosis in Man and Animals. Edinburgh: E. and S. Livingstone Ltd.
- 2 - **Francis, j., and others.** (1953): Biochem. j., 55: 596.
- 3 - **Faine, S.** (1957): Brit. J. exp. Path 38,1.
- 4 - **Faine, S.** (1958): R Proc. Univ. Otago med. Sch. 36, 27.
- 5 - **Faine, S.** (1959): *J. gen. Microbiol.* 20, 247-251.
- 6 - **Guirard, B.M., and Snell. E.E.** (1962): chap. 2 in the Bacteria, Vol. IV, New York, Academic Press.
- 7 - **Hesseltine, C.W., and others.** (1953): Mycologia. 45:7.
- 8 - **Hunter, S. H., and Halz, G.,G.** (1962): Ann. Rev. Microbiol., 16: 189.
- 9 - **Lichstein, H.G.** (1959): Symposium on initiation of bacteria at 6 growth. Bact. Rev., 23: 261.
- 10 - **Neilands, j. B.** (1957): Same aspects at microbial on metabolism Bact. Rev., 21: 101.
- 11 - **Reed, L. j.** (1962): Vitamins and Homones, 20:1.
- 12 - **Smith, David T., Conant, Norman F. and Overman, John R.** (1964): Zinsser Microbiology. 13 th. Edition. Appleton-Century-Crofts. New York.
- 13 - **Wolff, j. j. W.** (1964): The laboratory Diagnosis of Leptospirosis. Springfield, Ohio: W.B. Saunders.

Yözü "Dergi Yazı Kuruluna" 8.7.1966 günü gelmiştir.