

Konu 62

ANAEROP BAKTERİLER VE ANAEROBİZM

Aydın M. Anaerop bakteriler ve anaerobizm. Ed. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel Mikrobiyoloji. Konu 62. Sa:569-576. Güneş yayınevi, Ankara, 2004.

Bakterilerin oksijen karşısındaki tutumları genus seviyesinde özgüdür. Bu tekdüze davranışları bile bakterileri oksijen ilişkilerine göre sınıflamayı mümkün kılar.

BAKTERİ OKSİJEN İLİŞKİSİ:

Bazı bakteriler nonfermentatif yoldan enerji temin ederler. Bu suretle 1 mol glukozdan 38 ATP (380 kcal kimyasal + 308 kcal ısı enerjisi) elde ederler. Veya Kreb's siklusu ile 15 ATP (15 kcal enerji) elde ederler. Bu olaylar sırasında flavinler, sitokromlar ve demirli bileşikler kullanılır. NAD ve NAD⁺, NADH₂'e yükseltgenir. Böyle bakterilerin sitoplazmik membranlarındaki son elektron alıcısı oksijendir, bunlara **aerobik bakteriler** denir.

Öteyandan diğer bir bakteri grubu fermentatif metabolizmaya sahiptir 1 mol glukozdan 2 ATP enerji elde ederler. Membrandaki son elektron alıcısı nitrat, sülfat veya başka bir inorganik azot bileşiğidir. Bazen, fumarate, CO₂, siyanür, karbonmonoksit, polihidrik alkol veya başka bir organik bileşik son elektron alıcısı olabilir. Böyle bakteriler, hiç oksijen gereksinmedikleri gibi, oksijenin varlığı bu bakteriler için engelleyicidir. Bu grup bakterilere **anaerop bakteriler** adı verilir. Anaerobik bakterilerin üremeleri için gerekli olan atmosferin kompozisyonunu, üreme koşullarının elde edilmesini, besiyerinde redüksiyon potansiyelinin temin, idame ve monitörize edilmesini, inkübasyon ve izolasyon prensiplerini konu alan mikrobiyolojik sistematığe **anaerobizm** adı verilir.

Bazı aerop bakteriler oksijensiz ortamda hiç üreyemezler veya pek cılız koloniler yaparlar. Bunlar **zorunlu aerop** adı verilir. *Bacillus*, *Legionella*, *Pseudomonas* genusunun üyeleri ve *Mycobacterium tuberculosis* bu guruba örnek teşkil ederler. Diğer bir grup bakteri aslında aeroptur ama bir alternatif metabolizma geliştirip anerop üremeyi tercih ederler, bunlara **fakültatif anaerop** adı verilir. Enterobakteriler ve bilinen daha pek çok bakteri ailesi fakültatif anaeroptur, bu bakterilerin hem fermentatif ve hem de nonfermentatif metabolizmaları vardır. Eğer bir bakteri aslında anaerop olduğu halde alternatif metabolizmasını kullanarak aerop koşullarda üreyebiliyorsa **fakültatif aerop** adını alır. **Mikroaerofilik** bakteriler ise, ancak %4-6 O₂ 'i tolere ederek üreyebilirler. Oda atmosferinde (%20 O₂ altında) günler sonra cılız koloniler geliştirebilirler, fakat anaerobik atmosferde daha bol ürerler. *Lactobacillus* ve *Camphylobacter* üyeleri bunlara bir örnek teşkil eder. **Aerotoleran** anaerop bakteriler aslında zorunlu anaerop oldukları halde sonradan %2-8 arasında O₂ toleransı gösteren bakterilerdir. Aerotoleran ve mikroaerofilik bakterilerin arasındaki sınır keskin değildir. **Zorunlu anaerop** bakteriler ise tamamen oksijensiz veya %0.5 den az oksijen içeren ortamda üreyebilirler. *Clostridium haemolyticum*, *C. novyi* tip B, *Selenomonas ruminatum*, *Treponema denticola*, *Bacteroides gracilis* bu gruba örnektir.

Anaerobik bakterilerde peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi oksijen açığa çıkaran enzimler genellikle bulunmaz. Fakat tuhaftırki, bazı anaeroplarda katalaz enzimi bulunabilmektedir. *Tsieraella preacutus*, *Fusobacterium bullosum*, *Selenomonas sputigena*, *Prevotella intermedia* katalaz bulunduran anaerop bakterilere örnektir. Böyle bakterilerin kendi oluşturdıkları oksijenden nasıl korundukları açıklık kazanmamıştır.

Bir bakterinin oksijen duyarlılığı veya direnci, onun üretildiği besiyerinin kimyasal kompozisyonuna, inokulum miktarına, floradaki diğer bakterilerin neler olduğuna ve yapılan inkübasyonun kaçınıcı pasajı olduğuna bağlı olarak beklenmeyen sapmalar gösterebilir. Bir zorunlu aerop bakteri alternatif bir metabolizma geliştirip kuralları ihlal ederek anaerop koşullarda üreyebilir. Örneğin, *Pseudomonas aeruginosa* aslında zorunlu aerop bir bakteri olmasına rağmen NO_3 dan zengin bir besiyerine bolca ekilirse anaerop atmosfer koşullarında üreyebilir, çünkü NO_3 'ı son elektron alıcısı olarak kullanabilme yetenekleri vardır. Ayrıca, üretilen bakteri topluluğu içerisinde oksijeni bol kullanan bir bakteri, diğer bakterilere oksijensiz ortam hazırlıyor demektir. Bu sebeple zorunlu anaerop bakteriler, hızlı üreyip bol oksijen sarfeden bir bakteri (mesela bir *Bacillus*) ile birlikte inkübe edildiklerinde daha kolay ve bol ürerler. Giderek artan oksijen konsantrasyonlarında inkübe edilmek şartıyla, zorunlu anaerop bakteriler arka arkaya pasajlanırsa oksijen toleransı geliştirebilirler, oksijen varlığında üremeye alışabilirler.

Acaba oksijen, zorunlu anaerop bakteriler için toksik midir, yoksa, inhibitör müdür? Bu soru ilk defa Hentges tarafından sorulmuştur. Sayısı önceden bilinen zorunlu anaerop bakteriler oksijenli atmosfer içerisinde inkübe edilmiş ve bir süre sonra canlı hücreler sayılarak başlangıç miktarları ile karşılaştırılmıştır. Canlı bakteri hücrelerinin sayıca azalmış olması oksijenin anaerop bakteri hücresi üzerine toksik etkisi olarak yorumlanmıştır. Aynı deney redüksiyon potansiyeli için tekrarlanmıştır. Besiyerinin redüksiyon potansiyeli yeteri kadar düşük olduğunda, zorunlu anaerop bir bakterinin oksijen varken bile üreyebileceği gösterilmiştir. Oksijenin anaerobik bakterileri enzimatik yoldan değil, elektrokimyasal yoldan etkilediği açıktır. Anaerobik bakteriler için asıl önemli olan anaerobik atmosfer değil, Eh potansiyelidir. Oksijen, bakteriyi enzimatik yoldan doğrudan öldürmemekte, Eh potansiyelini artırmakta ve bu suretle hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. Yani Hentges'e göre, oksijenin öldürücü etkisi büyük ölçüde ortamdaki elektrokimyasal reaktantları yükseltgemesinden ileri gelmektedir.

Mademki oksijen, ortamın Eh potansiyelini yükseltebiliyor, o halde oksijensizliğin Eh potansiyelini düşürmesi beklenir. Bir besiyerinin içerisine *potasyum ferric siyanid* ilave ederek Eh potansiyelini +325 mV'a çıkarılmış, bu besiyerine zorunlu anaerop bakteriler (*Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* ve *Peptostreptococcus magnus*) inoküle edilmiş, oksijensiz atmosferde inkübe edilmiştir. Anaerop bakterilerin bu besiyerinde üreyebildikleri gösterilmiştir. Bu kadar yüksek bir Eh varken hiçbir anaerop bakterinin üremesi beklenmediği halde, üreme olması atmosfer kompozisyonunun (oksijensizliğin) redüksiyon potansiyelini düşürebildiğini telkin etmektedir.

Bu çalışmaların sonuçları bir anaerop mikroorganizmanın üretilmesi için atmosferinin kompozisyonunun ve redüksiyon potansiyelinin gayet önemli olduğunu ve birbirleriyle etkileşebildiklerini göstermektedir. Inkübasyon atmosferindeki oksijen ile ortamın Eh potansiyeli arasında dinamik bir elektrokimyasal etkileşim vardır.

ANAEROBİK SOLUNUM:

Birçok bakteri zincirleme gelişen elektrokimyasal olaylar (elektron transport zinciri) sırasında bir tane elektronu belirli kimyasal maddeler üzerinden sürükleyerek membrandaki son elektron alıcısına verir ve enerji temin eder. Elektron transport zincirinde gerekli olan bu başlangıç elektronu ya ortamdaki H_2 den koparılır veya heksozlar yıkılarak elde edilen pirüvat (HOOC-CO-CH_2) 'tan alınır (Embden-Meyerhof-Parnas yolu). Buraya kadar gerçekleşen olaylar, anaerop bakteriler

dışındaki bakterilerde de bulunur, fakat anaeroplarda ortaya çıkan heksoz yıkım ürünleri nispeten anaeroplara özgüdür:

Birçok *Clostridium* türleri (mesela *Clostridium saccharobutyricum*, *C. thermosaccharolyticum*) ve *Butyribacterium* türleri glukozu fermentleyerek butirat, asetat, CO₂ ve H₂'e dönüştürürler. Başka bazı *Clostridium* türleri (mesela *C. acetobutylicum* ve *C. butyricum*) butanol, aseton, izopropanol, format ve etanol'e dönüştürürler. *Propionibacterium* türleri glukozu propionik asit'e, *Veillonella* türleri CO₂, propionat, asetat ve suksinat'a dönüştürürler. Diğer bazı anaeroplarda (mesela *Bacteroides ruminicola* ve *Peptostreptococcus* türleri) ise okzalasetat, malat, fumarat ve propionat'a dönüştürür.

Bu basamaktan sonra, anaeroplarda elektron transport zinciri muhtelif fermentasyon yollarıyla devam eder. *Propionibacterium*'larda olduğu gibi propionik asit fermentasyonu, laktobasil ve *Prevotella*'larda olduğu gibi laktik veya karışık asit fermentasyonu, *Bacteroides*'lerin büyük kısmında bulunan butirik asit fermentasyonu, alkolik fermentasyon, homolaktik fermentasyon yoluyla elektronlar membrandaki son alıcı moleküle doğru sürüklenir.

Anaerop bakterilerde elektronun membrandaki son adresi genellikle nitrat (NO₃), sülfat (SO₄²⁻), fumarate, laktat, asetat, arsenit, CN veya CO₂ molekülüdür. Büyük bir sıklıkla son elektron alıcısı nitrattır. Bu sebeple birçok anaerop bakteride nitrat redüksiyon testi pozitif bulunur. Nitrat, 2 e⁻ alarak nitrit (NO₂) veya 5 e⁻ alarak azot gazı (N₂) veya 8 e⁻ alarak amonyak (NH₃) haline dönüşür= 4AH₂ + NO₃ -----> 4A + NH₃ + 2H₂O + Enerji

Eğer *Fusobacterium*'larda olduğu gibi, membrandaki son redüklenen sülfat ise 8 e⁻ alarak H₂S haline dönüşür. 4AH₂ + H₂SO₄ ---> 4A + H₂S + 4 H₂O + Enerji

Bacteroides, *Eubacterium* ve *Peptostreptococcus* türlerinde membrandaki fumarat elektronu alarak, süksinat'a redüklenir. Ortaya çıkan süksinat besiyerine salınır: AH₂ + HOOC=CH-COOH ----> A +HOOC-CH₂-CH₂-COOH + Enerji

Capnocytophaga ve *Archaeobacteria*'larda olduğu gibi membrandaki son elektron alıcısı CO₂ olursa, metan gazına dönüşür ve ortama salınır: 4 AH₂ + CO₂ ---> CH₄ + 2H₂O + Enerji

Membrandaki son elektron alıcısına verilen elektron, yeni bir elektron transport zincirinin başlangıç elektronu olarak tekrar kullanılacaksa, bakteri membranı bu elektronu yeniden içeri alabilir. Buna **oksidatif fosforilasyon** adı verilir, bir çok anaerop bakterinin ilk izolasyonunda bu mekanizma bulunmaz. Anaerop bakteriler, büyük bir sıklıkla bir sonraki elektron transport zincirinin başlangıç elektronu ortamdaki temin ederler. Bu olaylar zinciri gayet detaylı, karmaşık ve o bakteri türüne özgüdür, önceden kestirilemeyen ara basamaklar olabileceği gibi, bir bakteri türü, besiyerinin kompozisyonu veya dış ortam koşullarının gereği olarak modifiye metabolik yollar geliştirebilir ve kullanabilir. Ama sonuçta bakteri hücresi 1 mol glukozdan 2 ATP enerji temin eder.

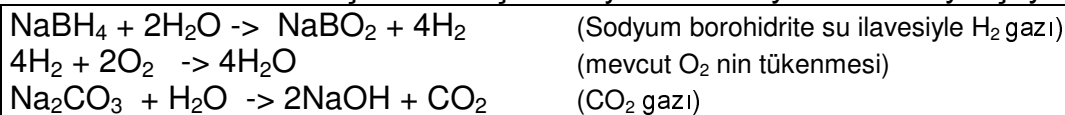
ANAEROBİK ATMOSFER:

Hacimce % 80 N₂, % 10 H₂, %10 CO₂ gaz kompozisyonu kapalı bir ortama verildiğinde, dışardan verilen hidrojen gazı ortamdaki önceden mevcut oksijen ile birleşir. Ortamın gaz kompozisyonu % 80 N₂, %10 H₂O, %10 CO₂ şekline dönüşür. Bu, anaerobik atmosferdir. Bazen azot gazı %85, karbon dioksit %5 oranında verilebilir veya CO₂ yerine He gazı kullanılabilir. Fakat üretilmesi düşünülen bakteri cinsi *Clostridium* ise, CO₂ gazı önerilir, çünkü karbondioksit, sporlu *Clostridium*'ların germinasyonunu indükler.

Anaerobik atmosfer glove box adı verilen hava sızdırmaz şekilde kapatılmış, pleksiglas kabinlerde oluşturulur. Kabin içindeki gaz basıncı, sıcaklığı ve oksijen varlığı kabin dışındaki cihazlar ile izlenebilir. Kabin kapatıldıktan sonra 0.5 paskal basınç ile bir yandan H₂ gazı doldurulurken diğer yandan kabin ekzoslanarak gaz dışarı çıkarılır. Böylece kabinin içerisi H₂ gazı ile yıkanmış olur. Sonra CO₂ ve N₂ gazları verilmeye başlanır. CO₂ seviyesi %10 olunca durulur. Bu gazlar teker teker veya hazır karışım halinde tanklar içerisinde satılır. Böyle gaz tankları patlayıcıdır, bina dışında yatay olarak bekletilmelidir. Gaz karışımı tek bir defada verilecekse %80 N₂, %10 CO₂, %10H₂ kompozisyonunda hazır gaz tankları kullanılmalıdır.

Anaerobik inkübasyon için bir başka metot PRAS (Pre Reduced Anaerobically Sterilized roll tubes) 'tır. Otoklavdan henüz çıkan anaerobik katı besiyerleri, tüplere dökülüp bu iş için özel olarak yapılmış santrifüjlü cihazlarda sabit hızla döndürülerek, besiyerinin tüpün çeperine yapışması sağlanır. Besi yeri jel kıvamına geldikten sonra bu tüplere indirgenmiş sıvı besi yeri doldurulur. Böylece çift fazlı (hem sıvı, hem katı) bir besiyeri elde edilir. Tüplere lastik tıkaç yerleştirilmeden önce tüpün havası alınır, içerisine anaerobik atmosfer karışımı doldurulur. Böyle hazırlanmış besiyerlerine **PRAS** (Roll Tube) adı verilir. Ekim yapılacağı zaman, materyal enjektöre alınır, ve tüpün ağzındaki lastik tıkaçı dikine delecek şekilde batırılarak, inoküle edilir.

Anaerobik inkübasyon için bir başka metot kavanoz metodudur. Bu amaçla hazırlanmış 3,5 litre hacminde, pleksiglastan yapılmış, kapağı hava sızdırmayacak şekilde sıkı kapanan kavanozlar vardır. Kavanozun içerisine kapağındaki siboplu vanadan anaerobik atmosfer doldurulabilir veya gaz paketi (gas pack, gas generator) adı verilen hazır kimyasal madde paketleri kullanarak kavanoz içerisinde anaerobik atmosfer oluşturulabilir. Gaz paketleri mektup zarfı büyüklüğünde alüminyum folyodan yapılmış havası alınmış paketlerdir. İçlerinde 0.8 g NaBH₄ (Sodium Borohydride) ve 3 g sodyum bikarbonat + sitrik (veya tartarik) asit bulunur. Uygun yerinden yırtılarak içerisine 10 ml su ilave edilince aktive olur ve gaz üretir. Sodyum borohidrit, H₂; sodyum bikarbonat ise CO₂ gazı üretir. Sitrik veya tartarik asitler ise reaksiyonu yavaşlatarak manüplasyonu kolaylaştırır. Gaz paketi aktive edildiğinde vakit kaybetmeden besiyerleri ile birlikte kavanozun içerisine yerleştirilir ve kavanozun kapağı sıkıca kapatılır. Gaz paketinden çıkan gazlar kavanozun içerisine anaerobik atmosferi oluşturur. Oluşan kimyasal reaksiyonlar sırasıyla şöyledir:



Bu reaksiyon ekzotermiktir. Eğer bir gaz paketi su ile aktive edilip kavanoza yerleştirildikten 40 dakika sonra kavanoz kapağında dokunma ile bir ısı artışı hissedilmiyor ve kavanozun iç yüzeyinde su buharı toplanmıyor ise veya (varsa) Eh indikatörü renksizleşmiyor ise kavanoz açılarak gaz paket bir yenisi ile değiştirilmelidir.

Gaz paketindeki kimyasal madde miktarları sabit ve standart miktarlardır. 3,5 litrelik bir anaerobik kavanoz içerisine sadece 1 (bir) tane gaz paketi konulmalıdır. Daha küçük veya büyük nonstandart kavanozlar için gaz paketi sayısı yeniden hesaplanmalıdır. Daha hızlı reaksiyon gereksinimi, 1 kavanoza 2 veya daha fazla gaz paketi kullanmayı gerektirmez. Birden fazla gaz paketi kullanıldığında H₂ gazı fazlası ortamın pH'sını asit yapacaktır ve narin anaerobik bakterilerin üremesini engelleyecektir. Bu hataya tahammül edebilen türler *Lactobacillus*, *Mitsuokella multiacitus*, *Streptococcus mutans* ve diğer bazı sakkarolitik *Prevotella* türleridir.

Gas-Pack 100 Anaerobik sistemler 60 dakika sonra oksijen oranını %0.2 - 0.5 'e, Eh potansiyelini ise -229 mV 'a (besiyerinde kan varsa -30 mV'a) düşürebilmektedir. 100 dakika sonra -300 mV'a düşürürler. Bu Eh potansiyeli, en iyi ihtimal ile ancak 1 saat sonra oluşmaktadır. Bu sürede oksijene duyarlı bazı anaerop bakteriler ölebilirler. Bir isabet olarak, patojen anaerop bakteriler oksijen ile ilk temasta derhal ölmezler. Bazıları 30-60 veya bazen 100 dakika hava ile teması tolere edebilirler. Bu özellik kavanoz yöntemini güncel tutmaktadır. Ayrıca pratik ve en ucuzdur.

Anaerop materyalin daha çabuk ve daha kısa bir sürede anaerop atmosfere kavuşması gerekiyorsa kaynayıp soğumuş sıvı besiyerine ekilir ve havadaki oksijeninin temasını engellemek için besiyerinin yüzeyi steril mineral yağı ile örtülür. Bu metot, anaerop materyalin transportunda kullanılır. Sıvı besiyerlerinde tüpün dip kısmında çok az oksijen vardır. Henüz kaynatılmış ve çalkalanmadan soğutulmuş bir sıvı anaerop besiyerinin dibindeki çözülmüş oksijen miktarı %0.9 ile %2.5 arasındadır. Bu miktar oksijen, gaz jeneratörü aktive edildikten 1 saat sonra kavanozda bulunan oksijenden daha yüksektir, fakat, bir avantaj olarak çabuktur.

Başka bir metot, Birkaç petri kutusunu alabilecek büyüklükte hava sızdırmayan ve gaz üretebilen silikon torbalardır (Bio-Bag System, Cockeysville, MD; Anaerobic Pouch System, Difco; Anaerocult-A, Merck Gibbson, NJ). Böyle ticari paketlerde Eh indikatörü de bulunur.

REDÜKSİYON POTANSİYELİ (Eh):

Bir oksitleme olayının olduğu herhangi bir kimyasal düzenek içerisinde oksitleyici kimyasal maddeye elektron verici (donör, redükleyici veya indirgeyici) adı verilir. Eğer böyle bir kimyasal madde ortamda yer alıyorsa bunun karşısında elektron alıcı (recipient, oksidan) bir madde bulunur. Böyle dengede olan bir sisteme **redox sistemi** adı verilir. Bir redox sistemde oksitlenme oluşan taraftaki elektro kimyasallara **oksidasyon yarı hücresi**, indirgenme oluşan taraftakilere **redüksiyon yarı hücresi** adı verilir. Bu demektir ki bir redox sisteminde birbirinin komplementeri olan iki tane yarı hücre bulunur. Bir yarı hücrede redüksiyon olurken, diğer yarı hücrede aynı hız ve oranda oksidasyon olur. Sistemdeki her iki yarı hücrede ölçülebilir bir elektrik yükü vardır, buna **elektrot potansiyeli** adı verilir. Oksidasyon yarı hücresindeki elektrot potansiyeline **oksidasyon potansiyeli** adı verilir, pozitifdir, redüksiyon yarı hücresindeki potansiyele **redüksiyon potansiyeli** (Eh) adı verilir ve negatifdir. Her ikisi de voltmetre ile ölçülebilen bir büyüklüktür. Birimi Volt (V) dur. Her iki yarı hücrenin elektrot potansiyel farkları ne kadar büyükse aralarındaki elektron alışverişi (kimyasal tepkime) o kadar hızlı ve kolay olur. Bir ortamda hem oksidasyon hem redüksiyon yarı hücresi birlikte bulunuyorsa, çok kısa bir süre (dakikalar) sonra aralarındaki fark sıfır olacak şekilde birbirlerini nötrleştirirler. Dengedeki redoks sistemlerde, redüksiyon potansiyeli ilk başlarda kaç volt olursa olsun dakikalar sonra sıfır olacaktır.

Bazı redoks sistemlerinde yarı hücrelerden bir tanesi bulunmaz. Örneğin bir besiyerinde oksidasyon yarı hücresi yok ise sadece redüksiyon yarı hücresi varsa, sistemin dengesi redüksiyon lehine bozuk kalacaktır. Bu özelliğe sahip besiyerinde redüksiyon potansiyeli eksi birkaç yüz milivoltun altındadır ve oksijen ile temas edinceye kadar orada sabit kalır. Böylece besiyerindeki kimyasal maddeler tepkimeye ve elektron alışverişine fevkalade hazır ve istekli iken, karşısında elektron alıcı yarı hücre bulamazlar.

Anaerop bakteriler işte böyle ortamlarda üretilirler.

Anaeroplara besiyerlerinin terkibine daima redüksiyon potansiyelini düşüren katkı maddeleri (redüktaz) katılır; *L-cystine*, *cystein HCl*, *Na-thioglycolate*, *ascorbic acid*, *sodium bisulphide*, *glutathione*, glukoz, metalik demir, kaynamış et gibi. Böyle

besiyerleri oksijene duyarlıdır. Bu sebeple anaerop besiyerleri daima taze iken kullanılmalıdır. Eğer stoklanacaksa sıkı kapanan kapaklar ile kapatılmalı ve kullanmadan önce kaynatılarak içlerindeki çözünmüş oksijen uzaklaştırılmalıdır. Anaerop sıvı besiyerlerinin yüzeyi oda atmosferi ile temasta bulunacağından havadaki oksijenin bir kısmı sıvı besiyeri içerisinde çözünecektir. Anaerop buyyonlar daima tüpü dolduracak kadar (en az 8 ml) hazırlanmalıdır. Böylece atmosferden gelen oksijen buyyonun yüzey tabakasında çözünse bile sıvının dibi hala oksijensiz kalacaktır.

BESİYERİNDE Eh ÖLÇÜLMESİ:

Pratikte ve günlük laboratuvar çalışmalarında besiyerinde Eh potansiyelini ölçmek gerekmez. Ancak ölçülmesi istenirse özel elektrotlar hazırlanmalıdır. Bir besiyerinde redüksiyon potansiyelinin neye göre eksi, neye göre artı ve neye göre kaç volt olacağı ancak referans elektrotlar kullanılarak ölçülür. Bu amaçla IUPAC (Union of Pure and Applied Chemistry) tarafından standardize edilmiş 3 tane referans elektrottan birisi kullanılır. Bu elektrotların yüzeyinde hem redüksiyon ve hem de oksidasyon olayları aynı anda meydana geldiğinden elektrot potansiyeli sıfır volt olacaktır. Bu elektrotlar ne gerçek bir anottur ne de bir katottur. Mutlak bir sıfır noktasıdır.

Standart Hidrojen elektrot:(SHE): Bir platin çubuk, bir cam kanül içerisinde geçirilerek içerisinde 1.228 N HCl bulunan bir havuza daldırılır. Bu konsantrasyondaki bir HCl solusyonunun 1 litresinde 1 gr H⁺ iyonu bulunur. Cam kanülün içerisinde 1 atm basınçta H₂ gazı devamlı olarak geçirilir. Oluşan kabarcıklar platin çubuk ile sıvı banyosu arasında elektrot rolü oynar. Gaz sabit basınç ile yollandığından sıvı içerisindeki kısmi hidrojen basıncı ve serbest hidrojen iyon konsantrasyonu (pH) sabit kalacaktır. Elektriksel teması sağlamak için, bir ucu bu havuza daldırılmış ve içerisinde doymuş KCl çözeltisi bulunan, U şeklinde bir cam borunun diğer ucu Eh potansiyeli ölçülmesi istenen besiyerine daldırılır.

Kalomel elektrot: (Saturated Calomel Elektrot, SCE) 2-oz hacmindeki bir şişeye sıra ile önce 5 mm kalınlığında saf metalik civa, daha sonra bir tabaka oluşturacak şekilde toz haline getirilmiş Hg₂Cl₂ (calomel) ilave edilir. Daha sonra, bir kısım Hg ve bir kısım KCl karışımı dökülerek bir tabaka oluşturulur, son olarak şişe doluncaya kadar doymuş KCl çözeltisi ile doldurulur. U harfi şeklinde olan ve içerisinde doymuş KCl çözeltisi bulunan bir cam borunun bir ucu yüzeydeki sıvıya daldırılarak en altta bulunan metalik civa tabakasına temas ettirilir. Bu düzenek hazırlandıktan sonra bir kaç gün kimyasal denge kurulması için beklenir. Elektrot yüzeyinde oluşan kimyasal reaksiyon (Hg₂Cl₂ + 2e⁻ <=> 2 Hg + 2 Cl⁻ E⁰=0.2676 V) geri dönüşümlüdür.

Gümüş-gümüş klorür elektrot: Bir referans sistem elektrot analogudur. Doymuş KCl çözeltisine batırılmış saf bir gümüş telden ibarettir. Yaklaşık 1 cm çapındaki bir metal çubuk bir test tübünün içerisine sokularak tüpün dip kısmına sertçe vurulur ve tüpün dip kısmı kırılır. Camın keskin kenarları bir ege ile düzeltilir. Tübün taban çapına uygun bir poröz fiber ile bu delik sıkıca tıkanır, veya burayı tıkamak için 4-6 gr mikrobiyolojik agar ve 35-40 gr KCl, 100 ml su içerisinde çözülür ve otoklavlanır, tabanı kırılmış tüp soğumakta olan agara dik şekilde batırılır. Jel kıvamına gelen agar poröz tıkaç görevi yapacaktır. Daha sonra tıkaç yüzeyine katı *potasyum klorit* tabakası yerleştirilir. Son olarak *potasyum klorit* ile doyurulmuş bir solusyon içerisine 1-2 damla 1N AgNO₃ damlatılarak tüpe doldurulur. Tüpün ağzına mantar bir tıkaç yerleştirilir, 1-2 mm çapında saf bir gümüş tel tüpün ağzındaki tıkaçta batırılır, tıkaçı delip geçerek dipteki KCl solusyonu içerisinde sonlandırılır. Bu gümüş telin tüp dışında kalan ucu referans elektrot olarak kullanılır, tüpün agar jel ile tıkalı ucu ise ölçüm yapılacak besiyerine saplanır (oluşan reaksiyon, AgCl + e⁻ <----> Ag⁺ + Cl⁻ E⁰ = 0.222 V).

Besiyerinin Eh potansiyelini ölçmek için, ilk önce yukarıda anlatılan referans elektrotlardan bir tanesi hazırlanır. KCl solusyonundan ibaret tuz köprüsü (U boru)

ölçüm yapılacak besiyerinin içerisine batırılır. Eğer besiyeri sıvı ise, tuz köprüsünün açık ucu doğrudan besiyeri içerisine daldırılır. Eğer bu besiyeri katı ise, petri kutusuna, agarın yüzeyini örtecek şekilde doygun KCl solüsyonu dökülür. Tuz köprüsünün ucu bu yüzey sıvısına daldırılır. Bu düzenek kurulduktan sonra bir platin veya saf gümüş elektrot Eh potansiyeli ölçülmesi istenilen besi yeri içerisine agarı delecek şekilde saplanır ve hassas bir voltmetrenin bir probuna irtibatlandırılır. Voltmetrenin diğer probu ise referans elektrota temas ettirilir. Bu şartlar altında standart elektrot ile besiyerine batırılmış ikinci metal elektrot arasında okunan potansiyel farkı, besiyerinin redüksiyon potansiyelini (Eh) verecektir. Böyle ölçümler yapabilen elektronik laboratuvar cihazları da satılmaktadır. Eh potansiyeli thiogluçolate buyyonda -10 mV, CDC kanlı agarda kan konulmadan önce -120 mV, kan ilave edilmişse -40 mV, PYG buyyonda -30 mV civarında bulunur.

ANAEROP İNDİKATÖRLER:

Anaerobik atmosfer temin edilen ortamlarda O₂ yoktur, Eh potansiyeli negatiftir ve inkübasyon boyunca hep böyle kalması arzu edilir. Ortama istenmeyen bir oksijen sızıntısı redox sistemini, oksidasyon lehine bozar ve Eh potansiyeli yükselir. Bu durum, kültürü olumsuz yönde etkileyebilir. İnkübasyon sırasında besiyerinin Eh potansiyelini izlemek ve gerekirse sisteme dışardan müdahale etmek için Eh indikatör boyalarından istifade edilir. Eh ve oksijen, bu iki komponent birbirini çok yakından etkiler bu sebeple bir tanesinin gözlenmesi diğeri hakkında fikir verir.

Besiyerlerine ilave edilebilecek bazı boyalar o besiyerinin oksitlenmiş ya da redüklenmiş olduklarına göre farklı renkler alırlar. Bu boyalardan başlıcaları *resazurin*, metilen mavisi ve *litmus*dur. Bu boyalar indirgendiklerinde renksizdir, oksijen temasında renk kazanırlar. Örneğin resazurin oksijen temasında kırmızı, metilen mavisi mavi renk alır. Bu boyalar kaynatıldığında oksijen kaybederek renksizleşir. Renksiz olması Eh voltajının -20, -40 mV civarında olduğunu ve anaerobik koşulların oluştuğunu gösterir. Bu boyalardan hiç birisi tek başlarına birer redüktaz değildirler, yani ortamın Eh potansiyelini düşürmezler, sadece birer Eh indikatörüdürler. Bu boyalar karanlıkta ve kapalı şişelerde saklanmalıdır. Satın almadan önce kalitesinin kontrolü amacı ile kapağı açılarak yaklaşık 10 dakika içerisinde renk değişimi olup olmadığı gözlenmelidir.

Bu indikatör boyalar besiyerinin içerisine katılmayıp inkübasyon sırasında besiyerinin yanına bırakıldığında ortamdaki anaerop atmosferi izlemeye imkan verir. Bu amaç ile "metylen blue strip" kağıt şeritler (Becton Dickinson Lab, Cockeysville, MD) ticaretten temin edilebilir. İstenirse standart test tüpü içerisine 1-2 ml metilen mavisi, NaHCO₃ ve glukoz ilave edilip, kaynatılarak laboratuvarında hazırlanabilir. Metilen mavisinin renksiz olarak kalması ortamın redüksiyon potansiyelinin yeterince düşük olduğunu gösterir. Bu madde -40 mV'un altında renksiz, -40 +11 mV arasında kısmen ve zayıfca mavi, +11 mV dan sonra koyu mavidir.

Anaerop indikatör olarak hazırlanabilen veya hazır satın alınabilen Lucas ampulleri vardır. Bir ampul kırılarak içerisindeki jel indikatör, ağız açık olarak besiyerinin yanına konur ve birlikte inkübe edilir. İndikatörün renk değiştirmesi ortama oksijen sızıntısı bulunduğunu gösterir. Bu ampuller istenirse şöyle hazırlanabilir: Kaynamakta olan 5 ml %2 lik boraks solüsyonunun içerisine, 9 damla %9 luk thioglycolic asit, 2 damla fenol kırmızısı damlatılır. 10 ml metilen mavisi ve otoklavlanmış sıvı agar ilave edilir. Renksizleşinceye kadar kaynatmaya devam edilir. Derhal hava ile teması kesilerek ampullere kapatılır.

Başka bir indikatör Brewer-Allgeier-McLaughlin adıyla satılır (Becton, Dickinson, UK). Eşit miktarda %60 *tris (hydroxymethyl) aminomethone*, %4 dekstroz, %0.02 metilen mavisi karışımı kaynatılarak renksizleştirilir ve hava sızdırmaz şekilde paketlenir.

Fildes-McIntosh indikatörü ise şöyle hazırlanır: 6ml 0.1M NaOH alınarak 100 ml su içinde çözülür. 3ml %0.5 lik metilen mavisi 100 ml suda çözülür. Ayrıca %6 lık glukoz solüsyonu ayrı tüplerde hazırlanır. Her üç solusyondan eşit miktarda alınarak bir tüpe konur ve renksizleşinceye kadar kaynatılır.

ANAEROBİK EKOLOJİ:

Konağın bir dokusunda anaerop infeksiyonun ortaya çıkabilmesi için dokunun oksijen bakımından fakirleşmesi gerekir. Dokuların oksijenizasyonu, kan akımının mevcudiyeti ile mümkün olur. İyi kanlanan bir dokuda genellikle anaerop infeksiyon gelişmez. Çünkü, kanın Eh potansiyeli, (kalbe uzaklığına bağlı olarak) yaklaşık +150 mV civarındadır (arteryel kanın Eh potansiyeli, venöz kanından daha fazladır). Anaerobik infeksiyonlar genellikle nekroze olmuş ve kan akımı durmuş veya en azından ciddi biçimde azalmış dokularda görülür. Böyle dokularda Eh voltajı -250 mV'a kadar düşerek anaerop ekolojiyi oluşturur.

Mezenter, barsaklar, apendiks, bursa'lar, ovarium, kas dokusu ve periton anatomik olarak oksijenle teması mümkün olmayan bölgelerdir, bir yaralanma durumunda anaerobik infeksiyonlara duyarlıdır. Peki nasıl olurda zorunlu anaerop bir bakteri solunum epiteli, konjunktiva veya dişeti mukozası gibi havanın ve oksijenin bol olduğu bir floraya yerleşebilir? Her solunumda bol miktarda havanın yüzeye temas ettiği solunum epitelinin ve tonsillerin anaerop infeksiyonlara dirençli olması beklendiği halde *Actinomyces*'ler akciğere, *Fusobacterium* ve spiroketler boğaz florasına yerleşebilmektedir.

Doku içerisinde ve yüzeyinde anaerop mikroorganizmaların oksijenden korunabildikleri sahalara vardır. Anaerop bakteriler, mukozadaki silyalar veya konak doku salgılarının mukozayı kapladığı sahalara kolonize olarak oksijenden gizlenirler. Nazal pasajda mukus, ağızda dişler ve salya, akciğer alveollerinde sürfaktan gibi salgılar, ayrıca tonsillerin yüzeyindeki kriptalar oksijensiz yüzeyler yaratır.

Anaerop bakteriler periapikal lezyonlardan daha sık üretildiği halde, marginal gingivitis florasında nispeten sınırlı sayıdadır. Çünkü dişeti, kök kanalı kadar kapalı bir doku değildir. Havanın oksijeniyle nispeten daha geniş bir yüzeyden temas halindedir. Ancak dişeti ceplerinin derinliklerinde, periodontal doku kaybının olduğu kemik içi ceplerde ve dişlerin aproksimal yüzeylerinde Eh potansiyeli yeterince düşüktür ve anaerop bakteriler buraya kolonize olurlar. Ayrıca ilerlemiş periodontitiste artan damar harabiyetine bağlı olarak subgingival bağ dokusu ve mukozanın kan dolaşımı azalarak anaerop ekolojinin gelişmesine yardımcı olur. Fena yapılmış protetik restorasyonlar, gevşemiş veya delik krun ve köprüler, total ve parsiyel protezlerin mukozaya temas eden yüzeyleri, dil papillerinin arası, diştaşları ve çürük tabanı oksijenin ulaşmadığı ve anaerop ekolojinin geliştiği bölgelerdir. Kötü ağız hijyeni ve kusurlu temizlik anaerobik ekolojiyi hazırlayıcıdır. Böyle durumlarda *Fusobacterium*'ların oluşturduğu Vincent stomatiti ve nekrozlu ülseratif gingivitis daha sık görülür.

Dişlerin infekte kök kanalında kan dolaşımının durmuş olması, (bilhassa pulpa odası kapalı olduğunda) anaerobik ekolojinin oluşmasına yardım eder. Pulpa dokusu nekroze olarak anaerop ekolojinin tam olarak oluşmasını sağlar. Kök kanalı infeksiyonlarının erken dönemlerinde bile pulpa odasında oksijen seviyesi hızla azalarak Eh potansiyelinin düşmesine yol açar. En az seviyede oksijen dentin tubuluslerindedir. Ekspoze kanal ağız(lar)ında biraz fazla oksijen bulunabilir, foramen apikaleye doğru giderek azalır. Kan dolaşımı durmuş bir kök kanalı, anaerop bakteriler için ideal bir vasat oluşturur. İnfekte kök kanalı daima, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Wolinella*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* ve spiroketler gibi zorunlu anaerop bakteriler tarafından istila edilir. İnfekte kök kanalından *Bacillus* veya *Pseudomonas* gibi zorunlu aerop bakteriler izole

edilmezler, buradaki patojenlerinin neredeyse tamamı (%99) anaeroptur. Bu sebeple endodontik mikrobiyoloji büyük ölçüde anaerobik bakteriyoloji üzerine kuruludur.

Konak dokuda anaerobik ekolojinin oluşmasını sağlayan başka faktörler de vardır. Örneğin bir florada bulunan zorunlu aerobik bakteriler sınırlı miktardaki oksijeni süratle tüketebilirler. Bu durum, anaerop bakterilere uygun koşullar yaratır.

Anaerop ekolojiyi oluşturan bir başka faktör nekrotik dokuların mevcudiyetidir. Harp yaraları, ezik ve yırtık şeklindeki yaralar, içerisinde yabancı cisim bakiyesi bulunan yaralar, vasküler staz ile oluşan dekubitus ülserleri veya ampirik yöntemle (üzerine kahve ve tütün kapatılarak) tedavi edilmeye çalışılan yaralarda oksijensiz kalan ve negatif redüksiyon potansiyeli oluşan odaklar bulunur.

ANAEROBİK BAKTERİLER VE ANAEROBİK İNFEKSİYONLAR:

Klinik önemi olan anaerop genurşlar alfabetik sıra ile Şunlardır:

Sporlu, Gram pozitif çomaklar: *Clostridium, Desulfotomaculum.*

Sporsuz, Gram pozitif çomaklar: *Acetobacterium, Actinomyces, Arcanobacterium, Bifidobacterium, Eubacterium, Lachnospira, Lactobacillus, Methanobacterium, Propinibacterium.*

Sporsuz, Gram pozitif koklar: *Caprococcus, Gemmiger, Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Sarcinia, Staphylococcus, Gamella* ve bazı *Streptococcus*lar (*S. hansenii, S. morbillorum, S. parvulus* ve *S. pleomorphus*).

Sporsuz, Gram negatif çomaklar: *Acetivibrio, Acidaminobacter, Anaerovibrio, Anaerorhabdus, Anaerobiospirillum, Anaerobacter, Bacteroides, Bilophila, Borrelia, Butyrivibrio, Capnocytophage, Capsularis, Camphylobacter, Centipeda, Cristaspira, Desulfobacter, Desulfobulbus, Desulfococcus, Desulfosarcinia, Desulfomonas, Desulfuromonas, Desulfovibrio, Dichelobacter, Fibrobacter, Fusobacterium, Helicobacter, Hyobacter, Leptotrichia, Megamonas, Mitsuokella, Mobilincus, Pelobacter, Pectinatus, Porphyromonas, Prevotella, Progiogenium, Propionispira, Rikenella, Roseburia, Ruminobacter, Sealdella, Selenomonas, Serpula, Spirochaeta, Succinomonas, Succinovibrio, Tisierella, Treponema, Wolinella.*

Sporsuz, Gram negatif koklar: *Acidaminococcus, Megasphaera, Veillonella.*

Bu bakterilerle oluşan infeksiyonlarda genellikle ortak hazırlayıcı sebep dŐŐük redüksiyon potansiyeli ve dokunun iyi kanlanamayışıdır ve genellikle Őu infeksiyonlara sebep olurlar: Nazokomiyal diyareler, botulismus, diyare, gaz gangren, yŐzeyel infeksiyonlar, insan ve hayvan parazit kaynaklı infeksiyonlar, septik abortus, aktinomikoz apsesi, kapalı organ abseleri, aspirasyon pnömonisi, apandisit, kolesistit, krepitan ve nonkrepitan selŐlit, klostridial miyonekroz, diş kŐkŐ ve dişeti infeksiyonları, stomatit, endokardit, beyin apsesi, menenjit, nekrotik pnömoni, osteomyelit, orta kulak iltihabı, peritonit, septik artrit, kronik sinŐzit, subdural ve torasik ampiyem ve tetanoz.

Bazı polimikrobial infeksiyonlarda fakŐltatif ve hatta zorunlu aeroplara ile birlikte bulunabilirler. İnsan kaynaklı baŐlıca infeksiyonlarda anaerop bakteri gŐrŐlme yŐzdeleri Tablo 62-1'de verilmiŐtir.

Tablo 62-1 Bazı önemli infeksiyonlar ve anaerop bakteri izole edilme yüzdeleri.

İnfeksiyon tipi	Anerop (%)
Aspirasyon pnömonisi, akc.apsesi ve nekrotik pnömoni	85-93
Bakteriyemi	9-20
Sinüzit	50-100
Torasik ampiyem	76
Beyin absesi	83
Diş kök kanalı infeksiyonları	99
Gingivitis ve Periodontitis	84
Apandisit ve kolon cerrahi yaraları	79-95
Derialtı abseleri	60
Nonklostridial krepitan selülit	75
Pilonidal sinüs	73
Diyabetik ülser ve gangren	63-85
Üriner sistem infeksiyonları	1

Sık rastlanan anaeroplara başına *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* gelir. Bu grup bakteriler, penisilin ve analoglarına, tetrasiklinlere, 3 üncü kuşak sefalosporin, kinolonlar ve aminoglikozitlere giderek artan biçimde direnç geliştirmişlerdir. *Clostridium* türleri, *Bacteroides*, *Fusobacterium* ve anaerobik koklardan daha nadir izole edilirler, ama daha iddialı infeksiyonlar yaparlar. Bazı önemli *Clostridium*lar rastlanma sıklığına göre, *C. perfringens*, *C. ramosum*, *C. difficile*, *C. clostridioforme*, *C. innocuum*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. cadaveris*, *C. paraputrificum*, *C. sporogenes*, *C. tertium*, *C. bifementes*, *C. butyricum* ve *C. subterminale*dir. Daha seyrek görülen anaerop infeksiyonlar ise *Actinomyces* kaynaklı olanlardır. Aktinomikoz, kronik, granülomatöz ve süpüratif abseler ile karakterize bir hastalıktır. En sık hastalık etkeni olan *Actinomyces* 'ler şunlardır: *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. odontoliticus*, *A. meyeri*. Daha seyrek olarak *Propionobacterium propionicum* infeksiyonları gelir. *Propionobacterium*lar bazen bir kontaminant olarak ortaya çıkar, ancak arka arkaya yapılan kan kültürlerinde ısrarla üreyorsa *Propionobacterium*ların patojen mikroorganizma olduğuna karar verilebilir. Bilhassa implant protez kullananlarda endokardit etkeni olabilmektedir. Gram pozitif anaerop koklar bilhassa kemik, eklem ve abdominal materyalde %10 sıklıkla ürerler. Bunlar *Peptostreptococcus magnus*, *P. asaccharolyticus*, *P. prevotii*, *P. anaerobius* ve *Streptococcus intermedius*dur. Genellikle tamamına yakın bir bölümü penisiline dirençlidir. Penisilin G ve analogları çok eskilerden beri anaerop infeksiyonlarda sıklıkla seçilen antibiyotik olagelmıştır. Ancak yapılan son çalışmalar göstermiştir ki; *F. mortiferum*, *F. varium*, bazı *Prevotella* ve *Porphyromonas* türleri, *P. bivia*, *P. disiens* ve bazı *Clostridium* türleri penisiline artık büyük ölçüde dirençlidir. Bu bakterilerde β -laktamaz aktiviteleri tespit edilmiştir.

İnfekte bir dişin kök kanalından izole edilmesi beklenen çoğu patojen anaerop bakteriler şunlardır: *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Wolinella recta*, *Streptococcus anginosus*, *Actinomyces israelii*, *Capnocytophage ochracea*, *Selenomonas sputigena*, *Veillonella parvula*, *Treponema denticola*, *Propionobacterium propionicum* ve *Acidaminococcus*.

Tablo 62-2 Bazı anaerop patojenlerin izolasyonunda seçici besiyeri içerisine ilave edilen katkı maddeleri.

Seçici madde	miktar / 100 ml besiyeri	Hangi bakteriyi seçtiği
Kristal viyole	1mg	<i>Fusobacterium</i>
Streptomisin	1mg	
Sodyum azid	20 mg	<i>Clostridium</i>
Sodyum azid	20 mg	<i>Bacteroides</i>
Safra	1.7 mg	
Sodyum azid	30 mg	<i>Bacteroides, Fusobacterium</i>
Brilan yeşili	1.8 mg	
Sorbik asit	0.12 g	<i>Clostridium</i>
Sorbik asit	0.12 g	<i>Clostridium</i>
Polimiksin B	2 mg	
Feniletıl alkol	0.25 g	<i>Clostridium, Bacteroides, Fusobacterium</i>
Neomisin	10 mg	<i>Clostridium, Peptostreptococcus, Bacteroides</i>
Kanamisin	7.5 mg	<i>Eubacterium, Actinomyces, Propionibacterium</i>
Kanamisin	10mg	<i>Bacteroides, Fusobacterium</i>
Vankomisin	750 µg	
Neomisin	10 mg	<i>Fusobacterium, Veillonella</i>
Vankomisin	750 µg	
Oleandomisin	50 µg	<i>Clostridium perfringens</i>
Polimiksin	1000 Unit	
Sulfadiazin	10 mg	

KAYNAKLAR:

1. Aydın M. Endodontik mikrobiyoloji. In: Alacam T. eds. Endodonti. Ankara: Barış Yayınları 2000:313-385.
2. Aydın M, Serin MS, Yarkin F. Antibiotic susceptibility in anaerobic bacteria which are most frequently isolated from infected root canals. *Ann Med Sci*, 1997; 8:33-37.
3. Jurtshuk P. Microbial growth Chapter 5, In Madigan MM, Martinko J, Parker J Eds. 8th press. Brock Biology of Microorganisms. Illinois: Prentice-Hall, Inc 2000: 151-179.
4. Kıyan M. Anaerob bakteriler. In: Ustaçelebi Ş. Ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitapevi 1999: 611-668.
5. Könönen E. Jousimies SH, Asikainen S. The most frequently isolated Gram-negative anaerobes in saline and subgingival samples taken from young women. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 126-128.
6. Könönen E, Saarela M, Kanervo J, et al. β lactamase production and penicillin susceptibility among different ribotypes of *Prevotella melaninogenica* simultaneously colonizing the oral cavity. *Clinical Infectious Disease* 1995; 20:364-366.
7. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7:257-262.
8. Sundqvist G. Ecology of the Root Canal Flora. *Journal of Endodontics* 1992; 18:427-430.
9. Strohl WA, Rouse H, Fisher BD. Bacterial structure, growth, and metabolism. In: Harvey RA, Champe PA eds. Lippincott's Microbiology. Philadelphia: Williams&Wilkins 2001: 101-