

A. Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü
Prof. Dr. Ö. Ertürk

DEĞİŞİK GLİSERİN KONSANTRASYONLARININ BAKTERİSİT ETKİSİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Muzaffer Beşe* Mehmet Karal** Nejat Aydın***

Giriş

Yurdumuzda uzun senelerdir hatta bugün bile bakteriyel ve viral hastalıkların teşhisi yönünden bir ayırım yapmaksızın marazi maddelerin (özellikle organ veya organ parçaları) laboratuvara steril % 50 gliserin içinde gönderilmesi adet haline gelmiştir. Gerek Tarım Bakanlığı Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü ve gerekse bazı bilim adamları, materyallerin bu metoda göre gönderilmesini tavsiye etmektedirler (1,11,14,16). Bugün birçok batı memleketlerinde bütün marazi maddeler, uzak mesafeler için hava postası veya hava ekspresi gibi en seri vasıtalarla kuru buz içinde, dondurulmuş durumda veya buzdolabı ısısı şartlarında laboratuvara gönderilmektedir (7,10). Genel olarak % 50 gliserinli tuzlu su içinde materyallerin laboratuvara gönderilmesi terk edilmiştir. Ancak bazı bakterilerin, özellikle Enterobacteriaceae familyası bakterilerinin izolasyonu yönünden gaita numuneleri, takriben % 25 - 30 gliserinli preservatif solusyonları veya transport besiyerlerinde gönderilmektedir (2, 6, 8, 9, 12). Bailey ve Scott (2) biopsi ve otopsi materyallerinin steril kuru bir kap içinde gönderilmesini, tuzlu su veya suyun bir dereceye kadar bakterisit etkisi olduğunu, bu sebepten ilave edilmemesini Damon (7) ve Olvey (10) bakteriyolojik muayeneler için gönderilecek marazi maddelere asla kimyasal preservatiflerin ilave edilmemesini bildirmektedirler. Bu arada virolojik muayeneler yönünden materyallerin preservasyonu için bufferli gliserin solusyonu

* A. Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü Doçenti, Ankara

** A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü Asistanı, Ankara, Türkiye.

*** A. Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji ve Salgınlar Kürsüsü Asistanı, Ankara

kullanılması bugün bile tavsiye edilmektedir. (2,7,10,14). Whith (15) Özel bir araştırmada mesul bir laboratuvar uzmanının herşeyden önce kendisine gönderilecek marazi maddenin nasıl olacağıı sualini çözmesi icap ettiğini tavsiye etmektedir.

Turk ve Porter (13) sporsuz bakterileri çabukça öldüren gliserin konsantrasyonlarına bir çok virusun (poliomyelitis, kuduz ve vaccinia gibi) aylarca veya senelerce infektif kaldığını zikretmektedir. White (15), Busby ve arkadaşları (5) genel olarak sporsuz bakterilerin % 50 gliserin içinde kolaylıkla ölebileceğini, halbuki birçok virusun bu ortamda + 4°C. de uzun müddet canlı kalabileceğini yazmaktadırlar. Bununla beraber Buchanan ve Fulmer (4), River (1927) in çalışmalarına istinaden virusların gliserine karşı bakterilerden daha mukavim olduğunu, fakat bunun genellikle doğru olmadığını, zira bazı virusların (örneğin kobayların salivary gland virus gibi) % 50 gliserin içinde 6 hafta bırakıldıktan sonra aktif olmadığını kaydetmektedir.

Buchanan ve Fulmer (4) in bildirdiğine göre; Winslow ve Holland (1919) % 9 gliserin solusyonunun bazı E. coli suşlarına belirli olarak etki etmediğini, hatta % 100 gliserin 18 - 24 saatlik E. Coli kültürünün bütün hücrelerini öldürmediğini tesbit etmişlerdir. Başkaya ve Emre (3) % 50 gliserinli ortamda B. anthracis vegetatif formlarının birkaç günde başlamak üzere canlı sayımının devamlı olarak düştüğünü ve + 4°C. muhafaza edildiği takdirde 18 günde, 18 - 22°C. de ise 10 - 14 günde tamamen yaşama kabiliyetini kaybettiğini tesbit etmişlerdir.

Gliserin, birçok bakteri ve fungus için uygun bir karbon kaynağıdır. Genellikle bakteriyoloji laboratuvarlarında besiyerlerinin bir maddesi olarak kullanılır. Keza bakterilerin, gliserin kullanma özelliğini tayin etmekle onların differensiyel teşhislerinde fayda sağlanır. Diğer taraftan gliserin, aşuların bir preservatifi olarak ve hatta gliserinlenmiş lymph, çiçek aşısı gibi kullanılır (4). Gliserin, bir kurutucu gibi etki gösterir ve böylece dokuların autoliz olmasını geciktirir. Bu yüzden virusların preservasyonu için gliserinin kullanılması, virusların autoliz olan dokulardaki şartlara çok hassas olmasından ötürüdür (4).

Biz bu araştırmayı yıllardan beri yapılan şikayetleri dikkate alarak % 50 gliserinli tuzlu su içinde marazi madde gönderme metodunun mahzurlu olup olmadığını ortaya çıkarmak amacı ile yaptık. Bu bakımdan önce değişik gliserin konsantrasyonlarının bazı patojen bakteri kültürleri üzerine bakterisit etkisini araştırdık. Bilahare deneysel olarak enfekte edilmiş laboratuvar hayvanlarına ait ve % 50 gliserinli tuzlu su içindeki otopsi materyalinde bu patojenlerin yaşama kabiliyetini tayin etmeğe çalıştık.

Materyal ve Metod

Değişik gliserin konsantrasyonlarının patogen bakteriler üzerine bakterisit etkisini ölçmek için Kürsümüz kolleksiyonundan temin edilen suşlar kullanıldı. Bu suşlar (*P. multocida*, *S. paratyphi A*, *S. gallinarum*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *Str. equi*, *L. monocytogenes* (L 2), *Staph. aureus*, *B. anthracis.*, *M. capri*, *Cl. Chauvoei*) denemeye alınmadan önce uygun besiyerleri ve ısıda üretilerek karakterleri tekrar gözden geçirildi ve ondan sonra deneye işirak ettirildi.

% 0.85 tuzlu su içinde gliserinin (Merck) çeşitli dilusyonları (% 50, % 20, % 10, % 5, % 2 ve % 1) hazırlandı ve 50 cc. miktarında şişelere taksim edilerek 121°C. otoklavda yarım saat sterilize edildi. Sıvı besiyerinde üretilen kültürler, 18 - 20 saatlik inkubasyondan sonra bu şişelere inokule edildi ve ağızları steril mantar ile kapatılarak deney süresince (1 sene) oda derecesinde tutuldular. Her muayene periyodu esnasında bu şişeler hafifce çalkalanarak steril pipetle 1 cc. kültür suspansiyonu çekildi ve % 5 defibrine koyun kanı muhtevi kanlı agar yüzeyine yayıldı. 37°C. lik etüvde 3 gün inkubasyondan sonra üreme gözle kalitatif olarak tayin edildi.

Kültür deneyleri yanısıra, çeşitli patogenlerin gliserin içinde yaşama kabiliyetini tayin etmek için patogen suşlarla deney hayvanları enfekte edildi. Enfeksiyon sonucu ölen deney hayvanlarının karaciğer ve dalakları mümkün olduğu kadar aseptik şartlarda alınarak içerisinde % 50, % 20 ve % 5 gliserinli tuzlu su bulunan cam kavanozlara kondu. Bu arada materyal gliserin içine kormadan önce kontrol maksadile ekimler yapıldı ve üreme gözle kalitatif olarak kaydedildi. 24 saat aralıkla yapılan muayenelerde, özellikle karaciğer kavanozdan alınarak steril bir petri kutusuna kondu. Spatül ile hafifce sterilize edilerek sivri uclu, steril bir bistürü ile delindi, ve steril bir öze ile alınan materyal, petri kutusundaki kanlı agara yayıldı. 37°C. de 3 gün inkubasyondan sonra üreme kontrol edildi. Aseptik şartlarda karaciğer tekrar kavanoza kondu.

Sonuçlar

Bakteri kültürlerinin değişik gliserin konsantrasyonu içinde yaşama kabiliyetleri, gliserin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. (Çizelge I) Yüksek gliserin konsantrasyonu daha fazla bakterisit etki göstermekte, gliserin konsantrasyonu azaldıkça bakterisit etkide düşmektedir. Nitekim Çizelge 1 de görüldüğü gibi 10. günde yapılan kali-

% Gliserin Konsantrasyonu				Muayene aralığı
10	5	2	1	
1	2	3	2	10 gün
--	--	1	1	1 ay
—	—	--	—	3 ay
--	---	—	—	6 ay
—	---	—	—	1 sene
3	3	4	4	10 gün
1	2	3	3	1 ay
1	1	2	3	3 ay
--	---	1	1	6 ay
--	—	1	1	1 sene
2	3	3	4	10 gün
1	2	2	2	1 ay
--	—	1	1	3 at
—	---	1	1	6 ay
—	—	1	1	1 sene

% Gliserin Konsantrasyonu				Muayene aralığı
10	5	2	1	
1	1	3	3	10 gün
—	—	—	—	1 ay
—	—	—	—	3 ay
—	—	—	—	6 ay
—	—	—	—	1 sene
3	4	4	4	10 gün
1	2	2	2	1 ay
2	1	1	3	3 ay
—	1	1	1	6 ay
—	—	1	1	1 sene

tatif canlılık kontrolünde, genellikle bakteri kültürleri (*Str. equi*, *P. vulgaris*, *L. monocytogenes* ve *Cl. chauvoei* kültürleri müstesna) % 50 gliserinde tamamiyle canlılıklarını kaybetmekte, 30 gün sonra bütün kültürler (*Cl. chauvoei* hariç) hem % 50 ve hemde % 20 gliserinde ölmektedirler. Bir yıl sonra yapılan muayenelerde, bazı kültürlerin en düşük gliserin konsantrasyonlarında (% 2, % 1) bile tamamiyle öldüğü, bazılarının ise hala canlı kaldığı görüldü (çizelge 1). Bu arada bakteri kültürleri üzerine % 50 ve % 20 gliserin konsantrasyonlarının en erken ne zaman öldürücü etki gösterdiğini 24 saat aralıklarla yapılan muayenelerle araştırdık: Bu gliserin konsantrasyonları, *B. anthracis* ve *P. multocida* üzerine 24 saatte başlayan ve *B. anthracis* kültürünü 48 ve *P. multocida* kültürünü 120 saatte öldüren bir etki göstermektedir. % 5 gliserin konsantrasyonunda ise; *B. anthracis*, 7. günde, *P. multocida* 9. günde tamamiyle canlılıklarını kaybetmektedirler.

% 20 ve % 5 gliserin içinde bulunan fare karaciğerlerinde *B. anthracis* 2 gün canlı kalmaktadır. Buna karşı % 50 gliserin içinde 24 saatte ölmektedir. Aynı kültür ile enfeksiyon sonu ölen kobay karaciğerlerinde (% 50 ve % 20 gliserin içinde), *B. anthracis*'in 3 gün canlı kaldığı ve 4. günde tamamiyle öldüğü her gün yapılan izolasyon-çalışmaları ile tesbit edilmiştir.

% 50 gliserin içindeki keçi akciğer parçalarında, *Mycoplasma capri* (142 suşu) 7 gün canlı kalmakta ve 8. günde yaşama kabiliyetini kaybetmektedir.

% 50 ve % 20 gliserin içinde tutulan kobay karaciğerlerinde; *P. multocida*, 3 gün yaşamaktadır. *S. paratyphi A* ise % 50 gliserin içindeki fare karaciğerlerinde; 12 gün ve % 20 gliserin içinde 24 gün yaşamaktadır.

% 50 gliserin içinde tutulan kobay karaciğerlerinde; *S. gallinarum*, 6 gün ve *Cl. chauvoei*, 12 gün canlılığını muhafaza etmektedir.

Sonuç olarak % 50 ve % 20 gliserin içindeki materyalde patogen bakteriler, genellikle kısa zamanda yaşama kabiliyetini kaybetmektedirler. Hatta bu materyallerden izolasyon başarılı olduğu hallerde bile bakterilerin sayılarında da düşmeler olmaktadır. Buda gliserinin bakterisit etkisinin çok erken başladığını göstermektedir.

T a r t ı Ő m a

Literatürde patogen bakteriler üzerinde gliserinin bakterisit etkisi hakkındaki bilgiler çok eski yıllara dayanmaktadır ve yakın zamanlarda bu konu üzerinde yapılan araştırmalar yok denecek kadar azdır. Ancak bazı bakteriyel ve viral aşıların hazırlanma araştırmalarında, bir pręservatif olarak kullanılan gliserinin bu özelliği üzerinde durulmuştur. Başkaya ve Emre (3) B. anthracis vegetatif formlar üzerinde % 50 gliserin konsantrasyonunun bakterisit etkisini incelemişler ve vegetatif formların bu ortamda kısa zamanda ölmęe başladığını, 10 - 18 günde de tamamiyle öldüğünü bildirmişlerdir. Biz bakteri kültürleri ile yaptığımız araştırmalarda; bakterisit etkinin gliserin konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiğini, en erken tüm kültür ölümünün % 50 gliserin içinde husule geldiğini, % 20 gliserin konsantrasyonu hariç diğer gliserin konsantrasyonlarında genellikle bakteri kültürlerinin uzun zaman canlı kaldığını gördük.

Yurdumuzda ötedenberi enfeksiyöz hastalıkların teşhisi bakımından marazi madde % 50 gliserinli tuzlu su içinde laboratuvarlara gönderilmektedir. Çoğu zaman uzak bölge veya illerden tren postası ile gönderilen marazi madde kolisi, normal olarak en az bir hafta ve bazende birkaç hafta da laboratuvara ulaşmaktadır. Laboratuvarca bu gibi marazi maddeler üzerinde yapılan bakteriyolojik yoklamalardan olumsuz sonuçlar alındığı öteden beri söylenile gelmektedir. Biz bu nedenle % 50 gliserin içinde tutulan materyalde patogen bakterilerin kaç gün canlı kalabileceğini deneysel olarak araştırdık: Genel olarak bu patagen bakteriler (B. anthracis, M. capri, P. multocida, S. paratyphi A, S. gallinarum ve Cl. Chauvoei) gliserinin bakterisit etkisinden ötürü kısa bir zamanda tamamiyle ölmektedir. Keza tamamen ölünceye kadar geçen zamanda, bu patogenlerin kalitatif canlı sayılmalarında da önemli derecede bir düşme görölmüştür. Bu hal, muhtemelen bazı enfeksiyöz hastalıkların teşhisinde, izolasyonun başarılı olmamasına sebep olabilir. Her ne kadar ilk bakışta % 50 gliserin içinde tutulan kobay ve karaciğerleri küçük bir organ parçası gibi düşünölür ise de; gayet büyük akciğer parçalarında da M. capri ancak 7 gün canlı kalmıştır. Kaldıkları Tarım Bakanlığı Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü yayını (16) % 50 gliserinli tuzlu su içinde gönderilecek organ parçalarının 5 - 10 cc. büyüklüğünde olması icap ettiğini tavsiye etmektedir. Sonuç olarak yurdumuz şartlarında birçok güçlükleri (marazi maddeyi muhafaza etmek ve laboratuvara çok çabuk sevk etmek gibi) dikkate almak mecburiyetinde olsak bile % 50 gliserinli tuzlu su içinde marazi madde göndermek bakteriyolojik muayene yönünden uygun değildir.

Ö z e t

Bu araştırmada bazı patogen bakteri kültürleri üzerinde değişik gliserin konsantrasyonlarının bakterisit etkisi incelendi. Gliserinin bakterisit özelliği, gliserin konsantrasyonuna ve kültürlerin gliserin ile temasta kaldığı müddete bağlıdır. Keza % 50 gliserinli tuzlu suda tutulan marazi maddede bazı patogen bakterilerin yaşama kabiliyetleri araştırıldı. Bu gliserin konsantrasyonunda, bazı patogen bakterilerin (*P. multocida*, *B. anthracis*, *M. capri*, *S. gallinarum*) kısa bir zamanda öldüğünü sonuçlar gösterdi.

S u m m a r y

A study of the bactericidal effect of glycerol on various pathogenic bacteria

The bacterial effect of glycerol on various pathogenic bacteria was investigated in this study. The bactericidal activity of glycerol depended upon its concentration and upon the length of time the cells were exposed to it. The viability of various pathogenic bacteria was also studied in autopsy material collected in 50 percent glycerol saline. The results showed that some pathogenic bacteria (*P. multocida*, *B. anthracis*, *M. capri*, *S. gallinarum*) were killed by this concentration of glycerol in a short time.

L i t e r a t ü r

- 1- **Aygün, S. T.** (1960.): *Özel mikrobiyoloji ve Özel Salgınlar Bilgisi*, Ankara.
- 2- **Bailey, W. R., and Scott, E. G.** (1966.): *Diagnostic Microbiology*. The C. V. Mosby Company, Saint Louis.
- 3- **Başkaya, H., ve Emre, M. N.** (1969.): *Bacillus anthracis'in vegetatif Şekillerine Isının ve Gliserinin etkisi*. Etlik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü Dergisi (Baskıda).
- 4- **Buchanan, R. E., and Fulmer, E. I.** (1930.): *Physiology and Biochemistry of Bacteria. Volume II - Effects of Environment upon Microorganisms*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- 5- **Busby, D. W. G., House, W. and Macdonald, J. R.** (1964.): *Virological Technique*. J., and A. Churchill Ltd., London.
- 6- **Cruickshank, R.** (1965.): *Medical Microbiology*. The Williams and Wilkins company, Baltimore.

- 7- **Damon, S. R.** (1963.): *Collection, handling. and shipment of diagnostic specimens.* Public Health Service Publication No. 976. U. S. Government Printing Office, Washington 25, D. C.
- 8- **Edwards, P. R., and Ewing, W. H.** (1962.): *Identification of Enterobacteriaceae.* Burgess Publishing Company, Minneapolis 15, Minnesota.
- 9- **Kauffmann, F.** (1966.): *The Bacteriology of Enterobacteriaceae.* The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- 10- **Olve, F. H.** (1968.): *Infectious animals diseases of the Near East.* Neahi Handbook No.4, United Nations and FAO.
- 11- **Sadık, M., ve Refik, A.** (1934.): *Bakteriyolojik Tahliller için Marazi Mahsul Almak ve Göndermek.* Hakimiyeti Milliye Matbaası.
- 12- **Stokes, E. J.** (1962.): *Clinical Bacteriology.* Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.
- 13- **Turk, D. C., and Porter, I. A.** (1965.): *A short Textbook of Microbiology.* W. B. Saunders Company, Philadelphia and London.
- 14- **Urman, H. K.** (1966.): *Kısa Nekropsi Teknikleri ve Bazı Hastalıkların Teşhisi için Alınacak Marazi Maddeler ve Muhafaza şekilleri.* A. Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları, 192.
- 15- **White, R. G.** (1964.): *Essentials of Bacteriology.* J. B. Lippincott Company. Philadelphia and Montreal.
- 16- Ziraat Vekâleti, Veteriner İşleri Umum Müdürlüğü yayını (1954.): *Laboratuvarlara Muayene Maksadile Gönderilecek Materyallerin Alınma, Ambalaj ve Gönderme Metodları, Rekor matbaası, Ankara.*

Yazı "Dergi Yazı Kuruluna" 31.7.1969 günü gelmiştir.