

ÇEVRE
MİKROBİYOLOJİSİ
LABORATUVARI

MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

Mikrobiyoloji uygulamalarında mikroorganizmalardan uzak ve arındırılmış koşullarda çalışmak ancak aseptik teknik ile sağlanır. Aseptik teknik iki amaca dönük olarak uygulanır: 1-İncelemek istenilen kültürlerle çevreden diğer istenmeyen ve incelmeyi yanıltacak mikroorganizmaların bulaşmasını (kontaminasyonunu) ve kültürün karışık bir kültür halini almasını önlemek, 2-Kültürdeki mikroorganizmaların özellikle patojen olabileceklerin çevreye ve laboratuvarında çalışanlara bulaşmasını önlemek (kontaminasyon: mikroorganizmaların çevreye ve cansız materyale bulaşması, enfeksiyon: mikroorganizmaların canlıya bulaşması).

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kontaminasyon tehlikesi her zaman mevcuttur. Çünkü mikroorganizmalar derimizde, boğazımızda, burnumuzda, dokunduğumuz tüm yüzeylerde, havada (toz partikülleri ve aerosoller ile taşınırlar) ve çeşme suyu gibi hemen her ortamda bulunmaktadır. Bu nedenle de bir saf kültür elde edilmek istendiğinde, steril bir besiyeri ile işe başlanılmalı ve besiyeri dışarıdan istenmeyen mikroorganizmaların girişini engelleyecek önlemler alınmalıdır. Bunun için laboratuvarında aseptik koşullarda, yani asepsis'e (mikroorganizmaları uzaklaştırma ve arındırma) dikkat edilerek çalıştırılmalıdır. Bu amaçla, çalışmalar her zaman alev altında yapılmalıdır. Mikroorganizma veya incelenecek örneğin bir ortamdan diğerine aktarılması esnasında aktarma için kullanılacak araç ve gereçlerde steriliteye dikkat edilmelidir. Örneğin, öze her kullanımdan önce ve sonra bunzen beki alevinde usulüne uygun olarak yakılmalıdır. Kullanılacak besiyerleri ve bütün cam ve metal ekipman kullanımdan önce ve sonra yine usulüne uygun olarak sterilize edilmelidir.

Kullanılacak besiyerleri ve sıvılar (dilüsyon sıvısı vb.) uygun bir cam kap içinde hazırlanarak sterilize edilmelidir. Besiyerleri sterilizasyon sonrası başka bir kaba veya ortama aktarılacaksa, bu kapların da daha önceden sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilmesi gereklidir. Besiyerlerini içeren kapların içine, havada toz partikülleri veya aerosoller ile taşınan mikroorganizmaların girişini engelleyecek önlemler alınmalıdır. Bu amaçla, örneğin cam tüpler veya balonlar ağızlarına sterilizasyon öncesinde bir pamuk parçası ile usulüne uygun şekilde tıkaç yapılmalı yada bu amaçla ağzı metal veya yüksek sıcaklığa dayanıklı plastik vida kapaklı tüpler kullanılmalıdır. Çalışma anında, bu pamuk tıkaç veya kapak, bunzen beki alev çatısı altında çıkarılmalı ve yapılacak işlem seri bir şekilde tamamlanarak

hiç beklenilmeden yerine tekrar yerleştirilmelidir. Pamuk tıkaç veya kapak tüp veya balonun ağzından çıkarıldıktan sonra, hiçbir şekilde kontaminasyon kaynağı olabilecek herhangi bir yüzeye bırakılmamalı ve temas ettirilmemelidir.

Pipetler kullanılmadan önce pipet kutusu içinde sterilize edilmeli ve kullanım aralarında pipet kutusunun ağzı kapalı tutulmalıdır.

Ellerin laboratuvarda bulundurulacak uygun bir antiseptik çözelti ile yıkanması gereklidir. Laboratuvarda hiçbir şey yenilmemeli veya içilmemeli, ekim yaparken konuşulmamalı, aksırıp hapşurulmamalı (aerosol etkisi) ve gereksiz hareketlerden kaçınılarak laboratuvar havasının enfeksiyon ve kontaminasyon kaynağı haline dönüşmesi engellenmelidir.

Aseptik çalışmanın dikkate alındığı, mikrobiyoloji laboratuvarında uyulması gerekli temel bazı kurallar aşağıda sıralanmıştır.

MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA UYULMASI GEREKEN ÇALIŞMA KURALLARI

1. Laboratuvara girerken beyaz ve temiz bir önlük giyilmelidir. Önlük, giysilerin (veya derinin) mikroorganizma, toz, kimyasal madde ve boyalardan kirlenmesini ve korunmasını sağladığı gibi, giysilerdeki toz ve kültürlerin besi yerlerine, kullanılan araç ve gereçlere kontamine olmasını engeller. Laboratuvar önlüğü laboratuvar dışında giyilmemelidir.
2. Laboratuvara gereksiz eşya (palto, kitap, defter vb.) sokulmamalıdır.
3. Laboratuvarda herhangi bir şey yenilmemeli ve içilmemeli (özellikle sigara içilmemeli), çalışırken eller yüze sürülmemeli, ağıza herhangi bir şey sokulmamalıdır.
4. Çalışma sırasında masanın üzerinde gerekli malzemedan başka eşya bulunmamalı, masa üzerine oturmamalıdır.
5. İçinde kültür bulunan tüp, petri kutusu gibi malzeme açık olarak masa üzerine bırakılmamalı, tüpler önlük cebinde taşınmamalı, masa üzerine geliş güzel konulmamalıdır (özellikle sıvı kültür içerenler). Tüpler tüplükte tutulmalıdır.
6. Çalışırken laboratuvar kapı ve pencereleri kapalı tutulmalı, laboratuvarda yüksek sesle konuşulmamalı, mikroorganizma veya sporlarını etrafa yayacak gereksiz ve ani hareketlerden sakınılmalıdır.

7. Kùltürlerin yere veya masaya dökülmesi veya kùltür kaplarının kırılması halinde durum hemen laboratuvar sorumlusuna bildirilmeli ve dökülen kùltürün üzeri anında uygun bir dezenfektan çözeltili ile kaplanarak (örneğin %10'luk hipoklorit çözeltili) 15-30 dakika beklenmeli ve daha sonra temizlenmelidir.
8. Öze uçları her kullanımdan önce ve sonra Bunzen beki alevinde usulüne uygun şekilde yakılarak sterilize edilmelidir.
9. Pipetleme yapılırken kesinlikle üflenmemelidir.
10. Etil alkol gibi yanıcı, tutuşucu maddeler Bunzen beki alevi çevresinden uzak tutulmalıdır.
11. Ellerde kesik, yara ve benzeri durumlar varsa, bunların üzeri ancak su geçirmez bir bantla kapatıldıktan sonra çalışılmalı, aksi takdirde çalışılmamalı ve durum sorumluya iletilmelidir.
12. Mikroskopun objektif ve oküler kısmı her kullanımdan önce ve sonra ince mercek kağıdı ile veya bir tülbent vasıtasıyla dikkatlice merceğe zarar vermeden temizlenmelidir.
13. Laboratuvardaki mikroskop, pH metre, terazi gibi aletler çok dikkatli kullanılmalı ve her kullanımdan sonra kapatılmalıdır.
14. Çalışma bittikten sonra kirli malzemeler kendilerine ait kaplara konulmalıdır. Örneğin; kullanılmış pipetler, lam ve lamel hemen içinde dezenfektan çözeltili bulunan özel kaplara aktarılmalıdır.
15. Çalışma sonunda, kullanılan cam malzemeler sorumlunun belirttiği şekilde sterilize edilmeli veya yıkanmalıdır.
16. Laboratuvardan çıkmadan önce havagazı ve su muslukları ile mikroskop lambaları kapatılmalıdır.
17. Çalışma bittikten sonra eller sabunlu su ve gerektiğinde antiseptik bir sıvı ile yıkanmalıdır.
18. Laboratuvardan kùltür ve benzeri materyal dışarıya çıkarılmamalıdır.
19. Laboratuvar çalışması süresince, laboratuvar görevlilerinin ikaz, uyarı ve isteklerine uyulmalıdır.
20. Öğrenciler yapılacak olan laboratuvar çalışması ile ilgili bilgileri öğrenmek zorundadırlar.
21. Laboratuvar bitiminde, bir çalışma raporu hazırlanarak sorumluya teslim edilmelidir.

Çalışma raporu aşağıdaki pozisyona uygun olabilir:

-Başlık

-Amaç

-Sonuçlar ve Yorum

MİKROBİYOLOJİ
LABORATUVARINDA
KULLANILAN MALZEME
VE ARAÇLARIN TANITIMI

I. CAM MALZEMELER

PETRİ KUTUSU: Petri kutusu biri küçük diğeri büyük iç içe girebilen iki parçadan oluşmaktadır. Cam ve plastikten, çeşitli büyüklükte olabilir. Uygun yöntemler ile steril edildikten sonra, içlerine steril katı besiyerleri dökülerek mikroorganizmaların inkübasyonunda kullanılır, 1887 yılında ilk kez PETRİ tarafından tanımlandığı için bu ad ile anılır.

DENEY TÜPÜ: Farklı boy ve çapta, bir tarafı açık silindir şeklinde, cam veya plastikten yapılı malzemedir. İçlerine sıvı besi ortamları veya solüsyonlar konularak kullanılır. Kullanım amacına uygun olarak çok çeşitli tipleri vardır. Örneğin, santrifüj, kapiller tüp, derecelendirilmiş olanlar gibi.

ANAEROBİK TÜPLER: Ortamdaki oksijeni tutarak anaerobik bir ortamın meydana gelmesini temin eden kimyasal maddelerin bulunduğu bir bölmesi olan özel olarak yapılmış tüplerdir. Anaerobik mikroorganizmaların üretiminde kullanılırlar. Çeşitli hacimlerde olabilirler.

DURHAM TÜPÜ: Yaklaşık 7x25 mm boyutlarında olup, mikroorganizmaların sıvı besiyerinde belli bir maddeyi kullanıp gaz oluşturup oluşturmadığını tespit etmek için kullanılır. Test tüpünün içine ters olarak yerleştirilir. Daha sonra bu test tüpü, içine sıvı besiyeri konularak sterilize edilir.

RENKLİ ŞİŞELER: Boyalar gibi ışıktan zarar görebilen çeşitli solüsyonların saklanması için kullanılan çeşitli hacimlerde olabilen şişelerdir.

DAMLALIK: Çeşitli boya çözeltilerini veya reaktifler damlatmak için kullanılan şişelerdir.

PİPET: İnce uzun camdan yapılmış borucuklardır. Üzerinde ml. cinsinden bölmeler bulunan yaklaşık 30 cm. boyunda olan bu cam borular çeşitli hacimlerde (0.5, 1, 2, 5, 10,

25 ml.) bulunurlar. Ağız kısmından emilerek sıvı materyal pipet içine alınır, ölçülür ve transferi yapılır. Pipetler metal kutular içerisinde veya kağıda sarılarak steril edilir.

ERLENMAYERLER: Tabanları geniş, ağız kısımları çeşitli çap ve şekillerde olabilen, besiyerlerin hazırlanmasında kullanılan cam malzemelerdir.

BEHERLER: Ağız ve taban kısımları aynı çapta olan, çeşitli besiyeri ve çözeltileri karıştırmada kullanılan cam malzemelerdir.

HUNİ: Bir süspansiyonun bir kaptan dar ağızlı bir başka kaba aktarılması veya süzülmesi için kullanılan; alt kısmı ince boru, üst kısmı ise geniş koni şeklinde olan cam malzemelerdir. Çeşitli büyüklüklerde dir.

MEZÜR: Sıvıları belirli hacimlerde alabilmek için bölmelere ayrılmış ölçü silindirleridir.

LAM: Camdan yapılmış, dikdörtgen şeklinde, birkaç mm. kalınlığındaki laboratuvar malzemesidir. Mikroorganizmaların doğrudan veya boyanarak mikroskop altında incelenmesinde kullanılır.

LAMEL: Lam üzerine kapatılan daha küçük ebatlı, camdan yapılmış, kare yada dikdörtgen şeklindeki malzemedir. Lamelin eni lamdan 1-2 mm. daha kısadır ve daha ince yapıdadır.

THOMA LAMI: Bu lamda 25 büyük kare bulunur ve bu büyük karelerin her biri 16 küçük kareye bölünmüştür. Bazı thoma lamalarında ise, 16 büyük kare ve her bir büyük kare 25 küçük kareye bölünmüştür. Bu lamda esas, $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılmasıdır. Her bir küçük karenin hacmi lam üzerinde yazılı olarak belirlenmiştir.

BALON: Alt kısmı balon, üst kısmı silindir şeklindedir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, besiyerlerinin hazırlanmasında, sterilizasyonunda ve saklanmasında kullanılır.

MEZÜR: Cam malzemedir yapılmış, üzerinde ml. cinsinden bölmeler bulunan, silindir şeklinde bir ölçü kabıdır. Çeşitli kaplarda ve büyüklükte mezürler vardır. Sıvı malzemelerin ölçülmesinde kullanılırlar.

PASTEUR PİPETİ: Bir ucu açık cam tüptür. Dar ucunun çapı 1 mm.dir. Geniş uca pamuk takılır. Kullanmadan önce geniş ucuna plastik piston takılır.

BAGETLER: Bunlar da çeşitli uzunluk ve kalınlıklarda olabilirler ve çözeltilerin karıştırılmasında kullanılırlar.

DRİGALSKI SPATÜLÜ: Katı besi yeri üzerine aktarılan kültürün (sıvı) homojen olarak yayılmasında kullanılan camdan yapılmış araçtır. İnce bir cam bagetin özel bir şekilde kıvrılması ile elde edilebilir. Drigalski spatülünün tamamı cam olabilir yada tutma yeri metal, yayma yeri cam veya silikon kaplı camdan da yapılı olabilir. Alkol ile yada alüminyum folyelere sarılarak otoklavda steril edilir.

2. ARAÇ VE GEREÇLER:

TÜPLÜK: Metal ya da tahtadan yapılmış tüplerin dik olarak içine yerleştirilip taşınmasını ve saklanmasını sağlayan taşıyıcıdır. Supor (support) olarak da adlandırılırlar.

ÖZE: Isıyı az ileten metal bir sap ile platin veya yumuşak bir telden yapılmış uca sahiptir. Bu uç amaca göre çembersel veya iğne şeklinde (transfer iğnesi) olabilir. Öze ucu alevde kırmızı renk olana kadar tutulduğunda steril edilir. Öze örneklerin ve mikroorganizmaların besi yerine yayılmasında ve transferinde kullanılır. Özenin yuvarlak tel kısmı genellikle 0.01-0.005 ml. sıvı taşır.

OK UÇLU İĞNELER: Ucu halka şeklinde olmayan özeler olarak düşünülebilirler. Katı besiyerlerinin içerisine ekim yapmada ve bakteri kolonilerini tek tek seçmede kullanılırlar.

EKÜVYON: Ucuna pamuk sarılmış, tahtadan yapılmış bir çubuktur. Örnek alma işlemlerinde kullanılır. Alüminyum kağıtlara sarılarak steril edilir.

PİSETLER: Camdan veya plastikten yapılmış olabilirler. İçerisine damıtık su konur ve gerektiği zaman kullanılırlar. Lastikten yapılmış olanların ucunda ince bir plastik boru vardır.

BUNZEN BEKİ: Ayarlı şekilde alev elde etmede kullanılan, havagazı veya tüp gaz ile çalışan aletlerdir. Sterilizasyon işleminde kullanılır.

BOYA KUVETİ: Mikroorganizmaların boyanması için kullanılan ve üzerine iki paralel cam boru veya çubuğun yerleştirildiği kaplardır.

FİLTHER HOLDER: Arasına, çeşitli delik çaplarına sahip filtrelerin takılarak sıvıların sterilize edilmesinde kullanılan aletlerdir.

FİLTRELER: Sıvıları süzmede sterilize etmede kullanılırlar. Yapıldıkları maddelere göre değişik tipte filtreler mevcuttur. Bunlar;

- a) Diyatome toprağından yapılmış olan Berkefeld Filtreleri,
- b) Porselenden yapılmış olan Pasteur-Chamberland Filtreleri,
- c) Asbestten yapılmış Seitz Filtreleri,
- d) Cam tozu veya liflerinden yapılmış olan Cam Tozu Filtreleri,
- e) Sellüloz asetat veya selüloz nitrattan yapılmış olan Membran Filtreleridir.

MULTİDİSKLER: Bir merkez etrafında sıralanmış değişik antibiyotik veya ilaçların emdirildiği kağıt diskleri ihtiva ederler. Antibiyogram testlerinde kullanılırlar.

ŞİRINGALAR: Değişik hacimlerde olabilirler ve enjeksiyon işlemlerinde kullanılırlar.

MİKROPİPETÖRLER: Son yıllarda otomatik pipetörler geliştirilmiştir. Mikropipetörler mikrobiyologlar ve moleküler biyologlar tarafından çeşitli örneklerin analizinde doğru ve tam ölçüm/hazırlıklar yapmak için kullanılırlar. Mikropipetörler doğru kullanıldıklarında solüsyonların istenilen hacimlerde küçük miktarlarının başarılı bir şekilde dağıtılmasını sağlarlar. Bu özellikle çok hacimlerde doğru olarak çalışılmasında önemlidir.

ETÜV (İNKÜBATÖR): Sabit ısı sağlayan bir araçtır. Elektrik enerjisi ile çalışır. Paslanmaz metal malzemedden yapılmış, bir kapak ile açılıp kapanan inkübatör bir çeşit fırın görevi yapar. Etüv termostatı yardımı ile istenilen sıcaklığa ayarlanır ve ekimi

yapılan örnekler üremeleri için etüvde belirli sürelerde tutulur (inkübe edilir). CO₂ etüvü, soğutmalı etüv ve çalkalamalı etüv gibi çeşitleri vardır.

STERİLİZATÖR (PASTEUR FIRINI): Elektrik enerjisi ile çalışır. Etüve benzer, tek farkı; sterilizatörde ısının mikroorganizmaların üremeleri için değil, öldürmeleri için kullanılmasıdır. Cam malzemeler Pasteur fırını içinde 150 °C'de 3 saat, 160 °C'de 2 saat ya da 170 °C'de 1 saat tutularak kuru ısı ile steril edilirler.

OTOKLAV: Nemli ısı ile sterilizasyonda kullanılır. Otoklav ile ilgili geniş bilgi için laboratuvarında sterilizasyon-dezenfeksiyon bölümünde anlatılmaktadır.

SU BANYOSU (BENMARİ): Paslanmaz metalden yapılmış, içindeki suyu istenilen ısıda tutan bir araçtır. Elektrik enerjisi ile çalışır. Çalkalamalı olanları da vardır. Serum, enzim inaktivasyonunda kullanılır.

SANTRİFÜJ: Tüpler içerisinde santrifüje yerleştirilen materyali/solüsyonu dakikada belli bir hızda döndüren alettir. Eğer böyle bir solüsyonda bakteri varsa merkez kaç kuvvetinin etkisi ile bakteriler yoğunlukları dolayısıyla dibeye çökerek sıvıdan ayrılır. Santrifüj kullanılarak yoğunluk farkından dolayı solüsyonlardaki farklı birimlerde birbirinden ayrılabilir. Yüksek devirli soğutmalı santrifüjlerin yanı sıra, masa üstü tipte küçük santrifüjlerde laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Belirli hücrelerin yoğunlaştırılmasında da santrifüj kullanılır.

SPEKTROFOTOMETRE: Spektrofotometre örnek saflığının kalitatif analizinde, DNA-protein oranlamasında, hücre yoğunluğu ölçümünde, enzimlerin katalizlediği reaksiyon ölçümlerinde kullanılır. Spektrofotometrenin temelinde çeşitli maddelerin özel dalga boylarını farklı olarak absorbe etme ilkesi yer alır (UV; 200-400 nm., visible; 400-700 nm., infrared; 700-900 nm.). Fotometrik ölçüm belli bir dalga boyunda örnek absorbansının direkt ölçülmesini veya enzimatik reaksiyon ürününün veya direkt olarak absorbansının indikatörü olarak rol oynayan ilgili maddelerin indirekt ölçümünü kapsar. Bütün spektrofotometreler dalga boylarının absorpsiyonu ve konsantrasyonlarındaki değişiklikleri belirlemek için dizayn edilmiş, aynı temel yapısal unsurları taşırlar.

pH METRE: pH farklı yollarda ölçülebilir. PH ölçmede en doğru ve pratik yol pH metre kullanılmasıdır. PH metre bir cam elektrot ile referans elektrot arasındaki potansiyel değişimini ölçer. Modern pH metrelerde bu iki elektrot bir elektrotta toplanmıştır ve “kombinasyon elektrot” olarak adlandırılır. Cam elektrot, cam bir ampul taşır. Bu ampul oldukça ince, özel bir camdan yapılıdır ve H⁺ geçişine izin verir. Sonuçta cam membran üzerinden bir potansiyel oluşur. Bu potansiyel doğrusal olarak pH ile ilgilidir. H⁺ konsantrasyonu bilinen tamponlara karşı standardizasyon gereklidir. Çünkü, cam elektrot içindeki H⁺ konsantrasyonu zamanla değişebilmektedir. Sıcaklık ayarlaması da gerekli bir unsurdur, çünkü ölçülen potansiyel ile pH arasındaki ilgi ısıya bağlıdır.

STERİL KABİN: Laboratuvarlarda kontaminasyon riski çalışma alanlarının yüzeylerinin uygun dezenfektanlar ile silinmesiyle, havanın filtre edilerek fungi, bakteri spor ve hücrelerinin elimine edilmesi ile sağlanabilir. Bakteriyolojik çalışmalar bazen steril kabin (safety cabinet) içinde yapılır. Çeşitli steril kabinler vardır. Bunlardan birisi SINIF II steril kabinlerdir. Bunlarda steril hava devamlı olarak çalışma yüzeyine dik olarak akar ve hava daha sonraki filtrasyon için dışarıya verilir. Çalışmalar kabinin önündeki açık panel yardımı ile yapılır. SINIF III steril kabinler ise gaz sızdırmaz kabinlerdir. Hava içeri alınmadan ve verilmeden önce filtre edilir. Çalışmalar ön panele monte edilmiş kol uzunluğundaki plastik eldivenler yardımı ile yapılır. Kabinin içine yaklaşma ise ayrı iki kapı sterilizasyon/dezenfeksiyon çemberi yolu ile olur. SINIF II kabinler laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılırken, SINIF III kabinler çok patojen mikroorganizmalar ile çalışırken kullanılır.

FERMENTÖR: Mikroorganizmaların üretilmesi ve bazı metabolik ürünlerin elde edilmesi için kullanılırlar. Sıcaklık, karıştırma, pH ve O₂ kontrolleri vardır. Değişik hacimlerde olabilirler.

ROTARY ÇALKALAYICI: Belirli bir sıcaklığa ve dakikada belirli bir devre ayarlanabilen inkübatörlerdir. Çalkalamalı kültür elde etmede kullanılırlar.

TERAZİLER: Hassas (miligram seviyesinde) ve kaba (gram seviyesinde) teraziler mevcuttur.

BUZDOLABI: Stok kültürleri saklamak için kullanılırlar ve genellikle +4°C'de sabit tutulurlar.

LİYOFİLİZE CİHAZI: Bakteriler, virüsler ve serum gibi maddeler kendiliklerinden oda sıcaklığında kurutulacak olurlarsa bünyelerindeki bozulmazlar ve yıllarca canlı olarak kalabilirler. Dondurarak kurutma işlemi Liyofilin Cihazlarında yapılır. Liyofilize ampüllerinin içerisine katkı maddeleri ile birlikte bakteri veya virüs konur. Kuru buz ve alkol veya selosel karışımında (-76 °C) çevrilerek süratle donması ve yüksek vakum altında kuruması sağlanır. Daha sonra tüpün ağzı alev tabancası ile kesilir. Bu şekilde hazırlanan ampüller yıllarca canlılığını kaybetmeden saklanabilirler.

TÜP KARIŞTIRICI: Tüpteki sıvıları karıştırmaya yarayan ve elektrikle çalışan aletlerdir.

MANYETİK KARIŞTIRICI: Bazı besiyerlerinin karıştırılması veya bazı kimyasal maddelerin çözelti hazırlanırken eritilmesi için kullanılan, manyetik olarak çalışan aletlerdir.

MİKROSKOP: Mikroorganizmaları çoğunlukla gözle görmek mümkün değildir. Görünebilmeleri için büyütülmeleri ve gözle görülür hale getirilmeleri gereklidir. Bu nedenle mikroskop, mikrobiyoloji laboratuvarının vazgeçilmez aletidir.

Mikroskobun çeşitli tipleri olup, uygulama laboratuvarında kullanılanları adi ışık mikroskobudur. Bunlar **mekanik** ve **optik** olmak üzere başlıca iki kısımdan ibaret bulunmaktadır. Üst tarafta dikey pozisyonda ve her iki ucuna mercekle yerleştirildiği **Ana Tüp** ve bazı mikroskoplarda da ana tüp içinde ayrıca ayarlanabilen çekme tüp bulunmaktadır. Bu tip mikroskopların kullanılmalarından önce çekme tüpün yan tarafındaki 160 sayısının görülecek şekilde yukarı kaldırılması gerekmektedir. Bununla beraber bir çok mikroskoplarda tüp sabit olduğundan bunun ayarlanmasına lüzum yoktur. Ana tüpün alt tarafında, üzerine preparatın konduğu **Tabla** bulunmaktadır. Bazı mikroskoplarda tabla sabit olduğu halde bazılarında muayenesi yapılacak objenin yatay pozisyonda hareketini sağlayan mekanik kısım bulunmaktadır. Bu tip tablalara da **Mekanik Tabla** adı verilmektedir. Ana tüple tablayı kol birleştirmektedir. Kol bazı

mikroskoplarda düz olduğu halde bazılarında bükeydir ve mikroskobun kaldırılması veya taşınmasında hizmet görür. Doğrudan doğruya kolun ve tablanın alt tarafında at nalı şeklinde ayak ile desteklenen direk şeklinde bir sütun bulunmaktadır. Kol ve sütunun birbirine **Eğilme yeri (Eklem)** adı verilen bir mekanizmayla bağlı bulunmaktadır.

Ana tüpün üst ucuna yerleştirilen merceğe sistemine Oküler denmekte ve 4x işareti bulunan görüntüyü 4 defa büyüttüğünü ifade etmektedir. Okülerin zarar görmemesi için ince yumuşak ve lif bırakmayan bir bez (**tülbent**) ile temizlenmesi gereklidir. Mikroskop kullanılmadan önce ana tüpten çıkartılarak silinmesi adet haline getirilmelidir.

Ana tüpün alt ucunda yuvarlak şeklinde **Döndürme Mekanizması** ve bunun alt tarafında ise **Objektif** adı verilen merceğe sistemi bağlanmış bulunmaktadır. Objektifler muhtelif uzunlukta olup burun kısmının döndürülmesi suretiyle bunlardan herhangi biri ana tüpün merkezinden inen hat üzerine getirilebilir. Objektif de oküler gibi ince yumuşak kağıt ile temizlenmelidir.

Mikroskopta bulunan 4 objektiften en kısası az büyütme güçlü objektif olup üzerinde 4x işareti bulunmaktadır. Bundan daha uzun olanına **Yüksek Büyütme Güçlü Objektif** adı verilmekte ve üzerinde 40x işareti bulunmaktadır. En uzun olan objektife ise İmmersiyon objektifi denilmekte ve üzerinde 100x işareti bulunmaktadır.

İmmersiyon objektifindeki merceğin alt tarafı o kadar küçüktür ki yeteri kadar ışık merceğe içeri geçemez. Bunu sağlamak üzere immersiyon objektifinin kırılma indisi, camın indisinin aynı olan sedir yağına batırılarak kullanılması gerekmektedir. Bu sebepten immersiyon objektifi kullanılacağı zaman preparat üzerine bir damla sedir yağı damlatılır ve objektif bu yağı batırılarak gözlem yapılır.

Mikroskop kolunun her iki yanında birer adet kaba ayar vidası ve bunların iç kısmında yine birer adet ince ayar vidası bulunmakta ve ayar bu vidalar vasıtasıyla yapılmaktadır.

Tablanın alt tarafında **Kondansör** ve **İris Diyaframı** bulunmakta ve objektife gelen ışık bu diyafram ile kontrol edilmektedir. Kondansörün solunda ve onu tablaya bağlayan mekanizmaya **Tabla Altı Kolu** adı verilmektedir. Bunun alt ucunda kondansörü kaldıran veya indiren Ayar Vidası bulunmaktadır ki buna **Hızlı Vida** denilmektedir.

Ayakla tabla arasında yuvarlak şekilde bir **Ayna** bulunmaktadır. Bu ayna birbirine dikey iki eksenden birisi üzerinde çevrilebilir ve ışınları preparasyon üzerine yansıtır. Aynanın bir yüzü düz bir yüzü ise iç bükeydir. Bunlardan başka preparatın tabla üzerinde sıkıca tutulmasını **Kıskaç** sağlar.

Elektron mikroskobu hariç tutulacak olursa, mikrobiyoloji laboratuvarında adi ışık mikroskobu, faz-kontrast mikroskobu, floresans mikroskobu ve karanlık alan mikroskobu çok fazla kullanılır. Bakteriler genellikle x1000 büyütmede incelenirler. Bu büyütme ise immersiyon objektifi ile elde edilir. İmmersiyon objektifi ile çalışırken incelenecek olan preparatın üzerine bir damla immersiyon veya sedir yağı damlatılır. İmmersiyon objektifinin delik çapı oldukça küçüktür. Bu sebeple, kondansörden gelen ışınların çok azı bu açıklıktan geçebilir. Işınların büyük bir kısmı yanlara doğru kırılarak kaybolur. İşte bu yüzden preparatın üzerine sedir veya immersiyon yağı konur ve ışınların yanlara doğru kırılarak kaybolması engellenir. Sedir ve immersiyon yağının yoğunluğu fazla olduğu için (havadan) kondansörden ve dolayısıyla objeden gelen ışınların dağılmasına engel olur ve obje daha iyi görülür.

İmmersiyon objektifi ile çalışılırken dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, obje en küçük büyütmede bulunmalı, daha sonra immersiyon objektifine geçilmelidir (x100). Bu büyütmede sadece mikro vida ile görüntü aranır.

Adi ışık mikroskobunda, boyanmış ve dolayısıyla ölmüş bakteriler incelenirken, karanlık alan mikroskobunda bakteriler boyanmadan incelenirler. Bu şekilde bakterilerin hareketli olup olmadıkları ve kirpik durumları rahatlıkla görülebilir. Karanlık alan mikroskobundaki kondansör adi ışık mikroskobundaki kondansörden farklıdır. Bu şekildeki objeler üzerine eğik ışınlar gönderilir ve bakteriler karanlık bir sahada parlak olarak görülürler.

Fluoresans mikroskobunda, ışık kaynağı normal ışık olmayıp ultraviyole ışındır. Bu da yüksek basınçlı civa basınçlı lambalar kullanılarak elde edilir. Bakteriler normal olarak bu ışınlar altında floresans ışık saçmazlar. Ancak bu bakteriler Auramin, Korifosfin o, Tioflavin S, Berberin sülfat, Fuksin Morin ve Primulin gibi floresans renk veren boyalarla muamele edildikten sonra floresan mikroskobunda bakılacak olurlarsa karanlık bir sahada floresans renk veren parlak cisimler şeklinde görülürler.

Faz-Kontrast mikroskobunda ise, adi ışık mikroskobundan farklı olarak kondansör ve objektifte olmak üzere iki adet difraksiyon (ışınların kırılması) levhası bulunur. Bu levhalar, elen ışığın dalga boyuda 1/4'lük bir gecikmeyle gelirler. Bu şekilde faz-kontrast mikroskoplarında, ışık kaynağından doğrudan doğruya gelen ışınlar ve cisimlerden kırılarak gelen ışınlar olmak üzere iki tip ışın vardır. Faz-kontrast mikroskobunda bakteriler canlı olarak incelendiği için, bakteri hareketlerini, bölünmesini, çeşitli yapı elemanlarını, inklüzyonlarını incelemek mümkündür.

SOĞAN ZARI HÜCRESİNİN İNCELENMESİ

Canlıları meydana getiren, yaşama ve çoğalma yeteneğindeki en küçük yapı birimine Hücre denir. Hücre ilk kez 1665 yılında İngiliz bilim adamı Robert Hook tarafından keşfedilmiştir.

Mikroskopun gelişmesiyle hücre hakkındaki bilgiler gelişmiş ve Hücre Teorisi ortaya çıkmıştır. Hücre teorisine göre:

1-Canlıların temel yapı ve görev birimi, hücrelerdir.

2-Bütün canlılar bir veya birçok hücreden meydana gelmiştir.

3-Hücreler bağımsız olmakla birlikte, iş bölümüne de katılabilirler.

4-Hücrelerde canlılığın kalıtım maddeleri bulunur.

5-Hücreler kendilerinden önceki hücrelerin bölünmesiyle meydana gelirler.

Hücreler üç ana bölümden oluşur. I.Hücre zarı II. Sitoplazma III. Çekirdek

AMAÇ

Soğan zarı hücrelerini ışık mikroskobu ile incelemek

MATERYAL

Araç ve gereçler:

1. mikroskop
2. kuru soğan
3. bıçak
4. lam
5. lamel
6. damlalık
7. pens
8. bistüri veya jilet

İŞLEM

- 1- Bıçak yardımıyla soğanı birkaç parçaya bölünüz. Etlı parçalardan birini büyüteçle inceleyiniz.
- 2-Etlı yaprağın iç kısmındaki ince zarı, pens yardımıyla ayırınız. Bu zarı da Büyüteçle inceleyiniz.
- 3-Soğan zarından bistüri veya jilet yardımıyla küçük bir kesit alarak, incelenecek örneği lamın üzerine koyunuz.
- 4-Damlalık ile preparatın üzerine bir damla su damlatınız.
- 5-Lamelle, lama 45 derece açđ yapacak şekilde preparatın üzerine yavaşça hava almayacak şekilde kapatınız.
- 6- Hazırladığınız örneği mikroskopta inceleyerek, gördüklerinizi çiziniz.



Soru:

1. Gördüklerinizi çizerek mikroskobun çalışma sistemini anlatınız.

LABORATUVARDA
STERİLİZASYON
VE
DEZENFEKSİYON

LABORATUVARDA STERİLİZASYON VE DEZENFEKSİYON

Mikrobiyoloji çalışmaları ve araştırmalarındaki pek çok işlem canlı mikroorganizmaların kullanılmasını içerir. Canlı mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalarda laboratuvarında kullanılan her mikroorganizmanın potansiyel zararlı olabileceği, her kültür sıvısının patojen organizmalar ve toksik maddeler taşıdıklarını unutmamak gerekir. Bu nedenle, mikroorganizmaların elimine edilmesi veya aktivitelerinin inhibe edilmesi ile ilgili metotlara gerek vardır. Bazen bütün canlı yaşam formlarının tamamen ortadan kaldırılması veya sadece zararlı organizmaların elimine edilmesi gerekebilir. Ayrıca canlı dokuların içindeki ve/veya üzerindeki patojenik bakterilerin inaktivite edilmesinde de bazı problemler vardır.

Mikrobiyal popülasyonların kontrol altına alınmasında çeşitli yöntemler vardır. Bu işlemler ısı uygulaması, kimyasal sterilizasyon, filtrasyon ve radyasyon olarak gruplandırılabilir.

Bir ortam veya maddenin tüm canlı mikroorganizmalardan arındırılması işlemine **STERİLİZASYON** adı verilir. Sterilizasyonda bütün mikroorganizmalar öldürüldüğü için “kısmi sterilizasyon” gibi bir terim anlamsızdır.

Sterilizasyon metotları etkili, çabuk, basit, ucuz ve pek çok çeşitli materyale uygulanabilir olmalıdır.

1. SICAKLIK İLE STERİLİZASYON: Bakterileri türleri hücrelerindeki içerdikleri su miktarına bağlı olarak sıcaklığa karşı farklı hassasiyet gösterirler. Endosporlar vejetatif hücrelerden daha dirençlidir. Vejetatif hücreler kaynayan su içinde genellikle hızla ölürlerken, endosporlar daha uzun süre yaşayabilirler.

Isının sterilizasyon gücü sadece sıcaklığa değil, zamana, nem oranına ve çevre şartlarına bağlıdır. Sıcaklık kuru ve nemli olarak sterilizasyon işlemlerinde kullanılır.

1.1. KURU ISI İLE STERİLİZASYON: Buhar basıncı ile steril edilmeyen porselen, tüp, balon, pipet, petri kutusu gibi cam malzemenin ve toz halindeki maddelerin sterilizasyonu kuru sıcaklık ile çalışan elektrikli veya gazlı fırınlarda yapılır. Bu fırınlar Pasteur fırını olarak adlandırılırlar. Bu fırınlarda cam malzemeler 150 °C’de 3 saat, 160 °C’de 2 saat ya da 170 °C’de 1 saat’de sterilize edilir.

1.2. NEMLİ ISI İLE STERİLİZASYON: Besiyeri, dilüsyon sıvısı, çeşitli çözeltiler, belirli gıda maddeleri hazırlandıkları cam veya metal kaplarda otoklavda sterilize edilebilir (zorunlu durumlarda içi boş tüp, pipet, Petri kutusu belli bir hazırlıktan sonra otoklavda sterilize edilebilir. Buda birtakım riskleri beraberinde getirmektedir.

Sterilizasyon için beklenen süre; otoklavdaki tüm materyaller için etkili olmalı, sterilizasyon sıcaklığına ulaşmak için yeterli olmalı ve bütün organizmaların öldürülmesi için istenilen sürede olmalıdır.

Otoklavda kullanılan genel sıcaklık/zaman kombinasyonlarını şöyle sıralayabiliriz;

-115 °C'de 35 dakika

-121 °C'de 15-20 dakika

-134 °C'de 4 dakika

Otoklavda başarılı bir sterilizasyon için aşağıda sayılan noktalara dikkat edilmelidir;

1. Tam bir sterilizasyon için gerekli sürenin otoklav içine yerleştirilen materyalin kalite ve miktarına göre değişeceği unutulmamalıdır.
2. Otoklavda steril edilecek malzemeler gevşek olarak aralarında buharın en küçük gözeneklere girmesine izin verecek şekilde yerleştirilmelidir.
3. Otoklavın basıncı hızlı bir şekilde düşürülmemelidir. Aksi halde kaplar içindeki sıvılılar kaynar, kaplarından taşar ve tıkaçları atabilir.
4. Otoklava konulan malzemelerin ağızları buharın kapların içine girmesine engel olmayacak şekilde çok sıkı kapatılamamalıdır.
5. Etkili bir sterilizasyon için buhar doymuş olmalıdır. Buhar istenilen sıcaklıkta olmalı ve mümkün olabildiği kadar gaz formda su içermelidir.
6. Kazanın içinde su bulunmamalıdır. Çünkü hava basınç-sıcaklık ilişkisini bozar. Aynı basınç altında hava-buhar karışımı sadece buharın sahip olduğu sıcaklıktan daha az sıcaklığa ulaşır. Bu yüzden hava kazandaki ve kazan içindeki bütün materyalden hava vanası kapanmadan önce çıkarılmalıdır.

Laboratuvarlarda evlerde kullanılan düdüklü tencereler birer otoklav olarak kullanılabilir. Çünkü bu tencerelerin çalışması ve kullanılması prensipte otoklav ile aynıdır. Hastanelerde kullanılan büyük otoklavlarda ise buhar bir kaynaticıdan kazana pompalanır. Zaman, basınç ve buhar kalitesi gibi faktörler otomatik olarak kontrol edilir. Bazı otoklav modellerinde buhar kazanın üst kısmından verilir, böylece hava kazanın alt tarafına kayar. Bu küçük otoklavlarda kullanılan yukarı doğru yer değiştirmeden daha etkilidir. Çünkü bu şartlarda buhar havadan daha hafiftir.

Başka bir çeşit otoklavda ise, kazanın içindeki hava buhar verilmeden önce pompa ile boşaltılır. Bu işlem delikli materyallerden buharın hızlı ve etkin bir şekilde geçmesine izin verir.

Bazı materyaller otoklavda steril edilmezler. Örneğin; su geçirmeyen maddeler (petroleum jelly), ısı ile bozunabilen maddeler. Bu maddeler Pasteur fırında veya filtrasyon ile steril edilebilirler.

Otoklavın sağlıklı çalışıp çalışmadığı, otoklavın içerisine yerleştirilen digital bir termometre ile, kükürt gibi 120 °C'de eriyen maddeler özel bir tüpün içine yerleştirilerek, boyalı kağıtlar ile veya biyolojik indikatörler (*Bacillus subtilis* veya *B. stearothermophilus* gibi sporlu bakteriler) yardımı ile test edilebilir.

1.2. ISLAK STERİLİZASYON

1.2.1. KAYNATMA İLE STERİLİZASYON: Kaynatma yolu ile mikroorganizmaların sadece vejetatif formları ölür. Etkili bir sterilizasyon için 100 °C'de 30 dakikalık bir zaman gereklidir. Bu yöntemde sterilizasyon edilecek materyallerin tümünün suyun içine batık durumda kaynatılması, kaynatma işlemi bittikten sonra malzemelerin önceden steril edilmiş bir pens ile tutularak sudan çıkarılması gerekmektedir. Kaynatma işlemi sterilizasyondan çok bir dezenfeksiyon işlemi sağlar.

1.2.2. TİNDALİZASYON: 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bozunabilen besi yerleri (şekerli, jelatinli besi yerleri) ve bazı çözeltiler dayanabildikleri sıcaklık derecelerine göre (56 –100 °C) birkaç gün arka arkaya ısıtılarak steril edilebilirler. Bu yöntemde steril edilecek materyal genellikle 100 °C'de yarım saat aralıklarla 3 gün tutulur. Böylece vejetatif hücreler ölür. Ancak sıcaklık 100 °C'nin üzerine çıkarılmadığı için sporlar canlı kalır. Materyal ertesi güne kadar oda sıcaklığında bekletilir. Bu süre içinde 1.gün işleminden etkilenmeyen sporlar vejetatif forma dönüşür. Materyal 2.gün yine 100 °C'de yarım saat tutulur. Aynı işlemler bir gün daha tekrarlanır ve tindalizasyon işlemi 3 gün içinde tamamlanır.

Tindalizasyon işlemi otoklav kapağı tamamen kapatılmadan 100 °C'deki buharın serbestçe dışarı çıkacağı durumda, benmari adı verilen metal su banyolarında, Koch Kazanı ve Steam Arnold isimli araç ile yapılabilir.

Tindalizasyon işlemi ile sterilizasyon bazen üç gün içinde tamamlanmaz. Bu gibi durumlarda süre birkaç gün daha arttırılabilir.

1.2.3.PASTÖRİZASYON: Tam bir sterilizasyon değildir. Süt, meyve suları, krema, bira, şarap gibi alkollü içeceklerdeki patojen mikroorganizmaların (bütün mikroorganizmaları değil) yaş ısı uygulayarak öldürülmesi işlemidir. İki çeşit pastörizasyon uygulanır;

1. LTH(Low Temperature Holding): Pastörize edilecek materyal 63 °C’de yarım saat tutulur ve sıcaklık en kısa sürede 10 °C’ye düşürülür. Buradaki 63 °C besinlerde zararlı olan *Mycobacterium tuberculosis*’in bu sıcaklıkta 15 dakika öldüğünün deneysel olarak tespiti sonucunda bulunmuştur.
2. HTST (High Temperature Short Time): Materyal 72 °C’de 15 saniye tutulur ve sıcaklık en kısa sürede 10 °C’ye indirilir.

2. KİMYASAL MADDELER İLE STERİLİZASYON: Sterilizasyon için kullanılan kimyasallar oldukça reaktifler ve canlı dokulara zarar verirler. Bu yüzden kullanımlarında çok dikkatli olmak gerekir. Sadece uygun alet ve yetiştirilmiş personel bulunan kuruluş ve enstitülerde kullanılırlar. Örneğin, Etilen oksit (C₂H₄O)-suda eriyen siklik eter-10.8 °C’nin üzerinde gazdır. Hava ile temasında patlayıcıdır. Bu yüzden azot, CO₂ gibi gazlar ile seyreltilmiş halde kullanılır. Sterilizasyon için ise gaz karışımı özel kabinler içinde kullanılır ve etilen oksitin konsantrasyonu dikkatli bir şekilde kontrol edilir. Protein ve nükleik asitlerdeki çeşitli gruplar ile reaksiyona giren etilen oksit klinik araçların, yatak, çarşaf vb. maddelerin sterilizasyonunda kullanılır.

DEZENFEKSİYON

Bazı kimyasal maddelerin uygun konsantrasyonlarındaki çözeltileri gaz ya da buharları mikroorganizmaları öldürme (**bakterisidal**) veya üremelerini durdurma (**bakteriyostatik**) özelliği gösterir. Kimyasal maddeler kullanarak patojen mikroorganizmaların öldürülmesi işlemine **DEZENFEKSİYON** adı verilir. Dezenfeksiyon tam bir sterilizasyon değildir, yani sterilizasyon yerine kullanılamaz. Çünkü dezenfeksiyon için kullanılan maddeler (dezenfektanlar) bazı mikroorganizmaları ve sporları etkilemez. Dezenfeksiyon işlemi daha çok cansız objeler ve yüzeyler için kullanılır. Kimyasal dezenfeksiyon yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bazı işlemler için fiziksel metotlar daha uygundur.

Genel amaç için kullanılan dezenfektanların ideal olarak çok geniş kapsamlı ve potansiyel patojenleri öldürme özelliğine sahip olması gerekir. Fakat, bir dezenfektan genellikle bazı organizmalara diğerlerinden daha fazla etkilidir. Dezenfektan maddenin etkinliği; dilüsyon

oranına, sıcaklığa, pH'ya, organik madde veya deterjan varlığına, ortamdaki mikroorganizma cinsine ve yüküne bağlıdır.

Dezenfektan maddenin etkili olabilmesi için uygun şartlarda, uygun konsantrasyonda ve zaman aralığında kullanılması gerekir. Hipokloritler gibi bazı dezenfektanlar kararlı değildir. Bazı dezenfektanlarında etkili olabilmesi için eriyik halinde olması gerekir. Bazı dezenfektanlar düşük konsantrasyonlarda etkili olurken, bazı bakterileri metabolize edebilirler. Örneğin; *Pseudomonas* türleri karbonik asit (fenol) in seyreltik solüsyonlarında büyüyebilirler.

Dezenfeksiyon işleminde kullanılan çeşitli kimyasal maddeleri şöyle sıralayabiliriz; sülfirik asit (H₂SO₄), hidroklorik asit (HCl), borik asit, benzoik asit, etil alkol, kloroform, fenol, krezol, lizol, hidrojen peroksit, potasyum permanganat, sönmemiş kireç, kireç sütü, timol, iyot, klor, sodyum hipoklorit, kalsiyum hipoklorit, klor amin, antiformin, etilen oksit, sabun ve deterjanlar, ağır metaller, kuaternar amonyum bileşikleri (QACs), boyalar.

Genel olarak yaygın şekilde kullanılan bazı dezenfektanlara örnekler aşağıda verilmiştir:

FENOL VE FENOL TÜREVLERİ: Uygun konsantrasyonlarda bakterisidaldir. Sitoplazmik membranın permeabilitesini etkilerler. Lizol, metilfenolün sabun ile solubilize edilmiş karışımıdır. % 0.5 lik konsantrasyonda 15 dakikada spor yapmayan pek çok bakteriyi öldürür. Endosporlar % 2 lik lizolde birkaç günde yaşayabilir. Fenol rahatsız edici bir kokuya sahiptir ve kullanıldıktan sonra yüzeyde yapışkan bir iz bırakır.

KLOR: İçme sularının ve yüzme havuzlarının dezenfeksiyonunda kullanılır. Direk olarak ya da hipoklorit asit yolu ile etki eder. Organik materyaller veya reaksiyona girdiği diğer maddeler etkinliğini azaltır. Hemen hemen bütün bakterilere ve bakteri sporlarına karşı oldukça etkilidir. Gaz halinde iken çok tehlikelidir. Bu yüzden genellikle hipoklorit veya kloraminler olarak sıvı halde kullanılır. Klor çözeltileri zamanla etkilerini kaybettikleri için taze olarak hazırlanmalıdır.

KUATERNER AMONYUM BİLEŞİKLERİ: Katyonik deterjanlardır. Besin ve süt endüstrisinde kullanılan aletlerin dezenfeksiyonunda kullanılırlar. Düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik etki gösterirler. Yüksek konsantrasyonlarda ise bakterisidal etki gösterirler. Gram pozitif bakteriler üzerinde daha etkilidirler. Sitoplazmik membranın bütünlüğünü

bozarlar. Sabunlar ve bazı katyonlar (Ca^{+2} , Mg^{+2}), düşük pH ve organik maddeler etkinliğini inhibe ederler. Kokusuz olmaları, yüzey boyamadıkları, metallerde korozik etki göstermedikleri, stabil oldukları, ucuz ve nispeten toksik olmadıkları için tercih edilirler.

HİPOKLORİTLER: Bakteri ve sporlara karşı oldukça etkindirler. HOCl kuvvetli bakterisidaldir. Sodyum hipoklorit ticari hipoklorit dezenfektanların stabilizeri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.

ALKOLLER: Genellikle etil alkolün % 50-70 lik konsantrasyonları kullanılır. Yüzey dezenfeksiyonunda kullanılırlar, sporları etkili değildirler. Alkol mutlaka su ile karıştırılarak kullanılmalıdır, çünkü; saf alkol hücre duvarındaki proteinleri bloke ederek hücre içine nüfuz edemez. Alkoller etkilerini proteinleri denatüre ederek değil, lipid çözücü ve dehidre edici özelliklerinden dolayı gösterirler.

FORMALDEHİT: Zehirli buharı nedeni ile kullanımına özen gösterilmelidir. % 37-40 lık konsantrasyonlarında sıvı (formol) veya para formaldehit (katı) halde yüzey dezenfeksiyonunda kullanılırlar.

AĞIR METALLER: Gümüş, civa, bakır, çinko, altın tuzları yaygın olarak kullanılır. Mikroorganizmalar üzerinde "sidal" etkiye sahiptirler. Hücre enzimlerini çözelterek veya -SH grupları ile birleşerek enzimleri inhibe ederler. Çok az miktarlarda çok etkili olmalarının nedeni bazı hücre proteinlerinin bu iyonlara ilgisinin fazla olmasıdır. Bazı bakteriler plasmidler tarafından kodlanan ağır metal dirençliliğine sahiptirler. Materyal bu maddelerden yapılmış kağıtlar arasına saklanarak uygulanır.

PEROKSİTLER: Hidrojen peroksitin %3'lük sulu çözeltisi dezenfeksiyonda kullanılır. Antimikrobiyal etkisi çok zayıftır.

BOYALAR: Malaşit yeşili, Brilyant green, Kristal viyoleto gibi mikroorganizmaların boyanmasında kullanılan bazı boyalar bakterisidal etkiye sahiptirler. Kristal viyoleto Gram pozitif koklar tarafından etkilidir. Akrişavin ve proflavin boyalar özellikle gram pozitif bakteriler üzerinde etkilidir. Boyaların yoğunlukları ve mikroorganizma türü önemlidir.

FİZİKSEL AJANLAR İLE DEZENFEKSİYON: U.V., DNA ya zarar verebilir ve uygun şartlar altında bakterilerin ölümüne neden olur. UV'nin etki gücü oldukça zayıftır (toprak tarafından kolayca adsorbe edilir), fakat UV lambaları (254 nm) havanın ve kapalı alanlardaki yüzeylerin dezenfeksiyonunda kullanılır.

ANTİSEPSİS: canlı dokuların dezenfeksiyonuna ANTİSEPSİS adı verilir. Enfeksiyondan korunmak veya enfeksiyonu tedavi etmek için uygulanır. Genel olarak kullanılan dezenfektan maddeler fazlaca sulandırılarak antisepsi uygulanır. Bu maddeler ise antiseptik maddeler olarak adlandırılırlar. Antiseptiklere ait bazı örnekler aşağıda verilmiştir:

Detol: Genel amaçla seyreltik olarak kullanılan fenol antiseptiktir. Eysel dezenfeksiyonda daha konsantre formları kullanılır.

Hekzoklorafen: Antiseptik sabunlarda kullanılır. Bir bis fenoldür (Molekül 2 fenol grubu taşır). Gram pozitif bakterilere karşı etkindir.

70:30 Etanol-Su Karışımı: Deri antiseptiği olarak kullanılır. Sabunlar antiseptik taşımadıkları sürece çok az ya da hiç antibakteriyal aktivite göstermezler. Sabun bakterilerin, kir ve yağların deriden uzaklaştırılmasını sağlar.

QACs: Antiseptik kremlerde kullanılır.

İyod: Alkol ya da sulu solüsyonları potansiyel bakterisidaldir. Ayrıca sporisidal bir antiseptiktir.

3.FİLTRASYON İLE STERİLİZASYON: Yüksek ısı ile sterilizasyon uygulandığında fiziksel ve kimyasal yapılarında değişimler olabilecek serum, enzim, vitamin, antibiyotik, protein vb. maddeler ısıya dayanıksız olduklarından filtreden geçirilerek steril edilirler.

Filtrenin yapısı ve kalitesi yanında, filtrasyonda etkili olan faktörler arasında filtre edilecek sıvı içindeki mikroorganizmanın elektrik yükü, filtrenin kendi elektrik yükü ve por büyüklüğü sayılabilir.

Çok çeşitli filtreler vardır; membran filtreler, porselen, cam tozu, amyant (Setiz) diyatome (Berfeld), asbest, selüloz asetattan yapılmış filtreler örnek olarak verilebilir.

Bir sterilizasyon metodu olan filtrasyon aynı zamanda mikroorganizmaların izolasyonu ve çeşitli metabolizma ürünlerinin elde edilmesinde ve havanın sterilizasyonunda da kullanılır. Filtrasyonda mikroorganizmalar ya filtrenin küçük deliklerine mekanik olarak tutunur ya da elektrik yüklerindeki farklılık nedeni ile filtreye absorbe olur.

Membran filtreler mikrobiyolojide en çok kullanılan filtrelerdir. Bunların por çapları genellikle 0.45 µm dir. Bu filtreler bakteriler için kullanılır. Son yıllarda 0.01-10 µm lik por çaplı olan filtreler yapılmıştır. Membran ve moleküler filtreler biyolojik olarak reaksiyona girmeyen maddelerden yapılmıştır. Delik çapı çok küçük (0,2 µm) olan virüslerin ve çok küçük partiküllerin ayrılmasında kullanılan filtrelerde vardır. Filtre cihazı kullanılmadan önce alimünyum kağıtlara ayrı ayrı sarılarak steril hale getirilirler.

4.RADYASYON İLE STERİLİZASYON: 2000-3800 Å dalga boyları arasındaki şeritte yer alan ultraviyole ışınları (UV) mikroorganizmalar üzerinde bakterisid özelliğe sahiptir. Güneşten gelen UV ışınları, su yüzeyinde ve havada serbest dolaşan mikroorganizmaları öldürür.

Radyasyon ile sterilizasyon kısıtlı bir uygulama alanına sahiptir ve eki mekanizması hakkında çok az ayrıntı bilinmektedir. Radyasyon uygulamaları iyonize radyasyon ve iyonize olmayan radyasyon olarak ikiye ayrılabilir:

İyonize Olmayan Radyasyon: Buna en iyi örnek UV ışınlarıdır. UV ışınları kısa dalga boylu oldukları için çok az etki etme özelliği gösterirler. Bu yüzden UV ışınları hava ve yüzeylerdeki mikroorganizma popülasyonlarının sayısını azaltmak için kullanılır. Bu yüzden kullanıcılar tarafından gerekli tedbirler alınmalıdır.

Yapılan deneyler sonucunda UV spektrumunda en etkin dalga boyunun her bir mikroorganizma cinsi için farklı olduğu saptanmıştır. *E.coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* ve *Protous* cinsi Gram negatif bakteriler radyasyona karşı en hassas olanlardır. Gram pozitif bakterilerin ise bir kısmı radyasyona direnç gösterirken, bir kısmı ise dirençsizdir. Sporlar radyasyona karşı oldukça dirençlidir. Mayalar ise radyasyondan hücrelerin diploid ya da haploid oluşuna göre farklı şekilde etkilenirler.

UV ışınları ile sterilizasyon UV lambaları ile sağlanır. Ticari UV lambaları 260 nm dalga boyunda ışınlar çıkarır. UV etkisi lamba ile steril edilecek materyal arasındaki uzaklığın karesi ile ters orantılıdır.

UV ışınları hücre içindeki nükleik asitlere etki ederek, hücrenin metabolik faaliyetlerini bozar ve hücrenin ölümüne neden olur. Hücre mutasyona uğrayarak da canlı kalabilir. Ancak bu mutasyona uğrayan hücreler güneş ışığına maruz bırakılırsa bir başka onarım mekanizması ile normal hallerine dönebilirler.

UV ışınları mikroorganizmaların kontrolü yanında mutasyona neden oldukları için mikroorganizmaların islahında da kullanılır.

İyonize Radyasyon: X ışınları ve γ (gama) ışınları bu grupta yer alır. X ışınlarının dalga boyu 100 Å'dan γ ışınları ise 1 Å'dan daha kısadır. Bu ışınlar moleküllerden elektron kopararak onların iyonlaşmasına neden olur. Çok yüksek penetrasyon özelliğine sahiptirler. Bu ışınlar polietilen veya sentetik maddelerden yapılmış cihazların, malzemelerin steril edilmesinde, besin ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır.

Biyolojik materyalin sterilizasyonunda iyonize ışınların kullanılması "soğuk sterilizasyon" olarak adlandırılır. Çünkü, bu işlemlerde çok az ısı oluşur. X ışınları üretildikleri merkezden her yöne doğru yayıldıkları için uygulayıcıların çok dikkatli olmaları gerekir. γ Işınları çok derin nüfuz etme özelliğinden dolayı büyük hacimli maddelerin içinde veya üzerindeki mikroorganizmaların öldürülmesinde kullanılırlar. Bu ışınlarda çalışanlarda zarar verebileceği unutulmamalıdır. Etkin penetre özelliklerinin yanı sıra, uygulayıcılara verebilecekleri zararlardan dolayı bu ışınların kullanım alanları sınırlı olmuştur.

KATOD IŞINLARI: Yeterli şiddette uygulandığında germisidal etkiye sahip ışınlardır. Kolay üretilirler ama penetrasyon güçleri zayıftır. Uygulandıkları maddeyi çok kısa sürede sterilizasyona uğrattırlar.

FOTOOKSİDASYON: Bir bakteri popülasyonu belirli bir süre kuvvetli ışığa maruz bırakılırsa, bakterilerin hücrelerinde yer alan riboflavin ve porfirinlere ışığın etkisi sonucu ölürler. Floresan (rose bengal, metilen blue vb.) boyalar ile boyanan mikroorganizmalar kuvvetli ışık altında tutulursa, boyalar ışıktan enerji absorbe eder. Bu enerjiyi floresan ışığa çevirir ve bitişik protein molekülü aktarır. Proteinlerde bu enerji ile okside olur ve hücre ölür.

SONİK RADYASYON: Ultrasonik dalgaların bakterisidal etkisi vardır. Bu ses dalgaları 2000000 saykılın (titreşim menzil birimi) üzerinde titreşim yapan ses dalgalarıdır. Ultrasonik ses dalgaları, sıvı içindeki mikroorganizmalara uygulandığında hücreler yırtılmakta ve içerikleri açığa çıkmaktadır. Bu metod mikroorganizmaların öldürülmesinden ziyade, hücre çeperi ve hücre içi yapıların, enzimlerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır.

BESİ ORTAMLARI
VE
BESİ ORTAMLARININ
HAZIRLANMASI

BESİ ORTAMLARI VE BESİ ORTAMLARININ HAZIRLANMASI

Besi ortamı (medium) mikroorganizmaların büyümeleri, saklanmaları ve transferleri için hazırlanan katı veya sıvı preparasyonlardır. Mikroorganizmaların kültür edilmeleri (büyütülmeleri) için hazırlanan herhangi bir besi ortamında mikroorganizmanın türüne göre gerekli olan tüm beslenme gereksinimleri bulunmalıdır. Bunlar;

- a. Enerji kaynağı olarak görev yapan bir karbon kaynağı,
- b. Su,
- c. Azot kaynağı,
- d. Sülfat kaynağı,
- e. Fosfat kaynağı, Fe^{+2} , Mg^{+2} vb. çeşitli mineraller olarak sıralanabilir.

Besi ortamlarının çeşitlerinden söz etmeden önce, bakteriolojide sıklıkla kullanılan bazı terimleri açıklamak basit laboratuvar işlemlerinde kolaylık sağlayacaktır. *E. coli* gibi bir mikroorganizmayı geliştirmek için önce uygun ve steril bir besi ortamı hazırlanır. Daha sonra bu mikroorganizmanın canlı hücrelerini içeren bir miktar materyal steril besi ortamına aktarılır. Bu az miktardaki materyale **İNOKULUM** (aşı) adı verilir. Aktarma işlemine ise **İNOKÜLASYON** (aşılama) adı verilir. İnoküle edilmiş besi yeri uygun şartlar altında bir süre bekletilir. Bu işleme ise **İNKÜBASYON** adı verilir. İnkübasyon süresince bakteriler büyür ve bölünürler, böylece kültür oluşur. Kültür; içerisinde ve üzerinde mikroorganizmanın geliştiği besi ortamıdır.

Sıvı besi yerleri test tüpleri içinde kullanılır. Bu tüpler cam ve kapaklı, değişik hacimlerde olabilir. 25 ml. kapasiteli cam kapaklı tüpler **UNIVERSAL BOTTLE** adını alır.

Pek çok katı besi yeri ortamı, besin maddeleri içeren solüsyonların agar ile katılaştırılması sonucu jel gibi (jelly-like) yapısal özellik kazanır. **AGAR** mikrobiyologlar için ideal bir katılaştırıcıdır. Agar Gelidium adlı kırmızı deniz alginden elde edilen kompleks bir polisakarittir. Bakteriler ve funguslar agarı kompleks yapısından dolayı parçalayamazlar, böylece agar sadece besi ortamlarını katılaştırma görevi görür. Agar ayrıca taşıdığı özel erime özelliğinden dolayı da katılaştırıcı olarak kullanılır. Çünkü katı agar 90-100 °C'de erir, sıvı agar da 42 °C civarında katılaşır ve 37 °C'de erimez.

Katı besi ortamları genellikle 9 cm. çaplı petri kutularında kullanılır. Steril katı besi ortamı eritilmiş halde steril petri kutularına dökülür ve donması için bekletilir. Katı besi yeri içeren petri kutuları **PLATE** olarak adlandırılır.

Sıvı besi ortamı gerekli besin bileşenlerinin sadece suda eritilmesi ile elde edilir. Sıvı besi ortamına agar ilavesi ile katı besi ortamı elde edilir.

BESİ ORTAMI ÇEŞİTLERİ

Kemotrofik bakteriler için olan besi ortamlarında sadece temel inorganikler bulunur. *E. coli* gibi heterotrof mikroorganizmalar ise basal besi ortamlarında bulunan genel organik maddelere gereksinim duyarlar. Bu basal besi ortamları;

- PEPTONLU SU; %1 pepton (protein hidrolizinin eriyebilen ürünü), %0.5 NaCl₂ içerir.
- NUTRIENT BROTH; %1 pepton, %0.5 NaCl₂, %0.5-1 beef extract (et ekstresi) içerir.
- NUTRIENT AGAR; nutrient brothun % 1.5-2 agar ile katılaştırılması ile elde edilir.

Pek çok bakteri basal besi ortamına gelişemez. Bu temel ortama yumurta, serum, kan gibi maddelerin ilavesi ile bu bakterilerin gelişmesi sağlanabilir. Basal ortamlara bu maddelerin eklenmesi ile luşan besi ortamları **ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ORTAMLAR** olarak adlandırılır. Bu nalara örnek olarak; Kanlı agar (blood agar), çikolata agar, serum agar verilebilir.

SEÇİCİ BESİ ORTAMI (SELEKTİF) ise; belirli bir grup mikroorganizmanın büyümesini diğer bir grup mikroorganizmanın büyümesine karşı destekleyen besi ortamıdır. Temel ortama bazı kimyasal maddelerin ilavesi ile veya ortam pH sınırın ayarlanması ile elde edilen seçici besi ortamlarına Mac Conkey's broth-agar örnek olarak verilebilir. Mac Conkey's broth içindeki bile salt (sofra tuzu) enterik olmayan bakterilerin gelişmesini inhibe ederek, enterik olanları etkilemez. Bu besi ortamı ile inokulumda her iki grup bakteride bulunuyorsa bunlardan enterik formların izolasyonu sağlanabilir. Şunu da unutmamak gerekir ki; bütün besi ortamları seçicidir, çünkü her bir grup bakterinin gelişimini eşit derecede sağlayan bir besi ortamı yoktur.

Zenginleştirilmiş besi ortamı kullanarak örneklerde az sayıda bulunan ve çalışılmak istenilen mikroorganizmanın yakalanması ve belirlenmesi şansı artar. Örneğin; Selenite broth ile örneklerde çok az sayıda olan *Salmonella typhi* kolayca belirlenebilir (Selenite broth enterik bakterileri inhibe eder).

AYIRT EDİCİ ORTAMLAR (DİFERANSİYEL) (katı) da bakterilerin farklı türleri birbirinden koloni karakterleri ile ayırt edilir. Temel ortama ilave edilen kimyasal maddeler yardımı ile mikroorganizmanın herhangi bir biyokimyasal özelliğinden faydalanılır. Örneğin; Mac Conkey's agar da *E.coli* gibi laktoz kullanan enterik bakteriler kırmızı koloniler oluşturur, çünkü oluşturdukları asidik ürünler besi ortamındaki indikatörün pH'sını etkiler. Laktoz kullanmayan enterik türler ise bu ortamda renksiz koloniler meydana getirir.

Bazı besi ortamları ne agar nede jelatin içerir. Örneğin; Dorset's egg homojenize edilmiş tavuk yumurtası ve tuzun ısıtılması ile yapılır. Bu besi ortamları mikroorganizmanın önce

gelişmesini, sonra saklanması için kullanılır. Bu tip besi ortamlarına **KORUYUCU BESİ ORTAMI** (maintenance medium) adı verilir. Dorset's egg *Mycobacterium tuberculosis*'in saklanması için kullanılır.

Pek çok besi ortamı bileşenleri tam olarak bilinmeyen maddeler (pepton, çeşme suyu vb.) içerir. Bazen bir besi ortamında iz miktarda bile bulunan maddelerin hepsinin bileşenlerinin bilinmesi gerekir. Bu tür besi ortamlarına **FORMÜLÜ BİLİNEBİR BESİ ORTAMLARI** (defined) adı verilir. Bu tip besi ortamları saf maddelerden belirli oranlarda hazırlanır. Örneğin; belirli miktardaki inorganik tuzlar, glukoz, aminoasit vb. distile ya da deiyonize suda karıştırılır. Bu besis ortamları üzerinde çalışılan bakteri türünün beslenme gereksinimlerinin belirlenmesinde kullanılır.

TRANSFER BESİ ORTAMLARI mikroorganizmaların geçici saklanması amacı ile veya özel bir mikroorganizmanın varlığının araştırılacağı materyalin (ör. Swab) transferinde kullanılır. Bu besi ortamının ana görevi mikroorganizmanın canlılığını korumaktır. Büyümeyi desteklemez, çünkü büyüme sonucu oluşan atıklar mikroorganizmayı ve yaşayabilirliğini etkileyebilir. Stuart's transfer besi ortamı anaerobik bakteriler için ve özellikle *Neisseria* için uygundur.

BESİ ORTAMLARININ HAZIRLANMASI

Laboratuvarda kullanılan besi ortamlarının formülleri pek çok laboratuvar kitabında veya ticari ürün kataloglarında kolaylıkla bulunabilir. Ortamların formülleri bulunduktan sonra, içerdikleri kimyasal maddeler hassas terazilerde tartılarak uygun miktarda su ile besi ortamının yapılaşlarında tarif edilen tüm işlemler uygulanarak karıştırılır.

Ticari firmalar tarafından pek çok besi ortamı kimyasal olarak dehidre (susuz) halde toz olarak laboratuvarda kullanıcılara sunulmaktadır. Böyle besi ortamları da uygun miktarları, uygun hacim suda eritilerek hazırlanabilir.

pH değeri ölçülen besi ortamları steril edilir ve uygun steril kaplara aktarılır. Bazen de besi ortamları önce uygun kaplara aktarılır, daha sonra steril edilir.

Pek çok agarlı besi ortamında toz besi ortamı su ile karıştırılır, daha sonra agarın erimesi için hafifçe ısıtılır. Bundan sonra otoklavda sterilizasyon işlemi yapılır. Sterilizasyon işleminden sonra besi ortamı yaklaşık 45 °C'ye kadar soğutulur. Bu ısıda agar erimiş halde kalır. Steril şartlar altında agarlı besi ortamından 15-20 ml. Besi ortamı steril petri kutularına aktarılır ve soğuyup agarın donması için beklenir.

Bazen agarlı besi ortamı içeren petrilere, agar yüzeyi kurutulmalıdır. Yüzeydeki nemin buharlaşması için, kapağı yarı açık petrilere 37 °C'de Pasteur fırınında 20 dakika bekletilir.

Tüpte yatık agar hazırlamak için ise; otoklavdan çıkarılan tüpler eğik konumda donmaya bırakılır.

Bazı besi ortamları içerdikleri bileşenlerden bir veya birkaçının yüksek ısıdan bozunması nedeni ile otoklavda steril edilemezler. Böyle besi ortamları otoklav yerine buharla işleme tabi tutulurlar. Glukoz, ısıyla bozunan şeker, vitamin içeren besi ortamlarında ise, solüsyonlar filtre ile steril edilir ve otoklavda steril edilmiş besi ortamına ilave edilirler.

**BAKTERİLERİN
BOYANARAK
İNCELENMESİ VE
PREPARAT HAZIRLAMA**

BAKTERİLERİN BOYANARAK İNCELENMESİ

Mikroorganizmalar, mikroskopta incelendikleri zaman yarı saydam ve renksiz oldukları için iyi görünemezler. Mikroorganizmaların morfolojik ve sitolojik özelliklerinin incelenebilmesi amacıyla, mikroorganizmaların boyanmaları mikrobiyolojide büyük önem taşır.

Mikroorganizmaların boyanmaları için önce bunların preparatların hazırlanması gerekmektedir. Hazırlanan preparatların fiksasyonu sırasında mikroorganizmalar canlılarını ve hareket kabiliyetlerini kaybederler. Zeminle bir kontrast oluşturarak daha iyi incelenebilir hale gelirler. Bakterileri boyayarak incelemenin önemli bir diğer avantajı da, farklı boyanma özelliklerinin farklı bakterilerin tanımlarında önemli rol oynamasıdır.

Mikrobiyolojide kullanılan boyalar doğal veya yapay olmakla birlikte genellikle yapay boyalar kullanılmaktadır. Yapay boyalar, maden kömürünün distilasyonu sırasında elde edilen benzen halkası içeren organik bileşiklerdir. Boyalar, benzen halkasına bağlı kromofor ve oksokrom gruplarını içerir. Boyadaki benzen renksiz organik bir solvent olup, buna bağlı kromofor grubu renk özelliklerini, oksokrom grubu ise bileşiğe elektrik ayrışımı özelliğini verir.

Boyaların protein veya nükleik asitler gibi makromoleküler, hücre bileşenlerini boyama kabiliyeti kromogen kısmın üzerinde bulunan elektrik yüküne bağlıdır.

Boyalar kimyasal özelliklerine göre asit, baz ve nötr boyalar olmak üzere ayrılır. Asit boyalarda renk maddesi negatif elektrik yüklüdür yani asit köktedir, bunlara aniyonik boyalar adı da verilir. Asidik boyalar sodyum, potasyum, kalsiyum, amonyum tuzları halindedir. Asidik boyalar hücrenin pozitif yüklü bileşenlerine büyük ilgi duyarlar. Proteinler pozitif olarak yüklü hücre bileşenleridir. Aniyonik boyalarla kolaylıkla boyanırlar. Pikrik asit asidik bir boyadır.

Bazik veya katyonik boyalarda renk maddesi baz köktedir yani pozitif elektrik yüklüdür, bu nedenle hücrenin negatif bileşenlerine büyük ilgi duyarlar. Bazik boyalar klor veya sülfat tuzu şeklindedir. Bakteriler negatif elektrik yüklü nükleik asitlerce zengin oldukları için bazik boyalarla iyi boyanırlar. Metilen mavisi bazik bir boyadır.

Asit ve bazik renk maddesinin birlikte oluşturdukları tuza nötral boya adı verilir. Asit boyalar, bazik hücre komponentlerini, bazik boyalar asidik hücre komponentlerini boyarlar. Boyama süresi, boya ile bakteri hücresi içindeki veya yüzeyindeki aktif bölgeler arasındaki iyon değişimi reaksiyonlarını kapsar. Boyanma sırasında hücrenin katyon kısmı boyanın katyon kısmı ile yer değiştirir.

Boya ile suda çözünmeyen bileşikler oluşturma özelliğine sahip olan ve böylece boyanın mikroorganizma hücresine girmesini fazlalaştıran maddelere **mordan** adı verilir. Amonyum oksalat, potasyum hidroksit, tannik asit, osmik asit, ferrik asit, pikrik asit, iyot, alüminyum, potasyum, demir, çinko, bakır, krom mordan olarak kullanılmaktadır.

Bakterilerin hücre yapıları ve morfolojik özelliklerini görebilmek, ayırmak ve tanıyabilmek için çok sayıda boyama yöntemi vardır. Boyama yöntemleri ikiye ayrılabilir.

1. Basit boyama
2. Diferansiyel boyama

Basit boyamada tek bir boya kullanılır. Mikroorganizmaların morfolojik şekillerini ve dizilişlerinin görmek amacıyla yapılır.

Diferansiyel boyama ayırt edici ve yapıları incelemek amacıyla yapılır. İki farklı boya kullanılır.

PREPARAT HAZIRLAMA

Mikroorganizmaların boyanarak incelenebilmesi için öncelikle preparatların hazırlanması gerekmektedir. Hangi boyama yöntemi kullanılırsa kullanılsın preparat hazırlama üç aşamada gerçekleşir. Bunlar; incelenecek örneğin lam üzerine yayılması, tespit edilmesi ve boyanmasıdır.

Mikroorganizmaları incelemek için iki şekilde tespit yapılabilir. Bunlardan biri ısı ile yapılan fiziksel tesbittir. Diğeri ise etil alkol, metil alkol, alkol-eter karışımı, formalin, civa klorür, osmik asit gibi maddeler kullanılarak yapılan kimyasal tesbittir. Tesbit işlemi sıvı içindeki süspansiyon haldeki hücrelerin lama yapışmasını sağlar. Boyama sırasında tesbit işlemi yapılmamış hücreler ise yıkama işlemi ile uzaklaşırlar.

AMAÇ

Preparat hazırlamak

MATERYAL

1. **Kültürler:** Mikroorganizma kültürleri (18-24 saatlik)

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Streptococcus faecalis

Bacillus cereus

Micrococcus luteus

1. **Araç ve gereçler:** Lam, Bunzen beki, öze, kurutma kağıdı

İŞLEM

1. Temiz bir lam üzerine bir damla su koyunuz. Sıvı kültür kullanılıyorsa su damlası koymaya gerek yoktur.
2. Özenin ucunu alevde akkor haline gelinceye kadar tutunuz. Alevden fazla uzaklaştırmadan soğumasını bekleyiniz.
3. Özenin yardımıyla bakteri kültüründen bir parça alıp lamın ortasındaki su damlasında süspansiyon haline getiriniz. Sıvı kültür kullanılıyorsa bir veya iki öze dolusu kültür lam üzerine koyunuz.

4. Bu süspansiyonu lam üzerine ince bir tabaka halinde yayınız.
5. Preparatı havada kurumaya bırakınız. Preparatı kurutmak amacıyla asla üflemeyiniz ve havada sallamayınız.
6. Preparat kurduktan sonra lamın alt yüzünü 2-3 defa alevden geçirerek tesbit ediniz. Preparat boyanmaya hazır haldedir.

BASİT BOYAMA

BASİT BOYAMA

Mikroorganizmaların tek bir boya ile boyanmalarındır. Bu yöntemde tesbit edilmiş preparatın üzerine tek bir boya dökülerek belirli bir süre beklenir. Basit boyama yapılmış preparatlarda bütün hücreler aynı şekilde boyanmış olarak görülürler.

AMAÇ

Basit boyama yöntemi kullanılarak mikroorganizmaları incelemek

MATERYAL

1. **Kültürler:** Mikroorganizma kültürleri (18-24 saatlik)

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Streptococcus faecalis

Bacillus cereus

Micrococcus luteus

2. **Boyalarda:** Metilen mavisi, kristal viyole, karbol fuksin, safranin boya çözeltisi.

1. **Araç ve gereçler:** Mikroskop, lam, Bunzen beki, öze, kurutma kağıdı, ksilol.

İŞLEM

1. Usulüne uygun preparat hazırlayınız.
2. Preparatın üzerine boya çözeltisi dökünüz. Metilen mavisi 1-1.5 dakika, safranin veya karbol fuksin ile 30 saniye, kristal viyole ile 60 saniye muamele ediniz.
3. Bu sürenin sonunda boyayı uzaklaştırıp, preparatı su ile yıkayınız.
4. Preparatı kurutma kağıdı ile hafifçe kurulayınız.
5. Boyanan preparatları mikroskopta en az büyüten objektif ve immersiyon objektifi ile kontrol ederek değerlendiriniz.

GÖZLEM SONUÇLAR

1. Kullandığınız boyaya göre her mikroorganizma için gözlemlerinizi kaydediniz.

2. Görüntü alanının çeşitli yerlerindeki hücrelerin tek veya küme halindeki şekillerini her bir mikroorganizma için ayrı ayrı şekillerini çiziniz.

KONU İLE İLGİLİ SORULAR

1. Tesbit terimini açıklayınız?
2. Isı ile tesbiti niçin yaparız?
3. Bakterilerin boyanmasına neden gerek vardır?
4. Farklı boyalarla yaptığınız basit boyamalar hücre morfolojilerinin tesbitinde nasıl bir sonuç vermiştir?

NEGATİF BOYAMA

NEGATİF BOYAMA

Mikroorganizmaların büyüklüğünü ve şeklini daha iyi görmek için uygulanan boyama tekniğidir. İndirek boyama yöntemidir. Bu boyama yönteminde mikroorganizmalar değil zemin boyanır. Nigrosin veya eosin gibi asidik boyalar kullanılır. Boyanmış zemin üzerinde mikroorganizmalar açık olarak görülür. Negatif boyamda ısı ile fiksasyon işlemi yoktur, bu nedenle hücreler sarar görmez. Böylece doğal şekilleri ve büyüklükleri kolayca incelenebilir. Yine bu yöntemle boyanması güç olan bakterilerin incelenmesi mümkündür.

AMAÇ

Negatif boyama yöntemi kullanılarak mikroorganizmaların morfolojilerini incelemek

MATERYAL

1. **Kültürler:** Mikroorganizma kültürleri (18-24 saatlik)

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Streptococcus faecalis

Bacillus cereus

2. **Boyalar:** Nigrosin veya eosin boya çözeltisi., Çini mürekkebi

3. **Araç ve gereçler:** Mikroskop, lam, Bunzen beki, öze, kurutma kağıdı, ksilol.

İŞLEM

1. Temiz bir lamın bir tarafına bir damla nigrosin boya çözeltisinden koyunuz.
2. Bir öze dolusu mikroorganizma süspansyonu alarak boya ile iyice karıştırınız.
3. Karışımı diğer bir lamın kenarı ile üniform olacak şekilde dikkatlice yayınız.
4. Preparatı kurumaya bırakınız.
5. İmmersiyon objektifi ile preparatı inceleyiniz.

GÖZLEM SONUÇLAR

1. Her bir mikroorganizma için görünüş şekillerini çiziniz.

2. Farklı bakterilerin mikroskobik görünüşlerini tanımlayınız.

KONU İLE İLGİLİ SORULAR

1. Negatif boyama ile diğer boyama tekniği arasındaki fark nedir?
2. Bu boyama tekniğine niçin negatif boyama adı verilmektedir?
3. Negatif boyama için nigrosin yerine metilen mavisi kullanılabilir mi? Açıklayınız.

GRAM BOYAMA

GRAM BOYAMA

Gram boyama diferansiyel boyama tekniğidir. Bu boyama tekniğinde 4 farklı kimyasal reagent kullanılır. İlk boya ile hücre tamamen boyanır. Daha sonra dekolorize edici madde kullanıldığında bir kısım hücreler rengini verirken bir kısmı da rengini korur. Daha sonra birinci boyaya karşıt bir boya kullanılır. İlk boyanın rengin koruyan hücreler ikinci boyayı absorbe edemez ve mor menekşe renginde görülürler. İkinci boyayı alan hücreler ise kırmızı renkli görülürler. İkinci boyayı alan hücreler ise kırmızı renkli görülürler. Burada Gram'ın iyot çözeltisi mordan olarak iş görmektedir. Alkol ise dekolorize edicidir.

Gram negatif bakteriler kristal viyole rengini kaybederek, ikinci boya olan safraninin rengini alıp kırmızı renkli görülürler. Gram pozitif bakteriler ise kristal viyolenin rengini alır ve mor menekşe renkli görülürler.

AMAÇ

Bakterileri Gram pozitif ve Gram negatif olarak iki gruba ayırmak.

MATERYAL

1. **Kültürler:** Mikroorganizma kültürleri (18-24 saatlik)

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Bacillus cereus

2. **Boyalar:** Kristal viyole ve karbol fuksin boya çözeltisi, Gram'ın iyot çözeltisi, %96'lık alkol.

3. **Araç ve gereçler:** Mikroskop, lam, Bunzen beki, öze, kurutma kağıdı, ksilol, sedir yağı.

İŞLEM

- 18-24 saatlik kültürden lam üzerine alınız ve usulüne uygun preparat hazırlayınız.
- Preparatın üzerine kristal viyole boya çözeltisini dökünüz ve 1-1.5 dakika bekleyiniz.
- Boyayı dökerek su ile yıkayınız.

4. Bu sürenin sonunda boyayı dökünüz ve preparatın üzerine Gramın iyot çözeltisinden dökerek 1 dakika bekleyiniz.
5. Bu sürenin sonunda Gramın iyot çözeltisini dökünüz ve preparatı su ile yıkayınız.
6. Bundan sonra lamı %96'lık alkole batıp çıkararak 10-15 saniye alkol ile yıkayınız.
7. Lamı musluk sulu ile yıkayınız.
8. Lamın üzerine karbol fuksin boya çözeltisinden dökerek 20 saniye tutunuz.
9. Bu sürenin sonunda lamı su ile yıkayarak kurutunuz.
10. Boyanan preparatları mikroskopta en az büyüten objektif ve immersiyon objektifi ile kontrol ederek değerlendiriniz.

GÖZLEM SONUÇLAR

1. Her mikroorganizma için gözlemlerinizi kayediniz.
2. Görüntü alanının çeşitli yerlerindeki hücrelerin tek veya küme halindeki şekillerinin her mikroorganizma için ayrı ayrı şeklini çiziniz.

KONU İLE İLGİLİ SORULAR

1. Gram pozitif bakterilerde niçin kristal viyole tutulmaktadır?
2. Gram boyamanın mekanizmasını açıklayınız?
3. Boyamada kullanılan kimyasal reaktifler hangi amaçla kullanılmaktadır?

BAKTERİLERDE HAREKET

BAKTERİLERDE HAREKET

Bakteriler hareketli veya hareketsiz olabilir. Bakterilerde hareket aktif veya pasif olabilir. Aktif hareket, hareket organeli flagella ile sağlanmaktadır. Flagella bulunmayan bakterilere **atrik** denilmektedir. Hücrede bir tek flagellum varsa **monotrik**, flagellum hücrenin her iki ucunda ise **amfitrik**, hücrenin bir veya iki ucunda iki veya daha fazla ise **lofotrik**, hücrenin her tarafında ise **peritrik** adı verilir. Aktif hareket eden bakteri yer değiştirir.

Pasif hareket (Brownian hareketi) titreşim şeklinde kendini gösterir. Sıvı moleküllerinin bakteri üzerine yaptığı moleküler bombardıman ile açıklanabilir. Pasif harekette bakteri yer değiştirmez ancak titreşim hareketi yapar.

Bakterilerde flagellum bulunup bulunmadığı flagella boyama yöntemi ile ortaya konabileceği gibi bakterilerin hareket edip etmedikleri çeşitli yöntemlerle saptanabilmektedir. Bu yöntemlerden ikisi asılı damla ve yaş preparasyon yöntemidir. Asılı damla metodunda bakteri hareketi kolayca görülebilir.

Bu yöntem mikroorganizmaların gelişme safhalarını incelemek için kullanılabilir gibi, onların saf olarak elde edilmeleri için de kullanılabilir.

ASILI DAMLA YÖNTEMİ

Asılı damla metodunda bakteri hareketi kolayca görülebilir. Bu yöntem mikroorganizmaların gelişme safhalarını incelemek için kullanılabilir gibi, onların saf olarak elde edilmeleri için de kullanılabilir.

AMAÇ

Bakteri hareketini asılı damla yöntemi ile incelemek.

MATERYAL

1. **Kültürler:** Mikroorganizma kültürleri (48 saatlik)

Escherichia coli

Proteus vulgaris

Staphylococcus aureus

Bacillus cereus

Pseudomonas aeruginosa

- 2. Araç ve gereçler:** Mikroskop, lam, lamel, öze, kurutma kağıdı, ksilol, sedir yağı vazelin-parafin.

İŞLEM

1. Temiz bir lamelin ortasına bir damla bakteri süspansiyonu koyunuz.
2. Çukur lamı alevden geçirdikten sonra çukur kısmın etrafına vazelin-parafin karışımından sürünüz.
3. Lameli ters olmak üzere ve kültür süspansiyonu çukur kısmın ortasına gelecek şekilde lam üzerine kapatınız.
4. Yüksek büyütme güçlü objektifle damlacığın kenar kısmını inceleyiniz.

GÖZLEM VE SONUÇLAR:

1. Bakteri hareketini inceleyerek, hareket yönlerini gözlemleyerek çiziniz.

KONU İLE İLGİLİ SORULAR:

1. Brownian hareketi ne demektir?
2. Brownian hareketi ve gerçek hareket arasındaki farklılığı açıklayınız?

PROTOZOA

İNCELENMESİ

PROTOZOA İNCELENMESİ

Protozoa ya da Bir hücreliler; genellikle mikroskopik, bir hücreli ve ökaryotik canlıları içeren bir Protista altalemidir.

Tek hücreli olmalarına rağmen, çok hücrelilerde görülen yaşamsal işlevlerin birçoğunu yapabilirler. Bu nedenle eski zamanlarda vücut maddesi hücrelere ayrılmamış hayvanlar olarak kabul edilmiş ve "Hücresizler" adıyla anılmıştır.

Sitoplazmalarında bulunan özelleşmiş yapılara "organel" denilmekte, hareket, sindirim, boşaltım gibi hayatsal faaliyetlerini bunlarla sağlamaktadırlar. Çoğu bir çekirdekli, (Monoenergid), bir kısmı da her zaman çok çekirdek taşıyan (Polienergid) canlılardır. Bazıları ise yaşamlarının belli bir kısmında çok çekirdek taşırlar. Organel olarak; çekirdek, endoplazmik retikulum, ribozom, golgi aygıtı, mitokondri, lizozom, peroksizom, mikrotubuluslar ve filamentler bulundurulur. Hareket organelleri olarak yalancıayaklar, kamçılar, siller, sirlar ve tentaküller görülür. Beslenme şekillerinde ototrof, saprozoyik, parazitik, kommensal, mikсотrof ya da heterotrof beslenme görülür. Boşaltımda en belirgin özelliklerinden biri; ritmik olarak şişen ve küçülen vurgan (kontraktil) kofulların bulunmasıdır. Birçok denizel türde ve parazitlerde bu vurgan kofullar görülmez. Çoğalmalarında; eşeysiz olarak; boyuna bölünme, çoğa bölünme, enine bölünme, zırh oluşturduktan sonra ikiye bölünme, hücre dışı tomurcuk oluşturma ve hücre içi tomurcuk oluşturma görülür. Eşeyli çoğalmalarında; kaynaşma (hologami), merogami ve konjugasyon görülür. Tek olarak ya da koloni şeklinde yaşayan tek hücreli canlılardır. Bugüne kadar 60.000 kadar türü tanımlanmış ve bunların yaklaşık 1/4'ü parazit olarak bilinir.

AMAÇ

Su numunesinde protozoaları incelemek.

MATERYAL

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, damlalık.

İŞLEM

1. Temiz bir lam ortasına bir damla su numunesinden koyunuz.
2. Lameli lam üstüne kapatınız.
3. Mikroskopta inceleme yapınız.

KONU İLE İLGİLİ SORULAR:

1. Aktif çamurda bulunan protozoonlar hakkında bilgi veriniz.
2. İçme suyu olarak kullanılacak suda bulunabilecek protozoonlar hakkında bilgi veriniz

CANLI
MİKROORGANİZMA
SAYISININ
BELİRLENMESİ

CANLI MİKROORGANİZMA SAYISININ BELİRLENMESİ

Kültürel sayım yapılacak bir örneğin ml'sinde binlerce hatta milyonlarca mikroorganizma bulunabilir. Bu durum dikkate alınarak, genellikle incelenecek sıvı örneğin (örnek katı ve yarı katı ise homejanatın) uygun seri dilüsyonları hazırlanır. Dilüsyon hazırlama, mikrobiyolojik yönden incelemeye alınan orijinal örnek içindeki mikroorganizma sayısının belli oranlarda sulandırılarak (dilüe edilerek) daha aza indirilmesini amaçlayan bir işlemdir. Bu amaçla kullanılan sıvılara **dilüsyon sıvısı (dilüent)** denir.

Damıtık su, serum fizyolojik, ¼ kuvvetindeki Ringer çözeltisi, tamponlu fosfat dilüsyon sıvısı ile Nutrient broth gibi bazı sıvı besiyerleri en sık kullanılan dilüsyon sıvılarıdır. Dilüsyon sıvıları ekimler öncesinde hazırlanarak sterilize edilmelidir.

Dilüsyon hazırlarken dikkat edilecek en önemli konu, her aktarmada ayrı bir steril pipetin kullanılması ve aktarılacak örneğin, aktarmadan hemen önce kuvvetlice çalkalanarak homojen bir karışımın sağlanmasıdır. Bu amaçla, tüpler için bir tüp karıştırıcıdan yararlanılabilir. Karıştırma işleminden sonra, steril pipetle tüpteki örneğe girilir ve örnek 1-2 kere çekilerek bırakılır. Bırakma anında kesinlikle üflenmez.

AMAÇ

Bir kültürdeki canlı mikroorganizma sayısının belirlenmesi

MATERYAL:

1. **Kültürler:** Mikroorganizma kültürleri (48 saatlik)

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Bacillus cereus

Saccharomyces cerevisiae

2. **Besiyerleri:** Fizyolojik su, nutrient agar.

3. **Araç ve gereçler:** Steril petri kutusu ve tüpler, pipet, öze, bunzen beki, cam kalemi, etüv.

İŞLEM

1. İçerisinde 9 ml fizyolojik su bulunan 8 adet deney tüpü alınız.
2. Bu tüpleri 1 den 8'e kadar numaralandırınız.
3. Örnekten 1 ml alarak 1 numaralı tüpe ilave ediniz. Böylece birinci tüpteki seyreltme 1/10 oranında sulandırılmış olur.
4. Birinci tüpten 1 ml alarak, yine içerisinde 9 ml su bulunan transfer edilirse 1/100 oranında seyrelme sağlanır.
5. Bu işlemler 8 tüp için tekrarlayınız.
6. Daha sonra her dilüsyondan steril petrilere uygun miktarlarda koyunuz.
7. Her dilüsyon hazırlamada ayrı steril pipet kullanınız.
8. Petrilerin üzerine 45 °C'ye kadar soğutulmuş bulunan agarlı besiyerinden yaklaşık 15-20 ml dökülerek rotasyon hareketi ile mikroorganizmaların besiyeri içinde homojen dağılımını sağlayınız.
9. Petrileri donmaya bırakınız.
10. Petrileri ters çevirip etüvde 37 °C'de 24 saat inkübe ediniz.

GÖZLEM VE SONUÇLAR

İnkübasyon sonunda, 30-300 koloni içeren koloni içeren petri kutuları sayıma alınır. Genel olarak, yüzeyde gelişen koloniler daha büyük, agar içinde gelişenler ise daha küçüktür.

Sonuçlar aşağıdaki gibi hesaplanır:

Direk sayım sonucu X dilüsyon faktörü= sayı/ml

KONU İLE İLGİLİ SORULAR

1. Dilüsyon hazırlarken neden her seferinde ayrı bir pipet kullanılmalıdır?
2. Dilüsyon ve dilüsyon faktörü arasındaki farklılığı açıklayınız?
3. Kullandığımız besiyerinde üremeyen mikroorganizma var mıdır? Varsa neden ürememiştir?
4. Kültürel sayımda kaç koloniden fazla ve kaç koloniden az plakalar sayılmaz? Neden?

SAF KÜLTÜR ELDE ETME YÖNTEMİ

SAF KÜLTÜR ELDE ETME YÖNTEMİ

Mikroorganizmalar doğada yaygın olarak bulunurlar. Toprakta, suda, kanalizasyonda, havada, besinlerde ve vücut yüzeyinde. Karışık halde bulunan mikroorganizmaların incelenmesi için bunların saf kültürlerinin elde edilmesi gerekmektedir. Besi ortamlarında üretilen mikroorganizmaların tümüne kültür adı verilir. Ekim yapılan besi ortamları uygun koşullar altında bekletilirse mikroorganizmalar ürerler. Birden fazla bakteri türünün ürediği kültüre karışık kültür adı verilir. Yalnız bir kültür mikroorganizmanın üretilmesiyle elde edilen kültüre saf kültür adı verilir. Mikroorganizmaların incelenmesi için saf kültürlere gereksinim vardır. Kültür ortamları katı, yarı katı ve sıvı olabilir. Katı besiyerleri tüpte veya petri kutusunda olabilir. Tüpte besiyeri dik veya yatık olabilir.

Mikroorganizmaların kültürel morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve tanımlanması (identifikasyon) için saf kültürlere gereksinim vardır. Bir mikroorganizmanın saf halde elde edilmesi işlemine izolasyon adı verilmektedir. Bu amaçla çok çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Burada sadece sürme yöntemi verilecektir. Katı besi yeri daha önceden hazırlanarak petri kutularına dökülür ve katılaşması beklenir. Katılaşma olduktan sonra karışık kültürden öze ile agar üzerine sürülür. Kolonilerin tek tek düşmesi sağlanır.

AMAÇ

Çizgi ekimi metodu ile karışık kültürden saf kültür elde edilmesi.

MATERYAL:

4. **Kültürler:** Mikroorganizma kültürleri (48 saatlik)

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Bacillus cereus

Saccharomyces cerevisiae

5. **Besiyerleri:** Fizyolojik su, nutrient agar.

6. **Araç ve gereçler:** Steril petri kutusu ve tüpler, pipet, öze, bunzen beki, cam kalemi, etüv.

İŞLEM

1. Karışık kültürden bir öze dolusu alarak petri kutusundaki besi yeri üzerine bir birine paralel 3-4 çizgi çiziniz.
2. Özeyi alevde steril ederek, petri kutusundaki besi yerinin kenara yakın bir yerine dokundurarak soğutunuz.
3. Petri kutusunu 90 derece çevirerek önceden çizmiş olduğunuz çizgilere dik olacak şekilde 3-4 paralel çizgi çiziniz.
4. Özeyi alevde steril ederek, petri kutusundaki besi yerinin kenara yakın bir yerine dokundurarak soğutunuz.
5. Petri kutusunu 90 derece çevirerek önceden çizmiş olduğunuz çizgilere dik olacak şekilde 3-4 paralel çizgi çiziniz.
6. Özeyi alevde steril ederek, petri kutusundaki besi yerinin kenara yakın bir yerine dokundurarak soğutunuz.
7. Petri kutusunu 90 derece çevirerek önceden çizmiş olduğunuz çizgilere dik olacak şekilde 3-4 paralel çizgi çiziniz.

GÖZLEM VE SONUÇLAR

1. Petri kutularını inceleyerek görüntüyü çiziniz.
2. Petri kutusundaki farklı özellikte tek tek düşmüş koloniler var mı?

KONU İLE İLGİLİ SORULAR

1. Aşağıdaki terimleri açıklayınız;
Koloni, saf kültür, karışık kültür, izolasyon, identifikasyon.
2. Saf kültür ne işe yarar?

SAF KÜLTÜRLERİN İZOLASYONU

SAF KÜLTÜRLERİN İZOLASYONU

Petri kutusundaki agar üzerine tek tek düşen koloniler steril öze yardımı ile alınıp, içinde yatık nutrient agar bulunan tüplere transfer edilir. Bu kültürlere de **stok kültür** adı verilir. Daha sonraki çalışmalarda bu stok kültürden yararlanılır.

AMAÇ

Saf kültürün izole edilmesi.

MATERYAL

1. **Kültürler:** Bir önceki çalışmada zerinde tek koloni bulunan plaklar.
2. **Besiyerleri:** Yatık nutrient agar tüpleri.
3. **Araç ve gereçler:** Öze, bunzen beki, cam kalemi, etüv.

İŞLEM

1. Tüpleri numaralandırınız.
2. Aseptik şartlar altında farklı özellik gösteren tek kolonileri ayrı ayrı yatık agar tüplerine aktarınız.
3. Kültürleri 25 °C'de 48-72 saat inkübe ediniz.

GÖZLEM VE SONUÇLAR

1. Yatık agar tüplerinde gelişen kültürlere gram boyama yaparak saflık kontrolü yapınız.
2. Kültürlerin isimlendirilmesini yapınız.

KONU İLE İLGİLİ SORULAR

1. Kültürlerin saflık kontrolü nasıl yapılır?

KÜFLER
VE
MAYALAR

KÜFLER VE MAYALAR

Funguslar (çoğulu fungi), farklı özelliklere sahip ökaryotik organizmalardan oluşmuş taksonomik bir gruptur. Küfler, miselyum oluşturan çok hücreli funguslardır. Fungusların diğer bir üyesi olan mayalar ise, tek hücrelidirler ve genelde miselyum oluşturmamalarıyla karakterize edilirler.

KÜFLER

Küfler, doğada hemen her yere yayılmış olan, filamentli (uzantılı ve çok hücreli funguslardır. Küf hücreleri ard arda dizilerek, hif adı verilen hücre iplikçiklerini (uzantılarını) oluştururlar. Hifler çeşitli dallanma ve budaklanmalar yaparak, karmaşık bir hif topluluğu oluşturacak şekilde bir araya gelirler. Bu hif topluluklarına **miselyum** (mycelium=tekil, mycelia=çoğul) denilmektedir. Besiyeri yüzeyine, temas edecek şekilde paralel olarak uzanan veya besiyeri içine giren hiflere **vegetatif hif** ya da **beslenme hifi**, besiyerinin üstünde kalan ve çoğunlukla küflerin üreme organelleri olan sporları taşıyan hiflere ise **förtlil (fertile) (reproductive) hif** ya da **hava hifi** adı verilmektedir. Bazı hiflerde enine bölmeler (septa) bulunmaktadır. Böyle hiflere **septalı**, enine bölmelere ayrılmamış hiflere (düz) ise **septasız hifler** adı verilmektedir.

MAYALAR

Mayalar tek hücrelidirler ve genellikle yuvarlak, oval veya silindirik bir hücre morfolojisine sahiptirler. Bir kısım maya ise limon (apiculate) ya da şişe şeklindedir. Her mayanın kendisine özgü bir hücre morfolojisi vardır. Ancak saf bir maya kültüründe bile, üreme koşullarına veya kültür yaşına bağlı olarak, farklı şekil ve boyutlarda maya hücrelerine rastlanabilmektedir. Maya hücreleri, bakteri hücrelerinden 2-10 kat daha büyüktürler.

AMAÇ

Küf ve mayaların morfolojilerinin incelenmesi.

MATERYAL

1.Besiyeri: Potato Dektroz agar dökülmüş petri kutuları (PDA)

2. Araç ve gereçler: Bunzen beki, transfer iğnesi, lam, lamel, boya çözeltileri, mikroskop.

İŞLEM

1. Besiyeri dökülmüş petri kutularının kapaklarını açıp laboratuvarın çeşitli yerlerine koyunuz.
2. Kapakları açık halde 15 dakika bekleyiniz.
3. Petri kutularını küf ve mayaların gelişmesi için 1 hafta oda sıcaklığında inkübe ediniz.

Küflerin Mikroskopik Morfolojisi:

1. Temiz lamın üzerine 1-2 damla laktofenol veya laktofenol blue çözeltisi damlatınız.
2. İncelenecek küf kültüründen transfer iğnesi ile örnek alınarak, lamdaki boya çözeltisi üzerine dikkatlice ve bastırmadan yayınız.
3. Örneği besiyerinden kazıyarak ya da yapılabılırsa kültüre zarar vermeden küçük bir parça besiyeri (1-2 mm çapında) ile birlikte alınız.
4. Örnek alınırken, küf sporlarının etrafa saçılacağı gereksiz hareketlerden kaçınınız ve petri kutusu kapağını açık bırakmayınız.
5. Örneğin üzerini lamel ile kapatınız. Lam ile lamel arasında hava kabarcığı kalmamasına özen gösteriniz. Eğer hava kabarcığı varsa bir kurutma kağıdı ile sıvıyı çektilirerek hava kabarcığını yok ediniz.
6. Mikroskopta inceleyip, çiziminizi yapınız.

Mayaların Mikroskopik Morfolojisi:

1. Temiz lamın üzerine 1-2 damla Löffler'in metilen mavisi çözeltisi damlatınız.
2. İncelenecek maya kültüründen öze ile örnek alınarak, lamdaki boya çözeltisi içinde ezdiriniz..
3. Örneğin üzerini lamel ile kapatınız. Lam ile lamel arasında hava kabarcığı kalmamasına özen gösteriniz. Eğer hava kabarcığı varsa bir kurutma kağıdı ile sıvıyı çektilirerek hava kabarcığını yok ediniz.
4. Mikroskopta inceleyip, çiziminizi yapınız.

KONU İLE İLGİLİ SORULAR

1. Çevre Mühendisliğinde kullanılan 3 adet küf hakkında bilgi veriniz.
2. Biyoteknolojide kullanılan mayalar hakkında bilgi veriniz.

SU MİKROBİYOLOJİSİ

SUYUN MİKROBİYOLOJİK İNCELENMESİ

Suların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesinde güvenilir sonuçlara ulaşılması için su örneklerinin tekniğine uygun bir şekilde alınması ve saklanması gerekir. Su örneği alınırken dikkat edilmesi gereken en önemli hususlar şunlardır:

- a) Örnek, tanımlanmış bir biyotop kısmından olmalı, yani temsilci bir örnek olmalıdır.
- b) Örneğe yabancı madde veya organizma karıştırılmamalıdır.
- c) Örnek, mümkün olduğunca hiç bir değişikliğe uğratılmadan analiz edilmelidir.

Örnek almanın detayları, amaç ve şartlara göre değişir. Bu hususta uluslar arası geçerlilikte bir kural yoktur. Bazen örnekleri birleştirmek yerine ayrı ayrı analizlerini yapmak çok daha faydalı olabilir. Örnekte sıcaklık değişimi gaz kaybına (H_2S, CO_2, O_2) sebep olduğundan , sıcaklık, pH, çözülmüş gazlar mutlaka örneğin alındığı yerde ölçülmelidir. örnekte bir değişikliğe sebep olmadığı takdirde amaca uygun bir koruyucu madde konulabilir. Örnek alındığında hemen yapılması gereken çözülmüş oksijen tayini için özel şişeler bulunur. 200-300 ml' lik bu şişelere, örneğin 4-8 saat muhafaza edilebilmesi için 0,7 ml. derişik sülfürik asit ve 1 ml. Sodyum azotür ($2g NaN_3, 100 ml. Damıtık suda$) ilave edilir. Biyokimyasal O_2 ihtiyacının belirlenmesi için alınan örneklere hiçbir zaman koruyucu madde katılmamalıdır. Bu amaçla alınan birleşik veya tek örnekler 3-4°C te muhafaza edilmelidir.

Sulardan bakteriyolojik muayene için su alma suyun şekline ve yerine, akış ve duruş tarzına göre olacaktır.

- a) Çeşmeden örnek alma : Çeşmeden örnek alınması için önce musluk alev ile sterilize edilir. Yarım saat kadar akıtıldıktan sonra klorlu su ise tiyosülfat içeren, klorsuz ise steril şişelere örnek doldurulur.
- b) Kuyudan Örnek alma : Kuyu suyu sabit karakterde olduğundan temsil örneğinin bileşik örnek şeklinde olmasına gerek yoktur. Şişeyi kuyuya sallandırdığımız ip steril olmalıdır ve ip kuyunun dışında şişenin boğazına bağlanır. İpin bir ucu elde iken şişe kuyuya atılır. Ayrı bir kağıttaki steril şişe kapağı, şişe dışarı çekilir çekilmez süratle şişenin ağzına takılır.
- c) Göllerden Örnek alma : Kıyıdan en az 15-20 m. uzaklıktan ve gölün suyunu temsil eden bir yerinden örnek alınmalıdır.

d) Akarsudan Örnek alma : Akarsular büyük değişikliklerin etkisi altında bulunduğundan bileşik örneklerin analizini veya tek tek örneklerin analizlerinin ortalamasının alınmasını gerektirebilir. Kıyıdan uzak, akıntının ortasından örnek alınmalıdır.

e)Yüzme havuzundan Örnek alma : Örnek, havuzun en çok kullanıldığı zamanda kıyıdan ve derinden tiyosülfatlı şişeler içine alınmalıdır.

f) Tulumbası olan kuyulardan Örnek alma : Önce 10 dk kadar işletilerek su akıtılır. Sonra bilinen yöntemle su alınır. Ancak belirli bir hastalık etkeni, örneğin, tifoya neden olan mikroorganizma aranacak ise, örnek ilk gelen sudan alınmalıdır.

g) Su arıtma tesislerinden örnek alma : Su arıtma tesislerinden birleşik veya tek tek örnekler ünitenin değişik bölgelerinden değişik zamanlarda alınmalıdır. Böylece kimyasal madde ihtiyacı ve temizlenme derecesi belirlenmiş olur.

Örneklerin alınmasıyla analizleri için laboratuvara ulaştırılması arasında geçen süre uzarsa suyun kalitesinde birtakım değişiklikler meydana gelir. Örneklerin bulunduğu şişeler, içinde odun talaşı ile karışık buz parçaları bulunan teneke kutularda taşınırsa bu değişiklikler mümkün mertebe azalır. Örneklerin alındığı cam şişeler sudaki bazı katyonları iyon değişimi veya adsorbsiyonla kaybedebilir. Ayrıca camın bileşimindeki sodyum, silikat ve bor örneği geçebilir. Doğal sulardan alınmış örneklerde çeşitli mikroorganizma gruplarına rastlamak mümkündür, özellikle içme ve banyo sularında hastalık yapıcı olanlarının bulunması ihtimali üzerinde durularak *Enterobacter,aceae*, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *E. coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. Cholerae*, *Leptospira icterohemorrhagie*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium perfringens*, kaynağı dışkı olmayan çeşitli türleri *Streptococcus*, *Staphylococcus* ve *Neisseria* türleri aranır.

Bir su örneğinden aşılana ve özel şartlarda inkübe edilen ortam, toplam mikrobiyal popülasyonun yalnızca bir kısmını gösterir. Bu nedenle, farklı mikrobiyal tiplerin izolasyonu ve sayımında farklı teknikler uygulanır.

1. Toplam Bakteri Sayımı

Seyreltme Plaka Yöntemi

- Bir su örneğinden steril petrilere 1.0 ve 0,1 ml/ lik miktarlarda koyunuz. Üzerine 45 °C ye kadar soğutulmuş Nutrient Ağar ilave ediniz.
- Petrilere 8 hareketi yaptırdıktan sonra donmaya bırakınız.
- Petrilere 35 ° C de 24 saat inkübe ettikten sonra oluşan kolonileri sayınız.

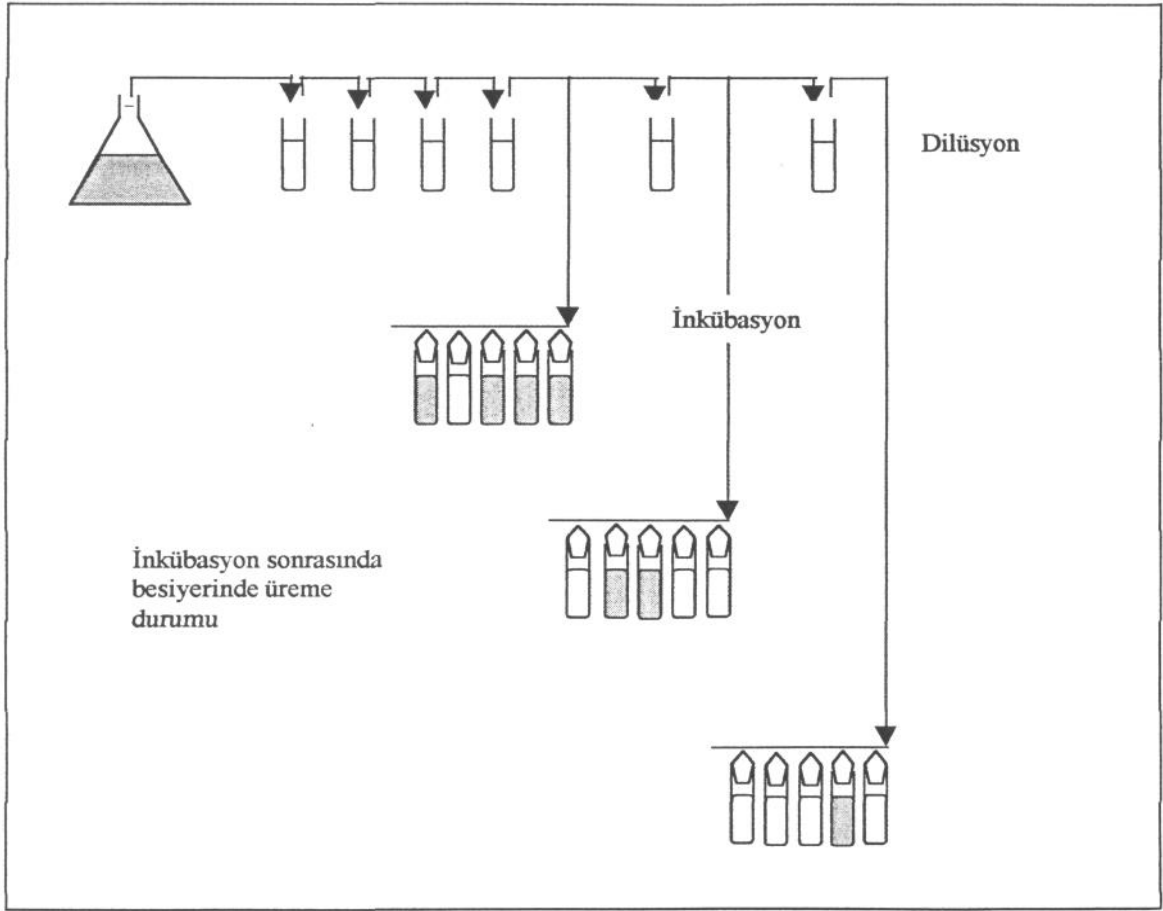
2. Kolorimetri

Bu işlem koliformların (Koliform bakteri terimi içine; aerobik ve fakültatif anaerobik, Gram (-), spor oluşturmeyen ve 35 ° C' de 48 saatlik inkübasyon sonunda laktozdan asit ve gaz oluşturan tüm basiller girmektedir. Örneğin; *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* türleri) ve sayılarının belirlenmesidir.

2.1 Kantitatif analiz

Bu analizde başlıca üç yöntem kullanılır. Bunlardan birincisi, uygun bir besiyeri kullanılarak seyreltme plaka tekniğinin uygulanmasıdır, ikinci yöntem ise membran filtre tekniği' dir. Sudaki toplam aerobik bakteri sayısını belirlemeye yönelik olarak kullanılan bu yöntem, laktoz içeren bir besiyeri kullanılarak uygulanırsa koliform bakterilerin sayısını belirlemek amacı ile de kullanılabilir.

Kantitatif analiz için en yaygın kullanılan teknik ise MPN (Most Probable Number) veya EMS (En Muhtemel Sayı) olarak bilinen tekniktir. EMS yöntemi genellikle aynı dilüsyondan 1' den fazla (genellikle 3 veya 5) tüp kullanılarak gerçekleştirilir. Aynı dilüsyondan yapılan paralel ekim sayısı arttıkça, istatistiksel olarak daha doğru sonuçlar alınacaktır. Aynı dilüsyondan yapılan paralel ekim sayısı sonsuza ulaştığında ise sayım sonucu kesinleşir.



Şekil. 1.1 5 tüp kullanılarak EMS yönteminin uygulanması (Gürgün ve Halkman, 1988' dan)

Çeşitli mikrobiyoloji kitaplarında farklı şekillerde düzenlenmiş EMS tablolarına rastlanılmaktadır.

Olasılık Testi:

- Aynı su örneğinden tek kuvvetli Lauril Triptoz Broth tüplerinden üç tanesine 1 ml., üç tanesine 0,1 ml., çift kuvvetli Lauril Triptoz Broth tüplerinden üç tanesine 10 ml. aşılınız.
- Bütün tüpleri 35 °C de 48 saat inkübe ediniz.
- İnkübasyondan sonra bulanıklık, renk değişimi, ve durham tüplerinde gaz birikimi özelliklerine sahip olan tüpleri “pozitif” değer olarak kaydediniz. Bu özelliğe sahip olmayan tüpleri ise “negatif” olarak kabul ediniz.
- 0.1, 1 ve 10 ml ekim yaptığınız tüpler için elde ettiğiniz pozitif ve negatif değerleri yanyana yazınız, örneğin, 0.1 ml için +-- , 1 ml için ++-, 10 ml için +++ değerleri gibi.

- Elinizdeki pozitif ve negatif değerleri kullanarak, ilişikte sunulan EMS Tablosundan su örneğinizin 100 mililitresindeki koliform bakteri sayısını belirleyiniz.

Onaylama Testi:

- Renk değişimi ve gaz birikimi gözlediğiniz tüplerin birinden Eosin Metilen Blue (EMB) Ağar içeren petrilere çizgi ekim yapınız.
- Petrileri 35  C de 24 saat inkübe ettikten sonra beliren kolonileri inceleyiniz.(*E. coli*, yansıtılmış ışıkta yeşilimsi metelik parlaklıkta, direkt ışıkta mavimsi siyah görünümde koloniler oluşturur. *E. aerogenes* oğunlukla mukoid, konveks ve kahverengimsi koloniler oluşturur.)

Tamamlama Testi:

A.

- EMB Ağarda belirlediğiniz tipik koliform kolonilerden bir adet Laktoz Broth tüpüne ve bir adet eğik Nutrient Ağar tüpüne (aynı koloniden olmak koşuluyla) aşılayınız.
- Tüpleri 35  C de 24-48 saat inkübe ediniz
- Inkübasyon sonucunda Laktoz Broth tüplerinde gaz oluşumunu kaydediniz. Nutrient Ağar kültüründen Gram boyama yapınız.

B.

- Gram negatif çubukların gözlendiği Nutrient Ağar kltrlerinden ve *E.coli*, *E. aerogenes* kltrlerinden İMVİC testlerini uygulayınız.
- Bu amaçla Indol Testi için Trypton Broth, Metil Red ve Voges Proskouer Testleri için MR-VP Broth ve Sitrat testi için Simon's Sitrat Agar tüplerine aşılama yapınız.
- Tüpleri 35  C de 24-48 saat inkübe ediniz.
- Inkübasyon süresi sonunda kltrlerin İMVİC testlerini uygun ayıraçlar yardımıyla gerçekleştiriniz.

Su örneğinizde *E. coli* olup olmadığını elinizdeki verileri aşağıdaki tabloda belirtilen özellikler ile karşılaştırarak belirleyiniz.

Tablo. 1.1. Suyun mikrobiyolojik analizinde aranan koliformların bazı biyokimyasal özellikleri (+;Olumlu, -; Olumsuz, d; Türe göre değişebilen sonuçları ifade eder.) (Tamer,1988' den)

	Laktoz	Glukoz	H ₂ S	Indol	Metil red	Asetoin	Sitat	Hareket
<i>E. coli</i>	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Citobacter</i>	+	+	d	-	+	-	+	+
<i>Klebsiella</i>	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>Enterobacter</i>	+	+	-	-	-	+	+	+

KONU İLE İLGİLİ SORULAR

1. İçme suyu ve kullanma suyunda bulunması gereken toplam bakteri, toplam koliform değerleri hakkında bilgi veriniz.
2. Su numunenizden elde ettiğiniz sonuç değerleri ve bakteri tiplerini yorumlayınız.