

VET 206
GENEL MİKROBİYOLOJİ
UYGULAMA KİTAPÇIĞI



2021

Uygulamanın adı	Biyogüvenlik uygulamaları, Mikrobiyoloji laboratuvarının tanıtımı, laboratuvarda çalışma prensipleri, laboratuvar kazaları ve önlenmesi hakkında bilgilendirme
Yapılacağı hafta	1
Uygulamanın temel hedefi	Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışmanın esaslarının öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Ekipmanlar tanıtılacaktır. (Otoklav, Hassas Terazi, Sterilizatör, Soğutmalı İnkübatör, Su Banyosu, Mikrodalga Fırın, Anaerobik İnkübatör, Mikroskop, Terazi, Vorteks, Karıştırıcı, UV Lamba, Mekanik Çalkalayıcı, Kabinli UV Lamba, İnkübatör, pH Metre, Buzdolabı, Deney Tüpü, Tüpspor, Erlen, Mezür, Pipet, Otomatik Pipet)
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan başlıca ekipmanlar şunlardır: Otoklav, Hassas Terazi, Sterilizatör, Soğutmalı İnkübatör, Su Banyosu, Mikrodalga Fırın, Anaerobik İnkübatör, Mikroskop, Terazi, Vorteks, Karıştırıcı, UV Lamba, Mekanik Çalkalayıcı, Kabinli UV Lamba, İnkübatör, pH Metre, Buzdolabı, Deney Tüpü, Tüpspor, Erlen, Mezür, Pipet, Otomatik Pipet, Distile Su Cihazı, Santrifüj, Mikrosantrifüj, Desikatör

Bakteriyoloji laboratuvarında çalışanların bakteriyi etrafa yaymamak, kendilerine ve laboratuvarında çalışanlara enfeksiyonu bulaştırmamak, saf kültürleri ve besiyerlerini kontamine etmemek için çok dikkatli ve temiz çalışmaları gereklidir. Bunun için de yetişmiş elemana ihtiyaç vardır. Küçük bir dikkatsizlik ölümler son bulabilir, hastalanmalara veya kazalara yol açabilmektedir. Bunun çeşitli örnekleri de vardır.

Laboratuvarlarda çalışırken başlıca dikkat edilmesi gereken önemli noktalar aşağıda belirtilmiştir:

- 1- Laboratuvara çamurlu veya tozlu ayakkabı ile girilmemeli, mümkünse ayakkabılar temizlenmeli veya dışarıda bırakılmalı ve temiz bir ayakkabı giyilmelidir.
- 2- Laboratuvara girerken beyaz (veya diğer renkte) bir gömlek giyilmeli, çalışma bittikten sonra da çıkarılmalı ve laboratuvarında özel yerine asılmalıdır. Gömlek dışarı götürülmelidir.
- 3- Laboratuvara palto, kitap, defter, vs. ile girilmemelidir.
- 4- Laboratuvara yemek getirmek, yemek yemek, sakız ve çiklet çiğnemek, ısıklık çalmak, sesli konuşmak, şarkı söylemek yasaktır. Çay ve sigara da içilmemelidir.
- 5- Laboratuvar masalarının üzerine oturulmamalıdır.
- 6- Laboratuvara ziyaretçi sokulmamalıdır. Eğer zorunluluk varsa, ayakkabılarının üzerine plastik steril galoş geçirilmeli ve onunla laboratuvara girilmelidir.
- 7- Çalışma masalarının üzeri, çalışmaya başlamadan önce ve çalışma bittikten sonra dezenfektan bir madde ile silinmelidir (%0.5 formol, %5 lizol, vs.).
- 8- Çalışma masasının üzerinde, lüzumlu malzemeden başka eşya bulundurmamalıdır.
- 9- Çalışırken elleri ağza, buruna, yüze veya göze sürmemeli ve kalem, kağıt, iplik, etiket vs. ağza götürülmemelidir.
- 10- Mikroplu tüp veya petri kutularını açık olarak masa üzerine bırakmamalıdır.
- 11- Gömlek ceplerine sıvı veya katı kültür ihtiva eden tüp veya petri kutusu koymamalıdır.
- 12- Ekim yaparken veya çalışırken pencereler kapalı olmalı, konuşmamalı, lüzumsuz

el-kol hareketleri yapmamalıdır.

13- Etrafa mikroplu bir madde saçılınca veya kültür tüpleri kırılınca üzeri, dezenfektan bir maddeye batırılmış pamukla örtülmeli ve uygun bir etki süresinden sonra toplanarak alınmalıdır. Böyle durumlarda laboratuvar yetkililerine hemen haber verilmelidir.

14- Çalışma bittikten sonra kirlenen tüp, pipet, vs. kendilerine ait kaplara konulmalıdır.

15- Kullanılan lâm ve lâmeller, içinde dezenfektan bir madde bulunan özel kaplara veya kavanozlara konulmalıdır.

16- Öze veya iğneleri kullanmadan önce iyice sterilize etmeli (yakmalı), soğuduktan sonra kullanmalı ve tekrar yaktıktan sonra yerine koymalıdır.

17- Çalışma bittikten sonra eller önce sabunlu su ile yıkanmalı ve sonra dezenfektan bir madde ile dezenfekte edilmelidir.

18- Pipetlerin steril olması ve ağıza gelen kısmında pamuk bulunması gereklidir. Pamuksuz olanlar, kağıt sargısından ucu dışarı çıkanlar ve kağıt sargısı açık olan pipetler kullanılmamalıdır. En iyisi manuel çalışan (yarı otomatik) pipetler tercih edilmelidir.

19- Pipetle tehlikeli sıvı çekerken pamuğa kadar çekilmemeli ve arada 6-7 cm. lik bir güven boşluğu bırakılmalıdır.

20- Sterilitesinden şüphe edilen bir malzeme kullanılmamalıdır.

21- İnfekte bir materyali havanda ezerken, başlık, gözlük, burun maskesi ve eldiven kullanılmalıdır.

22- Laboratuvarlarda kullanılan malzeme ve maddelerin kırılmasına, bozulmasına meydan verilmemelidir.

23- Mikroskop, pH metre, terazi, su banyosu, santrifüj vs. gibi lüzumlu ve hergün kullanılabilecek malzeme çok dikkatlice kullanılmalı, kullanılmadan önce ve sonra temizlenmelidir.

24- Etüv, buzdolabı ve dipfirize konacak tüp, petri kutusu, vs. malzemenin üzeri okunacak şekilde yazılmalı veya etiketlenmelidir. Silinmiş olanlar çıkarılmalıdır.

25- Laboratuvarlardan ayrılırken gömlek, başlık, maske ve eldiven çıkarılır. Eldivenler dezenfektan içine konur ve diğerleri sterilizasyon için kendilerine ait yerlere asılırlar veya bırakılırlar.

26- Laboratuvarlarda sinek veya böcek bulunmamalı ve yok edilmelidir. Mikrop taşıyarak tehlikeli olabilirler.

27- Çalışma bittikten sonra her şey yerine konur. Havagazı, elektrik, su ve vakum muslukları kapatılır ve iyice kapatılmış olduğuna da dikkat edilir.

28- Çalışırken dağınık olmamalı, temiz, derli-toplu ve bilinçli olmalı ve aseptik koşullara azami derecede riayet edilmelidir.

29- Çalışma programı bir gün önceden veya Laboratuvara girmeden önce hazırlanmalıdır.

30- Laboratuvarlardan dışarı herhangi bir tehlikeli kültür veya materyal çıkarılmamalıdır.

31- Kullanılmış kağıt, pamuk, vs. kendine ait özel kutulara bırakılmalıdır.

32- Yapılan bütün çalışmaların kayıtları doğru ve zamanında tutulmalıdır.

33- Laboratuvar havası tozsuz olmalıdır.

34- Çalışmanın özelliğine göre "steril kabinet" kullanılmalıdır.



Besiyerine svap ile ekim yapılması



Steril kabin (Klas II)



Deney tüpü



Otoklav



Hassas Terazı



İnkubator



Desikatör



Santrifüj



Tüpspor

Uygulamanın adı	Sterilizasyon, dezenfeksiyon, antisepsi ve uygulama yöntemleri
Yapılacağı hafta	2
Uygulamanın temel hedefi	Sterilizasyon, dezenfeksiyon, antisepsi ve uygulama yöntemlerinin öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Otoklav, % 96'lık alkol, Zefiran, Pamuk, UV lamba
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ
Sterilizasyon yöntemleri A- Isı ile sterilizasyon I. Nemli ısı ile sterilizasyon a. Buharla sterilizasyon b. Sıcak su ile sterilizasyon II. Kuru sıcak hava ile sterilizasyon III. Yakma ve alevle sterilizasyon B. Süzme ile sterilizasyon C. Kimyasal maddelerle sterilizasyon Ç. Işınlendirme ile sterilizasyon <u>Buharla Sterilizasyon</u> *Basıncılı buharla -otoklav *Basıncısız buharla -Koch kazanı <u>Sıcak su ile sterilizasyon</u> * kaynatma ile * Tindalizasyon -benmari <u>Pastörizasyon</u> <u>UHT sterilizasyon</u> <u>Işınlama</u> Isı; proteinleri koagüle eder Isı ile sterilizasyonu etkileyecek faktörler: *Isı derecesi *Süre *Mikroorganizmanın cinsi *Mikroorganizmanın bulunduğu üreme dönemi * Nem oranı *Mikroorganizmanın içerdiği su miktarı *Ortamın pH derecesi *Ortamın ozmotik basıncı *Ortamdaki organik madde miktarı <u>Basıncılı buharlı sterilizasyon-Otoklav</u> *Doymuş buharla *Basınc altında *Yüksek derecede sterilizasyon

Deniz seviyesinde su buharının ısı 100 derecedir.
1 atmosfer basıncında (1 kg/cm²) 120-121 derece
* 121 derecede 15-45 dakikada sterilizasyon sağlanır
*134 derecede 3-4 dakika

Basıncsız buharla-akım halindeki buharla-Koch kazanı

Buhar ısını içindeki cisme verir
*60 dakikada sterilizasyon sağlanır

Kaynatma

*Deniz seviyesinde su 100 derecede kaynar
*5-10 dakikada vejetatif şekiller ve bazı bakteri sporları ölür Dezenfeksiyon

*30 dakika kaynatmak-sterilizasyon
*Kaynatma distile su ile tüm malzemeyi kaplayacak şekilde yapılmalı
Tindalizasyon- fraksiyone ısıtma-Benmari

*56-70 derece 3 gün ardışık 1 saat uygulanır
*Bakterilerin vejetatif şekilleri ilk gün ölür
*2. Ve 3. Günlerde sporlu bakteriler açılarak ölür
*Sterilize edilecek malzeme suyun içerisinde olmalıdır.

Ultra High Temperature-UHT
*135-150 derecelik levhalardan 3-4 saniyede tutma
*Ani olarak 20 dereceye düşürme

* Sütün sterilizasyonunda kullanılır
*Bütün vejetatif mikroorganizmalar ve az dayanıklı sporlar ölür.

Yakma -alevden geçirme
* İğne, öze gibi araçların akkor haline kadar ısıtılması

*Lam, lamel, cam balon, tüplerin alevden geçirilmesi

Kuru sıcak hava- Pasteur fırını

*Tüp, balon, pipet, cam malzeme, madeni eşya,
*toz halindeki maddeler, yağlar

170 derecede 1 saat
160 derecede 2 saat
150 derecede 3 saat

Sterilizasyonun kontrolü

*Maksimal termometre
*Sticker ve Browne tüpleri
*Kimyasal madde emdirilmiş kağıt indikatörler
*Isıya dirençli bakteri sporları

Süzme ile sterilizasyon (filtrasyon)

*Berkefeld- buji şeklinde sıkıştırılmış silisyumlu diatom toprağı
*Pasteur, Chamberland- sırsız porselen

*Seitz- disk şeklinde sıkıştırılmış asbest

*Cam tozu yada liflerinden

Mikrofiltreler-kollodyum, sellüloz esterleri, polivinil

Işınlama

* Ultraviyole

Direkt etki ile DNA ve RNA transkripsiyonu ve replikasyonunda hata

İndirekt etki ile organik maddelerde değişiklik

-200-300 nm dalga boyu- hava ve yüzey dezenfeksiyonu için kullanılır

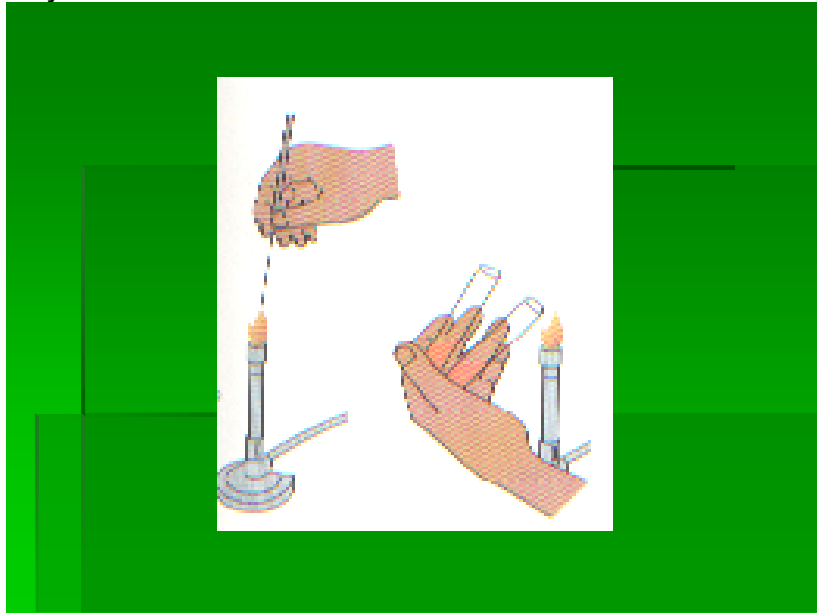
-240-280 (253.7 nm) mikroorganizmalara en etkin

UV kaynağı-Civa buharlı lambalar

*X, gama , beta ışınları

-iyonize edici ışınlardır

-besin, ilaç sanaysinde kullanılır



Alevde sterilizasyon



Filtrasyonda kullanılan malzemeler

Uygulamanın adı	Mikroskoplar ve mikroskopi prensipleri
Yapılacağı hafta	3
Uygulamanın temel hedefi	Mikroskoplar ve uygulama yöntemlerinin öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Işık mikroskobu
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ
Mikros: Küçük Skopein: İnceleme Mikroskobun bölümleri Mekanik kısım Aydınlatma sistemi Optik kısım Mekanik kısım: Aydınlatma sistemini ve optik kısmın taşıyıcısı Ayak Kol Tabla Revolver Tüp(Makrovida, mikrovida) Aydınlatma sistemi Işık kaynağı Kondansatör Diyafram Optik kısım Objektif Oküler Büyütme Objektifin odak uzaklığı Okülerin büyütme yeteneği Tüp uzunluğu (Objektifin oluşturduğu görüntünün mesafesi) Büyütme: <u>Tüp uzunluğu</u> X oküler büyütmesi Objektif odak uzunluğu Odak uzunluğu: 2 mm Tüp uzunluğu: 160 mm Oküler büyütmesi: 10x Büyütme: <u>160x10</u>: 800 2 Sayısal açıklık *Merceğin yarıçapının odak uzunluğuna oranı *Merceğin ışığı toplama ve yansıtma yeteneği *Sayısal açıklık arttıkça ayırtetme artar SA (NA): $n \times \sin \theta$ n(v): kırma indeksi *Havanın kırma indeksi:1

İmmersiyon yağının kırma indeksi:1,5

θ : objeden kırılarak geçen ışının açısı

Ayırdetme (rezolüsyon) Gücü

*En yakın mesafede iki cisim ayırdetme gücü

$\frac{0,5\lambda}{SA}$

*Dalga boyu azaldıkça, sayısal açıklık arttıkça artar

Görünür ışığın dalga boyu: 4000-7000 Å

10 000 Å : 1µm

10 Å : 1000 nm

5000 Å : 0,5 µm (500 nm)

Ayırdetme gücü: $\frac{0,5 \times 5}{SA(1-1,5)}$: 0,2 µm (200 nm)

Ayırdetme gücü

Işık mikroskobu: 100-200 nm

Karanlık alan mikroskobu: 100-200 nm

Faz kontrast mikroskobu: 100-200 nm

Floresan Mikroskobu: 100 nm

Elektron mikroskobu: 1-10 nm

Objektif

Working distance: Çalışma mesafesi

Oküler

Field Number: Objektif üzerindeki görüntünün görülebildiği alanı

Mikroskoplar

Işık mikroskobu

Karanlık alan mikroskobu

Ultraviyole mikroskobu

Faz kontrast mikroskobu

Floresan mikroskobu

Nomarski Diferansiyel
interferans mikroskobu

Confocal mikroskop

Elektron mikroskobu

Inverted mikroskop



Mikroskopun bölümleri

Uygulamanın adı	Mikroorganizmaların üretilmesi, besiyerleri hazırlanması ve ekim yöntemleri
Yapılacağı hafta	4
Uygulamanın temel hedefi	Mikroorganizmaların üretilmesi, besiyerleri hazırlanması ve ekim yöntemlerinin öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Besiyeri, otoklav, petri kabı, öze, svap, cam baget
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ
Besiyerleri ○ Mikroorganizmaların uygun çevre koşulları sağlanarak in vivo veya in vitro ortamlarda üretilmeleri işlemine kültür yapmak, besleyici ortamda üretilmiş olan mikroorganizmaların tümüne kültür adı verilir. ○ Bakteri ve mantarların çoğu in vitro olarak besiyeri adı verilen cansız ortamlarda üretilirler. ○ Mikroorganizmaları ilk olarak besiyerinde üretebilen bilim adamı Robert Koch'tur. ○ Koch 1876 yılında Bacillus anthracis'i besiyerinde üretmiştir. Agar ● Agar, agarophytes olarak tanımlanan Gellidium, Gracilaria, Pterocladia vb deniz yosunlarından elde edilen bir galaktoz polimeridir. ● Katılaştırma özelliğini içinde bulunan D-galakton sağlar. ● Normal inkübasyon ısı derecesinde erimemesi ve uzun dallanmış zincir yapısından dolayı mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılmaması jelatine olan üstünlükleridir. Fiziksel Özelliklerine Göre Besiyerleri ○ Sıvı besiyerleri ○ Yarı-katı besiyerleri ○ %0,05-0,5 agar ○ Katı besiyerleri ○ %0,5-3 agar Kimyasal Özelliklerine Göre Besiyerleri ○ Sentetik veya kimyasal yapıları tam olarak bilinen besiyerleri ○ Sentetik olmayan veya kompleks besiyerleri Kullanım Amaçlarına Göre Besiyerleri ○ Temel besiyerleri ○ Seçici besiyerleri ○ Zenginleştirici besiyerleri ○ Ayırt edici (identifikasyon) besiyerleri ○ Taşıma besiyerleri ○ Saklama besiyerleri Temel Besiyerleri ○ Buyyon: ○ Pepton (%1) ○ Et özütü (%1) ○ NaCl (%0,5)

- Distile su
- Adi agar (Jeloz):
- Buyyon+%2-3 agar
- Seçici Besiyeri
- EMB
- MacConkey

- Gram negatiflerin üremesi kristal viyole ve safra tuzları tarafından baskılanır.
- Zenginleştirici Besiyeri
- Selenit F

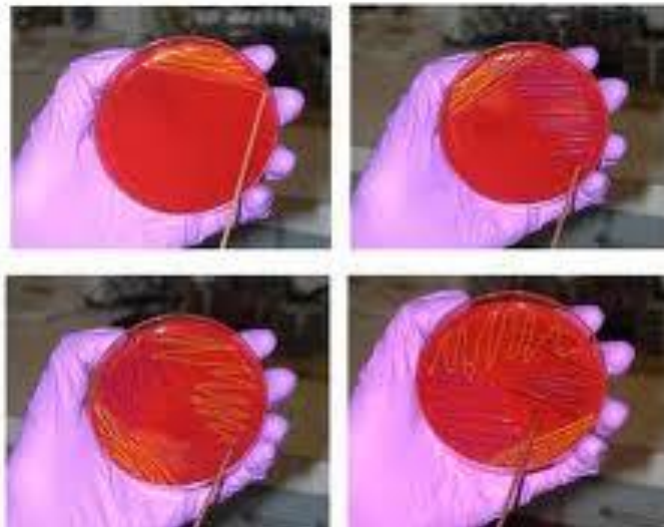
- Salmonella ve Shigella için
- İdentifikasyon Besiyeri
- Sitrata
- Üre
- Taşıma Besiyeri
- Amies
- Stuard

- Amies besiyeri oksijeni absorbe eder. Bu nedenle anaerop örneklerin taşınması için uygundur.

- Saklama Besiyeri
- Gliserinli Triptik soy broth

- İzole edilen kkenlerim -20 veya -70 C'de saklanmasında kullanılır.
- Besiyerlerinde kalite kontrolü
- Sterilligi denetleme

- Mikroorganizmaları üretebilme, seçicilik, zenginleştirme ve biyokimyasal özelliklerini saptayabilme açısından uygunluğunu denetleme.



Seyreltme yöntemi ile katı besiyerine ekim yöntemi

Uygulamanın adı	Boyalar ve boyama yöntemleri ve basit boyama
Yapılacağı hafta	5
Uygulamanın temel hedefi	Boyama yöntemlerinin öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Mikrobiyolojik boyalar
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Preparatların Hazırlanması

- Lamlar temiz, yağsız, çiziksiz olmalı
 - % 50 lik etil alkolde tutulup silinebilirler
 - Kullanılan malzeme steril olmalı
 - İşi biten lamlar dezenfekte edilmeli
- Boyasız preparatlar
- Bakteri hareketlerinin incelenmesi
 - Karanlık alanda inceleme
 - Hücrelerin görülmesi
 - Protozoa ve parazitlerin görülmesi

- Lamlar silinerek temizlenir
- Preparat hazırlanacak yüzü alevden geçirilir
- Doğrudan sıvı madde ya da serum fizyolojikle sulandırılmış yarı katı materyal ile preparat hazırlanır.

- Karanlık alan mikroskopisi ile hareket incelemesi yapılabilir.

- Karanlık alanda bakteri kirpiklerinin görülmesi

- Asılı damla preparatı: çukurlu lam kullanılır

Boyalı preparatların incelenmesi

- Temiz lamlarla uygun koşullarda preparat hazırlanır

- Havada kurutulur

- Materyal tespit edilir

- Havada kurutarak (2-3 hatta 18 saat)

- Alevde tespit

- Kimyasal maddelerle tespit (etil alkolle 8-10 dk, metil alkolle 3 dk, aseton ile 5 dk)

Boyama teknikleri

- Boyama köşesi bir evye etrafında düzenlenir

- Boya eriyikleri stok eriyik halde hazırlanır ve koyu renkli şişelerde saklanır

- Hazırlamada saf su kullanılır

- Damlalıklı şişeler kullanılır

- Boyadaki kimyasal maddelerle mikroorganizma ya da hücre yapılarındaki madde ve parçacıklar arasında fiziksel ve kimyasal tepkimeler

- Bazik boyalar: boyayıcı kısımları katyonda bulunan tuz şeklinde boyalardır

- Nükleik asitlerle bileşikler yapar (çekirdek boyaları). Kullanılan boyaların çoğunluğunu oluştururlar.

- Asidik boyalar; boyayıcı kısımları anyonda bulunur

- Hücre sitoplazmasındaki bazik bileşiklerle birleşirler

- Bazı boyalar boyanan materyalle kimyasal bileşik oluşturmaz.

hücrelerdeki parçacıkları çevreleyip orada çökelirler.

İmmersiyon yağı ile incelenmiş preparatlar ksilol/benzol ile yıkanıp silindikten sonra

karanlıkta saklanırlar.

Basit boyama yöntemleri

- Tek bir boyama eriyiği kullanılır
- Metilen mavisi ile boyama
- Löflerin Metilen mavisi eriyiği ile boyama
- A) Stok eriyikten hazırlama (fazla sarfiyat durumunda)
- Metilen mavisinin alkolde doymuş stok eriyiği

Metilen mavisi 1,5 gr

% 95 lik alkol 100 ml

Metilen mavisi cam havanda ezilirken azar azar alkol eklenerek karıştırılır. En az 24 saat oda ısısında bekletilip süzgeç kağıdından süzülür ve cam kapaklı renkli şişelerde saklanır.

b) Boyamada kullanılan eriyik

Önce 100 ml saf su bir balona konur. Üzerine % 10 luk KOH eriyiğinden 0,1 ml eklenerek karıştırılır

Üzerine 30 ml doymuş metilen mavisi eriyiği eklenir

Oda ısısında 1 gece bekletilip kağıt süzgeçten süzülür, renkli şişelerde saklanır

• B) Metilen mavisi eriyiğini stoksuz hazırlama (az sarfiyatlı laboratuvarlarda)

- Metilen mavisi 0,3 gr
- % 95 lik etil alkol 30 ml
- % 10 luk KOH eriyiği 0,1 ml
- Saf su 100 ml
- Cam havanda metilen mavisi alkolle karıştırılıp ezilir, balona aktarılır
- Saf su ile KOH eriyiği karıştırılıp boya eriyiği ile karıştırılır
- 24 saat beklendikten sonra süzülür

Metilen mavisi ile boyama

- Preparat tespit edilir
- Üzerini kaplayacak şekilde boya dökülür
- 30-60 sn bekletilip su ile yıkanır
- Kurutulur immersiyon objektifi ile incelenir
- Preparattakiler maviye boyanır

Sulu füksin ile boyama

- Ziehl Neelsen'in fenollü (karbol) füksini 2 ml
- Saf su 18 ml
- Karıştırılıp damlalıklı şişede saklanır (en çok 2 hafta)
- Tespit edilmiş preparat üzerine dökülür
- 20-30 sn bekletilip yıkanır
- Kurutularak immersiyon objektifi ile incelenir
- Preparat pembe-kırmızı boyanır

Negatif preparat

- Zor boyanan mikroorganizmaların görülmesinde kullanılır
- Boyasız mikroorganizmaların izdüşümleri boyalı zeminde boşluklar halinde görülür.
- İkinci bir boya ile boyanırsa (sulu füksin gibi) boyanan bakterilerin çevresinde boşluklar halinde kapsülleri görülür.

Negatif preparat

- Çini mürekkebi (içine koruyucu olarak % 0,03 trikrezol eklenerek saklanır)

• Nigrosin eriyiği

• Nigrosin 10 gr

• Formalin (% 40) 0,5 ml

• Saf su 100 ml

• Nigrosin saf suda kaynatılarak eritilir. Soğuyunca formalin eklenir. Çif süzgeç kağıdından iki kez süzülür. Küçük şişelerde saklanır

Negatif preparat

- Çok temiz bir lamın ucuna bakterinin ya da materyalin süspansiyonundan damlatılır
- Yanına bir öze ya da bir damla çini mürek. ya da nigrosin konur
- Temiz bir lamel 45 derece ile önden arkaya doğru çekilerek iki damla karıştırılır ve kan yayar gibi ince bir damla halinde lama yayılır
- Şekli elementler genelde boyanmazlar, boyalı zeminde renksiz boşluklar halinde görülürler



Metilen mavisi

Uygulamanın adı	Gram boyama
Yapılacağı hafta	6
Uygulamanın temel hedefi	Gram boyamanın öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Mikrobiyolojik boyalar
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Gram boyama

- Hans Christian Joachim Gram
- Bakterilerin çoğu Gram olumlu ya da olumsuz boyanır
- Önce jansiyan moru ya da kristal moru ardından da mordan olarak lugol eriyiği uygulanır (tüm bakteriler boyayı alırlar)
- % 96 lık etil alkol ile renksizleştirme işlemi yapılır (Gram olumlular boyayı bırakmaz, olumsuzlar renksizleşir)
- Zıt boya eriyiği ile Gram olumsuzlar boyanarak görünür hale getirilir
- Sulu fuksin kullanılırsa pembe, eozinle kırmızı , safraninle turuncu, parlak yeşili ile yeşil, pikrik asitle sarıya boyanırlar.

Gram boyama

- Bazı bakteriler sınırda tepkime verebilir
- Gram olumlu olduğu halde eskiyen kültürlerde olumsuz gibi boyanabilir
- Bazı Gram (+)'ler besiyerinde en az % 5 serum ya da kan bulunmadıkça Gr (-)leşme eğilimindedirler
- Ortam pH sınır asitleşmesi Gram olumsuzlaşmaya eğilimi artırır
- Kesin karar verilirken boyamanın yenilenmesi ve aynı preparatta kesin Gram (+) ya da (-) olduğu bilinen kontrol bakterilerin boyanması iyi olur

- Gram olumlu bakterilerdeki peptidoglikan tabaka Gram olumsuzlara göre daha kalındır ve hücre çeperinde teikoik asit içerirler.
- Gram (-) lerde ise farklı olarak peptidoglikan tabakanın dışında bir lipopolisakkarit tabaka bulunur
- Kristal viyole ve lugol her iki bakteride hücre çeperini geçerek hücre içine girer, Gram (4) lerde bu maddeler hücre çeperi ile zor ayrılabilen bileşikler oluşturur.
- Gram (+) lerin hücre çeperinde bulunan Mg ribonükleat, lipidler ve karbonhidratlar ribonükleaz, eter ve sıcak su ile uzaklaştırıldığında Gram olumluluk özelliklerini kaybederler
- Gram olulu bakterilerden oluşan protoplastlar Gram (-) boyanırlar.

•Jensen'in değişik Gram boyama yöntemi

•A) kristal moru ya da jansiyan moru eriyiği

- Kristal viyole ya da jansiyan viyole 1 gr
- Asit fenik kristal 2 gr
- % 96 lık etil alkol 10 ml
- Saf su 100 ml

Bir cam havanda boya ezilirken yavaş yavaş alkol ve asit fenik kristalleri de atılıp karıştırılarak eritilirler

Suyun 2/3 ü eklenir

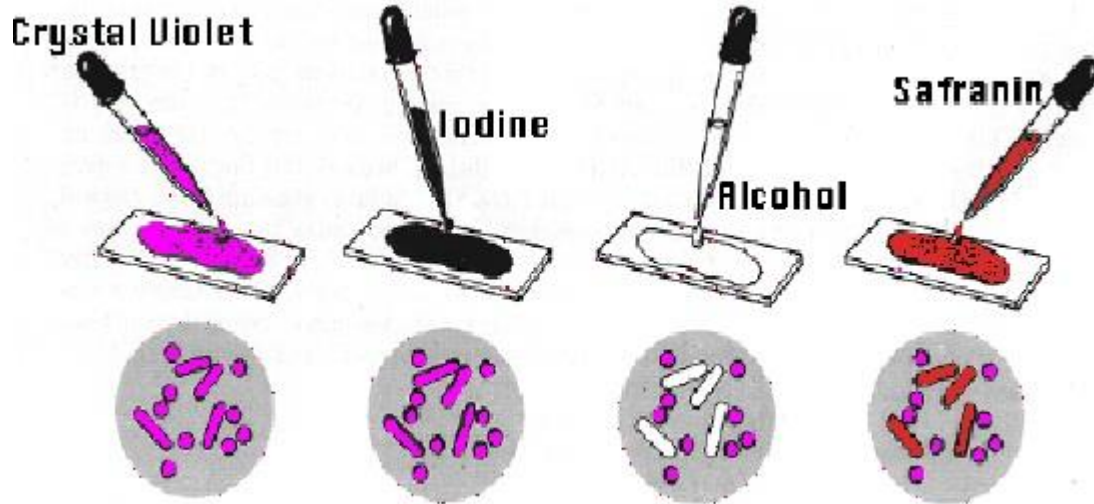
Eriyik dereceli mnezure konur

Artan su ile havan çalkalanarak mezure aktarılır ve hacim 100 ml e tamamlanır

24 saat oda derecesinde bekletildikten sonra süzgeç kağıdından süzülerek saklanır

•B) Gram iyot eriyiği (Lugol eriyiği)

- İyot kristalleri 1 gr
 - Potasyum iyodür 2 gr
 - Saf su 300 ml
 - Cam havanda I ve KI kristalleri ezilerek karıştırılır. Üzerlerine saf su eklenerek eritilir. Renkli şişelerde saklanır
 - C) % 96 lık etil alkol (veya aseton alkol)
 - D) Sulu fuksin eriyiği
- Gram boyama
- Tespit edilen preparat üzerine kristal viyole eriyiği dökülüp 1-2 dk beklendikten sonra yıkanır.
 - Lugol eriyiği dökülür, 30-60 sn beklendikten sonra yıkanır.
 - Aseton alkol ile 10-15 saniye renksizleştirilir, preparat yıkanır
 - Sulu fuksinle 30 sn boyanır, kurutulduktan sonra immersiyon objektifi ile incelenir
 - Gram olumlu bakteriler mor, Gram olumsuzlar pembe-kırmızı renkte görülür
- Gram boyamada diğer zıt boya eriyikleri
- Nötral kırmızısı
 - Safranin
 - Bismark kahverengisi
 - Asit pikrik
 - Malaşit yeşili
- Gram boyası ile olumlu ya da olumsuz kararı verilemeyen bakterilerin ayırt edilmesinde kullanılan yöntemler;
- KOH deneyi: Lam üzerine bir damla % 3 lük KOH eriyiği konur. Bakteri kolonisinden öze ile alınan bir parça bu eriyik içinde ezilerek 1 dk kadar karıştırılır. Öze yavaşça çekildiğinde iplikçikler halinde uzama görülürse bakteri Gram olumsuzdur. (KOH bakteri duvarını harab edip yapışkan DNA yı ortaya çıkarmıştır)
 - L-alanine-4-nitroanilide (LANA) aerop ya da fakültatif anaeroplara için kullanılır. Ticari olarak pamuklu silgiçlere emdirilmiş halde bulunur, Gram olumsuz bakteri kolonisine dokundurulduğunda sarı renge dönüşür.



Gram boyama basamakları

Uygulamanın adı	Ziehl-Neelsen boyama
Yapılacağı hafta	7
Uygulamanın temel hedefi	Ziehl-Neelsen boyamanın öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Mikrobiyolojik boyalar
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Aside dirençli bakterilerin boyanması

- Asiderezistan bakteriler diğer yöntemlerle kolay boyanmazlar
- Boyanmaları için fenollü ve yoğun boya eriyiklerinin uzun süre ya da sıcaklık etkisi ile uygulanması gerekir
- Bu şekilde boyama sonrası asit, asitli alkol ve diğer renk gidericilerle boyalarını bırakmazlar
- Asidorezistan bakterilerin hücre çeperi yapısında diğer bakterilere oranla çok daha fazla lipid bulunur
- Fenollü fuksin lipid ortamda alkol ve sulu ortama göre daha kolay eridiğinden bakteri lipidlerini kolayca geçer, bakteriyi boyar. Renksizleştiricilerde daha az eridiğinden bunların uygulanması ile bakteriyi terk etmez

Erlich- Ziehl-Neelsen boyama yöntemi

•A) Ziehl-Neelsen fenollü fuksini (Karbolfuksin)

- Bazik fuksin 1 gr
- Fenol kristalize 5 gr
- Saf etil alkol 10 ml
- Saf su 100 ml
- Fenol saf suda eritilerek % 5 lik eriyik hazırlanır, 50 ml si balon jöjeye aktarılır.
- Bazik fuksin cam havanda ezilirken alkolle karıştırılarak eritilir. Bu eriyik balon jöjedeki fenollü suya eklenir. Arta kalan fenollü su ile havan çalkalanarak yıkantı suyu da balona aktarılır ve 100 ml e ulaşılır. 24 saat oda ısısında beklendikten sonrakığıt süzgeçten süzülür.

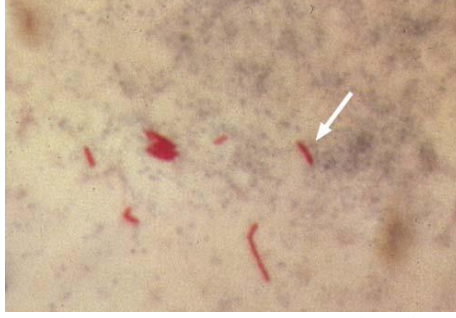
•B) Asit-alkol eriyiğı

- HCL 3 ml
- % 95 lik etil alkol 97 ml

•Karıştırılır

•C) Löflerin metilen mavisi eriyiğı

- Tespit edilmiş preparat üzerine karbolfuksin dökülür
- Altan alev geçirilerek kaynatılmadan 3-5 dk ısıtılır. Boya azalırsa eklenir.
- Yıkayıp asit alkol ile 2 dk dekolarize edilir
- Zıt boyama için 1-2 dk metilen mavisi ile boyanır, yıkayıp kurutulur ve X100 büyütmede incelenir. Mikobakteriler kırmızı, zemin mavi renkte görülür.
- Zıt boyamada farklı boyalar kullanılabilir.



Ziehl-Neelsen boyama sonucu görülen kırmızı basiller

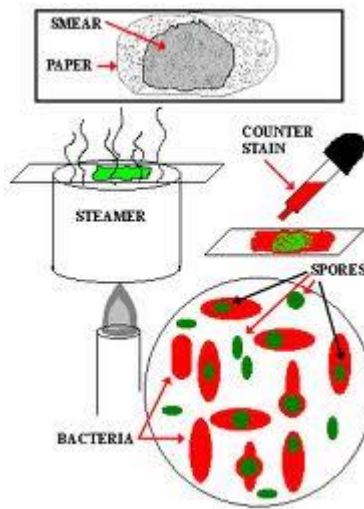
Uygulamanın adı	Spor boyama
Yapılacağı hafta	8
Uygulamanın temel hedefi	Spor boyamanın öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Mikrobiyolojik boyalar
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

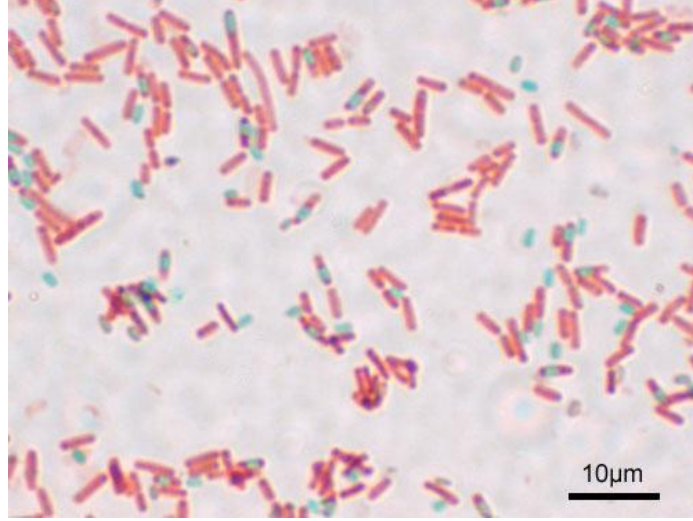
Spor oluşturan mikroorganizmalarda, vegetatif hücre normal boyalarla boyanmasına karşın, sporun etrafında kalın muhafazaların bulunması ve bunların geçirgen olmaması boyanmalarını imkansızlaştırır. Spor boyamak için başlıca iki metot bulunmaktadır.

1. Zeihl-Neelsen Tb. boyama yöntemi ve
2. Malaşit yeşili ile boyama tekniği. Bu son yöntemde:

- a) Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.
 - b) Malaşit yeşili (% 5) solusyonu ile, alttan ısıtılarak, 5 dakika boyanır.
 - c) Su ile yıkanır. Safranin (%0,5) veya füksin'le 30 saniye boyanır.
 - d) Su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir.
- Sporlar yeşil ve basiller ise kırmızı renkte görülürler.



Spor boyama aşamaları



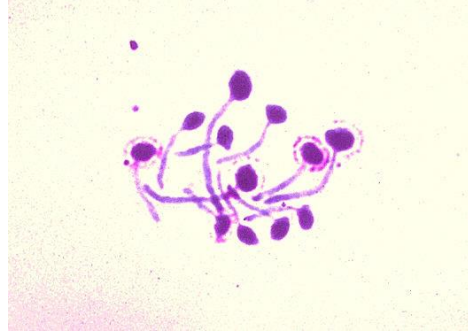
Spor boyama mikroskopik görünüm

Uygulamanın adı	Mantar boyama
Yapılacağı hafta	9
Uygulamanın temel hedefi	Mantar boyamanın öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Mikrobiyolojik boyalar
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

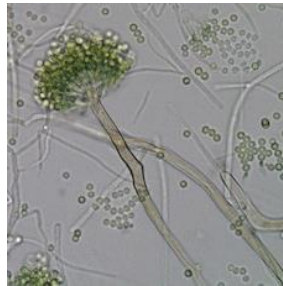
UYGULAMA BİLGİSİ

Mantarların incelenmesi

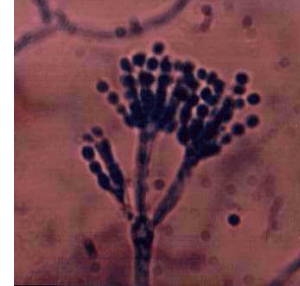
- Gram boyama: tüm mantarlar Gram olumludur.
- Laktofenol pamuk mavisi yöntemi
- Laktik asit 20 ml
- Fenol kristal 20 gr
- Gliserin 40 ml
- Saf su 20 ml
- Pamuk mavisi (Poirrier mavisi) 0.075 gr
- Saf su, Laktik asit ve Gliserin karıştırılır. Isıtılırken Fenol kristalleri eklenir boya atılır ve eritilir.
- Lam üzerine bir damla % 96 lık etil alkol konur. İğne ile bir miktar kültür alıp ezilir
- Bir damla boya damlatılıp lamel kapatılır
- X40 büyütmede mantar elemanları açık mavi boyalı olarak görülür
- Saydam bant-Laktofenol pamuk mavisi yöntemi: saydam banttan 3 cm kesilerek yapışkan yüzü alt tarafa gelecek şekilde bir penset ile tutularak mantar kolonisine dokundurulur (küflerde)
- Üzerinde bir damla boya olan lam üzerine yapıştırılarak X40 büyütmede incelenir
- Cryptococcus neoformans ve Histoplasma capsulatum gibi kapsüllü mantarların incelenmesinde çini mürekkep ile yaş preparat hazırlanır
- KOH ve NaOH preparatları
- Kıl, deri, tırnak gibi keratinize dokunun mantar enfeksiyonlarında mantar aramasında kullanılır
- Örnek bölgesi etil alkol ile silinir. Bistüri ile kazıntı alınır. Materyal üzerine bir damla % 15 lik KOH veya NaOH eriyiği damlatılıp lamel kapatılır. Altan hafifçe ısıtılır
- X40 büyütmede hifler, sporlar vs mantar elemanları görülür.



Candida etkenleri
etkenleri



Aspergillus etkenleri



Penicillium

Uygulamanın adı	Preparatların incelenmesi ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	10
Uygulamanın temel hedefi	Preparatların incelenmesi ve yorumlanmasının öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Lam, Lamel, Mikrobiyolojik boyalar
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Preparatların Hazırlanması

- Lamlar temiz, yağsız, çiziksiz olmalı
- % 50 lik etil alkolde tutulup silinebilirler
- Kullanılan malzeme steril olmalı
- İşi biten lamlar dezenfekte edilmeli

Boyasız preparatlar

- Bakteri hareketlerinin incelenmesi
- Karanlık alanda inceleme
- Hücrelerin görülmesi
- Protozoa ve parazitlerin görülmesi

- Lamlar silinerek temizlenir
- Preparat hazırlanacak yüzü alevden geçirilir
- Doğrudan sıvı madde ya da serum fizyolojikle sulandırılmış yarı katı materyal ile preparat hazırlanır.

- Karanlık alan mikroskopisi ile hareket incelemesi yapılabilir.

- Karanlık alanda bakteri kirpiklerinin görülmesi

- Asılı damla preparatı: çukurlu lam kullanılır

Boyalı preparatların incelenmesi

- Temiz lamlarla uygun koşullarda preparat hazırlanır
- Havada kurutulur
- Materyal tespit edilir
- Havada kurutarak (2-3 hatta 18 saat)
- Alevde tespit
- Kimyasal maddelerle tespit (etil alkolle 8-10 dk, metil alkolle 3 dk, aseton ile 5 dk)



Preparatlar

Uygulamanın adı	Biyokimyasal aktivitenin ölçülmesi
Yapılacağı hafta	11
Uygulamanın temel hedefi	Biyokimyasal aktivitenin ölçülmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Kültür, besiyeri
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Katalase Testi

Metot

- 1) Katı besi yerinde (kanlı agar hariç) üremiş olan mikroorganizma kolonilerinden platin öze (veya cam baget) yardımı ile yeterli miktarda alınarak temiz ve yağsız bir lamın üzerine konulur. Sonra buna % 30 luk hidrojen peroksitten bir damla damlatılır veya
- 2) Sıvı besiyerinde (5 ml) üremiş kültür üzerine % 3 lük hidrojen peroksit'den 3-4 damla ilave edilir.

Değerlendirme

Hidrojenperoksit katılmasından sonra kabarcıkların görülmesi veya çıkması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir. Şüpheli durumlarda mikroskop altında muayene yapılabilir. Reaksiyon en iyi pH 7.0 da meydana gelir ve oda sıcaklığında yapılır. Sonuçlar, negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) pozitif olarak derecelendirilir.

Koagülase Testi

Bu test, özellikle stafilokoklarda bulunan ve kan plazmasını pıhtılaştıran koagülase enzimini (stafilokoagülase) ortaya koyma, patojenik olanlarla nonpatojenik olanları ayırmak amacı ile yapılır. Patojenik olan *S. aureus* pozitif reaksiyon vermesine karşın *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* negatif reaksiyon gösterir. Aslında koagülase'nin patojenite ile ilişkisi de tam olarak aydınlatılmamıştır.

Karbonhidrat Fermentasyon Testi

Bu test, mikroorganizmaların çeşitli spesifik karbonhidratları ayrıştırma yeteneklerini (sakkarolitik aktivite) belirlemek amacı ile yapılmaktadır. Mikroorganizmalar karbonhidratları, kendileri tarafından sentezlenen hidrolase (karbohidrase) enzimleri yardımı ile ayrıştırırlar. Ancak bu yetenek mikroplar arasında oldukça fazla değişiklik gösterdiği gibi, bir türe ait mikroorganizmalar arasında da ayrı fermentasyon özelliği gösteren variant suşlar da meydana çıkmaktadır. Bazı mikroorganizmaların fermentasyon özelliği yok denecek kadar az olmasına karşın Enterobacteriaceae familyasına ait olanlarda bu aktivite oldukça yüksektir.

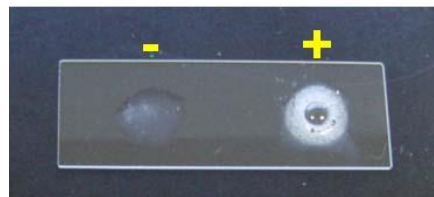
Karbonhidratlar (monosakkarid, polisakkarid ve alkoller), bakteriler tarafından değişik tarzda (aerobik ve anaerobik) ayrıştırılarak çeşitli ürünler, organik asitler (asetik asit, butirik asit, formik asit, laktik asit, propionik asit, suksinik asit, vs.), nötral ürünler (Asetilmetilkarbinol, 2,3-butilenglikol, aseton, etil alkol, isopropil alkol, butil alkol, vs.)

ve gazlar (hidrojen, oksijen, metan, karbondioksit) meydana gelirler.

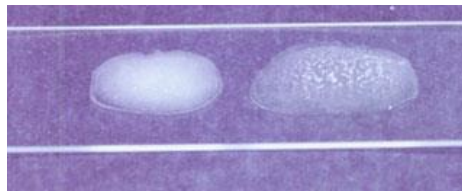
Bu maddeler çeşitli testler yardımı ile ortaya konabilir ve mikroorganizmaların identifikasyonunda önemli göreve sahip olurlar. Enerji ve karbon kaynağı olarak, karbonhidratların önemi fazladır. Metabolize olabilenlerin üreme üzerine olumlu etkileri vardır. Ancak, ayrışma sonu oluşan organik asitler, besi yerinin pH sını düşürerek belli bir süre sonra üremeyi sınırlar ve durdururlar. Bu yönden de zararlı etkisi olur. Karbonhidratların aerobik ayrışması sonu çok fazla enerji ortaya çıkmasına karşın anaerobik ayrışmada (fermentasyon) enerji daha az çıkmakta ve organik asit oluşumu daha fazla görülmektedir. Laboratuvarlarda kullanılan besi yerleri ve diğer koşulların etkisi altında, mikroorganizma türlerine göre değişmek üzere, karbonhidratların ayrışması, genellikle, 1-10 gün arasında değişmektedir. Bazen daha uzun bir süreye gereksinim duyulabilir. Ayrışmayı ortaya koyabilmek için besi yerlerine üreme üzerine olumsuz etkisi olmayacak yoğunlukta bazı indikatörler (Andrade, bromkrezol moru, brom timol mavis, fenol kırmızısı, vs.) katılır. Bunların özelliklerine göre renklerinde meydana gelen değişimler ayrışmayı ve derecesini belirtir. Bu indikatörler besi yerlerine, yukarıdaki sıraya göre, % .005, % 0.0025, % 0.001 son konsentrasyonda olacak tarzda ilave edilirler. Andrade hariç olmak üzere diğerleri asit ortamlarda sarı renk meydana getirirler. Besi yerlerinde gaz oluşumunu saptamada, tersine yerleştirilmiş küçük Durham tüplerinden yararlanılır. Gaz, bu tüpün üst tarafında birikir. Bu amaçla özel Smith tüpleri de kullanılabilir. Nötral ürünlerden asetoin'i (asetil metilkarbinol) saptamada Voges Proskauer (VP) reaksiyonu laboratuvarlarca benimsenmektedir.

Oksidase Testi

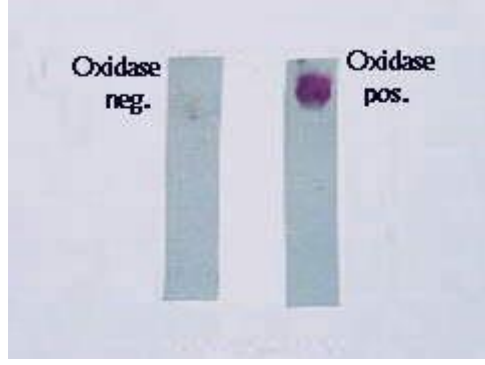
Bu test, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan oksidase enziminin (sitokrom C oksidase) varlığını ortaya koymada kullanılır. Deneyden aynı zamanda cinslerin (*Moraxella* (+), *Neisseria* (+), *Yersinia* (-), *Acinetobacter* (-), ve türlerin (*B. ovis* (-), *B. neotomae* (-) ve *B. abortus* (+) ayrımında yararlanılır. Oksidase reaksiyonu, bakterilerde (aerobik olanlarda) sitokrom oksidase sisteminin bulunduğunu ifade eder. Üzerine ayıraç damlatılan kolonilerin 1-2 dakika içinde kırmızı mavi renk almaları pozitif oksidase testi olarak kabul edilir. Hiç bir renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirilir. Kolonilerin siyah renk alması öldüklerini ifade eder.



Katalaz testi



Koagülaz testi



Oksidaz testi

Uygulamanın adı	Hareket muayenesi
Yapılacağı hafta	12
Uygulamanın temel hedefi	Hareket muayenesinin öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Kültür, besiyeri, mikroskop, lam, lamel
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

#Asılı Damla Yöntemi: bakteri kültürü örneğinden lam üzerine pastör pipeti yardımıyla küçük bir damla aktarılır. Lamel, üzerindeki damla lama doğru yönlendirilmiş olarak lam üzerinde yerine yerleştirilir ve gözlem yapılır. Işık miktarı gözlem yapılırken azaltılır.

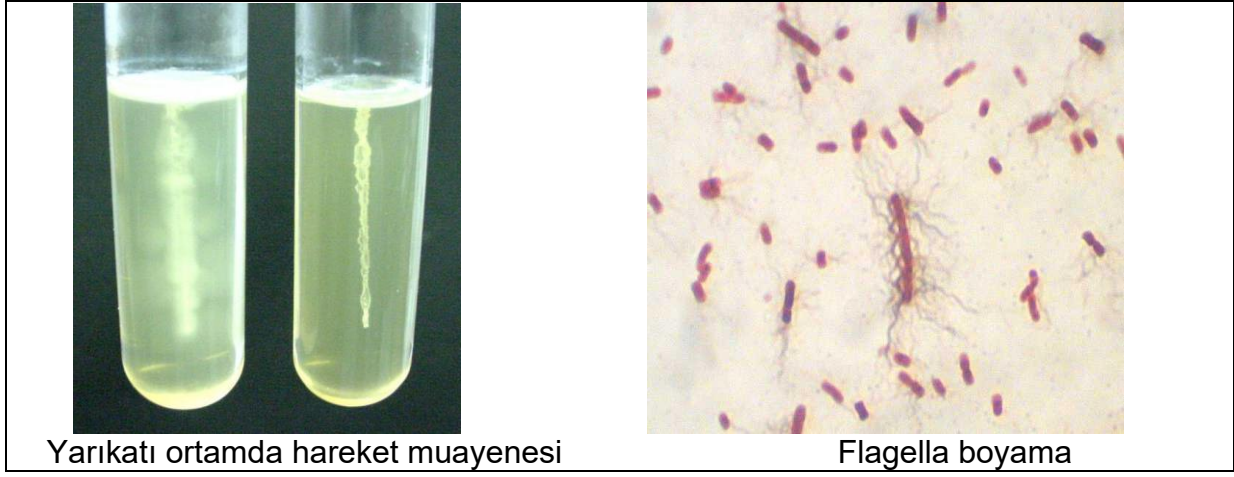
#Lam-lamel arası muayene: Bir öze dolusu örnek veya sıvı kültür temiz bir lama konulur, lamelle kapatılır ve 100 lük obj. muayene edilir. muayene mümkünse soğuk ortamda yapılmalı ve uzun sürmemelidir.

#Yarıkatı ortamda üreme: Mannitol besiyerinde zikzak şeklinde ekim hattının dışında üremeler gözlenmesi hareketin + olduğunu gösterir.

#Flagella boyama: 9 ml Mordan (5 ml potasyum alum, 2 ml tannik asit, 2 ml civa klorür) ile 0.8 ml bazik fuksin karıştırılır. bakteri süspansiyonundan alınarak 1 damla konur ve eğik olarak lamin diğer tarafına akması beklenir. Havada kurutulur. Preperatlar 3'er adet hazırlanır. Taze boya solusyonu bu 3 preperata dökülür ve 5, 10, 15 dakika beklenerek 3 preperatın boyanması sağlanır. Su ile yıkandıktan sonra kristal viyole ile negatif boyama yapılır. Mordan maddesi flagella üzerinde presipite olarak onu daha kalın ve görülebilir hale getirir.

#Elektron mikroskoplarla muayene

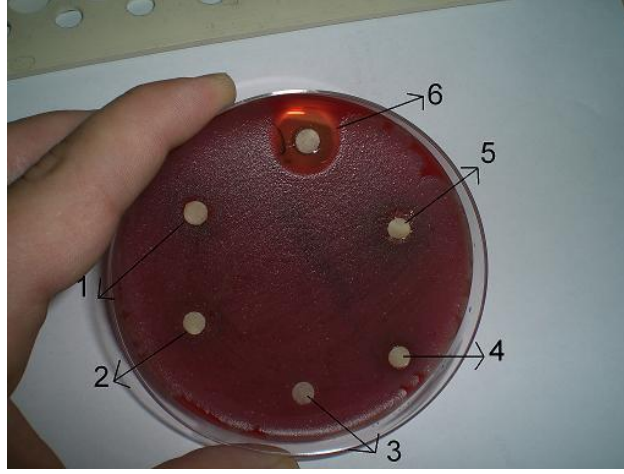
#Antiflagellar serumla test



Uygulamanın adı	Antibiyogram testinin yapılması ve yorumlanması
Yapılacağı hafta	13
Uygulamanın temel hedefi	Antibiyogram testinin öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Kültür, besiyeri
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ
Belirli bir bakteri veya bir kaç türünün gelişmesini ve üremesini hangi antibiyotiğin önleyeceği veya hangi oranda azaltacağını ortaya koyan biyolojik metottur. Bir mikrobun alt gruplarının veya sonraki değişik döllerinin antibiyotiklere karşı aynı cevabı vermediği bilinmektedir. Halbuki muayyen bir mikroba veya bir mikrobun muayyen dölüne karşı hangi antibiyotiğin veya antibiyotiklerin tesirli olduğunu bilmek hem tedavi olan hasta açısından, hem de sağlıklı toplum açısından önemlidir. Hasta daha çabuk tedavi olur. Daha az antibiyotik dolayısıyla para harcanır ve daha ilerisi için direnç kazanmış mikrop dölleri bırakılmamış olur Bazen antibiyogram, veya mikrop cinsini belirlemek imkansız olabilir. Hasta organ veya hastalıklı materyalden numune alınamaz veya enfeksiyon çok şiddetli olduğu için beklemeye tahammül olmayabilir. Böyle durumlarda yani antibiyogram elde edilemeyecek veya gecikecek durumlarda kuvvetli antibiyotiklerden veya hasta sistem için özellik kazanmış antibiyotiklerden ikisi kombine olarak kullanılır. Bu arada bir yandan mümkün olursa, antibiyogram sonucunda belirlenen etkili antibiyotiklere geçilir. Antibiyogram yapılırken, az etkilenenler ve dirençli olanlar diye derecelendirilir. Antibiyogram yapımında halen en çok disk metodu kullanılmaktadır. Bu usûlde mikrop petri kutusu içinde hazırlanan katı jeloz besi yerine ekildikten sonra üzerine çeşitli antibiyotik sıvılarına batırılmış yuvarlak kağıt parçaları konulur. Besi yerinde

Üreyen mikrop etkili olan antibiyotiğin çevresinde üremediğinden yasak bölge meydana gelir. Yasak bölgenin genişliği antibiyotiğin tesir kuvvetinin fazlalığına işarettir. Eğer antibiyotikli kağıdın hemen etrafında dahi çepe çevre mikrop kolonileri ortaya çıkabilmişse mikrobun bu antibiyotiğe dirençli olduğu gösterilmiş olur.



Antibiyogram testi sonucu oluşan zon çapları

Uygulamanın adı	Bakteri sayım yöntemleri
Yapılacağı hafta	14
Uygulamanın temel hedefi	Bakteri sayım yöntemlerinin öğretilmesi
Kullanılacak materyal ve malzeme adı	Kültür, besiyeri
Gerekli olan güvenlik uygulamaları	Uzun kollu önlük, plastik gözlük, koruyucu maske, lateks eldiven.

UYGULAMA BİLGİSİ

Koloni Sayımı

Bu yöntemlerin prensibi mikroorganizmanın katı besiyerinde koloni oluşturması, bu kolonilerin sayılarak örnekteki mikroorganizma sayısının hesaplanmasıdır. Dökme, yayma ve damlatma olarak 3 şekilde uygulanır.

Dökme Yöntemi

Dökme yönteminde 1 ml örnek steril petri kutusuna pipetlenir, üzerine 45 °C 'a kadar soğutulmuş agarlı besiyerinden yaklaşık 15 ml dökülür, besiyeri ile örnek karıştırılır, besiyeri

katılaştıktan sonra petri kutuları inkübasyona bırakılır. Bu yöntemin avantajı ekim yapılacak

tüpten 1 ml pipetlendiği için yayma yöntemine göre 10 misli daha az mikroorganizma içeren

örneklerde sayım yapılabilmesidir. Dezavantajları ise sıcak dökülen besiyerinin mikroorganizmaya zarar verme olasılığının yüksek olması, besiyerinin petrilere ekim yapılınca kadar erimiş halde (50 °C su banyosunda) tutulması ve bunun besiyeri üzerine

olumsuz etkisi, herhangi bir ekim hatasında yedek besiyeri kullanımındaki sıkıntılar, mikroorganizmaların petri kutusunun tabanına veya besiyeri yüzeyine yakın olmalarına bağlı

olarak oksijenden farklı düzeyde faydalanmaları ve dolayısı ile farklı düzeyde gelişmeleridir.

Yayma Yöntemi

Yayma yönteminin esası, önceden petri kutularına dökülüp katılaştırılmış (hatta bu şekilde stoklanmış) ve belirli bir düzeyde kurutulmuş besiyerleri üzerine 0,1 ml örnek aktararak drigalski spatülü denilen kıvrık bir cam baget ile bu miktarın besiyeri yüzeyine yayılmasıdır. Yukarıda dökme yöntemi için verilen tüm dezavantajlar bu yöntemde avantaj, avantaj olarak verilen ise dezavantajdır. Bu yöntemin uygulanmasında dikkat edilmesi gereken hususlar drigalski spatülünün sterilize edildiği alkol çözeltisinin (%70 v/v) sürekli olarak yenilenme ve kontrol gerekliliği, alkol ile drigalski spatülünün temas süresinin 5-10 dakikadan az olmaması gerektiği ve buna göre yeterli sayıda spatül bulundurulması, alkolden çıkarılan spatülün bunzen beki alevinden geçirilme nedeninin ısı ile sterilizasyon değil sadece alkolü uzaklaştırmak olduğunun unutulmaması, beherdeki alkolün alev almasının önlenmesidir. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında en yaygın olarak kullanılan ve kullanımı önerilen yöntem budur.

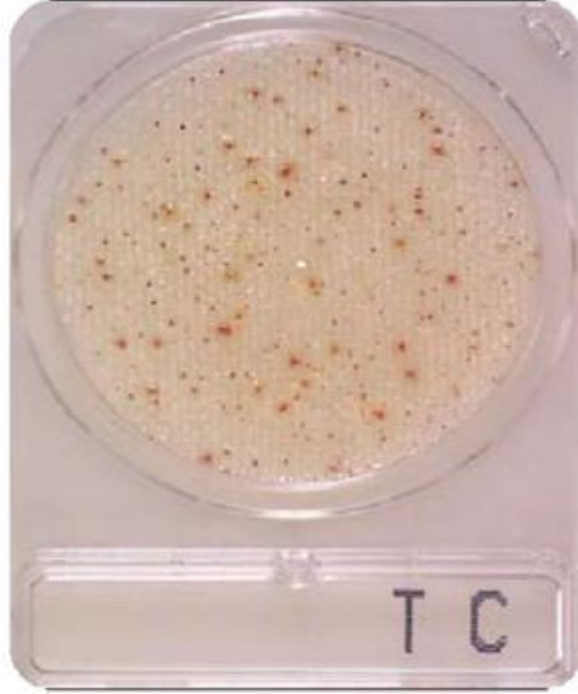
Damlatma Yöntemi

Damlatma yönteminde ise 0,01 (ya da 0,05 ; besiyeri uygun ise 0,1) ml örnek petri kutusunda önceden dökülmüş, katılaştırılmış ve belirli bir düzeyde kurutulmuş besiyeri üzerine damlatılır, yayma yapılmadan besiyerinin damlayı emmesi beklenir. Dolayısı ile koloniler sadece yaklaşık 2-3 cm kadar çapı olan bir alanda yoşun ve bu nedenle küçük olarak gelişir. Bu yöntemin rutin gıda kontrolünde kullanımı yaygın değildir. Bir petri kutusunun tabanının 2; 3; 4; hatta 6' ya bölünerek her bölmede farklı örnek ve/veya seyreltiden ekim yapılması, buna göre laboratuvarında besiyeri ve petri kutusundan tasarruf sağlanması bu yöntemin en büyük avantajıdır. Bu yöntem sayımdan ziyade titre belirleme (yarı kantitatif sayım) amacıyla kullanılabilir. Örneğin bir gıda maddesinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının 100.000 adet/g olmasına ilgili tüzük ve/veya standarda göre izin veriliyor ise ve işletme için sadece bu değerinin altında kalmak önemli ise 10-1,10-2 ve 10-3 seyreltilerden 0,01 ml damlatma yöntemi ekim yapılır. İnkübasyondan sonra 10-2 seyreltide bir kaç koloni var, ancak 10⁻³ seyreltide gelişme yok ise sayım sonucu 10000 adet/g 'dan fazla ancak 100.000 adet/g'dan daha az olarak verilebilir. Ancak istatistik yaklaşım altında bu sonucun sadece bir ön bilgi olduğu, eşer 10-2 seyreltide de koloni gelişimi olmaz ise ilgili tüzük ve/veya standarda uyulduğu söylenebilir. Oluşan kolonilerin büyüteç ile sayılarak daha doğru sayım sonucunun alınması mümkündür.

Petri film

Besiyeri bir film tabakası halinde plastik bir destek tabakasına bir film tabakası halinde dökülmüş, kurutulmuş ve bu şekilde kullanıma hazır steril preparat haline getirilmiştir. Analiz aşamasında üstteki korutucu tabaka kaldırılarak 1 ml örnek 5 cm çaplı bu alana aktarılır, koruyucu tabaka kapatılır ve özel bir aparatla bu hacmin tüm alana yeknesak olarak dağılması sağlanır. Standart inkübasyon sonunda koloniler sayılarak işlem bitirilir. Petri film yönteminin en büyük üstünlükleri laboratuvarında

besiyeri hazırlamaya gerek kalmaması, cam petrilerde olduğu gibi yıkama zorunluğunun olmaması, 1 ml örnek aktarıldığı için analiz duyarlılığının standart yayma yönteminden 10 misli fazla olması, inkübatörde standart petri kutuları ile kıyaslanmayacak kadar az yer kaplaması ve gerektiğinde bunların kurutularak saklanabilmesidir. Farklı mikroorganizma grupları için (toplam aerobik mezofilik bakteri, koliform grup, maya - küf vb.) farklı besiyerleri sağlanabilmektedir.



Koloni sayım metodu