

Bu kitaba sığmayan daha neler var!

eba
www.eba.gov.tr



Karekodu okut, bu kitapla
ilgili EBA içeriklerine ulaş!

Teknoloji Yolculuğumuz



**BU DERS KİTABI MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞINCA
ÜCRETSİZ OLARAK VERİLMİŞTİR.
PARA İLE SATILAMAZ.**

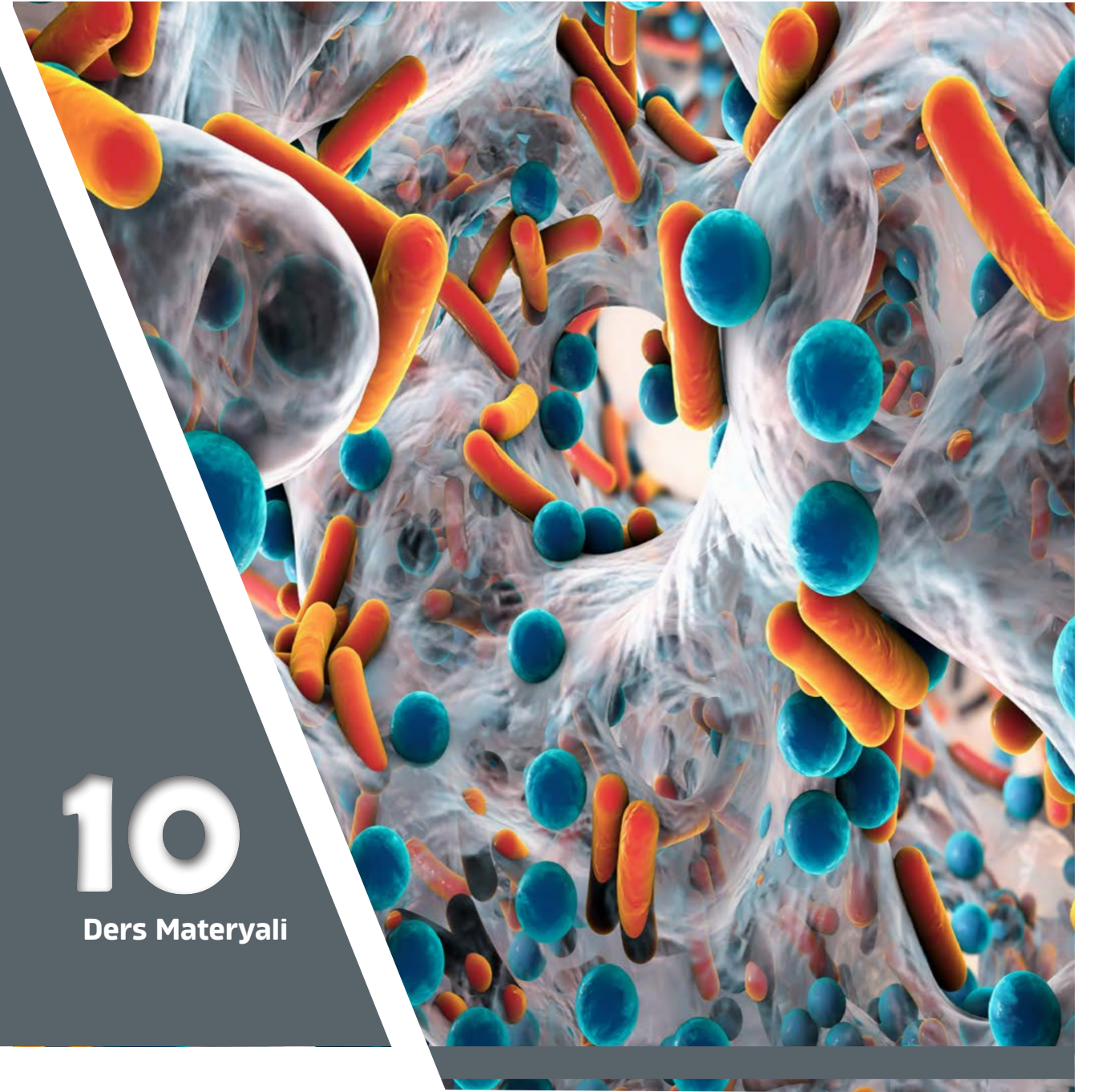
ISBN: 978-975-11-6333-2

Bandrol Uygulamasına İlişkin Usul ve Esaslar Hakkında Yönetmeliğin Beşinci Maddesinin
İkinci Fıkrası Çerçevesinde Bandrol Taşınması Zorunlu Değildir.

LABORATUVAR HİZMETLERİ ALANI MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER 10 DERS MATERYALI

MESLEKİ VE TEKNİK ANADOLU LİSESİ
LABORATUVAR HİZMETLERİ ALANI

MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER



10
Ders Materyali



MESLEKİ VE TEKNİK ANADOLU LİSESİ
LABORATUVAR HİZMETLERİ ALANI

MİKROBİYOLOJİK **ANALİZLER**

10

DERS MATERYALİ

YAZARLAR

Cansu ATICI

Fikret ERDEM

Mehmet TAÇYILDIZ



MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI YAYINLARI : 8010
YARDIMCI VE KAYNAK KİTAPLAR DİZİSİ : 1938

Her hakkı saklıdır ve Millî Eğitim Bakanlığına aittir. Ders materyalinin metin, soru ve şekilleri kısmen de olsa hiçbir surette alınıp yayımlanamaz.

	HAZIRLAYANLAR
DİL UZMANI	Şükran ERTAŞ
REHBERLİK UZMANI	Sümeyye Betül HALLAK
PROGRAM GELİŞTİRME UZMANI	Seçkin Seçil BAŞARAN
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME UZMANI	Fatma YILMAZ
GÖRSEL TASARIM UZMANI	Mehmet ÖZKARABULUT

ISBN
978-975-11-6333-2

Millî Eğitim Bakanlığının 24.12.2020 gün ve 18433886 sayılı oluru ile Mesleki ve Teknik Eğitim Genel Müdürlüğünce ders materyali olarak hazırlanmıştır.



İSTİKLÂL MARŞI

Korkma, sönmez bu şafaklarda yüzen al sancak;
Sönmeden yurdumun üstünde tüten en son ocak.
O benim milletimin yıldızıdır, parlayacak;
O benimdir, o benim milletimindir ancak.

Çatma, kurban olayım, çehreni ey nazlı hilâl!
Kahraman ırkıma bir gül! Ne bu şiddet, bu celâl?
Sana olmaz dökülen kanlarımız sonra helâl.
Hakkıdır Hakk'a tapan milletimin istiklâl.

Ben ezelden beridir hür yaşadım, hür yaşarım.
Hangi çılgın bana zincir vuracakmış? Şaşarım!
Kükremiş sel gibiyim, bendimi çiğner, aşarım.
Yırtarım dağları, enginlere sığmam, taşarım.

Garbın âfâkını sarmışsa çelik zırhlı duvar,
Benim iman dolu göğsüm gibi serhaddim var.
Ulusun, korkma! Nasıl böyle bir imanı boğar,
Medeniyet dediğin tek dişi kalmış canavar?

Arkadaş, yurduma alçakları uğratma sakın;
Siper et gövdeni, dursun bu hayâsızca akın.
Doğacaktır sana va'dettiği günler Hakk'ın;
Kim bilir, belki yarın, belki yarından da yakın.

Bastığın yerleri toprak diyerek geçme, tanı:
Düşün altındaki binlerce kefensiz yatanı.
Sen şehit oğlusun, incitme, yazıktır, atanı:
Verme, dünyaları alsan da bu cennet vatanı.

Kim bu cennet vatanın uğruna olmaz ki feda?
Şüheda fışkıracak toprağı sıksan, şüheda!
Cânı, cânânı, bütün varımı alsın da Huda,
Etmesin tek vatanımdan beni dünyada cüda.

Ruhumun senden İlahî, şudur ancak emeli:
Değmesin mabedimin göğsüne nâmahrem eli.
Bu ezanlar -ki şehadetleri dinin temeli-
Ebedî yurdumun üstünde benim inlemeli.

O zaman vecd ile bin secde eder -varsa- taşım,
Her cerihamdan İlahî, boşanıp kanlı yaşım,
Fışkırır ruh-ı mücerret gibi yerden na'sım;
O zaman yükselerek arşa değer belki başım.

Dalgalan sen de şafaklar gibi ey şanlı hilâl!
Olsun artık dökülen kanlarımın hepsi helâl.
Ebediyyen sana yok, ırkıma yok izmihlâl;
Hakkıdır hür yaşamış bayrağımın hürriyet;
Hakkıdır Hakk'a tapan milletimin istiklâl!

Mehmet Âkif Ersoy

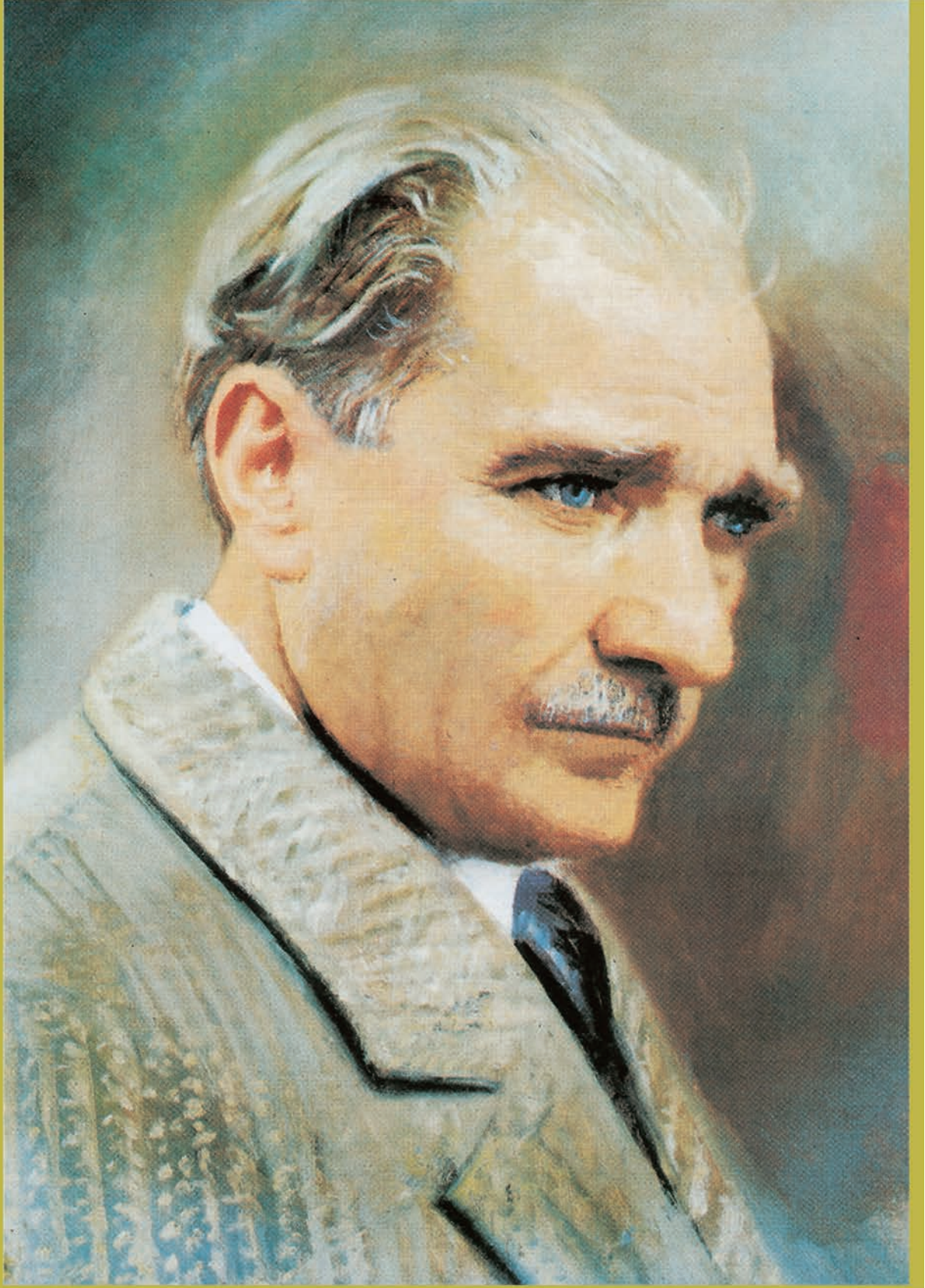
GENÇLİĞE HİTABE

Ey Türk gençliği! Birinci vazifen, Türk istiklâlini, Türk Cumhuriyetini, ilelebet muhafaza ve müdafaa etmektir.

Mevcudiyetinin ve istikbalinin yegâne temeli budur. Bu temel, senin en kıymetli hazinendir. İstikbalde dahi, seni bu hazineden mahrum etmek isteyecek dâhilî ve hâricî bedhahların olacaktır. Bir gün, istiklâl ve cumhuriyeti müdafaa mecburiyetine düşersen, vazifeye atılmak için, içinde bulunacağın vaziyetin imkân ve şeraitini düşünmeyeceksin! Bu imkân ve şerait, çok namüsaî bir mahiyette tezahür edebilir. İstiklâl ve cumhuriyetine kastedecek düşmanlar, bütün dünyada emsali görülmemiş bir galibiyetin mümessili olabilirler. Cebren ve hile ile aziz vatanın bütün kaleleri zapt edilmiş, bütün tersanelerine girilmiş, bütün orduları dağıtılmış ve memleketin her köşesi bilfiil işgal edilmiş olabilir. Bütün bu şeraitten daha elîm ve daha vahim olmak üzere, memleketin dâhilinde iktidara sahip olanlar gaflet ve dalâlet ve hattâ hıyanet içinde bulunabilirler. Hattâ bu iktidar sahipleri şahsî menfaatlerini, müstevlîlerin siyasî emelleriyle tevhit edebilirler. Millet, fakr u zaruret içinde harap ve bîtap düşmüş olabilir.

Ey Türk istikbalinin evlâdı! İşte, bu ahval ve şerait içinde dahi vazifen, Türk istiklâl ve cumhuriyetini kurtarmaktır. Muhtaç olduğun kudret, damarlarındaki asil kanda mevcuttur.

Mustafa Kemal Atatürk



MUSTAFA KEMAL ATATÜRK

1

ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROORGANİZMALARIN ÖZELLİKLERİ	19
1.1. BAKTERİLER	20
1.1.1. Mikroorganizmalar	20
1.1.2. Mikroorganizmaların Sınıflandırılması	21
1.1.2.1. Hücre Yapılarına Göre Mikroorganizmalar	21
1.1.2.2. Oksijen İhtiyaçlarına Göre Mikroorganizmalar	21
1.1.2.3. Sıcaklık İhtiyaçlarına Göre Mikroorganizmalar	22
1.1.3. Mikroorganizmaların İsimlendirilmesi	22
1.1.4. Mikroorganizmaların Gelişimlerine Etki Eden Faktörler	22
1.1.5. Bakterilerin Özellikleri.....	23
1.1.6. Bakterilerin Hücre Yapısı	24
1.1.7. Bakterilerin Morfolojik Özellikleri	25
1.1.8. Bakterilerde Üreme	25
1.2. FUNGUSLAR	28
1.2.1. Mayalar	28
1.2.2. Küfler	29
1.3. VİRÜSLER	32
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	34

2

ÖĞRENME BİRİMİ



STERİLİZASYON VE DEZENFEKSİYON	35
2.1. ASEPTİK ÇALIŞMA TEKNİĞİ	36
2.1.1. Aseptik Tekniğin Amacı ve Önemi	36
2.1.2. Mikrobiyoloji Laboratuvarı Çalışma Kuralları	36
2.2. STERİLİZASYON HAZIRLIĞI	42
2.2.1. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kullanılan Araç Gereçler	42
2.2.2. Sterilizasyon ve Önemi	44
2.2.3. Malzemelerin ve Çözeltilerin Sterilizasyon Hazırlığı	44
2.3. IŞINLA, BUHARLA VE KURU ISIL İŞLEMLE STERİLİZASYON	48
2.3.1. Isıl İşlem Uygulamaları ile Sterilizasyon	48
2.3.2. Işınlama (Radyasyon) ile Sterilizasyon	49
2.4. KİMYASAL MADDELERLE STERİLİZASYON VE DEZENFEKSİYON	54
2.4.1. Dezenfeksiyon ve Önemi	54
2.4.2. Dezenfeksiyon Amacıyla Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
2.4.3. Dezenfektanların Taşınması Gereken Özellikler	55
2.4.4. Çalışma Ortamında Dezenfeksiyon ve Antisepsi	56
2.4.5. Sterilizasyon Amacıyla Kullanılan Kimyasal Maddeler	56
2.5. MEKANİK YÖNTEMLERLE STERİLİZASYON	58
2.5.1. Filtrasyon Yöntemi ile Sterilizasyon	58
2.5.2. Ultrasonik Vibrasyon Yöntemi ile Sterilizasyon	58
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	63

3

ÖĞRENME BİRİMİ



BESİYERİ HAZIRLAMA	65
3.1. BESİYERİ HAZIRLAMA ÖN İŞLEMLERİ	66
3.1.1. Besiye hazırlama Sınıflandırılması	66
3.1.1.1. Genel Besiye hazırlama	66
3.1.1.2. Fiziksel Özelliklerine Göre Besiye hazırlama	67
3.1.1.3. Kullanım Amaçlarına Göre Besiye hazırlama	67
3.1.2. Laboratuvar ortamında Kullanılan Hazır Besiye hazırlama	68
3.1.2.1. Dehidre Besiye hazırlama	68
3.1.2.2. Kullanıma Hazır Besiye hazırlama	69
3.1.3. Besiye hazırlama Sahip Olması Gereken Özellikler	69
3.1.4. Besiye hazırlama Hazırlamada Ön İşlemler	70
3.2. BESİYERİ HAZIRLAMA İŞLEMLERİ	73
3.2.1. Tartım	73
3.2.2. Çözündürme	73
3.2.3. pH Ayarlama	73
3.2.4. Sterilizasyon	74
3.3. BESİYERLERİNDE STERİLİZASYON SONRASI İŞLEMLER	77
3.3.1. Sterilizasyon Kontrolü	77
3.3.2. Katkı Maddelerinin Eklenmesi	77
3.3.3. Agarlı Besiye hazırlama Petri Kutularına Dökülmesi	78
3.3.4. Tüpte Agarlı Besiye hazırlama hazırlanması	78
3.3.5. Besiye hazırlama yüzey Kurutma İşlemi	79
3.3.6. Hazırlanmış Besiye hazırlama Muhafazası	79
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	81

4

ÖĞRENME BİRİMİ



DİLÜSYON HAZIRLAMA	83
4.1. DİLÜSYON SIVISI (SEYRELTME ÇÖZELTİSİ) HAZIRLAMA	84
4.1.1. Dilüsyon Oranı ve Dilüsyon Faktörü	85
4.1.2. Dilüsyon Sıvıları	85
4.2. ANALİZ NUMUNESİ HAZIRLAMA	90
4.2.1. Mikrobiyolojik İnceleme Numunesi Alımında Dikkat Edilmesi Gereken Genel İlkeler	90
4.2.2. Numunenin Laboratuvara Kabulü	90
4.2.3. Ambalajın Açılması	91
4.2.4. Homojenizasyon İşlemi	93
4.2.4.1. Manyetik Karıştırıcı ve Tüp Karıştırıcı ile Homojenizasyon İşlemi	94
4.2.4.2. Blender ile Homojenizasyon İşlemi	95
4.2.4.3. Stomacher ile Homojenizasyon İşlemi	96

4.3. DİLÜSYON SERİSİ HAZIRLAMA	99
4.3.1. Sıvı Numuneden Desimal (Ondalık) Dilüsyon Serisi Hazırlama	99
4.3.2. Sıvı Numuneden İki Katlı Dilüsyon Serisi Hazırlama	100
4.3.3. Katı Numuneden Desimal Dilüsyon Serisi Hazırlama	100
4.3.4. Dilüsyon Serileri Hazırlanırken Dikkat Edilecek Noktalar	101
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	103

5

ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROBİYOLOJİK KÜLTÜR	105
5.1. EKİM İŞLEMİ (İNOKÜLASYON)	104
5.1.1. Tüpteki Sıvı Besiyerine Ekim Yöntemleri	106
5.1.2. Petri Kutusundaki Katı Besiyerine Ekim Yöntemleri	109
5.1.2.1. Dökme Plak Yöntemi	109
5.1.2.2. Yayma Plak Yöntemi	110
5.1.2.3. Sürme Yöntemi	110
5.1.2.4. Petri Kutusuna Ekim Bilgilerinin Yazılması	112
5.1.3. Tüpteki Katı Besiyerine Ekim Yöntemleri	118
5.1.3.1. Tüpteki Yatık Besiyerine Yüzey Ekimi	118
5.1.3.2. Tüpteki Yatık Besiyerine Özeyle Saplama ve Yüzey Ekimi ..	118
5.1.3.3. Tüpteki Yumuşak Agarlı Dik Besiyerine Saplama Yöntemi ile Ekim	118
5.1.4. Yüzeyden Alınan Numunelerde Uygulanan Ekim Yöntemleri	120
5.2. İNKÜBASYON	122
5.2.1. İnkübatörde İnkübasyon İşlemi	122
5.2.2. Su Banyosunda İnkübasyon İşlemi	123
5.3. İNKÜBASYON SONU DEĞERLENDİRME	125
5.3.1. Katı Besiyerinde İnkübasyon Sonu Koloni Morfolojilerinin İncelenmesi	125
5.3.1.1. Bakterilerin Koloni Morfolojileri	125
5.3.1.2. Küf ve Mayaların Koloni Morfolojileri	127
5.3.1.3. Deney Tüpündeki Katı Besiyerinde Makroskobik İnceleme ve Hareket Muayenesi.....	128
5.3.2. Sıvı Besiyerinde İnkübasyon Sonu Makroskobik İnceleme	128
5.4. SAF KÜLTÜR ELDE ETME VE KÜLTÜRLERİN MUHAFAZASI	131
5.4.1. Saflık Kontrolü	131
5.4.2. Saf Kültürlerin Muhafazası	131
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	133

6

ÖĞRENME BİRİMİ



BOYAMA YÖNTEMLERİ	135
6.1. PREPARAT HAZIRLAMA	136
6.1.1. Yaş Preparat Hazırlama	136
6.1.2. Kuru Preparat Hazırlama	136
6.2. DİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ	139
6.2.1. Boya Çözeltileri	139
6.2.2. Basit Boyama	140
6.2.3. Gram Boyama	141
6.2.4. Spor Boyama	142
6.2.5. Aside Dirençli Bakterilerde (ARB) Boyama	142
6.2.6. Kapsül Boyama	142
6.2.7. Saklama Preparatı Hazırlama	142
6.3. İNDİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ	149
6.3.1. Yaş Preparasyon Tekniği ile Negatif Boyama	149
6.3.2. Yayma Yöntemi ile Negatif Boyama	149
6.3.3. Negatif Diferensiyel (Ayırt Edici) Boyama	149
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	153

7

ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROSKOBİK İNCELEME	155
7.1. PREPARAT İNCELEME	156
7.1.1. Mikroskop Çeşitleri	156
7.1.2. Mikroskopun Kısımları	157
7.1.3. Mikroskop Kullanımında Dikkat Edilecek Noktalar	157
7.1.4. Mikroskopun Temizliği ve Bakımı	158
7.1.5. Mikroskop Kullanımı	158
7.2. MİKROSKOPLA ÖLÇÜM	162
7.2.1. Oküler ve Objektif Mikrometre	162
7.2.2. Oküler Mikrometre Cetvelinin Birim Değerinin Bulunması	162
7.2.3. Oküler Mikrometre ile Ölçümü Yapılan Nesnelerin Gerçek Boyutlarının Hesaplanması	164
7.3. MİKROORGANİZMALARDA HAREKET	166
7.3.1. Bakterilerde Hareket	166
7.3.2. Asılı Damla Yöntemi ile Bakterilerde Hareket Muayenesi	166
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	169

8

ÖĞRENME BİRİMİ



KÜLTÜREL SAYIM	171
8.1. KÜLTÜREL SAYIM YÖNTEMLERİ	172
8.1.1. Dökme Plak Yöntemi ile Kültürel Sayım	172
8.1.2. Petri Kutusunda Koloni Sayımı	172
8.1.2.1. Koloni Sayıcı Kullanımı	173
8.1.3. Sayım Sonuçlarının Hesaplanması	174
8.2. YAYMA PLAK YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM	178
8.3. EN MUHTEMEL SAYI (EMS) YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM	181
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	187

9

ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROSKOBİK SAYIM	189
9.1. BREED YÖNTEMİ İLE BAKTERİ SAYIMI	190
9.1.1. Mikroskop Faktörünün Belirlenmesi	190
9.1.2. Breed Yöntemi ile Sayımda Dikkat Edilecek Hususlar ve Hesaplama	191
9.2. THOMA LAMI İLE MAYA SAYIMI	197
9.2.1. Thoma Lamının Özellikleri ve Kullanımı	197
9.2.2. Mayalarda Yüzde (%) Canlılık Testi	200
9.3. HOWARD LAMI İLE KÜFLÜ SAHA SAYIMI	202
9.3.1. Howard Lam ve Lamelinin Özellikleri ve Kullanımı	202
9.3.2. Numunenin Refraktometre Yardımıyla Kuru Madde Oranının	
Ayarlanması	203
9.3.3. Küf Hiflerinin Diğer Yapılardan Ayırt Edilmesi	205
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	207

10

ÖĞRENME BİRİMİ



İNDİKATÖR VE PATOJEN MİKROORGANİZMA SAYIMI	209
10.1. İNDİKATÖR MİKROORGANİZMA SAYIMI	210
10.1.1. Patogen Mikroorganizma ve İndikatör Mikroorganizma	
Kavramı	210
10.1.2. Toplam Canlı Mikroorganizma Sayımı	212
10.1.3. Toplam <i>Enterobacteriaceae</i> Sayımı	212
10.1.3.1. Katı Besiyerinde Toplam <i>Enterobacteriaceae</i> Sayımı	213
10.1.4. Toplam Koliform, Fekal Koliform ve <i>E.coli</i> Sayımı	215
10.1.4.1. Katı Besiyerinde Toplam Koliform Sayımı	216
10.1.4.2. Katı Besiyerinde Fekal Koliform Sayımı	216

10.1.4.3. Katı Besiyerinde <i>E.coli</i> sayımı	217
10.2. PATOJEN MİKROORGANİZMA SAYIMI	224
10.2.1. <i>Salmonella</i> spp. Hakkında Genel Bilgiler	224
10.2.1.1. <i>Salmonella</i> spp. Aranması	225
10.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> Hakkında Genel Bilgiler	225
10.2.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> Aranması	228
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	232

11

ÖĞRENME BİRİMİ



BİYOKİMYASAL TESTLER	235
11.1. RENK DEĞİŞİMİNE BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER	236
11.1.1. İndol Testi	236
11.1.2. Metil Kırmızısı Testi	236
11.1.3. Voges-Proskauer (VP) Testi	237
11.1.4. Sitrat Testi	237
11.1.5. İMVİC Testi	237
11.1.6. Oksidaz Testi	237
11.1.7. Fosfotaz Testi	238
11.1.8. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Testi	238
11.1.9. Üreaz Testi	239
11.2. GAZ VEYA HAVA KABARCIĞI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER	244
11.2.1. Katalaz Testi	244
11.2.2. Eijkman Testi	244
11.2.3. Karbonhidrat Fermantasyon Testi	244
11.3. PIHTI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER	248
11.3.1. Koagülaz Testi	248
11.3.2. Aglütinasyon Testi	248
11.3.3. Jelatin Hidroliz Testi	248
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	251

12

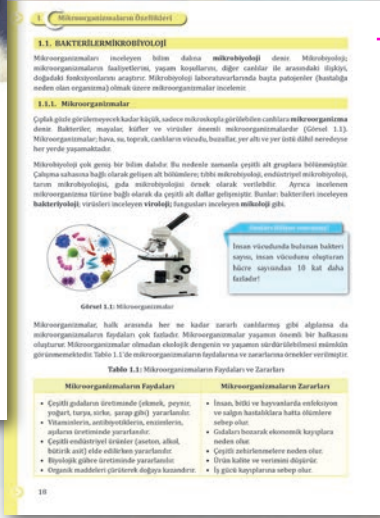
ÖĞRENME BİRİMİ



ANTİMİKROBİYAL MADDE TESTLERİ	253
12.1. DİSK DİFÜZYON (ANTİBİYOGRAM) TESTİ	254
12.1.1. Antibiyotiklerin Aktivitesi	255
12.1.2. Antibiyogram Testinin Yapılışı	256
12.1.2.1. Besiyerinin Hazırlanması	256
12.1.2.2. Örnek Alma ve Kültür Oluşturma	256
12.1.2.3. İnokülümün Hazırlanması	257
12.1.2.4. İnokülümün Standardizasyonu	257
12.1.2.5. Mcfarland Standardının Hazırlanması	258
12.1.2.6. Ekim İşleminin Yapılması	253
12.1.2.7. Antimikrobiyal Disklerin Yerleştirilmesi	258
12.1.2.8. İnkübasyon İşlemi	259
12.1.2.9. Zonların Ölçümü ve Duyarlılığın Değerlendirilmesi .	260
12.1.3. E-test	260
12.2. TÜP DİLÜSYON (ETKİNLİK) TESTİ	262
12.2.1. Tüp Dilüsyon Testinin Yapılışı	262
12.2.1.1. Antimikrobiyal Madde Çözeltisi Hazırlama	262
12.2.1.2. Tüp Dilüsyon İçin Besiyerinin Hazırlanması	263
12.2.1.3. Katlı Dilüsyon Hazırlama	263
12.2.1.4. İnokülüm Hazırlanması	264
12.2.1.5. Bakteri İnokülasyonu ve İnkübasyonu	264
12.2.1.6. MİK ve MLK Değerinin Belirlenmesi	264
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	267
CEVAP ANAHTARI.....	269
KAYNAKÇA.....	270

DERS MATERYALİNİN TANITIMI

Her öğrenme biriminin başında o birime ilişkin ilgi çekici görsel, konular, neler öğrenileceği, öğrenme biriminin içerdiği temel kavramlar, birlikte düşünelim bölümlerine yer verilmiştir.

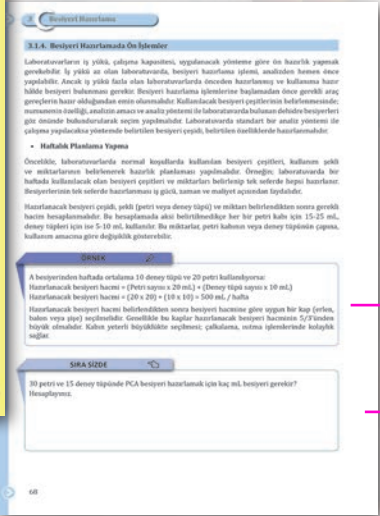


Her öğrenme biriminin başında o birim ile ilgili konu başlığı, konuyla ilgili açıklayıcı ve detaylı bilgi ve konularla ilişkili görseller bulunmaktadır.

Karekod okuyucu ile taratarak resim, video, animasyon, soru ve çözümleri vb. ilave kaynaklara ulaşabileceğiniz karekod. Detaylı bilgi için <http://kitap.eba.gov.tr/karekod>



Bu alanda, bilgi dağarcığınızın zenginleştirilmesi için konu ile ilgili ilginç bilgilere yer verilmiştir.



Konunun hemen arkasından konuyu pekiştirmek amacıyla hazırlanan çözümlü örnek sorular bulunmaktadır.

Bazı öğrenme birimlerinde o konuyla alakalı yaparak yaşayarak öğrenmeniz için Sıra Sizde etkinlikleri hazırlanmıştır.

5. UYGULAMA

VİRÜSLERLE İLGİLİ SUNUM / ÖĞRETİM MATERYALİ HAZIRLAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak virüslerle ilgili sunum çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlerle göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç Bilgisayar, etkileşimli tahta/projeeksiyon, İnternet, kitap.

İşlem Basamakları

1. Virüslerin özellikleri hakkında bilgi toplayınız.
 - Temel mikrobiyoloji konusuna içeren basılı veya dijital kaynaklardan faydalanınız.
2. Virüslerle ilgili görseller bulunuz.
3. Gıda, tarım ve sağlık açısından önemli virüsler hakkında bilgi toplayınız.
 - Çevrenizi gözlemleyerek virüslerin etkilerini (griyal enfeksiyon gibi) not alınız.
 - Çevrenizde Covid 19 hastalığına yakalanmış ve atılmış kişilerden hastalıkla ilgili bilgi alınız.
 - Viral hastalıklarla mücadele etmede etkin yöntemler hakkında bilgi toplayınız (Görsel 1.16).
4. Araştırma sonuçlarını sunu haline getiriniz.
 - Sunu hazırlamada arkadaşlarınızla iş birliği yapınız.
 - Sunu hazırlama programları kullanınız.
 - Sunumun konu bütünlüğüne dikkat ediniz.
5. Sunum yapınız.
 - Sunuma başlamadan önce arkadaşlarınızı selamlayınız.
 - Arkadaşlarınıza karşı kibar ve saygılı olunuz.
 - Sunuya başlatırken yaptığınız çalışmalar hakkında bilgi veriniz.



Görsel 1.16: Virüslerle mücadele

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ

	Çok İyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1. Basılı veya dijital kaynaklardan faydalandı.				
2. Konu ile ilgili gözlem yaptı.				
3. Edindiği bilgileri kullandı.				
4. Sunu hazırladı.				
5. Sunum yaptı.				
TOPLAM PUAN				

Bu bölümler, laboratuvar çalışması olarak sınıflandırılmıştır. Bazı laboratuvar ve uygulama etkinlikleri bildiğiniz kavramlardan hareketle yeni kavramları keşfetmeniz, bazıları da yaparak yaşayarak öğrenmeniz için hazırlanmıştır.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

Her yerde bulunan gözle görülemeyecek kadar küçük canlılara denir. İnsanları inceleyen bilim dalına denir. İki mayızla hücre yapısına sahiptirler. Oksijensiz hem oksijensiz ortamda gelişebilen mikroorganizmalara denir. Mikroorganizmaların beslenmesi için ortamda bulunması gerekir. Hareketin hareket etmesini sağlayan organelidir. Gösteri bölümünde incelenen tek hücreli mikroorganizmalara denir. Alınma sırasında çukuk bakterilerin zincir pektini almasıyla oluşur. Asilerde adı verilen proteinden yapılmış bir kök bulunmaktadır. Palar, tipik üreme pekti olan ile ürerler.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevabını işaretleyiniz.

11. Sıcak su kaynaklarında gelişim gösteren mikroorganizma sınıfı aşağıdakilerden hangisidir?
 - A) Aerotolerant
 - B) Mezofil
 - C) Mikroaerofil
 - D) Psikrotofil
 - E) Termofil
12. Aşağıdakilerden hangisi virüsleri inceleyen bilim dalıdır?
 - A) Algoloji
 - B) Filoloji
 - C) Parazitoloji
 - D) Protozooloji
 - E) Viroloji
13. Bakterilerin sahip olduğu hücre tipi aşağıdakilerden hangisidir?
 - A) Aerob
 - B) Okaryot
 - C) Prion
 - D) Prokaryot
 - E) Prototro
14. Bazı küfler gıda maddeleri üzerinde çoğaldıkları ortamı zehirli metabolitler bırakır bunlara ne denir?
 - A) Pestisit
 - B) Andidot
 - C) Toksin
 - D) Okratoksin
 - E) Mikotoksin
15. Hiflerin bir araya gelmesiyle oluşan iplikçi yapılar ne ad verilir?
 - A) Cim
 - B) Hif
 - C) Mikelyum
 - D) Septa
 - E) Septum
16. 2020 yılında tüm dünyada salgın ilan edilmesine sebep olan virüs hangisidir?
 - A) Ebola
 - B) Sars-Cov-2
 - C) İnfluenza
 - D) Rota
 - E) HIV
17. Oksijensiz ortamda aşağıdaki mikroorganizma türlerinden hangisi üşşemez?
 - A) Aerob
 - B) Anaerob
 - C) Fakültatif
 - D) Aerotolerant
 - E) Mezofil
18. Vegetatif hücreye göre dış etkilere karşı daha dayanıklı olan ve uygun koşullarda vegetatif hücreye dönüşen yapıya ne ad verilir?
 - A) Endospor
 - B) Hücre duvarı
 - C) Kapsid
 - D) Koloni
 - E) Sitoplazmik zar
19. Aşağıdaki bakteri isimlerinden hangisi doğru yazılmıştır?
 - A) BACILLUS CEREUS
 - B) Bacillus Cereus
 - C) Bacillus cereus
 - D) bacillus Cereus
 - E) bacillus cereus
20. Mayalarla ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?
 - A) Mayalar genel olarak fakültatif anaerobiktirler.
 - B) Tek hücreli funguslardır.
 - C) Mikroskopta yuvartak şeklinde görünür.
 - D) Mayaların boyutları, genellikle bakterilerden daha büyüktür.
 - E) Mayalarda kumpi adında hareket organeli bulunur.

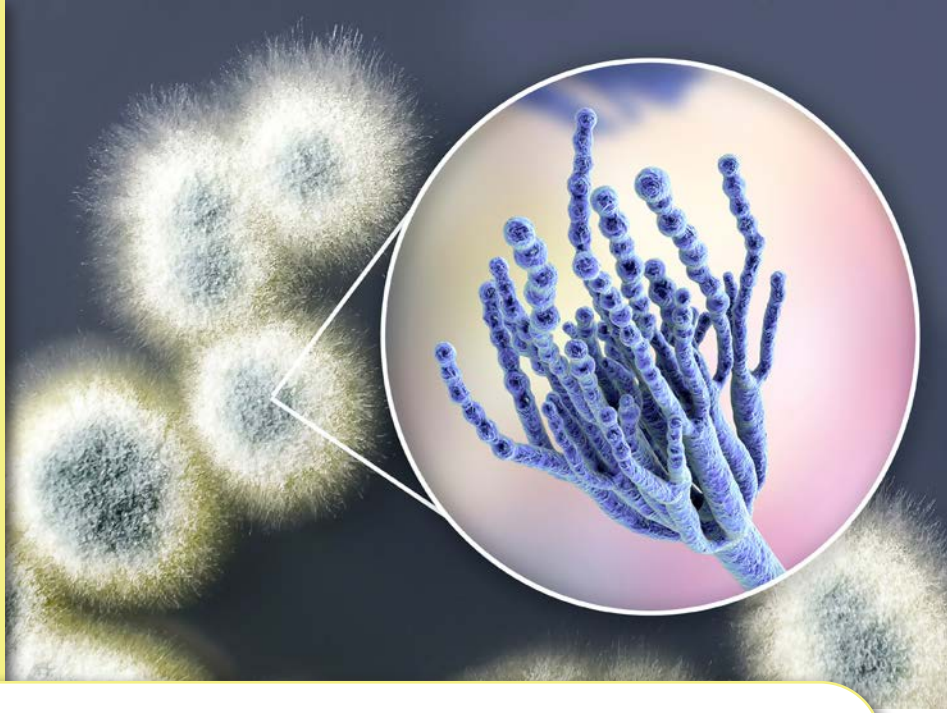
Her öğrenme biriminin sonuna o birim ile ilgili farklı tarzlarda sorular (boşluk doldurma, çoktan seçmeli ve açık uçlu) hazırlanmıştır. Bu soruları çözerek hem ilgili kazanımları öğrenmeniz hem de bilimsel okuryazarlık kazanmanız hedeflenmiştir.

GÜVENLİK İŞARETLERİ

Laboratuvar çalışmalarında meydana gelebilecek tehlikelere karşı uyarı amacıyla güvenlik piktogramları kullanılmaktadır. Bu piktogramlar aşağıda açıklanmıştır. Uygulama faaliyetlerinde ilgili piktogramların laboratuvar panosuna asılması önerilir. Mevzuat gereği uygulama faaliyetlerine katılacakların iş sağlığı ve güvenliği eğitimlerini tamamlamış olmaları gereklidir.

	Göz Güvenliği Bu piktogram, çalışma sırasında gözler için tehlike oluşabileceğini gösterir. Koruyucu gözlük kullanılmalıdır.		Yangın Güvenliği Bu piktogram, çalışma sırasında yangına sebep olabilecek maddelerin kullanılacağını gösterir. Gerekli önlemler alınmalıdır.
	Isı Güvenliği Bu piktogram, sıcak cisimlere veya yüzeylere dokunulacağı zaman önlem alınması gerektiğini gösterir. Isıya dayanıklı eldiven kullanılmalıdır.		Sıcak Cisim Güvenliği Bu piktogram, çalışma sırasında sıcak bir yüzey veya cismin olduğunu ve teması hâlinde yanıklara sebep olacağını gösterir. Dikkatli çalışılmalı ve gerekli önlemler alınmalıdır.
	Kırılabilir Cam Güvenliği Bu piktogram, bazı malzemelerin kırılabileceğini ve kırıklarının tehlike oluşturabileceğini gösterir. Dikkatli kullanılmalıdır.		Kesici / Delici Cisim Güvenliği Bu piktogram, çalışma sırasında kesici/delici araç kullanılacağını gösterir. Dikkatli çalışılmalıdır.
	Duman Güvenliği Bu piktogram, çalışma sırasında tehlikeli gazlar oluşabileceğini gösterir. Risk düzeyine uygun maske kullanılmalıdır.		Yanıcı, Parlayıcı Bu piktogram, yanıcı ve ateşi şiddetlendirme özelliğine sahip olduğunu gösterir. Tutuşturucularla temas etmemesi için gerekli önlemler alınmalıdır.
	Tahriş Edici Bu piktogram, kullanılacak bazı maddelerin deriye ve göze zarar verebileceğini gösterir. Direkt temas edilmemeli, gerekli önlemler alınmalıdır.		Korozyon (Aşındırıcı) Bu piktogram, çalışma sırasında aşındırıcı maddelerin kullanılacağını gösterir. Göz ve derinin zarar görmemesi için gerekli önlemler alınmalıdır.
	Zehirli (Toksik) Bu piktogram, kullanılacak bazı maddelerin ağız, deri ve solunum yolu ile teması hâlinde zehirlenmelere sebep olacağını gösterir. Direkt temastan kaçınılmalıdır.		Çevreye Zararlı (Ekotoksik) Bu piktogram, çalışma sırasında doğadaki canlılara zararlı maddelerin kullanılacağını gösterir. Atıklar doğaya kontrolsüz dökülmemelidir.

1. ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROORGANİZMALARIN ÖZELLİKLERİ

TEMEL KAVRAMLAR

Mikrobiyoloji
Mikroorganizma
Bakteri
Fungus
Küf
Maya
Virüs
Aerob
Anaerob
Fakültatif
Mikroaerofil
Mezofil
Psikrofil
Termofil
Kok
Basıl
Hif
Miselyum



KONULAR

- 1.1. BAKTERİLER
- 1.2. FUNGUSLAR
- 1.3. VİRÜSLER

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Bakterilerin özelliklerini açıklamayı,
- Fungusların özelliklerini açıklamayı,
- Virüslerin özelliklerini açıklamayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Duyu organlarımızın (görme, işitme gibi) sınırlılıkları var mıdır? Belirli bir frekansın altında ve üstündeki sesleri duyabilir miyiz? Örneğin karıncanın ayak sesini veya gezegenlerin dönerken çıkardığı sesi...
2. Her sesi duyabilseydik veya her nesneyi görebilseydik bunların yaşam tarzımız üzerindeki etkileri nasıl olurdu?
3. Mikroorganizmaları çirkin ve zararlı gösteriyorlar. Acaba mikroorganizmalar gerçekten öyle mi görünür?
4. Küflenmiş bazı peynir türlerini yiyebildiğimiz halde küflenmiş ekmek veya salçayı yemiyoruz. Bunun sebebi sizce ne olabilir?

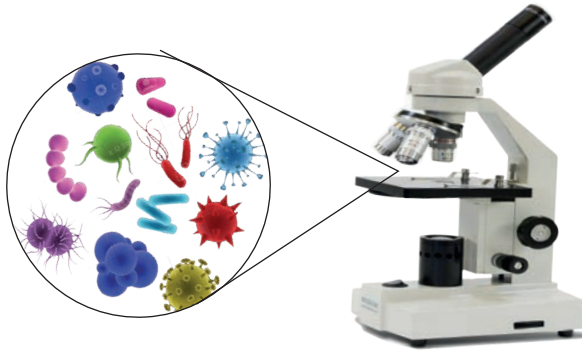
1.1. BAKTERİLER

Mikroorganizmaları inceleyen bilim dalına **mikrobiyoloji** denir. Mikrobiyoloji; mikroorganizmaların faaliyetlerini, yaşam koşullarını, diğer canlılar ile arasındaki ilişkiyi, doğadaki fonksiyonlarını araştırır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında başta patojenler (hastalığa neden olan organizma) olmak üzere mikroorganizmalar incelenir.

1.1.1. Mikroorganizmalar

Çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük, sadece mikroskopla görülebilen canlılara **mikroorganizma** denir. Bakteriler, mayalar, küfler ve virüsler önemli mikroorganizmalardır (Görsel 1.1). Mikroorganizmalar; hava, su, toprak, canlıların vücudu, buzullar, yer altı ve yer üstü dâhil neredeyse her yerde yaşamaktadır.

Mikrobiyoloji çok geniş bir bilim dalıdır. Bu nedenle zamanla çeşitli alt gruplara bölünmüştür. Çalışma sahasına bağlı olarak gelişen alt bölümlere; tıbbi mikrobiyoloji, endüstriyel mikrobiyoloji, tarım mikrobiyolojisi, gıda mikrobiyolojisi örnek olarak verilebilir. Ayrıca incelenen mikroorganizma türüne bağlı olarak da çeşitli alt dallar gelişmiştir. Bunlar: bakterileri inceleyen **bakteriyoloji**; virüsleri inceleyen **viroloji**; fungusları inceleyen **mikoloji** gibi.



Görsel 1.1: Mikroorganizmalar

Bunları Biliyor musunuz?

İnsan vücudunda bulunan bakteri sayısı, insan vücudunu oluşturan hücre sayısından 10 kat daha fazladır!

Mikroorganizmalar, halk arasında her ne kadar zararlı canlılar mış gibi algılansa da mikroorganizmaların faydaları çok fazladır. Mikroorganizmalar yaşamın önemli bir halkasını oluşturur. Mikroorganizmalar olmadan ekolojik dengenin ve yaşamın sürdürülebilmesi mümkün görünmemektedir. Tablo 1.1’de mikroorganizmaların faydalarına ve zararlarına örnekler verilmiştir.

Tablo 1.1: Mikroorganizmaların Faydaları ve Zararları

Mikroorganizmaların Faydaları	Mikroorganizmaların Zararları
• Çeşitli gıdaların üretiminde (ekmek, peynir, yoğurt, turşu, sirke, şarap gibi) yararlanılır. • Vitaminlerin, antibiyotiklerin, enzimlerin, aşılarda üretiminde yararlanılır. • Çeşitli endüstriyel ürünler (aseton, alkol, bütirik asit) elde edilirken yararlanılır. • Biyolojik gübre üretiminde yararlanılır. • Organik maddeleri çürüterek doğaya kazandırır.	• İnsan, bitki ve hayvanlarda enfeksiyon ve salgın hastalıklara hatta ölümlere sebep olur. • Gıdaları bozarak ekonomik kayıplara neden olur. • Çeşitli zehirlenmelere neden olur. • Ürün kalite ve verimini düşürür. • İş gücü kayıplarına sebep olur.

Laboratuvarlar, kontrollü çalışmaların yapıldığı yerlerdir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların morfolojileri (şekil, yapı, boyut olarak inceleme), yaşam koşulları, diğer canlılar üzerindeki etkileri araştırılır. Gerekğinde bu etkilerin giderilmesi için uygulanacak tedavi yöntemlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yapılır. Çalışanların, laboratuvarında mikroorganizmaları kontrol altında tutabilmesi için mikroorganizmaların yaşam koşullarını ve özelliklerini bilmesi gerekir. Duruma göre laboratuvarında uygun yaşam koşulları sağlayarak mikroorganizmalar çoğaltılır ya da yaşam koşullarını engelleyerek mikroorganizmalar yok edilir.

1.1.2. Mikroorganizmaların Sınıflandırılması

Sınıflandırma yapmanın amacı bu küçük canlıları daha kolay anlayabilmektir. Mikroorganizmalar farklı özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. En sık kullanılan sınıflandırma; hücre yapılarına, oksijen ve sıcaklık ihtiyaçlarına göre yapılandır.

1.1.2.1. Hücre Yapılarına Göre Mikroorganizmalar

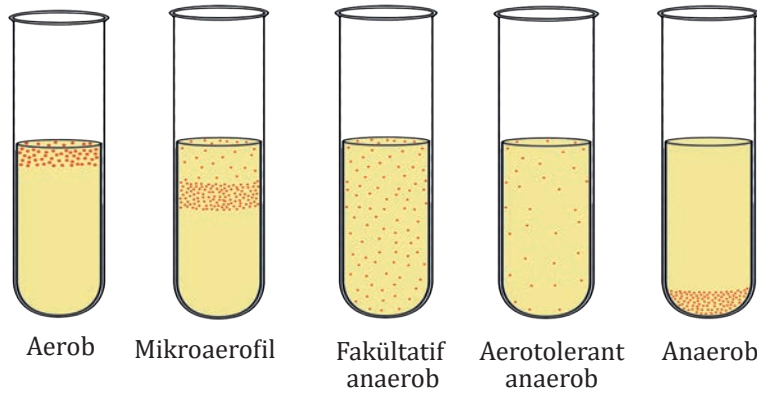
Mikroorganizmaları hücre yapılarına göre üç grupta incelemek mümkündür.

- Prokaryotik hücreye sahip olan mikroorganizmalar: bakteriler.
- Ökaryotik hücreye sahip olan mikroorganizmalar: küf, maya, alg ve protozoonlar.
- Hücre yapısı göstermeyen ve yaşamaları için metabolik faaliyetleri yetersiz olan (yaşayabilmeleri için canlı bir organizmaya ihtiyaç duyan) mikroorganizmalar: virüsler.

1.1.2.2. Oksijen İhtiyaçlarına Göre Mikroorganizmalar

Mikroorganizmaları oksijen ihtiyaçlarına göre beş grupta incelemek mümkündür.

- **Aerob Mikroorganizmalar:** Üremeleri için oksijene (%21) gereksinim duyarlar. Dik agar besiyerlerinde üretildiği zaman genellikle üst kısımda koloni oluşturur.
- **Mikroaerofil Mikroorganizmalar:** Üremeleri için daha az miktarda (%5) oksijen gerekenler bu gruptadır.
- **Fakültatif mikroorganizmalar:** Hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda gelişebilirler.
- **Aerotolerant Mikroorganizmalar:** Aslen oksijensiz ortamı seven ama oksijenli ortamda zayıf da olsa gelişebilen mikroorganizmalardır.
- **Anaerob Mikroorganizmalar:** Sadece oksijensiz ortamda üreyebilirler. Hatta oksijen zehir etkisi gösterir. Görsel 1.2'de oksijen gereksinimlerine göre mikroorganizmaların üremesi gösterilmiştir.



Görsel 1.2: Oksijen gereksinimlerine göre mikroorganizma gelişimleri

1.1.2.3. Sıcaklık İhtiyaçlarına Göre Mikroorganizmalar

Mikroorganizmaları sıcaklık ihtiyaçlarına göre üç grupta incelemek mümkündür.

- **Psikrofil Mikroorganizmalar**

Soğuk seven ve soğukta iyi gelişen mikroorganizmalardır. Minimum -5 °C'de, optimum 15-20 °C'de yaşayabilirler. Buzdolabındaki gıdaların bozulmasına neden olurlar. Örnek: *Pseudomonas fluorescens*.

- **Mezofil Mikroorganizmalar**

Ilık seven ve doğada en sık görülen mikroorganizmalardır. Minimum 10 °C, optimum 30-40 °C, maksimum ise 50 °C'de yaşarlar. İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan bakteriler bu grupta yer alır. Örnek: *Escherichia coli*.

- **Termofil Mikroorganizmalar**

Sıcak seven mikroorganizmalardır. Minimum 45 °C, optimum 45-70 °C ve maksimum 80-95 °C'de yaşayabilir. Isıl işleme direnç gösteren mikroorganizmalardır. Çoğunlukla spor oluştururlar. Örnek: *Mucor pusillus*.

1.1.3. Mikroorganizmaların İsimlendirilmesi

Mikroorganizmaların bilimsel adları iki kelimeden oluşmaktadır. İlk kelime mikroorganizmanın cinsini, ikinci kelime ise türünü göstermektedir. Cins ismi büyük harfle başlar ve genellikle mikroorganizmayı bulanın adını veya morfolojik, fizyolojik özelliklerinden birini ifade eden bir kelimeden oluşur. Tür adı ise mikroorganizmanın karakterlerinden birisini (koloni rengi, yerleştiği yer, oluşturduğu hastalık, biçim vs.) yansıtmaktadır.

Mikroorganizma isimleri italik, koyu renkte veya altları çizilerek yazılır. Örneğin *Bacillus cereus*, **Staphylococcus aureus**, Proteus vulgaris gibi. Mikroorganizma isimleri kısaltılırken cins isminin ilk harfi yazılarak kısaltılır. Örneğin *B. cereus*, S. aureus, **P. vulgaris** gibi.

1.1.4. Mikroorganizmaların Gelişimlerine Etki Eden Faktörler

Mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri, gelişip üreyebilmeleri için çeşitli besin ve ortam şartlarına ihtiyaçları vardır. Bu ihtiyaçlar mikroorganizmanın cins ve türüne bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Mikroorganizmaların gelişimleri üzerinde ortam sıcaklığı, pH, nem, oksijen, ozmotik basınç, radyasyon, besin çeşitliliği ve miktarları gibi faktörler etkilidir.

Mikroorganizmanın yaşamsal faaliyetlerini sürdürebildiği en düşük değere **minimum**, en yüksek değere **maksimum** ve en uygun (ideal) değere ise **optimal değer** denir. Optimal değer mikroorganizmaların en hızlı üreyip gelişebildikleri şartları ifade eder.

- **Besin Maddeleri**

Mikroorganizmaların yaşaması, gelişmesi ve çoğalması için çeşitli besin maddelerini alması gereklidir. Mikroorganizmalar bazı maddelere daha fazla ihtiyaç duyarlar. Bu maddelere makroelement (karbon, oksijen, hidrojen, nitrojen, sülfür, fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve demir) denir. Mikroorganizmaların daha az ihtiyaç duyduğu maddeler ise mikroelement (manganez, çinko, kobalt, molibden, nikel ve bakır) olarak adlandırılır.

- **Su (Nem)**

Mikroorganizmaların beslenmeleri için ortamda su bulunması gerekir. Çünkü besin maddelerinin hücre içine alınmasında, metabolitlerin dışarıya atılmasında su önemli rol oynar. Yüksek neme sahip gıdaların (yaş meyve, süt vb.) kurutulmuş gıdalara (kuru meyve, süt tozu) göre daha çabuk bozulmasının nedeni bu ortamlarda mikroorganizmaların daha kolay ve hızlı üreyebilmeleridir.

- **Ortam Sıcaklığı**

Mikroorganizmaların cins ve türüne bağlı olarak, sıcaklık istekleri ve dayanabildikleri sıcaklık değerleri farklılık gösterir. Sıcaklık ne kadar yükselirse mikroorganizma ölümleri o kadar artar. Mikroorganizmaların öldürülmesinde ısı uygulamalar sıkça başvurulan bir yöntemdir. Mikroorganizmalar, soğuk ortama sıcak ortamdan daha fazla dayanırlar. Donma noktasında bile yaşarlar, sadece gelişmeleri durur.

- **Ortamın pH'ı**

Mikroorganizmaların cins ve türüne bağlı olarak ihtiyaç duydukları pH değerleri farklılık gösterir. Bazı mikroorganizmalar asidik ortamda (maya, küf, laktobasil, asetobakter vs.), bazıları alkali ortamlarda (mikoplazma, toprak bakterileri, *V. cholera* vs.) daha iyi gelişirler. Patojen mikroorganizmaların çoğunluğu nötr değere yakın ortamları tercih ederler.

- **Osmotik Basıncı**

Mikroorganizmanın sitoplazması ile içinde bulunduğu ortamın konsantrasyonları eşitleninceye kadar karşılıklı madde geçişi söz konusudur. Bu geçiş konsantrasyonlar eşitleninceye (izotonik ortam) kadar devam eder. Mikroorganizmalar izotonik ortamda daha iyi ürerler. Ortamın konsantrasyonu daha düşük ise (hipotonik ortam) dışarıdan bakteri içine sıvı girerek bakteriyi şişirir, bu olaya **plasmoptiz** denir. Ancak ortamın konsantrasyonu daha yüksek ise (hipertonik ortam) bakterinin içinden dışarı fazla sıvının çıkması hücre büzülmesine neden olur. Bu olaya da **plasmoliz** denir.

- **Oksijen**

Mikroorganizmaların oksijen ihtiyacı türüne göre değişiklik göstermektedir. Bazı mikroorganizmalar gelişmek için oksijene (aerob), bazı mikroorganizmalar ise oksijensiz ortama (anaerob) ihtiyaç duyarlar. Bazıları da her iki ortamda (fakültatif) gelişme göstererek yaşamlarını sürdürürler.

- **Radyasyon**

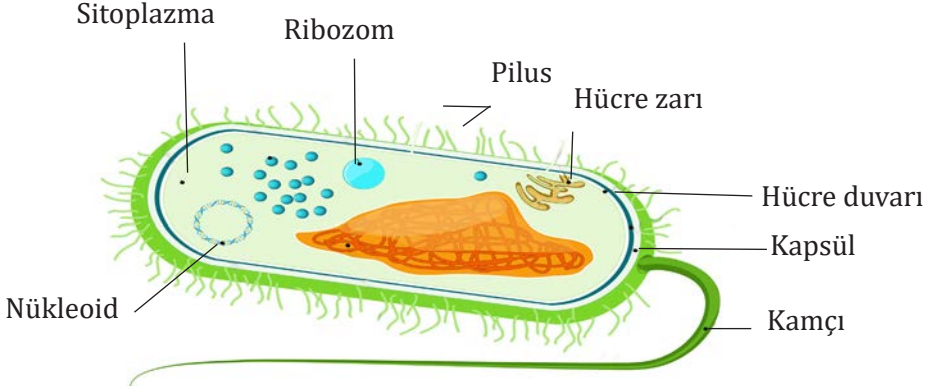
Radyasyon, boşlukta veya materyal bir ortamda enerjinin dalgalar halinde yayılması olayıdır. Canlılar üzerinde olumsuz etki yapar. Mikroorganizmaların gelişimlerini olumsuz yönde etkiler, hatta ölümlerine sebep olur.

1.1.5. Bakterilerin Özellikleri

Bakteriler; tek hücreli, prokaryotik hücre yapısına sahip canlılardır. Ortam koşullarına adaptasyonları hızlı ve besin ihtiyacı basit olduğu için hemen hemen her yerde (toprak, su, bitki, hayvan, insan vücudu...) bulunurlar. En fazla yaşadıkları yerler, sular ve organik atıkların çok olduğu alanlardır. Çevresel faktörlerle (hava, rüzgâr ve su damlacıkları) uzak mesafelere taşınırlar. Bölünerek çoğalırlar. Büyüklükleri 0,1–10 mikrometre arasında değişir.

1.1.6. Bakterilerin Hücre Yapısı

Bakterilerin hücre yapıları iki temel kısımda incelenebilir. Dış yapılar [Hücre duvarı, kamçı (flagella), pilus, kapsül], iç yapılar (hücre zarı, sitoplazma, mezozom, ribozom, nükleus, sitoplazmik granüller, pigment, spor, plazmid, vb.). Görsel 1.3'te bir bakteri hücresinin enine kesiti gösterilmiştir.



Görsel 1.3: Bakteri hücre kesiti

Hücre Duvarı: Bakteri hücresinin etrafını tam ve kesintisiz olarak saran ve dış etkilere karşı koruyan bir kılıftır. Bakterilere orijinal şeklini verir.

Kamçı: Bakteriler için sıvı ortamda aktif hareket olanağı sağlayan hareket organelidir. Her mikroorganizma türünde bulunmaz.

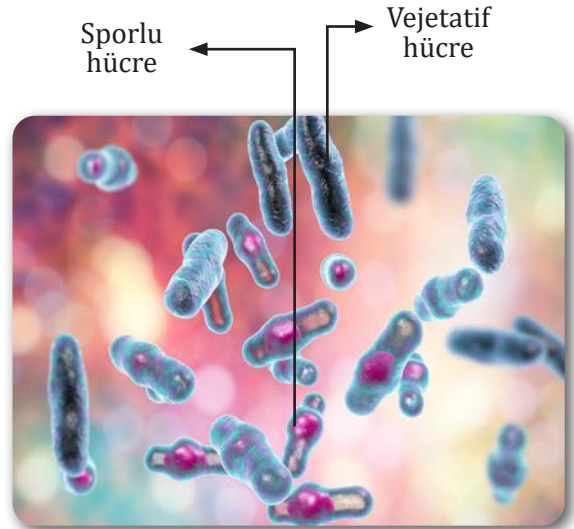
Pilus: Kamçıdan daha kısa ve ince yapıda olup bakterilerin yüzeye tutunmasını ve genetik materyal aktarımını sağlar.

Kapsül: Her bakteri hücresinde bulunmayan, bulunduğu hücreyi fiziksel, kimyasal ve mekanik etkilerinden koruyarak dayanıklılığını artıran bir katmandır.

Sitoplazmik Zar: Hücre duvarının altında, sitoplazmayı saran ince bir zardır. Seçici geçirgen özelliğe sahiptir. Dış ortamlardaki su ve besin maddelerinin içeri alınmasında ve hücre içinde oluşan çeşitli metabolitlerin dışarı atılmasında etkilidir.

Sitoplazma: Çoğunluğu sudan oluşan, berrak, hafif yapışkan bir sıvıdır. Hücrede meydana gelen kimyasal reaksiyonların olduğu, hücrenin yapı maddelerinin sentezlendiği yerdir. İçinde nükleik asitler, enzimler, amino asitler, karbonhidratlar, lipidler ile organeller bulunur.

Endospor: Bazı basiller uygun olmayan koşullarda (aşırı sıcak, aşırı kurak, besin kıtlığı, uygun olmayan pH gibi) kaldığında endospor denilen yapılar oluşturur. Endospor vejetatif hücreye göre fiziksel, kimyasal ve mekanik etkilere karşı çok daha fazla dayanıklıdır. Endospor bir üreme şekli değildir. Şartlar normale dönünce endosporlar vejetatif hücreye dönüşür (Görsel 1.4).



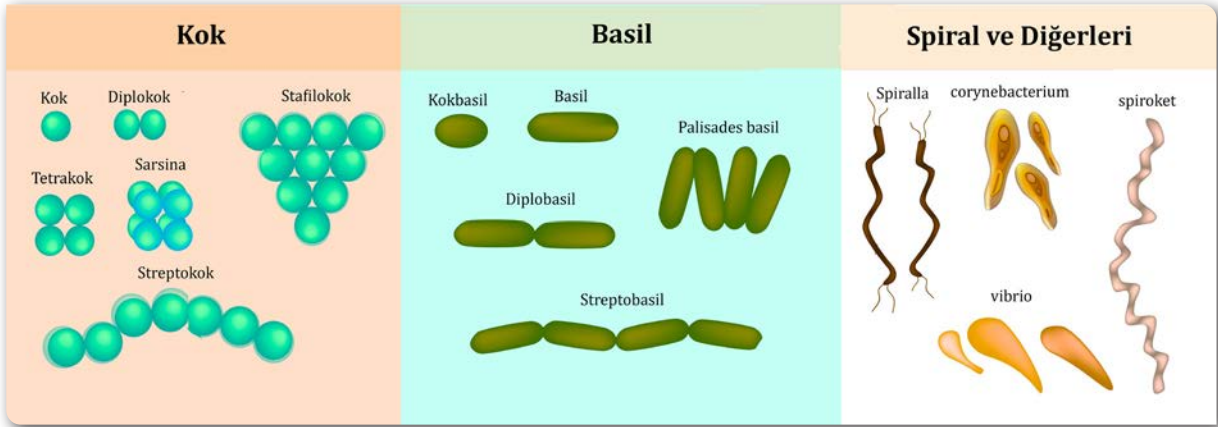
Görsel 1.4: Spor oluşumu

Bunları Biliyor musunuz?

Yağmur sonrası oluşan kokuya **aktinomiset** adı verilen bakteri grubu neden olur. Aktinomisetler kuru toprakta kalırsa endospor üretirler. Şiddetli yağış sonrası bu minik sporlar havaya karışır ve kendine özgü bir koku oluşur.

1.1.7. Bakterilerin Morfolojik Özellikleri

Bakteri morfolojisi, boyutlarının çok küçük olması nedeniyle mikroskopla gözlenerek belirlenebilir. Bu amaçla uygun ortamlarda üretilen bakterilerden hazırlanan preparatlar boyanarak incelenir. Bakteriler, mikroskopik görünümüleri esas alınarak: **kok** (yuvarlak, küre şeklindeki bakteriler), **basil** (çubuk biçimindeki bakteriler), **spiral** (sarmal biçimdeki bakteriler) olmak üzere üç ana grupta incelenir. Bu şekil dışındakiler ise **pleomorfik** (değişik biçimli bakteriler) olarak adlandırılır.



Görsel 1.5: Bakteri şekilleri

Bakterilerin bulunma şekline göre adlandırılması Görsel 1.5'te gösterilmiştir. Stafilokok, üzüm salkımı şeklinde kümelenmiş kokları; streptokok, zincir (tespih) şeklinde görülen kokları; streptobasil zincir şeklinde görülen basilleri, kokobasil eni boyuna yakın fakat eşit olmayan oval şeklindeki basilleri ifade etmektedir.

1.1.8. Bakterilerde Üreme

Mikroorganizmalar uygun koşullar altında türlerine özgü üreme gösterir. Üremenin hızı; mikroorganizmanın türüne, ortam koşullarına, besin maddesi miktarı ve çeşitliliğine göre değişir. Mikroorganizmalar, sıvı ortamlarda katı ortamlardan daha hızlı ürerler. Bakteriler bölünerek çoğalır ve ortam koşulları uygun olduğunda çok hızlı ürerler. Ancak bu artış sürekli değildir. Zamanla ortam şartları (sıcaklık artar, toksin birikir, besinler azalır.) bozulduğu için hücreler ölmeye başlar. Bir ortamdaki bakteri sayısı katlanarak çoğalır. Örneğin 1, 2, 4, 8, 16, 32 vb. ya da 2^0 , 2^1 , 2^2 , 2^3 , 2^4 , 2^5 vb.

Bir mikroorganizma hücresinin çoğalarak oluşturduğu ve gözle görülebilir mikroorganizma topluluklarına **koloni** denir. Her bakteri türü kendine özgü koloni oluşturur. Kolonilerin şekli, rengi, kokusu, büyüklüğü, saydamlığı, parlaklığı ve diğer özellikleri bakterinin türüne ve üreme koşullarına göre değişiklik gösterir.

1. UYGULAMA

BAKTERİLERLE İLGİLİ SUNUM / ÖĞRETİM MATERYALİ HAZIRLAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak bakterilerle ilgili sunum çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bilgisayar, etkileşimli tahta/projeksiyon, internet, kitap.

İşlem Basamakları

1. Bakterilerin özellikleri hakkında bilgi toplayınız.
 - Temel mikrobiyoloji konusunu içeren basılı veya dijital kaynaklardan faydalanınız.
2. Bakterilerle ilgili görseller bulunuz.
3. Gıda, tarım ve sağlık açısından önemli bakteriler hakkında bilgi toplayınız.
 - Çevrenizi gözlemleyerek bakterilerin etkilerini (etin bozulması, süttten yoğurt yapılması gibi) not alınız (Görsel 1.6).
 - Faydalı bakterileri ve kullanıldıkları alanları araştırınız.
 - Zararlı bakterileri ve bu bakterilerin etkilerini araştırınız.
4. Araştırma sonuçlarını sunu hâline getiriniz.
 - Sunu hazırlama programları kullanınız.
 - Sununun konu bütünlüğüne dikkat ediniz.
 - Sunu hazırlamada arkadaşlarınızla iş birliği yapınız.
5. Sunum yapınız.
 - Sunuma başlamadan önce arkadaşlarınızı selamlayınız.
 - Arkadaşlarınıza karşı kibar ve saygılı olunuz.
 - Sunuya başlarken yaptığınız çalışmalar hakkında bilgi veriniz.



Görsel 1.6: Yoğurt

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Basılı veya dijital kaynaklardan faydalandı.				
2	Konu ile ilgili gözlem yaptı.				
3	Edindiği bilgileri kullandı.				
4	Sunu hazırladı.				
5	Sunum yaptı.				
TOPLAM PUAN					

2. UYGULAMA

HAZIR BAKTERİ PREPARATLARININ MİKROSKOPTA İNCELENMESİ

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak hazır bakteri preparatlarının mikroskopta incelenmesi çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

- Bu uygulama faaliyetinde mikroskop kullanımı ve preparat hazırlama işlemleri yaptırılmayacaktır.
- Öğretmeniniz tarafından daha önce hazırlanmış preparatlar veya hazır preparatlar kullanılacak ve mikroskopta görüntü öğretmeniniz tarafından bulunacaktır.
- Preparat hazırlama ve mikroskop kullanımı ile ilgili çalışmalar ilerleyen konularda yapılacaktır.

Kullanılacak Araç Gereç

Mikroskop, hazır bakteri preparatları, immersiyon yağı.

İşlem Basamakları

1. Öğretmeniniz tarafından size gösterilen preparata çıplak gözle bakınız.
2. Öğretmeniniz tarafından kullanıma hazır hale getirilen mikroskoptaki görüntüyü inceleyiniz.
 - Mikroskop ayarları ile oynamayınız.
 - Öğretmeninizin talimatlarına uyunuz.
3. Çıplak gözle ve mikroskopta gördüğünüz görüntüyü kıyaslayınız.
 - Gözünüzün nesneleri görme ve ayırt edebilme sınırlarını arkadaşlarınızla tartışınız.
 - Diğer duyu organlarımız içinde böyle sınırların olup olmadığı konusu üzerinde arkadaşlarınızla tartışınız.
4. İncelediğiniz bakterinin morfolojik yapısını belirleyiniz.
 - Bakteri hücrelerine odaklanarak önce şeklini (kok, basil, spiral) belirleyiniz (Görsel 1.7).
 - Bakteri hücrelerinin bulunma şeklini (monokok, diplokok, stafilokok, streptokok, sarsina ve streptobasil gibi) belirleyiniz.
5. Gördüğünüz şekilleri defterinize çizerek şekillerin isimlerini yazınız.
6. Farklı preparatlarda aynı işlemleri yaparak farklı morfolojik yapıları kıyaslayınız.

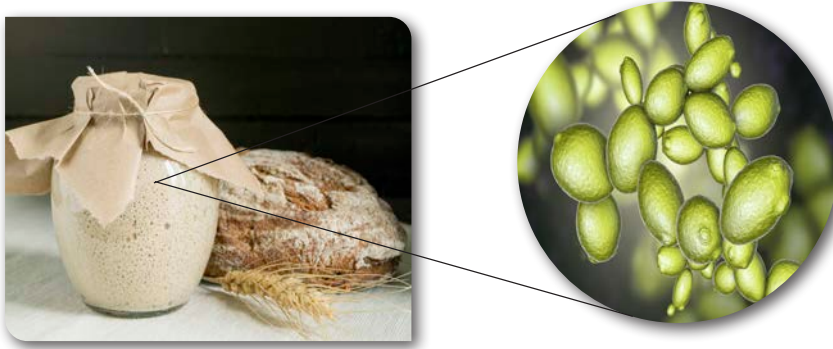


Görsel 1.7: Bakteri şekilleri (basil ve kok)

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Mikroskopta görüntüyü inceledi.				
2	Bakteri hücrelerinin şeklini belirledi.				
3	Bakteri hücrelerinin bulunma şeklini belirledi.				
4	Bakteri hücrelerinin şekillerini çizerek onları isimlendirdi.				
5	Bakterilerde morfolojik yapıları birbirleri ile kıyaslayarak ayırt etti.				
TOPLAM PUAN					

1.2. FUNGUSLAR

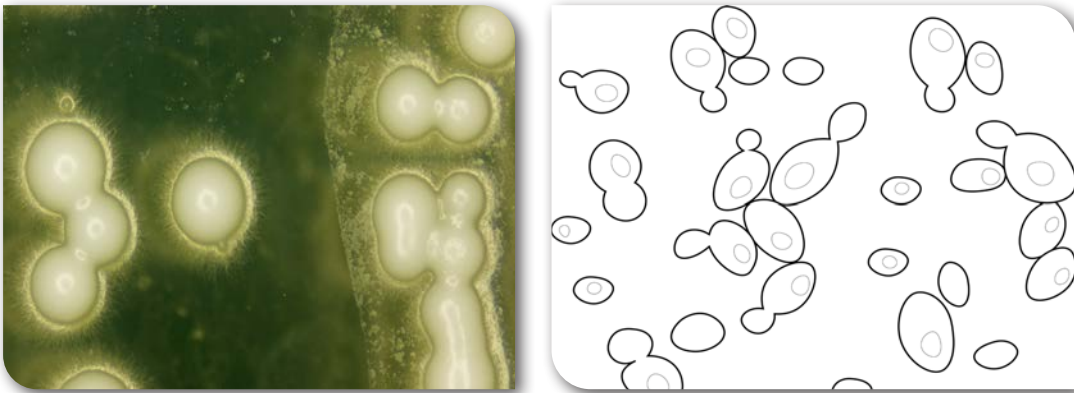
Funguslar; ökaryotik hücre yapısına sahip, genellikle saprofit (çürükçül) veya paraziter canlılardır. Funguslara toprakta, havada, suda, bitkisel ve hayvansal kaynaklarda yaygın olarak rastlanmaktadır. Funguslar, maya ve küf olarak iki sınıfta incelenir. Mikroskopla incelendiğinde aralarındaki en önemli farkın mayaların tek hücreli, küflerin çok hücreli yapılar olduğu görülür. Bazı funguslar endüstriyel öneme sahiptir. Örneğin bazı maya türlerinden ekmek, şarap ve bira üretiminde; bazı funguslardan ise alkol, asit ve antibiyotik üretiminde yararlanılmaktadır (Görsel 1.8). Zararlı olan funguslar da vardır. Bazı funguslar mikoz denilen hastalıklara sebep olur. Funguslar hastalığının yanında gıda, tekstil, tahta gibi ürünlerde bozulmalara da sebep olabilmektedir.



Görsel: 1.8: *Saccharomyces cerevisiae* mayasından ekmek yapımı

1.2.1. Mayalar

Mayalar; tek hücreli funguslardır. Genel olarak yuvarlak, oval, silindirik ve limon şeklindedir (Görsel 1.9). Boyutları bakterilerden 2-10 kat daha büyüktür. Mayalar, küfler gibi miselyum (ipliksi yapılar) oluşturmazlar ancak bazı mayalar ortam koşullarına uyum için yalancı miselyum oluşturma yeteneğine sahiptirler. Mayalar eşeyli ve eşeysiz olarak çoğalabilmektedir fakat tipik üreme şekli tomurcuklanmadır. Genel olarak fakültatif anaerobiktirler. Maya türlerine örnek olarak *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida lipolytica*, *Zygosaccharomyces bailii* verilebilir.



Görsel 1.9: Mayanın makroskobik ve mikroskobik görüntüsü

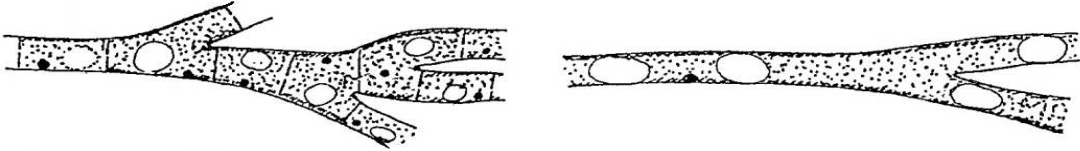
1.2.2. Küfler

Küfler çok hücreli funguslardır. Küf hücreleri art arda dizilerek ipliksi yapılar meydana getirirler, bu yapılara **hif** adı verilir. Hifler bölmeli (septalı) veya bölmesiz olabilir. Bazı küf çeşitlerinde hücrelerin birleşim yerlerindeki bölmeler kaybolur, böyle hiflere bölmesiz (septasız) hif denir. Ayrıca hifler dallanma durumuna göre branşlı veya branşsız hif olarak da tanımlanabilmektedir. Hiflerin bir araya gelmesiyle oluşan saç benzeri topluluğa da **miselyum** adı verilir (Görsel 1.10).

SIRA SİZDE



Şekildeki hiflerin türünü altına yazınız.

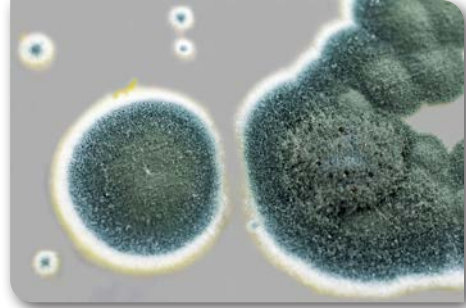


Genel olarak küfler aerobiktirler. Bunun için gıdaların yüzeyinde gelişerek bozulmalara neden olurlar. Küf türlerine örnek olarak *Aspergillus flavus*, *Alternaria citri*, *Fusarium verticillioides*, *Mucor rouxii*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus stolonifer* verilebilir.

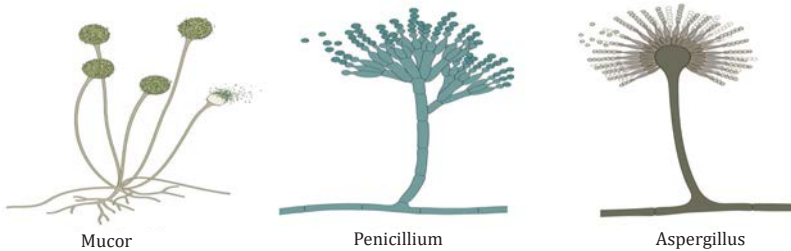
Küfler, tabiatta hemen hemen her yerde bulunur. Küfler, eşeysiz ve eşeyli sporlar ile ürerler. Sporlar küflerin hiflerinin ucunda sporangium adı verilen kese içinde oluşmaktadır. Üremelerini sağlayan sporlar çok hafif olduğundan yayılmaları kolaydır. Küfler gıdalar üzerinde pamuksu görünüşleriyle kolaylıkla tanınırlar (Görsel 1.11). Beyaz, siyah, yeşil, sarı, turuncu renkte olanları vardır. Bazı küfler çoğalırken ortama zehirli metabolitler bırakır, bunlara **mikotoksin** denir. Mikotoksinler, insan ve hayvanlarda toksik ve kanserojen etkiye sahiptir. Görsel 1.12'de morfolojilerine göre bazı küfler gösterilmiştir.



Görsel 1.10: Küflerin mikroskopik görüntüsü



Görsel 1.11: Küflerin makroskopik görüntüsü



Görsel 1.12: Morfolojilerine göre bazı küfler

3. UYGULAMA

FUNGUSLARLA İLGİLİ SUNUM / ÖĞRETİM MATERYALİ HAZIRLAMA

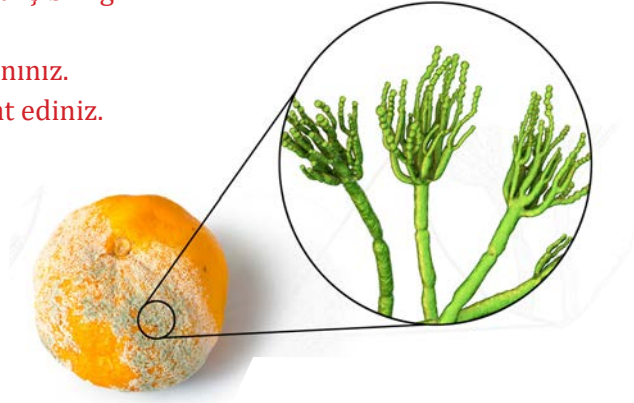
Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak funguslarla ilgili sunum çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bilgisayar, etkileşimli tahta/projeksiyon, internet, kitap.

İşlem Basamakları

1. Fungusların özellikleri hakkında bilgi toplayınız.
 - Temel mikrobiyoloji konusunu içeren basılı veya dijital kaynaklardan faydalanınız.
2. Funguslarla ilgili görseller bulunuz.
3. Gıda, tarım ve sağlık açısından önemli funguslar hakkında bilgi toplayınız.
 - Çevrenizi gözlemleyerek fungusların etkilerini (salçanın küflenmesi, ekmek mayasının kullanımı gibi) not alınız (Görsel 1.13).
 - Faydalı fungusları ve bunların kullanıldıkları alanları araştırınız.
 - Zararlı fungusları ve bu fungusların etkilerini araştırınız.
4. Araştırma sonuçlarını sunu hâline getiriniz.
 - Sunu hazırlamada arkadaşlarınızla iş birliği yaparak grup çalışması yapınız.
 - Sunu hazırlama programları kullanınız.
 - Sununun konu bütünlüğüne dikkat ediniz.
5. Sunum yapınız.
 - Sunuma başlamadan önce arkadaşlarınızı selamlayınız.
 - Arkadaşlarınıza karşı kibar ve saygılı olunuz.
 - Sunuya başlarken yaptığınız çalışmalar hakkında bilgi veriniz.



Görsel 1.13: Küflerin zararlarına örnek

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Basılı veya dijital kaynaklardan faydalandı.				
2	Konu ile ilgili gözlem yaptı.				
3	Edindiği bilgileri kullandı.				
4	Sunu hazırladı.				
5	Sunum yaptı.				
TOPLAM PUAN					

4. UYGULAMA

HAZIR FUNGUS PREPARATLARININ MİKROSKOPTA İNCELENMESİ

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak hazır fungus preparatlarının mikroskopta incelenmesi çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

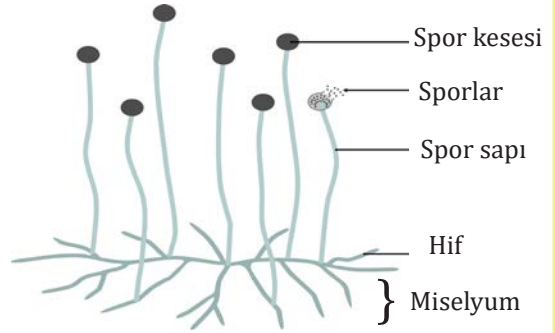
- Bu uygulama faaliyetinde mikroskop kullanımı ve preparat hazırlama işlemleri yaptırılmayacaktır.
- Öğretmeniniz tarafından daha önce hazırlanmış preparatlar veya hazır preparatlar kullanılacak ve mikroskopta görüntü öğretmeniniz tarafından bulunacaktır.
- Preparat hazırlama ve mikroskop kullanımı ile ilgili çalışmalar ilerleyen konularda yapılacaktır.

Kullanılacak Araç Gereç

Mikroskop, hazır fungus preparatları, immersiyon yağı.

İşlem Basamakları

1. Öğretmeniniz tarafından kullanıma hazır hale getirilen mikroskoptaki görüntüyü inceleyiniz.
 - Mikroskop ayarları ile oynamayınız.
 - Öğretmeninizin talimatlarına uyunuz.
2. İncelediğiniz fungusun morfolojik yapısını belirleyiniz.
 - Gördüğünüz fungusun küf mü yoksa maya mı olduğunu belirleyiniz.
 - Hif veya miselyum oluşturup oluşturmadığını belirleyiniz.
 - Hif oluşturmuşsa bölmeli mi yoksa bölmesiz mi olduğunu belirleyiniz.
 - Hif oluşturmuşsa branşlı mı yoksa branşsız mı olduğunu belirleyiniz.
 - Spor kesesi, sporların olup olmadığını belirleyiniz (Görsel 1.14).
3. Gördüğünüz şekilleri defterinize çizerek bu şekillerin isimlerini yazınız.
4. Farklı preparatlarda aynı işlemleri yaparak farklı morfolojik yapıları kıyaslayınız.



Görsel 1.14: Küflerde hif ve spor yapıları

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Mikroskopta görüntüyü inceledi.				
2	Fungus hücrelerinin şeklini belirledi.				
3	Küf ve maya hücrelerini birbirinden ayırt etti.				
4	Hif şekillerini çizerek özelliklerini belirledi.				
5	Spor kesesi ve sporları vejetatif hücreden ayırt etti.				
TOPLAM PUAN					

1.3. VİRÜSLER

Virüsler, kendi metabolik aktiviteleri olmadığı için zorunlu hücre içi parazitleridir. Virüslerin herhangi bir organeli ve enzimleri olmadığı için normal bir hücre gibi kendi başına yaşamaları imkânsızdır. Enfeksiyon yapma gücü yüksek mikroorganizmalardır.

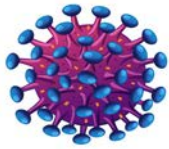
İnsanlarda hastalığa neden olan hatta salgınlara yol açan çok sayıda patojen virüs vardır. Genellikle sudan ve gıdadan bulaşan hepatit A, norovirüs, rotavirüs gibi. Özellikle soğuk havalarla birlikte etkisini gösterip insanlarda solunum yolu hastalıklarına neden olan bazı virüsler: influenza A, adenovirüs, parainfluenza virüs ve rhino virüstür. Koronavirüs ailesinden olan ve ilk olarak Çin’de 2019 yılında ortaya çıkan resmî adı **SARS-COV-2** olan virüs, ağır akut solunum yolu yetersizliğine sebep olarak tüm dünyayı etkileyip salgın ilan edilmesine sebep olmuştur. Virüslerin metabolizması olmadığı için viral hastalıkların tedavisi oldukça zordur. Antibiyotikler virüslere etki etmez ve az sayıda antiviral ilaç bulunmaktadır. Viral hastalıkları engellemenin en iyi yolu, bağışıklık sistemini güçlendirmektir. Aşılar, bağışıklık sistemini güçlendirmenin en kolay yoludur.

Bunları Biliyor musunuz?

SARS-COV-2 salgınından korunmak için maske, mesafe ve temizlik kuralları çok önemlidir. Bireyin sadece kendi sağlığını korumak için değil, toplumun sağlığını tehlikeye atmamak için de bu kurallara uyması gerekir.

Virüslerin boyutları 20-300 nm (nanometre) arasındadır. Bakterilerden 10-100 kat daha küçüktürler. Bu nedenle ışık mikroskopları ile görünmezler. Ancak elektron mikroskopunda incelenebilirler. Virüsler proteinden yapılmış bir kılıf (**kapsid**) ile bu kılıfın içinde bulunan genetik maddeden (**genom**) oluşur. DNA ya da RNA’ dan sadece birine sahiptirler.

Virüs bölünerek çoğalamaz. Çünkü hücresel bir yapıya sahip değildir. Üremek için mutlaka canlı bir hücreye girmeleri gerekir. Virüsün bulaşıp içinde çoğaldığı canlı hücreye **konak** denir. Virüsler, konağın metabolizması ve mekanizmasını kullanarak kendini kopyalar. Virüsler her hücreye zarar vermez sadece belirli hücrelere girerler. Kuduz virüsü beyin hücrelerine, uçuk virüsü (herpes virüs) epitel doku hücrelerine, AIDS virüsü kandaki akyuvar hücrelerine, bakteriyofaj sadece belirli bakteri türlerine girer (Görsel 1.15). Bakterileri enfekte eden virüsler, bakteriyofaj veya faj diye adlandırılır. Virüsler için en uygun ortam 30-35 °C sıcaklık ve pH’ı 6-8 olan ortamlardır.



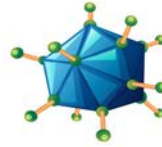
HIV



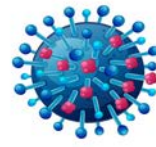
Hepatit B



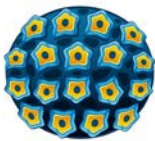
Ebola Virus



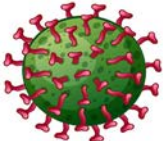
Adenovirus



Influenza



PaPillomavirus



Rotavirus



Herpes Virus



Rabies Virus



Bakteriyofaj

Görsel 1.15: Virüsün morfolojik yapıları

5. UYGULAMA

VİRÜSLERLE İLGİLİ SUNUM / ÖĞRETİM MATERYALİ HAZIRLAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak virüslerle ilgili sunum çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bilgisayar, etkileşimli tahta/projeksiyon, İnternet, kitap.

İşlem Basamakları

1. Virüslerin özellikleri hakkında bilgi toplayınız.
 - Temel mikrobiyoloji konusunu içeren basılı veya dijital kaynaklardan faydalanınız.
2. Virüslerle ilgili görseller bulunuz.
3. Gıda, tarım ve sağlık açısından önemli virüsler hakkında bilgi toplayınız.
 - Çevrenizi gözlemleyerek virüslerin etkilerini (gribal enfeksiyon gibi) not alınız.
 - Çevrenizde Covid 19 hastalığına yakalanmış ve atlatmış kişilerden hastalıkla ilgili bilgi alınız.
 - Viral hastalıklarla mücadele etmede etkin yöntemler hakkında bilgi toplayınız (Görsel 1.16).
4. Araştırma sonuçlarını sunu hâline getiriniz.
 - Sunu hazırlamada arkadaşlarınızla iş birliği yapınız.
 - Sunu hazırlama programları kullanınız.
 - Sununun konu bütünlüğüne dikkat ediniz.
5. Sunum yapınız.
 - Sunuma başlamadan önce arkadaşlarınızı selamlayınız.
 - Arkadaşlarınıza karşı kibar ve saygılı olunuz.
 - Sunuya başlarken yaptığınız çalışmalar hakkında bilgi veriniz.



Görsel 1.16: Virüslerle mücadele

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Basılı veya dijital kaynaklardan faydalandı.				
2	Konu ile ilgili gözlem yaptı.				
3	Edindiği bilgileri kullandı.				
4	Sunu hazırladı.				
5	Sunum yaptı.				
TOPLAM PUAN					

A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

- Doğada her yerde bulunabilen gözle görülemeyecek kadar küçük canlılara denir.
- Fungusları inceleyen bilim dalına denir.
- Küf ve mayalar hücre yapısına sahiptirler.
- Hem oksijenli hem oksijensiz ortamda gelişebilen mikroorganizmalara denir.
- Mikroorganizmaların beslenmesi için ortamda bulunması gerekir.
- Bakterilerin hareket etmesini sağlayan organelidir.
- Funguslar bölümünde incelenen tek hücreli mikroorganizmalara denir.
- Çoğalma sırasında çubuk bakterilerin zincir şeklini almasıyla oluşur.
- Virüslerde adı verilen proteinden yapılmış bir kılıf bulunmaktadır.
- Mayalar, tipik üreme şekli olan ile ürerler.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevabını işaretleyiniz.

11. Sıcak su kaynaklarında gelişim gösterebilen mikroorganizma sınıfı aşağıdaki-lerden hangisidir?

- A) Aerotolerant B) Mezofil
C) Mikroaerofil D) Psikrofil
E) Termofil

12. Aşağıdakilerden hangisi virüsleri inceleyen bilim dalıdır?

- A) Algoloji B) Fikoloji
C) Parazitoloji D) Protozooloji
E) Viroloji

13. Bakterilerin sahip olduğu hücre tipi aşağıdakilerden hangisidir?

- A) Aerob B) Ökaryot
C) Prion D) Prokaryot
E) Protozoa

14. Bazı küfler gıda maddeleri üzerinde çoğalırken ortama zehirli metabolitler bırakır bunlara ne denir?

- A) Pestisit B) Andidot
C) Toksin D) Okratoksin
E) Mikotoksin

15. Hiflerin bir araya gelmesiyle oluşan ipliksi yapılara ne ad verilir?

- A) Çim B) Hif
C) Miselyum D) Septa
E) Septum

16. 2020 yılında tüm dünyada salgın ilan edilmesine sebep olan virüs hangisidir?

- A) Ebola B) Sars-Cov-2
C) İnfluenza D) Rota
E) HIV

17. Oksijensiz ortamda aşağıdaki mikroor-ganizma türlerinden hangisi üreyemez?

- A) Aerop B) Anaerop
C) Fakültatif D) Aerotolerant
E) Mezofil

18. Vejetatif hücreye göre dış etkilere karşı daha dayanıklı olan ve uygun koşullarda vejetatif hücreye dönüşen yapıya ne ad verilir?

- A) Endospor B) Hücre duvarı
C) Kapsid D) Koloni
E) Sitoplazmik zar

19. Aşağıdaki bakteri isimlerinden hangisi doğru yazılmıştır?

- A) BACİLLUS CEREUS B) *Bacillus Cereus*
C) *Bacillus cereus* D) *bacillus Cereus*
E) *bacillus cereus*

20. Mayalarla ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?

- A) Mayalar genel olarak fakültatif anaerobiktirler.
B) Tek hücreli funguslardır.
C) Mikroskopta yuvarlak şeklinde görünür.
D) Mayaların boyutları, genellikle bakteriler-den daha büyüktür.
E) Mayalarda kamçı adında hareket organeli bulunur.

2.

ÖĞRENME BİRİMİ



STERİLİZASYON VE DEZENFEKSİYON

TEMEL KAVRAMLAR

Sterilizasyon
Dezenfeksiyon
Aseptik teknik
Steril
Dezenfektan
Kontaminasyon

KONULAR

- 2.1. Aseptik Çalışma Tekniği
- 2.2. Sterilizasyon Ön Hazırlığı
- 2.3. Işınla, Buharla ve Kuru Isıl İşleme Sterilizasyon
- 2.4. Kimyasal Maddelerle Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon
- 2.5. Mekanik Yöntemlerle Sterilizasyon

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Laboratuvar çalışmalarında kontaminasyona engel olacak şekilde aseptik tekniği uygulamayı,
- Malzemenin özelliğine ve kullanılacak yönteme uygun sterilizasyon ön hazırlığını yapmayı,
- Tekniğine ve cihaz kullanma talimatlarına uygun ısıyla, buharla ve kuru ısıl işlemle sterilizasyon uygulamasını yapmayı,
- Malzeme veya ortamın özelliğine uygun kimyasal maddelerle sterilizasyon ve dezenfeksiyon işlemlerini yapmayı,
- Tekniğine uygun mekanik yöntemlerle sterilizasyon işlemini yapmayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Pandemi dönemlerinde maske kullanımının, insanlara mesafeli durmanın ve hijyen kurallarına uymanın mikroorganizmaların bulaşması ve salgın hastalıkların yayılmasını engellemede nasıl bir etkisi vardır?
2. Günlük hayatta temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerine hangi durumlarda ihtiyaç duyulmaktadır?
3. Mikrobiyoloji laboratuvarında kontrollü çalışma neden önemlidir?



2.1. ASEPTİK ÇALIŞMA TEKNİĞİ

Mikroorganizmaların çalışma alanına bulaşmasının önlenmesi ve bunun devamlılığının sağlanması amacıyla yapılan işlemlerin tamamına **aseptik teknik** denir.

2.1.1. Aseptik Tekniğin Amacı ve Önemi

Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışma konusu mikroorganizmalardır. Mikroorganizmaların bir kısmı hastalık yapıcı özelliğe sahiptir. Laboratuvarında çalışma kurallarına uyulmadığı takdirde; bu mikroorganizmalar önce çalışana, daha sonra da çevresindeki insanlara bulaşabilir. Çalışanların ilk hedefi, kendilerini kontaminasyondan (bulaşma) korumaktır. Laboratuvar çalışmalarında kontaminasyon tehlikesi her zaman vardır. Bu nedenle aseptik ortamlarda (mikroorganizmalardan arındırılmış alan), çalışma kurallarına ve önerilere uygun çalışılmalıdır.

Mikrobiyoloji laboratuvar çalışmalarında mikroorganizmalardan uzak ve arındırılmış koşullarda çalışmak ancak aseptik teknik ile sağlanır. Aseptik tekniğin amaçları şunlardır:

- İncelenmek istenilen kültürlerle çevreden mikroorganizma bulaşmasını önlemek,
- Kültürdeki mikroorganizmaların çevreye ve çalışanlara bulaşmasını önlemek, çalışma güvenliğini sağlamaktır.

Aseptik teknik, çalışanların sağlığının yanında analiz sonuçlarının doğru ve güvenilir olması açısından da önemlidir. Analizde kullanılan araç gereç ve malzemelere kontaminasyon olması analiz sonucunun hatalı çıkmasına neden olur. Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışanların ve analizin güvenliği aseptik teknik ile sağlanır. Aseptik ortam oluşturulabilmesi için çalışma alanlarının temizliği, dezenfeksiyonu sağlanmalı ve çalışmalar daima bunzen bek alev çatısı altında veya steril kabin içerisinde yapılmalıdır. Alev çatısı yanan bunzen bekin çevresinde yaklaşık 20-25 cm çapındaki dairenin içerisinde çalışılmalıdır.

2.1.2. Mikrobiyoloji Laboratuvarı Çalışma Kuralları

Aseptik tekniğe uygun çalışma yapılabilmesi için laboratuvar çalışma kurallarının yanında mikrobiyoloji laboratuvarlarında alınması gereken önlemler ve uyulması gereken bazı kurallar şunlardır:

- Çalışmalar aseptik tekniğe uygun olarak yapılmalıdır.
- Sterillikten şüphe edilen malzemeler kullanılmamalıdır.
- Çalışmaya başlamadan önce ve sonra tezgâhların üzeri dezenfektan bir madde ile silinmelidir.
- Çalışırken eller ağza, burna veya yüze sürülmemeli, ağza herhangi bir şey götürülmemelidir.
- Kültür (mikroorganizma üretilmiş besiyeri) içeren kapların ağzı açık bırakılmamalıdır.
- Önlük ceplerine kültür içeren herhangi bir malzeme konulmamalıdır. Laboratuvar dışarı herhangi bir kültür veya materyal çıkarılmamalıdır.
- Çalışma anında pencereler kapalı olmalı, lüzumsuz el kol hareketleri yapılmamalıdır.
- Mikroplu bir madde dökülünce veya sıçrayınca üzeri dezenfektan bir maddeye batırılmış pamukla örtülmeli ve uygun bir süre bekletildikten sonra temizlenmelidir.
- Çalışma bittikten sonra kullanılmış malzemeler, kendilerine ait kirli kaplara konulmalıdır.
- Öze kullanılmadan önce ve sonra sterilize edilmelidir.
- Çalışma bittikten sonra eller önce sabunla yıkanmalı, ihtiyaç halinde dezenfekte edilmelidir.

- İçerisinde ne olduğu bilinmeyen kaplar imha edilmelidir.
- Laboratuvardan çıkarken önlük, maske ve eldiven çıkarılmalı, eldivenler dezenfektan içine, diğerleri ise kendilerine ait yerlere konulmalıdır.
- Dağınık çalışılmamalı, derli toplu, temiz ve titiz çalışılmalıdır.
- Laboratuvarlarda sinek veya böcek bulunmaması için gereken önlemler alınmalıdır.
- Laboratuvar sık sık havalandırılmalı ve laboratuvarın havası temiz olmalıdır.
- Çalışmanın özelliğine göre steril kabin kullanılmalıdır.
- Güvenlik işaretlerine uyulmalıdır (Görsel 2.1).
- Laboratuvarın risk düzeyine uygun koruyucu malzemeler kullanılmalıdır (Görsel 2.2).



Görsel 2.1: Güvenlik işaretleri



Görsel 2.2: Laboratuvar koruyucu malzemeleri

- Öze, aleve 45° açıyla tutulmalı, etrafa sıçrama olmamasına özen gösterilmelidir.
- Çalışma sırasında bek yanında alev alıcı, parlayıcı maddeler bulundurulmamalıdır.
- Tüp, erlen ve numune kaplarının tıkaçları veya kapakları açıldıktan sonra ve kapatılmadan önce ağızlarının bunzen beki alevinden geçirilmesi gerekir. Bu esnada cam malzemelerin aşırı ısınmamasına dikkat edilmelidir.
- Aleve yakın çalışılmalı, ağız açılan kaplar aleve dönük tutulmalıdır.
- Steril malzemeler ambalajından aseptik ortamda açılarak çıkarılmalıdır.
- Çalışılan kapların tıkaç ve/veya kapakları yere bırakılmamalıdır. Pipet ya da öze tutan elin serçe ve yüzük parmaklarıyla usulüne uygun olarak çıkartılmalı ve o şekilde elde tutulmalıdır.
- Pipetle yapılacak işlemlerde puar, pipet pompası kullanılmalı, ağız yolu ile çekim işlemi yapılmamalıdır. Mümkünse otomatik pipetler kullanılmalıdır.
- Enfekte bir materyali havanda ezerken gözlük, maske ve eldiven kullanılmalıdır.
- Etüv, buzdolabı ve dipfrize konacak malzemenin üzerine gerekli bilgiler okunaklı şekilde yazılmalı veya etiketlenmelidir. Silinmiş olanlar çıkarılmalıdır.

6. UYGULAMA

ASEPTİK ORTAM OLUŞTURMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak aseptik ortam oluşturma çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen bek, temizlik araç gereçleri, dezenfektan

İşlem Basamakları

1. Çalışma tezgâhı üzerindeki araç gereçleri kaldırınız.
 - Tezgâh üzerinde hiçbir malzemenin kalmadığından emin olunmalıdır.
2. Çalışma tezgâhını temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
 - Aksi belirtilmedikçe üretici firmanın talimatlarına uyulmalıdır.
 - Gerekli ise koruyucu malzeme kullanılmalıdır.
 - Dezenfektan ile tezgâh silinmelidir.
3. Laboratuvarın kapı ve pencerelerini kapatınız.
 - Laboratuvar içerisinde hava akımı olmamalıdır.
4. Bunzen beki açarak çakmakla yakınız.
 - Yanıcı, alev alıcı, parlayıcı maddeler beke yakın yerlerde bulundurulmamalıdır.
5. Bunzen bekin hava giriş yerini açıp kapatarak alev rengi içte parlak mavi, dışta soluk mavi olacak şekilde ayarlayınız (Görsel 2.3).
 - Bunzen bek modeline bağlı olarak hava giriş ayarı farklı şekillerde olabilmektedir. Beki yakmadan önce beki inceleyerek ayarın nasıl yapılacağına karar verilmelidir (Görsel 2.4). Bazı beklerde ayar aksamı olmayabilir bu durumda bek zorlanmamalıdır.
6. Çalışmada kullanılacak malzemeleri kullanım sırasına uygun olarak çalışma masasının üzerine yerleştiriniz.
 - Tüm çalışmaların alev çatısı altında yapılacağı unutulmamalıdır.



Görsel 2.3: Hava giriş ayarına göre yanma şekilleri



Görsel 2.4: Bunzen bekte hava giriş ayarı

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Çalışma koşullarını düzenledi.				
2	Çalışma kurallarına uygun davrandı.				
3	Tezgâhın temizliğini yaptı.				
4	Tezgâhın dezenfeksiyonunu yaptı.				
5	Bek alevini tekniğine uygun ayarladı.				
TOPLAM PUAN					

Bunları Biliyor musunuz?

Aktarma: Bir maddenin tamamının veya bir kısmının bulunduğu yerden alınarak başka bir yere taşınması işlemidir. Mikrobiyolojide aktarma " numune veya kültürün uygun, steril araç gereçlerle alınarak aseptik şartlarda istenilen yere taşınması işlemi " olarak anlaşılmalıdır. Aktarma işleminde öze, pipet, eküvyon, dip slide, selobant, agar sucuğu gibi gereçler kullanılabilir.

7. UYGULAMA

ASEPTİK KURALLARA UYGUN OLARAK TÜPTEN TÜPE ÖZE İLE AKTARMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak aseptik kurallara uygun olarak tüpten tüpe öze ile aktarma çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

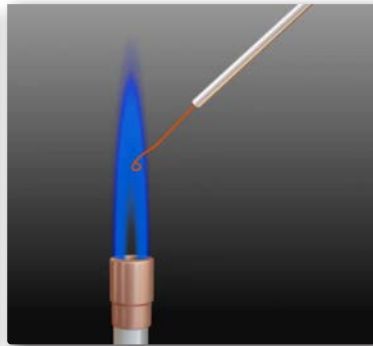
Bunzen bek, öze, deney tüpünde sıvı numune, deney tüpünde sıvı besiyeri.

İşlem Basamakları

1. Aseptik ortam oluşturunuz.
 - Tüm çalışmalar alev çatısı altında yapılmalıdır.
2. Numune bulunan tüpü çalkalayarak homojenize ediniz.
3. İki tüpü de sol elinize alınız (Görsel 2.5).
 - Tüpler birbirine karıştırılmamalıdır. Belli bir sıra ve disiplinde tutulmalıdır. Yani her çalışmada çalışma sırası değiştirilmemelidir. Örneğin her seferinde önce numune tüpü daha sonra aktarılabilecek tüp alınmalıdır.
 - İçerisinde sıvı bulunan tüpler gereksiz veya gereğinden fazla eğilmemelidir.
4. Özeyi sterilize ediniz (Görsel 2.6).
 - Özeyi sağ elde kalem gibi tutarak bek alevinde öze telinin akkor haline gelmesi sağlanmalıdır.
 - Tek kullanımlık steril öze kullanılacaksa alev çatısı altında açılmalı ve aleve tutmadan kullanılmalıdır.



Görsel 2.5: Tüpleri tutma şekli



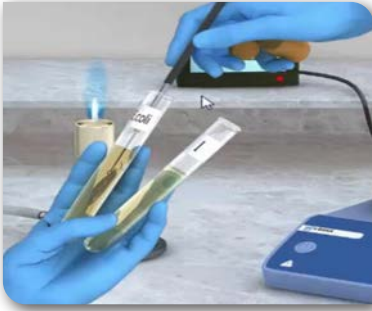
Görsel 2.6: Özeyin sterilize edilmesi



Görsel 2.7: Tüp kapaklarının açılması

5. Tüplerin kapağını veya tıkaçlarını öze tutan elinizin serçe ve yüzük parmaklarıyla usulüne uygun açarak ağızlarını alevden geçiriniz (Görsel 2.7).
 - Tüplerin kapak veya tıkaçları kapatıncaya kadar tüpler elde tutulmalı, yere bırakılmamalıdır.

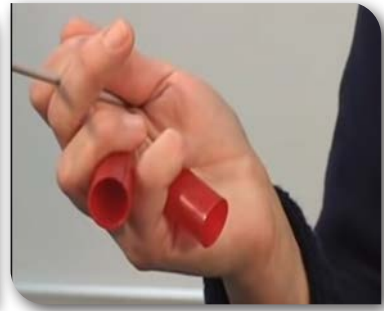
- Kullanımdan önce ve sonra deney tüplerinin ağızları, bek alevinden geçirilmelidir. Bu esnada cam malzemenin aşırı ısınmamasına dikkat edilmelidir.
 - Aleve yakın çalışılmalı, kapağı açılan malzemelerin ağzı aleve dönük tutulmalıdır.
- Özeyi alev çatısı altında bekleterek veya tüpün iç çeperine dokundurarak soğutunuz.
 - Numunenin içerisine özenin ucunu daldırarak karıştırma hareketi yapınız (Görsel 2.8).
 - Öze ucundaki yuvarlak kısmın sıvı ile dolu olması gerekir şayet sıvı ile dolmuyorsa öze ucu yanlış kıvrılmıştır. Öze ucu bek alevinde yakılarak halka düzeltilir.
 - Özenin sap kısmı sıvıya temas ettirilmemelidir.
 - Özenin ucunu kaba değdirmeden çıkararak diğer tüpe aktarınız.
 - Özeyi bek alevine tutarak sterilize ediniz ve bırakınız.
 - Özeden etrafa sıçrama olmaması için numune alınan kısım direkt aleve tutulmamalıdır. Öze telinin önce sap kısmı aleve tutulmalı daha sonra halka kısmı alev üzerine getirilmelidir.
 - Tüplerin ağızlarını alevden geçirerek kapak/tıkaçları kapatınız (Görsel 2.9).
 - Tüplerin kapak veya tıkaçları kapatılıncaya kadar tüpler elde tutulmalı, yere bırakılmamalıdır (Görsel 2.10).
 - Ele bulaşma olduğunda eller dezenfekte edilmelidir.



Görsel 2.8: Öze ile numune alma



Görsel 2.9: Tüplerin ağızını alevden geçirme



Görsel 2.10: Tüp kapaklarının elde tutulma şekli

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Aseptik ortam oluşturdu.				
2	Aseptik kurallara uygun çalıştı.				
3	Özeyi tekniğine uygun kullandı.				
4	Tıkaçları tekniğine uygun açıp kapattı.				
5	Aktarma işlemini yaptı.				
TOPLAM PUAN					

NOT ALINIZ



8. UYGULAMA

ASEPTİK KURALLARA UYGUN OLARAK TÜPTEN TÜPE PİPET İLE AKTARMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak aseptik kurallara uygun olarak tüpten tüpe pipet ile aktarma çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen bek, steril pipet, sıvı numune, deney tüpünde sıvı besiyeri.

İşlem Basamakları

1. Aseptik ortam oluşturunuz.
 - Tüm çalışmalar alev çatısı altında yapılmalıdır.
2. Pipetin ambalajını kontrol ediniz.
 - Aktarma sırasında kullanılacak araç gereçler steril olmalıdır.
 - Sterillikten emin olunmayan şüpheli malzemeler kullanılmamalıdır.
3. Kullanacağınız pipeti, ambalajından veya pipet kutusundan çıkarınız. Puar veya pipet pompası takınız.
 - Pipetleme işlemi ağızla yapılmamalı, puar, pipet pompası veya otomatik pipet kullanılmalıdır.
4. Numune bulunan tüpü çalkalayarak homojenize ediniz.
5. İki tüpü de sol elinize alınız.
 - Tüpler birbirine karıştırılmamalıdır. Belli bir sırada ve disiplinde tutulmalıdır. Yani her çalışmada çalışma sırası değiştirilmemelidir. Örneğin her seferinde önce numune tüpü sonra aktarılacak tüp alınabilir.
 - İçerisinde sıvı bulunan tüpler gereksiz veya gereğinden fazla eğilmemelidir.
6. Tüplerin kapağını veya tıkaçlarını pipet tutan elinizin serçe ve yüzük parmaklarıyla usulüne uygun açarak ağızlarını alevden geçiriniz.
 - Tüplerin kapak veya tıkaçları kapatılıncaya kadar elde tutulmalı, yere bırakılmamalıdır.
 - Kullanımdan önce ve sonra cam malzemelerin ağzı, bek alevinden geçirilmelidir.
 - Aleve yakın çalışılmalı, kapağı açılan malzemelerin ağzı aleve dönük tutulmalıdır.
7. İstenilen hacim miktarını biraz geçinceye kadar numuneyi pipetle çekiniz.
8. Pipetin ucunu numuneden çıkararak pipet içerisindeki sıvıyı istenen hacim çizgisine gelinceye kadar boşaltınız.
9. Pipetteki sıvıyı, besiyerine boşaltınız.
10. Tüplerin ağızlarını alevden geçirerek kapak/tıkaçlarını kapatınız.
 - Kullanılan pipetler dezenfektan çözeltisine konulmalıdır.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Çalışma koşullarını düzenledi.				
2	Çalışma kurallarına uygun davrandı.				
3	Tezgâhın temizliğini yaptı.				
4	Tezgâhın dezenfeksiyonunu yaptı.				
5	Bek alevini tekniğine uygun ayarladı.				
TOPLAM PUAN					

2.2. STERİLİZASYON HAZIRLIĞI

Sterilizasyon: Bir ortam veya maddenin canlı mikroorganizmaların tamamından arındırılması işlemidir. Bu işlem mikroorganizmaları öldürerek veya ortamdan uzaklaştırarak yapılabilir.

2.2.1. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kullanılan Araç Gereçler

Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan araç gereçleri aşağıdaki şekilde sınıflandırmak mümkündür:

- Cam ve plastik malzemeler (petri, pipet, mezür, balon, tüp, erlen, drigalski spatülü, beher, şişe vs.)
- Metal malzemeler (spatül, öze, bunzen bek, kirli malzemenin konulacağı kaplar, dolaplar vs.)
- Diğer malzemeler (puar, eküvyon, havan ve havaneli vs.)
- Cihazlar (inkübatör, kuru hava sterilizatörü, otoklav, steril kabin, pH metre, mikroskop vs.)

Laboratuvarlarda en sık kullanılan malzemeler, cam malzemelerdir. Bu malzemelerin kullanılmasının sebebi, ışık geçirgenliğinden dolayı içini göstermesi, kolay temizlenebilir ve tekrar kullanılabilir olmasıdır. Laboratuvar cam malzemeleri genellikle borosilikat içerikli camlardır ve piyasada pyrex (payreks) cam olarak adlandırılır. Adi cam; ucuz olmasına rağmen yüksek sıcaklık, basınç ve ani sıcaklık değişikliklerine dayanıksız olduğundan laboratuvar malzemesi üretimine pek uygun değildir. Pyrex cam; sıcaklık, asit ve alkalilere dayanıklıdır. Bu nedenle laboratuvarlarda kullanılan cam malzemelerin büyük çoğunluğu bu malzemedir.

Günümüzde plastik sanayisinin gelişmesi ve ekonomik olmasından dolayı, sert ve saydam plastikten, laboratuvar malzemelerinin birçoğu üretilmektedir. Spatül, mezür, huni, öze, pipet, balon, erlen ve tüp gibi malzemelerin plastik olanları, laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır fakat çoğunluğu yüksek ısıya dayanıklı olmadıklarından ısı işlemleriyle sterilize edilememeleri sebebiyle mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımları sınırlıdır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında steril ambalajlı, tek kullanımlık (kullan at) tipleri tercih edilmektedir.

Bunları Biliyor musunuz?

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, analizlerde kullanılan araç gereçlerin tamamı steril olmak zorundadır.



Görsel 2.11: Laboratuvarlarda kullanılan araç gereçler



Temel laboratuvar malzemelerinin dışında mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan araç gereç ve cihazların kullanım amaçları aşağıda açıklanmıştır:



Otoklav

Belirli sıcaklık (100-140 °C) ve basınca ayarlanabilen kazanlardır. Basınçlı buhar kullanılarak ısıya dayanıklı materyallerin ve besiyerlerinin sterilizasyonunda kullanılır.



Etüv

Oda sıcaklığı ile 250-300 °C sıcaklık aralığında çalışabilen, sıcaklık ve süre ayarı yapılarak kuru ısı ortam oluşturan fırınlardır. Kurutma ve sterilizasyon işlemlerinde kullanılır.



İnkübatör

Sıcaklık ve süre ayarı yapılabilen, ayarlanan sıcaklık derecesinden çok az sapma gösteren cihazlardır. Normal, vakumlu veya soğutmalı tipleri vardır. İnkübasyon işleminde kullanılır.



Steril Kabin

UV ışınları ve HEPA filtre yardımıyla aseptik ortam oluşturarak bulaşmanın önlenmesi için kullanılan kabinlerdir. Aşılama, güvenlik veya laminarflow kabin isimleriyle de bilinir.



Lam

Mikroorganizmaların doğrudan veya boyanarak mikroskopta incelenmesinde kullanılan dikdörtgen şeklindeki cam malzemedir.



Lamel

Lamin üzerindeki yaş preparatın üzerini kapatmada kullanılan plastik veya camdan, kare veya dikdörtgen şeklindeki malzemedir.



Petri Kutusu

Hazırlanan katı besiyerlerinin içine konulduğu daire şeklindeki cam veya plastik kaptır. Katı veya saf kültür oluşturmada kullanılır.



Drigalski Spatülü

Yayma yöntemiyle ekimde, sıvı numunenin petri plağının yüzeyine homojen şekilde yayılmasında kullanılır.



Durham Tüpü

Mikroorganizmaların sıvı besiyerinde belli bir maddeyi kullanarak gaz oluşturup oluşturmadığını gözlemlemek amacıyla kullanılan küçük tüplerdir.



Eküvyon (Swap)

Ucuna pamuk sarılmış tahtadan veya plastikten yapılmış bir çubuktur. Yüzeylerden örnek alma işleminde kullanılır.



Petri/Pipet Konteyneri

Pipetlerin ve petri kutularının sterilizasyonunda kullanılan, kapaklı silindirik şeklindeki metal kutulardır.



Öze

Aktarma işlemlerinde kullanılan ucunda platin veya krom nikel tel bulunan malzemedir. Tek kullanımlık plastik olanları da vardır. isimleriyle de bilinir.



Ayrıca mikrobiyoloji laboratuvarlarında soğutucu, dondurucu, tüp karıştırıcı, çalkalayıcı, stomacher, koloni sayıcı, su banyosu, yıkama makineleri, gaz sterilizasyon cihazları gibi laboratuvarın çalışma kapsam ve kapasitesinin gerektirdiği cihazlar da kullanılmaktadır.

2.2.2. Sterilizasyon ve Önemi

Mikrobiyoloji çalışmalarında sterilizasyon işlemi önemlidir. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılacak tüm araç gereçler (analiz numunesi hariç) steril olmak zorundadır. Aksi halde araç gereçlerde bulunan mikroorganizmalar numuneye aitmiş gibi anlaşılabileceğinden analiz sonuçları yanlış çıkar. Örneğin laboratuvara gelen bir numunede *Salmonella* (patojen bir mikroorganizma) aranması çalışması yapılması istenmiş olsun. Analizde steril olmayan bir malzeme kullanılırsa ve bu malzemeye daha önce *Salmonella* bulaşmışsa numunede bu mikroorganizma olmasa bile analiz sonucu "*Salmonella* pozitif" çıkacaktır. Böylece numunede bu mikroorganizma olmamasına rağmen varmış gibi işlem görecektir. Bu numune bir gıda maddesi ise tüketilemez raporu verilecektir.

Kültür bulaşmış (kontamine) araç gereçler sterilize edildikten sonra yıkanmalı veya çöpe atılmalıdır. Bu kural patojenlerin (enfeksiyon yapan mikroorganizma) çalışanlara bulaşmasını ve yayılmasını engeller. Ayrıca sterilizasyon laboratuvarında çoğaltılmış mikroorganizmaların çevreye zarar vermesini engelleyerek doğal dengenin korunmasını sağlar.

2.2.3. Malzemelerin ve Çözeltilerin Sterilizasyon Hazırlığı

Sterilizasyon işleminde doğru yöntemin seçilmesi ve uygulanması temel kuraldır. Sterilizasyon işleminden doğru sonuç alınabilmesi için malzemelerin uygulanacak sterilizasyon yöntemine uygun olarak hazırlanması gerekir. Sterilizasyon; ön yıkama, yıkama, durulama, kurulama, paketlenme, sterilizasyon işlemi, depolama aşamalarından oluşur. Steril malzemenin kullanım aşamasına kadar geçen her basamakta dikkat edilmesi ve uyulması gereken kuralları vardır.

Sterilizasyon öncesi temizlik (yıkama), sterilizasyonun önemli aşamalarından birisidir. Malzeme üzerinde kalan organik kirler mikrobiyal yükü artırdığı gibi sterilizasyonun etkinliğini azaltır. Temizlenmeyen hiçbir malzeme sterilize edilmez. Etkili bir temizlik ile mikroorganizmaların büyük çoğunluğu malzemeden uzaklaştırılmış olur. Temizlik manuel (elle) yapılabildiği gibi cihazlarla da (otomatik yıkama, dezenfeksiyon makineleri, ultrasonik temizleyiciler) yapılabilmektedir. Ayrıca temizlik, aletleri korozyondan da korur. Yıkama sonrası mutlaka durulama işlemi yapılmalıdır. Durulamada malzeme üzerinde sterilizasyonu ve analiz sonucunu etkileyecek veya çalışanlara zarar verme riski olan herhangi bir kalıntının kalmamasına özen gösterilmelidir. Durulama önce bol tazyikli su ile yapılmalı, daha sonra saf sudan geçirilerek bitirilmelidir. Durulama işleminden sonra kurulama işlemi yapılır. Kurulama oda sıcaklığında veya etüvde bekletilerek yapılabilir.

Sterilize edilecek araç gereçlerin paketlenmesi gerekir. Paketlemenin amacı; sterilize edilen araç gereçlerin dış ortamla ilişkisinin kesilerek kullanımına kadar sterilliğini korumaktır. Paketlemede kullanılacak malzeme, etkili bir bariyer oluşturarak malzemeyi olası bir kontaminasyondan korumalı ve sterilizasyona izin vermelidir. Paketleme materyali, seçilen sterilizasyon yöntemi ve sterilize edilecek malzeme ile uyumlu olmalıdır.

Tablo 2.1'de farklı sterilizasyon yöntemlerinde kullanılabilecek uygun paketlenme materyalleri ve özellikleri gösterilmiştir. Paketleme materyali olarak tekstil örtü malzemeleri, kâğıt ve polipropilen

paketlenme malzemeleri, sterilizasyon ruloları/poşetleri ve konteynerler kullanılmaktadır. Paketlenen malzemeler mutlaka kuru olmalıdır.

Tablo 2.1: Sterilizasyon Yöntemine Uygun Paketlenme Malzemeleri (Aslan ve Genç, 2007)

Sterilizasyon Yöntemi	Paketlenme Materyalinin Özellikleri	Uygun Materyal
Kuru ısı	Kullanılan ısıda tahrip olmamalıdır (140-180 °C). Sterilize edilecek objeyi ısıdan yalıtırmalıdır.	- Sterilizasyon kâğıtları - Alüminyum folyo - Metal konteyner - Plastik konteyner
Basınçlı buhar	Isı ve neme dayanıklı olmalıdır. Su buharının paket içine giriş ve çıkışına izin vermelidir.	- Sterilizasyon kâğıtları - Kâğıt/Tyvek + Film ürünler - Pamuklu dokuma - Polyester dokuma - Non-woven sargılar - Metal konteyner - Plastik konteyner
Etilen oksit	Etilen oksiti çok fazla absorbe etmemelidir. Etilen oksit ile reaksiyona girmemelidir.	- Sterilizasyon kâğıtları - Non-woven sargılar - Kâğıt/Tyvek + Film ürünler - Metal konteynerler - Plastik konteynerler

Bağımsız sterilizasyon ünitesi olan büyük kuruluşlarda paketlenme işlemlerinde zarf yöntemi, dikdörtgen yöntemi, kâğıt/plastik poşetlerle paketlenme yöntemleri kullanılmaktadır (Görsel 2.12 ve 2.13). Paketlenmede sterilizasyon poşetleri kullanılacaksa ısı ile güvenli kapatma özelliği olan paketlenme makineleri ile kapatılmalıdır (Görsel 2.14).



Görsel 2.12: Dikdörtgen yöntemi ile paketlenmiş malzemeler



Görsel 2.13: Sterilizasyona hazırlanmış malzemeler



Görsel 2.14: Paketlerin ısı uygulaması ile kapatılması

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan ve sterilizasyona hazırlanan bazı araç gereçlerin paketlenme işlemleri (Görsel 2.15) Tablo 2.2'de anlatılmıştır. Paketleri kapatmak amacıyla bütünlüğü bozan (iğne, zımba gibi) malzemeler, baskıya neden olabilecek ipler kullanılmamalıdır. Isı ve sterilizasyon kontrol bantları kapatma amacıyla kullanılabilir.

Tablo 2.2: Bazı Araç Gereçlerin Paketlenme İşlemleri

Deney tüpü, erlenmayer, şişe, balon vb.	Tüplerin ısıya dayanıklı kendi kapakları varsa kapakları ayarlanır. Kapağı yok ise pamuk tıkaçlar hazırlanarak tüpler kapatılır (Görsel 2.13). Tıkaç hazırlamak için tüpün ağzına bir miktar pamuk tutularak ince bir çubuk ile ortasından bastırılır. Pamuğun dışta kalan kısmı el ile kopararak düzeltilir. Tıkaç kendiliğinden düşecek kadar gevşek ve çıkartıldığında yeniden takılamayacak kadar sıkı olmamalıdır. Pamuktan tutulup çekildiğinde malzemeyi kaldıracak sıkılıkta olmalıdır.
Cam pipetler	Pipetler pipet konteyneri içerisinde sterilize edilecekse konteynerin tabanına pamuk konulur. Pipetlerin sivri uçları kabın dibine gelecek şekilde yerleştirilir. Pipet konteyneri kullanılmayacaksa pipetler tek tek kâğıtlara sarılır.
Petri kutuları	Petri kutuları tek tek veya ikili, üçlü gruplar halinde kâğıtlara sarılarak veya kâğıda sarmadan petri kutusu konteynerine yerleştirilerek sterilizasyona hazırlanır.
Metal ve porselen malzemeler	Metal veya porselen malzemeler teker teker veya gruplar halinde kâğıda sarılarak sterilizasyona hazırlanır.
İçerisinde çözelti veya besiyeri bulunan malzemeler	Isıl işlem ile sterilizasyon yapılacaksa ısının artması ile sıvı hacminin artacağı; bazı maddelerde köpürmeye, kabarmaya neden olabileceği unutulmamalıdır. Bu sebeple sıvıların bulunduğu kabın hacmi sıvı hacminin en az 5/4'ü kadar olmalıdır. Vida kapaklı şişeler tam kapatıldıktan sonra bir kaç diş açılarak sterilizasyona hazırlanır. Sterilizasyon sonrası 50 °C'ye kadar soğuduktan sonra kapaklar tam kapatılır.



Görsel 2.15: Sterilizasyon hazırlığı yapılmış araç gereçler

9. UYGULAMA

MALZEME VE ÇÖZELTİLERİN STERİLİZASYON HAZIRLIĞI

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak malzeme ve çözeltilerin sterilizasyon hazırlığı çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Sterilize edilmek istenen malzemeler (petri kutusu, pipet, tüp, besiyeri gibi).

İşlem Basamakları

1. Malzemelerin kaba kirlerini uzaklaştırmak amacı ile çeşme suyu ve fırça ile ön yıkama işlemini yapınız.
2. Malzemelerin, sabun ya da deterjan özelliği olan temizlik maddeleri ile sıcak suda yıkama işlemini yapınız.
 - Yıkama işlemi elde yapılabildiği gibi bulaşık makineleri veya ultrasonik temizleme cihazlarıyla da yapılabilir.
 - Enzimatik temizleyiciler kullanılacak ise enzimin aktif olduğu sıcaklık derecesi dikkate alınmalıdır.
3. Malzemeleri ılık veya soğuk tazyikli bol suyla durulayıp saf sudan geçiriniz.
4. Malzemeleri oda sıcaklığında veya etüvde (65-75 °C'de) kurutunuz.
5. Malzemenin sterilizasyona hazır olup olmadığını kontrol ediniz.
 - Paketlenecek malzemeler temiz ve kuru olmalıdır.
6. Sterilizasyon yöntemine ve malzemenin özelliğine uygun paketleme malzemesi seçiniz.
7. Malzemelerin kapaklarını ayarlayınız. Kapağı yok ise pamuk tıkaçları hazırlayarak kapatınız. Paketleme işlemini yapınız.
 - Pamuğun cam içinde kalan kısmı mümkün olduğu kadar lif uçları bulundurmayacak şekilde katlanmalıdır.
 - Paketler kendiliğinden açılmayacak şekilde yapılmalıdır.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Ön yıkama ve yıkama işlemlerini usulüne uygun yaptı.				
2	Durulama ve kurutma işlemlerini usulüne uygun yaptı.				
3	Paketleme malzemesini sterilizasyon yöntemine ve malzemenin özelliğine uygun seçti.				
4	Malzemenin sterilizasyon öncesi kontrollerini yaparak usulüne uygun pamuk tıkaç hazırladı.				
5	Paketleme işlemini tekniğine uygun yaptı.				
TOPLAM PUAN					

NOT ALINIZ



.....

.....

.....

2.3. IŞINLA, BUHARLA VE KURU ISIL İŞLEMLE STERİLİZASYON

Sterilize edilecek malzemenin özelliğine uygun en etkin yöntemin seçilebilmesi için sterilizasyon yöntemlerinin bilinmesi gerekir. Malzemenin zarar görmeden, işlevini yitirmeden uygun yöntemle sterilize edilmesi esastır. Genel olarak sterilizasyon yöntemleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır:

- Isıl İşlem Uygulamaları ile Sterilizasyon
- Işınlama ile Sterilizasyon
- Kimyasal Maddelerle Sterilizasyon
- Mekanik Yöntemlerle Sterilizasyon

2.3.1. Isıl İşlem Uygulamaları ile Sterilizasyon

Isıl işlem uygulamaları; ucuz, güvenilir, uygulaması kolay, hata yapma olasılığının düşük olması nedeniyle tercih edilen bir sterilizasyon yöntemidir fakat bu yöntemde sadece ısıya dayanıklı malzemeler sterilize edilebilmektedir. Bu yöntemde ısının derecesi ve uygulama süresi ile ortamdaki nem miktarı, ortamın pH'ı ve osmotik basınç gibi etmenler sterilizasyon üzerinde etkilidir. Bu yöntem alevden geçirme ve alevde tutma, kuru sıcak havada, basınçlı ve basınçsız buharda bekletme uygulamalarını kapsamaktadır.

Alevden Geçirme ve Alevde Tutma

Öze, iğne gibi ekim aletleri ile cam ve metal malzemelerin dış yüzlerinin sterilizasyonunda kullanılan yöntemdir. Ayrıca steril kapların ağız kısımları, açıldıktan sonra ve kapatılmadan önce alevden geçirilerek sterilizasyonun bozulmaması sağlanmaktadır. Isıya dayanıklı metalden yapılmış malzemeler alkolle ıslatılıp alevden geçirilerek (Görsel 2.16) veya alevde bekletilerek de sterilize edilebilir.



Görsel 2.16.a: Steril edilecek pensetin alkole daldırılması



Görsel 2.16.b: Pensetin alevden geçirilmesi



Görsel 2.16.c: Pensetin üzerindeki alkolün yanarak uzaklaşması

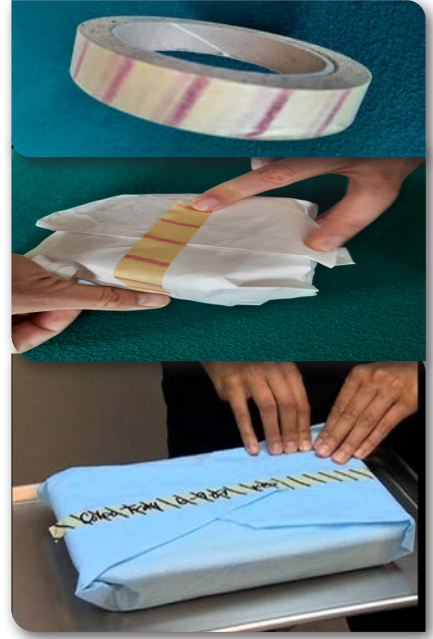
Kuru Sıcak Havada Bekletme

Ortamda nem bulunmadığından sterilizasyon daha uzun sürede yapılmaktadır. Bu amaçla Pastör fırınları (kuru hava sterilizatörü, etüv) kullanılır. Genellikle 170 °C'de bir saat, 160 °C'de iki saat, 140 °C'de ise 3 saat sterilizasyon için yeterlidir. Sıcaklık sterilizasyon derecesine ulaştıktan sonra süre başlatılmalıdır. Bu yöntem ile cam ve metal araç gereçler, içlerine nemin ulaşmadığı yağlar sterilize edilir. Besiyerleri, çözelti ve diğer sıvılar kuru ısı ile sterilize edilmez. Nemli sıcak uygulamaları, kuru sıcak uygulamalarına göre daha etkilidir.

Basınçlı Buhar ile Sterilizasyon

Yüksek ısı, nemli ortam ve basınç altında bozulmayacak malzeme ve besiyerlerinin sterilizasyonunda kullanılır. Bu amaçla otoklav kullanılır. Genellikle 121 °C'de, 1 atmosfer basınç altında 15 dakika bekletilerek sterilizasyon işlemi yapılır. Malzemenin özelliğine göre bazı durumlarda 134 °C'de 2 atmosfer basınç altında 3-5 dakika, 115 °C'de 0,5 atmosfer basınç altında 30 dakika bekletilerek de sterilizasyon yapılabilir. Mikroorganizmalar üzerinde nemli ısı, kuru ısıya göre daha fazla öldürücü etkiye sahiptir.

Otoklavlarda sterilizasyon kontrolü amacıyla kimyasal ve biyolojik indikatörler kullanılmaktadır. İndikatörler, sterilizasyon koşullarında renk değişimi göstererek veya katı hâlden sıvı hâle geçerek yapılan işlem hakkında bilgi verir. Bu amaçla laboratuvarlarda yaygın olarak otoklav bandı kullanılmaktadır. Sterilizasyon işleminde, malzemenin üzerine yapıştırılan otoklav bandı üzerinde renk değişikliği oluşur (Görsel 2.17). Bu durum sterilizasyona girmiş paketlerin kolaylıkla anlaşılmasını da sağlamaktadır.



Görsel 2.17: Otoklav bandı ve otoklav bandı ile sterilizasyon kontrolü

Basıncsız Buhar ile Sterilizasyon

Kaynatma, tindalizasyon, doymuş su buharında tutma uygulamaları örnek olarak verilebilir. Bazı besiyerleri sadece kaynar su banyosunda 30 dakika tutularak sterilize edilir. Yüksek ısıdan zarar gören, sıvı maddelerin sterilizasyonunda zorunluluk halinde kullanılan yöntemlerden birisi de tindalizasyondur. Tindalizasyon yönteminde sıvı maddeler belli bir sıcaklık derecesinde ısıtılıp, oda sıcaklığında bekletilerek birkaç günde sterilizasyon işlemi tamamlanabilmektedir. Bu amaçla benmaride 100 °C'nin altında günde 1 saat ısıtılıp oda sıcaklığında bekletilerek, 3 gün üst üste aynı işlem yapılır. Isıtma işlemleri arasında birer gün bekletilmesinin sebebi sıvı madde içerisinde varsa spor formların vejetatif forma dönüşmesi ve bir sonraki ısıtma işleminde ölmelerinin sağlanmasıdır.

2.3.2. Işınlama (Radyasyon) ile Sterilizasyon

Isı ve diğer yöntemlerle sterilize edilemeyen ortam ve malzemelerin sterilizasyonunda ışınlardan yararlanılmaktadır. Özellikle tek kullanımlık plastik malzemelerin (enjektör, öze, eldiven, hava filtreleri, protez, maske, cerrahi ve diyaliz setleri vb.) sterilizasyonunda gama ışınları kullanılmaktadır. Dünyada üretilen tek kullanımlık tıbbi ürünlerin çoğunluğu bu yöntem ile sterilize edilmektedir. Gama ışınları ambalajdan geçebildiğinden malzemeler ambalajlanmış hâli ile sterilize edilebilmektedir. Ancak bu yöntem oldukça pahalı bir altyapı ve yüksek radyasyon nedeniyle özel güvenlik tedbirlerinin alınmasını gerektirmektedir. Bu nedenle laboratuvarlarda, hastanelerde ve küçük işletmelerde kullanılmaz, büyük oranda endüstriyel üretime yöneliktir.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında aseptik ortam oluşturmak amacıyla ultraviyole (UV) ışınlarından yararlanılarak çalışma yüzeyi ve ortam havasının sterilizasyon ve dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır. Herhangi bir kimyasal kullanılmadığı, kalıntısının olmadığı, pratik ve ucuz olduğu için yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla sterilize odalar veya sterilize kabinlerde UV floresanları kullanılmaktadır. Pratik uygulamada UV lambaları gece boyunca (Uygulama süreleri 8-12 saat civarındadır.) açık bırakılarak ortam sterilizasyonu, çalışma öncesi en az 15-30 dakika açık bırakılarak ortam dezenfeksiyonu sağlanabilir.

10. UYGULAMA

KURU ISIDA (ETÜVDE) STERİLİZASYON

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak malzeme ve çözeltilerin sterilizasyon hazırlığı çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Sterilize edilmek istenen malzemeler (petri kutusu, pipet, numune kabı gibi), kuru hava sterilizatörü (etüv).

İşlem Basamakları

1. Sterilize edilecek malzemeleri sterilizasyona hazırlayınız.
 - Sterilize edilecek malzemelerin tekniğine uygun olarak yıkama, kurulum ve paketlenme işlemlerinin yapılmış olması gerekir.
 - Paketlenmiş malzeme boyutları 10x10x30 cm'den daha büyük olmamalıdır.
2. Sterilizasyon hazırlığı yapılan malzemeleri etüv raflarına yerleştiriniz (Görsel 2.18).
 - Sterilize edilecek malzeme, hava dolaşımını sağlayacak şekilde yerleştirilmelidir.
 - Pipet veya petri kutuları konteynerde sterilize edilecekse konteynerin kapağı açık olarak etüve yerleştirilir (Görsel 2.19). Sterilizasyon işlemi bittikten sonra kapakları kapatılır.
3. Etüvün kapağını kapatınız.
4. Etüvün sıcaklık ve süre ayarını yapınız (Görsel 2.20).
 - Cihaz kullanma talimatına uygun olarak kullanılmalıdır.
5. Etüvün çalışmasını kontrol ediniz.
6. Etüv zaman ayarlı ise alarm sesini duyunca etüvü kapatınız.
7. Etüv zaman ayarlı değilse termostat ışığı söndükten sonra istenilen süreyi tutunuz.
8. Süre sonunda etüvü kapatınız.
9. Sıcaklığın düşmesini bekleyiniz.
10. Malzemeleri çıkarınız.



Görsel 2.18: Etüv (kuru hava sterilizatörü)



Görsel 2.19: Steril edilecek malzemelerin etüve yerleştirilmesi



Görsel 2.20: Etüvün sıcaklık ve süre ayarlarının yapılması

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Çalışma koşullarını düzenledi.				
2	Etüvün temizlik ve dezenfeksiyonunu yaptı.				
3	Etüv ayarlarını tekniğine uygun yaptı.				
4	Etüvü cihaz kullanma talimatlarına uygun çalıştırdı.				
5	Kuru ısıda sterilizasyon işlemlerini yaptı.				
TOPLAM PUAN					

11. UYGULAMA

BASINÇLI BUHAR ORTAMINDA (OTOKLAVDA) STERİLİZASYON

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak basınçlı buhar ortamında (otoklavda) sterilizasyon çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

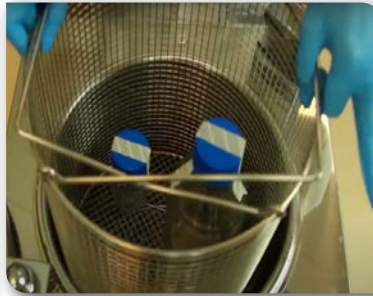
Sterilize edilmek istenen malzemeler
(besiyeri, dilüsyon sıvısı gibi), otoklav.

İşlem Basamakları

1. Sterilize edilecek malzemeleri sterilizasyona hazırlayınız (Görsel 2.21).
 - Sterilize edilecek malzemelerin tekniğine uygun olarak yıkama, kurulama ve paketlenme işlemleri yapılmış olmalıdır.
 - Vida kapaklı ve içerisinde besiyeri bulunan şişeler gevşek olarak (Tam olarak kapatıldıktan sonra birkaç tur açılmış olmalı.) kapatılmalıdır.
2. Otoklavı açınız. Otoklavın su seviye göstergesine bakarak eksikse tamamlayınız.
3. Sterilizasyon hazırlığı yapılan malzemeleri otoklav sepetine yerleştiriniz. Otoklav, cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak kullanılmalıdır.
 - Kirli ve temiz malzemeler aynı anda sterilize edilmemeli, ayrı ayrı sterilize edilmelidir.
 - Sterilizasyon kontrolü için malzemelerden birine otoklav bandı yapıştırılmalıdır.
4. Malzeme yerleştirilen sepetleri otoklava yerleştiriniz (Görsel 2.22).
 - Otoklavın kazan hacminin en fazla %70'i doldurulmalıdır.
 - Malzemeler buhar giriş çıkışını ve dolaşımını engellemeyecek şekilde yerleştirilmelidir.
5. Otoklavın kapağını kapatınız.



Görsel 2.21: Sterilizasyon hazırlığı yapılmış malzemeler



Görsel 2.22: Steril edilecek malzemelerin otoklava konulması



Görsel 2.23: Otoklavda sıcaklık ve süre ayarlarının yapılması

6. Otoklavın sıcaklık ve süre ayarını yapınız (Görsel 2.23).
 - Farklı hacimler mümkün olduğu kadar otoklava beraber konulmamalıdır. Zorunluluk durumunda hacmi en büyük olan kaba göre sıcaklık ve süre belirlenir.
 - Otoklavlama süresi çözeltinin hacmi, kullanılan cam kapların çeper kalınlığı, çözeltinin içerdiği maddelerin ısı iletim gücüne (besiyerinin agarlı olup olmaması gibi) göre belirlenmelidir.
7. Otoklav özelliği gereği havasını otomatik olarak boşaltmıyorsa hava çıkış vanasını sonuna kadar açınız. Buhar çıkışı başladığı zaman veya sıcaklık göstergesi 90 °C'yi gösterdiğinde vanayı kapatınız.

8. Çift cidarlı otoklavlarda otomatik olarak buhar vermiyorsa buhar besleme tuşuna basınız.
9. Basınç ve sıcaklık göstergelerini kontrol ediniz (Görsel 2.24).
10. Otoklav vakumlu sisteme sahip değilse buhar çıkış vanasını açınız.
11. Süre sonunda otoklavda basınç kalmayınca (basınç değeri sıfır oluncaya) kadar bekleyiniz.
12. Otoklavın kapağını açıp sterilize edilmiş materyali kontrol ederek alınız (Görsel 2.26).
 - Basınç değeri sıfıra, sıcaklık 80 °C'ye düştükten sonra kapak açılmalıdır (Görsel 2.25).
 - Otoklavdan malzeme paketleri kuruyunca alınmalıdır. Islak paketlerin kolayca yırtılabileceği ve kontaminasyon riskinin daha yüksek olduğu unutulmamalıdır.
 - Vida kapaklı ve içerisinde çözelti veya besiyeri bulunan şişelerin kapakları 50 °C'ye kadar soğuduktan sonra kapatılmalıdır.
 - Otoklav bandının renk değiştirip değiştirmediği kontrol edilmelidir (Görsel 2.26).
13. Otoklavı temizleyiniz ve bir sonraki kullanıma hazır halde bırakınız (Görsel 2.27).



Görsel 2.24: Otoklavda sterilizasyon anında göstergeler



Görsel 2.25: Sterilizasyon sonrası kapağın açılması



Görsel 2.26: Sterilizasyon işleminden çıkarılan malzemeler



Görsel 2.27: Otoklavın temizliği

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Çalışma koşullarını düzenledi.				
2	Otoklavın temizlik ve dezenfeksiyonunu yaptı.				
3	Otoklav ayarlarını tekniğine uygun yaptı.				
4	Otoklavı cihaz kullanma talimatlarına uygun çalıştırdı.				
5	Otoklavda sterilizasyon işlemlerini yaptı.				
TOPLAM PUAN					

12. UYGULAMA

UV IŞINLARI İLE STERİL ÇALIŞMA ORTAMI OLUŞTURULMASI

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak UV ışınları ile steril çalışma ortamı oluşturulması çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Steril kabin, bunzen bek, temizlik malzemeleri.

İşlem Basamakları

1. Steril kabini boşaltınız.
2. Steril kabini temizleyiniz (Görsel 2.28).
 - UV ışınlarının etkili olabilmesi için kabin ve lamba yüzeyi temiz olmalıdır.
3. Steril kabinin cam kapağını kapatınız (Görsel 2.29).
4. Çalışmaya başlamadan en az 15-30 dakika önce UV lambasını açarak çalıştırınız (Görsel 2.30).
 - UV ışınları göze ve cilde zararlı olduğu için koruyucu malzeme kullanılmalıdır.
 - UV ışığı altında kalınmamalı, çıplak gözle UV lambasına bakılmamalıdır.
5. Bunzen beki açarak çakmakla yakınız.
6. Bunzen bekin hava giriş yerini açıp kapatarak alev rengi içte parlak mavi, dışta soluk mavi olacak şekilde ayarlayınız.
7. Çalışmaya başlamadan önce hava filtresini çalıştırınız (Görsel 2.31).
 - Hava filtresi girişleri açık olmalıdır.
 - Filtre ömür saati kontrol edilir. Süre dolmuşsa filtre değiştirilmelidir.



Görsel 2.28: Steril kabin temizliği



Görsel 2.29: Steril kabinin cam kapağının kapatılması



Görsel 2.30: UV lambasının yakılması



Görsel 2.31: Hava filtresinin çalıştırılması

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Çalışma koşullarını düzenledi.				
2	Steril kabinin temizlik ve dezenfeksiyonunu yaptı.				
3	Bek alevini tekniğine uygun ayarladı.				
4	Steril kabini cihaz kullanma talimatlarına uygun kullandı.				
5	UV lambasını kullandı.				
TOPLAM PUAN					

2.4. KİMYASAL MADDELERLE STERİLİZASYON VE DEZENFEKSİYON

Bazı kimyasal maddelerin mikroorganizmaları öldürme (mikrobiyosidal) veya üremelerini durdurma (mikrobiyostatik) özelliği vardır. Bu kimyasal maddelerin uygun konsantrasyonları, cansız yüzeylere belirli bir süre uygulanarak dezenfeksiyon işlemi yapılır. Kimyasal maddelerle cansız yüzeylerde bulunan bakteri sporları dışındaki tüm patojen mikroorganizmaların öldürülmesi ve mikroorganizma yükünün azaltılması işlemine **dezenfeksiyon** adı verilir. Bu amaçla kullanılan kimyasal maddelere **dezenfektan** denir.

2.4.1. Dezenfeksiyon ve Önemi

Dezenfeksiyon, insan sağlığını tehdit eden virüs, bakteri ve mantarlara karşı korunma yollarından birisidir. Dezenfeksiyonda amaç ortamdaki potansiyel tehlikeye sahip mikroorganizmaların sayısını ve türünü azaltmak veya tamamen yok etmektir. Mikrobiyoloji laboratuvarında, çalışanın ve analizin güvenliği açısından çalışma öncesinde ve sonrasında çalışma alanlarının dezenfeksiyonu yapılmalıdır.

Dezenfeksiyon, işlemi tüm mikroorganizmaların öldürülmesinin gerekmediği ancak miktarlarının kabul edilebilir bir seviyeye düşürülmesinin yeterli olduğu ortam ve malzemelerde kullanılır. Sterilizasyonda ise mikroorganizmaların tamamının öldürülmesi gerekir. Sterilize edilen malzemede hiçbir canlı mikroorganizma kalmamalıdır. Dezenfeksiyonun sterilizasyondan en önemli farkı bakteri sporlarının tamamının yok edilememesidir. Dezenfektanlar, bazı dirençli mikroorganizmalar ile sporlar üzerinde etkili değildir.

Sterilizasyon için kullanılan kimyasal maddeler canlı dokulara zarar verdiğinden kullanımlarında çok dikkatli olmak gerekir. Sadece uygun alet ve yetkili personel bulunan kuruluşlarda uygulanır.

2.4.2. Dezenfeksiyon Amacıyla Kullanılan Kimyasal Maddeler

Farklı ticari kuruluşlar tarafından dezenfeksiyon amaçlı üretilen çok farklı ürünler bulunmaktadır. Bunlar kullanılırken mutlaka firmanın önerdiği kullanım talimatlarına uyulmalıdır.

Dezenfektanları etki şekillerine göre dört gruba ayırmak mümkündür. Bunlar:

- Hücre zarını etkileyen dezenfektanlar
- Hücre proteinlerini denatüre eden dezenfektanlar
- Enzim aktivitesini bozan dezenfektanlar
- Nükleik asitler üzerinde etkili dezenfektanlar

Dezenfektanlar; etki düzeylerine göre yüksek, orta ve düşük etkili olarak üç grupta değerlendirilmektedir. Tablo 2.3'te etki düzeylerine göre dezenfektanlara örnek verilmiştir.

Tablo 2.3: Etki Düzeylerine Göre Dezenfektanlar

Etki Düzeyi	Etkili Olduğu Mikroorganizmalar	Dezenfektan Madde	Uygulama Süresi
Yüksek Seviye	Tüm mikroorganizmaların vejetatif hücreleri üzerinde etkili, sporlar üzerinde kısmen etkili	%2 Gluteraldehit	20 dakika
		%0,55 Orto-fitalaldehid (OPA)	12 dakika
		%0,2 Perasetik asit	5-10 dakika
		%7,5 Hidrojen peroksit	10-20 dakika
		Klor dioksit	5 dakika



Orta Seviye	Mikobakteriler ve diğer bakterilerin vejetatif hücreleri üzerinde etkili, sporlar üzerinde etkisiz	%70-90 Etil veya izopropil alkol	10 dakika
		%0,4-5 Fenol ve fenol bileşikleri	
		İyodoforlar (30-50 ppm serbest iyot)	
		%4 Glikoprotamine	
		%50 Etil veya izopropil alkol	
Düşük Seviye	Sporlar, mikobakteri ve zarfsız virüsler dışındaki vejetatif bakterilerde etkili	Sodyum hipoklorit (100 ppm serbest klor)	10 dakika
		%3 Hidrojen peroksit	
		%0,5 Kuarternar amonyum bileşikler	

Dezenfektanın konsantrasyonu, etki süresi, ısı, pH, organik madde miktarı, mikroorganizmanın cins ve türleri ile bulunduğu yaşam evresi dezenfektan maddenin gücünü etkilemektedir. Genel olarak ortamın pH'ı nötrden (7) uzaklaştıkça, ortamın ısısı, dezenfektanın konsantrasyonu, dezenfektan madde ile mikroorganizma temas süresi arttıkça; ortamda bulunan organik madde miktarı azaldıkça dezenfeksiyon işleminin etki gücü artmaktadır.

2.4.3. Dezenfektanların Taşınması Gereken Özellikler

Dezenfektan maddelerin istenilen bütün özelliklere sahip olması mümkün değildir.

Dezenfektanların genel olarak taşınması gereken özellikler:

- Suda kolay ve homojen çözünmeli,
- Ucuz olmalı ve piyasadan kolay temin edilebilmeli,
- Geniş etki spektrumuna sahip olmalı ve hızlı etki göstermeli,
- Toksik olmamalı ve çevreye zarar vermemeli,
- Hariç maddelerle birleşmemeli ve aktivitesini kaybetmemeli,
- Aşındırıcı etki göstermemeli, temizlik araçları ile geçimsiz olmamalıdır.

Risk oluşturan mikroorganizma türüne, dezenfeksiyonun amacı ile uygulanacak ortam koşullarına göre dezenfektan seçilmelidir. Kullanım alanlarına göre dezenfektanlara Tablo 2.4'te örnekler verilmiştir.

Tablo 2.4: Kullanım Alanlarına Göre Dezenfektan Örnekleri

Dezenfektan	Kullanım Alanı
Alkol	Deri ve yara antisepsisi, bazı malzemelerin dezenfeksiyonu
Hidrojen peroksit	Deri ve yara antisepsisi, bazı malzemelerin dezenfeksiyonu
Gluteraldehit	Eşya ve odaların dezenfeksiyonu, cerrahi malzemelerin dezenfeksiyonu
Sodyum hipoklorit	Çeşitli eşyaların, çamaşırların ve ortamın dezenfeksiyonu, suların dezenfeksiyonu
İyot bileşikler	Deri antisepsisi ve çeşitli malzemelerin dezenfeksiyonu
Kreozol	Yüzeylerin dezenfeksiyonu
Lizol	Deri antisepsisi, hastane ortamı dezenfeksiyonu
Klor	Kirli suların dezenfeksiyonu
Sönmemiş kireç	Kadavra, septik çukur ve hasta çıkartılarının dezenfeksiyonu
Sabun ve deterjanlar	Mekanik temizleme



2.4.4. Çalışma Ortamında Dezenfeksiyon ve Antisepsi

El Antisepsisi: Mikroorganizmaların bulaştırılmasında ve yayılmasında temas önemli bir yer tutmaktadır. Temasta en etkili unsur ise ellerdir. Ellerin sık sık usulüne uygun yıkanması mikroorganizmaların uzaklaştırılmasını sağlayarak bu konuda ciddi bir önlem oluşturmaktadır. Günlük hayatta elleri 20 saniye sabunla yıkamak yeterlidir. Laboratuvar çalışanlarının ise ellerini daha uzun süre (2-3 dakika) yıkamaları gerekir.

Laboratuvarda Zemin, Tezgâh ve Masaların Dezenfeksiyonu

Laboratuvar ortamı günün sonunda uygun bir dezenfektan (%5 fenol, %5 kreozol, %3 lizol gibi) ile temizlenmelidir (Görsel 2.32). Eğer laboratuvarda virüse bağlı risk varsa bu dezenfektanlara ek olarak %1-3 sodyum veya kalsiyum hipoklorit kullanılmalıdır.

Araç Gereçlerin Dezenfeksiyonu

Kültürle bulaşık, kirli malzemeler (pipet, lam vb.) yeterli süre dezenfektan çözeltisi (% 2-4 hipoklorit gibi) içerisinde bekletildikten sonra tekrar kullanılacaksa temizlenmeli, kullanılmayacaksa atılmalıdır.



Görsel 2.32: Dezenfeksiyon işlemi

Bunları Biliyor musunuz?

2019 yılında ortaya çıkan ve Türkiye'yi de etkisi altına alan Covid pandemi süreci, hijyen konusunun ne kadar önemli olduğunu göstermiştir. Toplumu oluşturan bireylerin maske kullanımı, insanlara mesafeli durması ve hijyen konusuna gösterecekleri hassasiyet sadece kendi sağlıkları ile sınırlı değildir. Bireylerin sorumluluğu, kendi sağlığının yanında başkalarının sağlığını ve haklarını koruma konusunda da hassas davranmalarını gerektirir.

2.4.5. Sterilizasyon Amacıyla Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sterilizasyon amacıyla etilen oksit (EO), glutaraldehit, perasetik asit, formaldehit ve hidrojen peroksit gazı (gaz plazma) kullanılmaktadır. Laboratuvarlarda kullanımları oldukça sınırlı olup yüksek ısıda sterilize edilemeyen, ısıya duyarlı hassas malzemelerin sterilizasyonunda kullanılmaktadır. Bu maddelerin kullanımı tehlikeli ve sağlığa zararlı (toksik, kanserojen, yanıcı, patlayıcı ve çevre için zararlı) olduğu için kapalı özel cihazlarda yapılmaktadır.

13. UYGULAMA

LABORATUVAR VE ARAÇ GEREÇLERİN DEZENFEKSİYONU

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak laboratuvar ve araç gereçlerin dezenfeksiyonu çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Dezenfektan madde, deterjan, temizlik malzemeleri.

ARAÇ GEREÇLERİN DEZENFEKSİYONU

İşlem Basamakları

- Araç gerecin özelliğine uygun dezenfektan maddeyi seçiniz.
 - Kullanım amacı ve laboratuvarın risk düzeyine göre seçim yapıldığı unutulmamalıdır.**
- Seçilen dezenfektan maddenin kullanım talimatını inceleyiniz.
- Dezenfektan çözeltisini hazırlayınız.
 - Üretici firma talimatlarına uygun olarak ihtiyaç duyulan miktarda hazırlanmalı, israf edilmemelidir.**
 - Dezenfektan maddelerin deri ve göze zararlı olabileceği unutulmamalıdır.**
 - Uygun koruyucu malzeme (eldiven, gözlük, maske vb.) kullanılmalıdır.**
- Araç gerecin dezenfeksiyona uygun olup olmadığını kontrol ediniz.
 - Araç gereçler temiz ve kuru (yıkama, durulama ve kurulama yapılmış) olmalıdır.**
- Araç gereçleri dezenfektan kullanım talimatına uygun olarak dezenfekte ediniz.
 - Araç gereç dezenfektana tamamen batırılmalı ve belirtilen süre kadar içinde kalmasına dikkat edilmelidir.**
- Araç gereçleri bol temiz su ile durulayınız ve kurutunuz.

LABORATUVAR DEZENFEKSİYONU

İşlem Basamakları

- Laboratuvar masa ve tezgâhlarını deterjanlı su ile temizleyiniz.
- Durulama yapınız.
- Laboratuvar tezgâh ve masalarını dezenfektan ile siliniz.
- Laboratuvar zeminini temizleyerek deterjanlı su ile siliniz.
 - Temizlik işlemleri en az kirliden, en kirli alana doğru yapılmalıdır.**
- Laboratuvar zeminini dezenfektan çözeltisiyle siliniz.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Dezenfektan çözeltisini usulüne uygun hazırladı.				
2	Laboratuvarda zemin, tezgâh ve masaların temizliğini yaptı.				
3	Araç gereçlerin temizliğini yaptı.				
4	Araç gereçlerin dezenfeksiyon işlemlerini yaptı.				
5	Laboratuvarda zemin, tezgâh ve masaların dezenfeksiyon işlemini yaptı.				
TOPLAM PUAN					

2.5. MEKANİK YÖNTEMLERLE STERİLİZASYON

Mekanik yöntemlerle temizlik ve sterilizasyon işlemlerinde filtrasyon ve ultrasonik vibrasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

2.5.1. Filtrasyon Yöntemi ile Sterilizasyon

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında filtrasyon yönteminin farklı kullanım alanları vardır. Bunlar; çözeltilerin ve havanın sterilizasyonu, farklı büyüklükteki mikroorganizmaların birbirlerinden ayrılması, toksin, antijen ve enzimlerin hücrelerden arındırılması, çözeltilerin saflaştırılması gibi uygulamalardır. Filtrasyon, ısıya dayanıksız sıvılar (serum ve kan ürünleri, aşılar, ilaçlar, bazı besiyerleri, enzim ve vitaminler gibi) ile havanın sterilize edilmesinde tercih edilen bir yöntemdir. Diğer sterilizasyon yöntemlerinden farkı mikroorganizmalar öldürülmeden ortamdan uzaklaştırılmaktadır.

Sıvı içerisinde bulunan mikroorganizmaların özel filtrelerden geçirilerek ayrılması filtrasyon yönteminin temel prensibidir. Bu yöntemde iki farklı filtre tipi kullanılmaktadır. Bunlar; gözenekleri bakterilerden daha küçük olan **mekanik** filtreler ile bakterilerin zıt elektrik yüküne sahip olan **adsorbsiyon** filtreleridir. Adsorbsiyon filtrelerinde ise filtre ile bakteriler zıt elektriksel yüke sahip olduğundan bakteriler filtreye tutunur ve süzüntüye geçemezler. Mekanik filtrelere membran ve ultra filtreler adsorbsiyon filtrelerine ise seitz filtreleri örnek verilebilir.

Membran filtreler günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebi istenilen gözenek çaplarında tek kullanımlık ve sterilize olarak piyasadan kolay temin edilebilmesidir.

2.5.2. Ultrasonik Vibrasyon Yöntemi ile Sterilizasyon

Ultrasonik vibrasyon, yüksek frekanslı ses dalgalarının sıvı içerisinde meydana getirdiği titreşim hareketini ifade etmektedir. Ultrasonik dalgalar, sıvı içindeki hücrelerin yırtılmasına ve içeriklerinin dağılmasına sebep olmaktadır. Bu yöntem daha çok enzimlerin, hücre çeperi ve hücre içi yapıların ekstraksiyonunda kullanılmaktadır.

Ultrasonik vibrasyon, mekanik olarak hassas olan aletlerin (mikrocerrahi, dental aletler vb.) temizliğinde tercih edilmektedir. Normal temizlikte fırçalar tüm yüzeylere ulaşamamakta, temizlik tam anlamıyla yapılamamaktadır. Oysa ultrasonik dalgalar en ince yüzey ve girintilere girerek temizleme işlemini yapabilmektedir. Ses dalgalarının yarattığı titreşim yüksek hızla fırçalama etkisi göstermektedir.

Ultrasonik vibrasyon cihazının temizleme işlemini doğru yapıp yapmadığını kontrol etmek amacıyla iki farklı test yapılmaktadır. Bunlar lam ve alüminyum folyo testidir.

14. UYGULAMA

FİLTASYON YÖNTEMİ İLE STERİLİZASYON

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak filtrasyon yöntemi ile sterilizasyon çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

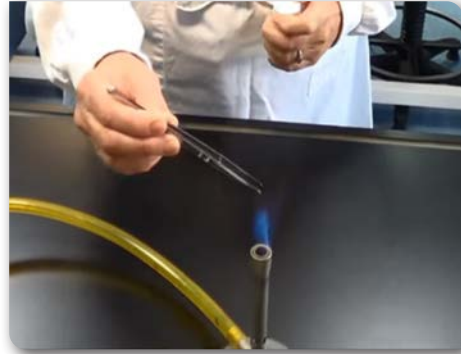
Bunzen bek, filtrasyon düzeneği, sterilize edilmek istenen çözelti, vakum pompası, nuçe erleni.

İşlem Basamakları

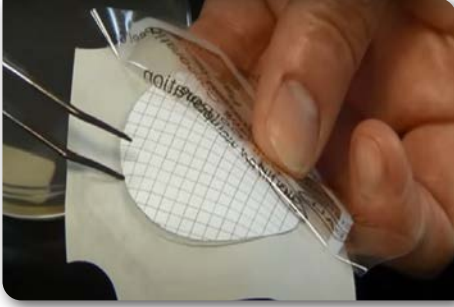
1. Filtrasyon düzeneğinde kullanılacak araç gereçleri ayrı ayrı ambalajlayarak otoklavda sterilize ediniz (Görsel 2.33).
 - Filtrasyon düzeneğinde kullanılacak araç gereçler (süzgeç, süzgeç tutar, sıvının konulacağı ve süzüntünün toplanacağı kaplar) steril olmalıdır.
2. Filtreler sterilize değilse petri kutularında her süzgecin arasına bir kurutma kağıdı koyarak steril ediniz.
3. Aseptik ortam oluşturunuz.
4. Filtrasyon düzeneğini kurunuz (Görsel 2.37).
5. Filtreyi steril penset yardımıyla süzgeç tutarına yerleştiriniz (Görsel 2.35 ve 2.36).
 - Penset alkolle ıslatılıp bunzen alevinden geçirilerek sterilize edilmelidir (Görsel 2.34).
6. Filtrasyon düzeneğini kontrol ediniz (Görsel 2.38).
7. Süzülecek sıvıyı huni içerisine koyunuz.
8. Süzüntünün toplanacağı kabın emziğine vakum pompasını bağlayarak çalıştırınız.
9. Süzme işlemini yapınız.
10. Süzme işlemi bitince önce vakum musluğunu sonra vakum pompasını kapatınız.
11. Steril süzüntüyü (filtrat) alınız.
12. Sterilite kontrolü yapınız.



Görsel 2.33: Filtrasyon düzeneğinde kullanılan malzemeler



Görsel 2.34: Pensetin alevde steril edilmesi



Görsel 2.35: Steril filtrenin alınması



Görsel 2.36: Filtrenin düzeneğe yerleştirilmesi



Görsel 2.37: Filtrasyon düzeneğinin kurulması



Görsel 2.38: Filtrasyon düzeneğinin kontrol edilmesi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Filtrasyon düzeneğinde kullanılacak araç ve gereçlerin sterilizasyonunu yaptı.				
2	Aseptik kurallara uygun çalıştı.				
3	Filtrasyon düzeneğini kurdu.				
4	Vakum pompasını cihaz kullanma talimatına uygun çalıştırdı.				
5	Filtrasyon işlemini gerçekleştirdi.				
TOPLAM PUAN					

NOT ALINIZ



15. UYGULAMA

ULTRASONİK VİBRASYON YÖNTEMİ İLE TEMİZLİK

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak ultrasonik vibrasyon yöntemi ile temizlik çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen bek, ultrasonik vibratör cihazı, sterilize edilecek malzeme.

İşlem Basamakları

1. Ultrasonik vibratör cihazını kullanıma hazır hale getiriniz (Görsel 2.39).
2. Sterilize edilecek malzemeleri uygun kaplara yerleştiriniz.
 - **Malzemeleri koymak için delikli küvet, tel sepet gibi sıvı hareketini engellemeyecek kaplar kullanılmalıdır (Görsel 2.39).**
 - **Malzemelerin birbirine temas etmemesine özen gösterilmelidir.**
3. Sterilize edilecek malzemelerin konduğu kapları cihaza yerleştiriniz (Görsel 2.40).
4. Kullanılacak temizleme ve dezenfektan çözelti konsantrasyonlarını üretici firma önerilerine uygun olarak hazırlayınız (Görsel 2.41).
5. Kullanılacak sıvının sıcaklığını üretici firma önerilerine uygun olarak ayarlayınız.
6. Malzemenin tamamını sıvının içerisine batırınız.
7. Cihazın dalga boyu ve süre ayarlarını yaparak cihazı çalıştırınız (Görsel 2.42).



Görsel 2.39: Ultrasonik vibratör cihazının hazır hale getirilmesi



Görsel 2.40: Temizlenecek malzemelerin yerleştirilmesi



Görsel 2.41: Temizleme çözeltisinin eklenmesi



Görsel 2.42: Ultrasonik vibratör cihazının çalıştırılması

8. İşlem bittikten sonra malzemeleri çıkarınız (Görsel 2.43).
9. Çıkartılan malzemeleri elle ya da makine ile durulayınız (Görsel 2.44).
10. Saf sudan geçiriniz.



Görsel 2.43: Malzemelerin cihazdan çıkarılması



Görsel 2.44: Malzemelerin durulanması

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Sterilize edilecek malzemelerin ön hazırlıklarını yaparak cihaza yerleştirdi.				
2	Kullanılacak temizleme ve dezenfektan çözeltilerini hazırladı.				
3	Ultrasonik vibratör cihazının dalga boyu ve süre ayarlarını yaptı.				
4	Ultrasonik vibratörü cihaz kullanma talimatına uygun çalıştırdı.				
5	Ultrasonik vibrasyon yöntemi ile temizlik işlemini gerçekleştirdi.				
TOPLAM PUAN					

SIRA SİZDE



Ultrasonik vibrasyon cihazının temizleme işlemini doğru yapıp yapmadığını kontrol etmek amacıyla aşağıda bilgileri verilen testler yapılmaktadır. Bu testlerden birini öğretmen gözetiminde yapınız.

Lam Testi: Rodajlı bir lam alınarak ıslatılır. Rodajlı kısım köşeden köşeye kurşun kalemle çizilir. Rodajlı kısım, küvetin içine sokularak cihaz çalıştırılır. 10 saniye içinde çizgi tamamen silinirse cihazın etkin olarak çalıştığı anlaşılır.

Alüminyum Folyo Testi: Aynı ebatlarda üç adet alüminyum folyo (10x20 cm) kesilir. Her parça katlanarak farklı bir çubuğa takılır. Küvetin içine daldırılır. Birisi küvetin ortasına, diğerleri ise kenarlara beşer cm uzağa yerleştirilir. Cihaz çalıştırılarak 10 dakika bekletilir. İşlem sonrası folyolar incelenir. Alüminyum folyoların hepsi eşit derecede kırışmış ve delinmiş ise cihazın etkin olarak çalıştığı anlaşılır.



A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında analizlerde kullanılacak tüm araç gereçler (analiz numunesi hariç) olmak zorundadır.
2. Sterilizasyon aşamaları sırasıyla: Ön yıkama, yıkama, durulama, kurulama, ... sterilizasyon işlemi ve depolama basamaklarından oluşur.
3. Ucuz, güvenilir, uygulaması kolay, hata yapma olasılığının düşük olması nedeniyle uygulamaları tercih edilen bir sterilizasyon yöntemidir.
4. Öze, iğne gibi ekim aletleri ile cam ve metal malzemelerin dış yüzlerinin sterilizasyonunda yöntemi kullanılır.
5. Isıya dayanıklı, boş cam ve metal araç gereçler ile içlerine nemin ulaşamadığı yağların sterilizasyonunda yöntemi kullanılır.
6. Yüksek ısı, nemli ortam ve basınç altında bozulmayacak malzeme, çözelti ve besiyerlerinin sterilizasyonunda yöntemi eklenir.
7. Özellikle tek kullanımlık plastik malzemelerin (enjektör, öze, eldiven, hava filtreleri, protez, maske, cerrahi ve diyaliz setleri vb.) sterilizasyonunda yöntemi kullanılır.
8. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında aseptik ortam oluşturmak amacıyla ışınlarından yararlanılarak çalışma yüzeyi ve ortam havasının sterilizasyon ve dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır.
9. Kültürle bulaşık, kirli malzemeler (pipet, lam vb.) yeterli süre çözeltisi içerisinde bekletildikten sonra tekrar kullanılacaksa temizlenmeli, kullanılmayacaksa atılmalıdır.
10. Bir sıvı içerisinde süspansiyon hâlde bulunan mikroorganizmaların belli gözenek çaplarına sahip özel filtrelerden geçirilerek ayrılması işlemi yöntemini tarif etmektedir.
11. Dezenfektanlar bazı dirençli mikroorganizmalar ile üzerinde etkili değildir.
12. Yüksek ısıdan zarar gören sıvı maddelerin sterilizasyonunda zorunluluk halinde yöntemi kullanılır.



B) Aşağıda verilen soruların doğru cevabını işaretleyiniz.

- 13. Aşağıdakilerden hangisi istenmeyen bir mikroorganizmanın ya da hastalık etmeninin bulaşmasıdır?**
 A) Asepsi B) Dekontaminasyon C) Dezenfeksiyon
 D) Kontaminasyon E) Steril
- 14. Mikroorganizmaların korunmuş bir alana bulaşmalarının önlenmesi ve bunun devamlılığının sağlanmasına yönelik yapılan işlemlerin tamamını karşılayan terim aşağıdakilerden hangisidir?**
 A) Asepsi B) Aseptik teknik C) Dezenfeksiyon D) Kontaminasyon E) Steril
- 15. Aşağıdakilerden hangisi doymuş su buharının elde edilmesi, uygun bir sıcaklığa çıkarılması ve buharın kontrollü basınç altında tutulmasını sağlayan donanımına sahip olan bir cihazdır?**
 A) Benmari B) Etüv C) Otoklav D) Pastör fırını E) Su banyosu
- 16. Çözelti veya besiyerleri aşağıdaki cihaz veya yöntemlerden hangisi ile sterilize edilemez?**
 A) Benmari B) Etüv C) Su banyosu D) Otoklav E) Filtrasyon düzeneği
- 17. Hastalık yapan vejetatif bakterilerin tamamının öldürülmesi ve mikroorganizma yükünün azaltılması işlemi aşağıdakilerden hangisidir?**
 A) Dekontaminasyon B) Dezenfeksiyon C) Kontaminasyon
 D) Sterilizasyon E) Temizlik
- 18. Aşağıdakilerden hangisi kuru ısı uygulamaları ile sterilize edilemez?**
 A) Kum B) Numune kabı C) Sıvı besiyeri D) Petri kutusu E) Pipet
- 19. Aşağıdakilerden hangisi otoklavda sterilize edilemez?**
 A) Çözelti B) Eküvyon C) Sıvı besiyeri D) Şekerli su E) Plastik pipet
- 20. Dünyada üretilen tek kullanımlık tıbbi ürünlerin (enjektör, protez vb.) çoğunluğunun ambalajlanmış hâli ile sterilizasyonunda kullanılan, oldukça pahalı bir altyapı ve yüksek radyasyon gerektiren sterilizasyon yöntemi aşağıdakilerden hangisidir?**
 A) Filtrasyon B) Gama ışınları C) Kuru ısı D) Otoklav E) Ultrasonik vibrasyon
- 21. Aşağıdakilerden hangisi ısı ile sterilizasyonda etkili değildir?**
 A) Isının temas süresi B) pH C) Renk
 D) Sıcaklık derecesi E) Organik madde miktarı
- 22. Aşağıdakilerden hangisi ultrasonik vibrasyon cihazının temizleme işlemini doğru yapıp yapmadığını kontrol etmek amacıyla kullanılan testlerdendir?**
 A) Aktarma B) Alüminyum folyo C) Aseptik
 D) Sterilizasyon kontrol E) Temizlik

3.

ÖĞRENME BİRİMİ



BESİYERİ HAZIRLAMA

TEMEL KAVRAMLAR

Besiyeri
Dehidre Besiyeri
Şahit Besiyeri
pH
Sterilizasyon
İndikatör
Agar

KONULAR

- 3.1. Besiyeri Hazırlama Ön İşlemleri
- 3.2. Besiyeri Hazırlama İşlemleri
- 3.3. Besiyerlerinde Sterilizasyon Sonrası İşlemler

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Kullanım amacına uygun besiyeri hazırlama ön işlemlerini yapmayı,
- Kullanılacak besiyerinin özelliğine ve kullanım amacına uygun besiyeri hazırlama işlemlerini yapmayı,
- Kullanım amacına uygun besiyeri hazırlamada sterilizasyon sonrası işlemleri yapmayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Canlı türlerine göre besin ihtiyaçları farklılık göstermekte midir? Etçil bir canlıyı bitkisel kaynaklı gıdalarla beslemek mümkün müdür?
2. Mikroorganizma türlerinin besin ihtiyaçları aynı mıdır? Farklılıklar varsa üretilmek istenen mikroorganizmaların ihtiyaçlarına göre nasıl bir ortam oluşturmak gerekir?
3. Çok fazla sayıda mikroorganizma türü olduğuna göre, farklı bileşimlere sahip ortamlar oluşturulabilir mi?



3.1. BESİYERİ HAZIRLAMA ÖN İŞLEMLERİ

Mikroorganizmaların, yaşayıp üreyebilmeleri için laboratuvar ortamında hazırlanmış, ihtiyaç duyduğu besin maddeleri ve ortam şartlarının sağlandığı yerlere **besiyeri** denir. Besiyerlerine; ortam, kültür ortamı, vasat, medium (midyum) gibi isimler de verilmektedir.

Besiyerleri; mikroorganizmaların üretilmesi, canlılıklarının devam ettirilmesi, saf kültürlerinin elde edilmesi, tanımlanmaları, yapısal ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, biyolojik ve metabolik ürünlerinin elde edilmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır.

Besiyerleri hazırlamanın amacı; incelenecek mikroorganizmanın gelişmesini sağlayacak gerekli besin maddelerinin dengeli karışımını ve ortam şartlarını oluşturmaktır. Besiyeri içerisinde bulunan maddeler, üretilmek istenen mikroorganizmanın tür ve cinsine göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak besiyerlerinde su, pepton, maya ekstraktı, et ekstraktı, malt ekstraktı, beyin ve kalp ekstraktı, karbohidrat, agar, tuz gibi maddelerin bir kısmı bulunmaktadır. Bazı besiyerlerinde ise bu maddelere ek olarak indikatör, inhibitör ve tampon maddeler de bulunmaktadır. Görsel 3.1'de farklı şekilde hazırlanmış besiyerleri gösterilmiştir.



Görsel 3.1: Farklı şekilde hazırlanmış besiyerleri

3.1.1. Besiyerlerinin Sınıflandırılması

Besiyerleri; genel olarak, fiziksel özelliklerine, kaynaklarına ve kullanım amacına göre sınıflandırılmaktadır.

3.1.1.1. Genel Besiyerleri

Genel olarak besiyerleri, doğal ve sentetik besiyerleri olarak iki grupta incelenebilir.

- **Doğal Besiyerleri:** Canlı ve cansız olarak ikiye ayrılır. Canlı besiyerlerinde; embriyolu yumurta ve deney hayvanlarından (kobay fare, sıçan vb.) yararlanılmaktadır. Virüs ve riketsiyaları üretmek için kullanılır. Cansız besiyerinde; süt, yumurta, üzüm şırası gibi doğal ürünler kullanılır.
- **Sentetik Besiyerleri:** Mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan besiyerlerinin çoğunluğu sentetiktir. Kuru formda (dehidre) ve hazır karışım hâlinde bulunur.

3.1.1.2. Fiziksel Özelliklerine Göre Besiyerleri

Fiziksel özelliklerine göre besiyerleri; katı, sıvı ve yarı katı besiyeri olarak üç grupta incelenebilir.

- **Katı Besiyerleri:** İçinde kıvam verici, katılaştırıcı madde olan besiyerleridir. Katılaştırıcı madde olarak genellikle agar kullanılmaktadır. Besiyeri adında agar kelimesi varsa bu besiyerinin katı besiyeri olduğu anlaşılır. Örneğin nutrient agar (niyutriind eiyya), EMB agar.
- **Sıvı Besiyerleri:** İçinde katılaştırıcı madde olmayan besiyerleridir. Genellikle deney tüplerinde hazırlanır. Örneğin nutrient broth (niyutriind brahd) , brilliant green bile broth (brilyint griin baiyl brahd).
- **Yarı Katı Besiyerleri:** İçinde az miktarda katılaştırıcı madde olan besiyerleridir. Deney tüplerinde hazırlanır ve bakterilerde hareket muayenesinde kullanılır. Örneğin SİM medium.

3.1.1.3. Kullanım Amaçlarına Göre Besiyerleri

Kullanım amacına göre besiyerleri, **genel besiyerleri** ve **özel besiyerleri** olarak iki ana gruba ayrılır.

Genel Besiyerleri: Birçok mikroorganizma türünün üremesi için gerekli besin maddelerini yeterli miktarlarda içeren ortamlardır. Genel besiyerleri; numunede bulunan mikroorganizmaların tür ayrımı yapılmaksızın çoğaltılması, toplam bakteri sayısının belirlenmesi gibi amaçlarla kullanılır. Bu grupta sık kullanılan besiyerlerine; plate count agar (pleit kâvınt eiyya-PCA), nutrient agar (NA) ve nutrient broth (NB) örnek olarak verilebilir. Genel besiyerleri, içine katkı maddeleri ilave edilerek zenginleştirilebilir.

Özel Besiyeri: Genel besiyeri dışındaki tüm besiyerleri özel besiyeri grubuna dâhildir. Aşağıda özel amaçlı besiyeri çeşitlerinin özellikleri anlatılmıştır.

- **Selektif Besiyerleri:** Üretilmek istenen mikroorganizma dışındaki diğer mikroorganizmaların üremesini engelleyen maddeler (boyalar, antibiyotikler, kimyasal maddeler, safra tuzları) içeren besiyerleridir. Bu besiyerleri karışık bir bakteri grubu içinde bulunan incelenmek istenilen mikroorganizmayı diğerlerinden ayırarak tek başına üretilmesini sağlar. Örneğin chapman besiyeri, stafilokokların üremesini sağlarken diğer mikroorganizmaların üremesini engellemektedir.
- **Diferansiyel (Ayırt Edici) Besiyerleri:** İçerisindeki ayıraçlar sayesinde incelenmek istenen bakteri türünün kendine özgü koloniler oluşturmalarını sağlayan besiyerleridir. Böylece incelenmek istenen bakterinin diğerlerinden izole edilmelerine imkân sağlar. Örneğin kanlı agar besiyeri, hemolitik ve non-hemolitik bakteri türlerinin birbirinden ayırt edilebilmelerini sağlar. EMB agarda üreyen *E. coli* bakterisi metalik parlak yeşil renkli koloniler oluşturarak diğer bakterilerden ayırt edilebilmektedir.
- **Hem Selektif Hem Ayırt Edici Besiyerleri:** Bir numunede veya karışık kültürdeki mikroorganizmaları ayırmak (izole etmek) için kullanılmaktadır. Örneğin MacConkey agar (Mekkankiy eiyya), laktozu fermente eden koliform bakteriler, kırmızı renkli koloniler oluştururken laktozu fermente edemeyen diğer bağırsak bakterileri "*Salmonella*" gibi renksiz koloniler oluşturur.
- **Zenginleştirme Besiyerleri:** Karışık mikroorganizmalar içinde, hedeflenen mikroorganizmayı geliştirmek, daha fazla üretmek için besin öğeleri ve ortam şartlarının karşılandığı özel sıvı besiyerleridir. Örneğin selenite broth ve tetrathionate broth, *Salmonella* izolasyonu için kullanılan zenginleştirme besiyerleridir.
- **Biyokimyasal Test Besiyerleri:** Mikroorganizmaların test edilen maddeyi biyokimyasal değişime uğratarak uğratmadığını belirlemek amacıyla kullanılan besiyerleridir. Örneğin karbonhidrat fermentasyon test besiyerleri, üre broth besiyeri vb.

3.1.2. Laboratuvarda Kullanılan Hazır Besiyerleri

Laboratuvarlar; besiyeri ihtiyaçlarını, kullanıma hazır besiyerleri olarak ya da kendileri hazırlayarak karşılamaktadır. Kullanıma hazır besiyerlerinin maliyetinin yüksek olması sebebiyle yaygın olarak her laboratuvar kendi besiyerini kendisi, dehidre besiyerlerinden hazırlamaktadır fakat laboratuvarlarda az kullanılan besiyerlerinin kullanıma hazır besiyeri olarak temini daha pratiktir. Sık kullanılan besiyeri ve kullanım amaçları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Sık Kullanılan Besiyerleri ve Kullanım Amaçları

BESİYERİ ADI	KULLANIM AMACI
XLD agar	<i>Salmonella</i> bakterilerinin ayırım ve tanımlanmasında
Violet Red Bile (VRB) agar	Koliform grubu bakterilerinin tanımlanması ve sayılmasında
Simmons Sitrat agar	<i>Enterobacteriaceae</i> familyası bakterilerinin ayırımlarında
Potato Dextrose agar	Fungusların üretilmesinde
Plate Count agar	Toplam mezofil aerob bakteri sayımında
Nutrient broth	Bakterilerin gelişimi için genel amaçlı besiyeri olarak
Malt Extract agar	Maya ve küflerin geliştirilmesi, izolasyonu ve sayımında
Mac Conkey agar	Koliform grubu bakteriler ile <i>salmonella</i> ve <i>shigella</i> bakterilerinin ayırım ve tanımlanmasında
Mueller Hinton agar	Antibiyogram duyarlılık testinde
Laktoz broth	EMS yöntemi ile <i>koliform</i> bakterilerin sayımında
Brilliant Green Bile broth	Koliform grubu bakterilerinin tanımlanması, doğrulanması, izole edilmesi ve sayımında
Eosin Metilen Blue (EMB) agar	<i>Enterobacteriaceae</i> familyası gram (-) bakterilerinin ayırımı ve izolasyonunda
Baird-Parker agar	Stafilokok bakterilerin tanımlanmasında ve sayımında

3.1.2.1. Dehidre Besiyerleri



Görsel 3.2: Dehidre besiyerleri

Bileşenleri formülde belirtilen oranlarda bir araya getirilen, kurutulmuş, toz veya granül haldeki ambalajlı karışımlara **dehidre besiyerleri** denir (Görsel 3.2). Bu besiyeri günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Dehidre besiyerleri, kullanılırken etiket bilgilerine ve üretici firmanın uyarılarına dikkat edilmesi gerekir. Etiketinde yazan saklanma koşullarında muhafaza edilmelidir. Dehidre besiyerleri nem çekicidir, ısıya ve ışığa karşı duyarlıdır. Kapağı sıkıca kapatılmış besiyerleri; karanlık, kuru ve serin ortamlarda muhafaza edilmelidir.

Görsel 3.3'te dehidre besiyerinin etiket bilgileri yer almaktadır.

SON KULLANMA TARİHİ → 2025/05/09 500 g HAZIRLAMA TALİMATI ↘

Safety data sheet available on request for professional users. * Store dry and tightly closed. Protect from light. Do not use dumped or discoloured medium. ** Store at +15°C to +25°C.

Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage für berufsmäßige Anwender erhältlich. * Trocken und gut verschlossen lagern. Vor Licht schützen. Verdumpfen oder verfärbten Nährboden nicht verwenden. Lagern bei +15°C bis +25°C.

Fiche de données de sécurité disponible sur demande pour les professionnels. * Conserver en récipient bien fermé et au sec. Protéger de la lumière. Ne pas utiliser de milieux décolorés ou présentant des masses compactes. ** Conserver de +15°C à +25°C.

Microbiology
VRB Agar
Violet red bile agar for microbiology
VRB-Agar
Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Agar für die Mikrobiologie
Agar VRB
Agar violeta cristal-rojo neutro-bilis para microbiología
Agar VRB
Agar au violet cristallisé au rouge neutre et à la bile pour la microbiologie

Preparation: Suspend 39.5 g in 1 litre of demin. water and heat in a boiling water bath or in free flowing steam with frequent stirring until completely dissolved. Afterwards do not boil for more than 2 minutes. Do not autoclave, do not over-heat.

Zubereitung: 39.5 g in 1 Liter demin. Wasser lösen und im siedenden Wasserbad oder im strömenden Dampf unter regelmäßigem Umrühren solange kochen, bis der Nährboden vollständig gelöst ist. Anschließend nicht länger als 2 Minuten weiter kochen. Nicht autoclavieren, nicht überhitzen!

Préparation: Dissolve 39.5 g in 1 litre of water demineralisée, faire bouillir au bain-marie ou sous vapeur fluente en agitant régulièrement jusqu'à ce que le milieu soit entièrement dissous. Puis ne pas faire bouillir plus de 2 min. Ne pas autoclaver, ne pas surchauffer.

Typical composition (g/litre): Peptone from meat 7.0; Yeast extract 3.0; Sodium chloride 5.0; Lactose 10.0; Neutral red 0.03; Blue salt mixture 1.5; Crystal violet 0.002; Agar-agar 13.0.

Typische Zusammensetzung (g/Liter): Pepton aus Fleisch 7.0; Hefeextrakt 3.0; Natriumchlorid 5.0; Lactose 10.0; Neutralrot 0.03; Gallenatzmischung 1.5; Kristallviolett 0.002; Agar-Agar 13.0.

Composición típica (g/litro): Peptona de carne 7.0; extracto de levadura 3.0; cloruro sódico 5.0; lactosa 10.0; rojo neutro 0.03; mezcla de sales biliares 1.5; violeta cristal 0.002; agar-agar 13.0.

Composition type (g/litre): Peptone de viande 7.0; extrait de levure 3.0; chlorure de sodium 5.0; lactose 10.0; rouge neutre 0.03; mélange de sels biliaires 1.5; violet cristallisé 0.002; agar-agar 13.0.

↑

SAKLAMA KOŞULLARI

↑

BESİYERİNİN ADI

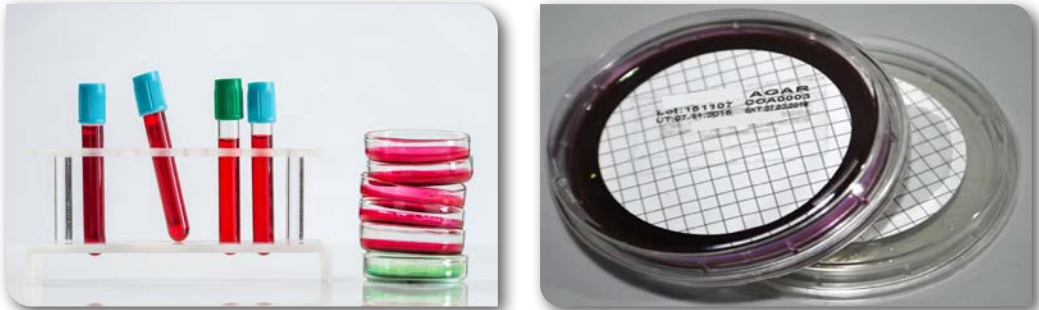
↑

İÇİNDEKİLER (BİLEŞİM)

Görsel 3.3: Besiyeri etiketi ve üzerinde bulunan bilgiler

3.1.2.2. Kullanıma Hazır Besiyerleri

Piyasada; çok çeşitli, kullanıma hazır besiyerleri vardır. Kapaklı tüp ve şişede sıvı veya katı besiyerleri ile petri kutularına dökülmüş agarlı besiyerleri en çok kullanılanlardır (Görsel 3.4). Petri kutularında tek çeşit besiyeri olabildiği gibi, iki veya üçe bölünmüş kutuda farklı besiyerleri de olabilir. Yüzeyden numune almada kullanılan hazır agar slaytları da mevcuttur.



Görsel 3.4: Kullanıma hazır besiyerleri

3.1.3. Besiyerinin Sahip Olması Gereken Özellikler

- Bünyesinde uygun miktarda su bulunmalıdır.
- Besiyerinde kullanılacak suyun saf olması gerekir. Kireçli sular mikroorganizmada toksik (zehir) etki yapar.
- Üretilmek istenen mikroorganizmaların ihtiyacını karşılayacak besin maddelerini içermelidir.
- Üretilmek istenen mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu ortam şartlarını (pH, ozmotik basınç gibi) karşılayacak özelliklere sahip olmalıdır.
- Besiyerlerine katılan kimyasal maddelerin saf olması gerekir.
- Besiyeri bileşiminde bulunan maddeler birbirleri ile geçimsiz olmamalı, birbirlerini olumsuz etkilememelidir.
- Ani pH değişimlerini engellemek amacıyla bileşiminde tampon maddeler (buffer) bulunmalıdır.
- Steril olmalı, sterilizasyon kontrolü yapılmalıdır.
- Dış ortamdan mikroorganizma kontaminasyonunu (bulaşma) önlemek için özel kaplarda hazırlanıp saklanmalıdır.

3.1.4. Besiyeri Hazırlamada Ön İşlemler

Laboratuvarların iş yükü, çalışma kapasitesi, uygulanacak yöntemle göre ön hazırlık yapmak gerekebilir. İş yükü az olan laboratuvarlarda, besiyeri hazırlama işlemi, analizden hemen önce yapılabilir. Ancak iş yükü fazla olan laboratuvarlarda önceden hazırlanmış ve kullanıma hazır hâlde besiyeri bulunması gerekir. Besiyeri hazırlama işlemlerine başlamadan önce gerekli araç gereçlerin hazır olduğundan emin olunmalıdır. Kullanılacak besiyeri çeşitlerinin belirlenmesinde; numunenin özelliği, analizin amacı ve analiz yöntemi ile laboratuvarlarda bulunan dehidre besiyerleri göz önünde bulundurularak seçim yapılmalıdır. Laboratuvarlarda standart bir analiz yöntemi ile çalışma yapılacaksa yöntemde belirtilen besiyeri çeşidi, belirtilen özelliklerde hazırlanmalıdır.

- **Haftalık Planlama Yapma**

Öncelikle, laboratuvarlarda normal koşullarda kullanılan besiyeri çeşitleri, kullanım şekli ve miktarlarının belirlenerek hazırlık planlaması yapılmalıdır. Örneğin laboratuvarlarda bir haftada kullanılacak olan besiyeri çeşitleri ve miktarları belirlenip tek seferde hepsi hazırlanır. Besiyerlerinin tek seferde hazırlanması iş gücü, zaman ve maliyet açısından faydalıdır.

Hazırlanacak besiyeri çeşidi, şekli (petri veya deney tüpü) ve miktarı belirlendikten sonra gerekli hacim hesaplanmalıdır. Bu hesaplamada aksi belirtilmedikçe her bir petri kabı için 15-25 mL, deney tüpleri için ise 5-10 mL kullanılır. Bu miktarlar, petri kabının veya deney tüpünün çapına, kullanım amacına göre değişiklik gösterebilir.

ÖRNEK



A besiyerinden haftada ortalama 10 deney tüpü ve 20 petri kullanılıyorsa:

Hazırlanacak besiyeri hacmi = (Petri sayısı x 20 mL) + (Deney tüpü sayısı x 10 mL)

Hazırlanacak besiyeri hacmi = (20 x 20) + (10 x 10) = 500 mL / hafta

Hazırlanacak besiyeri hacmi belirlendikten sonra besiyeri hacmine göre uygun bir kap (erlen, balon veya şişe) seçilmelidir. Genellikle bu kaplar hazırlanacak besiyeri hacminin 5/3'ünden büyük olmalıdır. Kabin yeterli büyüklükte seçilmesi; çalkalama, ısıtma işlemlerinde kolaylık sağlar.

SIRA SİZDE



30 petri ve 15 deney tüpünde PCA besiyeri hazırlamak için kaç mL besiyeri gerekir? Hesaplayınız.

• Etiket Bilgilerine Göre Hesaplama Yapma

Hazırlanacak besiyeri, hazır karışım hâlinde ise ambalaj üzerindeki etiket bilgilerinden faydalanılır. Etiket üzerinde hesaplama bilgileri hacmi 1 L (1 000 mL) olacak şekilde verilmektedir (Görsel 3.5).

VM555763 330 **1.05463.0500** **2025/07/09** **500 g**

Store dry and tightly closed. Protect from light. Do not use clumped or discoloured medium. ** Store at +15°C to +25°C.

Trocken und gut verschlossen lagern. Vor Licht schützen. Verklumpten oder verfärbten Nährboden nicht verwenden. ** Lagern bei +15°C bis +25°C.

Almacenar en lugar seco y en recipiente bien cerrado. Proteger de la luz. No usar medio de cultivo o grumoso o de color alterado. ** Almacenar entre +15°C y +25°C.

Conserver en récipient bien fermé et au sec. Protéger de la lumière. Ne pas utiliser de milieux décolorés ou présentant des masses compactes. ** Conserver de +15°C à +25°C.

Microbiology
Plate count agar
 Casein-peptone glucose yeast extract agar for microbiology
Plate-Count-Agar
 Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar für die Mikrobiologie
Agar plate count
 agar peptona de caseina-glucosa-extracto de levadura para microbiologia
Agar plate-count
 Agar à la peptone de caseine au glucose et à l'extrait de levure pour la microbiologie

Preparation:: Suspend 22.5 g in 1 litre of demin. water by heating in a boiling water bath or in a current of steam, autoclave (15 min. at 121°C). pH: 7.0 ± 0.2 at 25°C.
Zubereitung:: 22.5 g in 1 Liter demin. Wasser lösen durch Erhitzen im siedenden Wasserbad oder im strömenden Dampf; autoklavieren (15 Min. bei 121°C). pH: 7.0 ± 0.2 bei 25°C.
Preparación:: Dissolver 22.5 g en 1 litro de agua desmineralizada calentando en un baño de agua hirviendo o en corriente de vapor, tratar en autoclave (15 min. a 121°C). pH: 7.0 ± 0.2 a 25°C.
Préparation:: Dissoudre 22.5 g dans 1 litre d'eau déminéralisée par chauffage dans un bain-marie bouillant ou sous vapeur fluente, autoclaver (15 min à 121 °C). pH: 7.0 ± 0.2 à 25°C.

Typical composition (g/litre) : Peptone from casein 5.0; Yeast extract 2.5; D(+)-Glucose 1.0; Agar-agar 14.0.
Typische Zusammensetzung (g/Liter) Pepton aus Casein 5.0; Hefeextrakt 2.5; D(+)-Glucose 1.0; Agar-Agar 14.0.
Composición típica (g/litro) Peptona de caseína 5.0; extracto de levadura 2.5; D(+)-glucosa 1.0; agar-agar 14.0.
Composition type (g/litre) : Peptone de caséine 5.0; extrait de levure 2.5; D(+)-glucose 1.0; agar-agar 14.0.

Görsel 3.5: Besiyeri etiketi ve hesaplama bilgileri

ÖRNEK

500 mL Plate Count agar (PCA) hazırlamak için kaç g dehidre besiyeri maddesinden kullanmak gerekir?

PCA'nın etiket bilgilerine göre 1 litre (1 000 mL) besiyeri hazırlamak için 22,5 gram dehidre PCA tartmak gerekir. Basit bir orantı ile tartılacak miktar hesaplanır.

1000 mL (1L) besiyeri hazırlamak için 22,5 g PCA tartılırsa
 500 mL besiyeri hazırlamak için X g PCA tartılır.

$$X = \frac{500 \cdot 22,5}{1000} = 11,25 \text{ g PCA tartılarak, 500 mL besiyeri saf su ile hazırlanır.}$$

SIRA SİZDE

700 mL VRB agar (39,5 g/L) hazırlamak için kaç g dehidre besiyeri maddesinden kullanmak gerekir? Hesaplayınız.

SIRA SİZDE

EMB agar (36 g/L) besiyerinden 10 petri, 20 deney tüpü hazırlamak için kaç g dehidre besiyeri maddesinden kullanmak gerekir? Hesaplayınız.

16. UYGULAMA

BESİYERİ HAZIRLAMA ÖNCESİ İŞLEMLER

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak besiyeri hazırlama öncesi işlemler çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

**Kullanılacak
Araç Gereç**

Ticari besiyeri karışımı, hesap makinesi, balon, erlen, şişe, cam yazar kalem, deney tüpü, alüminyum folyo, pamuk, spatül, mezür, pipet, tüp standı.

İşlem Basamakları

- Hazırlanacak besiyeri çeşitlerini belirleyiniz.
 - Numunenin özelliği, analizin amacı ve yöntemi ile laboratuvarınızda bulunan dehidre besiyerlerini göz önünde bulundurarak seçim yapılmalıdır.
- Hazırlanacak besiyeri hazırlama şeklini ve miktarını belirleyiniz.
 - Çalışma kapasitesi, iş yükü, çalışma konusu, yöntem, numune ve analiz sayısı gibi etkenlere göre karar verilmelidir. Gereğinden fazla besiyeri hazırlanarak israf edilmemelidir.
 - Tüpte ve/veya petri kutusunda hazırlamanız gereken besiyeri adedi belirlenmelidir.
- Hazırlanacak besiyeri hacmini hesaplayınız.
 - Besiyeri, petrilere için ortalama 20 mL, deney tüpleri için 10 mL olacak şekilde hesaplanmalıdır.
 - Petri kutusu veya deney tüpü çapı, analize uygun besiyeri kalınlığı göz önünde bulundurularak seçilmelidir.
- Besiyeri ambalajı üzerindeki etiket bilgilerinden yararlanarak hazırlanacak hacme göre besiyeri karışım miktarını hesaplayınız.
 - Hazır besiyerlerinin etiketinde 1 litre besiyeri hazırlamak için alınması gereken miktarın belirtildiği unutulmamalıdır.
 - Hazırlanacak besiyeri hacmine göre doğru orantı kurarak miktarlar hesaplanmalıdır.
- Gerekli araç gereçleri hazırlayınız.
 - Hazırlanacak besiyeri hacmi, hazırlama şekli ve sterilizasyon yöntemi gibi konular göz önünde bulundurulmalıdır.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Besiyeri seçimini yaptı.				
2	Hazırlanacak besiyeri hacmini hesapladı.				
3	Uygun çapta petri kutusu ve deney tüpü seçti.				
4	Etiket bilgilerine göre besiyeri miktarını hesapladı.				
5	Kullanılacak araç gereçleri hazırladı.				
TOPLAM PUAN					

3.2. BESİYERİ HAZIRLAMA İŞLEMLERİ

Laboratuvarlarda kullanılan pek çok besiyeri, dehidre karışımlardan hazırlanır. Besiyeri hazırlamaya başlamadan önce ambalaj üzerindeki etiket bilgileri dikkatlice okunmalıdır.

Genel olarak besiyeri hazırlamada işlem basamakları; besiyeri hazırlama ön işlemleri (besiyeri seçimi, hacim ve tartılacak miktarların hesaplanması), araç gereç hazırlığı, tartım, çözündürme, pH ayarlama, sterilizasyon ve sterilizasyon sonrası işlemler şeklindedir.

Besiyeri hazırlamada kullanılacak cam malzemenin çok iyi bir şekilde yıkanmış, durulanmış, saf sudan geçirilmiş ve kurutulmuş olması gerekmektedir. Kırık ve çatlak malzemeler kullanılmamalıdır. Cam malzemenin yeterli büyüklükte olması gerekir.

3.2.1. Tartım

Tartım için kullanılan terazinin duyarlılığı, besiyerinin hazırlanış şekli ile doğrudan ilgilidir. Genellikle 0,1 gram duyarlılıktaki terazi kullanımı yeterlidir. Tartım için özel tartım kayıkçıları veya küçük beherler kullanılabilir. Doğrudan balon ya da erlene tartımdan olabildiğince kaçınılmalıdır. Tartım sırasında temiz spatül kullanılmalı, tartım olabildiğince dikkatli yapılmalı ve besiyeri kutusunun kapağı sıkıca kapatılmalıdır.

3.2.2. Çözündürme

Besiyeri hazırlamada saf su kullanılmalıdır. Besiyerine ilave edecek saf su mezürle ölçülerek alınmalıdır. Suyun hacmine uygun büyüklükte mezür seçilmelidir. Besiyeri hazırlanacak kabın, besiyeri hacminin en az 5/3'ü büyüklüğünde olmalıdır. Genellikle erlen, balon veya şişeler kullanılır. Uygun kaba, tartılan dehidre besiyeri konur. Mezüre koyulan suyun yarısı kaba aktarılarak çalkalanır. Daha sonra suyun geri kalanı, tartım kabında kalan besiyeri kalıntılarını yıkayarak besiyeri kabına aktarılır.

Bazı besiyerleri, sadece çalkalama ile çözündürülebilirken bazılarını çözündürülebilmek için besiyerinin ısıtılması gerekir. Agarlı besiyerleri, hazırlandığı kapta sterilize edilecek olsa bile öncesinde agarın erimesini sağlayacak şekilde ısıtılmalı, sonra otoklavda sterilize edilmelidir. Isıtma işlemi için genellikle manyetik karıştırıcılı ısıtıcı tabla veya su banyosu kullanılır. Gerekirse besiyeri ısıtılmadan önce su düzeyi işaretlenir. Isıtma sonrasında azalma varsa işaretli yere kadar saf su eklenebilir. Besiyerleri tam olarak çözündürülmeden otoklavlanırsa erimemiş agar parçaları camın iç çeperine yapışır ve otoklavlanma sırasında yanma meydana gelebilir. Isıtıldığı halde besiyeri içerisinde hala çözünmeyen parçacıklar varsa bu parçacıkların alınması için süzülmesi gerekir.

3.2.3. pH Ayarlama

Dehidre besiyerleri, tekniğine uygun olarak hazırlandığında pH değeri, etiketinde yazan değerden sapma göstermemektedir. Besiyeri etiketinde belirtilen pH değeri analiz için uygunsa pH ayarlama işlemine ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu besiyerlerinde aksi belirtilmedikçe pH değişikliği ve ayarlama işlemi yapılmamaktadır.

pH ayarlama işlemi yapılacaksa besiyeri tamamen çözündürüldükten sonra, sterilizasyon işleminden önce yapılır. pH ayarlamasında genellikle baz olarak sodyum hidroksit (NaOH) veya

asit olarak hidroklorik asit (HCl) çözeltisi kullanılır. Kalibrasyonu yapılmış pH metre ile besiyerinin pH'ı ölçülür. Besiyeri pH'ı istenilen değerden düşükse damla damla 1N veya 0,1N NaOH eklenerek istenilen seviyeye yükseltilir. pH'ı yüksek ise bu değeri düşürmek için damla damla 1N veya 0,1N HCl ilave edilerek ayarlama işlemi yapılır. Besiyeri pH'ında sterilizasyon sonrası 0,1-0,2 arasında düşmeler meydana gelebilir. Buna engel olmak için besiyerine fosfat tuzları eklenebilir veya besiyeri pH'ı önceden olması gereken değerden daha yüksek olacak şekilde ayarlanabilir.



Görsel 3.6: pH metre ile ölçüm

Zorunlu durumlarda pH ayarlaması sterilizasyon sonrası yapılabilir. Kontaminasyon riskinden dolayı tercih edilen bir yöntem değildir. Sterilize edilmiş besiyerinden aseptik kurallara uygun olarak belli hacimde (örneğin 10 mL) alınır. Kalibrasyonu yapılmış pH metre ile ölçümü yapılır. Alınan besiyeri için harcanan çözelti miktarı belirlenir. Tüm besiyerinde kullanılacak çözelti miktarı hesaplanır. Hesaplanan çözelti aseptik kurallara uygun olarak besiyerine eklenir (Görsel 3.6).

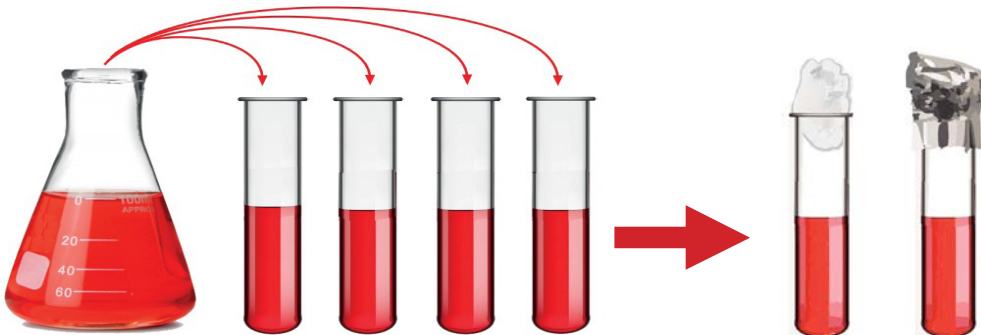
3.2.4. Sterilizasyon

Besiyeri, deney tüplerinde hazırlanacaksa pH ayarlaması yapıldıktan sonra deney tüplerine dağıtılır ve tüplerin ağızları pamuklanır. Tüplerin ağzı, pamukla kapatıldıktan sonra alüminyum folyo ile kaplanmaları gerekir. Tüplerin ağzındaki pamuk tıplar çok sıkı veya çok gevşek olmamalıdır. Pamuk, besiyeri ile temas etmemeli, aralarında yeterince boşluk bulunmalıdır (Görsel 3.7).

Besiyerlerinin sterilizasyonunda genellikle otoklavda basınçlı buhar altında sterilizasyon yöntemi uygulanır. Besiyeri hacmine göre sterilizasyon süresi değişmektedir. Genellikle otoklavda 121 °C'de, 15-20 dakika tutularak sterilize edilebilir. Besiyeri, sıcaklığa duyarlı maddeler içeriyorsa 115 °C'de 15 dakika sterilize edilebilir.

Besiyeri petri kutularında hazırlanacaksa erlen, balon veya şişe içinde sterilize edilir. İçinde besiyeri olan erlen veya balonun ağzı pamuk tıkaçlarla kapatılır. Üzerleri alüminyum folyo ile kaplanır. Böylece ortamdan gelebilecek bulaşmaların önüne geçilir. Pamuk yerine kapak kullanılacak ise otoklavdan önce kapak biraz gevşek bırakılmalı otoklavdan çıkınca sıkıca kapatılmalıdır.

Sterilizasyon yöntem ve uygulamaları ile ilgili detaylı bilgi için "Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon" öğrenme birimine bakınız.



Görsel 3.7: Sterilizasyon öncesi tüplere dağıtma

17. UYGULAMA

BESİYERİ HAZIRLAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak besiyeri hazırlama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulamasonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

**Kullanılacak
Araç Gereç**

Otoklav, manyetik karıştırıcılı ısıtıcı tabla, pH metre, dehidre besiyeri, hassas terazi, balon joje, erlen, pamuk, saat camı, huni, alüminyum folyo, saf su, spatül, mezür, deney tüpü, pipet, tüp standı, cam yazar kalem.

İşlem Basamakları

1. Besiyeri hazırlama öncesi işlemlerini yapınız.
2. Belirlenen dehidre besiyeri miktarını tartınız (Görsel 3.8).
 - Hassas terazide tartımı doğru ve dikkatli yapılmalıdır.
 - Temiz spatül kullanılmalıdır.
 - Tartım sırasında toz bulutu oluşmaması için dikkatli olunur.
3. Tarttığınız karışımı balon veya erlene aktarınız (Görsel 3.9).
 - Hazırlayacağınız hacmin en az 5/3'ü büyüklüğünde, uygun bir kap seçilir.
4. Hazırlayacağınız besiyeri hacmi kadar saf suyu ölçerek alınız.
5. Karışımı koyduğunuz kaba saf suyun yarısını ekleyip çalkalayınız.
6. Kalan su ile tartım kabındaki besiyeri bulaşlarını yıkayarak kaba aktarınız.
7. Çalkalayarak çözündürünüz.
 - Karıştırma işlemi homojen oluncaya kadar dairesel olarak yapılmalıdır.
 - Tam çözünme meydana gelmeyen besiyerleri uygun sıcaklıkta ısıtılarak çalkalanır (Görsel 3.10).
 - Isıtmak için manyetik karıştırıcılı ısıtıcı tabla veya su banyosu kullanılır.
8. Sıvı seviyesini cam yazar kalemle cam kap üzerinden işaretleyiniz.
9. Buharlaştırma yoluyla su kaybı varsa işaretli yere kadar saf su ekleyiniz.
10. Besiyerinde çözünmeyen partiküller varsa alınız.
11. Besiyerinin pH'ını ölçünüz ve gerekiyorsa pH ayarlama işlemlerini yapınız.
 - Hazırlanacak besiyerinin pH değeri besiyeri etiket bilgilerinden okunmalıdır. Okuduğunuz değer çalışmanız için uygunsa pH ayarlamaya gerek yoktur.
 - pH metre tekniğine uygun kullanılmalıdır.
 - Besiyeri istenen pH'da değilse seyreltik asit veya baz çözeltileri ile ayarlanmalıdır.



Görsel 3.8: Dehidre besiyerinde tartım işlemi



Görsel 3.9: Tartılan karışımın kaba aktarılması



Görsel 3.10: Besiyerinde çözündürme işlemi

12. Tüpte hazırlanacak besiyeri için, tüplere uygun miktarda besiyeri aktarınız.
13. Tüplerin, balon veya erlenlerin ağızlarını pamuklayıp folyolayınız (Görsel 3.11).
- Pamukların çok gevşek ya da çok sıkı olmamasına dikkat edilmelidir.
 - Petri kaplarında sterilizasyon işlemi yapılamadığı için bu besiyerleri balon veya erlende sterilize edilir.
14. Kapların üzerine gerekli bilgileri yazınız.
- Suyla silinmeyecek cam yazar kalem kullanılmalıdır.
15. Besiyerlerini sterilize ediniz (Görsel 3.12).
- Sterilizasyon için uygun yöntem seçilmelidir.
 - Kurallarına ve tekniğine uygun olarak sterilizasyon işlemi yapılmalıdır.
 - Sterilizasyon süresi; besiyerinin hacmine, besiyerinin agarlı olup olmamasına, kullanılan cam kapların et kalınlığına göre belirlenmelidir.
 - Katkı ilave edilecek besiyerleri içerisine sterilizasyon öncesi manyet (balık) konularak sterilize edilmelidir.



Görsel 3.12: Sterilizasyon işlemi

Görsel 3.11: Sterilizasyona hazırlık

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Tartım işlemini yaptı.				
2	Tekniğine uygun aktarma işlemlerini yaptı.				
3	Çözündürme işlemini yaptı.				
4	pH ölçümü yaptı.				
5	Tekniğine uygun sterilizasyon öncesi işlemleri ve sterilizasyonu yaptı.				
TOPLAM PUAN					

3.3. BESİYERLERİNDE STERİLİZASYON SONRASI İŞLEMLER

Sterilizasyon işleminden sonra petri kaplarına dağıtma, gerek duyulursa katkı maddelerinin ilavesi, yüzey kurutma ve hazırlanmış besiyerlerinin uygun şartlarda muhafaza edilmesi gibi işlemler yapılır.

3.3.1. Sterilizasyon Kontrolü

Besiyerlerinin sterilizasyonu genellikle otoklavda yapılır. Otoklavda steril edilemeyen besiyerleri için farklı yöntemler kullanılır. Analizlerde kullanılacak besiyerleri mutlaka sterilize olmalıdır. Sterillikten şüphe duyulan besiyerleri kullanılmamalıdır. Bundan dolayı besiyerlerinde sterilizasyon kontrolü yapılır. Otoklavın sterilizasyon kontrolü, biyolojik (bakteriyolojik) ve kimyasal indikatörlerle veya şahit besiyeri kullanılarak yapılır.

Biyolojik (Bakteriyolojik) İndikatörler: İçinde bakteri sporları ve pH indikatörü bulunan test materyalleridir. Biyoindikatör ismiyle bilinir. Bunlar sterilizasyon öncesinde otoklavın farklı yerlerine konulur. Sterilizasyon işlemi yapıldıktan sonra indikatörlerde renk değişikliği olmamışsa sterilizasyon başarılı demektir. Şayet rengi menekşeden sarı-turuncuya dönerse sterilizasyon başarısız demektir (Görsel 3.13).

Kimyasal İndikatörler: Belli sıcaklıklarda renk değiştiren, içinde kimyasal maddeler içeren tüp, bant vb. şekillerde hazırlanmış test materyalleridir. Otoklavda istenilen sıcaklığa ulaşıp ulaşılmadığını gösterir. Yaygın olarak otoklav bantları kullanılmaktadır. Bu bantlar sterilize edilecek malzemelerin üzerine yapıştırılır. Sterilizasyon sonunda bant renk değiştirir. Renk değişikliği görülmezse yeterli sterilizasyon yapılmadığını gösterir.

Şahit Besiyeri ile Sterilizasyon Kontrolü: Bu amaçla ekim yapılmamış besiyeri, inkübasyona bırakılır. Ekim yapılmamış besiyerine **şahit besiyeri** denir. Besiyerinde yeterli sterilizasyon yapıldıysa şahit besiyerinde mikroorganizma üremesi görülmez. Üreme görülürse sterilizasyonun iyi yapılmadığı anlaşılır ve bu besiyerleri kullanılmaz.



Görsel 3.13: Biyolojik sterilizasyon indikatörleri

3.3.2. Katkı Maddelerinin Eklenmesi

Katkı maddeleri; steril olarak piyasada sıvı, toz ve tablet formunda bulunmaktadır. Bunlar kullanılmadan önce etiket bilgileri okunmalı ve üreticinin önerilerine uyulmalıdır. Sıcakta zarar görmeyen katkı maddeleri sterilizasyon öncesi besiyerine eklenir. Antibiyotik, yumurta sarısı, vitamin gibi katkı maddeleri yüksek ısılarda özelliğini yitirir. Bu maddeler, sterilizasyon sonrası besiyeri 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra aseptik tekniğe uygun olarak eklenir. Ekleme esnasında, katkı maddeleri 30-35 °C'de olmalıdır. Karışması için çalkalanır. Sonra dağıtma işlemleri yapılır.

3.3.3. Agarlı Besiyerinin Petri Kutularına Dökülmesi

Agar, sıvı ortamı jelleştirmek için kullanılan besiyeri katkısıdır. Agarlı besiyerleri; sterilizasyondan sonra, aseptik koşullarda, petri kutularına sıvı haldeyken dökülür (Görsel 3.14). Besiyeri dökülmeden önce homojen olması için çalkalanmalıdır. Besiyerleri deney tüplerinde sterilize edilebildiği halde

petri kutularında sterilize edilemezler. Petri kutularında agarlı besiyeri hazırlanacaksa erlende veya cam şişede sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra besiyerinin sıcaklığı 45-50 °C'ye soğutulur. Sterilize edilmiş boş petri kutularına aseptik şartlarda dökülür. Otoklavdan çıkan agarlı besiyeri 50 °C'deki su banyosunda en fazla 3 saat tutulabilir. Aksi halde agarlı besiyerinde jelleşme sorunlarına neden olur.



Görsel 3.14: Besiyerinin petri kutularında hazırlanması

3.3.4. Tüpte Agarlı Besiyerlerinin Hazırlanması

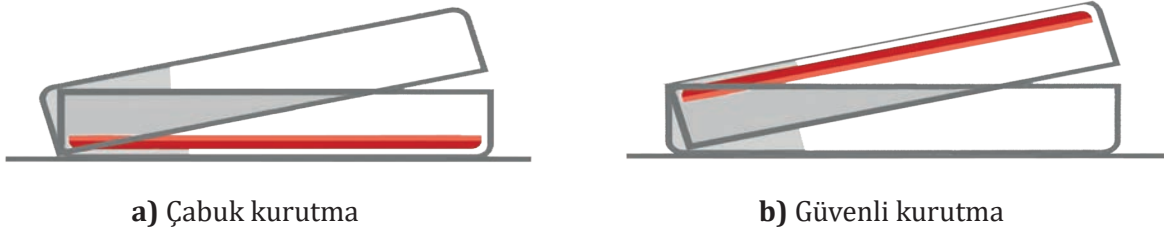
Tam olarak eritilmiş agarlı besiyeri, standart deney tüplerine 5-10 mL olacak şekilde dağıtılır ve otoklavlanır. Tüpte dik agar besiyeri hazırlanacaksa sterilizasyon sonrasında tüpler dik olarak tüp standında katılaşmaya bırakılır. Tüpte yatık agar hazırlanacaksa besiyeri henüz sıvı haldeyken tüpler bir çubuk üzerine yatırılır. Tüplerin ağız kısmı yerden 1 cm yüksekte olmalıdır. Besiyerinin dip kısımlarının 2,5 cm derinliğinde olmasına dikkat edilir. Sonra bu şekilde katılaşmaya bırakılır. Tüpte yatık agar yapmaktaki amaç: Geniş bir yüzey alanı elde etmektir. Görsel 3.15'te dik agar ve yatık agar gösterilmiştir.



Görsel 3.15: Dik agar ve yatık agar

3.3.5. Besiyerlerinde Yüzey Kurutma İşlemi

Petri kutularına dökülmüş agarlı besiyerleri yüzeyinin çok ıslak veya çok kuru olması istenmez. Islak olması demek yüzeyinde su damlacıkları bulunması demektir. Islak yüzeyde hareketli bakteriler yayılcı koloni oluşturur. Hareketsizler ise büyük koloni meydana getirerek yanlış değerlendirmelere sebep olur. Aşırı kuru yüzeyde ise mikroorganizmalar olduklarından daha küçük boyutta koloni oluşturur. Bu da hatalı değerlendirmeye neden olur. Mikroorganizmalar için en uygunu, hafif nemli olan yüzeydir. Ancak yüzeye yayma yöntemi uygulanacaksa besiyerinde yüzey kurutma işlemi yapılmalıdır. Besiyeri döküldükten sonra besiyerinde yüzey kurutma işlemi yapılacaksa Görsel 3.16'da görüldüğü gibi iki farklı şekilde yapılır. Çabuk kurutma yönteminde kuruma hızlı olur; ancak bulaşma riski fazladır. Güvenli kurutmada geç kuruma olur ancak bulaşma riski düşüktür. Kurutma, temiz ve hava akımı olmayan yerlerde yapılmalıdır. Etüv, UV lamba ile sterilize edilen kabinler bu amaçla kullanılabilir.



Görsel 3.16: Kurutma işlemi

3.3.6. Hazırlanmış Besiyerlerin Muhafazası

Besiyerlerinin hazırlanması emek ve zaman aldığı için belli periyotlarda hazırlanabilir. Ancak hazırlanan besiyeri uygun şartlarda ve ağızları kapalı muhafaza edilmelidir. Böylece bileşiminin bozulması, kurumması ve kontaminasyon riski önlenmiş olur.

Hazırlanmış besiyerlerinin saklanma süresi; bileşimine, ambalajına ve depolama koşullarına göre değişiklik gösterir. Uygun şartlarda hazırlanmış besiyerleri içinde katkı maddesi olmamak şartıyla buzdolabında en fazla 3 ay, oda sıcaklığında 1 ay saklanabilir (Görsel 3.17).

Bazı besiyerleri saklanmaz, hazırlandığı gün kullanılması gerekir. Petri kutularına dökülmüş saklanabilen özellikteki besiyerleri, plastik torbalar içinde soğukta saklanmalıdır. Rose Bengal Agar gibi ışıktan etkilenen bazı besiyerleri renkli şişelerde muhafaza edilmelidir. Selektif ve diferansiyel besiyerleri bir hafta içinde kullanılmalıdır.



Görsel 3.17: Buzdolabında besiyerlerinin muhafazası

18. UYGULAMA

BESİYERİNİN STERİLİZASYON SONRASI PETRİ KAPLARINA DÖKÜLMESİ

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak besiyerinin sterilizasyon sonrası petri kaplarına dökülmesi çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Sterilize edilmiş besiyeri, katkı maddeleri, steril petri kutusu, steril kabin, bek, buzdolabı.

İşlem Basamakları

1. Döküm yapılacak petri kutularını hazırlayınız.
 - Steril petri kutuları; masa üzerine, kapakları üste gelecek şekilde dizilmelidir.
2. Sterilizasyon sonrası besiyerini 45-50 °C'ye soğutunuz.
3. Aseptik ortam oluşturunuz.
4. Besiyeri çeşidine göre gerekliyse katkı maddesi ilave ediniz.
5. Besiyerini aseptik ortamda steril petri kutularına dökünüz (Görsel 3.18).
 - Besiyerini dökmeden önce kabın ağzı alevden geçirilmelidir.
 - Petri kutularına göz kararı ile eşit miktarlarda dökülmelidir.
 - Dökerken çevreye bulaşma olmaması için kapak gereğinden fazla açılmamalıdır.
6. Agarlı besiyeri yüzeyinde hava kabarcığı oluşmuşsa alev tutarak gideriniz.
 - Bu işlem besiyeri katılaşmadan yapılmalıdır.
7. Besiyeri katılaşınca kadar bekleyiniz.
 - Aseptik tekniğe uygun yüzey kurutma işlemi yapılmalıdır.
8. Petri kutularının üzerine gerekli bilgileri yazınız.
 - Besiyeri adı, hazırlanma tarihi ve hazırlayan kişi bilgileri yazılmalıdır.
9. Hazırladığınız besiyerlerini buzdolabında muhafaza ediniz.
10. Hazır ticari besiyerlerini talimatları doğrultusunda muhafaza ediniz.



Görsel 3.18: Besiyerinin petri kutularına dökülmesi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Petri kutularını hazırladı.				
2	Besiyerini istenen sıcaklığa getirdi.				
3	Aseptik tekniğini uyguladı.				
4	Tekniğine uygun petri kutularına döküm yaptı.				
5	Tekniğine uygun kurutma işlemini yaptı.				
TOPLAM PUAN					


A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. Mikroorganizmaların ihtiyacı olan besin maddelerini içeren ortamlara denir.
2. Üretilmek istenen mikroorganizmayı diğerlerinden ayırarak tek başına üretilmesini sağlayan besiyerlerine denir.
3. Bileşenleri formülde belirtilen oranlarda bir araya getirilen, kurutulmuş, toz veya granül hâldeki ambalajlı karışımlara denir.
4. Agarlı besiyerlerinde agarın erimesi için işlemi yapmak gerekir.
5. Besiyerlerinin sterilizasyonunda, sterilizasyon yöntemi olarak genellikle.....kullanılır.
6. Besiyeri pH'ı yüksek ise içine ayarlamak için çözeltisi eklenir.
7. Otoklavın sterilizasyon kontrolü, bakteriyolojik ve indikatörlerle yapılır.
8. Petri kutularına dökülmüş saklanabilen özellikteki besiyerleri, plastik torbalar içinde ortamda muhafaza edilmelidir.
9. Dış ortamdan mikroorganizma bulaşmasına denir.
10. Besiyerinin bileşiminde ani pH değişikliklerini engellemek amaçlı bulunmalıdır.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevabını işaretleyiniz

11. Besiyerlerinin sterilizasyonu aşağıdakilerden hangisinde yapılmaz?
 A) Cam balon B) Deney tüpü C) Erlen D) Petri kutusu E) Şişe
12. Aşağıdakilerden hangisi besiyerini katılaştırmak amacıyla kullanılır?
 A) Agar B) HCl C) Maya Ekstraktı D) NaOH E) Pepton
13. Aşağıdakilerden hangisi sıvı besiyeridir?
 A) EMB Agar B) Plate Count Agar C) Kanlı agar D) Nutrient broth E) VRBA
14. Aşağıdakilerden hangisi petri kutularına dökülecek agarlı besiyeri miktarı için uygundur?
 A) 5 mL B) 25 mL C) 30 mL D) 10 mL E) 50 mL



15. Aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?

- A) Besiyeri hazırlanmasında saf su kullanılmalıdır.
- B) Yeterince sterilize olmayan besiyerleri asla kullanılmamalıdır.
- C) Tüplerin ağzındaki pamuk tıplar çok sıkı veya gevşek olmamalıdır.
- D) Besiyeri içinde çökelti maddeleri bulunmalıdır.
- E) Besiyerinin asit baz dengesi uygun olmalıdır.

16. Tüpte yatık agar hazırlanmasındaki amacı nedir?

- A) Geniş üreme yüzeyi elde etmek
- B) Selektif besiyeri elde etmek
- C) Sterilizasyon işleminde avantaj sağlamak
- D) Besiyerinin çabuk katılaşmasını sağlamak
- E) Kontaminasyonu önlemek

17. Aşağıdakilerden hangisi yanlıştır?

- A) Dehidre besiyerlerinin nem alması istenmez.
- B) Hazırlanmış besiyerleri oda sıcaklığında 1 aya kadar saklanabilir.
- C) Geçimsiz maddeler besiyeri bileşimini olumsuz etkiler.
- D) Agar mikroorganizmalar için besin maddesidir.
- E) Kullanıma hazır besiyerleri pratiktir ancak maliyetlidir.

18.

- I. Besiyeri bileşimine giren maddeler suda çözünürler.
- II. Suyun bileşiminde bulunan maddeler mikroorganizmaların üremesini olumsuz etkiler.
- III. Suyun dezenfeksiyonu için kullanılan klor kontaminasyonu önler.
- IV. Kireçli sular mikroorganizmalara toksik etki yapar.

Besiyerleri hazırlanırken saf su kullanılmasının nedeni yukarıdakilerden hangisi olamaz?

- A) Yalnız I
- B) Yalnız III
- C) I, II ve IV
- D) II, III ve IV
- E) I, II, III ve IV

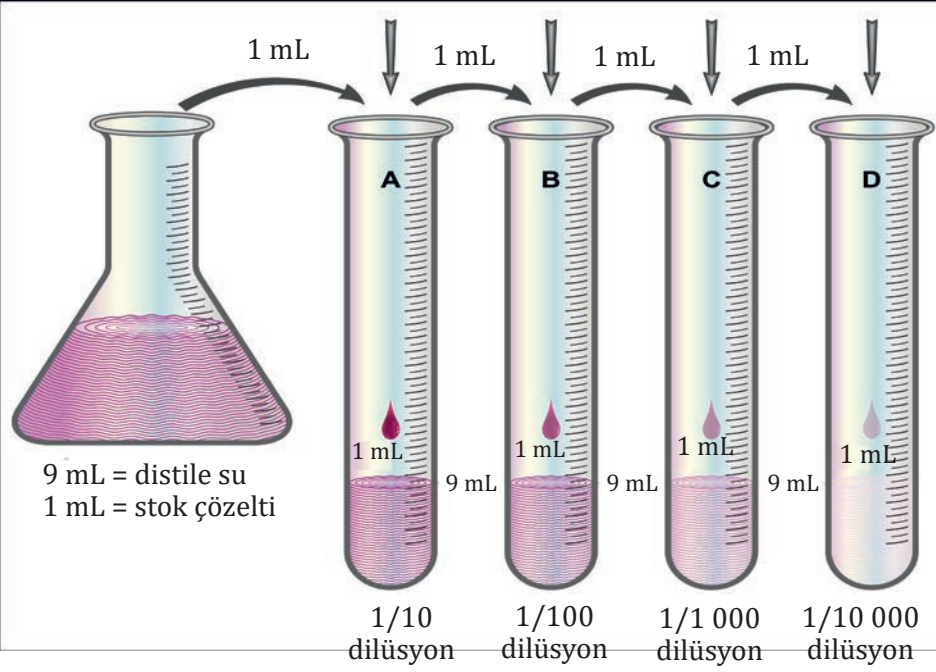
19. Aşağıdaki besiyerlerinden hangisi mikroorganizmaları diğer mikroorganizmalardan ayırt etmek için kullanılır?

- A) Zenginleştirilmiş besiyeri
- B) Diferansiyel besiyeri
- C) Biyokimyasal test besiyeri
- D) İndirgenmiş besiyeri
- E) Genel besiyeri

20. Besiyerlerinin sterilizasyon kontrolünde kullanılan biyolojik indikatör olan ampullerin otoklavlama işleminden sonra renginin menekşeden sarıya dönüşmesi neyi ifade eder?

- A) Biyoindikatör ampul içeriği bozulmuştur.
- B) Otoklavlamada tüm bakteri sporları ölmüştür.
- C) Sterilizasyon işlemi başarısızdır, sporların bir kısmı canlı kalmıştır.
- D) İstenen sıcaklığa ulaşmıştır.
- E) Otoklav cihazı bozulmuştur.

4. ÖĞRENME BİRİMİ



DİLÜSYON HAZIRLAMA

TEMEL KAVRAMLAR

Dilüsyon
Dilüsyon oranı
Dilüsyon faktörü
Dilüent
Analiz numunesi
Dilüsyon serisi

KONULAR

- 4.1. Dilüsyon Sıvısı (Seyreltme Çözeltisi) Hazırlama
- 4.2. Analiz Numunesi Hazırlama
- 4.3. Dilüsyon Serileri Hazırlama

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Numunenin özelliğine ve tekniğine uygun dilüsyon sıvısı hazırlamayı,
- Mikrobiyolojik analizler için, özelliğine uygun teknikleri kullanarak numuneyi analize hazırlamayı,
- Analiz numunesinden çalışma amacına uygun dilüsyon serileri hazırlamayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

- Fizyolojik tuzlu suyun (serum fizyolojik) kullanım alanları nelerdir? Hangi özelliklerinden dolayı kullanımının tercih edildiğini araştırınız.
- Balın uygun şartlarda muhafaza edildiği takdirde mikrobiyal bozulmaya uğramamasının nedenleri nelerdir?
- 1 g yoğurt içinde kaç bakteri vardır? Tahmin ediniz.
- Piyasada ticari olarak satılan kuru ekmek mayasının her gramında yaklaşık 10 milyar maya hücresi vardır. Bu kadar çok maya hücresini nasıl sayabiliriz?



4.1. DİLÜSYON SIVISI (SEYRELTME ÇÖZELTİSİ) HAZIRLAMA

Dilüsyon, seyreltme işlemidir. Çözünen madde oranı yüksek olan bir çözeltiye uygun bir sıvı eklenerek daha seyreltik bir çözelti hazırlanması işlemine **dilüsyon hazırlama**, hazırlanan çözeltiye ise **dilüsyon** denir. Mikrobiyoloji çalışmalarında seyreltme işlemi, birim miktardaki mikroorganizma yükünü seyreltip numune içindeki mikroorganizmaların sayılabilir ve incelenebilir düzeye indirilmesi amacıyla yapılır. İncelenecek örneğin 1 mL'sinde binlerce hatta milyonlarca mikroorganizma bulunabilir. Bu gibi içerdiği mikroorganizma sayısı yüksek olan numunelerde, hazırlanan dilüsyonlar üzerinden analiz yapılmaktadır. Bu kapsamda, incelenen numunenin mikroorganizma sayısında artış ya da azalışa neden olmayacak şekilde hazırlanan özel dilüsyon sıvıları (dilüent) kullanılır.

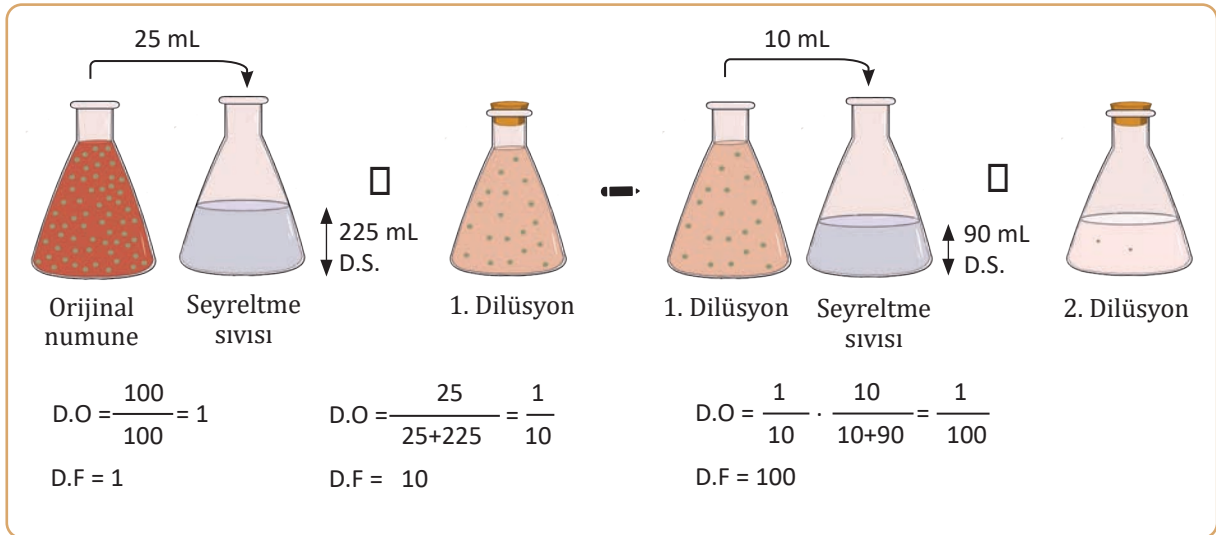
4.1.1. Dilüsyon Oranı ve Dilüsyon Faktörü

Dilüsyondaki mikroorganizma sayısının, analizi yapılan numuneye göre hangi oranda seyreltildiğini gösteren değere **dilüsyon oranı** denir ve şu şekilde hesaplanır:

$$DO = \frac{\text{Numune miktarı}}{\text{Numune miktarı} + \text{Dilüsyon sıvısı miktarı}}$$

Dilüsyonla yapılan analiz sonucunu orijinal numuneye uyarlamak için kullanılan çarpana **dilüsyon faktörü** denir. Numunedeki mikroorganizma sayısının kaç kat azaltılarak dilüsyon hazırlandığını gösterir. Dilüsyon faktörü, çarpma işlemine göre dilüsyon oranının tersidir.

$$DF = \frac{1}{\text{Dilüsyon oranı}}$$



Görsel 4.1: Dilüsyon hazırlama örneği

Görsel 4.1'de, incelenecek numuneden iki farklı dilüsyon hazırlanmıştır. Orijinal numuneden 25 mL alınıp içinde 225 mL dilüsyon sıvısı bulunan erlene aktarıldıktan sonra, homojenize edilerek 1. dilüsyon elde edilmiştir. Bu dilüsyonda numune, 10 kat seyreltilmiştir. Hazırlanan bu dilüsyondan 10 mL alınıp içinde 90 mL dilüsyon sıvısı bulunan başka bir erlene aktarılarak 2. dilüsyon oluşturulmuştur. 2. dilüsyon ise orijinal numunenin 100 kat seyreltilmiş hâlidir.

ÖRNEK



Çiğ süt numunesinden iki farklı dilüsyon hazırlanması istenmektedir. İlk dilüsyonu hazırlamak için numuneden 10 mL alınıp içinde 90 mL dilüsyon sıvısı bulunan erlene aktarılmıştır. Hazırlanan bu dilüsyondan 1 mL alınıp içinde 99 mL dilüsyon sıvısı olan başka bir erlene aktararak 2. dilüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonların, dilüsyon oranını ve dilüsyon faktörlerini hesaplayınız.

$$1. \text{ Dilüsyon: } D.O. = \frac{10}{(10+90)} = \frac{1}{10} = 10^{-1} \longrightarrow D.F. = \frac{10}{1} = 10$$

$$2. \text{ Dilüsyon: } D.O. = \frac{1}{10} \cdot \frac{1}{(1+99)} = \frac{1}{1000} = 10^{-3} \longrightarrow D.F. = \frac{1000}{1} = 10^3$$

Verilen örnekte; çiğ süt numunesi birinci dilüsyonda 10, ikinci dilüsyonda 1 000 kat seyreltilmiştir. Çiğ sütün 1 mL'sinde 100 000 adet bakteri olduğu var sayılırsa birinci dilüsyonun 1 mL'sinde 10 000 adet (100 000/10), ikinci dilüsyonun 1 mL'sinde ise 100 adet (100 000/1000) bakteri bulunacağı anlamına gelir.

SIRA SİZDE



25 g numune 225 mL dilüsyon sıvısı içerisinde çözündürülerek birinci dilüsyon hazırlanmıştır. Birinci dilüsyondan 1 mL alınıp 9 mL dilüsyon sıvısı içerisinde homojen hâle getirilerek ikinci dilüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonların, dilüsyon oranını ve dilüsyon faktörlerini hesaplayınız.

4.1.2. Dilüsyon Sıvıları

Dilüsyon sıvıları, numunenin özelliğine veya çalışmanın amacına uygun seçilmelidir. Kullanılacak dilüsyon sıvısının, numunenin mikrobiyal yükü üzerinde değişikliğe neden olmaması önemlidir. Aksi durumda, numunedeki hücreler zarar görmekte hatta ölümlere sebep olabilmektedir. Bu durumda analiz sonuçları hatalı çıkmaktadır.

Analiz yönteminde dilüsyon sıvısı belirtilmişse belirtilen dilüsyon sıvısı ile çalışılmalıdır. Örneğin Thoma lamı yöntemi ile maya sayımı çalışmasında önerilen dilüsyon sıvısı %10 asetik asit çözeltisidir. Aksi belirtilmedikçe değişikliğe gidilmemelidir. Analiz talimatında kullanılacak dilüsyon sıvısı belirtilmemiş ise numunenin özelliklerine en uygun dilüsyon sıvısı seçilmelidir. Örneğin bal, reçel, şerbet gibi şeker oranı yüksek numunelerde %20'lik sükröz çözeltisi

kullanılmalıdır. Kirlilik düzeyi yani çözünen madde içeriği düşük olan bir göl suyunun bakteriyel yükünün araştırıldığı bir analizde, dilüsyon sıvısı olarak steril damıtık su ya da gölün kendi suyunun sterilize edilerek kullanılması uygun olacaktır. İncelenecek numune; et, süt gibi besin ögesi bakımından zengin bir ortam ise, dilüsyon sıvısı olarak damıtık su kullanılmaz. Çünkü çözünen madde konsantrasyonlarının yüksek olduğu hipertonic ortamların ozmotik basıncı fazladır. Bu gibi numunelerden damıtık su ile dilüsyon hazırlanması durumunda, oluşan ozmotik basınç değişimi hücre kayıplarına neden olacaktır. Mikroorganizmalar; en iyi yaşamsal faaliyetlerini, hücre sıvıları ile aynı çözünen madde oranına sahip izotonik ortamlarda gerçekleştirirler.

Mikrobiyolojik analizlerde dilüsyon sıvısı olarak sıklıkla kullanılan çözeltiler Tablo 4.1’de verilmiştir. Bu çözeltilerin ticari dehidre formları piyasadan temin edilebilmektedir. Dilüsyon sıvılarının hazırlanmasında, içeriğinde bulunan maddeleri ayrı ayrı temin etmek yerine hazır karışımlar tercih edilmektedir. Hazır karışımlar, daha ekonomik olmasının yanı sıra hata yapma olasılığını azaltır ve işlem kolaylığı sağlar. Mikrobiyolojik çalışmalarda zamanı verimli kullanma ve analizlerin güvenilirliği çok önemlidir. Klinik çalışmalarda analiz sonuçlarına göre hastalık teşhisi konulmaktadır. Gıda mikrobiyolojisi açısından bakıldığında, uygun olmayan sonuçlarda işletmelere yaptırım uygulanabilmektedir. Mikrobiyolojik analizler yapılırken tüm ayrıntılara önem verilmeli ve çalışmalar sorumluluk bilinci ile yürütülmelidir.

Tablo 4.1: En Sık Kullanılan Dilüsyon Sıvıları

Dilüsyon Sıvısı	Kullanım Alanı ile İlgili Açıklamalar	Bileşimi (g/L)
Fizyolojik Tuzlu Su (FTS, Serum fizyolojik)	Mikroorganizmalar için izotonik ortam sağlayan, genel kullanım amacına sahip tuzlu su çözeltilisidir.	8,5 g NaCl (Sodyum klorür)
%0,1’lik Peptonlu Su	Genel amaçlı bir dilüsyon sıvısıdır. Bazı analizlerde besiyeri amacıyla da kullanılmaktadır.	1 g Pepton
Peptonlu Fizyolojik Tuzlu Su [Maximum Recovery Diluent (Maksimum Rikavri Dilüent)-MRD]	Ekim süresinin uzaması durumunda, mikroorganizmaların zarar görmesini engelleyici özelliği nedeniyle sıklıkla tercih edilen genel amaçlı dilüsyon sıvısıdır. İçeriğinde tuz ve peptonun birlikte bulunuyor olması, ozmotik basınç dengesini destekler niteliktedir.	1 g Pepton, 8,5 g NaCl Dehidre ticari form kullanımı: 9,5 g/L
Tamponlanmış Peptonlu Su [Buffered Peptone Water (Bafırd Pepton Votır)]	Dilüsyon sıvısı olarak kullanımının yanı sıra genel amaçlı besiyeri olarak da kullanılabilir.	10 g Pepton, 5 g NaCl 9 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (Disodyumhidrojen fosfat), 1,5 g K ₂ HPO ₄ (Potasyum dihidrojen fosfat) Dehidre ticari form kullanımı: 25,5 g/L



¼ Kuvvetinde Ringer Çözeltisi	Süt ve süt ürünleri analizlerinde dilüsyon sıvısı olarak kullanılır. Ozmotik basınç nedeniyle zarar görmüş mikroorganizmaların geri kazanımında etkilidir. Her biri 500 mL çözelti hazırlamak için formülize edilmiş tabletler halinde bulunan ticari formunun kullanımı tercih edilmektedir.	2,25 g NaCl, 0,105 g KCl (Potasyum klorür), 0,06 g CaCl ₂ (Kalsiyum klorür), 0,05 g NaHCO ₃ (Sodyum bikarbonat) Dehidre ticari form kullanımı: 1 tablet/500 mL
%20'lik Sükroz (çay şekeri) çözeltisi	Şeker içeriği yüksek numunelerde (reçel, marmelat, meyve suyu konsantresi, bal vb.) tercih edilir. Osmofilik (yüksek şeker konsantrasyonunu seven) ve Osmotolerant (yüksek şeker konsantrasyonuna dayanıklı) mikroorganizmalarla ilgili yapılan analizlerde kullanılır.	200 g C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ (Sükroz)
%15'lik Sodyum Klorür Çözeltisi	Tuz içeriği yüksek numunelerde (turşu vb.) tercih edilir. Halofilik (yüksek tuz konsantrasyonunu seven) mikroorganizmalarla ilgili yapılan analizlerde kullanılır.	150 g NaCl

Bunları Biliyor musunuz?

Bazı mikroorganizmalar, besiyerlerinde gelişirken ortama asidik veya bazik ürünler çıkartıp ortamın pH değerinde değişimlere neden olmaktadır. Bu durum mikroorganizmaların gelişimlerini olumsuz etkilemektedir. Bu olumsuzluğu gidermek amacıyla besiyeri ve dilüsyon sıvılarına tampon maddeler eklenir. Tampon maddeler, besiyeri veya çözeltide ani ve hızlı pH değişimlerini önlemek amacıyla bileşime eklenen zayıf asit veya baz tuzlarıdır. Tampon madde olarak en çok kullanılmakta olanlar; fosfatlar, karbonatlar, asetat ve sitratlardır.

SIRA SİZDE



Analiz yönteminde dilüsyon sıvısı belirtilmişse belirtilen dilüsyon sıvısı ile çalışılır. Belirtilmemişse numunenin özelliğine en yakın dilüsyon sıvılarının kullanılması önerilmektedir. Aşağıdaki tabloda verilen numunelerde kullanılabilecek dilüsyon sıvılarını karşılıklarına yazarak tabloyu doldurunuz.

Numune çeşidi	Kullanılabilecek Dilüsyon Sıvısı
İçme suyu	
Deniz suyu	
Turşu suyu	
Marmelat	
Peynir	
Sosis	



19. UYGULAMA

DİLÜSYON SIVISI (SEYRELTME ÇÖZELTİSİ) HAZIRLAMA

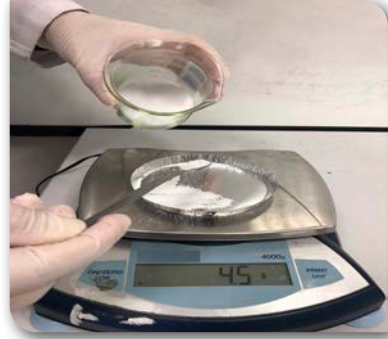
Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak dilüsyon sıvısı (seyreltme çözeltisi) hazırlama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Hassas terazi, balon joje, erlen, otoklav şişeleri, deney tüpleri, tartım kabı, spatül, otoklavlanabilir tüp standı, otoklav, yağlı pamuk, alüminyum folyo, manyet, cam boncuk, NaCl , Maximum recovery dilüent (MRD) dehidre ticari karışım.

250 mL FTS DİLÜSYON SIVISI HAZIRLAMA**İşlem Basamakları**

1. Analiz öncesi hazırlıkları yapınız.
 - **Kullanılacak araç gereç ve çalışma ortamı hazırlanır.**
2. Hazırlanacak dilüsyon sıvısı hacmine göre tartmanız gereken bileşen miktarını hesaplayınız.
3. Hesaplanan miktarları tartınız (Görsel 4.2).
4. Tartılan bileşeni 250 mL'lik balon jojeye aktarınız (Görsel 4.3).
 - **Bileşenlerin çözünmesi sağlandıktan sonra balon joje damıtık su ile çizgisine tamamlanır.**
5. Hazırlanan çözeltiyi tüplere dokuzar mL, erlen ve diğer otoklavlanabilir şişelere 90-225 mL olacak şekilde dağıtınız (Görsel 4.4).
6. Çözeltileri sterilizasyona hazırlayınız.
7. Çözeltileri otoklavda talimatına uygun olarak sterilize ediniz (Görsel 4.5).
8. Sterilizasyon sonrasında, dilüsyon sıvılarının muhafazasını sağlayınız.

**Görsel 4.2:** Bileşenlerin tartımı**Görsel 4.3:** Bileşenlerin balon jojeye aktarılması**Görsel 4.4:** Çözeltinin kaplara dağıtımı**Görsel 4.5:** Çözeltilerin otoklava yerleştirilmesi

MRD HAZIR TİCARİ DEHİDRE FORMUNDAN 250 mL DİLÜSYON SIVISI HAZIRLAMA**İşlem Basamakları**

1. Analiz öncesi hazırlıkları yapınız.
2. Hazırlanacak dilüsyon sıvısı hacmine göre tartmanız gereken bileşen miktarını hesaplayınız.
 - MRD etiket bilgileri incelenerek tartılacak miktar hesaplanır.
3. Hesaplanan miktarları tartınız.
4. Tartılan bileşeni 250 mL'lik balon jojeye aktarınız.
 - Aktarmadan önce, çözünmeyi kolaylaştırmak için bir miktar damıtık su eklenmelidir.
 - Bileşenlerin çözünmesi sağlandıktan sonra balon joje damıtık su ile çizgisine tamamlanır.
5. Çözeltilerin pH'ını ölçüp gerekiyorsa pH ayarlama işlemlerini yapınız.
 - Dehidre hazır formlarda, etikette yazan pH değeri değiştirilmek istenmiyorsa pH ayarlamaya ihtiyaç duyulmamaktadır.
6. Hazırlanan çözeltiyi tüplere dokuzar mL, erlen ve diğer otoklavlanabilir şişelere 90-225 mL olacak şekilde dağıtınız.
 - Bu aşamada örneğin homojenizasyon ihtiyacına göre erlen ve şişelerin içine manyet ya da cam boncuk atılabilir.
7. Çözeltileri sterilizasyona hazırlayınız (Görsel 4.6).
8. Çözeltileri otoklava yerleştirerek talimatına uygun olarak sterilize ediniz.
9. Sterilizasyon sonrasında, dilüsyon sıvılarının muhafazasını sağlayınız.
 - Sterilize edilen dilüsyon sıvıları hemen kullanılmayacaksa 0 °C ila +5 °C sıcaklıkta buzdolabında muhafaza edilir.



Görsel 4.6: Sterilizasyona hazır şişeler

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Tartım yapılacak madde miktarını hesapladı.				
2	Belirlenen miktarı tarttı.				
3	Çözeltiyi hazırladı ve gerekli ise pH ayarlamasını yaptı.				
4	Çözeltileri kaplara aktararak sterilizasyona hazırladı.				
5	Sterilizasyon işlemlerini yaptı.				
TOPLAM PUAN					

NOT ALINIZ

4.2. ANALİZ NUMUNESİ HAZIRLAMA

Mikrobiyolojik inceleme için; katı (toprak, ekmek, un, et, peynir, bitki-hayvan doku ve organları), sıvı (su, içecekler, idrar, kan), gaz (hava, nefes) ve ayrıca yüzeylerden (el, tırnak, boğaz, musluk, telefon, para, tezgâh) numune alınabilmektedir.

4.2.1. Mikrobiyolojik İnceleme Numunesi Alımında Dikkat Edilmesi Gereken Genel İlkeler

Laboratuvar çalışmalarında; doğru ve güvenilir sonuçlar alabilmek için, analizin dikkatli bir şekilde yapılması yeterli değildir. Numunenin, ürünü temsil edecek şekilde alınması ve özelliklerini muhafaza edecek şekilde laboratuvara getirilmesi gerekir. Laboratuvara gelen numune mümkün olan en kısa sürede analize alınmalıdır. Mikrobiyolojik analizler için numune alımında uyulması gereken genel kurallar aşağıda açıklanmıştır.

- Numuneler, tekniğine uygun olarak bu konuda bilgi ve tecrübesi olan kişilerce alınmalı ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Numune alma aşamasında aseptik kurallar uygulanmalıdır. Kullanılacak araç gereç ve kaplar steril olmalı ve bunzen bek ya da ispiro ocağı alev çatısı altında işlemler yapılmalıdır.
- Numune alma ve taşınması sırasında mikrobiyal düzeyi değiştirecek uygulamalardan kaçınılmalı, numunenin ve analizin özelliğine göre uygun ekipmanlar kullanılmalıdır.
- Alınacak numune sayısı ve miktarı; mevzuatta belirtilen kriterlere, analizin amacı ve ürünün özelliklerine göre belirlenir.
- Orijinal ambalajlı ürünlerde açılmamış ve zarar görmemiş paketlerden, tesadüfi seçim usulüne göre numune alınır.
- Büyük bir ambalaj içinde bulunan üründen numune alımında, ambalajın dış yüzeyi %76'lık etil alkol ile dezenfekte edildikten sonra steril bir kesici ile ambalaj açılmalı ve tekniğine uygun olarak alınan temsili numune steril bir kaba aktarılıp laboratuvara ulaştırılmalıdır.
- Musluktan akıtılarak alınan numunelerde, musluk ucu alkollendikten sonra alevden geçirilmeli ve bir süre musluk akıtıldıktan sonra numune alınmalıdır.
- Hastalık teşhisine yönelik incelemeler için numuneler, uygun teknik ve malzeme kullanılarak enfeksiyondan etkilenmiş bölgelerden alınmalıdır. Ayrıca;
 - o Numuneler hastalığın özelliğine göre patojenlerin yoğun olduğu bölgelerden (ishalde dışkı, akciğer enfeksiyonunda balgam, tonsilitte boğaz kültürü vb. gibi) alınmalıdır.
 - o Nekropsi (kadavra, ölü) ve biyopsi (doku) örnekleri otoliz (kokuşma) başlamadan önce ölümü yeni gerçekleşmiş olan hayvanlardan alınmalıdır.
 - o Antimikrobiyal tedaviye başlamadan önce alım yapılmalıdır.

4.2.2. Numunenin Laboratuvara Kabulü

Orijinal ambalajlı olan ürünler kendi ambalajlarında; diğerleri ise steril tek kullanımlık plastik kaplar (idrar kabı, dışkı kabı, kilitli numune poşeti vb.), swab, kapaklı tüp ve kavanozlar, enjektör, parafilmle kapatılmış petri kutusu gibi araç gereçlerle laboratuvara ulaştırılmaktadır. Soğuk zincir gerektiren işlem görmemiş, soğutulmuş, pastörize edilmiş, bozulmuş vb. gıdalar 0 °C ila +4 °C arasında; dondurulmuş ürünler ise -18 °C'de taşınmalıdır.

Klinik amaçlarla idrar (Görsel 4.7), dışkı ve gaita (Görsel 4.8) numunesi alımlarında kullanılan kaplar görsellerde yer almaktadır.



Görsel 4.7: İdrar numune kabı



Görsel 4.8: Dışkı-gaita numune kabı

Laboratuvara gelen tüm numunelerin kabul kriterlerine uygunluğu kontrol edilir. Kriterleri karşılamayan numune ya kabul edilmemeli ya da analiz sonucunu olumsuz etkileyecek durumlar kabul formunda detaylı biçimde açıklanmalıdır. Kabul işlemi yapılan numune, mümkün olan en kısa sürede analize alınır. Verilerin güvenliği açısından laboratuvar kayıtları silinmez kalem ile doldurulmalı, elektronik ortamda tutulan kayıtlar için de gerekli tedbirler alınmalıdır.

Tablo 4.2: Numune Kabul Formu Örneği

..... LABORATUVARI NUMUNE KABUL FORMU									
Sıra Numarası	Geliş Tarih ve Saati	Numuneyi Gönderen	Üretim Tarihi Parti Numarası	Numunenin Ambalaj Durumu	Numunenin			İstenilen Analizler	Açıklama
					Cinsi	Miktarı	Laboratuvara Geliş Sıcaklığı		

4.2.3. Ambalajın Açılması

Laboratuvara kabul edilen numunelerin açılacağı yer ve çevresi %76'lık etil alkol ya da uygun bir kimyasal ile dezenfekte edilir. Alkolü uzaklaştırmak için ambalaj uygun ise alevden geçirilir, uygun değilse steril damıtık suyla silinerek uzaklaştırılır. Açma işleminde kullanılacak materyal steril olmalıdır. Makas, bıçak gibi açma işleminde kullanılacak malzemeler alkolde bekletilerek de sterilize edilebilir. Malzemeden alkolü uzaklaştırmak için bek alevinden geçirmek yeterlidir.

Laboratuvara kabul edilen numunenin paraleli, analiz sonuçlanıncaya kadar ürün özellikleri değişmeyecek şekilde şahit olarak korunmalıdır.

Sıvı numuneler, basit bir çalkalama ile doğrudan analize alınabildiği halde katı numuneler, tartım, homojenizasyon gibi işlemlerden sonra analize alınabilir. Katı numunelerde, aseptik tekniğe uygun

olarak önce tartım, daha sonra blender (blendır) veya stomacher (stomekır) gibi cihazlarla numune ile dilüsyon sıvısının homojenizasyonu sağlanmalıdır. Katı numune; homojen bir yapıda değilse veya tartım sırasında sorun olacak büyüklükteyse numunenin özelliğine göre, tartım öncesi küçük parçalara bölünmesi gerekir. Bu işlem için numunenin özelliğine göre bazı ön işlemlerin (dilimleme, değirmende öğütme, kıyma makinesinden geçirme gibi) uygulanması gerekebilir.

Tartım işleminde kullanılacak malzemeler steril olmalıdır. Tartım işlemi tartım kayıkçığı, saat camı, petri kutusu, alüminyum folyo gibi materyallerde yapılır. Tartılan numune, içinde steril dilüsyon sıvısı olan kaplara aktarılır. İstenilen miktardan daha fazla numunenin tartılması halinde bunun geri alınmasındaki zorluktan dolayı tartımların erlen, beher gibi kaplarda yapılması tercih edilmemektedir. Stomacher torbası ya da kilitli poşet içine direkt tartım da yapılabilmektedir. Bu amaçla torba ya da poşet, bir beher içine koyularak tartım işlemi yapılır ve dilüsyon sıvısı üzerine eklenir.

Katı numuneler genellikle 10,0 g tartılarak analize alınır. *Salmonella* aranmasında olduğu gibi, yöntemin gerekliliğinden kaynaklı analizlerin yanı sıra, bazı cihazlarla yapılan homojenizasyon işlemi için ilk dilüsyonun 25,0 g numuneden yapılması gerektiği durumlar da vardır. Tartım, 0,1 g hassasiyetle yapılmalıdır. Parçalanmış olsa dahi et gibi bazı numunelerde tam olarak istenilen kütlede tartım yapmak zordur. Bu gibi durumlarda tartım işleminde kontaminasyon riskini artıracak hareketlerden kaçınılmalı, hedeflenen kütleden fazla olan kısım kadar dilüsyon sıvısı ilave etmek suretiyle dilüsyon hazırlanarak tartım hatası ortadan kaldırılmalıdır.

Örneğin 10 g numune yerine 10,5 g numune tartıldıysa 0,5 g'ı geri almaya çalışmak yerine, 10^{-1} lik dilüsyon hazırlamak için $10,5 \times 9 = 94,5$ mL dilüsyon sıvısı kullanmak daha kolay, hızlı ve kontaminasyon riskini azaltan bir uygulamadır. Bu durumda 90 mL olarak hazırlanmış dilüsyon sıvısı üzerine steril pipetle 4,5 mL daha ilave edilir. Bu uygulama hedeflenen ağırlıktan daha fazla tartımlar için geçerlidir. %5'ten fazla tartım hatası kabul edilmez.

ÖRNEK



25,8 g olarak tartılan analiz numunesinin, 10^{-1} lik dilüsyonunu hazırlamak için ne kadar dilüsyon sıvısı kullanılır?

$$\frac{1}{10} = \frac{25,8}{25,8 + D.S.} \longrightarrow \text{Dilüsyon Sıvısı} = 232,2 \text{ mL}$$

25 g numuneden 10^{-1} lik dilüsyon elde etmek için hazırlanmış olan 225 mL dilüsyon sıvısına, $232,2 - 225 = 7,2$ mL daha ilave edilmesi gerekmektedir.

Bunları Biliyor musunuz?

10^{-1} lik dilüsyon için kullanılması gereken dilüsyon sıvısı miktarı, 1 birim numuneye karşılık 9 birim dilüsyon sıvısı esasıyla (1:9), numune miktarı 9 ile çarpılarak pratik bir şekilde de bulunabilir.

$$\text{Dilüsyon Sıvısı} = 25,8 \times 9 = 232,2 \text{ mL}$$

SIRA SİZDE



10,4 g numunenin, 10^{-1} lik dilüsyonunu hazırlamak için ne kadar dilüsyon sıvısı kullanılır? Hesaplayınız.

4.2.4. Homojenizasyon İşlemi

Sıvı numunelerde kuvvetli bir çalkalama ile yeterli homojenizasyon sağlanabilmektedir. Numuneden beklenen mikroorganizma sayısının petri kutusunda sayılabilecek seviyede olması durumunda, doğrudan (seyreltmeden) çalışma yapılabilmektedir. Beklenen mikroorganizma sayısının yüksek olması durumunda ise numunenin dilüsyonları hazırlanarak analiz yapılmaktadır.

Yarı katı veya katı numunelerde ise mutlaka dilüsyon hazırlanması gerekmektedir. Numunede bulunan mikroorganizmaların dilüsyon sıvısına geçerek homojen dağılımını sağlamak için numunenin özelliğine göre manyetik karıştırıcı, blender, stomacher cihazlarından uygun olanı kullanılmaktadır (Görsel 4.9).



a) Manyetik karıştırıcı



b) Blender



c) Stomacher

Görsel 4.9 : Homojenizasyon için kullanılan araçlar

Homojenizasyon işlemi yapılırken şu konulara dikkat edilmelidir:

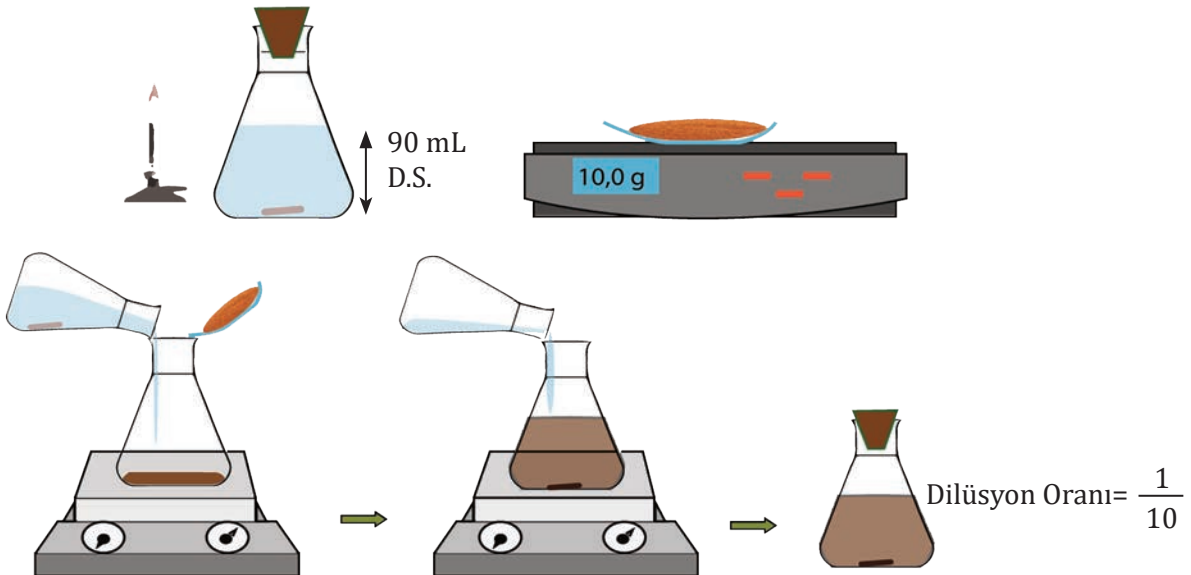
- Homojenizasyon işlemi yeterli sürede ve hızda yapılmalıdır. Az olması durumunda mikroorganizmaların tamamının dilüsyon sıvısına geçmesi mümkün olmayacağı gibi; fazla olması durumunda da mekanik enerji ile oluşan sıcaklık artışının hücre kayıplarına neden olacağı göz önünde bulundurulmalıdır.
- Numune buzdolabından çıkartıldığı gibi mekanik karıştırıcıya maruz bırakılmamalı, bir süre oda sıcaklığında bekletilerek homojenizasyon esnasında oluşan ani sıcaklık farkı ile bu konuda duyarlı mikroorganizma kayıplarına neden olunmamalıdır.
- Ungibisututma özelliği fazla ve hamurumsu yapı oluşturan numunelerin homojenizasyonunda, ilk dilüsyon 1/20 olacak şekilde hazırlanır.
- Kuru gıdalar, hardal, krema ve fındık ezmesi gibi ürünlerde homojenizasyon için cihaz kullanılmıyacaksa homojenizasyonu desteklemek adına, ilk dilüsyon sıvısı olarak hazırlanan erlen ya da şişenin içerisine, sterilizasyon öncesinde 6 mm çapında cam boncuklar atılır.

- Kuru gıdaların homojenizasyonunda, dilüsyon sıvısı ile karıştırma esnasında, mikroorganizmaları oluşacak ozmotik şoktan korumak için kademeli homojenizasyon yapılması daha doğru bir uygulamadır. Tartılan 10,0 g örneğin kademeli homojenizasyonu için, öncelikle dilüsyon sıvısının 10 mL kadarı örnek üzerine aktarılır. Elle karıştırılarak yeterli ıslanma sağlandıktan sonra dilüsyon sıvısının kalan kısmı üzerine eklenir.
- Tereyağ, krema gibi örneklerin homojenizasyonunda kullanılan dilüsyon sıvısı sıcaklığı 30-32 °C civarında olmalıdır. Bu gibi örneklerde kullanılan cam pipet, kullanmadan hemen önce birkaç defa alevden geçirilerek ısıtılır. Bu sayede pipetleme esnasında, pipet içinde oluşabilecek katılaşma önlenilebilir.
- Baharat, toprak gibi tam çözünme sağlanamayan veya parçalandığında pipetin ucunu tıkayabilecek partiküller oluşan numunelerde, homojenizasyon amacıyla hazırlanan ilk dilüsyon, partiküllerin çökmesi için 5 dk dinlendirilmelidir. Sonrasında numunenin durumuna göre berrak kısmından steril pipet ile 10 mL çekilerek steril bir tüpe aktarılır. Böylece pipetin tıkanması engellenmiş olur.

4.2.4.1. Manyetik Karıştırıcı ve Tüp Karıştırıcı ile Homojenizasyon İşlemi

Dilüsyon sıvısı hazırlama işlemlerinde ve suda kolayca çözülebilen numunelerin homojenizasyonunda manyetik karıştırıcı kullanılır. Standart analizlerde, içine manyetik balık bırakılarak sterilize edilmiş 90 mL dilüsyon sıvısına, aseptik ortamda tartılmış 10 gram numune ilave edilir ve manyetik karıştırıcıda orta devirde yaklaşık 1 dakika tutulup homojenizasyon sağlanır. Manyetik karıştırıcı ile homojenizasyon ketçap, yoğurt gibi yarı katı numunelerde de kullanılabilir. Görsel 4.10'da, hazır çorba numunesinin manyetik karıştırıcı kullanılarak yapılan kademeli homojenizasyonu resmedilmiştir.

Tartım ve homojenizasyon işlemleri aseptik ortam koşullarında yapılır.



Görsel 4.10: Hazır çorba numunesinin manyetik karıştırıcı kullanılarak kademeli homojenizasyonu

Tüp içinde bulunan sıvı numunelerde ya da katı numuneden tüp içerisinde analiz numunesi hazırlanmak istendiğinde homojenizasyon için tüp karıştırıcı (vorteks) cihaz kullanılır. Görsel 4.11'de gösterilen vorteks cihazı, tüp içeriğini merkezden dışa doğru döndürme prensibi ile çalışır.



Görsel 4.11: Vorteks cihazı ile homojenizasyon

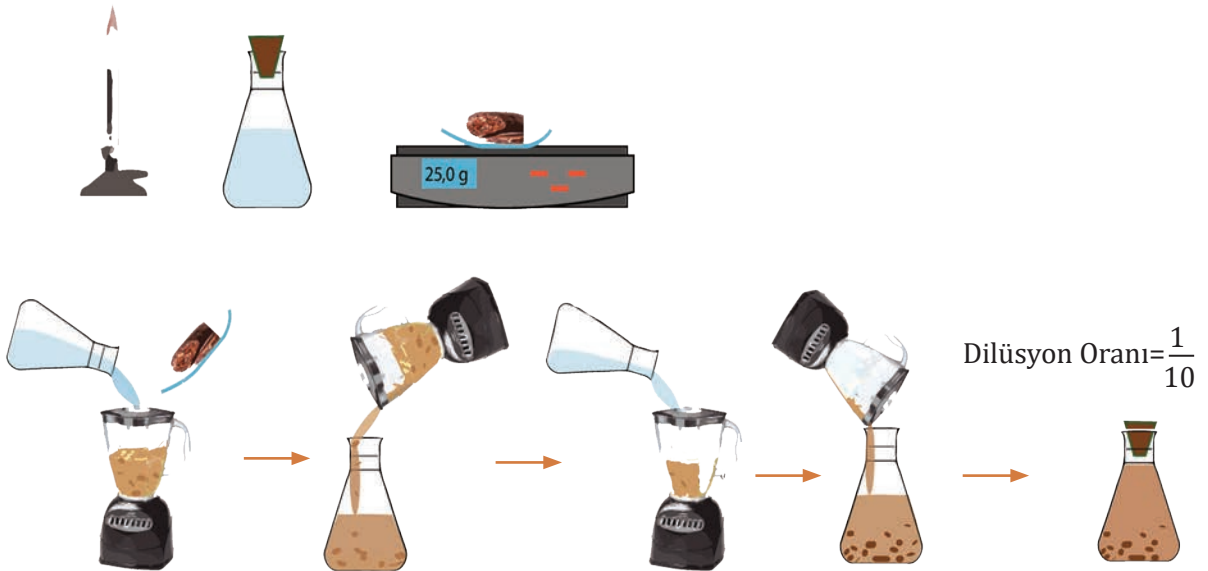
4.2.4.2. Blender ile Homojenizasyon İşlemi

Bisküvi, makarna, sucuk, sert peynir gibi kuru numunelerin homojenizasyonunda blender kullanılabilir. Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan blender, sterilize edilebilir özellikte olan metal ya da cam malzemeden üretilmiş olmalıdır. Her kullanımda temizlik ve sterilizasyonunun yapılması gerekir.

Bıçakların dönmesi ile oluşan sıcaklık artışından dolayı hücre kayıpları yaşanabilir. Numunenin hava (oksijen) ile aşırı miktarda teması, anaerobik mikroorganizma analizlerinde hatalı sonuçlara neden olabilir. Bu dezavantajlarından dolayı numune stomacher ile homojenize edilebilecek özellikte ise blender kullanılmamalıdır.

Az miktarda numune ile blenderda tam parçalanma sağlanamayacağı için, homojenizasyon amacıyla yapılan ilk dilüsyon 25 g numune ile yapılır. Blender kullanımında, ayrı bir steril 250 mL'lik erlen bulundurulur. 25 g numune, dilüsyon sıvısının 50-100 mL kadarı ile blenderda homojenize edildikten sonra içerik erlene aktarılır. Dilüsyon sıvısının arta kalan kısmı ile blender çalkalanarak kalıntıların erlene aktarılması sağlanır. Görsel 4.12'de sucuk numunesinin blender kullanılarak yapılan homojenizasyonu resmedilmiştir.

Tartım ve homojenizasyon işlemleri aseptik ortam koşullarında yapılır.



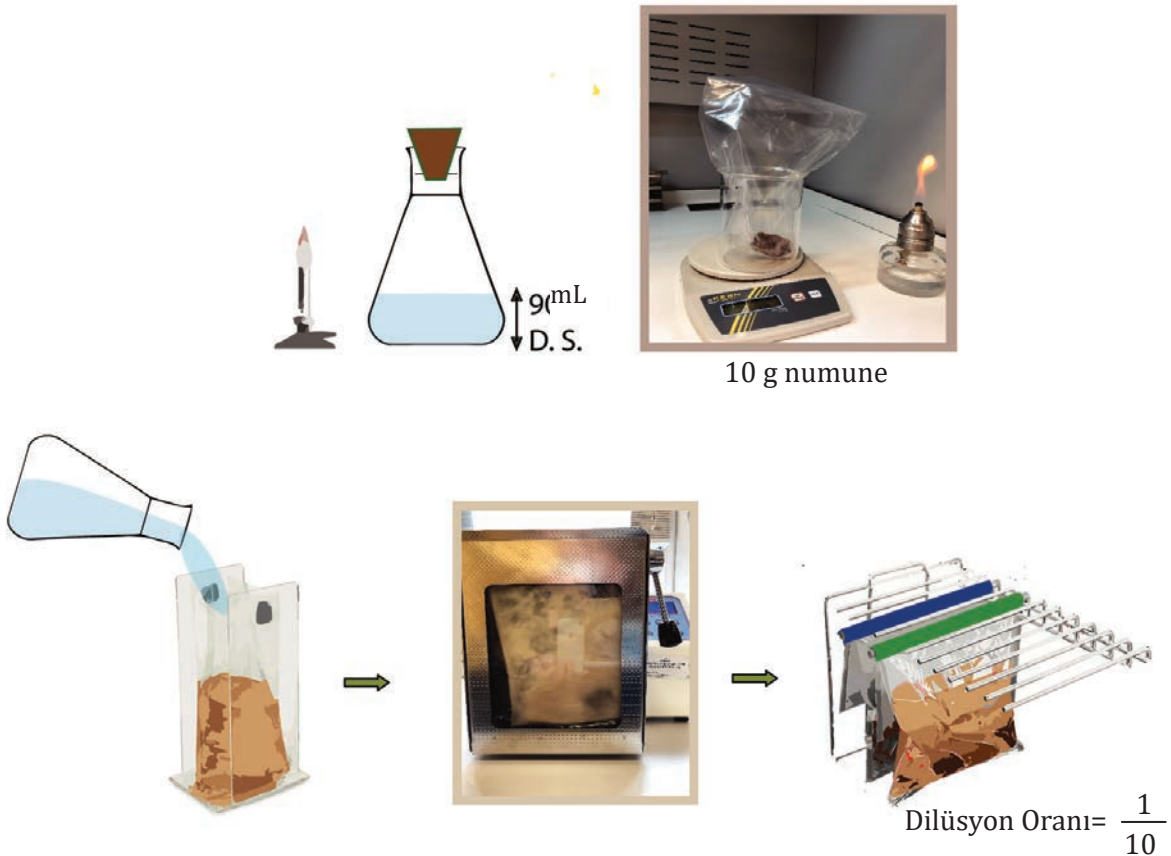
Görsel 4.12: Sucuk numunesinin blender kullanılarak homojenizasyonu

4.2.4.3. Stomacher ile Homojenizasyon İşlemi

Stomach (stomak), mide anlamında olan İngilizce bir kelimedir. Stomacher cihazı da, adını midedekine benzer öğütmeden almaktadır. Günümüzde mikrobiyoloji laboratuvarlarında, katı ve yarı katı numunelerin homojenizasyonunda, etkinliğinin yüksek olması ve iş yükünü hafifletmesi nedenleriyle, çoğunlukla stomacher cihazı kullanılmaktadır. Steril stomacher torbaları içine numune tartılıp dilüsyon sıvısı ilave edildikten sonra, torba cihazın kapak kısmına yerleştirilir. Torba içeriği, cihazın iki pedalının nazik ama etkili bir şekilde ileri geri hareket etmesi ile kapak ve pedallar arasında ezilir. Bu sayede dilüsyon sıvısı numunenin içindeki dokulara nüfuz ederek mikroorganizmaların dilüsyon sıvısı içinde homojen dağılımı sağlanır. Steril olarak satışa sunulan stomacher torbaları, mekanik darbelere karşı oldukça dirençlidir. Ancak içeriğinde sert parçacıklar olan numuneler (taş parçacıkları içeren toprak numunesi gibi) torbayı delebileceği için bu gibi numunelerde stomacher kullanımı tercih edilmemelidir.

Homojenizasyon tamamlandıktan sonra numunenin özelliğine göre oluşan partiküller, pipetleme esnasında tıkanmaya sebep olabilmektedir. Bu durumda stomacher torbası, standa asılarak kısa bir süre bekletilmeli, partiküller çöktükten sonra dilüsyon sıvısının üst katmanından pipetleme yapılmalıdır. Bunun yanı sıra filtreli olarak üretilen torbalar da bulunmaktadır. Bu torbalarda, numunenin partikül içermeyen çözünen kısmı, torbanın özel bölmesinde toplanmaktadır. Görsel 4.13'te et numunesinin stomacher kullanılarak yapılan homojenizasyonu resmedilmiştir.

Tartım ve homojenizasyon işlemleri aseptik ortam koşullarında yapılır.



Görsel 4.13: Et numunesinin stomacher kullanılarak homojenizasyonu

20. UYGULAMA

ANALİZ NUMUNESİ HAZIRLAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak analiz numunesi hazırlama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

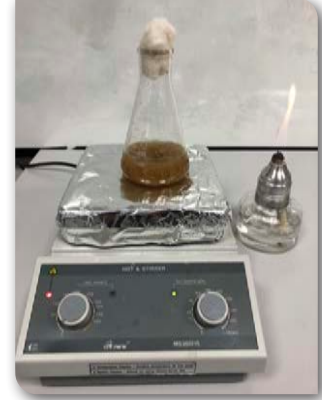
Kullanılacak Araç Gereç

Hassas terazi, steril tartım kabı (tartım kayığı/petri kutusu), steril spatül, 250 mL'lik steril erlen, manyetik karıştırıcı, steril blender, stomacher, stomacher torbası, steril levha, steril bistüri ya da makas; hazır çorba, sert peynir (tulum, mihaliç vb.), ekmek numuneleri, biri manyetli diğeri manyetsiz olarak hazırlanmış iki adet 90 mL steril FTS ya da MRD çözeltileri, 225 mL steril ¼ kuvvetinde ringer çözeltilisi, %76'lık etil alkol.

Not: Bu uygulamada yukarıdaki yazılı numuneler üzerinden işlem basamakları anlatılmıştır. Kullanılan cihaza uygun başka numunelerde de çalışma yapılabilir.

Ticari Hazır Çorba Karışımından Analiz Numunesi Hazırlama**İşlem Basamakları**

1. Kullanacağınız araç gereç ve aseptik çalışma ortamını hazırlayınız.
 2. Hazır çorba poşetinin ambalajını etil alkol ile dezenfekte ettikten sonra steril bir bistüri ya da makas yardımı ile açınız.
 3. Tartım kabında 10,0 g numune tartınız.
 4. Tartılan numuneyi boş bir 250 mL'lik steril erlene alınız.
 5. 90 mL manyetli olarak hazırlanmış dilüsyon sıvısından, numune üzerine yaklaşık 10 mL kadar ilave edip el ile hafifçe çalkalamak suretiyle karıştırınız.
- **Kuru ürünlerde kademeli homojenizasyon yapılmalıdır.**
6. Dilüsyon sıvısının kalan kısmını, manyet ile birlikte erlene aktarıp erlenin ağzını kapatarak manyetik karıştırıcıda, orta hız seviyesinde homojenizasyonu sağlayınız (Görsel 4.14).



Görsel 4.14: Manyetik karıştırıcıda homojenizasyon

Peynirden Analiz Numunesi Hazırlama**İşlem Basamakları**

1. Kullanacağınız araç gereç ve aseptik çalışma ortamını hazırlayınız.
 2. Laboratuvara gelen peynir numunesinin ambalajını etil alkol ile dezenfekte ettikten sonra steril bir bistüri ya da makas yardımı ile açınız.
 3. Peynir numunesini kabından çıkartıp aseptik koşullarda küçük parçalara ayırınız.
- **Küçük parçalara ayırma amaçlı kullanabilecek steril levha bulunmaması durumunda, aynı amaçla cam levha ve alüminyum folyo ile kaplanmış doğrama tahtası kullanılabilir. Bu durumda etil alkol ile dezenfekte edip alevden geçirerek sterilizasyonu sağlanmalıdır.**
4. Küçük parçalara ayırdığınız peynir numunesinden tartım kabına 25,0 g tartınız.

5. Tarttığınız peyniri ve dilüsyon sıvısını steril blender kabına aktarınız (Görsel 4.15)
 - Dilüsyon sıvısı olarak 225 mL ringer çözeltisi kullanılmalıdır.
 - Dilüsyon sıvısının yaklaşık 1/3'ü eklenmelidir. Kalanının blender kabını yıkamada kullanılacağı unutulmamalıdır.
6. Blenderda homojenizasyon işlemi yapınız.
7. Homojenizasyon sonunda içeriği, steril 250 mL'lik erlene alınız.
8. Geri kalan dilüsyon sıvısı ile blender kabını çalkalayarak içeriğin tamamını aynı erlen üzerine ekleyip erlenin ağzını kapatınız (Görsel 4.16).



Görsel 4.15: Blendera aktarım

Ekmekten Analiz Numunesi Hazırlama

İşlem Basamakları

1. Kullanacağınız araç, gereç ve aseptik çalışma ortamını hazırlayınız.
2. Laboratuvara gelen ekmek numunesinin ambalajını etil alkol ile dezenfekte ettikten sonra steril bir bistüri ya da makas yardımı ile açınız.
3. Ekmek numunesini kabından çıkartıp aseptik koşullarda küçük dilimlere ayırınız (Görsel 4.17).
4. Numunenin farklı yerlerinden (iç ve kabuk kısımlarından) alarak stomacher torbasına 10,0 g tartınız.
5. Stomacher torbası içine 90 mL steril dilüsyon sıvısı ilave ediniz (Görsel 4.18).
6. Torbayı stomacher cihazına yerleştirerek süre ve pedal hızı ayarlarını yapınız (Görsel 4.19).
 - Pedal hızı orta düzeye ayarlanmalıdır.
 - Homojenizasyon süresi ekmeğin fiziksel yapısına göre belirlenmelidir.
7. Homojenizasyon sonunda torbanın ağız kısmını özel aparatı ile kapatarak standı asınız.



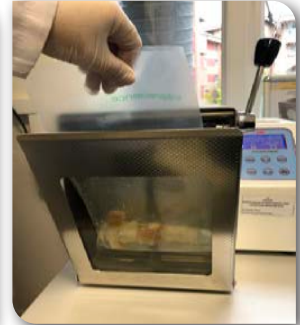
Görsel 4.16: Blenderı çalkalama



Görsel 4.17: Ekmeği dilimlere ayırma



Görsel 4.18: Dilüsyon sıvısı aktarımı



Görsel 4.19: Stomacher kullanımı

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ

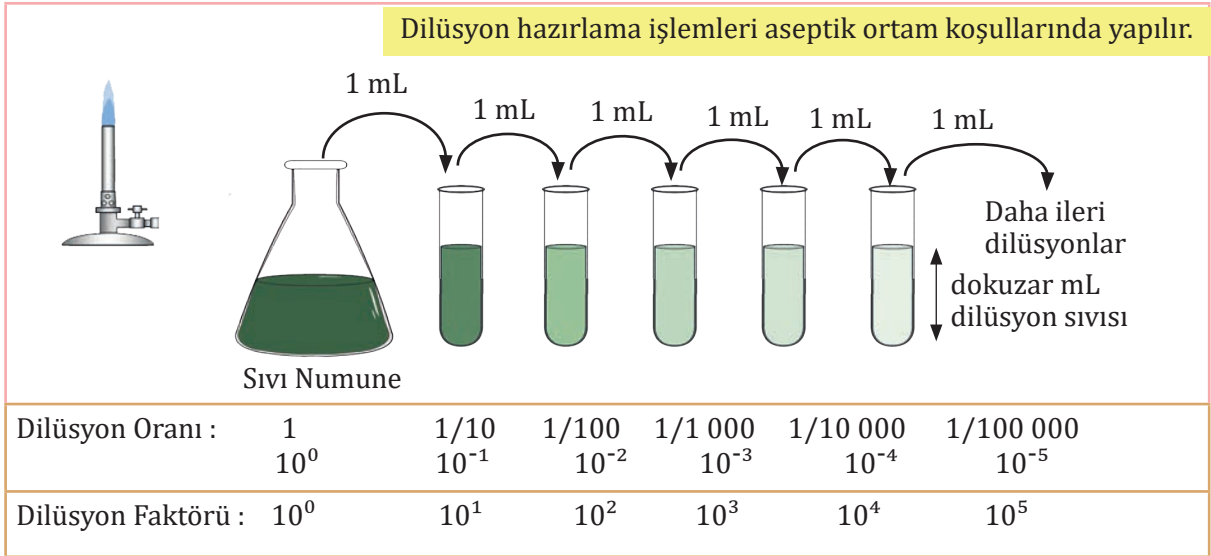
		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Aseptik tekniğe uygun çalıştı.				
2	Ambalajı açma ve numuneyi parçalara ayırma işlemlerini yaptı.				
3	Terazi kullanım talimatına uygun olarak tartım işlemlerini yaptı.				
4	Homojenizasyon işlemi yaptı.				
5	Homojenizasyon cihazlarını talimatlarına uygun kullandı.				
TOPLAM PUAN					

4.3. DİLÜSYON SERİSİ HAZIRLAMA

Numunede tahminen beklenen mikrobiyal yüke göre dilüsyon hazırlanması gerekir. Mikroorganizma sayısının az olduğu tahmin edilenlerde düşük dilüsyonlarla çalışmak yeterlidir fakat mikroorganizma sayısı yüksek olan numunelerin binlerce, hatta milyonlarca kez seyreltilmesi gerekir. Bu denli yüksek oranlı bir seyreltme işleminde, numuneden seri dilüsyonlar hazırlanarak dilüsyon işlemi kolaylaştırılır. Seri dilüsyon hazırlama hesap kolaylığı nedeniyle genellikle 10 ve katları (ondalık, desimal) şeklinde yapılmakla beraber numuneye ve yöntemine göre; 2 katlı, 4 katlı seri dilüsyonlar da hazırlanabilmektedir.

4.3.1. Sıvı Numuneden Desimal (Ondalık) Dilüsyon Serisi Hazırlama

Dilüsyon serileri büyük bir çoğunlukla deney tüplerine hazırlanmaktadır. Bu amaçla; öncelikle, hazırlanacak dilüsyon sayısı kadar, içlerinde dokuzar mL dilüsyon sıvısı bulunan tüpler hazırlanır ve sterilize edilir. Dilüsyon serisi hazırlamak için aseptik ortam oluşturulur. Homojenize edildikten sonra numuneden 1 mL alınarak içinde 9 mL steril dilüsyon sıvısı bulunan tüpe aktarılır. Varsa vorteks cihazında, yoksa el hareketleri ile numune ve dilüsyon sıvısının homojen karışması sağlanır. Böylelikle 10^{-1} oranlı dilüsyon hazırlanmış olur. Tüplerde karışıklığa sebep olunmaması adına, hazırlandığı anda deney tüpü üzerine asetat kalem ile dilüsyon oranı yazılır. Sonrasında 10^{-1} oranlı dilüsyondan 1 mL alınıp içinde 9 mL steril dilüsyon sıvısı bulunan diğer tüpe aktarılır. Homojenize edildikten sonra 10^{-2} lik dilüsyon elde edilir ($1/10 \times 1/10 = 1/100 = 10^{-2}$). 10^{-2} lik dilüsyondan 1 mL alınarak içinde steril 9 mL dilüsyon sıvısı bulunan tüpe aktarıldığında 10^{-3} lük dilüsyon elde edilir ($1/10 \times 1/100 = 1/1000 = 10^{-3}$). Bu şekilde, aynı işlemlere devam edilerek ihtiyaç duyulduğu kadar alt dilüsyonlar oluşturulabilir (Görsel 4.20).



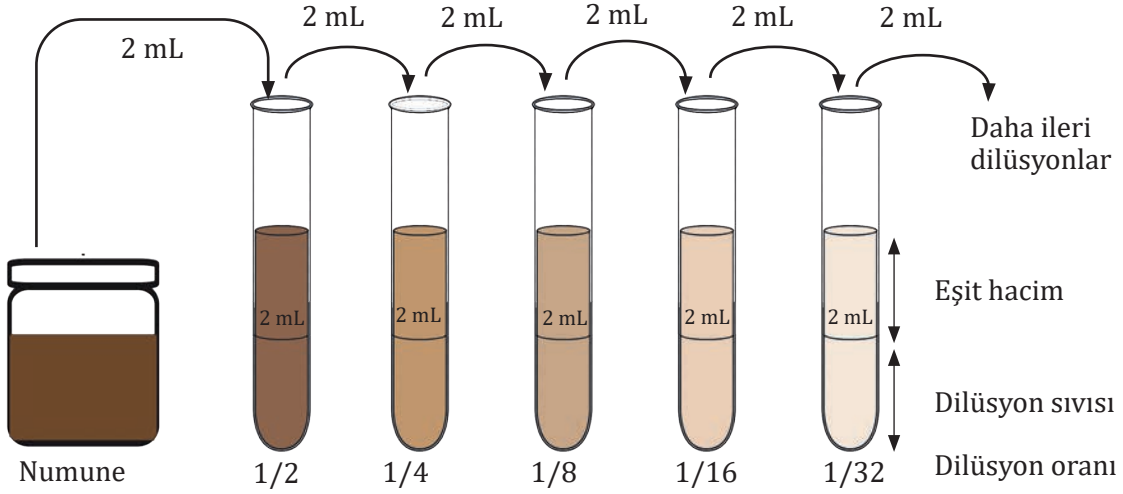
Görsel 4.20: Sıvı numuneden hazırlanan desimal dilüsyon serisi

Bunları Biliyor musunuz?

Görsel 4.20'de desimal dilüsyon serisi hazırlanan sıvı numunenin 1 mL'sinde 100 000 adet bakteri olduğunu varsayalım. Görseldeki her bir ileri dilüsyonun mL'sinde bulunan bakteri sayısı 10 kat azalarak, 10^{-5} lik dilüsyonda 1'e kadar indirgenmiş olacaktır. 10^{-5} lik dilüsyon, numunenin 100 000 (10^5) kat seyreltilmiş hâlidir.

4.3.2. Sıvı Numuneden İki Katlı Dilüsyon Serisi Hazırlama

İki katlı dilüsyon serisi hazırlamak için küçük hacimli deney tüplerinde ikişer mL steril dilüsyon sıvıları hazırlanır. Numune ve daha sonraki dilüsyonlardan, dilüsyon sıvısı üzerine aynı hacimde (ikişer mL) aktarma yapılır. Böylelikle iki kat seyreltmek suretiyle ileri dilüsyonlar hazırlanmış olur. Görsel 4.21’de sıvı numuneden iki katlı dilüsyon serisi hazırlama işlemi gösterilmiştir.



Görsel 4.21: Sıvı numuneden hazırlanan iki katlı dilüsyon serisi

SIRA SİZDE

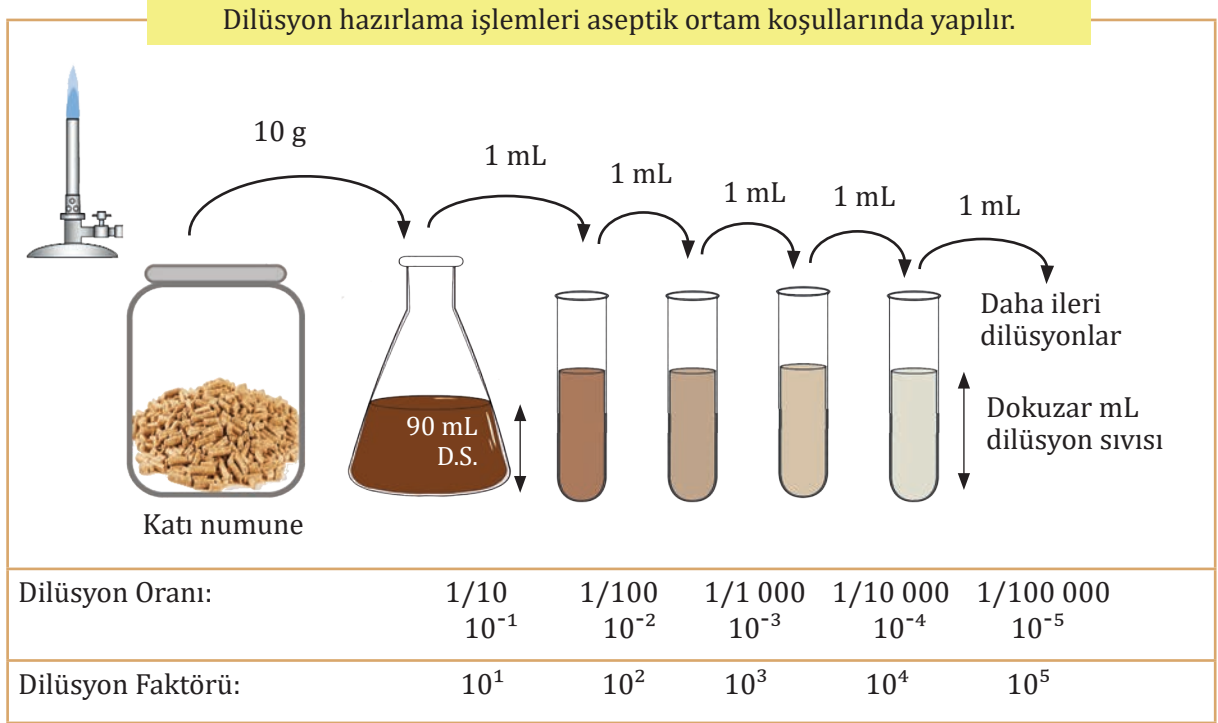


Görsel 4.21’de iki katlı olarak hazırlanmış dilüsyon serisinde, 1/16 oranlı dilüsyonun 1 mL’sinde 12 adet bakteri olduğu varsayılırsa numunenin 1 mL’sinde kaç adet bakteri vardır?

4.3.3. Katı Numuneden Desimal Dilüsyon Serisi Hazırlama

Katı numunelerde, analize hazırlama konusunda detaylı açıklama yapıldığı gibi, mikroorganizmaların homojen dağılımı için ilk dilüsyonun hazırlanması gerekir. Hazırlanan bu ilk dilüsyon genellikle 1/10 oranında olmakla birlikte, un numunesinde olduğu gibi 1/20 ya da başka oranlarda da olabilmektedir. İlk dilüsyon hangi oranda hazırlanmış olursa olsun; desimal dilüsyon serileri hazırlanırken devam eden işlemlerde, 1 mL bu dilüsyondan alınarak içinde 9 mL steril dilüsyon sıvısı bulunan deney tüpüne aktarılır. Sonra sıvı numuneden dilüsyon serisi hazırlamada anlatıldığı şekilde, desimal ileri dilüsyonlar hazırlanarak işlemler sürdürülür.

Görsel 4.22'de katı numuneden dilüsyon serisi hazırlama anlatılmıştır.



Görsel 4.22: Katı numuneden hazırlanan desimal dilüsyon serisi

4.3.4. Dilüsyon Serileri Hazırlanırken Dikkat Edilecek Noktalar

- Her aktarma için ayrı steril pipet ya da tek kullanımlık steril pipet ucu kullanılmalıdır. Kullanım kolaylığı sağladığı ve kontaminasyon riskini azalttığı için otomatik pipet ve tek kullanımlık steril pipet uçları tercih edilmektedir.
- Her aktarma öncesinde, numune alınacak tüpün vorteks cihazı ya da el ile homojenizasyonu sağlanmalıdır.
- Pipet ile çekim esnasında, aktarılacak numune birkaç defa çekilip bırakılarak pipetin iç yüzeyinin numune ile çalkalanması sağlanmalıdır.
- Dilüsyon hazırlandıktan sonra 15 dk. içinde ekim işlemleri bitirilmiş olmalıdır. Homojenizasyon, dilüsyon hazırlama ve ekim işlemlerinin tamamı en fazla 30 dk.da tamamlanmalıdır. Bu sürenin uzaması durumunda, hızlı çoğalabilen bazı mikroorganizmaların sayısı artabilir.
- Bazı analizlerde dilüsyon hazırlama aynı zamanda canlandırma amacıyla uygulanmaktadır. Bu durumda bu süre geçerli değildir.

SIRA SİZDE



Sıvı numuneden, 1 mL numuneye karşın 3 mL dilüsyon sıvısı (Dilüsyon oranı= $\frac{1}{3}$) olacak şekilde, 5 defa seyreltme işleminin yapıldığı dört katlı dilüsyon serisi hazırlamayı şekil üzerinde gösteriniz.

21. UYGULAMA

DESİMAL DİLÜSYON SERİSİ HAZIRLAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak desimal dilüsyon serisi hazırlama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Bu uygulama faaliyetinde sıvı numuneden 10^{-4} dilüsyon oranına kadar desimal dilüsyon serisi hazırlama yönergeleri verilmiştir. Analizin amacına ve numunenin özelliğine göre dilüsyon serisi kısaltılıp uzatılabilmektedir. Katı numuneden çalışma yapılacaksa 20. uygulama faaliyetinde anlatıldığı şekilde 10^{-1} lik dilüsyonu oluşturularak numune analize hazırlanır. Sonrasında 6. işlem basamağından itibaren yönergeler izlenir.

Kullanılacak Araç Gereç

İçerisinde dokuzar mL steril dilüsyon sıvısı bulunan deney tüpleri, asetat kalemi, steril pipet/pipet uçları, otomatik pipet, tüp standı, vorteks cihazı, stomacher, sıvı numune, katı numune.

İşlem Basamakları

1. Kullanacağınız araç gereç ve aseptik çalışma ortamını hazırlayınız.
2. İçerisinde dokuzar mL steril dilüsyon sıvısı bulunan 4 deney tüpünü, tüp standına alınız.
3. Asetat kalemi ile üzerlerine hazırlayacağınız dilüsyon oranlarını yazınız.
 - Birinci tüpe 10^{-1} , ikinci tüpe 10^{-2} , üçüncü tüpe 10^{-3} , dördüncü tüpe 10^{-4} yazılır.
4. Sıvı numunenin homojenizasyon işlemlerini yapınız.
5. Numuneden pipet ile 1 mL alarak birinci tüpe aktarınız.
 - Aktarma işleminde kullanılacak pipetin steril olduğundan emin olunmalıdır.
 - Pipet ile tüpten tüpe aktarma uygulamalarında anlatıldığı şekilde çalışılmalıdır.
6. Birinci tüpü (10^{-1}) vorteks cihazı ile homojenize ediniz.
7. Birinci tüpten 1 mL alarak ikinci tüpe (10^{-2}) aktarınız.
8. İkinci tüpü vorteks cihazı ile homojenize ediniz.
9. İkinci tüpten 1 mL alarak üçüncü tüpe (10^{-3}) aktarınız.
10. Üçüncü tüpü vorteks cihazı ile homojenize ediniz.
11. Üçüncü tüpten 1 mL alarak dördüncü tüpe (10^{-4}) aktarınız.
12. Dördüncü tüpü vorteks cihazı ile homojenize ediniz.
13. Dilüsyon serisi hazırlama işlemlerini tamamlayınız (Görsel 4.23).



Görsel 4.23: Dilüsyon serisi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Aseptik çalışma ortamı ve araç gereçleri hazırladı.				
2	Aseptik çalışma tekniklerini uyguladı.				
3	Homojenizasyon işlemlerini yaptı.				
4	Vorteks cihazını kullanma talimatlarına uygun kullandı.				
5	Pipetle aktarma işlemlerini yaptı.				
TOPLAM PUAN					



A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. Tüp içeriğini merkezden dışa doğru döndürme prensibi ile homojenize eden cihaz cihazdır.
2. Süt ve süt ürünlerinin mikrobiyolojik analizinde seyreltme sıvısı olarak kullanılır.
3. 10^{-3} lük dilüsyondaki mikroorganizma sayısı, orijinal örneğe göre kat seyreltilmiştir.
4. Ortama asit veya baz ilave edildiğinde pH değişimine karşı direnç oluşturan maddelere madde denir.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

5. **Mikrobiyolojik analizlerde seyreltme işlemi hangi amaçla yapılmaktadır?**
 - A) Mikroorganizmalar için hipertonic ortam oluşturmak.
 - B) Mikroorganizmaların su ihtiyacını karşılamak.
 - C) Petri kutusunda oluşan kolonileri sayılabilir düzeye indirmek.
 - D) Mikroorganizmaların besin ihtiyacını karşılamak.
 - E) Petri kutusunda oluşan koloni sayısını artırmak.
6. Dilüsyon sıvısındaki çözünen madde konsantrasyonu ile mikroorganizma hücre sıvısının çözünen madde konsantrasyonu birbirine yakın değerlerdedir. **Buna göre dilüsyon sıvısı, mikroorganizma hücresine göre ozmotik basınç açısından nasıl bir ortam oluşturur?**
 - A) Hidrofilik
 - B) Hipertonik
 - C) Hipotonik
 - D) İzotonik
 - E) Ozmofilik
7. **Dilüsyon serileri hazırlama işlemi ile ilgili aşağıda verilen ifadelerden hangisi yanlıştır?**
 - A) Dilüsyon hazırlandıktan sonra 15 dk. içinde ekim işlemleri bitirilmiş olmalıdır.
 - B) Pipet ile çekim esnasında, aktarılacak numune birkaç defa çekip bırakılarak pipetin iç yüzeyinin numune ile çalkalanması sağlanmalıdır.
 - C) Aktarılacak numunenin, her aktarma öncesi vorteks cihazı ya da el ile yeterli homojenizasyonu sağlanmalıdır.
 - D) Dilüsyon hazırlama işlemleri aseptik ortam koşullarında yapılmalıdır.
 - E) Dilüsyonlar arası aktarma işlemlerinde aynı pipet kullanılmalıdır.
8. Katı numuneden 10,0 g tartılarak mikrobiyolojik analiz yapılacaktır. **Yapısından ötürü tam olarak 10,0 g tartım yapılması zor olan bu numunede, aşağıdaki seçeneklerde verilen hangi hatalı tartım sonucu (g) kabul edilebilir sınırlar içindedir?**
 - A) 8,25
 - B) 8,75
 - C) 9,75
 - D) 10,45
 - E) 12,25



9. Homojenizasyon sonrasında pipeti tıkayan küçük partiküllerin olduğu örneklerde, rahat bir pipetleme yapılabilmesi için aşağıdaki seçeneklerden hangisi uygulanmalıdır?

- A) Homojenizasyon için mutlaka blender kullanılması gerekir.
- B) Pipetlemeyi kolaylaştırmak için dilüsyon ısıtılır.
- C) Partiküllerin çökmesi için 5 dk. bekletilir ve üst kısımdan pipetleme yapılır.
- D) Büyük pipet kullanılır.
- E) Homojenizasyon cihazı yüksek devirde kullanılır.

10. Mikrobiyolojik analiz numunesi hazırlamada, homojenizasyon ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?

- A) Anaerobik mikroorganizma analizinde blender kullanılması, numunenin hava ile aşırı miktarda temas etmesi nedeniyle hatalı sonuçlara neden olur.
- B) Bıçakların dönmesi ile oluşan sıcaklık artışından hücre kayıplarının yaşanabilmesi, blender kullanımında önemli bir dezavantajdır.
- C) Yağ oranı yüksek numunelerin homojenizasyonunda kullanılan dilüsyon sıvısı 30-32 °C civarında olmalıdır.
- D) Kuru numunelerin homojenizasyonunda, dilüsyon sıvısı ile numune kademeli olarak karıştırılır.
- E) Bünyesinde keskin kenarlı kemik parçacıkları olan et numunesinin homojenizasyonu stomacher cihazı ile yapılır.

C) Aşağıdaki soruları cevaplayınız.

11. Un numunesinden mikrobiyolojik analiz amacıyla 1/20 oranlı ilk dilüsyon hazırlanmıştır. Özel bir çalışma için bu ilk dilüsyondan 5 mL alınarak içinde 195 mL steril dilüsyon sıvısı bulunan erlene aktarılmış ve yeni bir dilüsyon daha hazırlanmıştır.

Hazırlanan bu yeni dilüsyonun dilüsyon oranı ve dilüsyon faktörünü hesaplayınız.

12. Et numunesinden 10 g tartılıp 90 mL MRD içerisinde çözündürülerek dilüsyon (1/10) hazırlanmak istenmektedir. Tartım işlemi sırasında 10,0 g et yerine, hatayla 11,0 g alınmıştır. Bu durumda istenilen oranda dilüsyon hazırlamak için kaç mL daha MRD dilüsyon sıvısına ihtiyaç olduğunu hesaplayınız.

5.

ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROBİYOLOJİK KÜLTÜR

TEMEL KAVRAMLAR

Ekim
Pasaj
Kültür
Kültivasyon
İnkübasyon
Makroskopik İnceleme
Saf Kültür

KONULAR

- 5.1. EKİM İŞLEMİ (İNOKÜLASYON)
- 5.2. İNKÜBASYON
- 5.3. İNKÜBASYON SONU DEĞERLENDİRME
- 5.4. SAF KÜLTÜR ELDE ETME VE KÜLTÜRLERİN MUHAFAZASI

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Çalışma amacına ve aseptik tekniğe uygun besiyerine ekim yapmayı,
- Çalışma amacına uygun olarak belirlenen sıcaklık ve sürede tekniğine uygun inkübasyon yapmayı,
- Makroskopik inceleme tekniğine uygun inkübasyon sonucunu gözlemlemeyi,
- Aseptik tekniğe uygun saf kültür üretip onu muhafaza etmeyi öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Yoğurt üretimi, yoğurt bakterilerinin süt içerisinde üreyip gelişmeleri ile meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişimler sonucunda gerçekleşmektedir. Evde yoğurt yapımı sonucunda her zaman aynı kıvam ve tat elde edilememesinin nedenleri neler olabilir?
2. Sağlık kuruluşlarında, eküvyon çubuğu ile ağız veya burundan numune alınma deneyimi yaşadıysanız sınıf ortamında deneyimlerinizi paylaşınız.
3. Evde ekmek yapımı için geleneksel olarak ekşi mayanın nasıl üretildiği ve maya kültürünün nasıl muhafaza edildiği ile ilgili deneyim ve gözlemlerinizi varsa paylaşınız.



5.1. EKİM İŞLEMİ (İNOKÜLASYON)

Mikrobiyolojik açıdan incelenecek numune ya da dilüsyonundan belirli bir miktarın, uygun teknikler kullanılarak steril bir besiyerine aktarılması işlemi **ekim** olarak adlandırılır. İçerisinde ya da üzerinde mikroorganizma üremiş besiyerlerine ise **kültür** denilmektedir. Mikroorganizmaların kültür ortamından alınarak çoğaltma, taze kültür elde etme, tanımlama amaçlarıyla başka bir besiyerine aktarılması işlemi **pasaj yapma** ya da **pasajlama** olarak ifade edilir. Ekim ya da pasaj sonrasında katı besiyerine aktarılan her bir canlı mikroorganizma hücresi, besiyerinin üreme koşullarına uygun olması durumunda gelişerek koloni oluştururlar. Mikroorganizma türlerinin oluşturdukları koloniler, kendine özgü yapıdadırlar. Numune alımından kültür elde edilmesine kadar izlenen ve **kültivasyon** olarak isimlendirilen süreç, Görsel 5.1’de aşamalı olarak gösterilmiştir.



Görsel 5.1: Kültür yapma (kültivasyon) aşamaları

Kültürler; elde edildiği besiyerinin fiziksel yapısı, hazırlanış şekli ya da uygulanan ekim yöntemine göre isimlendirilmektedir. Üretildiği besiyerinin fiziksel özelliğine göre **sıvı kültür**, **katı kültür**, **yarı katı kültür**; kullanılan kap bakımından **plak kültür** (petri kutusunda); **yatık kültür** (deney tüpünde yatık olarak); uygulama yöntemine göre **saplama kültür** (iğne özeyi besiyerine saplayarak) gibi isimler kullanılmaktadır.

Uygulanacak ekim yöntemi; analizin amacına, besiyeri ve numunenin fiziksel özelliğine göre belirlenmektedir. Farklı yöntemler olmakla birlikte en sık uygulama alanı bulunan ekim yöntemleri şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

1. Tüpteki Sıvı Besiyerine Ekim Yöntemleri
2. Petri Kutusundaki Katı Besiyerine Ekim Yöntemleri
 - Dökme Plak Yöntemi
 - Yayma Plak Yöntemi
 - Sürme Yöntemi
3. Tüpteki Katı Besiyerine Ekim Yöntemleri
4. Yüzeyden Alınan Numunelerde Uygulanan Ekim Yöntemleri

5.1.1. Tüpteki Sıvı Besiyerine Ekim Yöntemleri

Tüpteki sıvı besiyerine ekim işlemi katı numune ya da sıvı numuneden yapılabilir. Sıvı numuneden ekim yapıldığında analizin amacına göre halka öze ya da pipet kullanılır. Katı numuneden tüpteki sıvı besiyerine ekim işlemi ise iğne öze kullanılarak yapılır. Bazı durumlarda her iki numune türünde eküvyonla da ekim yapılmaktadır.

22. UYGULAMA

TÜPTEKİ SIVI BESİYERİNE EKİM

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak tüpteki sıvı besiyerine ekim çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

İçinde onar mL steril "Nutrient broth" veya "Peptonlu su" besiyeri bulunan deney tüpleri, halka öze (loop), iğne öze, otomatik pipet ve pipet uçları, bunzen beki, vorteks, sıvı numune, katı numune (hayvan dışkısı).

Sıvı Numuneden Tüpteki Sıvı Besiyerine Ekim

İşlem Basamakları

1. Kullanacağınız araç gereç ve aseptik çalışma ortamını hazırlayınız.
2. Numuneyi homojenize ediniz.
 - Numune kaptaysa çalkalanmalı, tüpte ise vorteks cihazı kullanılarak homojen hâle gelmesi sağlanmalıdır. Cihazın olmaması durumunda Görsel 5.2'de gösterilen yöntemlerden birisi uygulanmalıdır.
3. Ekim için kullanılacak halka özeyi tekniğine uygun sterilize ediniz.
4. Bir öze dolusu numune (Görsel 5.3) alarak sıvı besiyerine ekim yapınız.
5. Besiyeri tüpünün ağız kısmını alevden geçirip özeyi sterilize ettikten sonra öze ve besiyeri tüpünü spora yerleştiriniz.
6. Pipetle ekim uygulaması yapmak için, numuneden pipetle 1 mL alıp tekniğine uygun olarak başka bir besiyeri tüpüne aktarınız.
 - Ekim için otomatik pipet ve steril pipet uçları kullanımı tercih edilmelidir. Steril cam pipet kullanılacaksa pipet birkaç kez hızlıca alevden geçirilir.



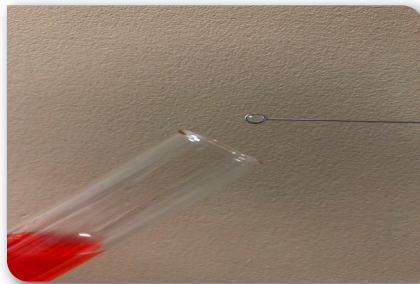
a) El ayası ile vurma



b) İki el arasında yuvarlama



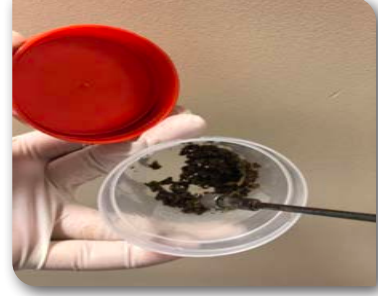
c) Parmakla vurma

Görsel 5.2: Tüpteki sıvı numunenin el ile homojenizasyon yöntemleri**Görsel 5.3:** Bir öze dolusu numune

Katı Numuneden Tüpteki Sıvı Besiyerine Ekim

İşlem Basamakları

1. Numune kabını sol elinize, ekim için kullanılacak iğne özeyi sağ elinize alarak özeyi tekniğine uygun sterilize ediniz.
2. Numune kabını eğik ve ağzı aleve yakın olarak tutup özeyi numunenin çeşitli alanlarına sürerek yeterli miktarda numune alınız (Görsel 5.4).
3. Özeyi besiyeri tüpünde sıvı seviyesinin hemen üstündeki kuru bölgeye değdirip sürme hareketleri yaparak numunenin bu bölgede yayılmasını sağlayınız (Görsel 5.5).
4. Öze ucunu besiyerine daldırıp karıştırınız (Görsel 5.6).
5. Öze ucunu, numuneyi yaydığınız bölgeye temas ettirip bu bölgede sürme hareketleri yaptırarak numunenin besiyerine doğru yikanmasını sağlayınız.
6. Ekim yapılmış tüpün ağız kısmını alelden geçirdikten sonra tıkaçını kapatıp tüpü spora yerleştiriniz.
7. Özeyi tekniğine uygun sterilize edip sapı alta gelecek şekilde spora yerleştiriniz (Görsel 5.7).



Görsel 5.4: İğne öze ile katı numune alımı



Görsel 5.5: Numunenin yayılması



Görsel 5.6: Özeyi karıştırma



Görsel 5.7: Özenin spora yerleştirilmesi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Numuneyi homojenize etti.				
2	Halka öze ile tekniğine uygun şekilde ekim yaptı.				
3	Pipet ile tekniğine uygun şekilde ekim yaptı.				
4	İğne öze ile tekniğine uygun şekilde ekim yaptı.				
5	Aseptik teknik ve güvenlik kurallarına uygun hareket etti.				
TOPLAM PUAN					

5.1.2. Petri Kutusundaki Katı Besiyerine Ekim Yöntemleri

Petri kutusundaki katı besiyerine yaygın olarak kullanılan ekim yöntemleri; dökme plak, yayma plak ve sürme yöntemleridir.

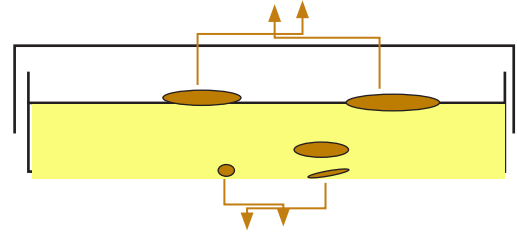
5.1.2.1. Dökme Plak Yöntemi

İncelenen numune veya dilüsyonundan alınan 1 mL örneğin boş steril petri kutusuna aktarılması ve üzerine 40-45 °C sıcaklıktaki besiyerinden 12-15 mL ilave edilerek karıştırılması suretiyle gerçekleştirilen ekim yöntemidir (Görsel 5.9). Bu yöntemle çoğunlukla numunedeki mikroorganizmaların kültürel sayımını gerçekleştirmek amacıyla başvurulur. Özellikle hedef mikroorganizma sayısı, sağlıklı bir sayım sonucu alınamayacak kadar düşük olan numunelerde, petri kutusuna pipetlenen numune miktarının diğer yöntemlere göre fazla olması; ekim yöntemi olarak tercih edilmesinde önemli bir etkindir. Dökme plak yönteminde numune, besiyeri iç ve yüzey kısımlarına homojen olarak dağıldığından mikroorganizmalar oksijen ihtiyaçlarına göre farklı morfolojilerde gelişebilmekte ya da dip kısımda kalanlar hiç gelişmemektedir. Bu nedenle zorunlu aerob ve küfler için uygun bir yöntem değildir. Görsel 5.8'de zorunlu aerobik bir mikroorganizma türünün, oksijenin fazla olduğu yüzey kısmında ve oksijenin az olduğu taban kısmında oluşturduğu koloniler şematize edilmiştir. Bu kolonilerde büyüklük farkı olabileceği gibi, taban kısmında oksijen yetersizliğinden amorf (şekilsiz, biçimsiz) koloni yapısı da gözlenebilmektedir.

Bunları Biliyor musunuz?

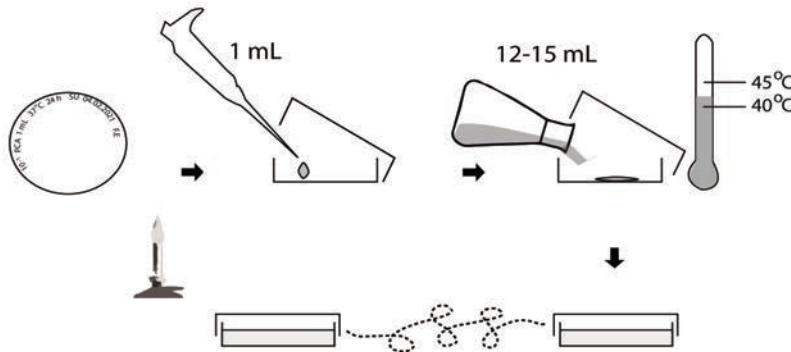
Besiyerinin petri kutularına döküm sıcaklığı çok önemlidir. Mutlaka 40-45 °C aralığında olmalıdır. Yüksek olması durumunda sıcaklıktan zarar gören hücreler olur. Düşük olması durumunda besiyeri jelleşmeye başlayacağı için ya dökülemez ya da dökülse bile numune ile yeterli homojenizasyon sağlanamaz. Bu nedenlerle besiyerinin su banyosundan alındığı gibi hızlı bir şekilde döküm işlemlerinin tamamlanması gerekir. Bu durum, dökme plak yöntemi için büyük bir dezavantajdır.

Oksijenle teması yüksek olan zorunlu aerobik mikroorganizma kolonileri



Oksijenle teması düşük olan zorunlu aerobik mikroorganizma kolonileri

Görsel 5.8: Yüzey ve tabandaki aerobik mikroorganizmaların oluşturduğu temsili koloniler

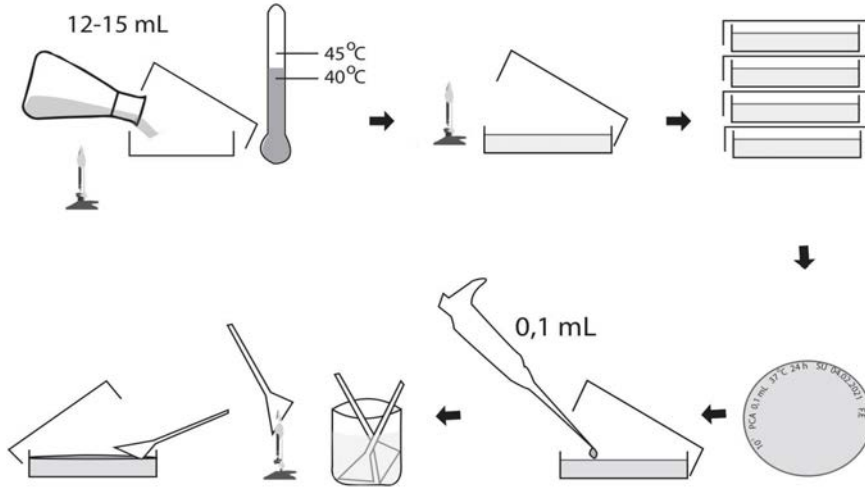


Görsel 5.9: Dökme plak yöntemi ile ekim

5.1.2.2. Yayma Plak Yöntemi

Petri kutusuna önceden dökülmüş, katılaştırma ve yüzey kurutma işlemleri yapılmış agarlı besiyeri üzerine, numune ya da dilüsyonundan 0,1 mL aktarılıp drigalski spatülü ile yayılarak gerçekleştirilen ekim yöntemidir (Görsel 5.10). Kültürel sayım amacıyla en çok tercih edilen yöntemdir. Mikroorganizmalar besiyerinin sadece yüzey kısmında olduğundan dökme plak yönteminde karşılaşılan zorunlu aeroblardaki gelişim bozuklukları bu uygulamada olmaz. Ancak, zorunlu aereoblar yüzeyde hızla gelişip oluşturdukları büyük kolonilerle komşu kolonilerin üzerini kaplayabilmektedir. Mikroorganizmalar herhangi bir sıcaklığa maruz kalmadıklarından dökme yöntemindeki gibi ısıya bağlı hücre kayıpları, bu yöntemde olmayacaktır. Pipetlenen numune miktarının 0,1 mL olması nedeniyle dökme plak yöntemine göre 10 kat daha az duyarlı olması, yayma plak yönteminin en önemli dezavantajıdır. Bu durum, mikrobiyal yükün az olduğu numunelerde sayım hatalarına sebep olabilmektedir. Böyle numunelerde yayma plak yöntemi tercih edildiğinde, 1 mL numune üç ayrı petri kutusuna yaklaşık hacimlerde dağıtılarak ya da büyük bir petri kutusu (14 cm çaplı) kullanılarak ekim yapılır.

Yayma plak yöntemi bazı uygulamalarda halka öze veya eküvyonla yayma şeklinde de yapılabilmektedir. Tıbbi mikrobiyolojide idrar örneği incelemesi ve antibiyogram testi amacıyla yapılan ekim uygulamalarında, öze veya eküvyonla alınan numune yine bu aletlerle tüm besiyerine sürülüp yaydırılmaktadır.

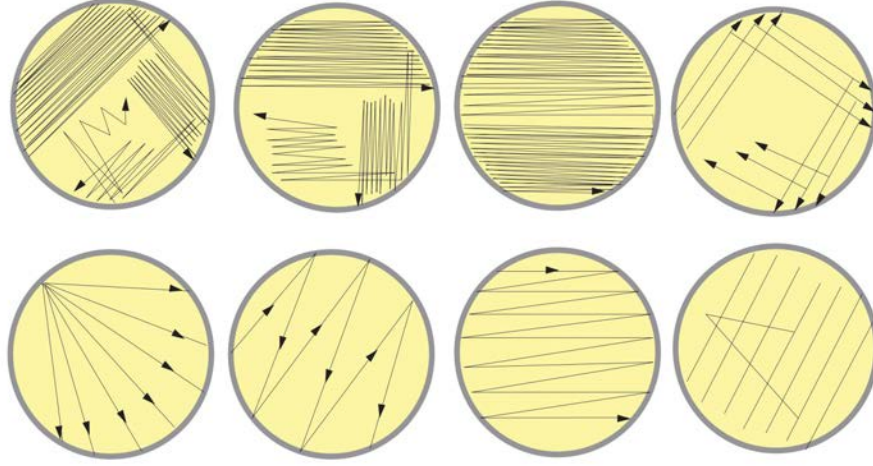


Görsel 5.10: Yayma plak yöntemi ile ekim

5.1.2.3. Sürme Yöntemi

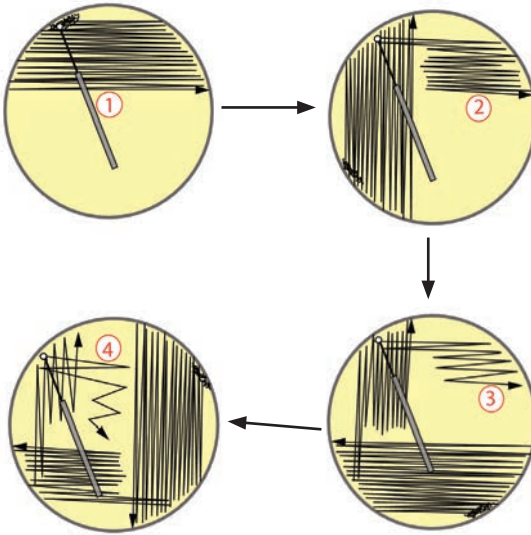
Sürme yöntemi “**Tek koloni düşürme tekniği**” olarak da isimlendirilmektedir. Bu yöntemde amaç sayım yapmak değil, tanımlamak veya saf kültür üretmek için mikroorganizmaları izole etmektir. Besiyerinde üreyen her bir mikroorganizma kendisinden türeyen koloniler meydana getirir. Koloniler iç içe ya da birbiri ile temas halinde olduklarında koloninin tek bir hücre tarafından oluşturulduğu söylenemez. Petri kutusunun bir bölümünde birbiri ile temas etmeden ayrı oluşan koloniler, büyük bir olasılıkla tek bir hücreden türemişlerdir. Bu nedenle sürme yönteminde, mikroorganizma kolonilerinin besiyerine tek koloni halinde düşürülerek izole edilmesi amaçlanmaktadır.

Sürme yöntemi; tercihe ve numuneye bağı olarak halka özenin farklı şekillerde besiyerine sürülmesi suretiyle yapılabilir. Petri kutusundaki agarlı besiyeri yüzeyine öze ile farklı şekillerde sürülen ekim uygulamaları Görsel 5.11’de resmedilmiş olup en çok tercih edilen, sol üst köşedeki sürme şeklidir.

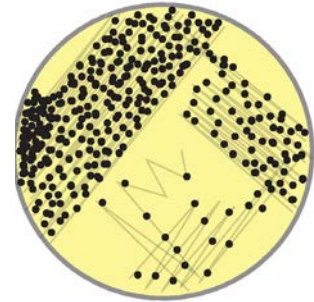


Görsel 5.11: Petri kutusuna farklı sürme şekilleri

Bu sürme şekli, içinde katılaştırılıp yüzey kurutma işlemi yapılmış agarlı besiyeri bulunan petri kutusuna, Görsel 5.12’de gösterildiği gibi dört aşamada sürme işlemi yapılarak uygulanır. Öze ile petri kutusunun köşesine numune alınıp birinci sürme işlemi yapıldıktan sonra, petri kutusu döndürülerek sırasıyla diğer alanlarda da sürme işlemi yapılır. İlk sürme yapılan alandaki çizgiler üzerinde inkübasyon sonunda yoğun üremeler meydana gelirken diğer çizgi alanlarında kademeli olarak koloniler azalır. En son sürülen dördüncü sürme alanına koloniler çok az sayıda ve tek tek düşerler, yani izole olurlar (Görsel 5.13).

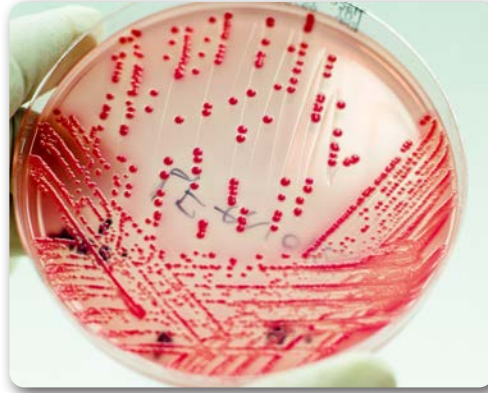


Görsel 5.12: Petri kutusuna dört aşamada sürme işlemi



Görsel 5.13: Petri kutusunda kolonilerin tek tek düşmesi

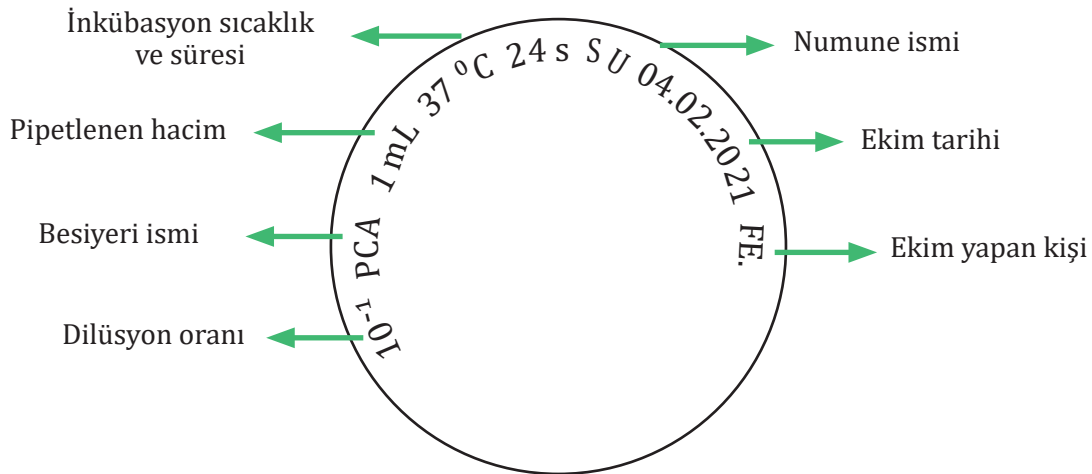
Birinci sürme işlemi yapıldıktan sonra öze sterilize edilir. Üçüncü ve dördüncü ekim bölgelerine geçişlerde, özenin sterilize edilmesine, numunedeki mikrobiyal yüke göre karar verilir. Mikrobiyal yük kabaca tahmin edilerek az olması durumunda bu bölgelere geçişlerde öze sterilize edilmez. Yine bir sürme alanından diğerine geçişlerde kaç çizgi ile temas edilerek geçiş yapılacağına, beklenen mikrobiyal yüke göre karar verilir. Fazla bulanık sıvı kültür veya yoğun üreme olmuş yatık bir kültürden aktarma yapılıyorsa geçişler arasında bir veya iki çizgi yeterli olurken aksi durumda üç veya dört sürme çizgisi ile geçiş yapılır (Görsel 5.14).



Görsel 5.14 : Tek koloni düşürme tekniği ile elde edilmiş plak kültür

5.1.2.4. Petri Kutusuna Ekim Bilgilerinin Yazılması

Ekim öncesinde petri kutularının tabanına, Görsel 5.15'te gösterildiği gibi gerekli bilgilerin asetat kalem ile yazılması gerekir. Bu bilgiler; numunenin adı, varsa kodu, ekim tarihi ve gerekirse saati, dilüsyon oranı, besiyeri adı, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, pipetlenen hacim miktarı, uygulamayı yapan kişinin adıdır. Petri kutusundaki yazılar inkübasyon sonrası incelemeye engel olmayacak şekilde petrinin kenar kısımlarına, ince uçlu kalem kullanılarak yazılmalıdır. Bilgiler, kapakların karışma olasılığı düşünülerek tabana yazılmalıdır.



Görsel 5.15 : Petri kutusu tabanına ekim bilgilerinin yazılması

23. UYGULAMA

DÖKME PLAK YÖNTEMİ İLE EKİM

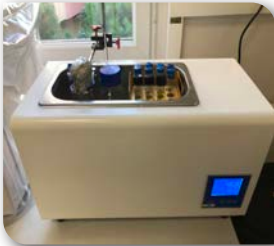
Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak dökme plak yöntemi ile ekim çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

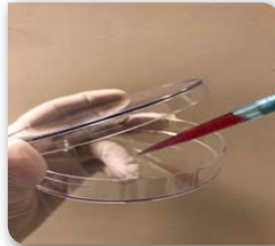
Bunzen beki, steril petri kutuları, 1 mL'lik steril pipet (varsa otomatik pipet ve steril pipet uçları), su banyosu, sterilize edilerek hazırlanmış PCA besiyeri, asetat kalemi.

İşlem Basamakları

1. Talimatına uygun bir şekilde yeterli miktarda PCA besiyeri hazırlayıp otoklavdan çıkardıktan hemen sonra 44-48 °C'ye ayarladığınız su banyosuna yerleştirerek besiyerinin bu sıcaklığa gelmesini sağlayınız (Görsel 5.16).
 - Sterilize edildikten sonra katılaşmış besiyeri kullanıldığında, bu besiyerinin öncelikle 90 °C'ye ayarlanmış başka bir su banyosunda eritilmesi gerekir. Her eritme işleminde agarın jelleşme özelliğinin bir miktar bozulduğu, sıcaklığın etkisi ile besin ve selektivite kayıplarının olduğu unutulmamalıdır.
 - Besiyerini 12-15 mL olacak şekilde petri kutularına dağıtılmış olarak hazırlamak daha pratik ve güvenilir olacaktır.
2. Ekim öncesi diğer işlem ve hazırlıkları (aseptik ortam oluşturma, numune homojenizasyonu dilüsyon hazırlama) yapınız.
3. Ekim yapacağınız petri kutusunun taban kısmına asetat kalemi ile gerekli bilgileri yazınız.
4. Alev çatısı altında, numune ya da dilüsyonundan pipet ile 1 mL çekerek ağız kısmını aleve doğru açtığınız petri kutusunun ortasına bırakınız (Görsel 5.17).
5. Besiyerini su banyosundan alarak petri kutusundaki numunenin üzerine zaman kaybetmeksizin ve pipet kullanmadan 12-15 mL kadar yavaşça dökünüz (Görsel 5.18).
6. Petri kutusunun kapağını kapatıp numune ile besiyerinin homojen dağılmasını sağlayınız.
 - Düz zemin üzerinde, petri kutusunun kapağına parmaklarla hafifçe bastırılarak üç defa 8 hareketi yaptırılır (Görsel 5.19).
7. Besiyerinin katılaşması için petri kutusunu hareket ettirmeden bir süre bekletiniz.



Görsel 5.16 : Su banyosu



Görsel 5.17 : Petriye aktarım



Görsel 5.18 : Besiyeri ilavesi



Görsel 5.19 : 888 çizme

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Petri kutusuna ekim bilgilerini yazdı.				
2	Petri kutusuna numune aktardı.				
3	Petri kutusuna uygun sıcaklıkta besiyeri döktü.				
4	Petri kutusu içeriğini homojenize etti.				
5	Aseptik tekniğe uygun çalıştı.				
TOPLAM PUAN					

24. UYGULAMA

YAYMA PLAK YÖNTEMİ İLE EKİM

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak yayma plak yöntemi ile ekim çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

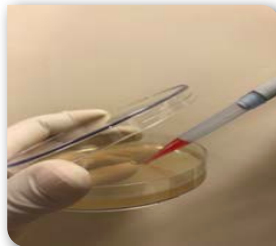
Bunzen beki, 0,1 mL hacim aktarmaya uygun steril pipet (varsa 100 µL'ye ayarlanabilen otomatik pipet ve steril pipet uçları), drigalski spatülü, sterilize edilerek hazırlanmış PCA besiyeri, asetat kalemi, %96'lık etil alkol.

İşlem Basamakları

1. Aseptik çalışma ortamı hazırlayınız.
2. Ekim yapılacak plakları tekniğine uygun olarak hazırlayınız (Görsel 5.20).
3. Kullanacağınız drigalski spatüllerini, içinde %96'lık etil alkol bulunan behere yerleştiriniz.
4. Ekim öncesi diğer işlem ve hazırlıkları (numunenin homojenizasyonu ve dilüsyon hazırlama) yapınız.
5. Ekim yapacağınız petri kutusunun taban kısmına asetat kalemi ile gerekli bilgileri yazınız.
6. Alev çatısı altında, numune ya da dilüsyonundan pipet ile 0,1 mL çekerek ağız kısmını aleve doğru açtığınız petri kutusunun içinde seçtiğiniz bir noktaya bırakınız (Görsel 5.21).
7. Drigalski spatülünü alkolden çıkartıp ucunu aleve değdirerek alkol kalıntılarının yanmasını sağlayınız (Görsel 5.22).
- **Alev, bunzen bek alev çatısı altında kendiliğinden sönünceye kadar bekletilir.**
8. Petri kutusunun kapağını aleve doğru açtıktan sonra drigalski spatülünü besiyerinin numune olmayan kısmına bir süre temas ettirip soğumasını sağlayınız.
9. Numuneyi drigalski spatülü ile tüm besiyeri üzerine usulüne uygun biçimde yayınız (Görsel 5.23).
- **Yayma işlemi için; petri kutusu sol elin parmakları ile döndürülürken sağ eldeki drigalski spatülü ile yarıçap dâhilinde sürme hareketi yapılır. Bu hareketler, spatülün başlangıçtaki sürme noktasına gelinceye kadar sürdürülür.**
10. Numunenin besiyeri tarafından emilmesini sağlamak için petri kutusunu ters çevirmeden 15 dk. bekletiniz.



Görsel: 5.20
Plak hazırlama



Görsel: 5.21
Petriye aktarım



Görsel: 5.22
Alkolü yakma



Görsel: 5.23
Yayma işlemi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ

		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Ekim yapılacak plakları hazırladı.				
2	Petri kutusuna numune aktardı.				
3	Drigalski spatülünün sterilizasyon işlemlerini yaptı.				
4	Drigalski spatülü ile yayma işlemi yaptı.				
5	Aseptik tekniğe uygun çalıştı.				
TOPLAM PUAN					

25. UYGULAMA

SÜRME YÖNTEMİ İLE EKİM

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak sürme yöntemi ile ekim çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, halka öze, sterilize edilerek hazırlanmış PCA besiyeri, asetat kalemi, ekim/pasaj yapılacak numune (sıvı numune/kültür numunesi).

ÖN ÇALIŞMA

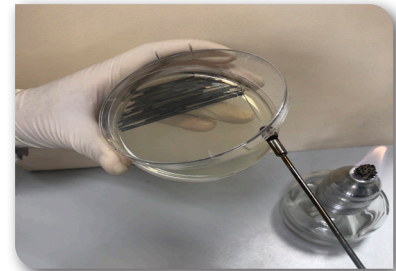
Besiyerli petri kutusunda uygulamayı gerçekleştirmeden önce; dört aşamalı sürme tekniğini, boş petri kutusunun tabanına, asetat kalemi ile sırasına uygun şekilde çiziniz. Petri kutusunu sol elinize alıp kapağını tekniğine uygun şekilde araladıktan sonra: Öze ile çizgilerin üzerinden geçerek yaptığınız tekrarlarla el becerinizi artırınız.

İşlem Basamakları

1. Aseptik çalışma ortamı hazırlayınız.
2. Ekim yapılacak plakları tekniğine uygun olarak hazırlayınız.
3. Ekim yapacağınız petri kutusunun taban kısmına asetat kalemi ile gerekli bilgileri yazınız.
4. Sıvı numuneden ekim yapacaksanız numune tüpünü vorteks cihazı ya da elde homojenize edip sol elinize alınız.
5. Özeyi sterilize ettikten sonra sağ elde kalem gibi tutarak numune tüpünün tıkaçını tekniğine uygun şekilde açınız.
 - Numune almadan önce öze, bek alevi seviyesinin altında bekletilerek ve sonrasında numune kabının iç kısmına temas ettirilerek soğutulmalıdır.
6. Numune tüpünün ağzını alevden geçirip bir öze dolusu numune aldıktan sonra aynı şekilde tekrar spora bırakınız.
 - Katı numune alınıyorsa öze ile numunenin yeterince teması sağlanmalıdır.
 - Katı kültürden koloni alınıyorsa kolonin üst kısmına öze değdirilerek yeterli miktarda alınması sağlanır.
7. Ekim yapılacak petri kutusunu, sol elin baş ve işaret parmağı serbest kalacak şekilde, avuç içinde kavrayarak tutunuz.
8. Petri kutusu üzerinde ekim yapacağınız alanları tasarlayınız.
9. Petri kutusunun kapağını, sol elinizin baş ve işaret parmaklarını kullanarak özenin rahatlıkla girebileceği seviyede açınız.
 - Görsel 5.24'te gösterildiği gibi steril kabin içerisinde çalışıldığında, kapak tamamıyla açılarak da sürme işlemi yapılabilir.
10. Özeyi, birinci ekim alanının üst kısmına ters düz ederek sürünüz. Sonra sağa sola sık aralıklı paralel zikzaklar çizerek birinci sürme işlemi tamamlayınız (Görsel 5.25).



Görsel 5.24 : Steril kabin içinde sürme uygulaması



Görsel 5.25 : Birinci alanda sürme işlemi

- Sürme işlemi yapılırken öze kesintisiz bir şekilde besiyeri ile temas ettirilir.
- Petri kutusunu kapatıp özeyi sterilize ettikten sonra soğumasını sağlayınız.
 - Tek kullanımlık öze kullanılıyorsa yeni bir steril öze açılır.
 - Özenin sterilize edilmesi diğer alanlara geçen hücre sayısını azaltır.
 - Petri kutusunu eksenine etrafında döndürerek ilk sürme alanını sol tarafınıza alınız.
 - Petri kutusunun kapağını yukarıda tarif edildiği gibi açarak özeyi ilk sürme alanının üst kısmına getiriniz.
 - Özeye sağa doğru hareket ettirip besiyeri yüzeyine paralel zikzaklar çizmek suretiyle ikinci sürme alanını oluşturunuz (Görsel 5.26.a).
 - Mikrobiyal yükün fazla olduğu kültür numunesi kullanıldığında, öze birinci alandaki çizgilerle bir ya da en fazla iki kez temas ettirilir. Bu sayede diğer alanlara geçen mikroorganizma sayı sının fazla olması önlenir.
 - Petri kutusunu kapatıp ikinci sürme alanını solunuza aldıktan sonra tekrar kapağını aralayınız.
 - İkinci sürme alanında kullandığınız özeyi sterilize etmeden bu sürme alanına bir ya da iki defa temas ettirerek sağa doğru paralel zikzaklarla üçüncü sürme alanını oluşturunuz.
 - Zikzaklar arasındaki mesafe sıklığı biraz daha açılır (Görsel 5.26.b).
 - Petri kutusunu kapatıp üçüncü sürme alanını solunuza aldıktan sonra tekrar kapağını aralayınız.
 - Üçüncü sürme alanında kullandığınız özeyi sterilize etmeden, bu sürme alanına bir defa temas ettirerek sağa doğru geniş aralıklarla birkaç tane zikzak çizip dördüncü sürme alanınızı tamamlayınız (Görsel 5.26.c).
 - Özeye tekniğine uygun biçimde sterilize edip sürme yöntemi ile ekim işlemini tamamlayınız (Görsel 5.27).



a) İkinci sürme alanı



b) Üçüncü sürme alanı



c) Dördüncü sürme alanı



Görsel 5.27: Ekim sonu temsili petri kutusu

Görsel 5.26 : Sürme alanları

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Ekim yapılacak plakları hazırladı.				
2	Petri kutusu ve öze tutuş tekniklerini uyguladı.				
3	Numuneyi petri kutusuna aktarıp ilk sürme işlemini yaptı.				
4	Diğer sürme işlemlerini yaptı.				
5	Aseptik teknik ve güvenlik kurallarına uygun hareket etti.				
TOPLAM PUAN					

26. UYGULAMA

EKÜVYON KULLANARAK YAYMA PLAK YÖNTEMİ İLE EKİM

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak eküvyon kullanarak yayma plak yöntemi ile ekim çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Aşağıda eküvyon ile ekim işlem basamakları verilmiştir. Benzer uygulama öze ile de yapılabilir. Öze ile çalışılacaksa Görsel 5.28 ve 5.29'da gösterildiği şekilde çalışılmalıdır.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, steril eküvyon, petri plakları, asetat kalemi, sıvı numune.



Görsel 5.28 : Numunenin özeyle petriye yayılması

İşlem Basamakları

1. Aseptik çalışma ortamı hazırlayınız.
2. Ekim yapılacak petri plaklarını temin ediniz.
3. Ekim yapacağınız petri kutusunun taban kısmına asetat kalemi ile gerekli bilgileri yazınız.
4. Sıvı numuneyi homojenize ediniz.
5. Steril eküvyonu ambalajından çıkarınız.
6. Eküvyonu, sıvı numune içine daldırıp hareket ettirerek yeterli miktarda sıvı emmesini sağlayınız.
7. Eküvyonu sıvıdan çıkarınız ve numune kabının iç çeperine temas ettirip döndürerek fazla sıvıyı uzaklaştırınız.
8. Petri plağının üst kısımdan başlayıp alta doğru sık aralıklarla zikzaklar çizerek yayma işlemi yapınız.
9. Petri kutusunu 90° döndürerek aynı işlemi tekrarlayınız (Görsel 5.30).
10. Petri kutusunu 45° döndürerek aynı işlemi tekrarlayınız ve petri kutusunu ters çevirmeden 15 dk. bekletiniz.



Görsel 5.29 : Öze ile yayma



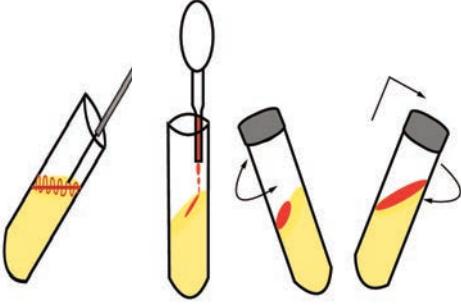
Görsel 5.30 : Eküvyon ile yayma

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Eküvyonla numune aldı.				
2	Eküvyonda bulunan fazla numuneyi uzaklaştırdı.				
3	Eküvyonla numuneyi petri plağına yaydı.				
4	Eküvyonla yayma işlemi petri kabını döndürerek iki defa daha yaptı.				
5	Aseptik teknik ve güvenlik kurallarına uygun çalıştı.				
TOPLAM PUAN					

5.1.3. Tüpteki Katı Besiyerine Ekim Yöntemleri

Tüpteki katı besiyerine ekim işlemleri amaca göre yatık ve dik besiyerine uygulanabilmektedir.

5.1.3.1. Tüpteki Yatık Besiyerine Yüzey Ekimi

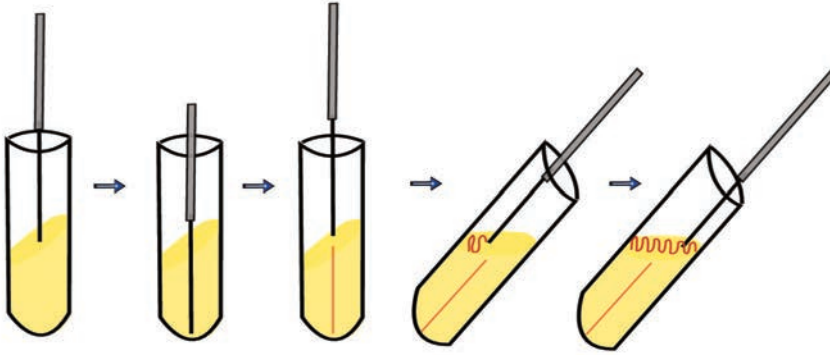


Görsel 5.31 : Yatık besiyerine öze ve pipet ile yüzey ekimi

Tanımlama, kültür koleksiyonu gibi amaçlarla uygulanan bu ekim yönteminde, tüp içerisinde sterilize edilmiş agarlı besiyeri, henüz sıcakken (55°C civarı) eğik bir şekilde sabit tutularak katılaştırılır. Bu sayede, tüp içerisinde daha fazla mikroorganizmanın gelişebileceği eğik, geniş bir besiyeri yüzeyi elde edilir. Görsel 5.31’de gösterildiği gibi kültürden pasaj yapmak amacıyla iğne öze ya da pastör pipeti kullanılarak yapılan bir ekim uygulamasıdır. Öze ile sürme işlemi, yüzeye bir çizgi çekildikten sonra besiyeri yüzeyinin alt ucundan yukarıya doğru “S” hareketi yapılmak suretiyle gerçekleştirilir.

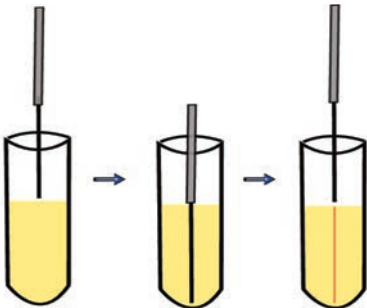
5.1.3.2. Tüpteki Yatık Besiyerine Özeye Saplama ve Yüzey Ekimi

Bu yöntemde iğne öze Görsel 5.32’de gösterildiği gibi, önce yatık agarlı besiyerine dik olarak saplanır. Ardından, besiyeri yüzeyinin alt ucundan yukarıya doğru “S” hareketi yapılarak sürme işlemi yapılır.



Görsel 5.32 : Yatık besiyerine saplama ve yüzey ekimi

5.1.3.3. Tüpteki Yumuşak Agarlı Dik Besiyerine Saplama Yöntemi ile Ekim



Görsel 5.33 : Yumuşak agarlı dik besiyerine saplama yöntemi ile ekim

Bu ekim yönteminde, tüp içerisinde oluşturulan steril yarı katı besiyerine iğne öze ile pasaj yapılır. İncelenen bakterilerin, hareketli ve gaz oluşturma özelliğinde olup olmadıklarının kontrol edilmesi amacıyla uygulanır. Görsel 5.33’te uygulaması gösterilmiştir.

27. UYGULAMA

TÜPTEKİ KATI BESİYERİNE EKİM

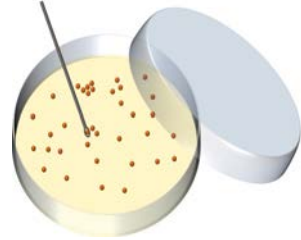
Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak tüpteki katı besiyerine ekim çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, iğne öze, pastör pipeti, deney tüplerinde hazırlanmış yatık PCA besiyeri (Standart deney tüplerinde yaklaşık 7 mL besiyeri yeterlidir.), saplama yöntemi ekimi için tüplerde hazırlanmış yumuşak agarlı SIM medium besiyeri, asetat kalemi, plak kültür numunesi.

İşlem Basamakları

1. Aseptik çalışma ortamı hazırlayınız.
2. Ekim yapacağınız yatık ve yumuşak agarlı dik besiyerlerini hazırlayınız.
3. Ekim yapılacak tüpler üzerine gerekli bilgileri yazınız.
4. İğne özeyi sterilize ettikten sonra koloninin üst yüzeyine değdirerek plak kültürden numune alınız (Görsel 5.34).
5. Yatık agarlı tüpü sol elinize alarak, özeyi alt kısmın ortasına temas ettirip hafifçe ezdikten sonra üste doğru bir çizgi çekiniz. Öze ile alt kısımdan başlayıp yukarıya doğru "S" çizerek ekimi tamamladıktan sonra tüpü spora yerleştiriniz (Görsel 5.35).
6. Saplama ve yüzey ekimi yapmak için; iğne özeyi sterilize ettikten sonra koloninin üst yüzeyine değdirerek plak kültürden numune alınız.
7. Sol elinize aldığınız başka bir yatık agarlı besiyerinin ortasına, özeyi bir kere batırıp besiyeri yüzeyine çıkardıktan sonra alt kısımdan yukarıya doğru "S" çizerek ekimi tamamlayınız.
8. Tüpü spora yerleştirdikten sonra özeyi sterilize ediniz.
9. Saplama ekim yapmak için iğne özeyi sterilize ettikten sonra koloninin üst yüzeyine değdirerek plak kültürden numune alınız.
10. Sol elinize yumuşak dik agarlı besiyeri tüpünü alarak özeyi besiyerine saplayınız.
 - İğne öze tek bir hamle hareketi ile besiyerinin ortasına, tüpün alt kısmına 2 cm kalacak şekilde batırılıp çıkarılır (Görsel 5.36).
11. Tüpün kapağını kapatarak spora yerleştiriniz.



Görsel 5.34 :Koloni alımı



Görsel 5.35 :Yatık besiyerine ekim



Görsel 5.36 :Saplama ekim

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Ekim yapılacak besiyeri tüplerini hazırladı.				
2	Yatık besiyerine yüzey ekimi yaptı.				
3	Yatık besiyerine saplama ve yüzey ekimi yaptı.				
4	Yumuşak agarlı dik besiyerine saplama ekimi yaptı.				
5	Aseptik teknik ve güvenlik kurallarına uygun hareket etti.				
TOPLAM PUAN					

5.1.4. Yüzeyden Alınan Numunelerde Uygulanan Ekim Yöntemleri

Yüzeylerden numune alma, uygulama alanı ve numunenin özelliğine göre farklı şekillerde yapılabilmeyle birlikte, en yaygın olanı eküvyon (swap) ile yapılandır. Diğer yüzeylerden numune alma uygulamaları; yüzey yıkama veya dilüsyon sıvısına daldırma tekniği, yüzey kazıma ve yüzeyden ince kesitler alma tekniği, dip slide tekniği, agar sucuğu tekniği, selobant tekniğidir. Bu kitapta, geniş kullanım alanı olan yüzeyden eküvyonla alınan numuneden ekim uygulaması anlatılacaktır.

Eküvyonla Yüzeylerden Alınan Numunelerden Ekim Yapma

Eküvyonla her türlü cansız yüzeyden (Görsel 5.37) numune alınabildiği gibi, burun (Görsel 5.38), boğaz, iltihaplı yara, epitel doku gibi canlı yüzeylerden de numuneler alınıp kültürleri elde edilmektedir. Bu amaçla steril paketlerinde kullanıma hazır eküvyonlardan yararlanılır. Uygulama durumlarına göre eküvyonların, steril taşıma besiyerli olanları da vardır.

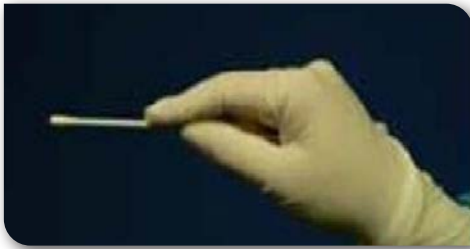


Görsel 5.37 : Eküvyonla cansız yüzeyden numune alma



Görsel 5.38 : Eküvyonla canlı yüzeyden numune alma

Steril eküvyon, paketinden çıkarıldıktan sonra yüzeye kuvvetli bir şekilde bastırılarak sürülür. Yeterli kuvvetin uygulanabilmesi için Görsel 5.39'da gösterildiği gibi tutulması daha doğru bir uygulamadır. Yanlış eküvyon uygulaması Görsel 5.40'daki gibidir. Tüm işlemlerde eküvyon, sterilitenin bozulmamasına dikkat edilerek ve sadece üst kısmından tutularak kullanılır. Sürme esnasında kendi etrafında döndürülüp değişik eğimler verdirilerek yüzeydeki mikroorganizmaların bütünüyle pamuk üzerine taşınmasına gayret edilir. Sonrasında hiçbir yere temas etmeden tüpü veya paketi içine konularak laboratuvara ulaştırılır.



Görsel 5.39: Doğru eküvyon uygulaması



Görsel 5.40: Yanlış eküvyon uygulaması

Eküvyonla alınan numuneden tek koloni düşürme ve yayma plak ekimleri yapılabilirdiği gibi, dilüsyon hazırlanarak kültürel sayım amacıyla da ekim yapılabilmektedir. Kültürel sayım amaçlandığında 10 mL hacminde sıvı alabilen tüp içerisinde kullanıma hazır eküvyonlardan yararlanılır. Laboratuvara ulaştırılan tüp içerisine aseptik koşullarda steril 10 mL dilüsyon sıvısı ilave edilerek 10^{-1} lik dilüsyonu oluşturulur. Beklenen mikrobiyal yüke göre daha ileri dilüsyonlar hazırlanarak dökme ya da yayma plak yöntemi ile ekim yapılır.

28. UYGULAMA

YÜZEYDEN EKÜVYONLA ALINAN NUMUNENİN PETRİ KUTUSUNA EKİMİ

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak yüzeyden eküvyonla alınan numunenin petri kutusuna ekimi çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

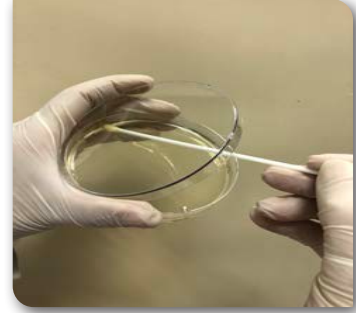
Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, steril eküvyon çubuğu, PCA besiyerli olarak hazırlanmış ekime hazır plaklar, halka öze, 10 mL sıvı alabilecek tüp ambalajlı eküvyon çubuğu, içinde 9 mL steril dilüsyon sıvısı bulunan deney tüpleri, asetat kalemi.

EKÜVYONLA ALINAN YÜZEY NUMUNESİNİN TEK KOLONİ DÜŞÜRME YÖNTEMİ İLE EKİMİ

İşlem Basamakları

1. Eküvyonu paketinden çıkartıp incelenecek yüzeyden tekniğine uygun bir şekilde sürüntü alınız.
2. Aseptik ortam oluşturunuz.
3. Eküvyonu ambalajından aseptik ortamda çıkarıp sağ elinize alınız.
4. Besiyerli petri kutusunu sol elinize alarak kapağını tekniğine uygun şekilde aralayınız.
5. Eküvyonu, besiyerinin herhangi bir köşesinde, yaklaşık 1 cm²lik bir alana sürerek numuneyi aktarınız (Görsel 5.41).
6. Eküvyonu ambalajına koyarak atık kutusuna atınız.
 - **Türüne göre uygun atık bertaraf yöntemleri uygulanıp çevreye karşı duyarlı olma bilinci ile hareket edilmelidir.**
7. Halka öze kullanarak numunenin bırakıldığı yerden başlamak suretiyle tek koloni düşürme yöntemini tekniğine göre uygulayınız.



Görsel 5.41: Eküvyonla numune aktarımı

EKÜVYONLA ALINAN YÜZEY NUMUNESİNİN KÜLTÜREL SAYIM AMACIYLA EKİMİ

İşlem Basamakları

1. Kültürel sayım yapılacak yüzeyden eküvyon ile sürüntü alınız.
2. Aseptik ortamda eküvyonu ambajından çıkartıp tüp içine 10 mL steril dilüsyon sıvısı ilave ederek 10⁻¹lik dilüsyon hazırlayınız (Görsel 5.42).
3. 10⁻³e kadar dilüsyon serisi hazırlayınız.
4. Hazırladığınız dilüsyonların her birinden tekniğine uygun olarak drigalski spatülü ile yayma plak ekimi yapınız.



Görsel 5.42: Dilüsyon sıvısı ilavesi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Eküvyonla tekniğine uygun şekilde numune aldı.				
2	Tek koloni düşürme ekimi yaptı.				
3	Eküvyon numunesinden dilüsyon hazırladı.				
4	Dilüsyondan yayma yöntemi ile ekim yaptı.				
5	Aseptik teknik ve güvenlik kurallarına uygun hareket etti.				
TOPLAM PUAN					

5.2. İNKÜBASYON

İnkübasyon, ekim yapılmış besiyerini içeren kabın, uygun sıcaklığın sağlanabildiği bir ortamda belirli bir süre tutulması işlemidir. Bu amaçla inkübatör, su banyosu gibi sıcaklığı ayarlanabilen ve ayarlanan sıcaklık derecesinden çok az sapma gösteren cihazlar kullanılmaktadır. Sterilizasyon amacıyla kullanılan etüvlerde ayarlanan sıcaklıktan sapma fazla olduğundan, bu cihazlar inkübasyon amacıyla kullanılamaz.

Her mikroorganizmanın optimum üreme ve gelişme gösterdiği bir sıcaklık derecesi ya da aralığı vardır. İnkübasyon esnasında ekimi yapılan numunedeki mikroorganizmalar, optimum sıcaklıkta tutulduğunda besiyerindeki besin maddelerini tüketerek hızla gelişmeye başlarlar. Belli bir süre sonra üreme hızı yavaşlar ve stabil bir hâl alır. Bu aşamada inkübasyona son verilerek elde edilen kültür inceleme ve değerlendirmeye alınır. İnkübasyon süreleri yapılan analize göre 24, 36, 48, 72 saat ya da daha fazla gün olabilmektedir. Bakterilerde genel olarak 18-24 saatlik kültürler genç, 48-96 saatlik olanlar ise yaşlı kültür olarak değerlendirilir. Küf kültürlerinde inkübasyon süresi 5 güne kadar sürebilmektedir.

5.2.1. İnkübatörde İnkübasyon İşlemi

Standart inkübatörlerin (Görsel 5.43) yanı sıra anaerobik (vakumlu veya karbondioksitli), soğutmalı, çalkalamalı (Görsel 5.44) gibi çeşitleri de bulunmaktadır. Bazı özel istisnalar haricinde kabul edilebilir sapma düzeyi, en fazla $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'dir. İnkübatör içerisine bir beher su konularak içerideki buhar basıncı belli bir düzeyde tutulmalı ve bu sayede uzun süreli inkübasyonlarda besiyeri yüzeylerindeki kuruma önlenmelidir. Ayrıca suyun sıcaklığı haricî bir termometre ile günde iki kere ölçölüp inkübatörün sıcaklığı kontrol edilmelidir. İnkübatörde petri kutularının yanı sıra; deney tüpleri, erlen, roux (roü) şişesi kültürleri inkübasyona bırakılabilmektedir. Petri kutuları, inkübatöre kapakları altta olacak şekilde ters konulur. Bunun sebebi, yukarıya doğru oluşan su buharının kapakta yoğunlaşıp besiyerine damlaması neticesinde oluşabilecek kontaminasyon ve koloni yayılmasını önlemektir. Küf sporlarının kapağa düşüp inceleme esnasında yayılma olasılığından ötürü küflerin inkübasyonunda petriler düz olarak yerleştirilir.



Görsel 5.43: Standart bir inkübatörün iç görünümü



Görsel 5.44: Çalkalamalı inkübatör

İnkübatörün, hava sirkülasyonunu önleyecek şekilde aşırı doldurulmasından kaçınılmalıdır. Kenar yüzeylerinde boşluk kalacak şekilde yerleşim yapılmalıdır. Petri kutularının tek sıra halinde yerleştirilmesi doğru uygulama olmasına karşın yerden tasarruf sağlamak için çoğunlukla, 2-5 adet petri kutusu üst üste konulabilmektedir.

5.2.2. Su Banyosunda İnkübasyon İşlemi

Erlen, balon gibi büyük kaplarda üretilen kültürlerin inkübasyonunda, daha stabil bir sıcaklık sağlanabildiği için su banyosu tercih edilir. Kapların inkübasyon esnasında yan yatmasının önüne geçilmelidir. Bu amaçla statif ve kısıkaçlardan yararlanılabilir (Görsel 5.45). Deney tüplerinin inkübasyonu, sporlarına yerleştirilerek su banyosunda da yapılabilir. Görsel 5.46'da gösterildiği şekilde haricî bir termometre ile sıcaklık kontrolü yapılmalıdır. Su banyolarında kullanılan su sürekli yenilenmeli, düzenli olarak temizlik ve dezenfeksiyonu sağlanmalıdır.

Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan su banyoları hassas termostatlıdır. Donmuş agarlı besiyerlerinin eritilmesi amacıyla kullanılmamalıdır. Bu besiyerlerinin eritilmesinde uygulanan uzun süreli 85-90 °C'deki sıcaklık, su banyosunun duyarlılığını yitirmesine sebep olabilmektedir. Bu amaçla duyarlılığı düşük su banyoları ya da mikrodalga fırınlar kullanılır.



Görsel 5.45: Su banyosunda haricî termometre kullanımı



Görsel 5.46: Statif ve kısıkaç kullanımı

Bunları Biliyor musunuz?

Cihazlarla çalışırken cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak çalışılmalıdır. Su banyosu çalıştırılmadan önce cihazda yeterli seviyede su bulunduğundan emin olunmalıdır. Su miktarı yeterli değilse saf su ile tamamlandıktan sonra cihaz açılıp sıcaklık ayarı yapılmalıdır. Belirli periyotlarda cihazın sıcaklık ölçümünü doğru yapıp yapmadığını kontrol edilmelidir. Kontrol için cihazda bulunan suyun sıcaklığı ölçülerek sıcaklık göstergesindeki değerle karşılaştırılır. Aradaki fark fazla ise cihazın sıcaklık algılayıcısı temizlenmeli düzelmezse değiştirilmelidir. Su banyosu özelinde anlatılan bu durum bütün cihazlar için geçerlidir. Cihazın doğru ölçüm yapıp yapmadığının kontrol edilmesi amacıyla değeri bilinen referans bir numune ile ölçüm yapılır. Ölçüm sonucu ile referans değer karşılaştırılması işlemi **kalibrasyon** olarak ifade edilmektedir.

29. UYGULAMA

İNKÜBASYON İŞLEMİ

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak inkübasyon işlemi çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulamasonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Ekim yapılmış petri kutuları ve deney tüpleri, inkübatör, su banyosu, termometre.

İşlem Basamakları

1. Su banyosunu, tüplerdeki besiyeri seviyesinin hemen üstüne gelecek miktarda su ile doldurunuz.
2. Kültürü yapılacak mikroorganizma grubuna göre inkübatör ve su banyosunun sıcaklık-süre ayarlarını yapınız (Görsel 5.47, Görsel 5.48).
- Ekim yöntemleri uygulamalarında PCA besiyeri kullanılmıştır. PCA genel amaçlı bir besiyeri olup çoğunlukla toplam bakteri sayımında kullanılır. Gıdalarda toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı için standartlara göre belirlenen inkübasyon sıcaklık ve süresi 35 ± 1 °C'de 48 saattir.
3. Bir beher içerisine su koyarak inkübatöre yerleştiriniz.
4. Petri kutularını ters şekilde, deney tüplerini ise sporla birlikte inkübatöre yerleştiriniz.
5. İnkübatörün kapağını kapatınız.
6. Günde iki defa termometre ile beher içindeki suyun sıcaklığını ölçerek inkübatör sıcaklığını takip ediniz.
7. Deney tüplerini sporu ile birlikte su banyosuna yerleştiriniz.
8. Su banyosunun sıcaklığını periyodik olarak termometre ile takip ediniz.
9. İnkübasyon süresi sonunda petri kutuları ve deney tüplerini çıkarınız.
10. İnkübatör ve su banyosunu temizleyerek dezenfekte ediniz.



Görsel 5.47: Ayarlanan (37 °C) ve anlık (37,4 °C) sıcaklık



Görsel 5.48: Modern inkübatör göstergesi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	İnkübatör sıcaklık ve süre ayarını yaptı.				
2	Petri kutularını ve deney tüplerini inkübatöre yerleştirdi.				
3	Su banyosu sıcaklık ve süre ayarını yaptı.				
4	Su banyosuna deney tüplerini yerleştirdi.				
5	Termometre ile sıcaklık kontrolü yaptı.				
TOPLAM PUAN					

5.3. İNKÜBASYON SONU DEĞERLENDİRME

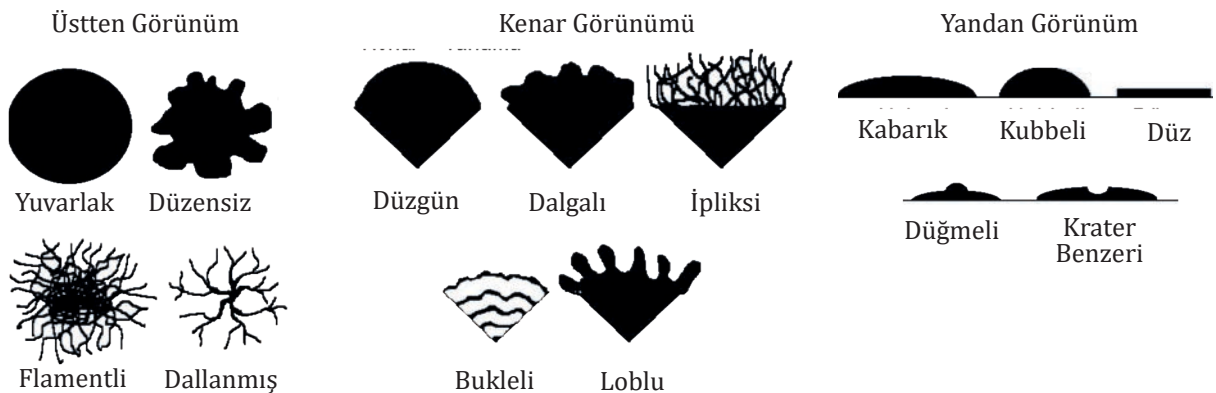
Biyolojide **morfoloji**; canlıların yapı, biçim ve fiziksel görünümünü inceleyen bir bilim dalıdır. Ekimi yapılan numunedeki mikroorganizmalar inkübasyon süresince üreyip gelişerek besiyerinde çıplak gözle görülebilir değişimler ve oluşumlar meydana getirirler. İnkübasyon sonu değerlendirme, mikroorganizmaların meydana getirdikleri bu değişim ve oluşumların gözlemlendiği makroskobik morfolojileri üzerinden yapılır. Bunun yanı sıra mikroorganizmaların enzimatik ve biyokimyasal aktiviteleri sonucunda meydana gelen renk değişimi, gaz oluşumu, hemoliz gibi olaylarla da değerlendirme yapılabilmektedir. Birçok besiyeri bileşiminde indikatör özelliğinde olan renk maddeleri bulunur. Bu gibi besiyerlerinde mikrobiyal gelişme sonrası ortaya çıkan ürünler renk değişimine sebep olmaktadır. Örneğin üre içeren besiyerinde gelişen hücreler üreaz enzimi içeriyorlarsa üreyi parçalayarak amonyak oluştururlar. Amonyak ortamın pH'ını yükseltir ve böylece besiyerinin bileşiminde bulunan Fenol kırmızısı indikatörünün rengi, kırmızıdan sarı-pembe renge döner.

5.3.1. Katı Besiyerinde İnkübasyon Sonu Koloni Morfolojilerinin İncelenmesi

Numunenin katı besiyerine ekimi sonrasında aktarılan miktardaki canlı mikroorganizmaların her biri besiyerine geçerek kendinden türeyen koloniler meydana getirirler. Her bir kolonide belli bir mikroorganizma türüne ait, milyonlar hatta milyarlarca hücre bulunur. Her mikroorganizma hücresi, koşullar değişmediği takdirde besiyerinde kendine özgü koloniler oluşturur. Aynı mikroorganizmanın farklı besiyerlerinde veya inkübasyon koşullarında oluşturdukları koloni yapıları değişebilmektedir.

5.3.1.1. Bakterilerin Koloni Morfolojileri

Bakterilerin koloni morfolojileri, petri kutusunda oluşturdukları koloniler incelenerek değerlendirilir. Tüpteki katı besiyerinde, üreme alanı dar olduğu için kolonilerin tek tek düşme ihtimali çok azdır. Bakterilerin petri kutusunda oluşturdukları kolonilerin değişik yönlerinden genel görüntüsü Görsel 5.49'da gösterilmiştir. Bu görüntülerinin yanı sıra bakteri kolonileri; renk (beyaz, sarı, mavi, kırmızı, krem, siyah gibi bir çok renk olabilir.), koloni büyüklüğü, saydamlık, parlaklık, kuruluk, yayılma, çözünürlük durumu, koku, viskozite (öze koloniye temas ettirilip çekildiğinde, özeye yapışıp sünme eğilimi gösterme), kanlı besiyerinde hemoliz yapma durumu özellikleri yönünden incelenirler. Koloni oluşturma süreleri bakteri türüne göre farklılık gösterir. Örneğin *Escherichia coli* 24 saat, *Brucella abortus* 3-4 gün, *Mycobacterium tuberculosis* 15-20 gün sonra koloni oluşturur.



Görsel 5.49: Petri kutusunda oluşan bakteri kolonilerinin farklı yönlerinden genel görüntüsü

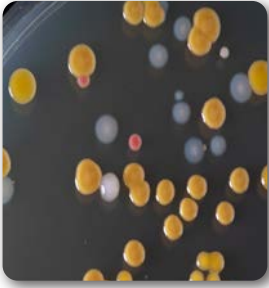
Bakterilerin oluşturdukları koloni yapıları dört temel başlık altında toplanır.

S Koloni: Düz anlamına gelen İngilizce "Smooth (simoöt)" kelimesinin baş harfinden isimlendirme yapılmıştır. Yuvarlak, düzgün kenarlı, düzgün yüzeyli, kabarık, bombeli, nemli ve homojen görünümlü kolonilerdir. En sık görülen koloni yapısıdır (Görsel 5.50).

R Koloni: Pürüzlü anlamına gelen İngilizce "Rough (raf)" kelimesinin baş harfinden isimlendirme yapılmıştır. Kenarları ve üzeri mat, granüllü, basık, pürüzlü, girintili çıkıntılı, dalgalı, ipliksi, bukleli, loblu olabilmektedir. Bunların hepsi genel bir ifade ile, R koloni olarak değerlendirilir. Uygun şartlarda S koloni oluşturan bakteriler, inkübasyon esnasında olumsuz şartlar olduğunda R koloni yapısında gelişebilmektedirler (Görsel 5.51).

L Koloni: Üstü ve kenarları düzensiz, granüllü yapıda, ortası düğmeli biçimde görüntüsüyle sahanda pişmiş yumurtayı andıran kolonilerdir. *Mycoplasma* ve *ureaplasma* gibi hücre duvarı olmayan bakteri cinslerine özgü tipik koloni yapısıdır (Görsel 5.52).

M Koloni: Kapsül veya mukoid salgı oluşturan bakteriler tarafından oluşturulan kolonilerdir. Parlak, sümüksü görünümlü, yapışkan, viskoz yapıdadırlar. Öze değdirildiğinde iplik gibi uzama gösterirler (Görsel 5.53) .



Görsel 5.50: S koloni



Görsel 5.51: R koloni

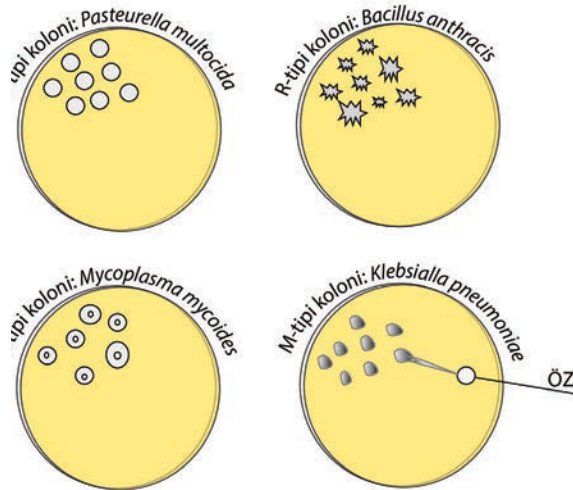


Görsel 5.52: L koloni



Görsel 5.53: M koloni

Görsel 5.54'te, petri kutusunda farklı koloni oluşturan bakteri türlerine örnekler verilmiştir.



Görsel 5.54: Farklı koloni tiplerine ait bakteri örnekleri

Bunları Biliyor musunuz?

Görsel 5.54'te koloni tiplerine örnek olarak verilen patojen bakterilerin neden olduğu başlıca hastalıklar şunlardır:
P.multocida sığır-domuz pnömonisi ve tavuk kolerası,
B.anthraxis şarbon,
M.mycoides mikoplazma pnömonisi,
K.pneumoniae zatürre ve menenjit.

Bazı bakteriler besiyerinde makroskobik değişimlere neden olan enzimler üretirler. Bunlardan bir tanesi, *Escherichia coli* ve birçok patojen bakteri tarafından üretilen hemolizin enzimidir. Hemolizin enzimi, eritrositlere kırmızı rengini veren hemoglobini parçalar. Bu olay **hemoliz** olarak adlandırılır. Bu enzimi taşıyan bakteriler, koyun kanı içeren kanlı agar'da yapılan ekim sonucunda, agarın bileşiminde bulunan eritrositlere etki ederek hemolize neden olurlar. Besiyeri yüzeyinde hemoliz, bakteri türüne göre iki farklı şekilde gözlemlenir. Alfa hemoliz olarak adlandırılan ilkinde, tam bir parçalanma yoktur. Koloni etrafında yeşil renkli, şeffaf olmayan bir halka meydana gelir. Beta hemolizde ise eritrosit hücresinin tam parçalanmasına bağlı olarak belirgin saydam yapıda bir halka zon oluşur (Görsel 5.55).



Görsel 5.55: Alfa hemoliz (*Streptococcus pyogenes*) ve Beta hemoliz (*Staphylococcus aureus*) koloni görünümü

5.3.1.2. Kүf ve Mayaların Koloni Morfolojileri

Genellikle küf ve mayalar selektif bir besiyerinde yapılan ekim sonucunda, beraber değerlendirilir ve sayılırlar. Maya hücreleri bakterilere yakın bir hızda üreme gösterip koloni oluştururken küfler daha yavaş çoğalırlar. Buna bağlı olarak standart maya ve küf analizlerinde inkübasyon süresi beş gündür. Küf (Görsel 5.56) ve maya (Görsel 5.57) kolonileri oluşturdukları yapılar ile birbirinden kolaylıkla ayırt edilebilirler. Küf kolonilerinin makroskobik incelemesinde; şekil, büyüklük, renk, yapı (keçemsi, kadifemsi, geniş yayılım, miselyum tabakasının sık ya da gevşek olması, koloni etrafında farklı renkte halkalar) özellikleri dikkate alınır. Maya kolonilerinin makroskobik incelenmesinde; şekil ve görünüm, büyüklük, renk, koku, yapı (kuru, ıslak, viskoz), ışığı yansıtma ve miselyum varlığı, özellikleri dikkate alınır.



Görsel 5.56: Kүf kolonileri



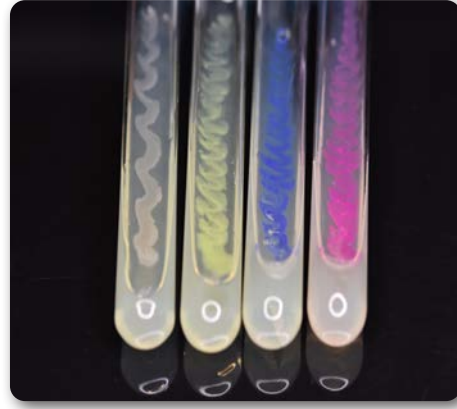
Görsel 5.57: Maya kolonileri

5.3.1.3. Deney Tüpündeki Katı Besiyerinde Makroskopik İnceleme ve Hareket Muayenesi

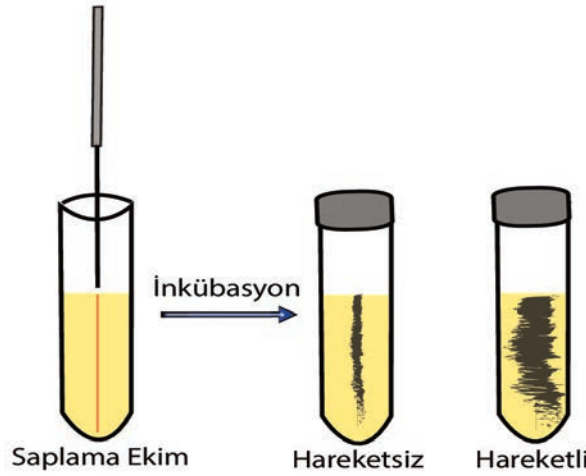
Deney tüplerindeki katı besiyerinde üreme, ekim şekli ve incelenen mikroorganizmanın özelliğine göre, agarlı besiyerinin yüzey ve iç kısmında meydana gelen oluşumlar incelenerek yapılır (Görsel 5.58, Görsel 5.59). Üreme sonunda gaz oluşmuşsa besiyerinde yarıklar ve dipte hava boşluğu gözlemlenir. Yumuşak agarlı dik besiyerinde hareket muayenesi, bakterinin hazırlanan taze sıvı kültüründen yapılır. Saplama yöntemi ile ekim ve inkübasyon sonunda; sadece özenin saplandığı hatta bir üreme meydana gelmiş ise bakteri hareketsiz, yanlara doğru genişleme/dallanma gibi bir yayılım gözlemlendi ise bakterinin hareketli olduğuna karar verilir (Görsel 5.60). Hareket muayenesi için kullanımı sıklıkla tercih edilen yumuşak agarlı besiyeri **SIM Medium**dur.



Görsel 5.58: *M.tuberculosis*



Görsel 5.59: *E.coli*



Görsel 5.60: Hareketsiz ve hareketli bakteri gelişimleri

5.3.2. Sıvı Besiyerinde İnkübasyon Sonu Makroskopik İnceleme

Sıvı besiyerinde mikroorganizma gelişmesinin makroskopik görüntüsü; bulanıklık, yüzeyde zar/ halka/yünüsü yapı oluşumu, dipte tortu, küçük ya da büyük partiküllerin varlığı, renk değişikliği, gaz oluşumu, UV ışık altında floresan ışımaya verme özelliklerinden bir veya birkaç tanesinin varlığı ile tespit edilir. Sıvı besiyerinde inkübasyon sonu değerlendirme çoğunlukla, gelişme var/yok

şeklinde olur. Bu değişikliklerin yoğunluğuna göre mikroorganizma gelişiminin fazla ya da az olduğu kanaatine varılabilir. Ayrıca gelişme görülen tüplerin sayısından yararlanılarak dolaylı bir yöntemle numunenin taşıdığı bakteri sayısının belirlendiği kültürel sayım yöntemleri de vardır.

Bazı bakteriler gelişimleri esnasında açığa asit ya da gaz çıkarırlar. Asit oluşumu, besiyeri içeriğinde bulunan indikatörün renk değişimi ile makroskobik olarak gözlemlenir. Gaz oluşumunun gözlemlenmesi için deney tüplerinin içine önceden durham tüpü atılır. Durham tüpleri besiyeri içine sterilizasyon öncesinde ters olarak bırakılır. Mikrobiyal gelişme ile sıvı besiyerinde açığa çıkan gazın bir kısmı, durham tüpünün tepesinde birikir. Ekim öncesi durham tüplerinde mekanik etkenlerden kaynaklı gaz kabarcığı olup olmadığı kontrol edilmelidir.

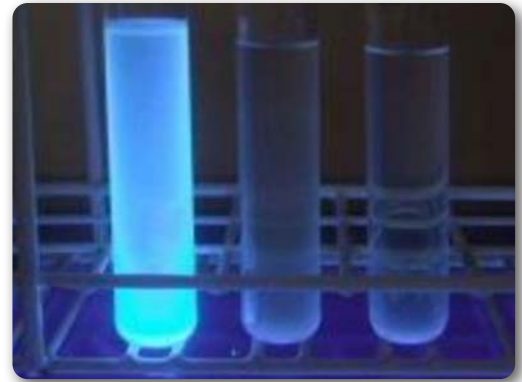
Ekim öncesi berrak olan besiyeri, mikroorganizma gelişimine bağlı olarak bulanıklaşır. Bazen ekim yapılan numunenin besiyerine hacimlendiği miktarın fazla olması ya da numunenin özelliği, bulanıklığın kaynağı olabilmektedir. Bu durumda, emin olmak için fotomotre cihazından yararlanılır.

Görsel 5.61'de, tüpteki sıvı besiyerinde mikroorganizma gelişmesi sonrası ortaya çıkabilecek makroskobik değişiklikler gösterilmiştir.



Görsel 5.61: Sıvı besiyerinde inkübasyon sonu makroskobik görünüm

Bazı durumlarda aranan mikroorganizmanın gelişimi, deney tüpünü UV ışığa tutup floresan ışımaya verme (Görsel 5.62) durumuna göre tespit edilir. Bu uygulamanın en tipik olarak kullanıldığı yer *Escherichia coli* tespitindedir. *E.coli* sayımında kullanılan besiyeri MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) içeriyorsa bakterinin sahip olduğu β -glucuronidase enzimi sayesinde parçalanır. Bunun sonucunda UV ışığa tutulduğunda açığa floresan ışımaya veren maddeler çıkar. Floresan ışımaya verme özelliği katı besiyerinde de geçerlidir. Katı besiyerine MUG ilave edildiğinde bu enzime sahip olan bakteriler UV ışığa tutularak tespit edilebilir.



Görsel 5.62: UV ışık altında besiyerinde görülen floresan ışımaya

30. UYGULAMA

İNKÜBASYON SONU MAKROSKOBİK İNCELEME

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak inkübasyon sonu makroskobik inceleme çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

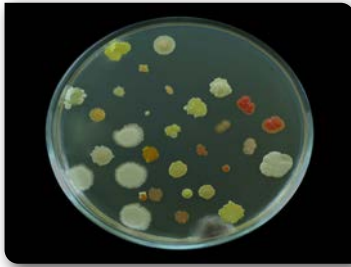
Ekim için *E.coli* içermeye ihtimali olan bir numune kullanılırsa (toprak, çamurlu su gibi) hemoliz, hareket, gaz oluşumu ve floresan ışığa verme pozitif olarak gözlemlenebilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

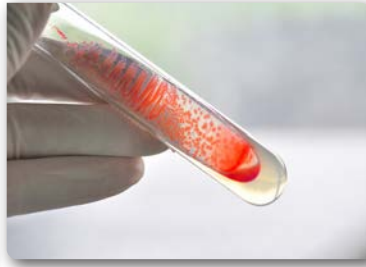
Petri kutusunda hazırlanmış PCA kültürü, petri kutusunda hazırlanmış koyun kanlı agar kültürü (sürme yöntemiyle ekim yapılmış), yatık yumuşak dik agarlı (SIM medium) besiyeri kültürü, durham tüplü MUG katkılı LST broth sıvı kültürü.

İşlem Basamakları

1. İnkübasyondan çıkan petri kutularında oluşan kolonileri inceleyiniz (Görsel 5.63).
 - Koloni şekilleri, renkleri; S, R, L, M koloni tiplerinden hangisi olduğu değerlendirilmelidir.
2. Kanlı agar besiyerinde gelişen kolonilerin hemoliz yapıp yapmadığını değerlendiriniz.
 - Hemoliz gözlemlendi ise türü belirlenmelidir.
3. Yatık kültürde makroskobik inceleme yapınız (Görsel 5.64).
4. Sıvı besiyerinde makroskobik inceleme yapınız.
 - Deney tüpleri; bulanıklık, zar, tortu, durham tüpünde gaz oluşumu, UV ışık altında floresan ışığa verme açısından değerlendirilir.
5. Yumuşak dik agarlı besiyerinde hareket muayenesi yapınız (Görsel 5.65).
 - Sadece ekim hattında üreme olması durumunda bakteri hareketsiz (-), ekim hattından yayılma olması halinde bakteri hareketli (+) olarak değerlendirilir.



Görsel 5.63: Petri kutusunda gelişen koloniler



Görsel 5.64: Yatık kültür



(-) (+)

Görsel 5.65: SIM medium besiyerinde hareket muayenesi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Petri kutusunda oluşan kolonilerin inceleme ve değerlendirmesini yaptı.				
2	Hemoliz durumunun inceleme ve değerlendirmesini yaptı.				
3	Yatık agarlı besiyerinde makroskobik inceleme yaptı.				
4	Sıvı besiyerinde makroskobik inceleme yaptı.				
5	Hareket muayenesi yaptı.				
TOPLAM PUAN					

5.4. SAF KùLTÜR ELDE ETME VE KùLTÜRLERİN MUHAFAZASI

Üzerinde veya içerisinde tek bir tür mikroorganizma üremiş besiyerlerine **saf kùltür** denilir. Besiyerinde birden fazla türde mikroorganizma bulunuyorsa **karışık kùltür** olarak adlandırılır. Mikroorganizmalar; doğada genellikle karışık kùltür halinde bulunurlar. Laboratuvar çalışmalarında numunede bulunan mikroorganizmaların izole edilerek saf kùltürlerin elde edilmesi gerekir. Özellikle mikroorganizmaların tanımlanmasında, tür özelliklerinin belirlenmesinde veya çeşitli endüstriyel ürünlerin (ekmek, yoğurt gibi) üretilmesinde kullanılacak kùltürlerin saf kùltür olması gerekir.

Saf kùltür elde edilirken numuneden uygun bir besiyerine, tek koloni düşürme yöntemi ile ekim yapılır. Besiyerleri inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda petri kutusunda oluşan tek koloniler incelenir. Bu kolonilerden sadece birisinden öze ile alınarak katı veya sıvı besiyerlerine pasajlanır. Pasaj yapılan besiyerleri inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda oluşan kùltürlerde saflık kontrolü yapılır.

5.4.1. Saflık Kontrolü

Elde edilen kùltürün saf olup olmadığını kontrol etmek için uygun besiyeri üzerine tek koloni düşürme ekimi yapılır. İnkübasyon sonunda besiyeri yüzeyinde oluşan koloniler, makroskopik olarak incelenir. Farklı özelliklere sahip koloni gözlemlendiğinde, kùltürün karışık olduğundan şüphelenilir. Bu konuda kesin yargıya varmak için sınıflandırma ve biyokimyasal testler yapılır.

5.4.2. Saf Kùltürlerin Muhafazası

Laboratuvarlarda, mikroorganizmaların, kùltür koleksiyonu bulunmalıdır. Bu koleksiyon, analizlerde pozitif ve negatif şahit olarak kullanılmak üzere korunur. Saf kùltürler stok ve günlük kullanım kùltürleri olarak kullanım anına dek buzdolabında, düşük donma sıcaklıklarında, liyofilize halde, kurutularak, transfer edilerek korunurlar.

Kùltürlerin Buzdolabında Muhafazası: Kùltürler, buzdolabında yaygın olarak yatık kùltürler halinde muhafaza edilmektedir. Kullanılan tüplerin kendi kapakları varsa kapakları kapatılarak pamuk tıkaçlı tüplerin ise ağız kısımları, parafilmle sarılarak buzdolabında saklanır.

Kùltürlerin Dondurularak Muhafazası: Kùltürler -20 ve -80 °C sıcaklıklarda derin dondurucuda ya da -196 °C sıvı azot içerisinde saklanır. Hücrelerin donma zararlarından etkilenmesini en aza indirmek için **kriyoprotektan** denilen koruyucu maddelerden (gliserin vb.) yararlanılır.

Kùltürlerin Liyofilize Edilerek (Dondurarak Kurutma) Muhafazası: Bir cam ampül ya da poşet içerisinde hazırlanmış liyofilize kùltürler birkaç yıl süreyle muhafaza altında tutulabilmektedir. Fermente gıda ve ilaç endüstrisinde bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır. Liyofilize kùltürler, kullanım öncesinde uygun bir sıvı besiyerinde aktiveştirilmelidir.

Kùltürlerin Kurutularak Muhafazası: Kùltür, farklı şekillerde kurutularak muhafaza edilebilir. Filtre kağıtları, delgeç aleti ile yuvarlak küçük diskler haline getirilir. Steril edilen diskler sıvı kùltüre daldırılır. Aseptik koşullarda desikatörde kurutulduktan sonra, deney tüplerinde saklanır.

Kùltürlerin Transfer Edilerek Muhafazası: Kùltürden yeni besiyerine pasaj yapılarak mikroorganizmaların canlı kalmaları sağlanır. Pasajlar arasındaki süre mikroorganizmanın türüne, kullanılan besiyeri ve depolama sıcaklığına bağlı olarak değişir. Bazı mikroorganizmaların canlılıklarının devamı için her gün, bazıları için 4-5 ayda bir transfer edilmeleri gerekir.

31. UYGULAMA

SAF KÜLTÜR ÜRETME

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak saf kültür üretme çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Mikroorganizma izole edilecek numune (sıvı/katı numune, kültür numunesi), bunzen beki, iğne öze, halka öze, ekimehazır plaklar, deney tüpünde hazırlanmış sıvı besiyerleri, yatık olarak hazırlanmış besiyerleri.

İşlem Basamakları

1. Aseptik ortam koşullarında, izolasyon yapılacak numuneden besiyerli olarak ekime hazırlanmış petri kutularına tek koloni düşürme yöntemi ile ekim yapınız.
 - Ekim yapılacak besiyeri numunenin durumuna göre genel bir besiyeri (PCA) olabileceği gibi, belirli bir mikroorganizmaya yönelik olarak hazırlanmış selektif besiyeri de olabilir.
 - Hazırda bulunan petri kutusundaki karışık kültürden izolasyon yapılacaksa halka öze, izole edilecek mikroorganizma kolonisinin üst kısmına değdirilerek (Görsel 5.66), başka bir petri kutusuna tek koloni düşürme ekimi yapılır.
2. Uygun sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakınız.
 - Üretilecek mikroorganizmaya özgü inkübasyon sıcaklık ve süresi uygulanmalıdır.
3. Tek düşen izole kolonilerin birinden iğne öze ile alarak genel amaçlı sıvı besiyerine pasaj yapınız.
4. Sıvı besiyerini, uygun sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakınız.
5. Inkübasyon sonunda sıvı kültürden iğne öze ile alarak yatık besiyerine pasaj yapınız.
6. Ekim yapılmış yatık agarlı tüpleri inkübasyona bırakınız.
 - Yeterli üreme sağlandığında (genellikle 8-18 saat) inkübasyona son verilir (Görsel 5.687).
7. Yatık kültürden petri kutusuna tek koloni yöntemi ile pasaj yaparak inkübasyon sonrası gelişen koloniler üzerinden saflık kontrolü yapınız.
8. Yatık saf kültürü buzdolabında muhafaza ediniz.
9. Dondurarak muhafaza edecekseniz sıvı besiyerine pasaj yapınız.
 - Steril eppendorf tüplerine eşit miktarda sıvı kültür ve steril gliserin katılarak homojenize edildikten sonra derin dondurucuya yerleştirilir.



Görsel 5.66: Öze ile koloni alma



Görsel 5.67: Yatık saf kültür

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Numuneden petri kutusuna pasaj yaptı.				
2	İzole koloniden öze ile sıvı besiyerine pasaj yaptı.				
3	Sıvı kültürden yatık besiyerli tüpe pasaj yaptı.				
4	Saflık kontrolü yaptı.				
5	Saf kültürü muhafaza etti.				
TOPLAM PUAN					

A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. İçerisinde ya da üzerinde mikroorganizma üremiş besiyerleri olarak isimlendirilir.
2. Kültür ortamından alınan örneğin mikroorganizmaları çoğaltma, taze kültür elde etme, tanımlama amaçlarıyla uygun teknikler kullanılarak başka bir besiyerine aktarılması, ... olarak isimlendirilir.
3. Yumuşak agarlı dik besiyerine hareket muayenesi için yapılan ekimlerde, inkübasyon sonucunda sadece özenin saplandığı hatta bir üreme meydana gelmiş ise bakteri , yanlara doğru bir yayılım gözlemlendi ise bakterinin olduğuna karar verilir.
4. Üzerinde veya içerisinde tek bir tür mikroorganizma üremiş besiyerlerine denilir. Besiyerinde birden fazla türde mikroorganizma bulunuyorsa olarak adlandırılır.

5.



.....



.....



.....



.....

Yan tarafta verilen bakteri koloni şekillerinin altına hangi tip koloni olduklarını yazınız.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

6. I) Drigalski spatülü
II) Eküvyon
III) Pipet
IV) Öze

Yukarıdaki ekim araçlarından hangisi ya da hangileri sıvı besiyerine ekim yapılırken kullanılmaz?

- A) Yalnız I B) Yalnız II C) I ve II D) I ve III E) II ve IV

7. Dökme plak yöntemi ile yapılan ekimde petri kutusuna aktarılan numune hacmi kaç mL'dir?

- A) 0,1 B) 0,5 C) 1 D) 2 E) 10

8. Uzun süreli inkübasyonlarda besiyeri yüzeylerindeki kurumunun önlenmesi için ne yapılır?

- A) Petri kutularının kapakları aralık bırakılarak inkübasyon yapılır.
B) Petri kutuları ters çevrilerek inkübatöre yerleştirilir.
C) İnkübatörün içine bir beher dolusu su konulur.
D) İnkübasyon düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilir.
E) İnkübatörün kapağı arada sırada açılır.

9. Bazı bakterilerin kanlı agar üzerinde geliştiklerinde, sahip oldukları bir enzim sayesinde agarın bileşiminde bulunan eritrosit hücrelerini parçalaması olayına ne ad verilir?

- A) Absorbsiyon B) Adsorbsiyon C) Hemoliz
D) MUG E) Plazmoliz

10. Bazı besiyerlerinde bulunan MUG katkısı hangi amaçla bileşimde yer almaktadır?

- A) Gaz oluşumunu gözlemlemek
- B) Hareket muayenesi yapmak
- C) Renk değişimini sağlamak
- D) Bulanıklık seviyesini ölçmek
- E) UV ışık altında floresan ışımayı gözlemlemek

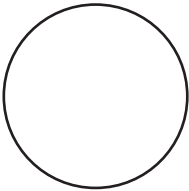
11. Dökme plak yöntemi ile petri kutusundaki katı besiyerine ekim işleminde, pipetlenen numune üzerine agarlı besiyeri ilave edilirken besiyeri sıcaklığı yaklaşık kaç °C olmalıdır?

- A) 20-25
- B) 25-30
- C) 30-35
- D) 35-40
- E) 40-45

C) Aşağıdaki soruları cevaplayınız.

12. Saf kültürler hangi yöntemler kullanılarak muhafaza edilmektedir?

13. Aşağıda verilen temsili petri kutusuna, tek koloni düşürme ekim yönteminin en çok tercih edilen sürme şeklini sırasına uygun bir şekilde çiziniz.



14. Kültür yapma (kültürasyon) aşamalarını sırasıyla yazınız.

15. Dökme plak yönteminde besiyerinin petri kutusuna döküm sıcaklığı neden önemlidir?

6.

ÖĞRENME BİRİMİ



BOYAMA YÖNTEMLERİ

TEMEL KAVRAMLAR

Preparat
Fiksasyon
Boyama
Dekolorizasyon
Fruti

KONULAR

- 6.1. PREPARAT HAZIRLAMA
- 6.2. DİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ
- 6.3. İNDİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Preparat hazırlamayı,
- Direkt boyama yapmayı,
- İndirekt boyama yapmayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Çevrenizde çok temiz ve şeffaf camın varlığından şüphe eden veya farkına varmadan çarpan oldu mu? Sizce bunun sebebi nedir?
2. Mikroorganizma hücrelerini gözümüzle göremediğimiz halde ekmeğin küflendiğini nasıl anlıyoruz?
3. Her renkli sıvı, boya mıdır? Her boya, her maddeyi boyar mı?



6.1. PREPARAT HAZIRLAMA

Kültür veya marazi maddelerin (kan, idrar, gaita, sperma, süt, organ ve patolojik sıvılar vb.) mikroskopik incelemelerinin yapılabilmesi için preparat hazırlanır. **Preparat**, mikroskopta incelenmeye hazır hale getirilmiş numuneye denir.

Hazırlanan preparatlar, boyasız incelenebilir fakat mikroorganizmaların büyük çoğunluğu şeffaf ve renksiz olduklarından daha iyi ve detaylı incelenebilmeleri için boyanmaları gerekebilir. Farklı boyama teknikleri ile mikroorganizmaların bazı özelliklerinin belirlenmesi mümkündür. Örneğin incelenen bakterinin morfolojik yapısı, kapsül veya flagellasının olup olmadığı, gram pozitif mi yoksa negatif mi olduğu gibi özellikleri belirlenebilir.

Preparat hazırlamada kullanılacak lamlar temiz olmalıdır. Lamlar kısa kenarlarından tutulmalı ve lam yüzeyine dokunulmamalıdır. Yıpranmış, çizilmiş ve yeterince temiz görünmeyen lamlar kullanılmadan atılmalıdır. Lam etil alkolle ıslatılarak temiz bir bezle silinmeli, bek alevinden geçirildikten sonra kullanılmalıdır.

6.1.1. Yaş Preparat Hazırlama

Mikroskopta direkt inceleme yapılmak isteniyorsa yaş preparat hazırlamak yeterlidir. Yaş preparat tekniği ile bakteri, maya ve küflerin morfolojik yapıları belirlenebilir.

Katı kültürden preparat hazırlanacaksa lamın ortasına öze ile alınan katı kültür sürülür ve yanına bir damla saf su konulur. Yaymadan katı kültür saf suda çözününceye kadar öze ile karıştırılır. Sıvı kültürden preparat hazırlanacaksa lamın ortasına 2-3 öze dolusu konur. Lamel, yavaşça lam üzerindeki sıvı kültürün üzerine kapatılır. Lam ile lamel arasında hava boşluğu kalmaması için lamelin bir kenarı sıvı kültüre temas etmeyecek şekilde lama temas ettirilerek kapatılmalıdır.

6.1.2. Kuru Preparat Hazırlama

Mikroorganizma boyanarak incelenmek isteniyorsa kuru preparat hazırlamak gereklidir. Genelde bakterilerin boyanarak incelenmesinde kullanılır. Katı kültürden preparat hazırlanacaksa lamın ortasına öze ile alınan katı kültür sürülür ve yanına bir damla saf su konulur. Katı kültür saf suda çözününceye kadar öze ile karıştırılır ve ince bir tabaka halinde lamın üzerine yayılır. Sıvı kültürden preparat hazırlanacaksa lamın ortasına 2-3 öze dolusu konulur ve ince bir tabaka halinde lamın üzerine yayılır. Oda sıcaklığında veya etüvde bekletilerek kurutulur. Daha sonra fiksasyon (mikroorganizmaların lam üzerine tespiti) işlemi yapılır.

Fiksasyon işleminin amacı, bakterilerin lama tespitini sağlayarak boyamada veya yıkama esnasında sıvılarla beraber gitmesini engellemektir. Fiksasyon işlemi ısı uygulamalar ile yapılır. Isıl uygulamada zarar görebilecek numunelerde (protein yönünden zengin kan ve doku gibi) ise kimyasal maddelerle fiksasyon yapılır.

Isıl uygulamalar ile fiksasyon işleminde kurutulan preparat, bir ucundan tutularak 3-4 defa alevden geçirilerek yapılır. Kimyasal fiksasyon işleminde ise kurutulan preparat etil alkol, metil alkol, alkol-eter, alkol-aseton gibi kimyasal maddeler içerisinde bekletilerek (metil alkolde 3-4 dakika, etil alkolde 10 dakika, eşit miktar alkol-aseton karışımında 10-20 dakika) yapılır. Kimyasaldan çıkarılan preparat çok hafif akan suda yıkanıp kurutulur.

32. UYGULAMA

PREPARAT HAZIRLAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak preparat hazırlama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

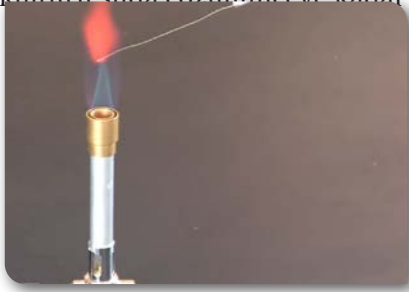
Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen bek, öze, sıvı kültür, katı kültür, lam, lamel.

YAŞ PREPARAT HAZIRLAMA

İşlem Basamakları

1. Aseptik ortam oluşturunuz.
2. Temiz bir lam alarak eter alkol karışımı ile siliniz.
 - **Lam karşılıklı kısa kenarlarından tutulmalı ve lamın yüzeyine dokunulmamalıdır.**
3. Katı kültürden yaş preparat hazırlamak için aşağıdaki işlemleri yapınız.
 - 3.1. Öze ile katı kültürden örnek alarak lamın ortasına sürünüz.
 - **Öze bunzen alevinde sterilize edilip soğutulduktan sonra kullanılmalıdır (Görsel 6.1).**
 - 3.2. Yanına bir damla saf su koyunuz (Görsel 6.2).
 - 3.3. Katı kültürü suda çözününceye kadar öze ile karıştırınız (Görsel 6.3).

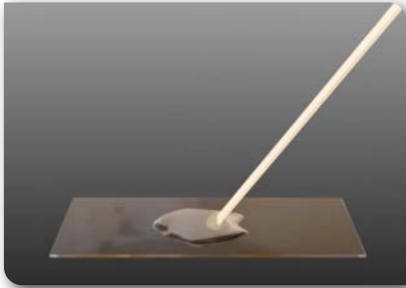


Görsel 6.1: Özenin steril edilmesi

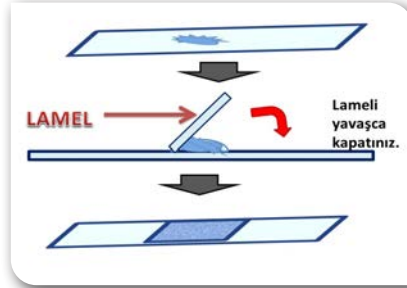


Görsel 6.2: Lam üzerine bir damla saf suyun aktarılması

4. Sıvı kültürden yaş preparat hazırlamak için sıvı kültürden 2-3 öze dolusu alıp lamın ortasına koyunuz.
5. Lameli yavaşça lam üzerindeki sıvı kültürün üzerine kapatınız (Görsel 6.4).



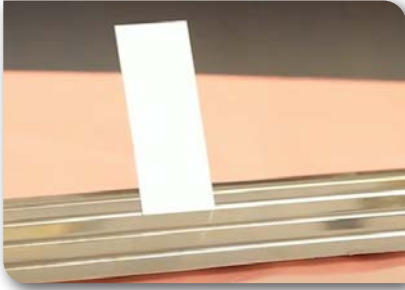
Görsel 6.3: Kültür ile saf suyun karıştırılması



Görsel 6.4: Yaş preparat hazırlamada lamelin kapatılması

KURU PREPARAT HAZIRLAMA**İşlem Basamakları**

1. Aseptik ortam oluşturunuz.
2. Temiz bir lam alarak alkol ile siliniz.
3. Lamın ortasına bir damla saf su koyunuz (Görsel 6.2).
 - Sıvı kültür ile çalışılıyorsa saf su koymaya gerek yoktur.
 - Lam karşılıklı kısa kenarlarından tutulmalı ve lamın yüzeyine dokunulmamalıdır.
4. Öze ile kültürden örnek alınız.
 - Öze bunzen alevinde sterilize edilip soğutulduktan sonra kullanılmalıdır.
5. Alınan örneği su damlasının yanında eziniz (Görsel 6.3).
6. Su damlası ile karıştırarak lamın üzerine yayınız.
 - Yaymadan önce örneğin çözündüğünden emin olunmalıdır.
 - İnce bir tabaka oluşturacak şekilde yayılmalıdır.
 - Lamın kısa kenarlarında en az 0,5 cm boşluk kalacak şekilde yayılmalıdır.
7. Oda sıcaklığında bekleterek kurumasını sağlayınız (Görsel 6.5).
 - Preparat kurutulmak amacıyla asla sallanmamalı ve preparata üflenmemelidir.
 - Tamamen kuruyuncaya kadar bekletilmelidir.
8. Lamın alt yüzünü üç defa bek alevinden geçiriniz (Görsel 6.6).
 - Preparat alevde aşırı bekletilmemelidir.
 - Preparatın yanmamasına dikkat edilmelidir.



Görsel 6.5: Preparatın kurutulması

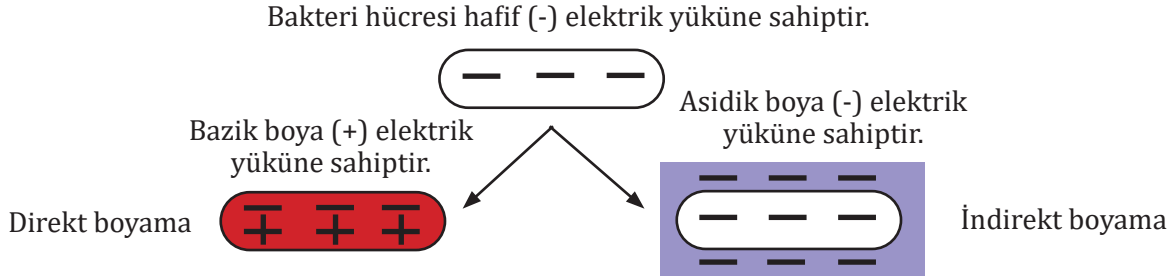


Görsel 6.6: Preparatın alevden geçirilerek fikse edilmesi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Aseptik tekniğe uygun çalıştı.				
2	Sıvı kültürden yaş preparat hazırladı.				
3	Katı kültürden yaş preparat hazırladı.				
4	Kuru preparat hazırladı.				
5	Fiksasyon işlemi yaptı.				
TOPLAM PUAN					

6.2. DİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ

Direkt boyama yöntemlerinde amaç, bakteri hücrelerini boyamaktır. Zıt elektriksel yük birbirini çeker. Bakteri hücreleri, negatif elektriksel yüke sahip olduğundan boyanabilmeleri için pozitif elektriksel yüke sahip olan bazik boyalar kullanılmalıdır. Direkt boyama yöntemleri içerisinde basit, gram, spor, ARB boyama yöntemleri yer almaktadır. İndirekt boyama yöntemlerinde asidik boyalar kullanılır. Aynı elektriksel yükler birbirini ittiği için bakteriler boyanmaz fakat zemin boyandığı için renkli zeminde bakteriler renksiz olarak görülür (Görsel 6.7).



Görsel 6.7: Direkt ve indirekt boyama

6.2.1. Boya Çözeltileri

Boya çözeltileri elektriksel yüküne göre üç gruba ayrılır:

- **Asidik Boyalar:** İyonize olduklarında negatif elektrikle yüklenirler. Preparatta zeminin boyanmasında kullanılır. Asit fuksin, pikrik asit, eozin, nigrosin, kongo kırmızısı gibi boyalar örnek olarak verilebilir.
- **Bazik Boyalar:** İyonize olduklarında, pozitif elektrikle yüklenirler. Bakteri hücrelerinin boyanmasında kullanılır. Metilen mavisi, kristal viyole, bazik fuksin, safranin, malaşit yeşili gibi boyalar örnek olarak verilebilir.
- **Nötr Boyalar:** Asidik ve bazik boyaların uygun oranlardaki karışımlarıdır. Bu boyalar, doku preparatları, kan ve parazitlerin incelenmesinde kullanılır. Giemsa, Wright, Leishman gibi boyalar örnek olarak verilebilir.

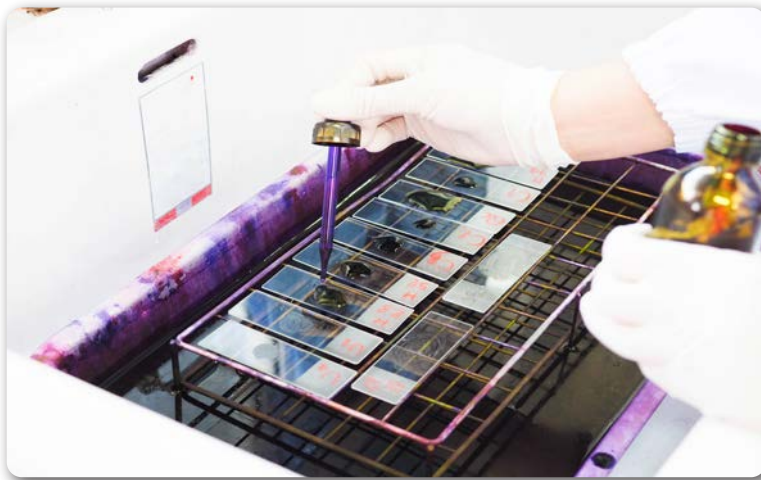
Tablo 6.1: Boya Çözeltileri, Kullanım Yerleri ve Hazırlanışı

BOYA ÇÖZELTİSİ	KULLANIM YERİ	HAZIRLANIŞI (100 mL)
Metilen mavisi	Basit ve ARB boyama	0,3 g boya maddesi tartılarak 30 mL %95'lik etanol içerisinde çözündürülür. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak karıştırılır. Filtre kâğıdından süzülür.
Kristal viyole	Basit ve gram boyama	2 g boya maddesi tartılarak 20 mL %95'lik etanol içerisinde çözündürülür. 0,8 g amonyum okzalot tartılarak 80 mL distile su içerisinde çözündürülür. Hazırlanan iki çözelti karıştırılarak kullanılır.
Safranin	Basit ve spor boyama	0,5 g boya maddesi tartılarak 10 mL %95'lik etanol içerisinde çözündürülür. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak karıştırılır. Filtre kâğıdından süzülür.
Malaşit yeşili	Spor boyama	5 g boya maddesi tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözündürülür.

Bazik fuksin	Basit ve gram boyama	0,1 g boya maddesi tartılarak 100 mL distile su içerisinde çözündürülür.
Karbol fuksin	ARB boyama	0,3 g bazik fuksin boya maddesi tartılarak 10 mL %95'lik etanol içerisinde çözündürülür. Hacmi %5'lik fenol çözeltisi ile 100 mL'ye tamamlanarak karıştırılır. 1 gün dinlendirildikten sonra kullanılır.
Sulu karbol fuksin	Basit ve gram boyama	Karbol fuksin boya çözeltisi 10 kat sulandırılarak hazırlanır.
Laktofenol	Küflerin boyasız incelenmesi	100 g fenol tartılır. 100 mL distile suda ısıtılarak çözündürülür. Üzerine 100 mL laktik asit ve 200 mL gliserol ilave edilerek karıştırılır.
Laktofenol blue	Küflerin boyalı incelenmesi	100 g fenol tartılır. 100 mL distile suda ısıtılarak çözündürülür. Üzerine 0,075 g metilen mavisini, 100 mL laktik asit ve 200 mL gliserol ilave edilerek karıştırılır.
Laktofenol pikrik asit	Küflerin boyalı incelenmesi	100 g fenol tartılır. 100 mL doymuş pikrik asit çözeltisi içerisinde çözündürülür. Üzerine 100 mL laktik asit ve 200 mL gliserol ilave edilerek karıştırılır.
Nigrosin	Negatif boyama	10 g boya maddesi tartılarak 100 mL distile su içerisine aktararak kaynar su banyosunda yarım saat tutulur. Üzerine 0,5 mL formalin koruyucu olarak eklenir. Çift katlı filtre kâğıdından süzülerek kullanılır.

6.2.2. Basit Boyama

Bakterilerin morfolojilerinin incelenmesinde kullanılan boyama yöntemidir. Basit boyamada, kuru preparat (yayma, kurutma, tespit) hazırlanarak bazik boyalardan birisi ile boyanır (Görsel 6.8). Bakteriler, kullanılan boyanın rengini alır. Bu boyamada en yaygın kullanılan boya, metilen mavisidir. Boyama işleminde hangi bazik boya kullanılırsa kullanılsın yapılan işlem aynıdır. sadece kullanılan boyanın etki süresine göre boyada bekletilme süresi değişir. Bu süre metilen mavisinde 30-90 saniye, karbol fuksinde 10-30 saniye, kristal viyolede 30-60 saniyedir.

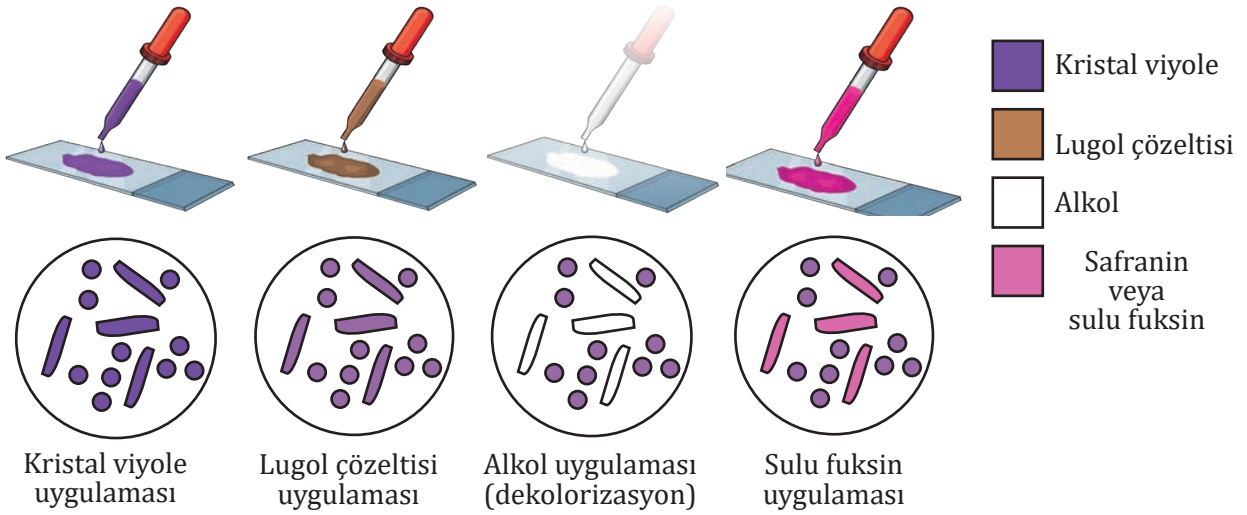


Görsel 6.8: Boyama işlemi

6.2.3. Gram Boyama

Gram boyama, bakteriyoloji laboratuvarlarında en sık kullanılan yöntemdir. Bu yöntem ile bakteriler **gram pozitif** ve **gram negatif** olarak ikiye ayrılır. Bakteri basillerin yaklaşık yarısı, kokların büyük kısmı ve mantarlar, gram pozitifdir. Spiral bakteriler ise gram negatiftir.

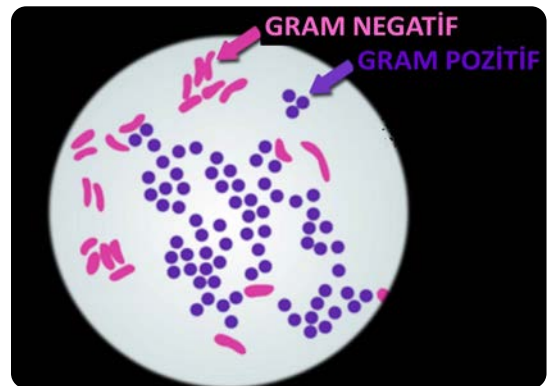
Boyamada kullanılacak kültürlerin genç (18–24 saatlik) olması gerekir. Yaşlı kültürlerle yapılan çalışmalarda gram (+) bakterilerden az da olsa bir kısmı gram (–) gibi değerlendirilebilmektedir.



Görsel 6.9: Gram boyamada işlem sırası

Görsel 6.9'da gram boyama işleminde uygulanan boya ve çözeltiler ile bakterilerin her aşamada göründükleri renkler gösterilmektedir. Gram boyama işleminde preparat önce kristal viyole ile boyanır. Bu aşamada bütün bakteriler koyu mavi/mor renge boyanmış olur. Boyanan preparat mordant etkisinden dolayı lügol çözeltisinde bekletilir. Mordant etki, boya ile boyanacak yüzey arasındaki tutuculuğu artırmak amacıyla uygulanır. Bu aşamaya kadar bütün bakteriler boyanmış haldedir. Daha sonra renk giderme (dekolorizasyon) amacıyla alkol uygulaması yapılır. Dekolorizasyon işleminde gram pozitif bakterilerin hücre duvarında porlar (delikler) iyice büzülür, daralır ve boya dışarı çıkamaz. Gram negatif bakterilerde ise porlar daha çok açılarak genişler ve alkol boyayı çözündürerek hücreden uzaklaştırır.

Böylece gram negatif bakteriler boyasız hale dönüşür. Preparat sulu fuksin veya safranin ile boyanır. Bu boyalar kristal viyoleye göre daha zayıf ve açık renkli olduğu için gram pozitif bakterilerin rengi değişmez fakat gram negatif bakteriler boyasız olduğu için kırmızı-pembe renge boyanır. Mikroskopta incelemesinde gram pozitif bakteriler mor renkte, gram negatif bakteriler ise pembe-kırmızı renkte görülürler (Görsel 6.10).



Görsel 6.10: Gram boyamada mikroskopik görüntü

Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hücre duvar yapıları arasında farklar vardır.

- Hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakası gram pozitif bakterilerde daha kalındır.
- Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında teikoik asit vardır. Gram negatiflerde ise yoktur.
- Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında karbonhidrat, gram negatif bakterilerin hücre duvarında ise lipitler daha fazladır.

6.2.4. Spor Boyama

Bazı bakteri türleri, olumsuz koşullar altında uzun süre kalmaları durumunda hücre içerisinde endospor olarak adlandırılan özel yapılar oluşturur. Bakteri hücresinin ölmesi veya çeşitli etkenlerle parçalanması durumunda endosporlar serbest hale geçerler. Bunlara spor denir. Spor formlar vejetatif formlara göre fiziksel (soğuk, sıcak, ozmotik basınç gibi) etkilere ve kimyasal maddelere karşı daha dirençli yapılardır.

Vejetatif hücreler, bazik boyalarla kolayca boyanabildiği halde sporlar daha dirençli olmaları ve geçirgen olmamaları sebebiyle boyanamazlar. Bundan dolayı özel spor boyama yöntemleri geliştirilmiştir. Isıl işlem uygulamaları sporların direncini kırarak boyanmalarını sağlamaktadır.

6.2.5. Aside Dirençli Bakterilerde (ARB) Boyama

Bazı bakteri türlerinin hücre yapısında diğer bakterilere göre daha fazla lipit ve hücrenin etrafında balmumsu bir tabaka bulunması sebebiyle asitlere karşı daha dirençlidirler. Bu gruba örnek olarak tüberküloz verilebilir. ARB boyama; tüberküloz (verem) hastalığının tanısında kullanılan hızlı, ucuz ve pratik bir yöntemdir. Aside dirençli bakteriler diğer boyama yöntemleri ile boyanamazlar. Boyanabilmeleri için fenol içeren yoğun boya çözeltilerinde, uzun süre bekletilmesi ya da ısıl işlem uygulanması gerekir. ARB boyamada en sık kullanılan yöntem Ehrlich Ziehl Neelsen (EZN) boyama yöntemidir. Boyama esnasında preparat alttan ısıtılarak aside dirençli bakterilerin boyanması sağlanır.

Preparat hazırlama aşaması, iş sağlığı ve güvenliği açısından steril kabinde yapılmalıdır. Preparat hazırlamada yayma, kurutma ve tespit işlemleri kabin içerisinde yapılmalı ve tespit işleminden sonra da bakterilerin canlı kalabileceği unutulmamalıdır.

6.2.6. Kapsül Boyama

Bakterilerde kapsül ekstraselüler bir yapıdır. Her bakteri hücresinde bulunmaz. Bazı bakteri türlerinde hücre duvarının dışında kapsül oluşur. Kapsül hücreyi dış etkilere (fiziksel, kimyasal ve mekanik) korur. Bakterinin kapsüllü olup olmadığının belirlenmesinde ve kapsülün boyanarak incelenmesinde Muir, His veya Antony yöntemleri kullanılmaktadır.

6.2.7. Saklama Preparatı Hazırlama

Preparatların bazılarının daha sonra tekrar faydalanabilmek için saklanması gerekebilir. Daha sonra kullanılmak üzere bozulmadan saklanabilecek hale getirilmiş preparatlara, **hazır preparat** veya **saklama preparatı** denir (Görsel 6.11). Saklama preparatı hazırlamak için aşağıdaki işlem basamaklarını uygulamak gerekir:

-

[illegible]

33. UYGULAMA

BASİT BOYAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak basit boyama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen bek, lam, öze, kültür, kristal viyole, damlalık.

İşlem Basamakları

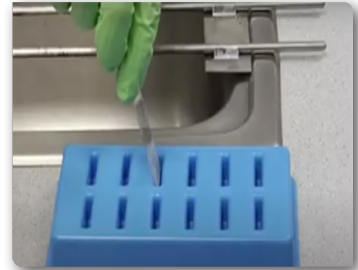
1. Kuru preparat hazırlayınız.
 - **Yayma, kurutma ve tespit işlemleri aseptik tekniğe uygun yapılmalıdır.**
2. Preparatın üzerini boya çözeltisiyle kaplayarak yeterli süre bekletiniz (Görsel 6.12).
 - **Basit boyamada bazik boyalardan herhangi birisi kullanılabilir. En sık metilen mavisii kullanılmaktadır.**
 - **Boyama süresi olarak metilen mavisinde 30-90 saniye, karbol fuksinde 10-30 saniye, kristal viyolede 30-60 saniye yeterlidir.**
 - **Boyama ve yıkama işlemleri boyama sehpasında veya plastik bir kaptaki yapılmalıdır.**
 - **Boyalari aktarmada damlalik veya damlalikli şişeler kullanilir.**
 - **Yeterli miktarda boya damlatilmali, gereğinden fazla bekletilerek boyanın kurumasına fırsat verilmemelidir.**
3. Preparatı distile suyla yıkayınız (Görsel 6.13).
 - **Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkanmalıdır.**
 - **Boya lekelerinin kolay temizlenemediği göz önünde bulundurularak elleri ve etrafı kirletmemeye özen gösterilmelidir.**
4. Preparatı oda sıcaklığında bekleterek kurutunuz (Görsel 6.14).



Görsel 6.12: Preparata boya eklenmesi



Görsel 6.13: Boyanan preparatın yıkanması



Görsel 6.14: Preparatın kurutulması

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Kuru preparat hazırladı.				
2	Boyama düzeneğini kurdu.				
3	Boya uygulamasını yaptı.				
4	Yıkama işlemini yaptı.				
5	Preparatı kuruttu.				
TOPLAM PUAN					

34. UYGULAMA

GRAM BOYAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak gram boyama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen bek, lam, öze, kültür, kristal viyole, lugol çözeltisi, sulu fuksin veya safranin, %96'lık etil alkol.

İşlem Basamakları

1. Kuru preparat hazırlayınız.
 - **Yayma, kurutma ve tespit işlemleri aseptik tekniğe uygun yapılmalıdır.**
2. Preparatı, kristal viyole boya çözeltisi ile 1-2 dakika boyayınız ve distile suyla yıkayınız (Görsel 6.16).
 - **Kullanılacak boya ve çözeltiler kullanım sırasına göre tezgâh üzerine dizilmelidir (Görsel 6.15).**
 - **Boyama ve yıkama işlemleri boyama sehpasında veya plastik bir kaptay yapılmalıdır.**
 - **Boyalari aktarmada damlalık veya damlalıklı şişeler kullanılmalıdır.**
 - **Yeterli miktarda boya damlatılmalı, gereğinden fazla bekletilerek boyanın kurumasına fırsat verilmemelidir.**
 - **Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkanmalıdır (Görsel 6.17).**
3. Preparatı lugol çözeltisinde 1-2 dakika bekletin ve distile suyla yıkayınız (Görsel 6.19).
 - **Preparatın üzerini tamamen kaplayacak şekilde lugol damlatılmalıdır (Görsel 6.18).**
4. Preparatın üzerine %96'lık etanol veya asit-alkol karışımı ekleyerek 10-15 saniye bekletin ve distile suyla yıkayınız (Görsel 6.20).
 - **Renksiz sıvı akana kadar alkol damlatılmalıdır.**



Görsel 6.15: Gram boyamada kullanılacak boya ve çözeltiler



Görsel 6.16: Preparata kristal viyole boya çözeltisi damlatılması



Görsel 6.17: Preparatın distile suyla yıkanması



Görsel 6.18: Preparata lugol çözeltisi eklenmesi



Görsel 6.19: Lugol çözeltisinin yıkanması



Görsel 6.20: Dekolorizasyon işlemi

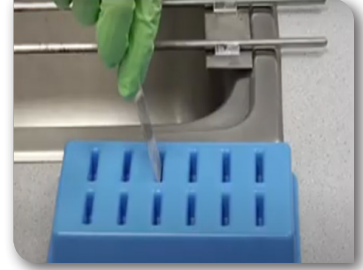
5. Preparatı, sulu fuksin veya safranin boya çözeltisi ile 30 saniye boyayınız ve distile suyla yıkayınız (Görsel 6.21 ve 6.22).
6. Preparatı oda sıcaklığında bekleterek kurutunuz (Görsel 6.23).
 - Mikroskopik incelemede mor renkte görülen bakteriler gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise gram (-) olarak değerlendirilir.



Görsel 6.21: Preparata safranin boya çözeltisi damlatılması



Görsel 6.22: Boyanan preparatın yıkama işlemi



Görsel 6.23: Preparatın kuruma işlemi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Kuru preparat hazırladı.				
2	Birinci boya uygulaması ve yıkama işlemi yaptı.				
3	Lugol uygulaması ve yıkama işlemi yaptı.				
4	Dekolorizasyon (alkol) uygulaması ve yıkama işlemi yaptı.				
5	İkinci boya uygulaması, yıkama ve kurutma işlemi yaptı.				
TOPLAM PUAN					

NOT ALINIZ



35. UYGULAMA

SPOR BOYAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak spor boyama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen bek, su banyosu düzeneği, lam, öze, kültür, sulu fuksin veya %5'lik safranin çözeltisi, %5'lik malaşit yeşili çözeltisi, kurutma kâğıdı.

İşlem Basamakları

1. Kuru preparat hazırlayınız.
 - Birinci uygulama faaliyetinde anlatıldığı şekilde yapılmalıdır.
 - Yayma, kurutma ve tespit işlemleri aseptik tekniğe uygun yapılmalıdır.
2. Preparatı, kaynar su banyosu düzeneğinin üstüne yerleştiriniz ve boyama süresince buharda ısınmasını sağlayınız (Görsel 6.24).
 - Boyama esnasında preparatın buharda ısınması gerektiği için preparat, düşmeyecek şekilde yerleştirilir.
3. Preparatın üzerine %5'lik malaşit yeşili boya çözeltisi ekleyiniz.
4. Preparatın üzerine, lamdan daha küçük boyutta kesilerek hazırlanmış olan kurutma kâğıdını yerleştiriniz (Görsel 6.25).
 - Kurutma kâğıdı boya çözeltisini çekerek tutmalıdır.
5. Boyama süresince (5–6 dakika) kurutma kâğıdının üzerine malaşit yeşili boya çözeltisi damlatılarak kâğıdın sürekli ıslak kalmasını sağlayınız.
6. Kurutma kâğıdını bir pens yardımıyla alarak atınız (Görsel 6.26).
7. Preparatı, ısıtma düzeneğinden alarak saf suyla yıkayınız.
8. Preparatı, sulu fuksin veya %5'lik safranin ile 20–30 saniye boyayınız ve saf su ile yıkayınız.
9. Preparatı, oda sıcaklığında bekleterek kurutunuz.
 - Mikroskopik incelemede vejetatif hücreler pembe-kırmızı, sporlar yeşil renkte görülür.



Görsel 6.24: Preparatın kaynar su düzeneğinde ısıtılması



Görsel 6.25: Kurutma kâğıdının preparat üzerine konulması



Görsel 6.26: Boyama sonrası kurutma kâğıdının alınması

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Kuru preparat hazırladı.				
2	Kaynar su banyosunda boyama düzeneğini hazırladı.				
3	Isıtma düzeneğinde boyama işlemi hazırlıklarını yaptı.				
4	Isıtma düzeneği üzerinde boya uygulaması işlemini yaptı.				
5	İkinci boya uygulaması, yıkama ve kurutma işlemini yaptı.				
TOPLAM PUAN					

36. UYGULAMA

ERLİCH ZİEHL NEELSEN (EZN) BOYAMA

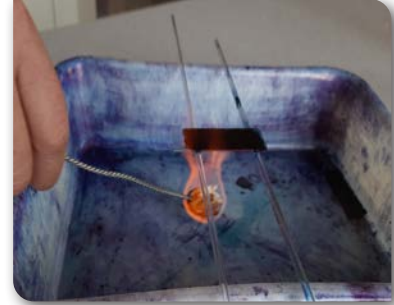
Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak Erlich ziehl neelsen (EZN) boyama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen bek, lam, öze, tel, pamuk, kültür, karbol fuksin, metilen mavisi, asit alkol karışımı (3 mL HCl, 97 mL etanol), kurutma kâğıdı.

İşlem Basamakları

1. Kuru preparat hazırlayınız.
2. Preparatı boyama düzeneğinin üstüne yerleştiriniz.
 - Preparatlar, birbiriyle temas etmeyecek şekilde konulmalıdır.
3. Preparatın üzerine karbol fuksin boya çözeltisi dökünüz.
4. Bir telin ucuna sarılmış pamuğu alkole batırarak yakınız ve preparatı alttan ısıtınız (Görsel 6.27).
 - Yaklaşık 30 cm uzunluğundaki bir telin ucuna pamuk sararak ısıtma teli hazırlanır.
5. Isıtma işlemine 5 dakika boyunca devam ediniz.
 - Isıtma işlemi sırasında buhar çıkmalı fakat kaynamamalıdır.
 - Preparatın üzerindeki boya eksildikçe kurumaya fırsat vermeden karbol fuksin eklenmelidir.
6. Preparat soğuyuncaya kadar bekleyiniz ve saf suyla yıkayınız (Görsel 6.28).
7. Preparatı asit-alkol karışımı ile renksiz sıvı akana kadar 1-2 dakika yıkayınız.
6. Preparatı saf suyla yıkayınız.
7. Preparatı metilen mavisi ile 1 dakika boyayınız ve saf su ile yıkayınız.
8. Preparatı oda sıcaklığında bekleterek kurutunuz.
 - Mikroskopik incelemede aside dirençli bakteriler kırmızı, diğer bakteriler mavi renkte görülür.



Görsel 6.27: Preparatın ısıtılarak boyanması



Görsel 6.28: Preparatın yıkınması

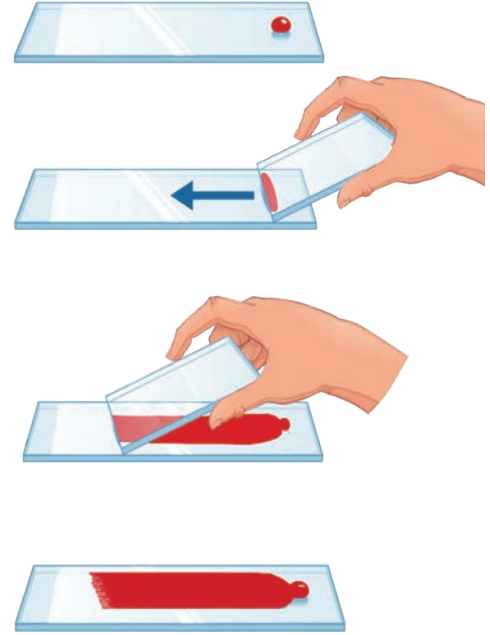
DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Kuru preparat hazırladı.				
2	Boyama düzeneğini ve ısıtma telini hazırladı.				
3	Preparatı alevde ısıtarak boyama işlemi yaptı.				
4	Dekolorizasyon işlemi yaptı.				
5	İkinci boya uygulaması, yıkama ve kurutma işlemi yaptı.				
TOPLAM PUAN					

6.3. İNDİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ

İndirekt boyama yöntemleri mikroorganizmaların morfolojileri ve kapsül varlığını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Bu yöntemde asidik boyalar kullanılır. Asidik boyalar; hücreleri değil, zemini boyadığından zemin renkli, mikroorganizmalar renksiz görünür.

6.3.1. Yaş Preparasyon Tekniği ile Negatif Boyama

Yaş preparasyon yönteminin direkt boyama yöntemlerinden farkı, preparatta kurutma ve fiksasyon işlemlerinin yapılmamasıdır. Preparatlarda kurutma ve fiksasyon işlemleri az da olsa hücrelerde büzüşme meydana getirir. Bu yöntemde hücre orijinal halini korur, hücrede değişiklik oluşmaz. Bu yöntemde çini mürekkebi kullanılmaktadır.



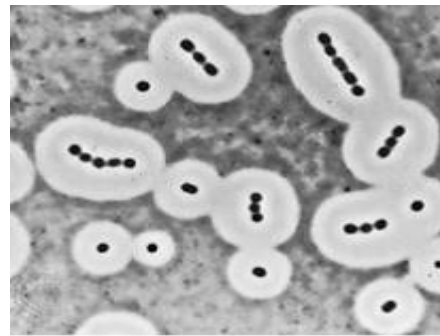
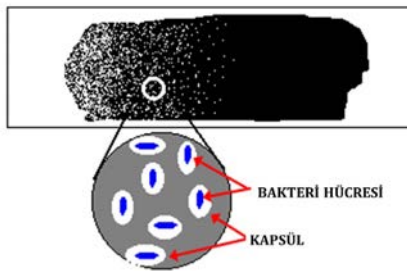
6.3.2. Yayma Yöntemi ile Negatif Boyama

Yayma yöntemi ile negatif boyamada preparat kurutulur fakat fiksasyon işlemi yapılmaz. İyi bir görüntü elde edebilmek için preparatta kültürün çok ince yayılması gerekmektedir. Preparat hazırlamada kültürün ince bir film tabakası halinde yayılmasında yardımcı bir lamın kullanıldığı işleme ince yayma veya **fruti** denilmektedir. Görsel 6.29'da fruti işleminin yapılışı gösterilmektedir.

Görsel 6.29: Yayma yöntemi ile negatif boyama

6.3.3. Negatif Diferansiyel (Ayırt Edici) Boyama

Bakterinin kapsüllü olup olmadığı, kapsül boyanarak belirlenebildiği gibi; zemin ve bakteri hücresi boyanarak da belirlenebilir. Bu durumda kapsül boyasız bir halka gibi görünür ve bu işlemde negatif diferansiyel boyama yöntemi kullanılır (Görsel 6.30). Zemin boyamada çini mürekkebi; bakteri hücresini boyamada ise kristal viyole tercih edilmektedir.



Görsel 6.30: Negatif diferansiyel boyama yönteminde kapsül varlığının tespiti

37. UYGULAMA

YAŞ PREPARASYON TEKNİĞİ İLE NEGATİF BOYAMA

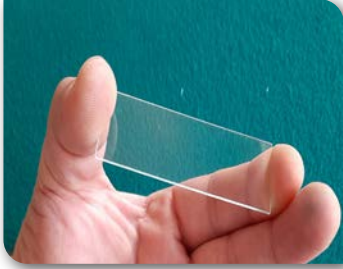
Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak yaş preparasyon tekniği ile negatif boyama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen bek, lam, lamel, kurutma kâğıdı, öze, kültür, çini mürekkebi veya nigrosin.

İşlem Basamakları

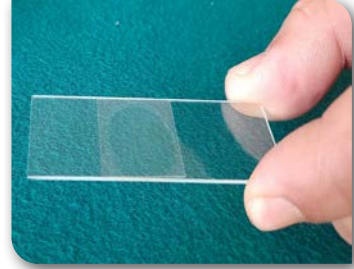
1. Temiz ve kuru bir lam alınız.
 - Lam karşılıklı kısa kenarlarından tutulmalı ve lamin yüzeyine dokunulmamalıdır (Görsel 6.31).
2. Katı kültürle çalışılacaksa lamin ortasına bir öze dolusu saf su aktarınız. Katı kültürden öze ile bir miktar alarak lam üzerindeki sıvı içerisinde çözündürünüz.
 - Aseptik çalışma kurallarına uyulmalıdır.
 - Kültür sıvı içerisinde tamamen çözündürülmelidir.
3. Sıvı kültürle çalışılacaksa kültürden direkt lam üzerine bir öze dolusu aktarınız.
4. Kültürün üzerine bir damla nigrosin veya çini mürekkebi koyarak öze ile karıştırınız.
 - Boya ile kültürün homojen bir şekilde karışması sağlanmalıdır.
5. Karışımın kenar kısmına yaklaşık 45° eğimle lamel değdirerek yavaşça üzerine kapatınız (Görsel 6.32).
6. Preparatın kurutma kâğıdının arasına koyarak başparmak ile lamele bastırınız.
 - Karışımın fazlasının kurutma kâğıdı tarafından emildiğinden emin olunmalıdır.
 - Lamin kırılmaması için dikkatli ve dengeli bastırılmalıdır.
 - Hazırlanan yaş preparat kurumadan mikroskopta incelenmelidir (Görsel 6.33).
 - Mikroskopik incelemede; zemin siyah, bakteri hücreleri renksiz görülür.



Görsel 6.31: Lamı tutma şekli



Görsel 6.32: Lamin kapatılma şekli



Görsel 6.33: Hazırlanmış yaş preparat

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Aseptik tekniğe uygun çalıştı.				
2	Katı kültürü saf suda çözündürdü.				
3	Kültür ile boyayı yaymadan karıştırdı.				
4	Preparatın üzerine lameli hava boşluğu kalmayacak şekilde kapattı.				
5	Kurutma kâğıdı ile kültürün fazlasını bastırarak aldı.				
TOPLAM PUAN					

38. UYGULAMA

YAYMA YÖNTEMİ İLE NEGATİF BOYAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak yayma yöntemi ile negatif boyama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

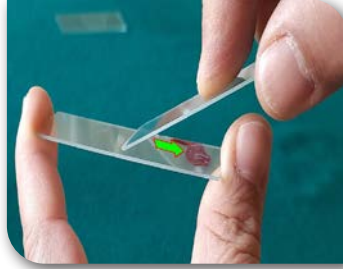
Bunzen bek, lam, öze, kültür, çini mürekkebi.

İşlem Basamakları

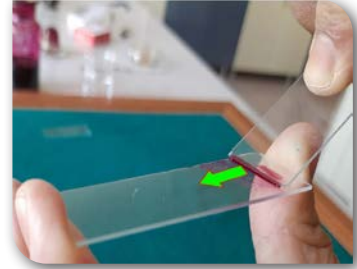
1. Lamin uç kısmına yakın bir bölgesine bir damla çini mürekkebi damlatınız (Görsel 6.34).
 - Lam karşılıklı kısa kenarlarından tutulmalı ve lamin yüzeyine dokunulmamalıdır.
2. İncelenecek kültürden öze ile alarak çini mürekkebi damlası içerisinde çözündürünüz.
 - Aseptik çalışma kurallarına uyulmalıdır.
 - Kültür sıvı içerisinde tamamen çözündürülmelidir.
3. Lamin ortasına yaklaşık 45° eğimle yardımcı lamin kısa kenarını değdiriniz.
 - Lam, üzerindeki karışım başparmağınız tarafında olacak şekilde tutulmalıdır.
 - Yardımcı lam, 45° açısının karışım tarafında olacak şekilde tutulmalıdır.
4. Yardımcı lamı, karışıma temas edinceye kadar, karışıma doğru çekerek karışıma temas edince lam hattı boyunca yayılmasını bekleyiniz (Görsel 6.35).
5. Yardımcı lamı, tek bir hareketle (sabit hızla) lamin diğer ucuna doğru kaydırınız (Görsel 6.36).
6. Preparatı havada kuruması için bekletiniz.
 - Preparat alevden geçirilmemeli, fiksasyon yapılmamalıdır.
 - Preparat kendi halinde bekletilerek (oda sıcaklığında) kurutulmalıdır.
 - Mikroskopik incelemede; zemin siyah, bakteri hücreleri renksiz görülür.



Görsel 6.34: Boya damlatılmış lam



Görsel 6.35: Yardımcı lamin karışıma doğru çekilmesi



Görsel 6.36: Yardımcı lamin ileri doğru itilmesi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Aseptik tekniğe uygun çalıştı.				
2	Kültür ile boyayı yaymadan karıştırdı.				
3	Yardımcı lamı tekniğine uygun olarak kullandı.				
4	Karışımı ince bir tabaka halinde fruti işlemi ile yaydı.				
5	Preparatı kuruttu.				
TOPLAM PUAN					

39. UYGULAMA

NEGATİF DİFERANSİYEL BOYAMA

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak negatif diferansiyel boyama çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen bek, lam, öze, kültür, çini mürekkebi, bazik fuksin veya kristal viyole, kurutma kâğıdı, sedir yağı.

İşlem Basamakları

1. Yayma yöntemi ile negatif boyama işlemlerini yapınız.
 - **Uygulama 38'deki önerilere uyararak işlem basamakları sırasıyla takip edilmelidir.**
2. Preparatı kristal viyole veya bazik fuksin boyası ile 1 dakika boyayınız.
3. Preparatı saf suyla çok yavaş ve hassas (tespit işlemi yapılmadığı için) bir şekilde yıkayınız.
4. Preparatı havada kuruması için bekletiniz.
 - **Preparat alevden geçirilmemeli, fiksasyon yapılmamalıdır.**
 - **Preparat kendi halinde bekletilerek (oda sıcaklığında) kurutulmalıdır.**
 - **Mikroskopik incelemede, zemin siyah, bakteri hücreleri kristal viyole kullanılmışsa mor; bazik fuksin ile boyanmışsa kırmızı renkli görülür. İncelenen bakteri kapsüllü ise kapsül hücre çevresinde saydam, renksiz bir halka olarak görülür.**

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Aseptik tekniğe uygun çalıştı.				
2	Yayma yöntemi ile negatif boyama işlemlerini yaptı.				
3	Preparatı kristal viyole veya bazik fuksin boyası ile boyadı.				
4	Preparatı yavaş ve hassas şekilde saf su ile yıkadı.				
5	Preparatı kuruttu.				
TOPLAM PUAN					

NOT ALINIZ




A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. Yaş preparatla mikroskopik inceleme yapılacaksa sıvı kültürün üzerine kapatılmalıdır.
2. Bakteri hücrelerinin, boyama veya yıkama esnasında sıvılarla beraber gitmesini engellemek amacıyla işlemi yapılır.
3. Bakteri hücreleri negatif elektriksel yüke sahip olduğundan boyanabilmesi için pozitif elektriksel yüke sahip olan boyalar kullanılmalıdır.
4. Gram bakterilerin hücre duvarında teikoikasit bulunur ve peptidoglikan tabakası daha kalındır.
5. Bazı bakteri türleri, olumsuz koşullar altında uzun süre kalırlarsa hücre içerisinde olarak adlandırılan özel yapılar oluşur.
6. Bazik boyalarla vejetatif hücreler kolayca boyanabildiği halde sporlar daha dirençli olmaları ve geçirgen olmamaları sebebiyle boyanamazlar. Bundan dolayı işlemi ile sporların dirençleri kırılarak boyanmaları sağlanmaktadır.
7. Tüberküloz (verem) hastalığının tanısında kullanılan boyama yöntemi hızlı, ucuz ve pratik bir yöntemdir.
8. Daha sonra kullanılmak üzere bozulmadan saklanabilecek hale getirilmiş preparatlara saklama preparatı denir. Saklama preparatı hazırlamak için kullanmak gerekir.
9. Preparata uygulandığında, bakteri hücrelerini boyamadığı için; hücrelerin renksiz, zemini boyadığından zeminin renkli görünmesini boyalar sağlar.
10. Bir telin ucuna sarılmış alkollü pamuk yakılarak preparatın boyama süresince ısıtıldığı yöntem boyamadır.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevabını işaretleyiniz.

11. Asidik boyalar bakterileri boyamaz, zemini boyar. Böylece bakteriler renksiz görünür.
Bu boyama türü aşağıdakilerden hangisidir?
A) Basit B) Bileşik C) Direkt D) Gram E) İndirekt
12. Boya ile boyanacak yüzey arasındaki tutuculuğu artırma etkisini ifade eden terim aşağıdakilerden hangisidir?
A) Dekolorizasyon B) Fiksasyon C) Mordant D) Oksokrom E) Preparat



13. Gram boyamada gram pozitif ve gram negatif bakteriler sırasıyla hangi renkte görülür?

- A) Kırmızı/yeşil B) Mor/kırmızı C) Mor/renksiz
D) Pembe/kırmızı E) Renksiz/mor

14. Gram boyamada, dekolorizasyonda aşağıdaki maddelerden hangisi kullanılır?

- A) Asit baz karışımı B) Etil alkol C) Isıl uygulama
D) Lugol çözeltisi E) Sulu fuksin

15. Gram boyamada, mordant etkisinden dolayı aşağıdakilerden hangisi kullanılır?

- A) Asit baz karışımı B) Etil alkol C) Isıl uygulama
D) Lugol çözeltisi E) Sulu fuksin

16. Boyanmış preparattan ileride tekrar faydalanılması için muhafaza edilmek istenirse aşağıdaki maddelerden hangisi kullanılır?

- A) Asit alkol karışımı B) Etil alkol C) İmmersiyon yağı
D) Kanada balsamı E) Metil alkol

17. Basit boyamada aşağıdaki boyalardan hangisi kullanılamaz?

- A) Kristal viyole B) Malaşit yeşili C) Metilen mavisi
D) Nigrosin E) Sulu fuksin

18. Zeminin çini mürekkebi ile bakteri hücresinin ise kristal viyole ile boyandığı; kapsülün boyanmadan boşluk şeklinde görüldüğü boyama yöntemi aşağıdakilerden hangisidir?

- A) Basit B) EZN C) Gram
D) Kapsül E) Negatif diferansiyel

19. Başka bir lam yardımıyla, örneğin ince bir film tabakası şeklinde yayıldığı işlem aşağıdakilerden hangisi ile ifade edilebilir?

- A) Dekolorizasyon B) Fiksasyon C) Fruti
D) Preparat E) Mordant

20. Vejetatif hücre; normal boyalarla boyanmasına karşın, sporun etrafında kalın muhafazaların bulunması ve bunların geçirgen olmaması boyanmalarını zorlaştırır. **Sporları boyamak için diğer boyama yöntemlerinden farklı olarak ne yapılır?**

- A) Boya çözeltisi hazırlanırken alkol kullanılması
B) Boyama esnasında ısı işlem uygulanması
C) Boyama esnasında UV ışın uygulanması
D) Boyama süresinin daha uzun tutulması
E) Konsantrasyonu yüksek boyaların kullanılması

7.

ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROSKOBİK İNCELEME

TEMEL KAVRAMLAR

Mikroskop
Preparat
Oküler Mikrometre
Objektif Mikrometre
Mikroskopik İnceleme
Asılı Damla Preparatı

KONULAR

- 7.1. PREPARAT İNCELEME
- 7.2. MİKROSKOPLA ÖLÇÜM
- 7.3. MİKROORGANİZMALARDA HAREKET

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Cihaz kullanma talimatlarına uygun mikroskop ile preparat incelemesi yapmayı,
- Cihaz kullanma talimatlarına uygun mikroskop ile uzunluk ölçümü yapmayı,
- Tekniğine uygun mikroorganizmalarda hareket muayenesi yapmayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Mikroskop, dürbün, teleskop gibi mercekli aletleri kullanırken tek gözünüzü kullanmanız gerekirse hangi gözünüzü kullanırsınız? Neden?
2. Mikroorganizmaların büyüklüğünü gündelik hayatta sıklıkla kullandığımız metre, santimetre veya milimetre ile ifade edebilir miyiz?
3. Mikroorganizmaların büyük çoğunluğunun hareket kabiliyeti yoktur. Buna rağmen mikroorganizmalar nasıl hızla yayılabilmektedir?



7.1. PREPARAT İNCELEME

Mikroskop, gözle görülmeyen, küçük canlı veya cansız nesnelerin incelenmesini sağlayan optik araçtır. İnsan gözü 0,2 mm'den (200 µm) daha küçük olan nesneleri ayırt edemez. 0,1 mm'den daha küçük nesneleri de göremez. Bu nedenle mikroorganizmaları görerek inceleyebilmek için mikroskop kullanma zorunluluğu vardır.

Mikroorganizmaların büyüklüklerini belirlemede uluslararası metrik sisteme ait ölçü birimlerinden yararlanılır. Küf, maya ve bakteriler mikrometre; virüsler nanometre, atom ve moleküller ise angstrom ölçü birimleri ile ifade edilirler.

1 mm = 1 000 µm (mikrometre)

1 µm = 1 000 nm (nanometre)

1 nm = 10 Å (angstrom)

7.1.1. Mikroskop Çeşitleri

Günümüzde farklı amaçlar için farklı özelliklere sahip mikroskoplar kullanılmaktadır. İşlevlerine göre mikroskopları 6 kategoriye ayırmak mümkündür.

- **Işık (Aydınlık Alan) Mikroskobu:** Birçok laboratuvarında (mikrobiyoloji, mikoloji, patoloji, histoloji, hematoloji, parazitoloji, biyokimya gibi) yaygın olarak kullanılmaktadır. Büyütme özelliği 40 ila 2 000 kattır.
- **Stereo Mikroskop:** Işık mikroskoplarına göre daha az büyötmeye (10-40 kat) sahip olmasına rağmen üç boyutlu görüntü inceleme özelliğinden dolayı bazı çalışmalarda tercih edilmektedir. Özellikle bitkilerin ve böceklerin vücut ve organelleri ile cansız materyallerin (toprak, yem, maden vb.) incelenmesinde kullanılmaktadır.
- **Karanlık Alan Mikroskobu:** Bu mikroskoplar, kondansatör yapılarının farklı olması nedeniyle ışık mikroskobundan ayrılır. Bu mikroskopta ışık preparata alttan değil, yandan gelerek preparatta bulunan nesneleri aydınlatmaktadır. Böylece incelenen nesne, karanlık sahada parlak yapılar olarak görölmektedir. Işık mikroskobunda görölemeyen bazı ince yapıli mikroorganizmaların (spiroket gibi) incelenmesinde kullanılır.
- **Faz Kontrast Mikroskobu:** Bu mikroskopların ışık mikroskobundan farkı, özel kondansatör ve optik sisteme (özel faz objektifleri) sahip olmasıdır. Bu mikroskoplar, sıvı ortam içerisinde mikroorganizmaların hücre içi yapılarının incelenmesinde kullanılır. Çözeltide ilerleyen ışığın farklı kırılma özelliğinden faydalanılarak mikroorganizmaların ve hücre yapılarının farklı koyulukta görölmelerini sağlar.
- **Floresan Mikroskobu:** Bu mikroskopların diğer mikroskoplardan farkı, ışık kaynağı olarak ultraviyole ışınlarının kullanılmasıdır. Bu mikroskoplarda görüntü elde edebilmek için preparatın, floresans boyalar ile boyanması gerekir. Yaygın olarak kullanılan floresans boyalar; flurescein (yeşil), rodamin (pembe), kinin sülfat, auramin, etidyum-bromür (DNA boyayıcı, altın sarısı), triflavindir. Bu boyalar kısa dalga boyundaki ışığı absorbe ederek uzun dalga boyunda yansıtırlar. Bu olaya floresans denir.
- **Elektron Mikroskobu:** Bu mikroskoplarda ışık kaynağı olarak elektronlar kullanılmaktadır. 20 000 ila 1 000 000 kat büyötmeye özelliğine sahiptir. Bu mikroskopların diğer mikroskoplardan farkı, ışık kaynağı olarak elektronların kullanılması ve cam mercek yerine elektromanyetik kondansatörlerin kullanılmasıdır.

7.1.2. Mikroskopun Kısımları

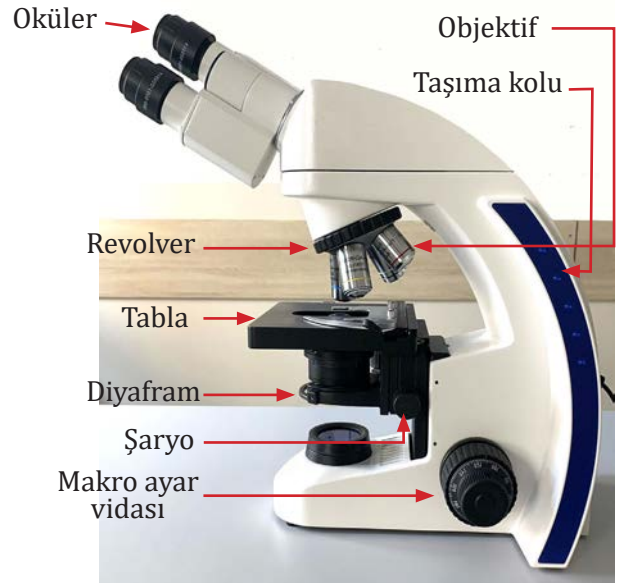
Mikroskop denildiğinde (özellği belirtilmemişse) ışık mikroskobu anlaşılır. Işık mikroskopları mekanik, optik ve aydınlatma kısımlarından oluşur (Görsel 7.1).

Mekanik Kısım: Bu kısım, oküler ve objektifleri taşıyan tüp, mikroskobu tutmaya yarayan kol, preparatı koymak için tabla ve mikroskopun zemine oturmasını sağlayan ayaktan (taban) oluşur.

Optik Kısım: Mikroskopta incelenen nesneleri büyütür ve görüntü elde edilmesini sağlayan kısımdır. Optik kısım, objektif ve okülerden meydana gelir. Objektifler farklı büyütme özelliğine sahiptir. Genel olarak 4x, 10x, 40x, 100x kat büyütme yapanlar kullanılmaktadır. Objektifler, kendi ekseninde etrafında dönebilen bir tablaya (revolver) sabitlenmiştir. Kullanılacak objektif, revolver yardımıyla ışık yolunun üzerine getirilerek görüntü bulunur. Oküler mikroskopta gözle bakılan kısımlardır. Genel olarak 5x, 10x, 15x, 20x kat büyütme yapanlar kullanılmaktadır. Bazı mikroskoplarda tek bir oküler (monoküler) bulunmasına karşın genellikle çift oküler (binoküler) bulunur.

Aydınlatma Kısım: Işık kaynağı, ayna, diyafram ve kondansatörden oluşur. Ayna, ışık kaynağından gelen ışığı preparata yansıtır. Kondansatör, ışığı preparat üzerinde toplar. Diyafram ise gelen ışığın, gereğine göre az veya fazla oranda kondansatöre girmesini sağlamada kullanılır.

Mikroskopun büyütme gücü, oküler ve objektifin büyütme güçlerinin çarpımına eşittir. Örneğin oküleri 10x, objektifi 100x olan bir mikroskopun büyütme gücü 1 000 kat (10 x 100) olur.



Görsel 7.1: Mikroskopun kısımları

7.1.3. Mikroskop Kullanımında Dikkat Edilecek Noktalar

Mikroskopları kullanırken dikkat edilmesi gereken kurallar aşağıda açıklanmıştır.

- Mikroskop, bir elle altından diğer elle kolundan tutularak iki elle taşınmalıdır.
- Mikroskopun konulduğu masa, sağlam olmalı; oturulacak sandalyenin boyu mikroskoba rahatça bakılacak boyda olmalıdır.
- Mikroskop, kullanılmadığı zamanlarda kılıfı içinde veya dolapta muhafaza edilmelidir.
- Mikroskop; yumuşak dokulu, kalıntı bırakmayan temiz bir bezle her kullanımdan sonra temizlenmelidir.
- Çalışma bitiminde mikroskop, küçük objektife ayarlı ve tabla en alt noktada olacak şekilde bırakılmalıdır.
- Objektif ve okülerler hiçbir zaman gereksiz yere yerlerinden çıkarılmamalıdır.
- Mikroskopların merceklerine elle dokunulmamalıdır.

7.1.4. Mikroskopun Temizliği ve Bakımı

Mikroskoptan iyi bir görüntü elde edebilmek için mikroskopun temizliği, bakımı ve ayarlarının iyi yapılması gerekir. Mikroskopların çalışmadan önce ve sonra hassas bir şekilde temizlenmesi gerekir. Mikroskop, kullanıldıktan sonra immersiyon yağ kalıntısı kalmayacak şekilde temizlenmelidir. İmmersiyon yağını temizlemek için çok az miktarda temizleme solüsyonu ile nemlendirilmiş yumuşak dokulu, kalıntı bırakmayan temiz bir bez (tülbent, mercek temizleme bezi veya kâğıdı) kullanılır (Görsel 7.2). Temizleme solüsyonu olarak 7 kısım eter, 3 kısım etanol karışımı kullanılır. Bu karışım yoksa ksilol kullanılabilir. Optik kısım alkol, pamuk, sert dokulu bezlerle silinmemelidir. Mikroskop, asla güneşte veya sıcakta bırakılmamalıdır. Günlük çalışma bittikten ve mikroskopun temizliği tamamlandıktan sonra mikroskopun örtüsü örtülmeli veya kabına yerleştirilerek muhafaza edilmelidir (Görsel 7.3).



Görsel 7.2: Mikroskop objektiflerinin temizliği



Görsel 7.3: Mikroskopların muhafazası

Mikroskoptaki lekelerin okülerde mi yoksa objektifte mi olduğunu anlamak için okülerleri kendi eksenini etrafında döndürmek yeterlidir. Şayet leke okülerde ise okülerin hareketi ile beraber leke de yer değiştirir. Okülerin hareketi ile yer değiştirmeyen lekeler ise objektifte demektir.

7.1.5. Mikroskop Kullanımı

Mikroskop kullanımında öncelikle mikroskopun sağlam, sarsıntısız bir masa üzerine konulması gerekir. İncelenecek preparat, tablada kısıpçılara tutturularak yerleştirilir. Görüntü bulmada şaryo, ışık, diyafram, makro ve mikro ayarların iyi yapılması gerekir. Şaryo ile preparat sağa sola, ileri geri hareket ettirilebilir. Şaryo ile görüntünün bulunacağı nokta, ışık yolu üzerine getirilmelidir. Preparatın özelliğine göre ışık miktarı azaltılıp çoğaltılır. Preparat kalın, renkli ve koyu ise ışık miktarı artırılır. Diyafram ayarı açılıp kapatılarak ışığın görüntü üzerinde toplanması sağlanır. Makro ayar vidası ile tabla aşağı yukarı hareket ettirilerek görüntü bulunur. Mikro ayar vidası, sadece görüntünün netleştirilmesi amacı ile kullanılmalıdır. Ayrıca incelemeyi yapan kişinin göz odaklanma seviyesini ayarlayabilmesi için okülerin birisinde diyoptri ayarı vardır. İhtiyaç duyulması halinde diyoptri ayarı kullanılabilir. 100x büyütme objektiflere immersiyon objektifi denir. İmmersiyon objektifinde görüntünün daha net görünmesi için immersiyon (sedir) yağı kullanılır.

40. UYGULAMA

MİKROSKOPTA KURU OBJEKTİF İLE PREPARAT İNCELEME

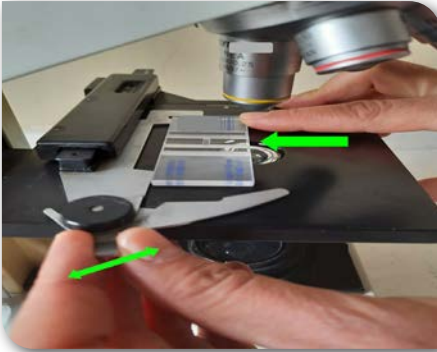
Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak mikroskopta kuru objektif ile preparat inceleme çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

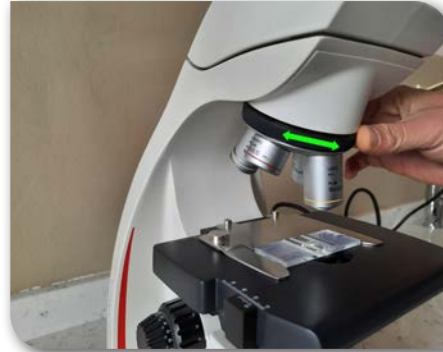
Mikroskop, hazır preparat, ksilol, mercek temizleme bezi.

İşlem Basamakları

1. Preparatı mikroskop tablasına yerleştirerek sabitleyiniz (Görsel 7.4).
 - Preparat, tabla üzerinde bulunan kısıklara tutturulmalıdır.
2. Önce dörtlük objektifi preparat üzerine gelecek şekilde çeviriniz.
 - Revolver çevrilerek kullanılacak objektif ışık yolu üzerine getirilmelidir (Görsel 7.5).
 - Objektifin yuvasına oturduğundan emin olunmalıdır.



Görsel 7.4: Preparatın tablaya yerleştirilmesi



Görsel 7.5: Objektifin ışık yoluna getirilmesi

3. Oküler arasında ki mesafeyi göz aralığınıza eşit olacak şekilde ayarlayınız (Görsel 7.6).
4. Gerekli ise diyoptri ayarını yapınız (Görsel 7.7).
 - Diyoptri ayarı genellikle tek oküler üzerinde bulunur.
 - Kişilere göre göz odaklama seviyelerinin ayarlanabilmesi için diyoptri ayarı yapılır.
5. Mikroskobun ışığını açarak ışık ayarını yapınız (Görsel 7.8).
 - Işık miktarı, preparatın boyalı- boyasız, açık-koyu renkli olma durumuna göre azaltılıp çoğaltılmalıdır.
 - Boyasız ve ince yayılmış preparatlarda ışık miktarı azaltılmalıdır.



Görsel 7.6: Okülerde göz aralığı mesafesinin ayarlanması

6. Mikroskobun diyafram ayarını yapınız (Görsel 7.9).
 - Boyasız, az boyalı veya yoğun olmayan preparatlar incelenecekse diyafram kısık; boyalı veya yoğun preparatlar incelenecekse diyafram açık olmalıdır.
7. Şaryo ayar vidasını çevirerek incelenecek alanı ışık üzerine getiriniz (Görsel 7.10).
8. Makro ayar vidasını görüntüyü buluncaya kadar çeviriniz (Görsel 7.11).
- Bu işlem süresince okülerden bakılmalıdır.
9. Mikro ayar vidası ile görüntüyü netleştiriniz.
10. Görüş alanındaki görüntüyü inceleyiniz.
11. Görüş alanını şaryo ayar vidasını çevirerek değiştiriniz.
12. Farklı görüş alanındaki görüntüleri inceleyiniz.
13. Sırasıyla 10x ve 40x büyütmeli objektifle görüntüyü inceleyiniz.



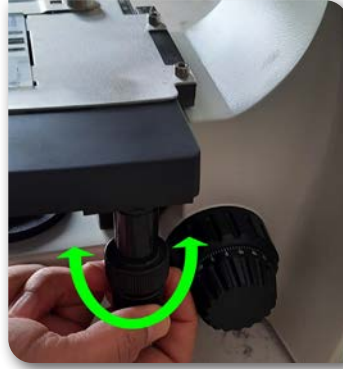
Görsel 7.7: Diyoptri ayarının yapılması



Görsel 7.8: Işık miktarının ayarlanması



Görsel 7.9: Diyafram ayarının yapılması



Görsel 7.10: Şaryonun kullanımı



Görsel 7.11: Makro ayar vidası ile görüntü aranması

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Mikroskobu kullanıma hazır hale getirdi.				
2	Preparatı tablaya yerleştirdi.				
3	Işık, diyafram ve şaryo ayarlarını yaptı.				
4	Mikroskopta görüntüyü bularak netleştirdi.				
5	Farklı objektif ve görüş alanlarında görüntü inceledi.				
TOPLAM PUAN					

41. UYGULAMA

MİKROSKOPTA İMMERSİYON OBJEKTİF İLE PREPARAT İNCELEME

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak mikroskopta immersiyon objektif ile preparat inceleme çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Mikroskop, preparat, immersiyon yağı, ksilol, mercek temizleme bezi.

İşlem Basamakları

1. Kuru objektifle preparat incelemesi yapınız.
 - **Uygulama 41'de belirtilen işlem basamakları ve önerilere uyulmalıdır.**
2. Kuru objektifte inceleme yaparken belirlediğiniz (immersiyon objektifi ile incelemek istediğiniz) yeri görüntü alanının ortasına getiriniz.
3. Preparat üzerinde incelenen bölgeye bir damla sedir yağı damlatınız (Görsel 7.12).
4. İmmersiyon objektifini, ışık yolu üzerine getiriniz.
 - **Tablanın en alt seviyede olduğundan emin olunmalıdır.**
5. Tablanın kenarından bakılarak makro ayar vidası yardımıyla immersiyon objektifinin ucunu yağa temas ettiriniz (Görsel 7.13).
6. Mikroskobun ışık ve diyafram ayarlarını yapınız.
7. Okülerden bakarak mikro ayar vidasını çevirerek görüntü bulunuz.
8. Mikro ayar vidası ile görüntüyü netleştiriniz.
9. Şaryo ile preparatı hareket ettirerek farklı görüş alanlarını inceleyiniz.
10. İnceleme bitince makro ayar vidası ile tablayı aşağıya indiriniz.
11. Preparatı çıkararak dezenfektan çözeltisi içerisine atınız.
12. Mikroskobu temizleyerek yerine kaldırınız.
 - **Mikroskobun temizliğinde yumuşak dokulu, kalıntı bırakmayan temiz bir bez (tülbent, mercek temizleme bezi veya kâğıdı) kullanılmalıdır.**
 - **Temizleme solüsyonu olarak 7 kısım eter, 3 kısım etanol karışımı; o yoksa ksilol kullanılmalıdır.**
 - **Objektifte yağ kalıntısı kalmayacak şekilde temizlenmelidir.**
 - **Mikroskop; kapalı bir dolapta veya örtüsü örtülerek muhafaza edilmelidir.**



Görsel 7.12: Preparatta inceleme yapılacak alana sedir yağı damlatılması



Görsel 7.13: İmmersiyon objektif ucunun sedir yağına temas ettirilmesi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Kuru objektifle preparat incelemesi yaptı.				
2	İmmersiyon objektifinin ucunu yağa temas ettirerek ışık ve diyafram ayarlarını yaptı.				
3	Görüntüyü bularak inceledi.				
4	Mikroskobun temizliğini yaptı.				
5	Farklı görüş alanları inceledi.				
TOPLAM PUAN					

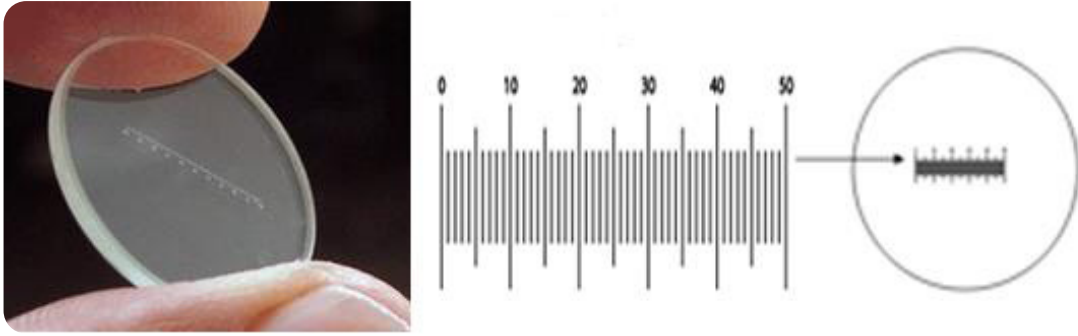
7.2. MİKROSKOPLA ÖLÇÜM

Bazı çalışmalarda, mikroskopik nesnelerin boyutlarının ölçümü gerekmektedir. Bakteri, maya ve küf hücreleri, küf sporları, spor torbaları, parazit hücreleri, balık yumurtaları gibi nesnelerin boyutlarının ölçümleri yapılabilmektedir. Mikroskopik ölçüm işlemi genellikle araştırma kurum ve kuruluşları ile araştırma-geliştirme laboratuvarlarında yaygın olarak yapılmaktadır. Mikroskopla ölçüm işleminde, oküler ve objektif mikrometre kullanılır.

7.2.1. Oküler ve Objektif Mikrometre

Oküler Mikrometre

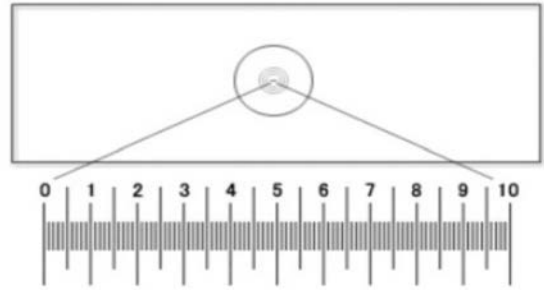
Daire şeklinde oküler içerisine konularak kullanılan bir lamdır. Üzerinde cetveli vardır (Görsel 7.14). Ölçüm işlemine geçmeden önce cetvelin ölçü birim değerinin objektif mikrometre yardımıyla hesaplanması gerekir. Çünkü büyütme gücüne göre bu değer değişir. Bu değer, ölçümde kullanılacak objektifin büyütme gücü arttıkça küçülür.



Görsel 7.14: Oküler mikrometre

Objektif Mikrometre

Üzerinde cetveli bulunan dikdörtgen şeklinde bir lamdır (Görsel 7.15). Cetvel, 1 mm'nin 100 eşit birime bölünmesi ile oluşturulmuştur. Her birim $1\text{mm}/100=0,01\text{ mm}$ 'dir. Yani her birim 10 mikrometreye eşittir. Preparatta olduğu gibi mikroskop tablasına yerleştirilerek kullanılır. Ölçüm öncesinde oküler mikrometrenin çizgileri arasındaki mesafenin hesaplanmasında kullanılır.

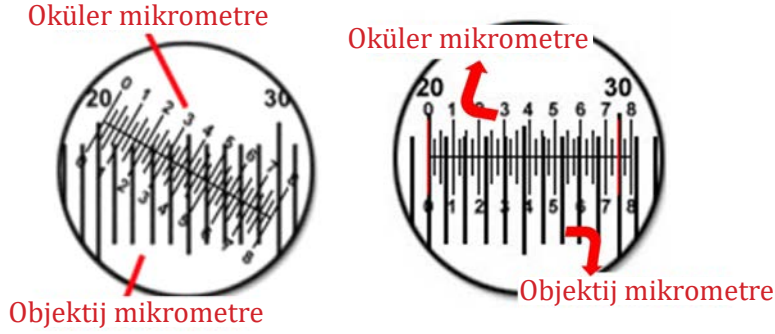


Görsel 7.15: Objektif mikrometre

7.2.2. Oküler Mikrometre Cetvelinin Birim Değerinin Bulunması

Uygulama 40 ve 41'de açıklanan işlem basamakları ve öneriler bu çalışma için de geçerlidir. Mikroskopun temizliğinden emin olduktan sonra daire şeklinde olan oküler mikrometre, okülere yerleştirilir. Objektif mikrometre ise mikroskop tablasına yerleştirilerek maşalarla sabitlenir. Ölçüm işleminde kullanılacak objektif ile görüntü bulunur.

Oküler ve objektif mikrometrenin cetvel çizgileri birbirine paralel hale getirilir ve başlangıç çizgileri çakıştırılır (Görsel 7.16). Bu işlem okülerin döndürülmesi ve şaryo yardımıyla yapılır. Oküler ve objektif mikrometrenin başlangıç çizgilerinden başka diğer çakışan çizgilerinin kaçınıcı çizgi olduğu belirlenir ve oküler mikrometrenin çizgileri arasındaki mesafe hesaplanır.



Görsel 7.16: Oküler ve objektif mikrometre cetvel çizgilerinin paralel hâle getirilmesi

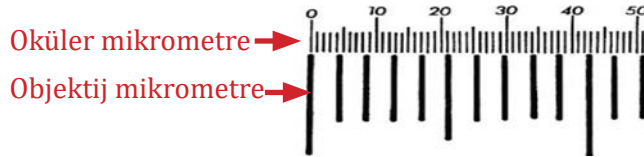
ÖRNEK



Görseldeki mikroskop görüntüsünde oküler mikrometrenin 51. çizgisi objektif mikrometrenin 12. çizgisi ile çakışmaktadır. Objektif mikrometrede bulunan iki çizgi arası 10 mikrometre (0,01 mm) olduğundan;

$$12 \times 10 = 120 \mu\text{m}$$

$$120 \mu\text{m} / 51 = 2,35 \mu\text{m} \text{ (Oküler mikrometrenin iki çizgisi arasındaki mesafe) olur.}$$



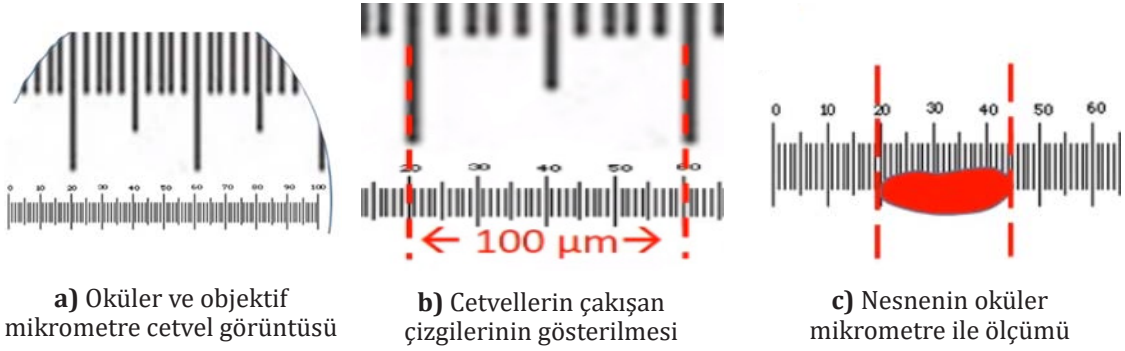
SIRA SİZDE



Mikroskopla ölçüm çalışmasında oküler ve objektif mikrometre cetvelleri birbirlerine paralel hale getirilerek başlangıç çizgileri çakıştırılmıştır. Mikroskop görüntüsü aşağıda verilmiştir. Bu durumda oküler mikrometrenin ölçü birim değerini hesaplayınız.



7.2.3. Oküler Mikrometre ile Ölçümü Yapılan Nesnelerin Gerçek Boyutlarının Hesaplanması



Görsel 7.17: Örnek çalışma ve hesaplama

Görsel 7.17’de örnek bir çalışma ve hesaplama şekil üzerinde gösterilmiştir. Görsel 7.17.a’da oküler ve objektif mikrometre çizgilerinin birbirine paralel hali görülmektedir. Görsel 7.17.b’de objektif mikrometrenin 10 biriminin oküler mikrometrenin 40 birimine (60-20) denk geldiği görülmektedir. Bu durumda;

$$10 \times 10 = 100 \mu\text{m}$$

$$100 \mu\text{m} / 40 = 2,5 \mu\text{m} \text{ (Oküler mikrometrenin iki çizgisi arasındaki mesafe) olur.}$$

Görsel 7.17.c’de ölçümü yapılacak nesnenin boyunun oküler mikrometrenin 25 birimine (45-20) denk geldiği görülmektedir. Bu durumda nesnenin gerçek boyu,

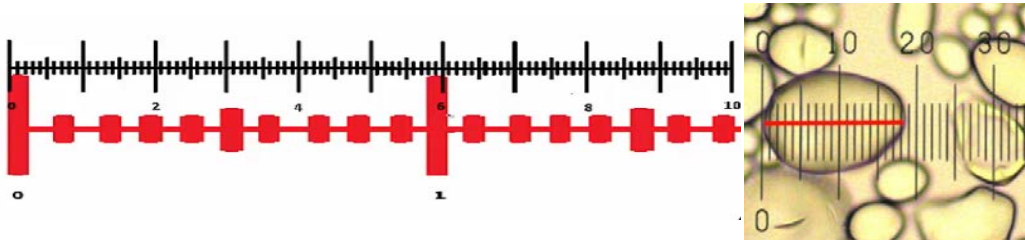
$$25 \times 2,5 = 62,5 \mu\text{m} \text{ olur.}$$

SIRA SİZDE



Mikroskopla ölçüm çalışmasında elde edilen veriler aşağıdaki görsellerde verilmiştir. Bu durumda ölçümü yapılan hücrenin gerçek boyutunu hesaplayınız.

Not: Kırmızı renkli cetvel objektif mikrometreye aittir.



42. UYGULAMA

MİKROSKOBİK ÖLÇÜM

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak mikroskopik ölçüm çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Mikroskop, oküler ve objektif mikrometre, preparat, sedir yağı.

İşlem Basamakları

- Oküler mikrometreyi okülerin içine yerleştiriniz.
 - Mikroskopun ışığı açılıp diyaframı kısarak temiz olup olmadığı kontrol edilir.
 - Temiz değilse temizlendikten sonra oküler mikrometre yerleştirilir.
- Objektif mikrometreyi mikroskop tablasına yerleştirerek kıskaçla sabitleyiniz.
 - Objektif ve oküler mikrometre kenarlarından tutulmalı, yüzeylerine dokunulmamalıdır.
- Ölçüm yapmada kullanılacak objektifi, ışık yoluna getiriniz.
 - Revolveri çevirerek objektifin çalışma yuvasına tam olarak yerleştiğinden emin olunmalıdır.
- Mikroskopun ışık ve diyafram ayarlarını yapınız.
 - Işık ve diyafram gereğinden fazla açılmamalıdır.
- Objektif mikrometre cetvelinin bulunduğu alanı şaryoyu kullanarak ışık üzerine getiriniz.
- Makro ayar vidasını kullanarak görüntüyü bulunuz.
- Mikro ayar vidasını kullanarak görüntüyü netleştiriniz.
- Oküler ve objektif mikrometre cetvel çizgileri birbirlerine paralel oluncaya kadar oküleri çeviriniz.
 - İçerisinde mikrometre bulunan oküler yavaş yavaş döndürülmelidir.
- Şaryo ayar vidasını kullanarak cetvel başlangıç çizgilerini çakıştırınız.
 - Başlangıç çizgilerinin tam olarak üst üste geldiğinden emin olunmalıdır.
- Diğer çakışan çizgiyi belirleyiniz.
 - Başlangıç çizgileri sıfır olarak değerlendirilmelidir.
- Oküler mikrometrede iki çizgi arasının ölçü miktarını hesaplayınız.
 - Objektif mikrometrenin çizgileri arasındaki mesafenin 10 μm olduğu unutulmamalıdır.
- Objektif mikrometreyi çıkartınız.
 - Temizleyip kutusuna koyulmalıdır.
- Ölçüm yapılacak preparatı tablaya yerleştirerek görüntüyü bulunuz.
- Ölçüm yapılacak nesneyi oküler mikrometrenin cetveliyle çakıştırınız.
- Oküler mikrometreyle nesneyi ölçünüz.
- Ölçümü yapılan nesnenin boyutlarını hesaplayınız.
 - Ölçü birimleri belirtilmeli ve küsurat göz kararıyla oransal olarak belirlenmelidir.

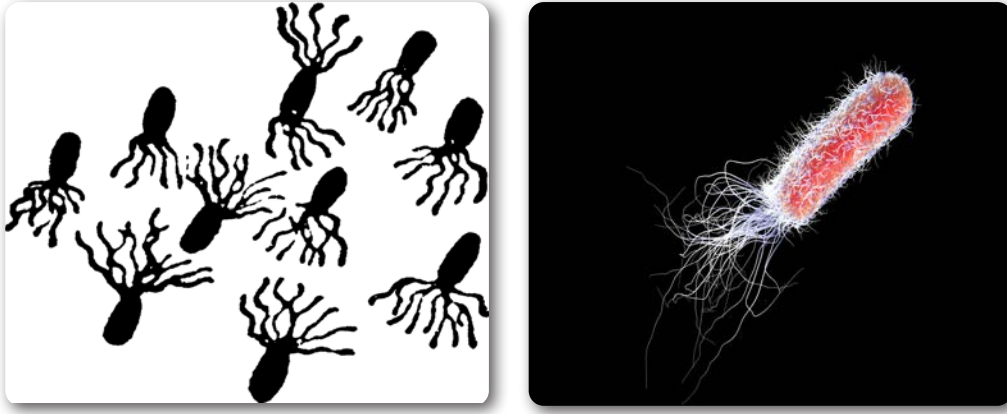
DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Mikroskobu tekniğine uygun olarak kullandı.				
2	Oküler ve objektif mikrometre görüntülerini buldu.				
3	Oküler mikrometre ölçü birim değerini belirledi.				
4	Oküler mikrometre ile nesnenin boyutlarını ölçtü.				
5	Nesnenin boyutlarını hesapladı.				
TOPLAM PUAN					

7.3. MİKROORGANİZMALARDA HAREKET

Mikroorganizmalarda hareket muayenesi, yarı katı besiyerinde saplama ekim yöntemi veya mikroskopta asılı damla yöntemi ile yapılabilmektedir. Yarı katı besiyeri yöntemi, uzun sürmesi ve sonucun gözlemlenmesindeki zorluklar sebebiyle az tercih edilen bir yöntemdir.

7.3.1. Bakterilerde Hareket

Bakterilerde hareket organeli kamçıdır. Kamçı her bakteri türünde bulunmamaktadır. Kamçı olan ve aktif hareket edebilme özelliğine sahip bakteriler hareketli, kamçısı olmayan bakteriler ise hareketsiz kabul edilmektedir (Görsel 7.18).



Görsel 7.18: Bakterilerde kamçı ve hareket

Aktif hareket, bakterinin kendi gayreti ile bulunduğu yerden başka bir yere gitmesidir. Mikroorganizmaların taşınması ve yayılmasında aktif hareketten daha ziyade pasif hareket etkilidir. Bir bakterinin kendi gayreti olmaksızın çevresel faktörlerin etkisi ile bulunduğu yerden başka bir yere taşınması olayına **pasif hareket** denir.

Kamçıya sahip olmayan bazı bakteri türleri (*M. tuberculosis* ve *C. pyogenes* gibi) bulundukları yerde kendi etrafında dönme (titreme, *brownian*) hareketi yaparken, bazıları (*leptospira* gibi) ise bükülerek, kıvrılarak veya sürünerek hareket edebilmektedirler. Aktif hareket kabiliyetine sahip olan bakterilere örnek olarak *Salmonella* ve *E. coli* verilebilir.

Bakterilerin türlerinin belirlenmesinde hareket ayırt edici bir özelliktir. Bu amaçla bakterilerde hareket muayenesi yapılmaktadır. Bakterilerde hareket muayenesi kamçı varlığının belirlenmesi yoluyla değil, hareketin gözlenmesi ile tespit edilmektedir.

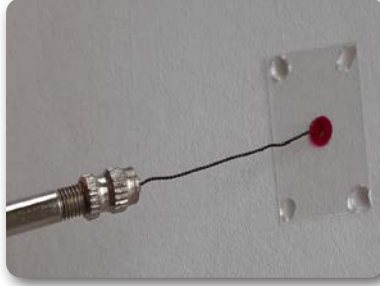
7.3.2. Asılı Damla Yöntemi ile Bakterilerde Hareket Muayenesi

Hareket muayenesi sıvı besiyerinde hazırlanmış, saf ve genç (18–24 saatlik) kültürlerde yapılır. Bu yöntemde genellikle çukur lam kullanılmaktadır. Çukur lamın olmaması durumunda lam ile lameli birbirinden ayıracak silindirik halkaya ihtiyaç vardır.

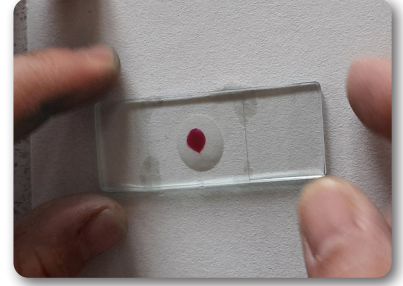
Temiz bir lamelin dört köşesine veya çukur lamın çukur kısmının dört köşesine vazelin veya sedir yağından az miktarlarda (toplu iğne başı kadar) sürülür (Görsel 7.19). Lamelin ortasına, sıvı kültürden bir öze dolusu konur (Görsel 7.20). Çukur lam ters çevrilerek çukur kısmı kültürün üzerine gelecek şekilde kapatılır (Görsel 7.21). Vazelin veya sedir yağı lam ile lamelin yapışmasını sağlar. Seri bir şekilde ters çevirerek lamelin lamın üstüne gelmesi sağlanır. Sıvı kültürün asılı halde (boşlukla sarkar bir durumda) kalması ve kenarla temas etmemesi gerekir (Görsel 7.22).



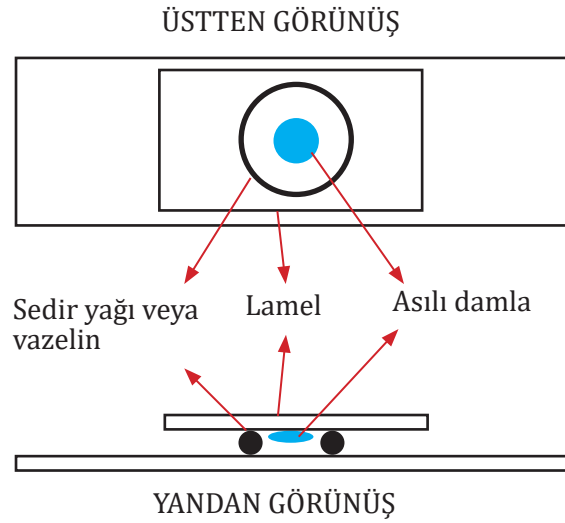
Görsel 7.19: Lamelin köşelerine vazelin sürülmesi



Görsel 7.20: Lamelin ortasına öze ile sıvı kültür aktarma



Görsel 7.21: Çukur lamın lamelin üzerine kapatılması



Görsel 7.22: Asılı damla preparatı

Hazırlanan preparat geciktirilmeden immersiyon objektifinde incelenir. Preparat dikkatli hareket ettirilmelidir. Şayet asılı damla düşerse veya kenara temas ederse preparat yeniden hazırlanmalıdır. Mikroskopta iyi bir görüntü elde edilebilmesi için ışık ve diyafram ayarlarının yeterince kısılması gerekir.

43. UYGULAMA

ASILI DAMLA YÖNTEMİ İLE BAKTERİLERDE HAREKET MUAYENESİ

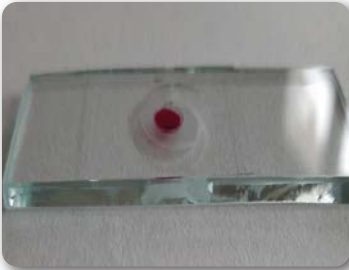
Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak asılı damla yöntemi ile bakterilerde hareket muayenesi çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

**Kullanılacak
Araç Gereç**

Mikroskop, çukur lam, lamel, kültür, sedir yağı, ksilol, FTS, dezenfektan çözeltisi, öze.

İşlem Basamakları

- Kültür katı ise FTS içerisinde çözündürerek sıvı kültüre dönüştürünüz.
 - Aseptik tekniğe uygun çalışılmalıdır.
 - Kültürün tamamen çözünmesi sağlanmalıdır.
- Lamelin 4 kenarına sedir yağı veya vazelin sürünüz (Görsel 7.19).
 - Lamelin kenarlarından tutulmalı, lamelin yüzeyine dokunulmamalıdır.
- Lamelin ortasına sıvı kültürden bir öze dolusu alarak koyunuz (Görsel 7.20).
 - Öze bek alevinde steril edilip soğutulduktan sonra kullanılmalıdır.
- Çukur lamın çukur kısmı kültürün üzerine gelecek şekilde kapatınız (Görsel 7.21).
 - Kültürün lamın çukur kısmının ortasında kalması sağlanmalıdır.
- Lamı ters çevirerek lamelin üste gelmesini sağlayınız (Görsel 7.23).
 - Dikkatli ve seri çalışılmalıdır.
- Asılı damla preparatını mikroskopta immersiyon objektifinde inceleyiniz (Görsel 7.24).
 - İncelenecek bölgenin üzerine 1 damla sedir yağı damlatılması gerektiği unutulmamalıdır. Bakterilerin hareketli olup olmadığını belirlerken dikkatli gözlem yapılmalıdır.
- İncelemesi biten preparatları dezenfektan içerisine atınız (Görsel 7.25).
 - Çalışma sonrası ellerin yıkanması unutulmamalıdır.



Görsel 7.23: Çukur lamın ters çevrilmiş hali



Görsel 7.24: Asılı damla preparatının mikroskopta incelenmesi



Görsel 7.25: İncelemesi biten preparatın dezenfektana atılması

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Aseptik tekniğe uygun çalıştı.				
2	Mikroskobu tekniğine uygun olarak kullandı.				
3	Asılı damla preparatını hazırladı.				
4	Asılı damla preparatını immersiyon objektifinde inceledi.				
5	İnceleme sonrası işlemlerini yaptı.				
TOPLAM PUAN					

A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. Atom ve moleküller angstrom; virüsler nanometre ile küf, maya ve bakteriler ise..... ölçü birimi ile ifade edilirler.
2. Işık mikroskoplarına göre daha az büyütme özelliğine sahip olmasına rağmen üç boyutlu görüntü inceleme özelliğinden dolayı bitkilerin ve böceklerin incelenmesinde mikroskoplar tercih edilirler.
3. Mikroskobun temizliğinde yumuşak dokulu, kalıntı bırakmayan temiz bir bez kullanılır. Temizleme solüsyonu olarak ise 7 kısım eter, 3 kısım etanol karışımı, yoksa kullanılır.
4. Mikroskopta görüntü bulmada şaryo, ışık, diyafram, makro ve mikro ayarların iyi yapılması gerekir. ile preparat sağa sola, ileri geri hareket ettirilebilir.
5. Üzerinde 10 mikrometre ölçüm aralığına sahip cetveli bulunan dikdörtgen şeklindeki lam olarak adlandırılır.
6. Oküler mikrometrenin 100. çizgisi objektif mikrometrenin 10. çizgisi ile çakışırsa oküler mikro metrenin iki çizgisi arasındaki mesafe µm olur.
7. Bakterilerde aktif hareketi sağlayan organelidir.
8. Bakterilerin kendi gayreti olmaksızın çevresel faktörlerin etkisi ile bulunduğu yerden başka bir yere taşınması olayına denir.
9. Hareket muayenesi genç ve kültürlerle yapılır.
10. Mikroskoplarda kullanıcıların göz odaklama seviyelerini ayarlayabilmesi için ayarı yapılır.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevabını işaretleyiniz.

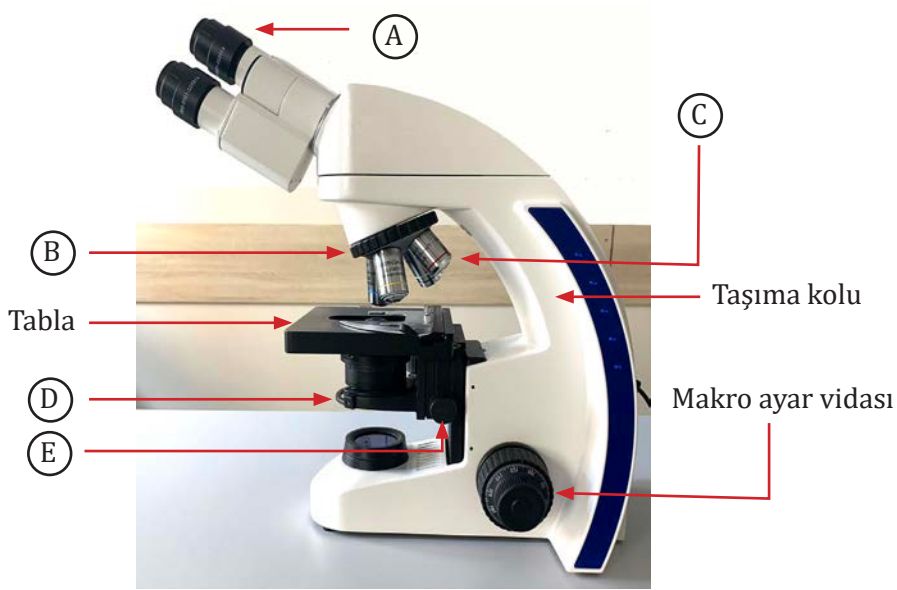
11. İmmersiyon objektifinin büyütme gücü ne kadardır?
A) 10 B) 40 C) 60 D) 100 E) 1 000
12. Objektifin büyütme gücü 40, okülerin büyütme gücü 20 ise bu mikroskopla incelediğimiz cisimleri kaç kat büyütülmüş olarak görürüz?
A) 400 B) 800 C) 1 000 D) 4 000 E) 8 000
13. Işık kaynağı olarak ultraviyole ışınlarının kullanıldığı mikroskop hangisidir?
A) Elektron B) Faz kontrast C) Floresan D) Karanlık alan E) Işık
14. En fazla büyütme olanağı olan mikroskop hangisidir?
A) Elektron B) Faz kontrast C) Floresan D) Karanlık alan E) Işık

15. Kullandığınız mikroskobun incelediğiniz objeyi ne kadar büyüttüğünü nasıl hesaplarsınız?

- A) Oküler ile kullandığınız objektife ait büyütme değerlerini çarparak
- B) Objektif üzerinde yazan büyütme değerini okuyarak
- C) Oküler ile objektife ait büyütme değerlerini toplayarak
- D) Objektif ile okülere ait büyütme değerlerini birbirinden çıkararak
- E) Oküler ve objektif mikrometre ile ölçüm yaparak

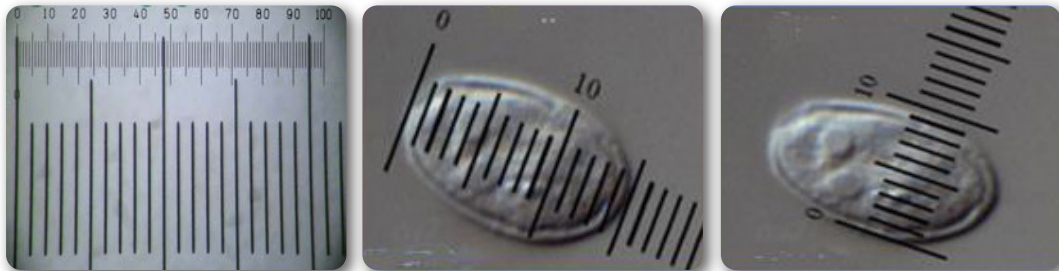
C) Aşağıdaki soruları cevaplayınız.

16. Görseldeki mikroskopta “büyük harflerle” gösterilen parça isimlerini aşağıdaki tabloda ilgili bölüme yazınız.

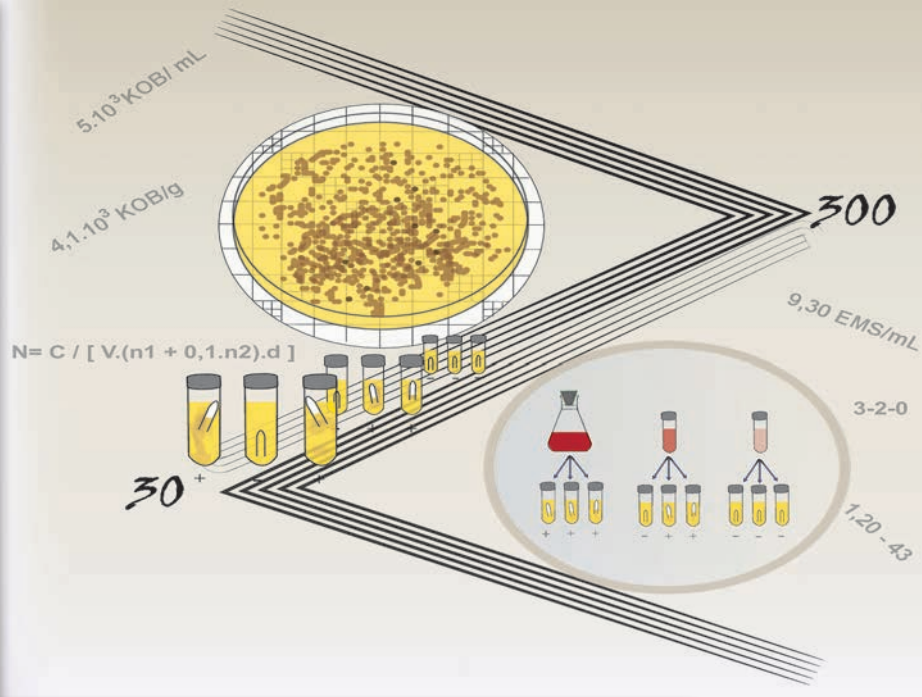


A	
B	
C	
D	
E	

17. Mikroskopla ölçüm çalışmasında elde edilen veriler aşağıdaki görsellerde verilmiştir. Bu durumda ölçümü yapılan hücrenin gerçek boyutlarını hesaplayınız.



8. ÖĞRENME BİRİMİ



KÜLTÜREL SAYIM

TEMEL KAVRAMLAR

Koloni Oluşturan Birim
Koloni Sayıcı
En Muhtemel Sayı

KONULAR

- 8.1. KÜLTÜREL SAYIM YÖNTEMLERİ
- 8.2. YAYMA PLAK YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM
- 8.3. EN MUHTEMEL SAYI (EMS) YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Numunenin özelliğine ve tekniğine uygun olarak;
- Dökme plak yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapmayı,
 - Yüzeye yayma yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapmayı,
 - EMS yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapmayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Gıdalardaki mikroorganizma sayısı neden önemlidir?
2. İncelenen numunenin içerdiği mikroorganizma sayısını kesin olarak belirlemek mümkün müdür?
3. Günlük hayatta kullanılan herhangi bir konuya ait istatistiksel veriler, ilgili konu hakkında genel bir kanaata varmamızı sağlar mı?



8.1. KÜLTÜREL SAYIM YÖNTEMLERİ

İncelenen numunenin birim miktarındaki yaklaşık mikroorganizma sayısı, numuneden ekim yapıp kültür elde edilerek ya da kültür elde etmeden mikroskop yardımıyla direkt belirlenebilmektedir. Farklı amaçlar için geliştirilmiş birçok kültürel sayım yöntemi var olmakla birlikte en yaygın kullanım alanına sahip olanlar: Dökme plak yöntemi, yayma plak yöntemi ve EMS (En Muhtemel Sayı) yöntemi ile yapılan kültürel sayımlardır. Hiçbir yöntem, numunenin içerdiği mikroorganizma sayısının tam ve kesin olarak belirlenmesine olanak sağlamaz. Numunenin özelliğine, standart ve mevzuatlara, çalışılan laboratuvarın olanaklarına göre en uygun yöntem belirlenerek uygulanmaktadır. Gıdalardaki mikroorganizma sayısının kabul edilebilir sınırlar dâhilinde olup olmadığı hakkında fikir vermesi nedeniyle gıda güvenliğinin belirlenmesinde kültürel sayım yöntemlerine sıklıkla müracaat edilmektedir. Sayım sonuçları değerlendirmeleri, mevzuat ve standartlarda belirlenen sınırlar ile karşılaştırılarak yapılır.

8.1.1. Dökme Plak Yöntemi ile Kültürel Sayım

Dökme plak yöntemi ile ekim uygulaması “Mikrobiyolojik Kültür” öğrenme biriminde detaylı olarak ele alınmıştır. Burada dökme plak yöntemi ile ekim yapıp elde edilen plak kültürde gelişen kolonilerin sayımı üzerinde durulacaktır. Ekim aşamaları genel hatları ile ele alındığında steril petri kutusuna numune ve/veya dilüsyonundan aktarıldıktan sonra üzerine 40-45 °C sıcaklıktaki agarlı besiyerinden dökülür, homojenize edildikten sonra katılaşması için beklenir ve petri kutuları ters şekilde inkübatöre yerleştirilir. İnkübasyon sonunda elde edilen plak kültürde oluşan koloniler sayılarak numunenin birim miktarındaki mikroorganizma sayısı belirlenir. Dökme plak yöntemi ile bakteri, maya ve küf sayımı yapılabilirdiği hâlde bu yöntem zorunlu aerob ve küf sayımlarında yanıltıcı sonuçlar alınabilirdiği için tercih edilmemektedir. Küflerin tamamı aerob özelliktedir. Mayaların ise bir kısmı aerob, diğer kısmı ise fakültatif anaeroptur.

Fakültatif anaerobik bakteri sayımlarında, dökme plak yöntemi **çift tabakalı** olarak uygulanır. Bu amaçla dökme plak yöntemi uygulanıp agar katılaştıktan hemen sonra, petri kutusuna 40-45 °C'deki besiyerinden 5 mL daha ilave edilerek katılaşması beklenir. Böylece ilk katmanda yer alan hücrelerin oksijenle teması kesilmiş olur. İkinci kat olarak kullanılan besiyeri çoğunlukla birinci katman için kullanılanla aynıdır. Bazı özel durumlarda ikinci katman için farklı bir besiyeri kullanılabilmektedir.

8.1.2. Petri Kutusunda Koloni Sayımı

Petri kutusundaki besiyerine ekim yapıldıktan sonra, numuneden geçen canlı mikroorganizmalar hızla üreyerek koloni oluştururlar. Aktarılan numune içerisinde canlılığını yitirmiş hücreler var olmasının yanında, canlı fakat gelişip koloni oluşturma yeteneğini yitirmiş hücreler de bulunurlar. Sayım yapılırken bunların sayılmadığını ve sadece koloni oluşturan mikroorganizmaların sayıldığını belirtmek için “**koloni oluşturan birim**” (KOB) ifadesi kullanılmaktadır. Analiz edilen numune sıvı ise sonuç KOB/mL, katı ise KOB/g, yüzey numunesi ise KOB/cm² olarak verilir.

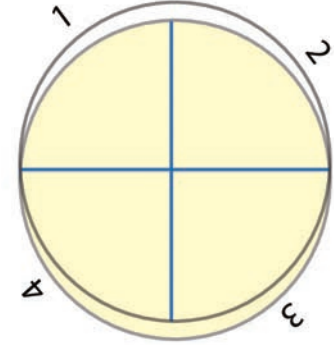
Kültürel sayım yapılacak numunenin mikrobiyal yükü kabaca tahmin edilerek kaç kat seyreltme yapıp dilüsyon hazırlanacağı belirlenir. Petri kutusunda sayım yapılacak alt ve üst sınırlar birçok standart ve uygulamada 30-300 koloni olarak belirlenmiştir. Genel olarak kültürel sayım sonuçları hesaplanırken koloni sayıları bu sınırlar içinde olan plaklar değerlendirmede esas alınır. Bazı analizlerde, örneğin VRB agar besiyerinde koliform grup bakteri sayımlarında 1-154 koloni,

toplam maya ve küf sayımında 15-150 koloni, süt ve süt ürünlerinde PCA besiyeri ile yapılan sayımlarda 25-250 koloni standartlarda güvenilir sınırlar olarak belirlenmiştir.

Her laboratuvar analizinde olduğu gibi, kültürel sayım yapılırken de güvenli sonuçlar elde etmek için paralelli çalışmak gerekir. Bu amaçla numune ve/veya her bir dilüsyonundan en az ikişer petri kutusuna paralel ekim yapılır.

İki paralel ekim sonuçları arasındaki kabul edilebilir fark, yapılan çalışmaya ve laboratuvara göre belirlenebilmektedir. Genel olarak paraleller arasındaki %20'ye kadar olan fark, güvenilir kabul edilir.

Petri kutusunda sayım işlemi, asetat kalemı ile koloniler işaretlenerek doğrudan yapılır. Petri kutusu üzerinde sağlıklı bir sayım yapılamayacak kadar koloni gelişmesi varsa ve yine de sonuç alınmak istenirse bu durumda petri kutusu, asetat kalemı ile bölünür ya da koloni sayıcı kullanılır. Petri kutusu sahasının bölünmesi; 4, 8 ya da 16 eşit parçaya ayırarak yapılabilir. Birkaç parçada sayım yapıp bütüne uyarlanarak petri kutusunun tamamındaki yaklaşık koloni sayısı belirlenir.



Görsel 8.1 : Sayım yapılacak petri kutusunun asetat kalemı ile dört eş parçaya bölünmesi

Görsel 8.1'de asetat kalemı ile 4 eş parçaya bölünmüş petri kutusu gösterilmiştir. Örneğin 4 parçaya bölünmüş petri kutusunun bir parçasında 110, diğer parçasında 140 koloni sayılmış olsun. Bu durumda petri kutusunun tamamında:

$110+140=250$, $250 \times 2 = 500$ koloni, sayım sonucu olarak belirlenir.

Bunları Biliyor musunuz?

Aynı plakta yapılan sayımlar arasındaki fark genel olarak %10'a kadar güvenli kabul edilmektedir. Mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanı; hem iş sağlığı ve güvenliğini sağlamak hem de doğru sonuçlar almak için tüm çalışmalarında prensipli ve titiz bir tutum içinde olmalıdır.

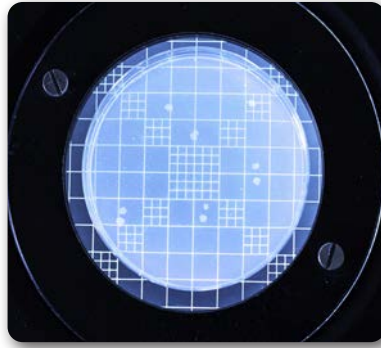
8.1.2.1. Koloni Sayıcı Kullanımı

Koloni sayıcı; alttan aydınlatmalı bir tabla, büyüteç, sayaç ve sayım kalemı parçalarından oluşmaktadır. Tablada kenar uzunluğu 1 cm olan kareler bulunmaktadır. Petri kutusu gibi daire şeklinde olan tablanın, köşegenlerinde yer alan 1 cm²'lik her bir kare içerisinde eş küçük kareler yer alır. İçinde eş küçük kareler bulunan ve köşegenler hizasında uzanan işaretli karelerin tamamının alanı, tabla sahasının toplam alanının 1/5'ine eşittir. Sayım işlemi, işaretli karelerin sınırları içine gelen koloniler üzerinden yapılır. Sayım sonucu 5 ile çarpıldığında, petri kutusunun tamamındaki koloni sayısına ulaşılmış olur. Bütünleşik kalemı olan cihazlarda, tespit edilen her bir koloninin üzerine sayım kalemı ile bastırıldığında, sayaç otomatik olarak bunu algılar ve ekranındaki sayı artar.

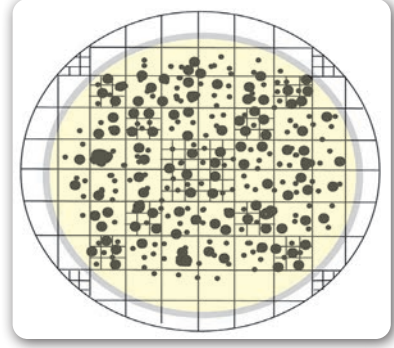
Görsel 8.2'de koloni sayıcı kullanımı, Görsel 8.3'te ise koloni sayıcı tablası yer almaktadır.



Görsel 8.2 : Koloni sayıcı



Görsel 8.3 : Koloni sayıcı tablası



Görsel 8.4 : Koloni sayıcı tablasına yerleştirilmiş temsili petri kutusu

Görsel 8.4'te koloni sayıcı tablasına yerleştirilmiş petri kutusu resmedilmiştir. Örneğin işaretli kareler üzerinde 95 tane koloni sayıldıysa petri kutusunun tamamındaki koloni sayısı $95 \times 5 = 475$ olarak belirlenir.

8.1.3. Sayım Sonuçlarının Hesaplanması

Petri kutularındaki koloniler sayıldıktan sonra belirlenen alt ve üst sınırlar içinde olanlar üzerinden numunenin birim miktarındaki (mL, g, cm²) mikroorganizma sayısı hesaplanır. Numunenin birim miktarındaki mikroorganizma sayısı, bir dilüsyona ait paralel plaklardaki koloni sayılarının aritmetik ortalaması alınarak veya ardışık iki dilüsyondaki sayıların ağırlıklı aritmetik ortalaması hesaplanarak belirlenebilmektedir.

Aşağıdaki formül yardımıyla numunedeki mikroorganizma sayısı belirlenir:

$$N = C / [V.(n_1 + 0,1.n_2).d]$$

Burada:

- N** : Numunenin birim miktarındaki (1 g / 1 mL / 1 cm²) mikroorganizma sayısı,
- C** : Hesaplamaya dâhil edilen toplam koloni sayısı,
- V** : Petri kutularına ekim aşamasında aktarılan hacim (mL),
- n₁** : İlk seyreltiden sayıma dâhil edilen paralel petri kutusu adedi,
- n₂** : İkinci seyreltiden sayıma dâhil edilen paralel petri kutusu adedi,
- d** : Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın dilüsyon oranıdır.

NOT ALINIZ



.....

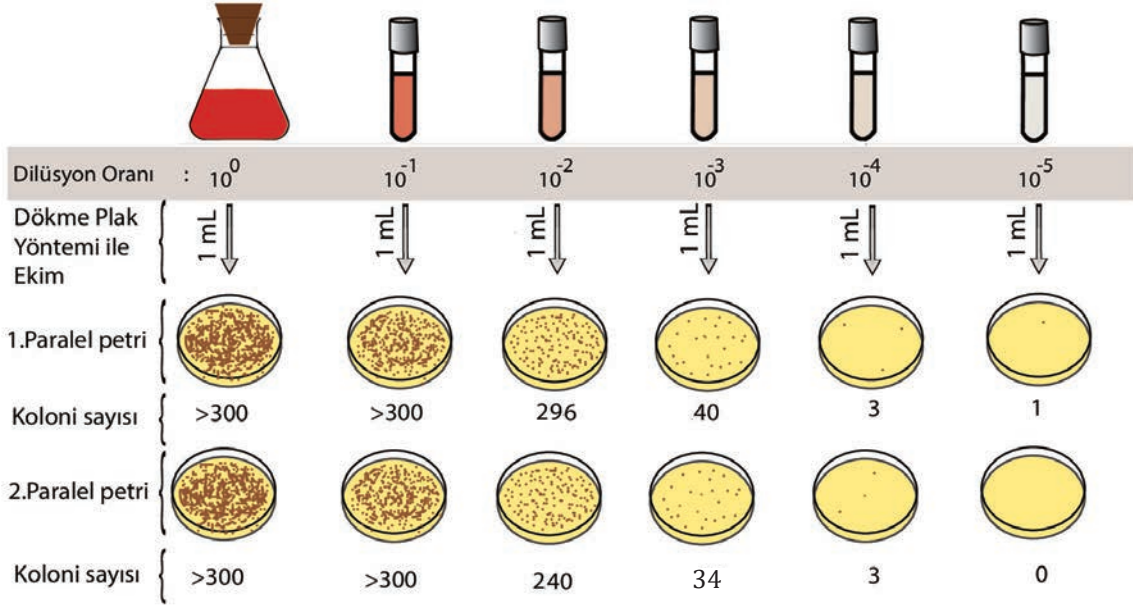
.....

.....

ÖRNEK 1



Görsel 8.5'te, sıvı numunede kültürel sayım yapmak için, her dilüsyondan iki paralelli olacak şekilde dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır.



Görsel 8.5 : Sıvı numuneden dökme plak yöntemi ile kültürel sayım

Çalışmalarında alt ve üst sınır olarak 30-300 sınırlarını benimseyen bir laboratuvar için numunenin 1 mL'sinde bulunan bakteri sayısını hesaplayınız.

Petri kutularındaki koloni sayılarına bakıldığında 30-300 koloni aralığında yer alan ilk dilüsyon (10^{-2}) ve bunun ardışık ileri dilüsyonundaki (10^{-3}) sonuçlar üzerinden hesaplama yapılır.

$$C = 296 + 240 + 40 + 34 = 610$$

$V = 1$ (Dökme plak yöntemi ile ekim yapıldığı için petri kutularına 1 mL pipetlenmiştir.)

$n_1 = 2$ (10^{-2} dilüsyonundan paralel iki petri kutusu hesaba dâhil edilmiştir.)

$n_2 = 2$ (10^{-3} dilüsyonundan paralel iki petri kutusu hesaba dâhil edilmiştir.)

$d = 10^{-2}$ (Ardışık iki dilüsyondan daha konsantre olanı 10^{-2} lik dilüsyondur.)

$$N = C / [V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d]$$

$$N = 610 / [1 \cdot (2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}]$$

$$N = 277,2727 \cdot 10^2 = 2,772727 \cdot 10^4 \approx 2,8 \cdot 10^4 \text{ KOB/mL}$$

Bunları Biliyor musunuz?

Sayım sonuçları bir tam sayı ve virgülden sonra bir basamak olacak şekilde yuvarlanır. Kalan kısım, onun üslü kuvveti şeklinde çarpım işareti ile yazılır. Yuvarlatılacak sayı 5 ise bir önündeki sayının tek ya da çift olmasına göre işlem yapılır. Örneğin 2,25 sayısında, 5'in önündeki 2 rakamı çift olduğu için yuvarlama aşağı doğru verilerek 2,2 olarak yazılır. 1,95 sayısı yuvarlatılırken 5'in önündeki 9 rakamı tek sayı olduğundan yuvarlama yukarı doğru yapılarak sonuç 2 olarak yazılmaktadır.

ÖRNEK 2



Katı bir numunede toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı belirlenmek istenmektedir. Bu amaçla 10^{-6} ya kadar seyreltme yapılarak tüm dilüsyonlardan iki paralel olacak şekilde dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Sayım sonuçları aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi sonuçlandığına göre numunenin 1 gramında bulunan bakteri sayısını hesaplayınız. (30-300 koloni sınırları dikkate alınacaktır).

Dilüsyon	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1. Paralel	>300	>300	>300	285	26	1
2. Paralel	>300	>300	>300	325	35	2

Petri kutularındaki koloni sayılarına bakıldığında 30-300 koloni aralığında yer alan ilk dilüsyon (10^{-4}) ve bunun ardışık ileri dilüsyonundaki (10^{-5}) sonuçlar üzerinden hesaplama yapılır.

$C = 285 + 35 = 320$ (10^{-4} ve 10^{-5} dilüsyonlarına ait paralel plaklardan 30-300 aralığında olanlar.)

$V = 1$ (Dökme plak yöntemi ile ekim yapıldığı için petri kutularına 1 mL pipetlenmiştir.)

$n_1 = 1$ (10^{-4} dilüsyonunun paralel iki petri kutusundan biri değerlendirmeye alınmıştır.)

$n_2 = 1$ (10^{-5} dilüsyonunun paralel iki petri kutusundan biri değerlendirmeye alınmıştır.)

$d = 10^{-4}$ (Sayıma dâhil edilen ardışık iki dilüsyondan daha konsantre olanı 10^{-4} lük dilüsyondur.)

$N = C / [V.(n_1 + 0,1.n_2).d]$

$N = 320 / [1.(1 + 0,1.1). 10^{-4}]$

$N = 290,909 . 10^4 = 2,90909 . 10^6 \approx 2,9.10^6 \text{ KOB/g}$

ÖRNEK 3



Petri kutusunda oluşması hedeflenen koloni sayısının düşük olduğu bir sıvı numuneden, seyreltmeden direkt ve 10^{-1} lik dilüsyonundan iki paralel olacak şekilde dökme plak yöntemi ile koliform bakteri sayımı yapılmıştır. Petri kutularında sayılan bakteri kolonileri aşağıdaki tabloda verilmiştir. Koliform bakteri sayımında alt ve üst sınır 1-154 olduğuna göre, numunenin 1 mL'sinde bulunan bakteri sayısını hesaplayınız.

Dilüsyon	10^0	10^{-1}
1. Paralel	20	2
2. Paralel	10	1

$C = 20 + 10 + 2 + 1 = 33$

$V = 1$

$n_1 = 2$

$n_2 = 2$

$d = 10^0$

$N = C / [V.(n_1 + 0,1.n_2).d]$

$N = 33 / [1.(2 + 0,1.2). 10^0]$

$N = 15 \text{ KOB/mL}$

Bunları Biliyor musunuz?

Dilüsyon serisinden ekim yapılan plaklarda, kabaca yapılan değerlendirmede üst sınırın üzerinde koloni gelişmesi bariz olarak gözlenen petri kutuları > 300 olarak yazılır. Bu durumda sonuç ŞÇK (sayılamayacak kadar çok) olarak ifade edilebilir olsa bile rakamsal gösterim daha doğrudur. 300 civarında olduğu gözlenenlerde sayım yapılır. Sonuç üst sınırın üzerinde çıksa bile tabloya yazılır, fakat hesaplamalara dâhil edilmez.

44. UYGULAMA

DÖKME PLAK YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak dökme plak yöntemi ile kültürel sayım çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

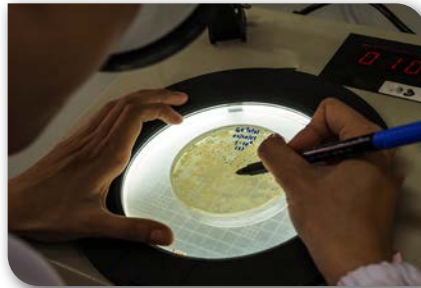
Bunzen beki, steril petri kutuları, 1 mL'lik steril pipet (varsa otomatik pipet ve steril pipet uçları), su banyosu, sterilize edilerek hazırlanmış PCA besiyeri, asetat kalemi.

İşlem Basamakları

1. Kültürel sayım yapacağınız numuneden, beklenen mikroorganizma yüküne göre dilüsyon serisi hazırlayarak en az iki paralelli olacak şekilde dökme plak yöntemi ile ekim yapınız.
2. Ekim yaptığınız plakları uygun sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakınız.
 - PCA besiyerinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı için inkübasyon sıcaklık ve süresi $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48 saattir. Amaca göre farklı sıcaklık ve süreler belirlenebilir.
3. Inkübasyon süresi sonunda petri kutularındaki kolonileri sayınız.
 - Sayım sonuçlarını yazmak için bilgi sayfalarında yer alan örnek sorulardaki gibi bir tablo hazırlayınız.
 - Asetat kalemi ile kolonilerin üzeri işaretlenerek doğrudan sayım yapılır.
 - Sayım yapmanın mümkün olmadığı plaklar >300 olarak tabloya yazılır.
 - Üst sınırın üzerinde olduğu gözlemlenen yoğun üreme olmuş plaklarda sayım yapılmak istendiğinde, sayım işlemi dört/sekiz/on altı parçaya bölerek (Görsel 8.6) veya koloni sayıcı kullanılarak gerçekleştirilir (Görsel 8.7).
4. Numunenin içerdiği mikroorganizma sayısını hesaplayınız.
 - Numunedeki bakteri sayısını hesaplamada, ardışık iki dilüsyondaki koloni sayılarının ağırlıklı aritmetik ortalaması üzerinden hesaplama yapılması tercih edilmelidir.



Görsel 8.6: Petri kutusunu asetat kalem ile bölme



Görsel 8.7: Koloni sayıcı ile sayım yapma

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Dökme plak yöntemi ile ekim yaptı.				
2	Plaklarda doğrudan koloni sayımı yaptı.				
3	Plakları eş parçalara bölerek koloni sayımı yaptı.				
4	Plaklarda koloni sayıcı ile sayım yaptı.				
5	Numunenin mikroorganizma sayısını hesapladı.				
TOPLAM PUAN					

8.2. YAYMA PLAK YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM

Yayma plak yöntemi ile kültürel sayımda, önceden besiyeri dökülüp yüzey kurutma işlemleri yapılmış plaklar kullanılır. Ekim yapılmadan önce, belirli bir stok kontrolü ile yeterli sayıda petri kutusunun hazır bulundurulması gerekir. Hazırlanan besiyerlerinin yüzeyi, yeterli kurulukta olmalıdır.

Yayma yöntemi ile kültürel sayım için, plaklara numune ya da dilüsyonlarından aktarılacak drigalski spatülü ile yüzeye yayılır. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler “8.1.2. Petri Kutusunda Koloni Sayımı” başlığında verildiği gibi yapılır. Yayma yönteminde tüm mikroorganizmalar, besiyeri yüzeyinde bulundukları için koloni yapıları daha homojendir. Yayma yönteminde kullanılan drigalski spatülü alkol çözeltisinde bekletilerek sterilize edilir. Spatüller, içerisinde alkol bulunan kaba sırayla dizilir. En öndeki spatül alınıp kullanıldıktan sonra en arka sıraya konulur. Böylece spatülün tekrar kullanılıncaya kadar alkol içerisinde bekleme süresi uzatılmış olur. Kullanılacak spatül alkolde en az 5 dakika bekletilmiş olmalıdır. Spatül yayma öncesinde aleve değiştirilerek alkol uçurulur. Aleve değiştirme işleminin sterilizasyon için değil, mikroorganizma gelişmesine engel olan alkol kalıntılarının uzaklaştırılması için yapıldığı unutulmamalı ve spatül alev üzerinde bekletilmemelidir. Isınan spatülün, yayma işleminden önce soğutulması gerekir. Steril kullan at spatüller de (Görsel 8.8) kullanım avantajlarından ötürü tercih edilebilmektedir. Yayma işleminde spatül yarı çap hattında döndürülerek yapılır. Spatülün çok fazla sürülmesi veya ileri geri hareket ettirilmesi numunenin kenarlarda toplanmasına neden olur. Bu durum istenmez. Yayma işlemi yapılan petri plakları 10 dakika bekletilir. Bekletmenin amacı, besiyerinin numuneyi tamamen emebilmesi içindir. Sayımı yapılacak mikroorganizma türüne uygun sıcaklık ve sürede inkübasyon işlemi yapılır. Oluşan koloniler sayılır.

Petri kutularında koloni sayımını takiben yapılan hesaplamalar da “8.1.3 Sayım Sonuçlarının Hesaplanması” konusunda anlatıldığı gibi yapılır. Yayma yöntemi ile kültürel sayım hesaplamasında farklı olan sadece petri kutusuna aktarılan numune miktarının 0,1 mL olmasının hesaba dâhil edilmesidir.



Görsel 8.8: Tek kullanımlık spatül

Fakültatif anaerob bakteri sayımlarında çift tabakalı ekim yöntemi kullanılabilir. Çift tabaka yönteminde plak üzerine yayılan numune besiyeri tarafından emildikten sonra besiyerinin yüzeyini kaplayacak kadar (5-10 mL) ikinci kat besiyeri dökülür. Böylece ekimi yapılan numunede bulunan mikroorganizmaların hava ile teması kesilir ve fakültatif anaeroblar için uygun bir üreme ortamı sağlanır.

ÖRNEK 1



Sıvı numuneden yayma plak yöntemi ile yapılan bir ekim sonucunda paralel petri kutularındaki koloniler Görsel 8.9'da olduğu gibi sayılmıştır.

Dilüsyon	:	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Yayma Plak Yöntemi ile Ekim		0,1 mL ↓	0,1 mL ↓	0,1 mL ↓	0,1 mL ↓	0,1 mL ↓	0,1 mL ↓
1. Petri kutusu							
Koloni sayısı		>300	>300	290	35	3	1
2. Petri kutusu							
Koloni sayısı		>300	>300	296	25	3	0

Görsel 8.9: Örnek 1'deki hesaplamaların yapılacağı petri kutularındaki koloni sayıları

Çalışmalarında alt ve üst sınır olarak 30-300 sınırlarını benimseyen bir laboratuvar için numunenin 1 mL'sinde bulunan bakteri sayısını hesaplayınız.

$C = 290 + 296 + 35 = 621$ (10^{-2} ve 10^{-3} dilüsyonlarındaki sınırlar dâhilinde olan petri kutularındaki sayım sonuçları)

$V = 0,1$ (Yayma plak yöntemi ile ekim yapıldığı için petri kutularına 0,1 mL pipetlenmiştir.)

$$n_1 = 2$$

$$n_2 = 1$$

$$d = 10^{-2}$$

$$N = C / [V.(n_1 + 0,1.n_2).d]$$

$$N = 621 / [0,1.(2 + 0,1.1).10^{-2}]$$

$$N = 2957,14 \cdot 10^2 = 2,95714 \cdot 10^5 \approx 3 \cdot 10^5 \text{ KOB/mL}$$

45. UYGULAMA

YAYMA PLAK YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak yayma plak yöntemi ile kültürel sayım çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, ekime hazır plaklar, 0,1 mL hacim çekilebilen steril pipet (varsa otomatik pipet ve steril pipet uçları), drigalski spatülü, etil alkol, beher, asetat kalemi.

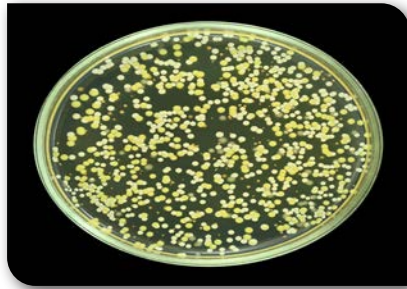
İşlem Basamakları

1. Kültürel sayım yapacağınız numuneden, beklenen mikroorganizma yüküne göre dilüsyon serisi hazırlayarak en az iki paralelli olacak şekilde yayma plak yöntemi ile ekim yapınız.
2. Ekim yaptığınız plakları uygun sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakınız.
3. İnkübasyon süresi sonunda petri kutularındaki kolonileri sayınız.
 - Sayım sonuçlarını yazmak için aşağıda verilen tablo kullanılabilir.
 - Asetat kalemi ile kolonilerin üzeri işaretlenerek doğrudan sayım yapılır (Görsel 8.10).
 - Sayım yapmanın mümkün olmadığı plaklar >300 olarak tabloya yazılır.
 - Üst sınırın üzerinde olduğu gözlemlenip sayılabilir durumda olan plaklarda (Görsel 8.11), sayım işlemi dört/sekiz/on altı parçaya bölerek veya koloni sayıcı kullanarak gerçekleştirilir.
4. Numunenin içerdiği mikroorganizma sayısını hesaplayınız.
 - Numunedeki bakteri sayısını hesaplamada, ardışık iki dilüsyondaki koloni sayılarının aritmetik ortalaması üzerinden hesaplama yapılması tercih edilmelidir.

Dilüsyon	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1.Paralel						
2.Paralel						



Görsel 8.10: Kalem ve büyüteç kullanarak koloni sayımı



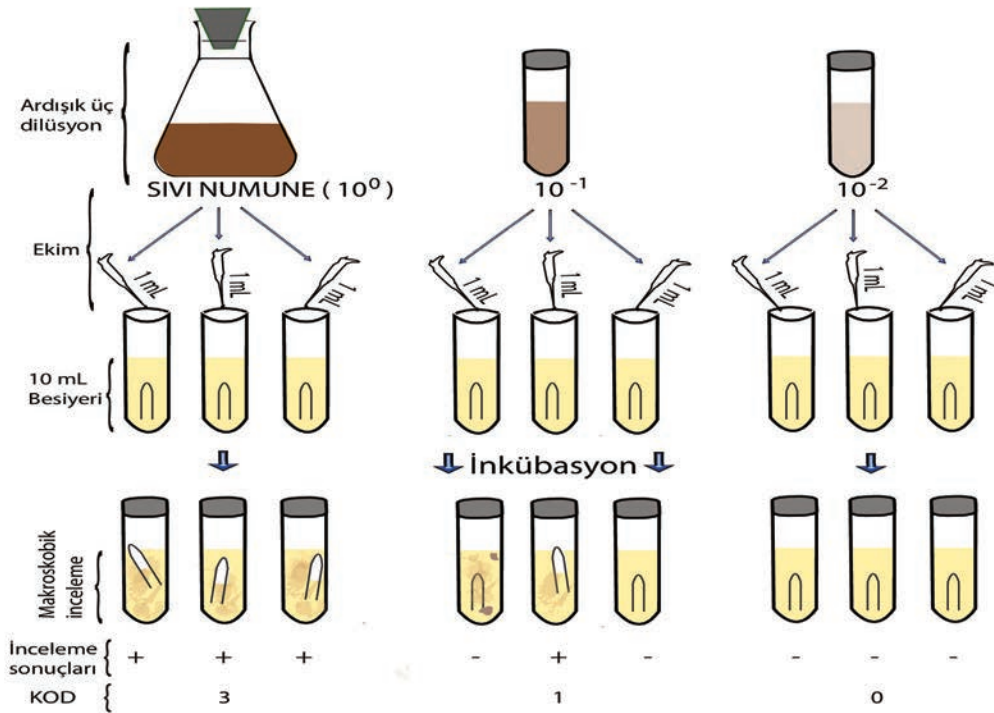
Görsel 8.11: Koloni sayıcı ile sayım yapılan petri kutusu

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Yayma plak yöntemi ile ekim yaptı.				
2	Plaklarda doğrudan koloni sayımı yaptı.				
3	Plakları eş parçalara bölerek koloni sayımı yaptı.				
4	Plaklarda koloni sayıcı ile sayım yaptı.				
5	Numunenin mikroorganizma sayısını hesapladı.				
TOPLAM PUAN					

8.3. EN MUHTEMEL SAYI (EMS) YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM

Sıvı besiyerinin kullanıldığı kültürel sayım yöntemidir. Temel kültürel sayım yöntemi katı besiyerinde koloni sayımı olmakla birlikte, EMS yöntemi ile sayım da oldukça fazla kullanım alanına sahiptir. Numunedeki mikroorganizma sayısı, istatistiksel olasılık hesapları ile oluşturulmuş çizelgeden yararlanılarak belirlenir. Bu nedenle “En Muhtemel Sayı Yöntemi” olarak isimlendirilmiştir. Bu yöntemle bakteri ve maya sayımları yapılabilir. Sıvı besiyeri küf gelişimi için uygun bir ortam olmadığından bu yöntemle küf sayımı yapılamaz. EMS yöntemi ile sayım, canlı hücre sayısının koloni oluşumu ile sayılamayacak kadar düşük (katı numune için $<10^2$ KOB/g, sıvı numune için <10 KOB/mL) mikroorganizma sayısına sahip olan numuneler için uygun olan bir yöntemdir.

Yöntemin uygulanmasında değerlendirme tablosunda belirtilen tüp sayısına uygun olarak ekim yapılacak besiyeri tüpleri üç gruba ayrılır. Yaygın olarak üç tüp serisine göre çalışılmaktadır. EMS yönteminde iki farklı ekim şekli kullanılabilir. Numune veya dilüsyonundan farklı miktarlarda (10^{-1} -0,1 veya 1-0,1-0,01 vb.) ekim yapılabilir gibi üç ardışık (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} gibi) dilüsyondan birer mL ekimde yapılabilir. Burada dikkat edilmesi gereken desimal (on ve onun katları) oranlarda çalışmasıdır. Dilüsyon yöntemi ile ekim yapılacaksa öncelikle numuneden üç ardışık dilüsyon hazırlanır. Her dilüsyondan üçer adet olmak üzere toplam dokuz adet sıvı besiyeri içeren tüpe ekim yapılır. İnkübasyon sonunda tüpler mikroorganizma gelişim durumuna göre pozitif/negatif olarak değerlendirilir. Görsel 8.12’de verilen uygulamada koliform bakteriler üzerinden gelişim değerlendirilmesi yapılmıştır. Ardışık seyreltilerden alınan pozitif sonuçlar yan yana yazıldığında bir kod ortaya çıkar. Kodun çizelgedeki karşılığına bakılarak numunedeki en muhtemel canlı mikroorganizma sayısı belirlenir. Sonuç, numunenin katı ya da sıvı olmasına göre EMS/mL veya EMS/g birimi ile ifade edilir.



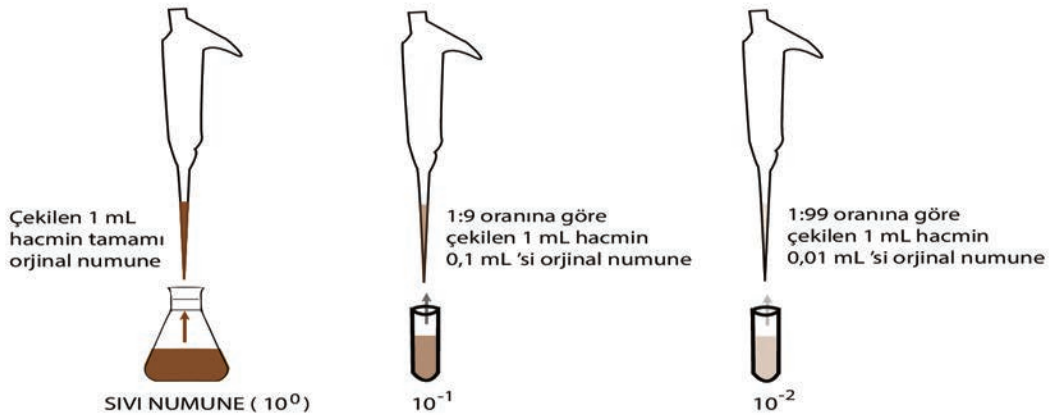
Görsel 8.12: EMS yöntemi ile sıvı gıda numunesinde koliform bakteri sayımı (Koliform bakteri gelişimi olan tüplerde bulanıklık ve gaz oluşumu gözlenir.)

Tablo 8.1: EMS Çizelgesi-EMS/g (mL)

Pozitif Tüpler			Sayı	Pozitif Tüpler			Sayı
1 mL	0,1 mL	0,01mL	EMS	1 mL	0,1 mL	0,01mL	EMS
0	0	0	< 0,30	2	3	0	2,90
0	1	0	0,30	3	0	0	2,30
0	2	0	0,62	3	0	1	3,80
1	0	0	0,36	3	0	2	6,40
1	1	0	0,74	3	1	0	4,30
1	1	1	1,10	3	1	1	7,50
1	2	0	1,10	3	1	2	12,00
1	2	1	1,50	3	2	0	9,30
1	3	0	1,60	3	2	1	15,00
2	0	0	0,92	3	2	2	21,00
2	0	1	1,40	3	2	3	29,00
2	1	0	1,50	3	3	0	24,00
2	1	1	2,00	3	3	1	46,00
2	2	0	2,10	3	3	2	110,00
2	2	1	2,80	3	3	3	>110,00

Çizelge; 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} ardışık dilüsyonlarından, üçer tüpe birer mL yapılan ekime göre düzenlenmiştir. 10^0 dilüsyonundan ekim yapıldığında tüplere orijinal numuneden birer mL geçer. 10^{-1} dilüsyonundan 1 mL ekim yapıldığında tüplere orijinal numuneden birer mL ve 10^{-2} dilüsyonundan 1 mL ekim yapıldığında tüplere orijinal numuneden 0,01'er mL geçmiş olur. Bu nedenle çizelgede ardışık tüpler 1 mL, 0,1 mL, 0,01 mL olarak ifade edilmiştir. Başka bir deyişle, üçer tüpe ardışık üç dilüsyondan 1'er mL aktarmakla sıvı numuneden dilüsyon hazırlamadan üç tüpe 1 mL, üç tüpe 0,1 mL, üç tüpe 0,01 mL aktarmak matematiksel olarak aynıdır.

Üç ardışık dilüsyonun içerdiği orijinal numune miktarları (1 mL, 0,1 mL, 0,01 mL) Görsel 8,13'te anlatılmıştır.



Görsel 8.13: Çizelgede dilüsyon serisinin 1 mL, 0,1 mL, 0,01 mL olarak yazılması

Pozitif sonuçlar üzerinden elde edilen kodun çizelgede EMS başlığı altındaki karşılığı, numunedeki en muhtemel mikroorganizma sayısı olarak verilir.

ÖRNEK 1



Sıvı numuneden EMS yöntemi ile yapılan kültürel sayımda, inkübasyon sonu tüplerde meydana gelen gelişim sonuçları 3-1-0 olarak kodlanmıştır. Sıvı numunenin 100 mL'sinde bulunan en muhtemel mikroorganizma sayısını belirleyiniz.

Tablo 8.1'de 3-1-0 kodunun karşısında bulunan EMS değeri 4,30 olduğu okunur. Bu değer 1 mL numunede bulunan mikroorganizma sayısını gösterir. 100 mL numunede bulunan mikroorganizma sayısı 430 ($4,30 \times 100$) olarak belirlenir.

SIRA SİZDE



EMS yöntemi ile kültürel sayım amacıyla sıvı numuneden ardışık üç dilüsyon hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan ekim yapılan tüplerin inkübasyon sonucu gelişim durumları tabloda işaretlenmiştir. Buna göre sıvı numunenin 100 mL'sinde bulunan en muhtemel mikroorganizma sayısını belirleyiniz.

Dilüsyon	10^0	10^{-1}	10^{-2}
1.Tüp	+	+	-
2.Tüp	-	+	-
3.Tüp	+	+	-

EMS çizelgesinden okunan değer, ardışık dilüsyonların en derişik olanının içerdiği numune miktarındaki mikroorganizma sayısını verir. Ekim yapılan üç ardışık dilüsyon bazı durumlarda farklı olabilmektedir. Mikrobiyal yükü fazla olan sıvı numunelerde daha seyreltik dilüsyonlar kullanılabilir. Katı bir numuneden EMS yöntemi ile sayım yapılmak istendiğinde 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} serisi kullanılacaktır. Yine katı numunenin mikroorganizma içeriği yüksek ise daha ileri dilüsyonlar kullanılması gerekir. 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} den farklı bir seri kullanıldığında, kullanılan seriye göre sonuç üzerinde düzeltme yapılması gerekir. Bu durum aşağıdaki örnekler üzerinde anlatılmıştır.

ÖRNEK 2



Mikroorganizma içeriği yüksek olan bir sıvı numuneden 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} olarak hazırlanan üç ardışık dilüsyon üzerinden EMS yöntemi ile kültürel sayım yapılmıştır. İnkübasyon sonu tüplerdeki gelişim 3-2-0 olarak kodlandığına göre numunenin 1 mL'sinde bulunan en muhtemel mikroorganizma sayısını belirleyiniz.

1 mL	0,1 mL	0,01mL	EMS
3	2	0	9,30

9,30 sayısı, serideki en derişik olan 10^{-2} lik dilüsyonun 1 mL'sindeki sayıdır. Numune, 10^{-2} lik dilüsyondan 100 kat daha fazla mikroorganizma içereceğinden, numunenin 1 mL'sindeki sayıyı belirlemek için 9,30'u 100 ile çarpmak gerekir.

Numunedeki mikroorganizma sayısı = $9,30 \times 100 = 930$ EMS/mL

ÖRNEK 3



Bir katı numuneden 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} olarak hazırlanan üç ardışık dilüsyon üzerinden EMS yöntemi ile kültürel sayım yapılmıştır. İnkübasyon sonu tüplerdeki gelişim 0-1-0 olarak kodlandığına göre numunenin 1 gramında bulunan en muhtemel mikroorganizma sayısını belirleyiniz.

1 mL	0,1 mL	0,01mL	EMS
0	1	0	0,30

0,30 sayısı, serideki en derişik olan 10^{-1} lik dilüsyonun 1 mL'sindeki sayıdır. Numune, 10^{-1} lik dilüsyondan 10 kat daha fazla mikroorganizma içereceğinden, numunenin 1 gramındaki sayıyı belirlemek için 0,30'u 10 ile çarpmak gerekir.

Numunedeki mikroorganizma sayısı=0,30 x10=3 EMS/g

Genel itibarıyla EMS yöntemi ile kültürel sayımda, besiyeri tüplerine ardışık üç seyreltiden 1 mL aktarılarak ekim yapılır. Ancak duyarlılığın artırılması amacıyla dilüsyon hazırlamadan numuneden üçer tüpe 10 mL, 1 mL, 0,1 mL ekim yapılan özel analizler de vardır. Bu durumda 10 mL ekim yapılacak tüplerin daha büyük olması ve içlerindeki besiyerinin çift kuvvetli olarak hazırlanmış olması gerekir. Böyle bir analizde EMS çizelgesinden bulunan değer, numunenin 10 mL'sindeki mikroorganizma sayısını verir. Bu durumda numunenin 1 mL'sindeki sayıyı bulmak için, çizelgeden okunan değer 10'a bölünür.

SIRA SİZDE



Katı numuneden EMS yöntemi ile yapılan kültürel sayımda, inkübasyon sonu tüplerdeki gelişim durumları tabloda verilmiştir. Buna göre numunedeki en muhtemel mikroorganizma sayısını belirleyiniz.

Dilüsyon	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
1.Tüp	+	-	-	-
2.Tüp	-	+	-	-
3.Tüp	-	-	-	-

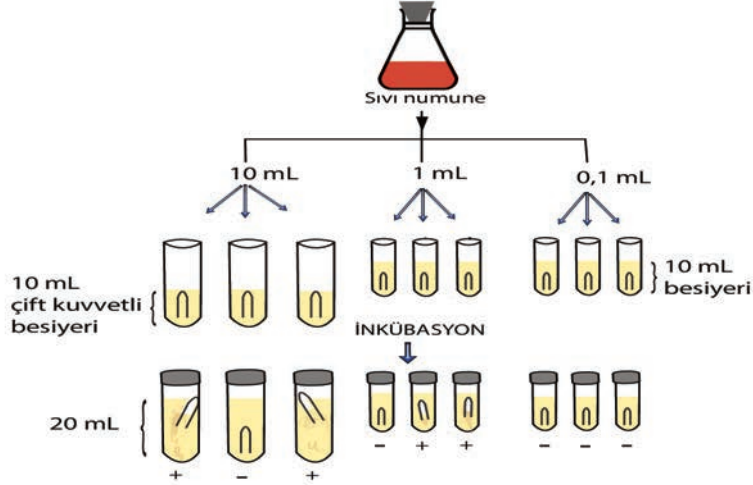
Bunları Biliyor musunuz?

10 mL besiyerine 10 mL numune aktarıldığında, besiyerinin konsantrasyonu yarı yarıya azalır ve bu ortam mikroorganizma gelişmesini olumsuz etkiler. Bu nedenle 10 mL numunenin aktarılacağı tüplerdeki besiyeri, çift kuvvetli olarak hazırlanır. Örneğin LST broth besiyeri normal olarak 35,5 g/L konsantrasyonda hazırlanır. Çift kuvvetli olduğunda 71 g/L konsantrasyonda hazırlanır.

ÖRNEK 4



Sıvı numuneden EMS yöntemi ile bakteri sayımı yapmak için, besiyeri tüplerine dilüsyon hazırlamadan direkt aktarma yapılmıştır. Bu amaçla numuneden, çift kuvvetli olarak hazırlanmış besiyeri tüplerine onar mL aktarılmıştır. Diğer üçer tüpe ise sırasıyla 1 mL ve 0,1 mL numune ekilmiştir. İnkübasyon sonu tüplerdeki değerlendirme Görsel 8.14'te olduğu gibi sonuçlandıysa numunenin 1 mL'sindeki en muhtemel mikroorganizma sayısını belirleyiniz.



Görsel 8.14: Çift kuvvetli besiyerinin kullanıldığı örnek çalışma

Tüplerdeki değerlendirme sonunda 2-2-0 kodu oluşmuştur. Buna göre EMS tablosunda okunan sayı 2,10 olur.

1 mL	0,1 mL	0,01mL	EMS
2	2	0	2,10

2,10, numunenin 10 mL'sindeki mikroorganizma sayısıdır. Bu sayı 10'a bölündüğünde numunenin 1 mL'sindeki sayı bulunur.

10 mL'de 2,10 bakteri varsa

1 mL'de x

$$X = 2,10 / 10 = 0,210$$

Bunları Biliyor musunuz?

İnkübasyon sonu tüplerde pozitif-negatif değerlendirilmesi yapılırken tüplerde makroskobik değişikliklerden herhangi biri gözlemlenirse bu, orada mikroorganizma ürediğini gösterir. Bu tüpler toplam bakteri sayımında pozitif olarak değerlendirilir. EMS yöntemi ile toplam bakteri sayımı, çok az sayıda bakteri içeriğine sahip olan numuneler haricinde tercih edilmez. Daha çok koliform bakteri sayımı için tercih edilen bir yöntemdir. Koliform bakteriler laktozu fermente ederek gaz üretirler. Bu bakterilerin sayımında, tüplerde pozitif değerlendirme yapılması için bulanıklıkla beraber mutlaka durham tüpünde gaz oluşmuş olması gerekir. Aksi durumda, yani tüpte bulanıklık vb. makroskobik bir değişim olup durham tüpünde gaz oluşmadıysa burada başka bir mikroorganizmanın ürediği anlamına gelir. Bu durumdaki tüpler, koliform bakterilerin sayımında negatif olarak değerlendirilir.

46. UYGULAMA

EMS YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak EMS yöntemi ile kültürel sayım çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, MRD dilüsyon sıvısı, LST broth besiyeri, deney tüpleri, 1 mL'lik steril pipet (varsa otomatik pipet ve steril pipet uçları), asetat kalemi, durham tüpü.

İşlem Basamakları

1. Ardışık üç seyrelti hazırlamaya yetecek miktarda dilüsyon sıvısı hazırlayınız.
2. Sayım yapılacak mikroorganizma grubuna göre belirlediğiniz besiyerini hazırlayınız.
 - LST broth, laktoz içerdiğinden koliform bakteri sayımı için uygundur.
 - LST broth, içerisinde durham tüpü bulunan deney tüplerine onar mL dağıtılarak hazırlanır. Her sayım için en az 9 deney tüpü hazırlanır.
3. Dilüsyon sıvısı ve besiyeri tüplerini otoklavda sterilize ediniz.
4. Aseptik çalışma ortamı hazırlayınız.
5. Numuneden ardışık üç seyrelti olacak şekilde desimal dilüsyon serisi hazırlayınız.
6. Her bir dilüsyondan üçer adet besiyeri tüpüne birer mL ekim yapınız.
 - Durham tüpü olan besiyerlerinde ekim öncesi gaz/hava boşluğu kontrolü yapılmalı, gaz olan tüplere ekim yapılmamalıdır. Durham tüpü olan besiyerleri vorteks ile karıştırılmaz. Oluşan anafor nedeniyle durham tüpüne giren hava sahte pozitif sonuçlara neden olabilir.
7. Besiyerlerini 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
 - İnkübasyon sıcaklığı ve süresi, sayımı yapılacak mikroorganizma türüne göre belirlenir.
8. İnkübasyon sonunda makroskobik inceleme yapınız.
 - Koliform bakteri sayımında, durham tüplerinde gaz birikmesi görülürse sonuç pozitif olarak değerlendirilir. Toplam bakteri sayımında, üreme görülen (bulanıklık, renk değişimi, çökelti gibi) tüpler pozitif olarak değerlendirilir. Rope sporu (sünme faktörü sayımında, yüzeyinde pelikül (zar) oluşmuş tüpler pozitif olarak değerlendirilir. Rope sporu sayımında dilüsyon serisi inkübasyon öncesi kaynar su banyosunda bekletilmelidir.
9. Alınan pozitif sonuçlar doğrultusunda çizelgeden yararlanarak numunenin içerdiği en muhtemel mikroorganizma sayısını belirleyiniz.
10. Tüpleri otoklavladıktan sonra yıkayınız.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Besiyeri tüplerini hazırladı.				
2	Besiyeri tüplerine ekim yaptı.				
3	Çizelgede okuma yaptı.				
4	Sonuç hesaplamalarını yaptı.				
5	Aseptik tekniğe uygun çalıştı.				
TOPLAM PUAN					



A) Aşağıda verilen soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.

1. Koloni sayıcıda, içinde eş küçük kareler bulunan ve köşegenler hizasında uzanan işaretli karelerin tamamının alanı, tabla sahasının toplam alanının ne kadarına eşittir?

- A) 1/2 B) 1/4 C) 1/5 D) 1/8 E) 1/16

2. Petri kutusunda koloni sayımı ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi doğrudur?

- A) Koloni sayımı mutlaka koloni sayıcı kullanılarak yapılmalıdır.
B) 4 parçaya bölerek sayım yapmak, en doğru sonucu verir.
C) Koloni sayımı mümkün olduğunca asetat kalemi kullanılarak doğrudan yapılmalıdır.
D) Koloni sayısının fazla olduğu plaklar >500 olarak ifade edilir.
E) Büyük kolonilerin her biri iki olarak sayılır.

3. EMS yöntemi ile kültürel sayımda çift kuvvetli besiyeri hangi durumda kullanılır?

- A) Numunedeki mikroorganizma sayısı fazla olduğunda
B) Koliform bakteri sayımlarında
C) İnkübasyon süresi kısaltılmak istendiğinde
D) Besiyeri tüpü üzerine 10 mL numune aktarılan uygulamalarda
E) Ardışık dört seyreltiden ekim yapıldığında

4.

Pozitif tüpler			Sayı
1 mL	0,1 mL	0,01mL	EMS
2	1	0	1,50

Bir katı numuneden 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} olarak hazırlanan üç ardışık dilüsyon üzerinden EMS yöntemi ile bakteri sayımı yapılmıştır. **İnkübasyon sonu tüplerdeki gelişim 2-1-0 olarak kodlandığına göre numunede bulunma olasılığı en muhtemel olan bakteri sayısı (EMS/mL) hangi seçenekte doğru verilmiştir? Tablodan yararlanarak cevaplayınız.**

- A) 1,5 EMS/mL B) 1,5 EMS/g C) 15 EMS/mL D) 15 EMS/g E) 150 EMS/g

5.

Pozitif tüpler			Sayı
1 mL	0,1 mL	0,01mL	EMS
3	2	0	9,30

Bir sıvı numuneden EMS yöntemi ile bakteri sayımında, dilüsyon hazırlamadan besiyeri tüplerine ardışık olarak onar kat azalacak hacimlerde ekim yapılmıştır. Çift kuvvetli olarak hazırlanan üç besiyeri tüpüne 10 mL, diğer üçer tüpe ise sırasıyla 1 ve 0,1'er mL ekim yapılmıştır. **İnkübasyon sonu tüplerdeki gelişim 3-2-0 olarak kodlandığına göre numunede bulunan bakteri sayısı (EMS/mL) hangi seçenekte doğru verilmiştir? Tablodan yararlanarak cevaplayınız.**

- A) 0,93 B) 0,093 C) 9,30 D) 93 E) 930



6.

Dilüsyon	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1.Paralel	>300	>300	>300	140	11	3
2.Paralel	>300	>300	>300	120	7	1

Katı numunede bakteri sayımı yapmak için, her dilüsyondan iki paralelli olacak şekilde yayma plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda petri kutularında sayılan koloni sayıları tabloda verilmiştir.

Çalışmalarında alt ve üst sınır olarak 30-300 sınırlarını benimseyen bir laboratuvar için numunede bulunan bakteri sayısı (KOB/g) aşağıdakilerden hangisidir?

- A) $1,3 \cdot 10^4$ B) $1,3 \cdot 10^6$ C) $1,3 \cdot 10^7$ D) $2,6 \cdot 10^6$ E) $2,6 \cdot 10^7$

B) Aşağıdaki soruları cevaplayınız.

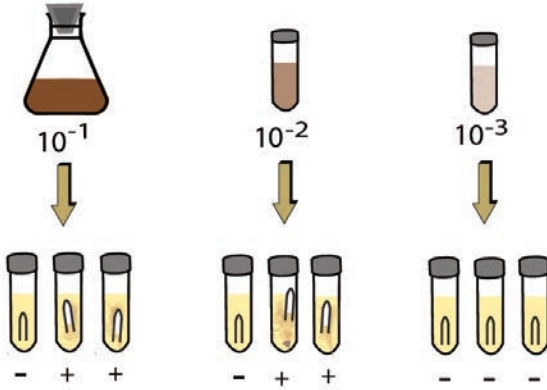
7.

Dilüsyon	10^0	10^{-1}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1.Paralel	>300	>300	310	20	3	1
2.Paralel	>300	>300	280	14	2	0

Sıvı numunede bakteri sayımı yapmak için, her dilüsyondan iki paralelli olacak şekilde dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda petri kutularında sayılan koloni sayıları tabloda verilmiştir.

Çalışmalarında alt ve üst sınır olarak 15-300 sınırlarını benimseyen bir laboratuvar için numunede bulunan bakteri sayısını hesaplayınız.

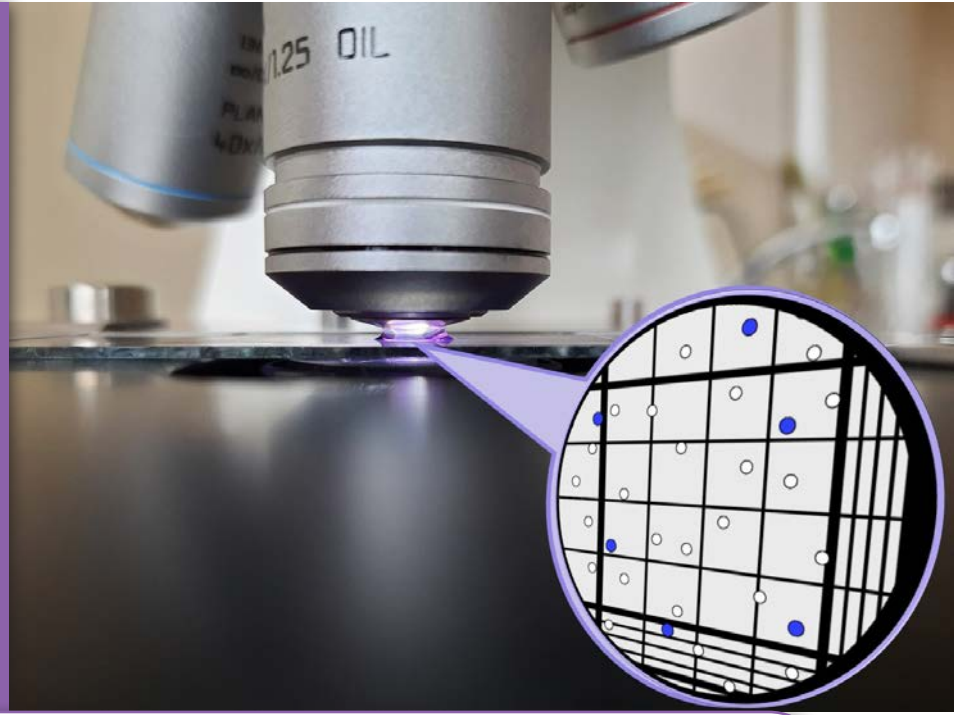
8.



Bir katı numuneden 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} olarak hazırlanan dört ardışık dilüsyon üzerinden EMS yöntemi ile koliform bakteri sayımı yapılmıştır. İnkübasyon sonu tüplerdeki gelişim görseldeki gibi gerçekleştiğine göre numunede bulunma olasılığı en muhtemel olan bakteri sayısını belirleyiniz.

9.

ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROSKOBİK SAYIM

TEMEL KAVRAMLAR

Mikroskopik Sayım
Görüş Alanı
Mikroskop Faktörü
Küflü Saha

KONULAR

- 9.1. BREED YÖNTEMİ İLE BAKTERİ SAYIMI
- 9.2. THOMA LAMI İLE MAYA SAYIMI
- 9.3. HOWARD LAMI İLE KÜFLÜ SAHA SAYIMI

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

Tekniğine uygun olarak mikroskopta;

- Breed yöntemi ile bakteri sayımı yapmayı,
- Thoma lamı ile maya sayımı yapmayı,
- Howard lamı ile küflü saha sayımı yapmayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Mikroskop incelemesinde canlı ve cansız mikroorganizmalar ayırt edilebilir mi?
2. Çeşitli gıda ürünlerinin üretimi sırasında uygulanan işlemlerle mikroorganizmalar öldürülmektedir. Küflü domatesten üretilen salçada bulunan ölü küfler zararlı mıdır?
3. Küflü domatesten yapılmış salçayı yemek istemememizin sebepleri nelerdir?



9.1. BREED YÖNTEMİ İLE BAKTERİ SAYIMI

Mikroskopik sayım yöntemleri, numunede bulunan mikroorganizma hücrelerinin, mikroskopla büyütülerek sayılması esasına dayanır. Bu amaçla çeşitli standart sayım yöntemleri geliştirilmiştir. Bu sayım yöntemlerinde sayımı kolaylaştırmak amacıyla özel sayım lamaları kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan özel lamalar: Thoma lamı ve Howard lamıdır. Çeşitli ön hazırlıklar yapılarak normal lamaların kullanıldığı yöntemler de (Breed yöntemi gibi) vardır.

Mikroskopik sayım yöntemlerinin en önemli avantajı; ucuz ve kolay olması ile kısa sürede sonuç vermesidir. Bunun yanında sayımı yapılan mikroorganizmanın morfolojisi hakkında da bilgi sahibi olunmaktadır. En önemli dezavantajı ise birçok çalışmada canlı ve cansız ayrımı yapılamadığından elde edilen sonuç canlı ve cansız mikroorganizma sayısının toplamını vermektedir. Bu durum ürünlerin üretiminde kullanılan ham maddelerin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Örneğin salça yapımında küflü domates kullanılmış olsa bile yapımı esnasında uygulanan ısıl işlemle bütün mikroorganizmalar öldürülmüş olacaktır. Howard lamı ile küflü saha sayımında hücreler ölmüş bile olsa salçanın yapımında kullanılan domateslerin küf durumu belirlenebilmektedir. Her ne kadar “Ölmüş hücreler çoğalarak zarar veremez.” diye düşünülse de ham maddede mikroorganizmalar ürerken ortama çeşitli metabolik atıklar bırakır. Bu atıkların bir kısmı toksik veya kanserojen etkiye sahiptir ve bu maddeler ısıl işlemlerle yok olmayabilirler.

Mikroskopik sayım yöntemleri, mikroskop kullanım becerisi ve tecrübesi gerektirir. Bazı çalışmalarda numunede bulunan partikülleri hücrelerden ayırt etmek oldukça zordur.

Mikroskopik sayım yöntemlerinden Breed yöntemi, bakteri sayımında; Thoma lamı yöntemi, maya sayımında; Howard lamı yöntemi ise küflü saha sayımında sıklıkla kullanılmaktadır. Breed yöntemi ile sayımda normal lamalar kullanılmaktadır. Breed yöntemi ile sayım sonucunu elde edebilmek için mikroskop faktörünün belirlenmesi gerekir. Mikroskop faktörü hesaplamada çarpan olarak kullanılmaktadır.

9.1.1. Mikroskop Faktörünün Belirlenmesi

Mikroskop faktörü 1 cm²'lik alandaki görüş sahası sayısıdır (1 cm²/görüş sahası alanı). Bir mikroskopta 10x oküler, 100x objektif kullanıldığında mikroskop faktörü 2500-5500 arasında değişir. 10x oküler, 40x objektif kullanıldığında ise mikroskop faktörü 700-1000 arasında değişir. Bu değerlerden çok farklı bir sonuç elde edilirse ölçüm ve hesaplama kontrol edilmelidir.

Görüş Sahası Çapının Ölçülmesi: Mikroskopta görüş alanının hesaplanabilmesi için görüş sahası çapının ölçülmesi gerekir. Görüş sahası çapının ölçülmesinde objektif mikrometre kullanılır. Objektif mikrometre, mikroskop tablasına yerleştirilerek görüntü bulunur. Mikrometre cetvel çizgileri görüş sahasının ortasından geçirilen hayalî bir çapla karşılaştırılır ve mikrometre cetvel aralıkları cinsinden ölçülür (Görsel 9.1). Elde edilen değer 10 ile çarpılarak mikrometre (µm) cinsinden görüş sahası çapının gerçek değeri hesaplanmış olur. 10 ile çarpılmasının nedeni; objektif mikrometrenin her biriminin gerçek değerinin 10 µm olmasından dolayıdır.



9.1: Görüş sahasının çapı

Örneğin Görsel 9.1’de mikroskop görüş sahası çapının objektif mikrometre ile yapılan ölçümü gösterilmiştir. Görüş sahası çapının objektif mikrometrede 20 birime denk geldiği görülmektedir. Bu durumda;

Mikroskop Görüş Sahasının Çapı = R

$R=20 \text{ birim} \times 10 \text{ } \mu\text{m} = 200 \text{ } \mu\text{m}$ olarak hesaplanır.

Görüş Alanının Hesaplanması: Görüş sahası çapının gerçek değeri hesaplandıktan sonra görüş sahası alanı hesaplanır. Görüş sahası daire şeklinde olduğu için alan hesaplamasında ($A=\pi.r^2$) formülü kullanılmalıdır.

Örneğimizde

Çap (R) = 200 μm

Yarıçap (r) = $200 / 2 = 100 \text{ } \mu\text{m}$

Görüş Alanı (A) = $\pi.r^2 = 3,14 \times 100^2 = 31400 \text{ } \mu\text{m}^2$

Mikroskop Faktörünün Hesaplanması: Mikroskop sahasının alanı hesaplandıktan sonra 1 cm^2 lik alan içinde kaç adet görüş sahası bulunduğu yani mikroskop faktörü hesaplanır. Yukarıdaki örnekte görüş sahasının alanı $31.400 \text{ } \mu\text{m}^2$ olarak hesaplanmıştı. Bölme işleminin yapılabilmesi için birimlerin aynı cinse dönüştürülmesi gerekir. $1 \text{ cm}^2 = 10^8 \text{ } \mu\text{m}^2$ eşit olduğundan

$$MF = 1 \text{ cm}^2 / A = 10^8 / A = 100000000 / 31400 = 3185$$

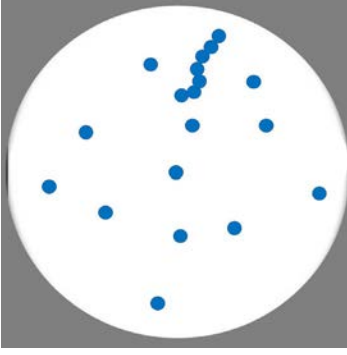
Ölçümü yapılan objektifin mikroskop faktörü 3185 olarak belirlenmiştir. Mikroskopta objektif, oküler veya tüp boyu değiştirilmezse elde edilen mikroskop faktörü sabittir. Her çalışmada tekrar hesaplanmasına gerek yoktur. Mikroskopun her objektifinin mikroskop faktörü farklıdır. Objektifin büyütme gücü arttıkça mikroskop faktörü büyür. Farklı mikroskoplarda, aynı büyütme gücüne sahip objektiflerde farklı bir mikroskop faktörü elde edilebileceği unutulmamalıdır.

9.1.2. Breed Yöntemi ile Sayımda Dikkat Edilecek Hususlar ve Hesaplama

Genellikle bakteri sayımında kullanılan bu yöntem belli bir hacimdeki örneğin belirli bir alan üzerine yayılması ve sayımın bu alanda yapılması esasına dayanır. Standart kullanımda hacim 0,01 mL (10 μL) ve alan 1 cm^2 olarak belirlenmiştir. Bu hacmin normal pipetlerle doğru olarak aktarılması mümkün değildir. Bundan dolayı mikropipet kullanılması gerekir. Mikropipetlerde ölçü birimi olarak genellikle mikrolitre kullanıldığı için mikropipetin 10’a ayarlanması gerekir.

Breed yöntemi daha çok çiğ süt ve bazı süt ürünlerinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde canlı ve ölü hücreler ayırt edilemediği için canlı ve cansız hücre sayısının toplamı belirlenebilir. Breed yöntemi istenirse maya sayımında da kullanılabilir.

Sayımda zincir şeklinde görülen (streptokok, streptobasil) bakteri zincirlerinin her biri bakteri sayısına bakılmaksızın bir olarak sayılır. Zincirin kısa veya uzun olması sayım şeklini değiştirmez. Her zincir bir adet olarak sayılmalıdır. Zincir şeklindeki bakteriler, tek hücre olarak sayılmalılardır ki kültürel sayım sonuçları ile paralellik gösterebilsinler. Kültürel sayımlarda, zinciri oluşturan bakteriler besiyerinde tek koloni oluşturacağından tek hücre olarak değerlendirilmektedir. Breed yönteminde de tek hücre gibi değerlendirilerek sonuçlarda paralellik sağlanmaya çalışılmaktadır. Görsel 9.2’de yapılan sayım sonucu 13 olarak belirlenmiştir.



Görsel 9.2: Mikroskop görüş sahasında sayım örneği

Breed yönteminde, sayım işlemi ne kadar çok farklı sahada yapılırsa sonucun güvenilirliği de o kadar artar. Sayım yapılacak saha sayısı numunenin birim hacminde bulunan bakteri sayısına ve mikroskop faktörüne göre değişmektedir (Tablo 9.1). Farklı sahalarda elde edilen sayım sonuçlarının toplam sayılan saha sayısına bölünerek ortalaması alınır. Sayım sırasında bakteri görülmeyen sahalarda da hesaplama katılmalıdır.

Tablo 9.1: Breed Yönteminde Sayılması Gereken Saha Sayısı (Gürgün ve Halkman, 1990)

Bakteri Sayısı/mL	Mikroskop Faktörü			
	3000	4000	5000	6000
30 bin – 300 bin	30	40	50	60
300 bin – 3 milyon	20	20	20	30
3 milyondan fazla	10	10	10	20

Sayım işlemi tamamlandıktan sonra hesaplama işlemi yapılarak numunenin birim hacmindeki bakteri sayısı hesaplanır. Hesaplama bir görüş sahasında bulunan bakteri sayısının ortalaması, mikroskop faktörü ve hacim düzeltme faktörü ile çarpılmalıdır. Breed yönteminde hacim düzeltme faktörü 100'dür. Çünkü sayım alanına konulan numune miktarı 0,01 mL olduğu için 100 çarpanı bu değeri 1'e tamamlanmaktadır.

Breed yönteminde numunenin mililitresindeki bakteri sayısı = $n \times MF \times 100$ formülü ile bulunur.

n: Farklı sahalarda yapılan sayımların ortalaması,

MF: Mikroskop faktörü,

100 ise 0,01 mL'deki sayının 1 mL'ye çevrilmesi için kullanılan hacim düzeltme faktörüdür.

ÖRNEK



Breed yöntemi ile sayım çalışması yapılmış ve 10 farklı görüş sahasında sırasıyla 3, 5, 4, 8, 0, 7, 3, 7, 5, 10 bakteri hücreleri sayılmıştır. Sayım işlemi yapılan objektifin mikroskop faktörü 3185 ise numunenin birim hacminde (mL) bulunan bakteri sayısını hesaplayınız.

$$n = (3 + 5 + 4 + 8 + 0 + 7 + 3 + 7 + 5 + 8) / 10 = 50 / 10 = 5$$

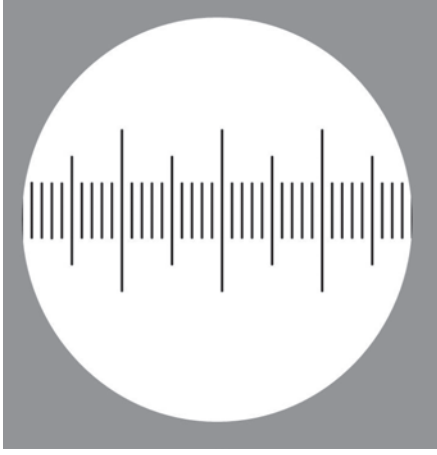
$$\text{Numunenin mililitresindeki bakteri sayısı} = 5 \times 3.185 \times 100$$

$$\text{Numunenin mililitresindeki bakteri sayısı} = 1.592.500 \text{ adet bakteri/mL numune}$$

SIRA SİZDE



Breed yöntemi ile sayım çalışmasında elde edilen veriler aşağıdaki görselde ve tabloda verilmiştir. Görsel sayımı yapılacak objektifte (40x) görüş sahası çapını belirlemek amacıyla objektif mikrometrede yapılan ölçümü göstermektedir. Bu durumda sayımı yapılan numunenin birim hacminde bulunan bakteri sayısını hesaplayınız.



Görüş Alanı Sırası	Sayım Sonucu
1. görüş alanı	3 maya
2. görüş alanı	5 maya
3. görüş alanı	3 maya
4. görüş alanı	2 maya
5. görüş alanı	0 maya
6. görüş alanı	5 maya
7. görüş alanı	2 maya
8. görüş alanı	3 maya
9. görüş alanı	4 maya
10. görüş alanı	0 maya

NOT ALINIZ



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

47. UYGULAMA

MİKROSKOP FAKTÖRÜNÜN BELİRLENMESİ

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak mikroskop faktörünün belirlenmesi çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Mikroskop, objektif mikrometre, sedir yağı, kselol, mercek temizleme bezi, hesap makinesi.

İşlem Basamakları

1. Mikroskobu kullanıma hazır hâle getiriniz.
 - Mikroskobun ışığı açılıp diyaframı kısılarak temiz olup olmadığı kontrol edilmelidir.
 - Temiz değilse temizledikten sonra kullanılmalıdır.
2. Objektif mikrometreyi mikroskop tablasına yerleştirerek kısıkaçla sabitleyiniz.
 - Objektif mikrometre temiz olmalıdır. Temiz değilse alkolle silinip kurulanmalıdır.
3. Sayım yapmada kullanılacak objektifi, ışık yoluna getiriniz.
 - Revolveri çevirerek objektifin çalışma yuvasına tam olarak yerleştiğinden emin olunmalıdır.
4. Mikroskobun ışık ve diyafram ayarlarını yapınız.
 - Işık ve diyafram gereğinden fazla açılmamalıdır.
5. Objektif mikrometre cetvelinin bulunduğu alanı şaryoyu kullanarak ışık üzerine getiriniz.
6. Makro ayar vidasını kullanarak görüntüyü bulunuz.
7. Mikro ayar vidasını kullanarak görüntüyü netleştiriniz.
8. Şaryo ayar vidasını kullanarak objektif mikrometre cetvel çizgilerini görüş alanı çapına dik olarak ayarlayınız.
9. Şaryo ayar vidasını kullanarak cetvel başlangıç çizgisini, görüş alanı çapının başlangıç noktası ile çakıştırınız.
 - Başlangıç çizgisinin görüş alanının tam kenarına denk geldiğinden emin olunmalıdır.
10. Görüş alanının çapını objektif mikrometre ile ölçünüz.
 - Başlangıç çizgisi sıfır olarak değerlendirilip sayılmalıdır.
11. Objektif mikrometreyi temizleyerek kutusuna koyunuz.
12. Mikroskop görüş alanını hesaplayınız.
13. Mikroskop faktörünü hesaplayınız.
 - Ölçü birimleri dönüştürülmeli, gerekirse hesap makinesi kullanılmalıdır.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Mikroskobu tekniğine uygun olarak kullandı.				
2	Mikroskopta görüntü buldu.				
3	Görüş sahasının çapını objektif mikrometre yardımıyla ölçtü.				
4	Görüş sahasının alanını hesapladı.				
5	Mikroskop faktörünü hesapladı.				
TOPLAM PUAN					

48. UYGULAMA

BREED YÖNTEMİ İLE BAKTERİ SAYIMI

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak Breed yöntemi ile bakteri sayımı çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

**Kullanılacak
Araç Gereç**

Mikroskop, lam, ksilol, mercek temizleme bezi, öze, cam yazar kalem, bazık boya çözeltisi (metilen mavisi, kristal viyole gibi).

İşlem Basamakları

1. Temiz bir lam alınız.
2. Lamın üzerine asetat kalemiyle 1cm² lik kare çiziniz ve lamı ters çevirerek kullanınız (Görsel 9.3).



Görsel 9.3: Lam üzerine karelerin çizilmesi



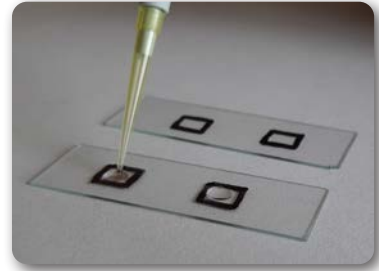
Görsel 9.4: Aktarma işleminde kullanılacak mikropipet



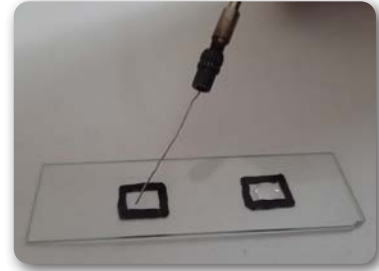
Görsel 9.5: Mikropipetin 0,01 mL ayarlanması

3. Numuneyi homojen hale getiriniz.
4. Sayım yapılacak numuneden mikropipet ile (Görsel 9.4) 0,01 mL (10 µL) (Görsel 9.5) alarak karenin ortasına koyunuz (Görsel 9.6).
5. Bunzen alevinde sterilize edilip soğutulan iğne öze ile numuneyi karenin tamamına yayınız (Görsel 9.7).
6. Hazırlanan preparatı düz bir zeminde kuruyuncaya kadar bekletiniz.
7. Preparatı fikse ediniz.

- Numunenin özelliğine uygun fiksasyon yöntemi belirlenir.
- Isıl işlemle fiksasyonda preparat 3 defa alevden geçirilir.
- Numunenin organik madde içeriği yüksek veya numune ısıdan zarar görecektse kimyasallarla fiksasyon yapılması önerilir (Görsel 9.8).
- Kimyasal yöntem ile fiksasyon işlemi yapılacaksa preparat içinde ksilol bulunan bir behere daldırılıp 60 saniye bekletilir. Ksilol, numunedeki yağı eriterek uzaklaştırır. Ayrıca bakterilerin suyunu çekerek lama yapışmalarını sağlar. Lam, bu kez içinde %76'lık alkol bulunan bir başka behere daldırılarak 60 saniye bekletilir. Alkol, ksilolun lamdan uzaklaştırılması için kullanılır. Alkol, su ile yıkanan lamdan uzaklaştırılır.



Görsel 9.6: Lam üzerindeki karelere 0,01 mL numunenin aktarılması

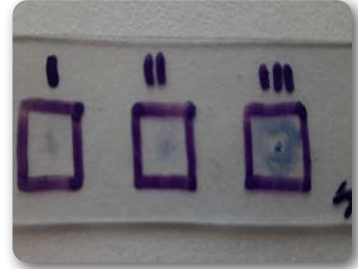


Görsel 9.7: Numunenin kareye iğne öze ile yayılması

8. Bazık bir boya ile boyayarak saf su ile yıkayınız.
 - Boyama süresi olarak metilen mavisinde 30-90 saniye, karbol fuksinde 10-30 saniye, kristal viyolede ise 30-60 saniye yeterlidir.
9. Preparatı kurutunuz (Görsel 9.9).
10. Preparatı mikroskop tablasına yerleştirerek immersiyon objektifinde görüntü bulunuz (Görsel 9.10).
 - İncelenecek bölgenin üzerine 1 damla sedir yağı damlatılması gerektiği unutulmamalıdır.
11. Mikro ayar vidası ile görüntüyü netleştirerek görüş alanında bulunan hücreleri sayınız.
12. Şaryo ile preparatı hareket ettirerek farklı görüş alanlarında sayım yapınız.
 - En az 10 farklı görüş alanında sayım yapılmalıdır.
13. İnceleme bitince makro ayar vidası ile tablayı aşağıya indiriniz.
14. Preparatı çıkararak dezenfektan çözeltisi içerisine atınız.
15. Mikroskobu temizleyerek yerine kaldırınız.
16. Numunenin bakteri sayısını hesaplayınız.



Görsel 9.8: Kimyasal fiksasyon işlemi



Görsel 9.9: İncelenmeye hazır breed preparatı



Görsel 9.10: Preparata sedir yağı damlatılması ve İmmersiyon objektifi ile sayım işlemi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Numuneyi analize hazırlayarak dilüsyon hazırladı.				
2	Breed yöntemine uygun preparat hazırlayarak basit boyama işlemini boyadı.				
3	Mikroskobu tekniğine uygun olarak kullandı.				
4	Mikroskopta immersiyon objektifinde görüntü bularak farklı görüş alanlarında sayım yaptı.				
5	Numunede bulunan bakteri sayısını hesapladı.				
TOPLAM PUAN					

9.2. THOMA LAMI İLE MAYA SAYIMI

Thoma lamı (hemositometre- neubauer chamber lamı) sayım amacıyla geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılan özel bir lamdır (Görsel 9.11). Mikroskopik birçok canlı ve cansız nesnenin (maya, alyuvar, akyuvar, sperm) sayımında kullanılmaktadır.

9.2.1. Thoma Laminin Özellikleri ve Kullanımı

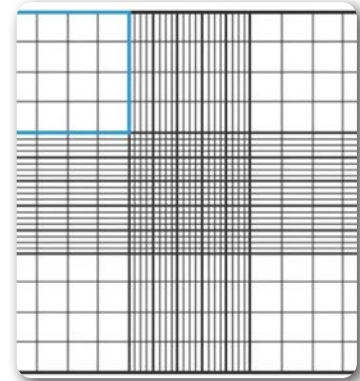
Sayım işleminin daha kolay ve hatasız yapılması için Thoma lamı üzerinde iki adet sayım bölgesi bulunmaktadır. Sayım bölgeleri de kendi içinde karelere bölünmüştür. Sayım bölgesinin toplam alanı 1 mm^2 ve sayım yüksekliği de $0,1 \text{ mm}$ 'dir. Thoma lamı yönteminin esası, mikroskop yardımıyla $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılarak numunenin birim hacminde bulunan maya sayısını belirlemektir.



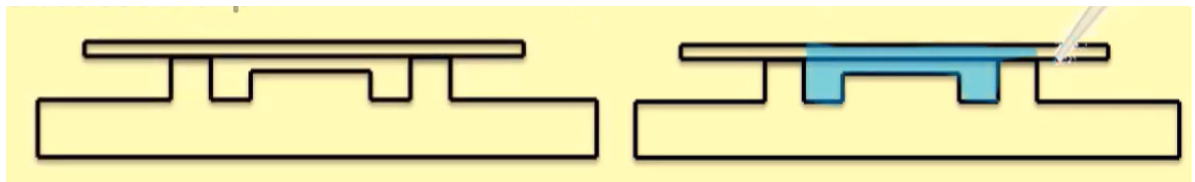
Görsel 9.11: Thoma lamı

Thoma lamı bakteri sayımında önerilmeyen bir yöntemdir. Çünkü bakteriler küçük olduğu için $0,1 \text{ mm}$ derinlikte hepsinin görülmesi mümkün değildir. Bu sebeple bakteri sayımı için Petroff-Hausser lamı geliştirilmiştir. Bu lamın Thoma lamından farkı, sayım bölgesi derinliğinin $0,02 \text{ mm}$ olmasıdır.

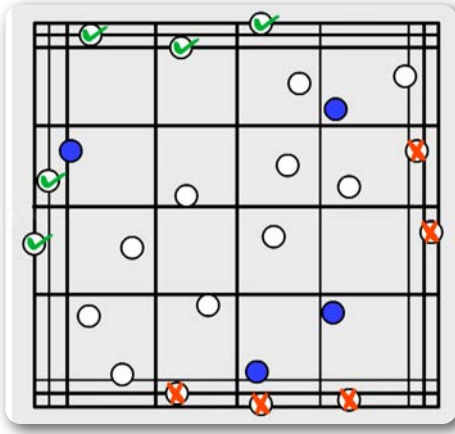
Thoma laminin bazılarında 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare toplamda ise 400 (16×25) küçük kare bulunmaktadır. Bazılarında ise 25 büyük kare, her büyük karede 16 küçük kare, toplamda 400 (25×16) küçük kare bulunmaktadır (Görsel 9.12). Her ikisinde de sayım yapılan hacim $0,1 \text{ mm}^3$ olup sadece hesaplamada kare sayısına dikkat edilmelidir (Görsel 9.13).



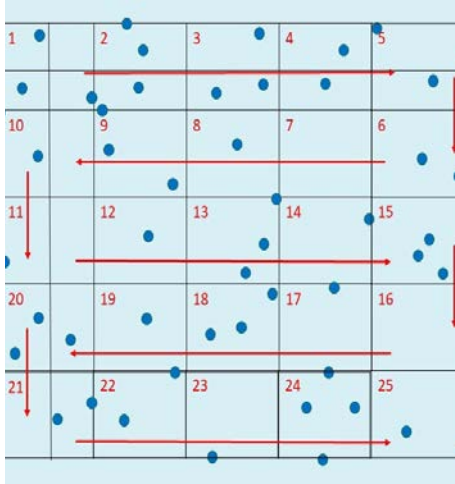
Görsel 9.12: Thoma lamında sayım bölgesi



Şekil 9.13: Thoma laminin yandan görünümü



Görsel 9.14: İç ve dış kenarlara temas eden hücrelerin sayım işlemi



Görsel 9.15: Thoma lamında sayım işlemi

2	4	3	2	2
2	3	1	0	1
1	1	2	1	4
3	1	3	1	0
2	3	0	3	1

Toplam 46 adet hücre sayılmıştır.

Numunenin birim miktarında bulunan toplam hücre sayısı şu formüle göre hesaplanır:

Numunenin Mililitresindeki Hücre Sayısı = A x DF x 10.000

A: 16 büyük karede bulunan maya sayısı

DF: Dilüsyon faktörü

10.000: Hacim düzeltme faktörüdür. 0,1 mm³ de elde edilen sayım sonucunun 1 mL' de bulunan hücre sayısına dönüştürülmesi amacıyla kullanılan çarpandır. Bu çarpan Thoma lamı ile yapılan bütün sayımlarda kullanılır ve değişmez.

Sayım işlemleri 18 – 24 saatlik taze maya kültürlerinde yapılmalıdır. Maya sayımında dilüsyon sıvısı olarak %10'luk asetik asit veya 1/9'luk sülfürik asit çözeltisi kullanılır. Bu çözelti maya hücrelerini birbirlerinden ayırarak kümeleşmeyi önlediği için sayım işlemi kolaylaştırır.

Sayım işlemlerini kolaylaştırmak amacıyla karelerin tamamını saymak yerine çaprazlama kuralına uygun olarak daha az karede sayım yapılabilir. Bu durumda genellikle büyük karelerin tümünü saymak yerine yalnızca çapraz 8 büyük karede sayım yapılır. Sayımlar hata ihtimaline karşı en az beş kere tekrarlanmalıdır. Sayımlar arasında fark olması durumunda ortalaması alınarak sonuç 2 ile çarpılır. Böylece bütün karelerdeki hücre sayısı belirlenmiş olur. Sayım yapılırken dikkat edilecek hususlar, örnek çalışma üzerinden aşağıda anlatılmaktadır.

- Sayıma alınan karelerin iki komşu kenarı iç, diğer iki komşu kenarı ise dış kabul edilir. İç kabul edilen çizgilere temas eden hücreler sayılırken dış kabul edilen kenarlara temas eden hücreler sayılmaz. Sayım boyunca iç ve dış olarak kabul edilen kenarlarda değişiklik yapılmaz. Genel olarak üst ve sol kenarlar iç olarak kabul edilmektedir (Görsel 9.14).
- Sayımın görselde gösterilen sıra ile yapılması önerilir (Görsel 9.15). Görselde sayım sırası oklarla ve numaralandırma ile gösterilmiştir. Sol üstteki küçük kareden başlanarak sağa doğru, daha sonra bir alt satıra inilerek sola doğru sayım yapılmalıdır.
- Görselde bir büyük karede bulunan maya hücreleri sayılmıştır. Bu sayımda, üst ve sol kenar, iç kabul edilmiş ve bu kenarlara temas eden hücreler sayılmıştır. Sayım sonuçları kare sırasına göre görselin altında verilmiştir.
- Görseldeki büyük karenin 25 küçük kareden oluştuğu görülmektedir. Bu durumda bu Thoma lamı 16 büyük kareden oluşuyor demektir. Şayet büyük kare 16 küçük kareden oluşuyorsa büyük kare sayısının da 25 olacağı unutulmamalıdır.

ÖRNEK



Thoma lamı ile maya sayım çalışması, numune ile çaprazlama kuralına göre yapılarak aşağıdaki veriler elde edilmiştir. Bu verileri kullanarak numunenin birim miktarında bulunan maya sayısını hesaplayınız.

1. Büyük Kare	2. Büyük Kare	3. Büyük Kare	4. Büyük Kare	5. Büyük Kare	6. Büyük Kare	7. Büyük Kare	8. Büyük Kare
43	40	47	36	44	35	42	33

$$A = 2 \times (43+40+47+36+44+35+42+33) = 640$$

DF=1 (Numunenin kendisi ile çalışıldığı için dilüsyon faktörü 1'e eşittir.)

$$\text{Numunenin mililitresindeki hücre sayısı} = A \times DF \times 10.000$$

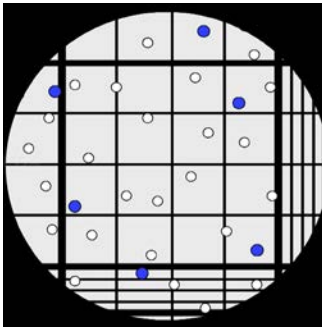
$$\begin{aligned} \text{Numunenin mililitresindeki hücre sayısı} &= 640 \times 1 \times 10.000 = 6.400.000 \\ &= 6,4 \times 10^6 \text{ maya/mL numune} \end{aligned}$$

SIRA SİZDE



Thoma lamı yöntemi ile sayım çalışmasında elde edilen görüntü aşağıda verilmiştir. Görsel 40x objektifte bir büyük karede yapılan sayımı göstermektedir. Bu görselde elde edilen verinin Thoma lamının tamamında yapılan sayımın ortalamasına eşit olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda sayımı yapılan numunenin birim hacminde bulunan maya sayısını hesaplayınız.

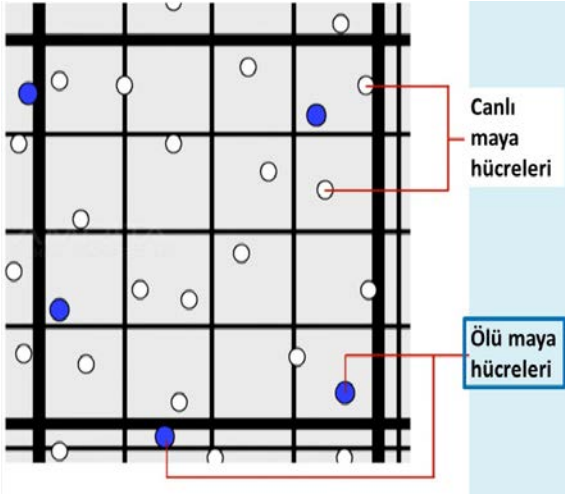
Not: Numuneden 1 mL alınarak 9 mL %10 asetik asit çözeltisi içerisinde homojenize edilen dilüsyonda sayım yapılmıştır.



Görsel 40x objektifte elde edilmiştir.

9.2.2. Mayalarda Yüzde (%) Canlılık Testi

Mayalarda canlılığın belirlenmesi özellikle ticari değeri olan maya ürünlerinde önemlidir. Piyasada satılan ekmek mayaları veya endüstride kullanılan starter kültürlerde (ekmek, bira, şarap mayası gibi) yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.



Görsel 9.16: Ölü ve canlı maya hücreleri

Maya hücrelerinin canlı veya ölü oldukları belirlenerek canlılık oranlarının yüzdesi hesaplanabilmektedir. Maya hücrelerinin canlı veya ölü olduklarını belirlemek amacıyla lugol çözeltisi veya metilen mavisi boya çözeltisi kullanılmaktadır. İncelenecek kültüre birkaç damla %1'lik metilen mavisi damlatıldığında ölü hücreler mavi, canlı hücreler ise renksiz görünür. Renksiz hücreler sayılarak canlı maya; mavi renkte olan hücreler sayılarak cansız maya sayısı belirlenebilir. Canlı ve ölü hücre sayısı belirlenerek mayalarda canlılık oranının yüzdesi belirlenebilir. Aynı işlem lugol çözeltisi ile yapıldığında ölü hücreler sarı, canlı hücreler kahverengi renkte görülmektedir.

Mayalarda canlılık yüzdesinin belirlenmesinde doğru sonuç alabilmek için mikroskop kullanımında deneyimli olmak ve mikroskop ışık ayarına dikkat etmek gerekir.

ÖRNEK

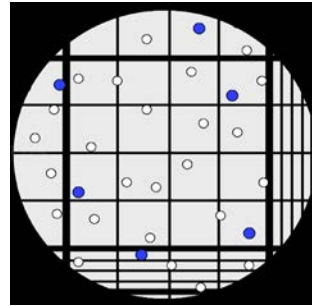
Mikroskopta görüş alanı içerisinde ortalama 20 renksiz, 5 mavi renkte maya hücresi belirlenmiştir. Bu durumda canlılık oranının yüzdesini hesaplayınız.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Canlı Hücre Sayısı} \times 100) / \text{Toplam Hücre Sayısı}$$

$$\% \text{ Canlılık} = (20 \times 100) / 25 = \%80$$

SIRA SİZDE

Mayalarda % canlılık oranının bulunması amacıyla kültüre metilen mavisi eklenmiş ve aşağıdaki görsel elde edilmiştir. Bu durumda sayımı yapılan numunenin canlılık oranının yüzdesini hesaplayınız.



Görsel 40x objektifte elde edilmiştir.

49. UYGULAMA

THOMA LAMİ İLE MAYA SAYIMI

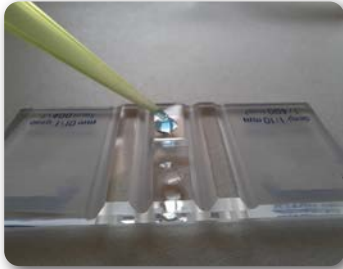
Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak Thoma lamı ile maya sayımı çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

**Kullanılacak
Araç Gereç**

Mikroskop, Thoma lamı, numune, %10'luk asetik asit veya 1/9'luk sülfürik asit çözeltisi, lamel.

İşlem Basamakları

1. Numuneyi homojen hâle getiriniz.
2. Numuneden dilüsyon hazırlayınız.
 - Numune katı ise veya numunede bulunan maya sayısı görüntü alanında sayılamayacak kadar çok ise mutlaka dilüsyon hazırlayarak sayım yapılmalıdır.
 - Dilüsyon sıvısı olarak %10'luk asetik asit veya 1/9'luk sülfürik asit çözeltisi kullanılmalıdır.
 - Dilüsyon hazırlanır hazırlanmaz sayım işlemine geçilmelidir.
3. Sayım yapılacak numune veya dilüsyonundan Thoma laminin her iki sayım bölgesine de birer damla aktarınız (Görsel 9.17).
4. Numune veya dilüsyonun üzerine lamel kapatınız (Görsel 9.18).
5. Lamelin Thoma lamına tam oturması için lamelin iki kenarına başparmaklarınızla bastırarak ileri geri hareket ettiriniz.
 - İncelenecek sıvının lamdaki sayım bölgesine homojen dağılımı sağlanmalıdır.
6. Thoma lamını mikroskop tablasına yerleştirerek görüntü bulunuz (Görsel 9.19).
7. Sayım yapılacak objektifte görüntüyü netleştirerek sayım yapılacak kareleri belirleyiniz.
8. Belirlediğiniz karelerde 40x objektif ile maya hücrelerini sayarak yazınız.
9. Preparatı çıkararak dezenfektan çözeltisinin içine atınız.
10. Mikroskobu temizleyerek yerine kaldırınız.
11. Numunenin maya sayısını hesaplayınız.



Görsel 9.17: Sayım bölgelerine numune konulması



Görsel 9.18: Lamel kapatma işlemi



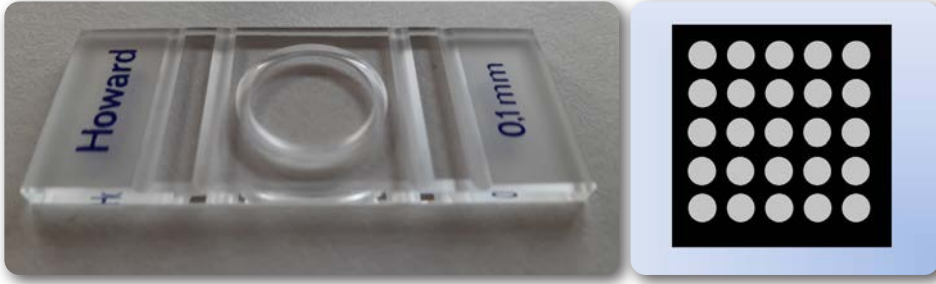
Görsel 9.19: Thoma laminin mikroskoba yerleştirilmesi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Numuneyi analize hazırlayarak dilüsyonlarını hazırladı.				
2	Thoma lamında preparat hazırladı.				
3	Mikroskobu tekniğine uygun olarak kullandı.				
4	Mikroskopta görüntü bularak yeterli karede sayım yaptı.				
5	Numunede bulunan maya sayısını hesapladı.				
TOPLAM PUAN					

9.3. HOWARD LAMI İLE KÜFLÜ SAHA SAYIMI

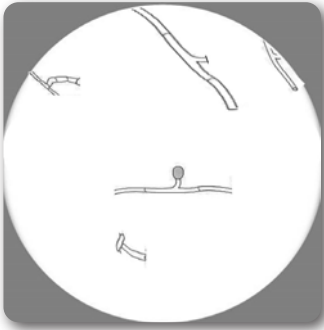
Domates ürünlerinde, küf yükü önemli kalite kriterlerindendir. Küf yükü, ürünün ham maddesinin küflü olup olmadığı ve hijyenik koşullarda üretilip üretilmediğini göstermesi açısından önemlidir. Küf yükünün kabul edilebilen azami sınırı; ülkeden ülkeye değişmekle birlikte %40-60 arasındadır.

9.3.1. Howard Lam ve Lamelinin Özellikleri ve Kullanımı



Görsel 9.20. Howard lamı ve lameli

Howard lamı ile küflü saha sayımı, domates ürünlerinde (domates suyu, salça, ketçap gibi) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ürünlerin üretiminde kullanılan ham maddenin, mikrobiyolojik kalitesi ve üretimin hijyen ve sanitasyon kurallarına uygun yapıp yapılmadığını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Yöntemin esası, 25 daire içinde küflü sahaların (pozitif) belirlenerek sonucun yüzde olarak ifade edilmesidir.



Görsel 9.21: Pozitif daire ve hifler

Howard lamı ve lameli, küflü saha sayımında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Thoma lamı ile sayımda normal lamel kullanımı yeterlikten Howard yönteminde özel olarak tasarlanmış Howard lameli kullanılmaktadır. Howard lamelinin üzerinde 25 daire vardır. Her daire bağımsız olarak değerlendirilir. İncelenen her daire pozitif (+) veya negatif (-) olarak değerlendirilir. Eğer incelenen dairenin içinde üçten daha fazla hif parçası varsa veya üçten daha az olmasına rağmen hiflerin toplam uzunluğu daire çapının 1/6'sından daha büyük ise (+) olarak değerlendirilir. Görsel 9.21'de pozitif bir daireye örnek verilmiştir. Sonuç değerlendirmesi için en az 25 daire incelenmelidir. Elde edilen pozitif daire sayısına göre hesaplama yapılarak sonuç **% küflü saha** olarak ifade edilir.

ÖRNEK



Howard lamı yöntemine göre küflü saha sayımı yapılmıştır. Değerlendirme 25 dairede yapılmış ve bu dairelerden 5 tanesi pozitif olarak belirlenmiştir. Bu numunenin % küflü saha oranını hesaplayınız.

$$\% \text{ Küflü Saha} = (\text{Pozitif Daire Sayısı} \times 100) / \text{İnceleme Yapılan Daire Sayısı}$$

$$\% \text{ Küflü Saha} = (5 \times 100) / 25 = \%20$$

Numunede belirlenen % küflü saha oranı, numunede bulunan küf miktarını doğrudan göstermez. Örneğin numunede %40 pozitif saha oranının belirlenmiş olması, numunede %40 oranında küf olduğunu göstermemektedir. Belirlenen değer Howard lamı yöntemine göre %40 oranında küflü saha olduğunu gösterir. Küflü saha oranı ile küflü ham madde oranı arasında belli bir korelasyon vardır. Küflü saha oranı arttıkça ham maddenin kalitesinin daha kötü olduğu sonucuna varılmaktadır. Yüzde küflü saha oranı, üretimde kullanılan ham maddenin ne kadarının küflü olduğu hakkında oransal olarak bilgi verir. Örneğin salça üretiminde kullanılan domateslerin kütlece %4'ü küflü ise bu üründe yüzde küflü saha oranı %60 çıkar.

Tablo 9.2, üretimde kullanılan küflü ham maddenin kütlece yüzdesi ve küflü saha oranını göstermektedir.

Tablo 9.2: Üretimde Kullanılan Küflü Ham Maddenin Kütlece Yüzdesi ve Küflü Saha Oranı

Küflü Ham Madde- nin Yüzdesi	% Küflü Saha Oranı	Küflü Ham Madde- nin Yüzdesi	% Küflü Saha Oranı
1	25	6	64
2	35	12	75
3	48	15	80
4	60	19	85
5	62	27	90

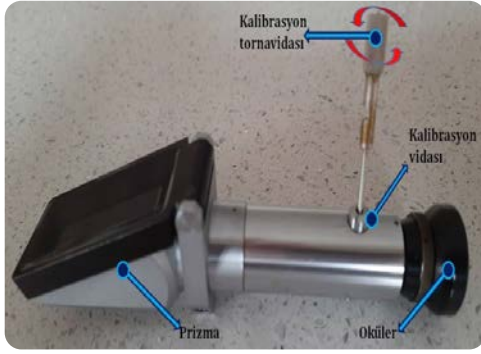
9.3.2. Numunenin Refraktometre Yardımıyla Kuru Madde Oranının Ayarlanması

Numunenin özelliğine göre seyreltme işlemine ihtiyaç duyulabilmektedir. Numunenin kuru madde oranı yüksek ise seyreltilmesi gerekir. Örneğin salça numuneleri steril destile su ile seyreltilerek kuru madde oranı %8-9'a ayarlanmalıdır. Salçanın kuru madde miktarının ayarlanmasında refraktometreden faydalanılmaktadır (Görsel 9.22). Seyreltme işlemine, refraktometre değeri 20 °C'de 45,0-48,7 veya refraktif indeks 20 °C'de 1,3447-1,3460 oluncaya kadar devam edilir. Domates suyunda, pulpunda ve proses örneklerinde seyreltme işlemine gerek duyulmamaktadır. Ketçap numunelerinde ise %0,5'lik sodyum-karboksimetil-selüloz, %3-5'lik pektin veya %1'lik algin çözeltilerinden biri ile 1/1 oranında seyreltilir.

Refraktometrenin kullanılmadan önce doğru ölçüm yapıp yapmadığı kontrol edilmelidir. Bu amaçla briks değeri bilinen herhangi bir sıvı kullanılabilir fakat genellikle saf su kullanılmaktadır. Saf suyun briks değeri sıfır olduğundan refraktometrede briks değeri 0 (sıfır) okunuyorsa doğru ölçüm yapıyor demektir. Şayet sıfır değerini göstermiyorsa kalibrasyon yapılmalıdır. Bunun için kalibrasyon vidası çevrilerek sıfır değeri okunacak şekilde getirilerek kalibrasyon tamamlanır.

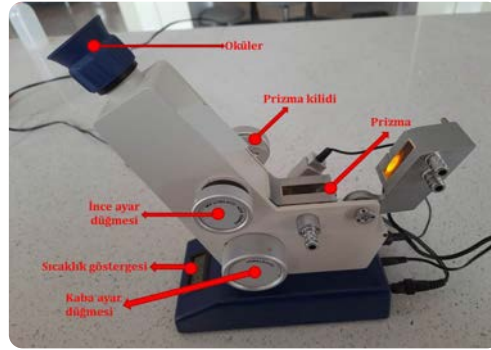


Görsel 9.22: Refraktometre çeşitleri



Görsel 9.23: El tipi refraktometre kısımları ve ölçüm

El tipi refraktometreler kullanımının pratik olması, taşınabiliyor olması ve kolay kalibrasyon işlemi yapılabilmesi nedeniyle üretim tesislerinde ve saha çalışmalarında tercih edilmektedir (Görsel 9.23). Abbe refraktometreleri ise hassas ve kesin ölçüm sonucu vermesi ve ölçüm aralığının daha geniş olması sebebiyle laboratuvar çalışmalarında tercih edilmektedir (Görsel 9.24).



Görsel 9.24: Abbe refraktometre kısımları

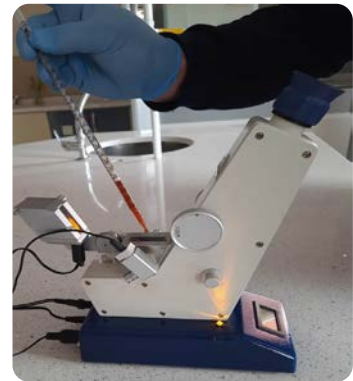
Refraktometrede ölçüm işlemi için öncelikle cihazın prizması temizlenir (Görsel 9.25). Prizmanın üzerine ölçümü yapılacak numune homojen hale getirilerek birkaç damla aktarılır (Görsel 9.26 ve 9.27). Prizmanın kapağı kapatılır ve sıcaklık ayarlaması yapılır (Görsel 9.28). Görüntü netleştirilerek refraktometre veya refraktif indeks değeri okunur (Görsel 9.29 ve 9.30). Numune istenen değere ulaşınca kadar seyreltme çözeltisi eklenerek numune homojen hale getirilir ve refraktometrede okuma yapılır. İstenilen değere ulaşınca işlem sonlandırılır.



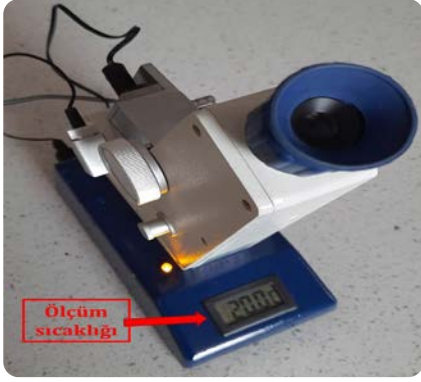
Görsel 9.25: Refraktometre prizmasının temizlenmesi



Görsel 9.26: Numunenin homojen hâle getirilmesi



Görsel 9.27: Numunenin aktarılması



Görsel 9.28: Refraktometrede ölçüm sıcaklığı



Görsel 9.29: Kaba ayar düğmesi ile ölçüm ayarı



Görsel 9.30: Abbe refraktometre başlangıç ve okuma anının görüntüsü

Abbe refraktometrelerinde okuma yapabilmek için görüntünün kaba ve ince ayar düğmeleri ile ayarlanması gerekir. Görsel 9.30'da olduğu gibi karanlık ve aydınlık alanların eşit, sınır çizgisinin net ve kesişim noktasının üzerinde olacak şekilde görüntü ayarlandıktan sonra skaladan okuma yapılması gerekir.

9.3.3. Küf Hiflerinin Diğer Yapılardan Ayırt Edilmesi

Mikroskopta ham maddeden gelen dokular ile küf hiflerinin birbirinden ayırt edilmesi oldukça zordur. Bu zorluk hammaddeden gelen parçacıklar ile küf hiflerinin mikroskoptaki benzerliklerinden kaynaklanmaktadır. Küf hiflerini diğer yapılardan ayırt edebilmek için dikkat edilmesi gereken özellikler şunlardır:

- Küf hifleri, boru şeklinde bir yapıya sahiptir. Hiflerin kenar çizgileri birbirine paralel ve karşılıklı kenarları birbirine eşittir fakat hif dışındaki yapıların genişliği veya boyları eşit değildir. Daralıp genişleyen bir yapıya sahiptir. Kenar çizgileri birbirine paralel değildir.
- Küf hiflerinin birçoğu septalı olmasına karşın hif dışındaki yapılarda septa görülmez.
- Küf hiflerinin uç kısımları küt, hif dışındaki yapıların uç kısımları ise sivridir.
- Küf hiflerinde dallanmış yapılar görülürken hif dışındaki yapılarda dallanma görülmez.
- Küf hifleri granüllü bir görüntüye sahip olmasına rağmen hif dışındaki yapılar saydamdır.
- Küf hifleri net görüntüye sahipken hif dışındaki yapılar aynı netlikte görülmez.

NOT ALINIZ



.....

.....

.....

50. UYGULAMA

HOWARD LAMI İLE KÜFLÜ SAHA SAYIMI

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak Howard lamı ile küflü saha sayımı çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Mikroskop, Howard lamı ve lameli, kültür, sedir yağı, ksilol, salça numunesi.

İşlem Basamakları

1. Numuneyi homojen hâle getiriniz.
2. Numuneyi kuru maddesi %8-9 oluncaya kadar seyreltiniz.
 - Numunenin kuru madde oranı refraktometre yardımıyla ölçülerek ayarlanmalıdır.
 - Numunenin refraktometre değeri 20 °C'de 45,0 – 48,7 veya refraktif indeksi 20 °C'de 1,3447-1,3460 değerleri arasında oluncaya kadar saf su ile seyreltilmelidir.
3. Seyreltilen numuneden Howard lamının sayım bölgesine aktarınız.
 - Kullanılacak Howard lam ve lameli temiz olmalıdır.
 - Seyreltilen numuneden ince bir spatül ile alınarak numune platformuna düzgün bir şekilde yayılmalıdır.
 - Lam üzerine konulan numune, taşacak kadar çok veya boşluk kalacak şekilde az olmamalıdır.
4. Sayım bölgesinin üzerine Howard lamelini kapatınız.
 - Lamelin bir kenarı, numune platformunun kenarına dayandırılarak yavaşça kapatılmalıdır.
5. Howard lamını mikroskop tablasına yerleştirerek görüntü bulunuz.
6. İnceleme yapılacak objektifte görüntüyü bularak netleştiriniz.
 - Sayım işleminin 10x oküler ve 10x objektifte yapılacağı unutulmamalıdır.
7. Lamel üzerinde bulunan daireleri sırayla tek tek incelenerek küf açısından pozitif veya negatif olduğunu belirleyiniz.
 - Lamelin sol üst köşesindeki daireden başlanarak sırayla bütün daireler incelenerek değerlendirilmelidir.
 - Bir preparatta en az 25 daire incelenmelidir.
8. İncelemesi biten preparatı çıkararak lam ve lameli dikkatli bir şekilde temizleyiniz.
9. Mikroskobu temizleyerek yerine kaldırınız.
10. Numunenin % küflü saha oranını hesaplayınız.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Numuneyi analize hazırlayarak kuru madde oranını ayarladı.				
2	Howard lamında preparat hazırladı.				
3	Mikroskobu tekniğine uygun olarak kullandı.				
4	Mikroskopta görüntü bularak yeterli sayıda dairede değerlendirme yaptı.				
5	Numunede bulunan % küflü saha oranını hesapladı.				
TOPLAM PUAN					



A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. Mikroskobik sayım yöntemlerinden Breed yöntemi bakteri sayımında; yöntemi maya sayımında; Howard lamı yöntemi ise küflü saha sayımında sıklıkla kullanılmaktadır.
2. Breed yöntemi ile sayım sonucu elde edebilmek için faktörünün belirlenmesi gerekmektedir.
3. Mikroskobun görüş sahası çapının ölçülmesinde mikrometre kullanılır.
4. Breed yöntemi ile sayımda şeklinde görülen bakteri zincirlerinin her biri bakteri sayısına bakılmaksızın bir olarak sayılır.
5. Breed yöntemi ile sayımda 1cm^2 lik alana mikrolitre numune aktarılarak yayılır.
6. Maya sayımlarında, seyreltme işleminde dilüsyon sıvısı olarak çözeltisi kullanılır.
7. Thoma lamı ile sayım işlemlerinde hacim düzeltme faktörü olarak çarpanı kullanılır.
8. Maya hücrelerinin canlı veya ölü olduklarını belirlemek amacıyla metilen mavisi boya çözeltisi kullanılmış ise canlı hücreler görünür.
9. Domates ürünlerinde (domates suyu, salça, ketçap gibi) küflü saha sayımında kullanılmak amacıyla lamı ve lameli geliştirilmiştir.
10. Salçanın kuru madde miktarının ölçülmesinde ve ayarlanmasında faydalanılmaktadır.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevabını işaretleyiniz.

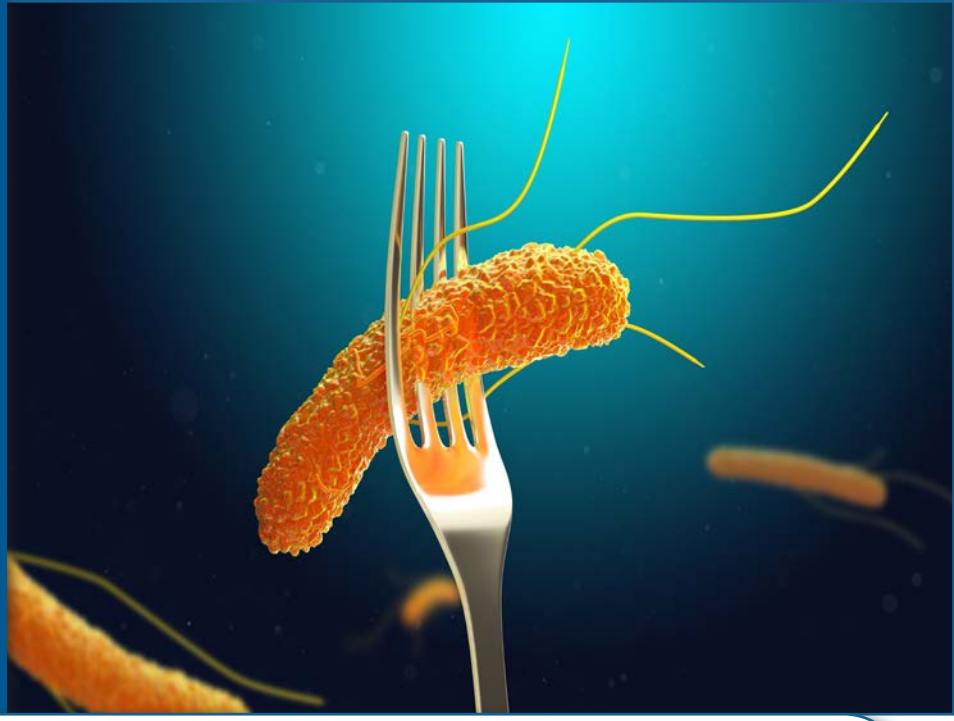
11. Aşağıdakilerden hangisi mikroskobik sayım yöntemlerinin avantajlarından değildir?
 A) Çok çabuk sonuç alınması
 B) Maliyetinin düşük olması
 C) Sayım sırasında hücre morfolojilerinin belirlenmesi
 D) Ölen bakteri sayısının belirlenmesi
 E) Uygulanmasının kolay olması
12. Breed yöntemi ile sayım çalışmasında numune ile çalışılmış ve ortalama bir görüş alanında 10 adet mikroorganizma sayılmıştır. **Sayım yapılan objektifin mikroskop faktörü 4000 ise numunenin 1 mililitresinde bulunan mikroorganizma sayısı kaçtır?**
 A) 4 000 B) 40 000 C) 400 000 D) 4 000 000 E) 40 000 000



13. Thoma lamı yöntemi ile sayım çalışmasında numune ile çalışılmış ve 8 büyük karede toplam 80 adet hücre sayılmıştır. Numunenin bir mililitresinde bulunan maya hücre sayısı kaçtır?
A) 160 B) 1 600 C) 16 000 D) 160 000 E) 1 600 000
14. Howard lamı ile küflü saha sayımında 50 dairede değerlendirme yapılmış ve toplam 10 dairede pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu durumda numunenin % küflü saha değeri aşağıdakilerden hangisidir?
A) 10 B) 15 C) 20 D) 25 E) 50
15. Mikroskopta görüş alanı içerisinde ortalama 36 renksiz, 4 mavi renkte maya hücresi sayılmıştır. Bu durumda % canlılık oranı kaçtır?
A) 10 B) 36 C) 72 D) 90 E) 92
16. Mikroskobik sayım yöntemleri ile ilgili verilen bilgilerden hangisi yanlıştır?
A) Salçada küflü saha sayımında Howard lamı ve lameli kullanılır.
B) Breed yöntemi ile bakteri sayımında mikroskop faktörünün belirlenmesi gerekir.
C) Thoma lamı bakteri sayımlarında önerilen bir yöntemdir.
D) Thoma lamının sayım bölgeleri karelere bölünmüştür.
E) Küflü saha sayımında, salçanın kuru maddesinin %8-9'a ayarlanması gerekir.
17. Breed yöntemi ile sayım işleminde verilen bilgilerden hangisi doğrudur?
A) Normal lam üzerine asetat kalemle daire çizilerek kullanılır.
B) Sayım yapılacak numuneden mikropipet ile 10 mL alınarak lamın ortasına koyulur.
C) Breed yöntemine uygun olarak hazırlanan preparat fikse edilmez.
D) Breed yöntemine uygun olarak hazırlanan preparat asidik bir boya ile boyanır.
E) Mikroskobun immersiyon objektifinde sayım işlemi yapılır.
18. Thoma lamı yöntemi ile sayım işleminde verilen bilgilerden hangisi yanlıştır?
A) Dilüsyon sıvısı olarak %10'luk asetik asit veya 1/9'luk sülfürik asit çözeltisi kullanılır.
B) Lamelin Thoma lamına tam oturması için lamelin iki kenarına bastırarak ileri geri hareket ettirilir.
C) Thoma lamı yöntemine uygun olarak hazırlanan preparat fikse edilir.
D) Thoma lamının çapraz 8 büyük karesinde sayım yapılması yeterlidir.
E) Mikroskobun 40x objektifinde sayım işlemi yapılır.
19. Howard lamı yöntemi ile sayım işleminde verilen bilgilerden hangisi doğrudur?
A) Salça numunesinin kuru madde oranı mikroskop yardımıyla ölçülerek ayarlanır.
B) Domates suyunda ve proses örneklerinde seyreltme işlemi yapılmalıdır.
C) Bir preparatta en az 10 dairede inceleme yapılarak değerlendirilmelidir.
D) Mikroskobun 100x objektifinde sayım işlemi yapılır.
E) Howard lamelinde bulunan her daire diğerlerinden bağımsız olarak (+) veya (-) olarak değerlendirilir.
20. Breed yöntemi ile sayım işleminde hacim düzeltme faktörü aşağıdakilerden hangisidir?
A) 10 B) 50 C) 100 D) 1 000 E) 10 000

10.

ÖĞRENME BİRİMİ



İNDİKATÖR VE PATOJEN MİKROORGANİZMA SAYIMI

TEMEL KAVRAMLAR

İndikatör
Patojen
Enfeksiyon
İntoksikasyon
Mikotoksin
Fekal
Gıda güvenliği

KONULAR

- 10.1. İNDİKATÖR MİKROORGANİZMA SAYIMI
- 10.2. PATOJEN MİKROORGANİZMA SAYIMI

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Mevzuatına ve analiz metoduna uygun olarak;
- İndikatör mikroorganizma sayımı yapmayı,
 - Patojen mikroorganizma sayımı yapmayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Yemek yediğiniz işletmelerin hijyen ve sanitasyon kurallarına uygunluğu sizin için ne kadar önemlidir? İşletmelerin gıda güvenliği açısından uyması gereken kural ve davranışlar hakkındaki düşüncelerinizi paylaşınız.
2. Üreme olmuş tek kullanımlık petri kutularını nasıl bertaraf etmeliyiz?
3. Banyo, tuvalet ve mutfaklarımızda suyla birlikte uzaklaştırılan atıklarımız kanalizasyon sistemine verilir. Kanalizasyon suları sizce nereye dökülür?



10.1. İNDİKATÖR MİKROORGANİZMA SAYIMI

Farklı kaynaklara göre, yeryüzünde 500.000 ila 6.000.000 arasında farklı mikroorganizma türü olduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde mikroorganizma türlerinden az bir kısmı izole edilip tanımlanabilmiştir. Bu kadar geniş bir etki alanı içinde yer alan mikrobiyoloji bilimi, birçok alt dala ayrılmıştır. Bu öğrenme biriminde; gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar ve patojen mikroorganizmaların varlığına işaret eden indikatör mikroorganizmaların kültürel sayım işlemlerine yer verilecektir.

10.1.1. Patojen Mikroorganizma ve İndikatör Mikroorganizma Kavramı

Hastalığa neden olan her türlü organizma veya maddeler **patojen** terimi ile tanımlanır. Patojen mikroorganizmalar; insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde hastalığa neden olur. Gıdalarda patojenlerin yanı sıra saprofit (çürükçül) ve fermente ürünlerin elde edilmesinde rol oynayan mikroorganizmalar da bulunabilmektedir.

Saprofit mikroorganizmalar, doğada bulunan bitki ve hayvan dokularını parçaladıkları için karbon ve azot döngüsünde çok önemli bir yere sahiptirler. Bununla birlikte, gıdaların bozulmasına neden olarak ekonomik kayıplar ortaya çıkardıkları için, gıda mikrobiyolojisi açısından kontrol altında tutulmak istenirler. Bu grup mikroorganizmalar, ancak vücuda çok yüksek sayıda girdiklerinde hastalık ortaya çıkarabilmektedir. Hastalık yapacak miktarda çoğalmış olduklarında, üzerinde bulundukları gıda fiziksel ve duyuşal özelliklerini kaybetmiş olacağından tüketilmesi söz konusu olmayacaktır.

Patojen olarak tanımlanan mikroorganizmaların vücuda az sayıda alınmaları, hastalık oluşması için yeterlidir. Enfeksiyon oluşturmak için gerekli olan minimal dozu ne kadar düşüğe mikroorganizmanın patojenitesi o denli yüksektir. Örneğin *E.coli* O157:H7 serotipi için bu doz sadece 1 adettir. Bunun anlamı, bu bakterinin hastalık oluşturması için vücuda 1 adet girmesinin yeterli olduğudur. Bir gıda (fermente ürünler hariç), 10^6 - 10^7 KOB/mL-g sayıda mikroorganizma içerdiğinde, fiziksel ve duyuşal olarak fark edilebilecek şekilde bozulmaya başlamıştır. Tüketici bunu rahatlıkla fark edebilir. Ancak 1 adet *E. coli* O157:H7 varlığının bu şekilde fark edilmesi mümkün değildir. Hatta, 10^4 - 10^5 KOB/mL-g'a kadar patojen mikroorganizma varlığının da fiziksel ve duyuşal olarak fark edilmesi zordur.

Maya türleri arasında, ağız yoluyla alındığında hastalık yapan bir türe rastlanmamıştır. Küfler ise geliştikleri yüzeylerde oluşturdukları mikotoksinlerin alınması yoluyla, başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara sebep olabilmektedir. Dolayısıyla gıda kaynaklı patojen denildiğinde bakteriler akla gelmektedir.

Patojen bir mikroorganizma veya onun ürettiği toksini içeren bir gıdanın tüketilmesi sonucu ortaya çıkan hastalıklar, gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar olarak isimlendirilir. Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar enfeksiyon ve intoksikasyon olmak üzere iki grupta ele alınır. Patojen mikroorganizmanın vücuda alınması sonucunda hastalık meydana geliyorsa **gıda kaynaklı enfeksiyon**; patojen mikroorganizmanın gıda üzerinde ürettiği toksinin gıda ile birlikte vücuda alınması sonucunda hastalık meydana geliyorsa **gıda kaynaklı intoksikasyon** olarak adlandırılır.

Enfeksiyon etmeni olan mikroorganizmaların bir kısmı, canlı olarak insan vücuduna girdikten sonra midede uzun süre kalmadan bağırsak sistemine ulaşmayı başarırlar. Bunlardan bazı türler bağırsak çeperinde iltihap oluştururken bazı türler ise burada çoğalıp ürettikleri toksinler vasıtasıyla hastalığa neden olurlar. Enfeksiyon etmeni patojen mikroorganizmalar dışkı yoluyla çevreye yayılarak özellikle kişisel temizliğe dikkat edilmeyen ortamlarda salgın hastalıklara neden olurlar. Gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren patojen bakteri sayısı 15-20 olup bunların arasından en fazla sayıda hastalığa ve ölüme neden olan dört tanesi öne çıkmaktadır. Bunlar; *Campylobacter jejuni*, patojenik *Salmonella* serotipleri, *Listeria monocytogenes* ve VTEC (verotoksijenik *E.coli*) serotipleridir. Enfeksiyon kaynaklı gıda zehirlenmelerinde görülen tipik belirtiler Görsel 10.1'deki gibidir.



Görsel 10.1: Enfeksiyon kaynaklı gıda zehirlenmelerinde görülen tipik belirtiler

İntoksikasyon tipi hastalıklarda, patojen mikroorganizma gıda üzerinde gelişerek toksin salgılar. Toksin gıda ile birlikte vücuda alındığında hastalığa neden olur. Toksin oluştuktan sonra, gıdanın bir ısıtma işlemine maruz bırakılıp mikroorganizmaların öldürülmüş olmasının bir önemi yoktur. Neticede, hücrenin vücuda alınmış olması değil, dışarıda ürettiği toksinin alınması hastalık etmenidir. Toksin, sadece bu gıdayı tüketmiş olan kişiyi etkiler ve salgın hastalık söz konusu değildir. Gıda mikrobiyolojisi açısından intoksikasyona neden olan patojenler; mikotoksin üreten küfler ile *Clostridium botulinum* ve *Staphylococcus aureus* bakterileridir.

Patojen mikroorganizmaların tespiti ve sayımına yönelik analizler birkaç farklı aşamadan oluşmaktadır. Ekim sonucunda elde edilen kolonilerin (sıvı besiyeri kullanılıyorsa tüplerin) aranılan patojen olup olmadığına yönelik yapılan tanımlama testleri de uzun işlemler gerektirebilmektedir. Bu durumlar hem analiz maliyetlerini artırmakta hem de analiz süresinin uzun olmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle indikatör olarak belirlenen mikroorganizmaların sayımı yapılarak gıdanın mikrobiyal kalitesi ve patojen içerme ihtimali üzerine genel kanıya ulaşıp değerlendirme yapılmaktadır. **İndikatör**, anlamı gösterge/belirteç olan bir terimdir. Gıdalarda indikatör olarak belirlenen mikroorganizmaların analiz edilmesiyle; üretim sırası ve sonrasındaki olası bulaşmalar, genel hijyen düzeyi ve gıda kaynaklı patojenlerin var olup olmadığı hakkında basit ve güvenilir bilgi sağlanmış olur. Bu analizler elbette patojen analizlerin yerine geçmez ancak patojenlerin ayrı ayrı izolasyonu ve tanımlanması için gereken zamandan çok daha kısa sürede güvenilir bilgi elde edilmesi açısından oldukça önemlidir.

Toplam canlı mikroorganizma sayısı, toplam *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakteri sayısı, toplam koliform grup bakteri sayısı, fekal koliform bakteri sayısı, *Escherichia coli* biyotip-1 sayısı gıdalarda mikrobiyolojik kalite indikatörü olarak sıklıkla yararlanılan analizlerdir.

10.1.2. Toplam Canlı Mikroorganizma Sayımı

Gıdalarda toplam canlı bakteri sayısı ve toplam maya-küf sayısını belirlemeye yönelik analizlerden genel mikrobiyolojik kalite indikatörü olarak yararlanılmaktadır. Bu analiz sonuçları gıda işletmelerinde sanitasyon uygulamalarının yeterliliği ve gıdanın işlenmesinden tüketimine kadar uygun sıcaklıklarda tutulup tutulmadığının bir göstergesi olması açısından önem taşır. Bu sayımlar ayrıca; gıdada bozulma başlangıcı, raf ömrü, dondurulmuş ürünlerde kontrolsüz çözündürme, yetersiz soğutma, üretim esnasındaki kontaminasyon düzeyi hakkında bilgi verir ve gerekli önlemlerin alınmasına yardımcı olur.

Toplam canlı bakteri sayımlarında, uygulanan inkübasyon sıcaklığına göre sayım yapılabilir. Psikrofilik, mezofilik ve termofilik bakteri sayıları belirlenmek istendiğinde farklı inkübasyon sıcaklıkları uygulanır. Gıda güvenliği ve sanitasyon indikatörü olarak çoğunlukla toplam aerobik mezofilik bakteri sayısına başvurulur. Bunda en büyük etken, insan ve hayvan kaynaklı patojen mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğunun sıcaklık ihtiyacına göre mezofilik olması, oksijen gereksinimi bakımından da aerobik ve fakültatif anaerobik özellikte olmasıdır. Bir üründe çok sayıda aerobik mezofilik bakteri bulunması, o ürünün patojenlerin gelişmesine uygun şartlarda üretilip depolandığını ve üründe bu patojenlerin bulunma ihtimalinin yüksek olduğunu gösterir.

Gıdadaki toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı; PCA gibi genel bir besiyerine ekim yapıp 35 ± 1 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda oluşan kolonilerin sayılması ile belirlenir. Petri kutusunda oluşması beklenen koloni sayısı az değilse yayma plak yöntemi ile ekim yapılır. Bu inkübasyon süresi küf kolonileri oluşumu için yeterli değildir. Maya türlerinden bazıları gelişip koloni oluşturabilirler. Koloni sayımı yapılırken maya-bakteri ayrımı yapılmaksızın tüm koloniler sayıma dâhil edilir. Toplam maya-küf sayısı belirlenmek istendiğinde, Potato Dextrose agar (PDA) besiyerine yayma plak yöntemi ile ekim yapılarak 25 °C'de 5 gün inkübasyon uygulanır. Toplam maya-küf sayısından; meyve ve sebzeler, meyve suları, peynir, tahıl ürünleri ve kuru gıdalarda kalite indikatörü olarak yararlanılır.

10.1.3. Toplam *Enterobacteriaceae* Sayımı

Bu familya içinde yer alan bakteriler, gram negatif ve fakültatif anaerob özellikte olup spor oluşturmazlar. Sahip oldukları flagellalar sayesinde hareketlidirler. Morfolojik olarak çubuk şeklindedirler. Biyokimyasal tanımlama testlerinde, oksidaz negatif ve katalaz pozitif sonuç verirler. Tümü glikozdan gaz ve asit üretirler.

Familya içinde bugüne kadar 53 cins altında 170 tür tanımlanmıştır. Nötre yakın pH'larda basit bileşimli besiyerlerinde kolaylıkla gelişirler. Çoğunun optimum gelişme sıcaklığı 30 °C olup gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren türler için bu sıcaklık 37 °C'dir. Bu familya üyeleri doğada geniş bir alana yayılmıştır. Familya içerisinde insan ve hayvanlar için patojen olan bakteriler de vardır.

Bağırsak kökenli (enterik) olanların yanı sıra birçoğu toprak ve bitki kökenlidir. Bazı üyeleri doğada saprofit olarak bulunurken bazıları da sadece bitki patojenidir. Bu nedenlerden gıdada bu familyaya ait bakterilerin bulunması, fekal (dışkı kaynaklı) kontaminasyon ve enterik patojen bulunma potansiyeli açısından kesin bir gösterge olarak değerlendirilemez. Toplam *Enterobacteriaceae* sayısından, gıdalarda hijyen ve sanitasyon indikatörü olarak yararlanılır.

Gıda mikrobiyolojisi ilgi alanı içinde yer alan *Salmonella*, *Shigella*, koliform grup bakteriler ve bu grubun içinde yer alan *E.coli* biyotip-1, patojen *E.coli* serotipleri bu familyanın üyeleridir. Mikroorganizmaların sınıflandırılmasında alt tür varyasyonların tümü için suş, alt tür altı varyasyonlar için serotip ve biyotip terimleri kullanılır. Toplam *Enterobacteriaceae* sayımı katı besiyerinde ya da EMS yöntemi ile uygulanabilmektedir.

10.1.3.1. Katı Besiyerinde Toplam *Enterobacteriaceae* Sayımı

Bu analiz için, incelenecek gıda numunesinden “Violet Red Bile (VRBD) agar” besiyerine, hedeflenen sayıya göre dökme ya da yayma plak yöntemi ile ekim yapılır. Familya üyeleri fakültatif anaerob özellikte olduklarından besiyeri dökümü çift tabakalı olarak yapılır. İnkübasyonda sıcaklık 37 °C ve süre 24 saattir. Petri kutusunda kırmızımsı bir presipitat (çökelti) zonu ile çevrili 1-2 mm çapındaki koyu kırmızı koloniler (Görsel 10.2) *Enterobacteriaceae* üyeleri olarak sayılır.

Petri kutusunda oluşan tipik kolonilerin, oksidaz ve glikoz fermentasyon testlerine tabi tutularak doğrulanması gerekir.



Görsel 10.2: VRBD agar besiyeri plağında üreyen tipik *Enterobacteriaceae* kolonileri

Bunları Biliyor musunuz?

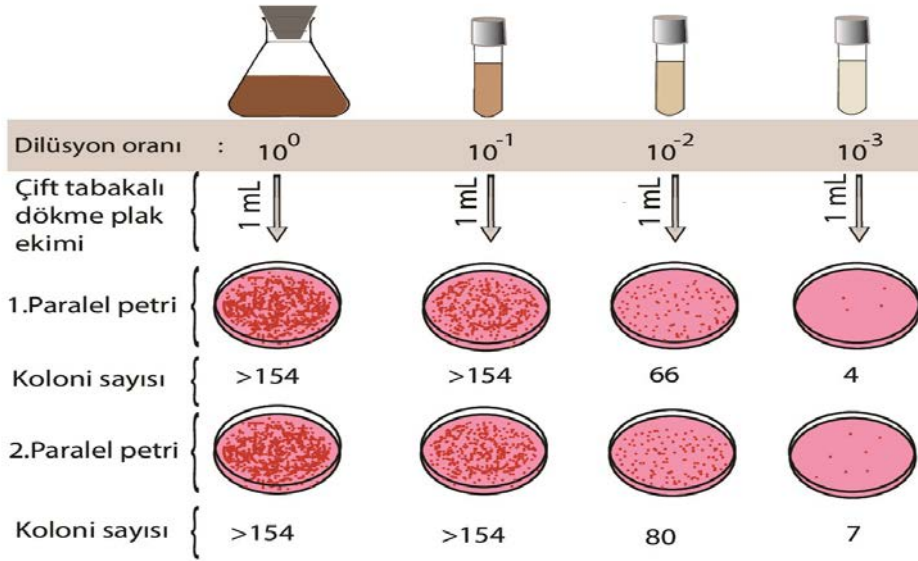
VRBD ve VRBL besiyerleri, bileşimleri nedeniyle otoklavda sterilize edilmeye uygun değildir. Bu nedenle şu şekilde hazırlanır.

500 mL'lik erlen ya da otoklav şişesi içine 250 mL damıtık su konulduktan sonra otoklavda sterilize edilir. İçine 9,9 g (39,5 g/L) dehidre besiyeri aktarılarak çalkalanır. Kaynama gerçekleşinceye kadar arada bir çalkalanarak kaynar su banyosunda bekletilir. Kaynama başladıktan sonra en çok 2 dk. daha su banyosunda bekletilir. Sonrasında 45 °C ayarlı su banyosuna alınarak bu sıcaklığa gelmesi sağlanır. Uygulanan ekim yöntemine göre bu sıcaklıkta petri kutularına dökülür. Hazırlanmasıyla birlikte aynı zamanda sterilizasyonu gerçekleşmiş olur. Su banyosunda sterilizasyonun etkinliği için yukarıda tarif edildiği şekilde 250 mL olarak hazırlanması gerekmektedir.

ÖRNEK 1

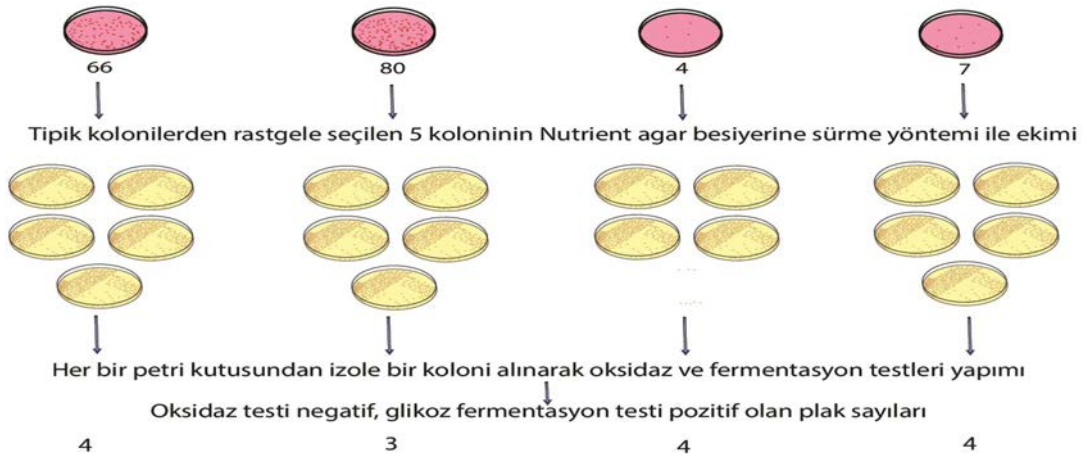


Toplam *Enterobacteriaceae* sayımı amacıyla, sıvı numuneden çift tabakalı dökme plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda petri kutularında oluşan tipik kırmızı koloniler Görsel 10.3'te belirtildiği şekilde sayılmıştır. Tipik kolonilere uygulanan doğrulama amaçlı biyokimyasal test sonuçları Görsel 10.4'teki gibi sonuçlandığına göre, numunenin 1 mL'sinde bulunan toplam *Enterobacteriaceae* sayısını biyokimyasal testler ile doğrulanmış olarak hesaplayınız.



Görsel 10.3: VRBD agar plaklarında inkübasyon sonu koloni sayıları

1-154 koloni üreyen plaklar üzerinden sayım sonucu hesaplanır. 10^{-2} ve 10^{-3} dilüsyonlarından ekim yapılan plaklar üzerinden ağırlıklı aritmetik ortalama hesaplanacaktır. Öncelikle her bir plak üzerindeki tipik kolonilerden rastgele beşer tane seçilerek oksidaz ve glikoz fermentasyon testlerine tabi tutulur. Yapılan biyokimyasal testler sonucunda oksidaz negatif ve glikoz pozitif olan koloniler *Enterobacteriaceae* kolonisi olarak tanımlanarak numunedeki sayı bu doğrultuda hesaplanır.



Görsel 10.4: Tipik kolonilerden rastgele seçilen 5 tanesine uygulanan biyokimyasal test sonuçları

Beşer koloni üzerinde yapılan doğrulama test sonuçları üzerinden, tüm plaktaki *Enterobacteriaceae* olduğu doğrulanan koloni sayısı belirlenir.

1. petri kutusu için;

Doğrulama testi yapılan 5 koloniden 4'ü *Enterobacteriaceae* ise
66 koloniden x

$$x = 4 \times 66 / 5 = 52,8 \approx 53 \text{ koloni}$$

Sayıma dâhil edilen 10^{-2} lik dilüsyonun paralel plaklarından birincisinde 66 tane tipik kırmızı koloni belirlenmişti. Bu kolonilerden rastgele alınan 5 tanesi üzerinde biyokimyasal testler yapıp 4'ü *Enterobacteriaceae* olarak doğrulanmıştır. Bu sonuç doğru orantı ile genele uyarlandığında 66 koloniden 53'ünün *Enterobacteriaceae* kolonisi olduğu doğrulanmış olur. Aynı şekilde diğer paralel petri kutularındaki sayılar hesaplandığında, aşağıdaki tabloda verildiği gibi olacaktır.

Dilüsyon	10^{-2}	10^{-3}
1.Paralel	53	4
2.Paralel	48	6

$$N = C / [V.(n_1 + 0,1.n_2).d]$$

$$C = 53 + 48 + 4 + 6 = 111$$

$$V = 1$$

$$n_1 = 2$$

$$n_2 = 2$$

$$d = 10^{-2}$$

$$N = 111 / [1.(2 + 0,1.2). 10^{-2}]$$

$$N = 50,4545. 10^2 \approx 5.10^3 \text{ KOB/mL}$$

10.1.4. Toplam Koliform, Fekal Koliform ve *E.coli* Sayımı

Enterobacteriaceae familyası içinde yer alan ve laktozdan 35-37 °C'de 48 saat içinde asit ve gaz oluşturma kabiliyetine sahip olan bakteriler **koliform grubu bakteriler** olarak isimlendirilir. Gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan koliform bakteriler; *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacea*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Citrobacter freundii* türleridir. Bu türlere ait suşlar, insan ve sıcak kanlı hayvanların (memeli hayvanlar ve kanatlılar) bağırsak sistemleri ve dolayısıyla dışkılarında, toprak ve bitkilerde yaygın olarak bulunurlar. Dışkı kaynaklı ifadesini belirtmek için **fekal** kelimesi kullanılır (fekal:dışkı kaynaklı). *E.coli* haricindekiler daha çok bitki ve toprak kaynaklıdır. İndikatör kelimesi yerine yine aynı anlama gelen indeks kelimesi de kullanılabilir (fekal kontaminasyon indikatörü/indeksi:dışkı bulaştığının göstergesi). Fekal olarak kontamine olmuş bir numunede, yine sıcak kanlı hayvanların dışkılarında bulunan *Salmonella*, *Shigella* ve VTEC serotipleri gibi enterik patojen bakterilerin bulunma olasılığından kaynaklı potansiyel bir risk vardır. *E.coli* biyotip-1, patojen özellikte değildir. Nadir olarak idrar yolları enfeksiyonuna sebep olabildiği rapor edilmiştir. Aksine, bağırsaklarda vitamin biyosentezinde rol oynadığı için yararlı olarak da kabul edilmektedir.

Koliform bakterilerin tespit edildiği analiz sonuçları, numuneye fekal bulaşma olduğu ihtimalini güçlendirmekle birlikte kesin gösterge olarak kabul edilemez. Fekal bulaşmanın kesin göstergesi

olarak fekal koliform sayımı ve/veya *E.coli* sayımı yapılır. Genellikle toplam koliform, fekal koliform ve *E.coli* sayımları ardışık olarak birlikte analiz edilerek değerlendirme yapılmaktadır. Koliform grubunda yer alan tüm bakteriler 35-37 °C'de gelişebilirken koliformlar içinde fekal olmayanlar 44,0 °C'de gelişemez. Gıda mikrobiyolojisinde koliform bakterilerin sayımları genellikle EMS yöntemi ile yapılmaktadır. Bunun nedeni; gıdalarda bulunmasına izin verilen koliform bakteri sayısının, katı besiyeri kullanılan yöntemlerde sayılamayacak kadar az olmasıdır.

10.1.4.1. Katı Besiyerinde Toplam Koliform Sayımı

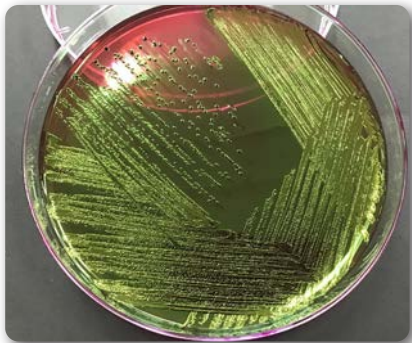


Görsel 10.5: Koliform kolonilerinin doğrulanması amacıyla pasaj yapılan BGLB broth tüpleri

Koliform sayımı için kullanılan katı besiyeri, laktoz içeren Violet Red Bile Lactose (VRBL) agardır. Çift tabakalı olarak dökme ya da yayma ekim yapıldıktan sonra petri kutuları 35-37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonu, kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili 1-2 mm çapındaki koyu kırmızı koloniler koliform bakteri olarak sayılır. Kolonilerin koliform olduğu doğrulanmak istendiğinde, her bir plaktan onar tane koloni seçilerek Brilliant Green Bile Laktose (BGBL) broth besiyeri bulunan tüplere (Görsel 10.5) pasaj yapıp 35-37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. Tüplerde oluşan gaz ve bulanıklık, pasaj yapılan koloninin koliform olduğunu doğrular.

10.1.4.2. Katı Besiyerinde Fekal Koliform ve *E. coli* Sayımı

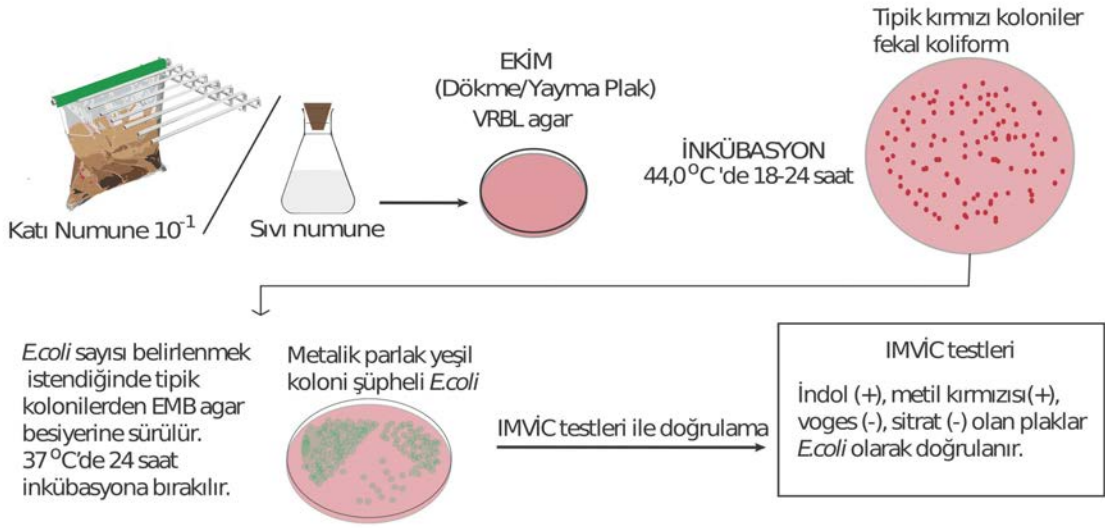
Fekal koliform sayımı için, standart koliform bakteri analizinde kullanılan VRBL Agar besiyerine ekim yapıp 44,0±0,1 °C'de 24 saat inkübasyon uygulanır. Bu sıcaklıkta fekal olmayan koliformlar gelişemez. İnkübasyon sonunda, kırmızımsı bir presipitat zonu ile çevrili 1-2 mm çapındaki koyu kırmızı koloniler fekal koliform olarak sayılır. İnkübasyon sıcaklığının yüksek olmasından kaynaklı olarak petri kutusundaki besiyerinin kurumaması için besiyerinin 20 mL olarak dökülmesi gerekir. Petri kutularının streç filmle sarılarak inkübasyona bırakılması, kurumayı bir miktar daha önler.



Görsel 10.6: EMB agar besiyerinde gelişen *E.coli* kolonileri

Elde edilen fekal koliform kolonilerinin *E.coli* olup olmadığı belirlenmek istendiğinde, kolonilerden halka öze ile alınarak Eosin Methylen Blue (EMB) agar besiyerine sürme yöntemi ile ekim yapılır. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda oluşan koloniler yeşilimsi metalik parlak renkte ise şüpheli *E.coli* (Görsel 10.6) olarak değerlendirilir. *E.coli* olduğu değerlendirilen plak sayısı üzerinden numunedeki toplam şüpheli *E.coli* sayısı belirlenir. Doğrulamak istendiğinde tipik koloni görülen plaklara IMViC testleri uygulanır. Test sonuçları üzerinden numunedeki doğrulanmış *E.coli* sayısı belirlenir.

Görsel 10.7’de katı besiyerinde fekal koliform bakteri sayımı şematize edilmiştir.



Görsel 10.7: Katı besiyerinde fekal koliform sayımı

ÖRNEK 2



Katı bir numunede fekal koliform ve *E.coli* sayısı belirlenmek istenmektedir. Bu amaçla hazırlanan 10^{-1} ’lik dilüsyondan iki paralelli olarak çalışılmıştır. VRBL agar besiyerine çift tabakalı dökme plak yöntemi ile ekim yapıp $44,0^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda plaklarda oluşan tipik kırmızı koloni sayıları tablodaki (A) gibidir. *E.coli* sayısını belirlemek için kolonilerden EMB agar besiyerine sürme yapılmış ve metalik parlak koloni görülenlerin sayısı tablodaki (B) gibi bulunmuştur. EMB agar besiyerinde tipik koloni görülenlere uygulanan IMViC testleri sonuçları da tabloda (C) verildiğine göre numunedeki fekal koliform, şüpheli *E.coli* ve doğrulanmış *E.coli* sayılarını belirleyiniz.

Dilüsyon	10^{-1}	EMB Agarda Tipik Koloni Görülen Plak Sayısı		<i>E.coli</i> Olduğu Doğrulan Plak Sayısı	
1.Paralel	8	1.Paralel	6	1.Paralel	5
2.Paralel	6	2.Paralel	4	2.Paralel	4

Fekal koliform sayısı= $(8+6/2) \cdot 10 = 70 \text{ KOB/g}$

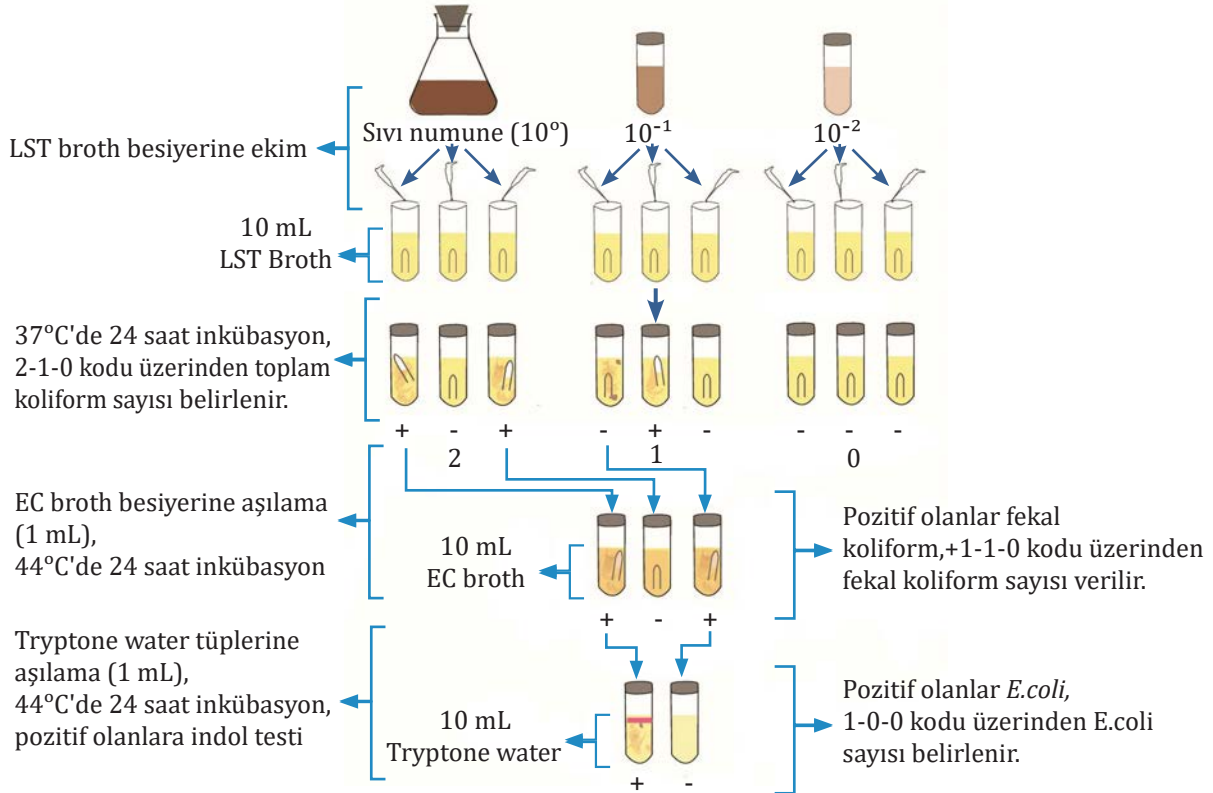
E.coli sayısı (şüpheli)= $(6+4/2) \cdot 10 = 50 \text{ KOB/g}$

E.coli sayısı (doğrulanmış)= $(5+4/2) \cdot 10 = 45 \text{ KOB/g}$

10.1.4.3. EMS Yöntemi ile Toplam Koliform, Fekal Koliform ve *E.coli* Sayımı

Koliform grup bakterilerin EMS yöntemi ile sayımında Lauryl Sulfate Tryptose (LST) broth besiyeri kullanılır. Standart yöntemde, besiyeri tüplerine ekim yapıldıktan sonra 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda bulanıklıkla birlikte gaz gelişimi olan tüpler pozitif olarak değerlendirilir. EMS çizelgesinden okuma yapılarak numunedeki toplam koliform sayısı belirlenir.

Pozitif gelişme görülen tüplerde üreyen bakterinin koliform olup olmadığı doğrulanmak istendiğinde, pozitif tüplerden BGLB broth besiyerine pasaj yapılır. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda gaz gelişmesi olan tüpler, bakterinin koliform olduğunu doğrular. Aynı analizde fekal koliform sayısını belirlemek için LST broth besiyerinde pozitif gelişme görülen tüplerden EC broth besiyerine pasaj yapılır. 44,0 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda gelişme ve gaz görülen tüpler fekal koliform olarak değerlendirilir. Fekal koliform olarak belirlenen EC broth tüplerindeki *E.coli* sayısını belirlemek için, bu tüplerden içinde tryptone water olan tüplere aşılama yapılır. Aşılama tryptone water tüpleri 44,0 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. Gelişme görülen tüplere indol testi uygulanır. İndol pozitif olanlar *E.coli* olarak değerlendirilir. Bu şekilde standart EMS yöntemi ile koliform, fekal koliform ve *E.coli* sayımı üç gün sürer. Görsel 10.8'de EMS yöntemi ile toplam koliform, fekal koliform ve *E.coli* sayımına yönelik standart uygulama şematize edilerek örnek sonuçlar verilmiştir. Bu örnekte numunedeki toplam koliform sayısı, 2-1-0 kodunun EMS çizelgesindeki karşılığı olan 1,5 EMS/mL'dir. Toplam fekal koliform sayısı, 1-1-0 kodunun karşılığına çizelgeden bakıldığında 0,74 EMS/mL'dir. Numunedeki *E.coli* sayısı ise 1-0-0 koduna karşılık gelen 0,36 EMS/mL'dir.



Görsel 10.8: EMS yöntemi ile toplam koliform, fekal koliform ve *E.coli* sayımı (standart yöntem)

Bu yöntem alternatif olarak Fluorocult LST (LST+MUG) broth besiyeri kullanıldığında bir günde sonuç alınabilir. Hızlı EMS yönteminde, numuneden Fluorocult LST broth besiyeri tüplerine ekim yapıldıktan sonra tüpler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda bulanıklık ve gaz görülen tüpler belirlenerek toplam koliform sayısı belirlenir. Koliform bakteri geliştiği belirlenen tüpler loş bir ortamda uzun dalga boylu UV ışık altında incelenir. Floresan ışığa veren tüpler *E.coli* olarak değerlendirilir.

51. UYGULAMA

KATI BESİYERİNDE TOPLAM KOLİFORM, FEKAL KOLİFORM VE *E.coli* SAYIMI (STANDART YÖNTEM)

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak katı besiyerinde toplam koliform, fekal koliform ve *E.coli* sayımı çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, steril petri kutuları, 1 mL'lik steril pipet (varsa otomatik pipet ve steril pipet uçları), su banyosu, stomacher, VRBL agar besiyeri, EMB agar besiyeri, asetat kalemi, steril deney tüpleri, inkübatör, halka öze, katı numune (kıyma, marul vb.)

İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği ile ilgili tedbirleri alıp aseptik çalışma ortamı hazırlayınız.
2. VRBL agar besiyerini talimatına uygun olarak su banyosunda hazırlayınız.
 - İki tane 250 mL olacak şekilde toplam 500 mL besiyeri hazırlanmalıdır.
3. 10 g numune tartarak stomacher cihazı ile 10^{-1} dilüsyon oranlı analiz numunesi hazırlayınız.
4. Analiz numunesinden 10^{-3} e kadar dilüsyon serisi hazırlayınız.
5. Besiyerini su banyosunda bekleterek petri kutularına döküm sıcaklığına gelmesini sağlayınız.
6. İki paralelli olacak şekilde petri kutularına çift tabakalı dökme plak yöntemi ile ekim yapınız.
 - Toplam koliform için üç dilüsyondan iki paralel olacak şekilde 6 petri kutusu, fekal koliform ve *E.coli* sayımı için de 6 petri kutusu olmak üzere toplam 12 tane petri kutusuna ekim yapılır.
7. Toplam koliform sayımı yapılacak plakları $35-37^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24, fekal koliform ve *E.coli* sayımı yapılacak plakları streç filmle sararak $44,0\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
8. İnkübasyon süresi sonunda plaklardaki kolonileri sayarak sonuçları hesaplayınız.
 - $35-37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılan plaklardaki tipik koloniler sayılarak toplam koliform bakteri sayısı hesaplanır.
 - $44,0\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılan plaklardaki tipik koloniler sayılarak fekal koliform sayısı hesaplanır.
9. Pasaj yapılacak EMB besiyeri plaklarını hazırlayınız.
 - *E.coli* tanımlaması yapılacak her bir fekal koliform kolonisine bir plak olacak miktarda hazırlanmalıdır.
10. Fekal koliform olarak tespit edilen kolonileri plaklara sürme yöntemi ile pasajlayınız.
11. Plakları 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
12. İnkübasyon sonunda yeşilimsi metalik parlak renkte olan plakları şüpheli *E.coli* olarak tespit edip numunedeki *E.coli* sayısını hesaplayınız.
 - Doğrulanmış *E.coli* sayısını belirlemek için EMB plaklarında görülen tipik kolonilere IMViC testleri uygulanır. Biyokimyasal testler öğrenme biriminde, renk değişimine bağlı biyokimyasal test uygulamaları gerçekleştirileceği zaman, bu aşamaya kadar uygulama tekrarlanıp tipik koloniler elde edilebilir.
13. Üreme olmuş cam petri kutularını mutlaka otoklavladıktan sonra yıkayınız.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Besiyerlerini talimatına uygun hazırladı.				
2	Dökme plak yöntemi ile ekim yaptı.				
3	Tipik kolonilerin sayımını yaptı.				
4	EMB agar besiyerine pasaj yaptı.				
5	Sayımla ilgili sonuçları hesapladı.				
TOPLAM PUAN					

52. UYGULAMA

KATI BESİYERİNDE TOPLAM KOLİFORM, FEKAL KOLİFORM VE *E.coli* SAYIMI (HIZLI YÖNTEM)

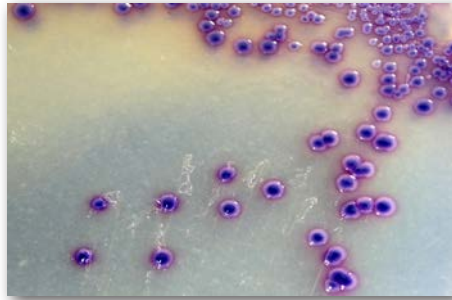
Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak katı besiyerinde toplam koliform, fekal koliform ve *E.coli* sayımı çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, steril petri kutuları, 1 mL'lik steril pipet (varsa otomatik pipet ve steril pipet uçları), su banyosu, stomacher, Fluorocult VRBL agar besiyeri, Chromocult TBX agar besiyeri, Chromocult Coliform Agar (CCA) besiyeri, 1 N NaOH, asetat kalem, sterildeney tüpleri, inkübatör, katı numune (marul, ıspanak, kıyma vb.).

İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği ile ilgili tedbirleri alıp aseptik çalışma ortamı hazırlayınız.
2. Besiyerlerini talimatına uygun olarak hazırlayınız.
 - Üç besiyerinden laboratuvarında mevcut olan herhangi birisi kullanılabilir. Besiyerlerinin tamamının bulunması durumunda üç kişilik gruplar halinde çalışarak her bir öğrenci farklı besiyeri kullanılmalıdır.
 - Fluorocult VRBL agar ve CCA besiyerleri su banyosunda hazırlanmalıdır.
 - Chromocult TBX agar besiyeri otoklavda sterilize edilmelidir.
3. Besiyerlerini su banyosunda bekleterek döküm sıcaklığına gelmesini sağlayınız.
4. 10 g numune tartıp stomacher cihazıyla 10^{-1} dilüsyon oranlı analiz numunesi hazırlayınız.
5. Analiz numunesinden 10^{-3} e kadar dilüsyon serisi hazırlayınız.
6. İki paralelli olacak şekilde petri kutularına çift tabakalı dökme plak yöntemi ile ekim yapınız.
7. TBX besiyerine ekim yapılan plakları streç filmle sararak $44,0 \pm 0,1$ °C'de 18-24 saat, Fluorocult VRBL agar besiyerine ekim yapılanları 35-37 °C'de 18 saat, CCA besiyerine ekim yapılanları 35-37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
 - İşlem görmüş gıdalarda inkübasyon sıcaklığını 44,0 °C'ye çıkarmadan önce, plaklar 30-37 °C'de 4 saat bekletilerek canlandırma işlemi yapılır.
8. Inkübasyon süresi sonunda petri kutularındaki kolonileri sayınız.
 - CCA besiyerindeki pembemsi kırmızı koloniler ve mavi-mor kolonilerin tamamı, toplam koliform bakteri sayısını verir. Mavi-mor koloni (Görsel 10.9) sayısı üzerinden *E.coli* sayısı hesaplanır. 24 saat sonrasında, besiyeri selektivitesini yitireceğinden bu süre sonunda yapılan sayımlar hatalı olur.



Görsel 10.9: CCA besiyerinde gelişen *E.coli* kolonileri



- TBX agar besiyerli plaklarda tipik yeşil koloniler sayılarak toplam *E.coli* sayısı hesaplanır.
- Fluorocult VRBL agar besiyerli plaklarda tipik kırmızı koloniler sayılarak toplam koliform sayısı hesaplanır. Plaklar UV lamba altında incelenip floresan ışığa (Görsel 10.10) veren koloniler sayılarak *E.coli* sayısı hesaplanır. 18 saat sonrasında ışığa besiyeri yüzeyinde yayılacağından sayım yapılması mümkün olmaz.

9. Tek kullanımlık petri kutusu kullandıysanız plakları otoklavda sterilize ettikten sonra bertaraf etmeyi unutmayınız (Görsel 10.11).

- Tekrar kullanılabilir cam petri kutuları, sterilize edildikten sonra yıkanmalıdır.
- Yıkama ve temizlik işlemleri iş birliği içerisinde yardımlaşarak yapılmalıdır.



Görsel 10.10: UV lamba altında floresan ışığa gösteren (sağdaki) koloni yapısı



Görsel 10.11: Sterilize edildikten sonra atık torbasına konulan plastik petri kutuları

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Besiyerlerini talimatına uygun hazırladı.				
2	Ekim yöntemini uyguladı.				
3	Tipik kolonilerin sayımını yaptı.				
4	Sayımla ilgili sonuçları hesapladı.				
5	Aseptik kurallara uygun çalıştı.				
TOPLAM PUAN					

NOT ALINIZ



.....

.....

.....



53. UYGULAMA

EMS YÖNTEMİYLE KOLİFORM, FEKAL KOLİFORM VE *E.coli* SAYIMI

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak EMS yöntemiyle kaliform, fekal kaliform ve *E.coli* sayımı çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, steril petri kutuları, 1 mL'lik steril pipet (varsa otomatik pipet ve steril pipet uçları), su banyosu, stomacher, LST broth besiyeri, EC broth besiyeri, BGLB, Tryptone Water besiyeri, Fluorocult LST broth besiyeri, asetat kalemi, steril deney tüpleri, inkübatör, katı numune (marul, ıspanak, kıyma vb.).

Standart Yöntem İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği ile ilgili tedbirleri alıp aseptik çalışma ortamı hazırlayınız.
2. LST broth, EC broth, BGLB, Tryptone Water, Fluorocult LST broth besiyerlerini talimatına uygun olarak hazırlayınız (Görsel 10.12).
 - Besiyerleri hazırlandıktan sonra, içinde durham tüpleri bulunan tüplere onar mL dağıtılıp bu şekilde otoklavda sterilize edilir. Tryptone water bulunan tüplere durham tüpü atılmaz.
3. 10 g numune tartarak stomacher cihazı ile 10^{-1} dilüsyon oranlı analiz numunesi hazırlayınız.
4. Analiz numunesinden 10^{-3} e kadar dilüsyon serisi hazırlayınız.
5. Her bir dilüsyondan üçer besiyeri tüpüne (LST broth) birer mL ekim yapınız.
6. Ekim yapılan tüpleri 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
7. Inkübasyon sonunda bulanıklıkla birlikte gaz gelişmesi görülen tüpleri belirleyip elde ettiğiniz kod üzerinden numunedeki toplam koliform sayısını hesaplayınız.
 - Doğrulanmış koliform sayısını belirlemek için pozitif gelişme görülen tüplerden BGLB besiyeri tüplerine 1 mL aşılama yapılmalıdır. 37°C 'de 24 saat inkübasyon sonunda gaz gelişmesi olan tüpler üzerinden oluşan kod ile doğrulanmış toplam koliform sayısı hesaplanır.
8. Fekal koliform bakteri sayısını belirlemek için pozitif tüplerden EC broth besiyeri tüplerine birer mL aşılama yapınız.
9. EC broth tüplerini $44,0^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
10. Inkübasyon sonunda bulanıklık ve gaz görülen pozitif tüpler üzerinden fekal koliform sayısını hesaplayınız.
11. *E.coli* sayısını belirlemek için pozitif olarak değerlendirilen EC broth tüplerinden tryptone water tüplerine aşılama yapınız.
12. Aşılamanın tryptone water tüplerini $44,0^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
13. Süre sonunda gelişme görülen tüplere indol testi uygulayarak pozitif olanlar üzerinden numunedeki *E.coli* sayısını hesaplayınız.

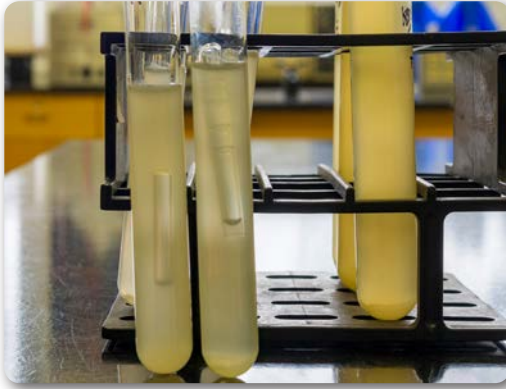


Görsel 10.12: Ekime hazır besiyeri tüpleri

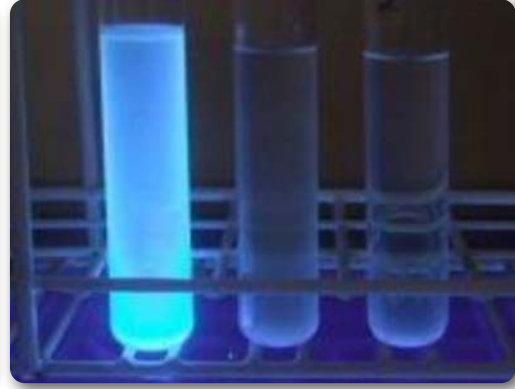


Hızlı Yöntem İşlem Basamakları

1. Aseptik ortam koşullarında numuneden 10^{-4} e kadar dilüsyon serisi hazırlayınız.
2. Her bir dilüsyondan üçer besiyeri tüpüne (Fluorocult LST broth) birer mL ekim yapınız.
3. Ekim yapılan tüpleri 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
4. İnkübasyon sonunda bulanıklıkla birlikte gaz gelişmesi görülen tüpleri (Görsel 10.13) belirleyip elde ettiğiniz kod üzerinden numunedeki toplam koliform sayısını hesaplayınız.
5. Koliform bakteri geliştiği belirlenen tüpleri loş bir ortamda uzun dalga boylu UV lamba altında inceleyiniz (Görsel 10.14).
 - Floresan ışıma veren tüpler üzerinden *E.coli* sayısı hesaplanır. Floresan ışımının net olarak gözlenemediği tüplere 1 mL 1 N NaOH eklenerek tekrar inceleme yapılmalıdır.
 - Floresan ışımaya ilaveten indol testi ile *E.coli* tüpleri üzerinde ikinci bir doğrulama işlemi yapılabilir. İndol testi aynı tüp üzerine ayıraç damlatılarak yapılır.
6. Besiyeri tüplerini otoklavda sterilize ettikten sonra yıkayınız.
 - Yıkama ve temizlik işlemleri iş birliği içerisinde yardımlaşarak yapılmalıdır.



Görsel 10.13: Bulanıklık ve gaz oluşan tüpler



Görsel 10.14: UV lamba altında görülen floresan ışıma

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Besiyerlerini talimatına uygun hazırladı.				
2	Tüplere ekim ve pasajlama yaptı.				
3	İnkübasyon sonu değerlendirme yaptı.				
4	Sayımla ilgili sonuçları hesapladı.				
5	Aseptik kurallara uygun çalıştı.				
TOPLAM PUAN					

NOT ALINIZ



.....

.....



10.2. PATOJEN MİKROORGANİZMA SAYIMI

İnsanların tüketimine sunulan gıdaların; her türlü mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal tehlikelerden arındırılmış olması, gıda güvenliği terimi ile ifade edilmektedir. Tarım ürünlerinin üretiminden tüketicinin sofrasına ulaşmaya kadar olan her aşamada, insan sağlığını olumsuz etkileyecek tehlikelerin tümüyle ortadan kaldırılması ya da kabul edilebilir seviyede azaltılması için alınan önlemlerin tümü gıda güvenliği kapsamında değerlendirilir. Gıda güvenliği açısından önemli olan bakteri çeşidi 15-20 civarındır. Bu kitapta; gıda kaynaklı hastalıklara neden olma açısından ilk sıralarda yer alan *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* aranmasına yönelik analizlere yer verilmiştir. Bu bakterilerin çeşitli durumlarda numunedeki sayısını belirlemeye yönelik analizler yapılabildiği gibi, çoğunlukla gıda ve sularda hiç olmaması istendiğinden analizler var/yok şeklinde sonuç almaya yöneliktir.

10.2.1. *Salmonella* spp. Hakkında Genel Bilgiler

Salmonella cinsi bakteriler, *Enterobacteriaceae* familyası içinde yer alırlar. Flagellaları sayesinde hareketli ve çubuk şeklindedirler (Görsel 10.15). Optimum üreme sıcaklığı 37 °C ve pH'ı 7,4'tür. Dışkı ve lağım suları ile kontamine olmuş gıda, içme suları ve enfekte olmuş insan veya hayvanlardan doğrudan bulaşma ile yayılıp hastalıklara neden olabilmektedir. Böcekler, kuşlar, kemirgenler, toprak ve sular aracılığıyla geniş bir alana yayılmaktadırlar. Koliform grubu bakterilerle yoğun kontamine olmuş gıdalarda genellikle *Salmonella* cinsi bakteriler de bulunur. Neden olduğu enfeksiyon hastalıkları genel bir ifadeyle **salmonellozis** olarak isimlendirilir.



Görsel 10.15: *Salmonella* türlerinin mikroskopik morfolojisi

Bunları Biliyor musunuz?

Tür, bilimsel literatürde İngilizce olarak "Species" sözcüğü ile ifade edilir. Batı dillerinde kısaltmalarda harf tekrarı yapılarak çoğul anlam kazandırılabilir. Bu kapsamda tür ve alt tür kavramlarının çoğul hali için şu kısaltmalar kullanılır:

sp. (species): tür → spp. (türler)

ssp. (subspecies): alt tür → sspp. (alt türler)

Tifo hastalığına sebep olan *Salmonella typhi* ve paratifo hastalığına sebep olan *Salmonella paratyphi* türlerinin tek konakçısı insandır ve bu iki tür sadece insanlarda hastalık yapar. Çoğunlukla hasta ya da taşıyıcı durumunda olan kişinin fekal kontaminasyonuna maruz kalmış gıdanın tüketilmesi ile bulaşır. Özellikle ev, kantin, kafeterya, lokanta gibi yerlerde ısıtma işlemi görmeden hazırlanan salata gibi ürünler bulaşma kaynağı olabilmektedir. Bu nedenle gıda ile ilişkili işlerde çalışanlar, bu gibi patojenlerin taşıyıcısı olup olmadıklarına dair belirli sürelerle portör (taşıyıcı) muayenesine tabi tutulmaktadır.

Salmonella türlerinin en çok bulunduğu gıdalar, hayvansal kaynaklı gıdalardır. Başta tavuk eti olmak üzere beyaz ve kırmızı et, yumurta, ısıtma işlemi görmeyen süt ve süt ürünleri ile birlikte fekal kontaminasyona uğramış her türlü gıda salmonellozis etmeni olabilir. Bununla birlikte lağım suyu karışmış akarsu ya da kuyu suyu ile sulamanın yapıldığı bitkisel ürünlerde de fazla miktarda *salmonella* bulunabilmektedir.

10.2.1.1. *Salmonella* spp. Aranması

Salmonella spp. aranması birkaç aşamada gerçekleştirilir. Aranması kelimesinden de anlaşılacağı gibi burada alınan sonuç, *salmonella* var/25 g (mL) ya da *salmonella* yok/25 g (mL) şeklinde olacaktır. Negatif sonuç alındığında “yok” demek yerine “rastlanmadı” demek daha doğru bir ifade şeklidir. Çünkü “yok” kelimesi kesin bir sonucu ifade eder. Oysaki mikrobiyolojik analiz çalışmalarında her işlem doğru yapılsa dahi sahte negatif sonuç alma ihtimali her zaman vardır. Bu nedenle “25 g (mL) numunede *Salmonella*’ya rastlanmadı” ifadesi kullanımı tercih edilmelidir.

Ön Zenginleştirme

Bu aşamada, numune bünyesindeki hasar görmüş olması muhtemel olan *Salmonella* spp. suşlarının hasarlarını onarması ve üreme için aktif hale geçmesi sağlanır. Bu amaçla 25 g/mL numune, 225 mL tamponlanmış peptonlu su ile homojenize edilerek 34-38 °C’de 18±2 saat bir erlen içinde inkübasyona bırakılır.

Selektif Zenginleştirme

Selektif zenginleştirme işlemi iki farklı sıvı besiyerinde yapılır. Bu amaçla kullanılan besiyerleri; Rappaport Vassiliadis Soy (RVS) broth ve Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin (MKTTn) brothtur. İki farklı besiyeri ile zenginleştirme yapılmasının sebebi, *Salmonella* cinsi bünyesinde bulunan çok fazla serotipin, besiyeri bileşiminde selektivite sağlamak için kullanılan inhibitör maddelerden farklı şekillerde etkilenmesidir. Selektif zenginleştirme yapmak için birer tane tüp içine 10 mL RVS broth ve 10 mL MKTTn broth hazırlanır. Ön zenginleştirme yapılmış erlendenden 0,1 mL alınıp RVS broth tüpüne aşılama yapılır. Aşılama tüp 41,5± 1 °C’de 24±3 saat inkübasyona bırakılır. MKTTn broth tüpüne ise ön zenginleştirme kültüründen 1 mL aşılama yapılarak tüp 37±1 °C’de 24±3 saat inkübasyona bırakılır.

Selektif Katı Besiyerine Sürme

Katı besiyerine sürme işlemi de selektif zenginleştirme aşamasındaki aynı sebepten iki farklı besiyerine yapılır. Bu amaçla kullanılan besiyerlerinden biri Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agardır (Görsel 10.16). İkinci olarak kullanılan besiyeri, analizi gerçekleştiren laboratuvarın tercihinine göre değişebilmektedir. İkinci selektif besiyeri olarak *Salmonella*-*Shigella*(SS) agar, Brilliant Green Fenol

Red Lactose (BGFRL) agar, Xylose Lysine Tergitol-4 (XLT-4) agar ve Rambach agar besiyerlerinden biri kullanılabilmektedir.



Görsel 10.16: XLD agar besiyerinde gelişen *Salmonella* spp. kolonileri

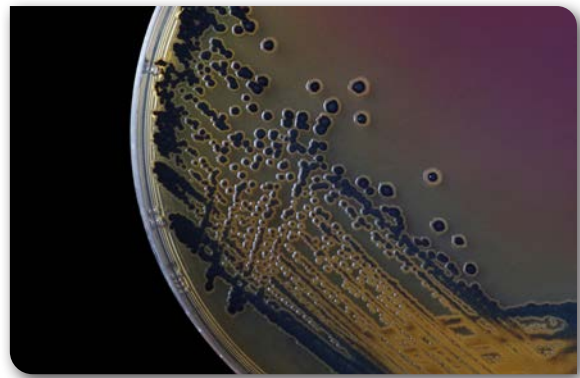
Selektif zenginleştirme yapılan kültürlerden bir öze dolu numune alınarak tek koloni düşürme ekimi yapıldıktan sonra plaklar, 37 ± 1 °C'de 24 ± 3 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda tipik *Salmonella* kolonilerinin varlığına bakılır. Bazı besiyerlerinde kolonilerde görülen siyahlaşma, *Salmonella* spp.nin besiyeri bileşiminde bulunan maddelerden hidrojen sülfür oluşturmamasından kaynaklıdır.

Tablo 10.1: *Salmonella* spp.nin Katı Besiyerlerinde Oluşturduğu Tipik Koloni Yapıları

Selektif Katı Besiyeri	<i>Salmonella</i> spp. Tipik Koloni Şekli
XLD agar	Ortası siyah, pembe-kırmızı yarı saydam koloni; bazen tamamen siyah koloni
SS agar	Ortası siyah yarı saydam koloni (Görsel 10.17) Koloni etrafındaki renk değişimi <i>Salmonella</i> 'da sarı (Görsel 10.18), <i>Shigella</i> 'da kırmızıdır.
BGFRL agar	Etrafı parlak kırmızı zon ile çevrili pembe-kırmızı renkli koloniler
XLT-4 agar	Siyah koloni
Rambach agar	Kırmızı koloni



Görsel 10.17: SS agarda *Salmonella* kolonileri



Görsel 10.18: SS agarda sarı zonlu siyah koloniler

Plaklarda tespit edilen tipik koloniler şüpheli *Salmonella* spp. olarak değerlendirilir. Bu kolonilerin biyokimyasal testler ve serolojik testlerle doğrulanması yapılır.

Şüpheli Tipik Kolonilerin Biyokimyasal Testlerle Tanımlanması

Salmonella spp. kolonilerini doğrulamak için plaklarda oluşan tipik kolonilere Tablo 10.2'de verilen biyokimyasal testler uygulanır. Test sonuçları Tablo 10.2'de verildiği gibi çıkarsa *Salmonella* varlığı biyokimyasal testler ile doğrulanmış olur.

Tablo 10.2: *Salmonella* spp. Kolonilerine Doğrulama Amacıyla Yapılan Biyokimyasal Testler

Biyokimyasal Test	<i>Salmonella</i> spp.
Triple Sugar Iron(TSI) agar testi	+
Lysine Iron agar testi	+
Voges-Proskauer testi	-
Üreaz testi	-
İndol testi	-
Sitrat testi	+

Serolojik Testler İle Doğrulama

Antijen-antikor reaksiyonlarının tespit edilmesine yönelik testler, serolojik testler olarak isimlendirilir. Biyokimyasal olarak doğrulanan kolonilerin *Salmonella* spp.nin hangi serotipi olduğunu belirlemek için serolojik testlere başvurulur. Ortak antijenlere sahip olan mikroorganizmalar serotip olarak adlandırılır.

Bunları Biliyor musunuz?

Salmonella spp. de adlandırma ve yazım şekli diğer bakterilerden farklıdır. *Salmonella* spp. de tür altı serotip farklılıkları önemlidir. Tam adı *Salmonella enterica serotype enteritidis* olan bakteri kısaca *Salmonella* Enteritidis olarak yazılır. Burada Enteritidis büyük harfle başlar ve italik yazılmaz. Bunun nedeni Enteritidis'in tür olmadığını belirtmektir.

10.2.2. *Listeria monocytogenes* Hakkında Genel Bilgiler

Listeriaceae familyası içinde yer almaktadır. Fakültatif anaerob ve psikrofilik özelliktedir. Soğutma, ısıtma, dondurma, kurutma, tuzlama vb. gibi olumsuz koşullara dayanıklıdır. Optimum gelişme sıcaklığı 30-35 °C'dir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında (%10-12) gelişebilir. 30 °C'nin altındaki sıcaklıklarda flagellaları sayesinde hareketli olmakla birlikte 37 °C'de hareket kabiliyetini yitirir. *Listeria monocytogenes* bakterisi ile enfekte olmuş kişilerde ölüm oranı %20-40'tır. *Salmonella* spp. ve *E.coli* gibi bağırsak kökenli bir bakteri olmayan *Listeria monocytogenes* varlığında fekal kontaminasyondan söz edilemez.

Listeria monocytogenes bakterisinin neden olduğu enfeksiyonlara genel bir ifade ile **Listeriozis** denilmektedir. Listeriozis; menenjit, sepsisemi, beyin iltihabı, karaciğer apsesi, gebelerde düşük gibi hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. İnsandan insana geçmesi nadir görülen bir durumdur. Çoğunlukla kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi sonucu enfeksiyon gerçekleşir. Soğukta uzun süre depolanmış tüketime hazır gıdalarda, 100 KOB/g'dan fazla sayıya ulaşması durumunda hastalık oluşturma riski oldukça fazladır. Bununla birlikte çiğ ya da pastörize süt, dondurma, çiğ sebze ve meyveler, fermente et ürünleri, çiğ veya pişmiş her türlü et, kabuklu deniz ürünleri, starter kültür kullanılmayan taze peynirler, tüketime hazır yiyecekler uygun şartlarda hazırlanmadığı takdirde bu bakteri açısından hastalık etmeni olabilmektedir.

10.2.2.1. *Listeria monocytogenes* Aranması

Listeria monocytogenes aranmasında uygulanan işlemler başlıklar halinde aşağıda açıklanmıştır. Sonuç; var/25 g(mL) ya da "25 g(mL) numunede rastlanmadı" şeklinde verilir.

Yarı Selektif Zenginleştirme

25 g/mL numune, 225 mL yarım kuvvetinde Fraser broth besiyeri ile homojenize edilerek 28-30 °C'de 24-26 saat, bir erlen içinde inkübasyona bırakılır.

Selektif Zenginleştirme

İçerisinde 10 mL tam kuvvette Fraser broth besiyeri bulunan deney tüplerine yarı selektif zenginleştirme kültüründen 0,1 mL aşıl原因arak deney tüpü 36-38 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılır.

Selektif Katı Besiyerine Sürme

Bu aşamada; yarı selektif zenginleştirme sonunda 2 adet, selektif zenginleştirmede inkübasyon işleminin 24. ve 48. saatlerinin sonunda ikişer adet olmak üzere toplam 6 adet selektif katı besiyeri plaklarına sürme yöntemi ile ekim yapılır. Ekim yapılan plaklarda iki farklı besiyeri kullanılır. Kullanılan besiyerlerinden biri Agar *Listeria* Ottaviani and Agosti'dir (ALOA). İkinci besiyeri olarak Oxford agar veya Palcam agar kullanılır. Ekim yapılan plaklar 36-38 °C'de 24-26 saat inkübasyona bırakılır. Ekim yapılan 6 adet petri kutusunun herhangi birinde *Listeria monocytogenes* tespit edilirse analiz edilen numunede sonuç "var/25 g(mL)" olarak verilir. Doğrulamak için biyokimyasal testler uygulanır. Kullanılan besiyerlerindeki tipik koloni şekilleri Tablo 10.3'te anlatıldığı, Görsel 10.19'da gösterildiği gibidir.

Tablo 10.3: *Listeria monocytogenes*'in Katı Besiyerlerinde Oluşturduğu Tipik Koloni Yapıları

Selektif Katı Besiyeri	<i>Listeria monocytogenes</i> Tipik Koloni Şekli
ALOA	Etrafı opak zonlu yeşil-mavi koloni
Oxford agar	Küçük, grimsi, siyah zonlu 48 saat sonunda koloniler; ortası çökmüş, siyah zonlu, çapı yaklaşık 2 mm ve parlak yeşildir.
Palcam agar	1,5-2 mm çapında, siyah zonlu, bazen siyah merkezli, grimsi yeşil ya da zeytin yeşili koloniler

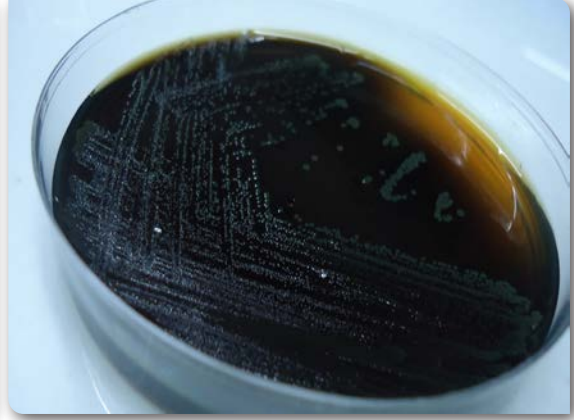


Şüpheli Tipik Kolonilerin Biyokimyasal Testlerle Tanımlanması

Tipik kolonilerin doğrulanması için hemoliz testi, CAMP testi, ramnoz testi ve ksiloz testleri uygulanır. *Listeria monocytogenes* koyun kanlı agarda β -hemoliz koloni yapısı oluşturur. Diğer testlerde alınan sonuçlar: CAMP S.a.(+), CAMP R.e.(-), ramnoz(+), ksiloz(-)'tir.



a) ALOA besiyeri



b) Oxford agar



c) Palcam agar

Görsel 10.19 : Farklı besiyerlerinde *Listeria monocytogenes* bakterisine ait tipik koloni yapıları

NOT ALINIZ



.....

.....

.....

.....

.....

.....



54. UYGULAMA

Salmonella spp. ARANMASI

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak *Salmonella* spp. araması çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulamasonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, steril petri kutuları, 1 mL ve 0,1 mL'lik steril pipet (varsa otomatik pipet ve steril pipet uçları), su banyosu, asetat kalemi, steril deney tüpleri, otoklav, inkübatör, halka öze, TPS, RVS broth, MKTTn broth, XLD agar, ikincil katı besiyeri (SS/BGFRL/XLT-4/Rambach agar).

İşlem Basamakları

1. İş sağlığı ve güvenliği ile ilgili tedbirleri aldıktan sonra aseptik ortam oluşturunuz.
2. Erlende ya da otoklavlanabilir şişede 225 mL steril tamponlanmış peptonlu su (TPS) hazırlayınız.
3. 25 g/mL numuneyi 225 mL TPS ile karıştırarak homojenize ettikten sonra hazırlanan erleni, su banyosunda 34-38 °C'de 18±2 saat inkübasyona bırakarak ön zenginleştirme yapınız.
4. Inkübasyon bitiminden hemen önce, birer tane tüp içinde steril 10 mL RVS broth ve 10 mL MKTTn broth besiyerlerini talimatına uygun olarak hazırlayınız.
5. Ön zenginleştirme yapılmış erlenden 0,1 mL alıp RVS broth tüpüne aşılama yapınız.
6. Aşılama RVS broth tüpünü 41,5±1 °C'de 24±3 saat inkübasyona bırakınız.
7. Ön zenginleştirme yapılmış erlenden 1 mL alıp MKTTn broth tüpüne aşılama yapınız.
8. Aşılama MKTTn broth tüpünü 37±1 °C'de 24±3 saat inkübasyona bırakınız.
9. XLD agar ile birlikte SS agar/BGFRL agar/XLT-4 agar/Rambach agar besiyerlerinden birisini talimatına uygun olarak hazırladıktan sonra her iki besiyerinden ikiyeşer tane ekime hazır plak oluşturunuz.
10. Inkübasyonu sona eren RVS broth tüpünden, XLD agar ve diğer besiyeri plağına sürme ekimi yapınız.
11. Inkübasyonu sona eren MKTTn broth tüpünden, XLD agar ve diğer besiyeri plağına sürme ekimi yapınız.
12. Ekim yapılan plakları 37±1 °C'de 24±3 saat inkübe ediniz.
13. Inkübasyon sonrası plaklarda oluşan tipik kolonileri şüpheli *Salmonella* spp. olarak değerlendiriniz.
 - Biyokimyasal testler öğrenme birimi uygulamalarında, buradaki işlem basamakları tekrar edilerek tipik koloniler elde edilebilir.
14. Üreme olmuş tüp ve petri kutularını yıkamadan önce mutlaka otoklavda sterilize ediniz.
 - İş sağlığı ve güvenliği açısından tek kullanımlık plastik petri kutusu ve pipet kullanımı daha güvenlidir. Bu durumda üreme olmuş petri kutuları ve kullanılmış pipet uçları otoklav torbasına konulup otoklavda sterilize edildikten sonra tıbbi atık torbasına konularak bertaraf edilmelidir.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Besiyerlerini talimatına uygun hazırladı.				
2	Ön zenginleştirme yaptı.				
3	Selektif zenginleştirme yaptı.				
4	Plaklara sürme işlemlerini yaptı.				
5	Inkübasyon sonu değerlendirme yaptı.				
TOPLAM PUAN					

55. UYGULAMA

Listeria monocytogenes ARANMASI

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak *Listeria monocytogenes* aranması çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Bunzen beki, steril petri kutuları, 1 mL ve 0,1 mL'lik steril pipet (varsa otomatik pipet ve steril pipet uçları), su banyosu, asetat kalemi, steril deney tüpleri, otoklav, inkübatör, halka öze, Fraser broth, ALOA besiyeri, ikincil katı besiyeri (Oxford agar/Palcam agar).

İşlem Basamakları

- Analiz için gerekli besiyeri ve araç gereçleri temin ediniz veya hazırlayınız.
 - 225 mL yarım kuvvetli (1/2) Fraser broth. 10 mL tam kuvvetli (1/1) Fraser brot üç petri ALOA agar ve üç petri Oxford agar (veya Palcam agar) analiz için gereklidir.
- 25 g/mL numuneyi 225 mL Fraser broth (1/2) besiyerine ekleyip karıştırınız ve su banyosunda 30 °C'de 24 saat inkübe ederek ön zenginleştirme yapınız.
- Ön zenginleştirme kültüründen 0,1 mL alarak içinde 10 mL tam kuvvetli Fraser broth (1/1) olan deney tüpüne aşılama yapınız.
- Ön zenginleştirme kültüründen bir adet ALOA agar ve bir adet Oxford agar (veya Palcam agar) petri plağına sürme yöntemi ile ekim yapınız.
- Ekim yapılan besiyerlerini 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakınız.
- İnkübasyonun 24. ve 48. saatinde Fraser broth kültüründen birer adet ALOA agar ve birer adet Oxford agar (veya Palcam agar) petri plaklarına sürme yöntemi ile ekim yapınız.
- Ekim yapılan petri plaklarını 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakınız.
- Petri kutularının her birini, kendi inkübasyon süresi sonunda inceleyiniz.
 - Petri kutularının herhangi birinde tipik *Listeria monocytogenes* kolonileri görülürse sonuç "var/25 g (mL) numune" görülmezse "rastlanmadı/25 g (mL) numune" şeklinde ifade edilir.
 - Tipik kolonileri doğrulamak için biyokimyasal testler uygulanır.
- Kullanılan araç gereçleri yıkamadan önce mutlaka otoklavda sterilize ediniz.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Besiyerlerini talimatına uygun hazırladı.				
2	Yarı selektif zenginleştirme yaptı.				
3	Selektif zenginleştirme yaptı.				
4	Plaklara sürme işlemlerini yaptı.				
5	İnkübasyon sonu değerlendirme yaptı.				
TOPLAM PUAN					

A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. Hastalığa neden olan her türlü organizma veya maddeler terimi ile tanımlanır.
2. Patojen mikroorganizmanın bulaşması sonucunda hastalık meydana geliyorsa enfeksiyon patojen mikroorganizmanın gıda üzerinde ürettiği toksinin gıda ile birlikte vücuda alınması sonucunda hastalık meydana geliyorsa olarak adlandırılır.
3. Gıdalarda olarak belirlenen mikroorganizmaların analiz edilmesiyle; genel hijyen düzeyi ve gıda kaynaklı patojenlerin var olup olmadığı hakkında basit ve güvenilir bilgi sağlanır.
4. *Enterobacteriaceae* familyası içinde yer alan ve laktozdan 35-37 °C'de 48 saat içinde asit ve gaz oluşturma kabiliyetine sahip olan bakteri grubu olarak isimlendirilir.
5. Dışkı kaynaklı ifadesini belirtmek için kelimesi kullanılır.
6. İnsanların tüketimine sunulan gıdaların her türlü mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal tehlikelerden arındırılmış olması terimi ile ifade edilmektedir.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevaplarını işaretleyiniz.**7. Gıdalarda mikrobiyolojik kalite ve gıda güvenliği indikatörü olarak aşağıda verilen analiz sonuçlarından hangisi kullanılmaz?**

- A) Toplam *Enterobacteriaceae* sayısı
- B) Toplam koliform sayısı
- C) Fekal koliform sayısı
- D) *Escherichia coli* biyotip-1 sayısı
- E) *Mycoplasma mycoides* sayısı

8. *Salmonella* spp. hakkında aşağıda verilen bilgilerden hangisi yanlıştır?

- A) Tifo hastalığını yapan bakteriler *Salmonella* grubuna aittir.
- B) *Enterobacteriaceae* familyası içinde yer alır.
- C) Laktozu parçalayarak gaz ve asit üretebilir.
- D) Neden olduğu enfeksiyon hastalıkları genel bir ifadeyle salmonellozis olarak isimlendirilir.
- E) Glikozu parçalayarak gaz ve asit üretebilir.

9. *Escherichia coli* hakkında aşağıda verilen bilgilerden hangisi yanlıştır?

- A) Glikozdan asit ve gaz oluşturma yeteneğindedir.
- B) Laktozdan asit ve gaz oluşturma yeteneğindedir.
- C) Fekal olmayan koliformlardan farklı olarak 44 °C'de gelişebilmektedir.
- D) Fekal kontaminasyon indikatörüdür.
- E) İndikatör olarak yararlanılan *E.coli* biyotip-1'in patojenitesi yüksektir.

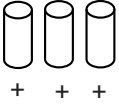
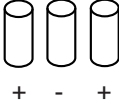
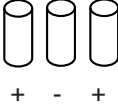
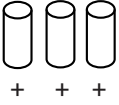
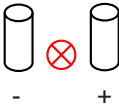
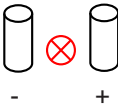
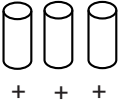
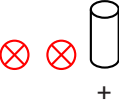
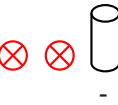


10. *Enterobacteriaceae* familyası içinde yer alan bakterilerin VRBD agar besiyerinde oluşturdıkları koloni yapısı aşağıdaki seçeneklerden hangisinde doğru olarak verilmiştir?
- A) Siyah zonlu, çapı yaklaşık 2 mm ve parlak yeşil
 - B) Kırmızımsı bir presipitat zon ile çevrili 1-2 mm çapında koyu kırmızı
 - C) Kırmızımsı bir presipitat zon ile çevrili 1-2 mm çapında mavi-menekşe
 - D) Etrafı opak zonlu yeşil-mavi
 - E) 1,5-2 mm çapında, siyah zonlu
11. Aşağıda verilen besiyerlerinden hangisi *Listeria monocytogenes* aranmasında kullanılır?
- A) ALOA
 - B) PCA
 - C) Rambach agar
 - D) RVS broth
 - E) XLD agar
12. Aşağıdaki seçeneklerden hangisi *Salmonella* spp. aranması aşamalarından biri değildir?
- A) Ön zenginleştirme
 - B) Yarı selektif zenginleştirme
 - C) Selektif zenginleştirme
 - D) Selektif katı besiyerine sürme aşaması
 - E) Şüpheli tipik kolonilerin biyokimyasal testlerle tanımlanması
13. *Listeria monocytogenes* hakkında aşağıda verilen bilgilerden hangisi doğrudur?
- A) Koliform bakteri grubunda yer alır.
 - B) ALOA besiyerinde siyah renkli koloniler oluşturur.
 - C) Fekal kontaminasyon indikatörüdür.
 - D) Soğutma, ısıtma, dondurma, kurutma vb. gibi olumsuz koşullara dayanıklı değildir.
 - E) Buzdolabı sıcaklığında üreyip gelişebilmektedir.
14. *Salmonella* bakterisi için aşağıda verilen değerlerin hangisi optimum şartları sağlar?
- A) Sıcaklık 37 °C, pH 7,4
 - B) Sıcaklık 35 °C, pH 5,4
 - C) Sıcaklık 25 °C, pH 7,4
 - D) Sıcaklık 20 °C, pH 5,4
 - E) Sıcaklık 45 °C, pH 7,4



C) Aşağıdaki soruları cevaplayınız.

15.

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
 + + +	 + - +	 + - +	} LST broth besiyeri tüpleri ekim sonuçları
 + + +	 - +	 - +	
 + + +	 + + +	 + + -	} İndol test sonuçları
 + + +	 + + +	 + + -	

Katı bir gıda numunesinde standart EMS yöntemi ile toplam koliform, fekal koliform ve *E.coli* sayısı belirlenmek istenmektedir. Bu amaçla yapılan analizde LST broth, EC broth besiyerlerinde gelişme görülen tüpler ve indol testi sonuçları yukarıdaki çizelgede verildiği gibi sonuçlanmıştır. Güvenilirliği artırmak amacıyla dört seyreltiden ekim yapılmıştır.

Numunedeki toplam koliform, fekal koliform ve *E.coli* sayılarını hesaplayınız.

11.

ÖĞRENME BİRİMİ



BİYOKİMYASAL TESTLER

TEMEL KAVRAMLAR

Biyokimyasal Test
İdentifikasyon
Ayıraç
Fermantasyon
İnokülüm

KONULAR

- 11.1. RENK DEĞİŞİMİNE BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER
- 11.2. GAZ VEYA HAVA KABARCIĞI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER
- 11.3. PIHTI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Çalışma amacına ve tekniğine uygun renk değişimine bağlı biyokimyasal testleri yapmayı,
- Gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testleri yapmayı,
- Pıhtı oluşumuna bağlı biyokimyasal testleri yapmayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Doğada çok fazla sayıda mikroorganizma türleri ve cinsi bulunmaktadır. Mikroorganizmaların türlerini ve cinslerini nasıl ayırt edebiliriz?
2. Farklı ülkelerde mikroorganizmalar üzerinde farklı çalışmalar yapılmaktadır. Aynı mikroorganizma türü üzerinden çalışma yapan farklı bilim insanları arasında koordinasyon nasıl sağlanabilir?
3. Her mikroorganizma türünün sahip olduğu özellikler farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar tür ve cinslerin belirlenmesinde nasıl kullanılabilir?



11.1. RENK DEĞİŞİMİNE BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER

Her mikroorganizmanın kendine özgü biyokimyasal özellikleri vardır. Örneğin bakteri türleri farklı enzimlere sahiptir. Bu enzimlere bağlı olarak ve belirli maddeleri kullanarak çeşitli yıkım ve yapım ürünleri oluştururlar. Mikroorganizmaların bu özellikleri belirlenerek mikroorganizmanın tür ve cinsleri tanımlanmaya (identifikasyon) çalışılmaktadır. Bu kapsamda biyokimyasal testler mikroorganizmaların cins ve türlerini belirlemede kullanılmaktadır. İncelenen mikroorganizmanın çeşitli besin maddelerini kullanabilmesi, belirli enzimleri meydana getirebilmesi, bazı maddeleri oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla biyokimyasal testler yapılmaktadır.

Tanımlamada kullanılan biyokimyasal testler; bazı özellikleri belirlenmiş mikroorganizmalarda, tahmin edilen türler arasında ayrımın sağlanarak tür ve cinsinin doğrulanması amacıyla uygulanır. Mikroorganizmalarda biyokimyasal test yapmadan önce mikroorganizmanın en azından gram boyama tepkimesi ve morfolojisi bilinmelidir.

Biyokimyasal testlerin avantajları; pratik, ucuz olması ve kısa sürede sonuç vermesidir. Bakterilerde tür tespiti bazen sadece biyokimyasal testlere göre yapılabilir. Bunun için testler; özenli, kontrollü yapılmalı, çok iyi ayıraçlar ve ortamlar kullanılmalıdır. Bakteri türleri test koşullarına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Bundan dolayı tanımlama sonucunun doğru, güvenilir ve standart olması için, taze ve saf kültür kullanılmalıdır. Biyokimyasal test sonuçları, tanımlama kaynaklarında (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) belirtilen değerler ile kıyaslanarak incelenen mikroorganizmanın tür ve cinsleri belirlenmektedir.

Çok sayıda biyokimyasal test çeşidi olması nedeniyle testlerin tamamı bu kitapta anlatılmamış fakat testlerin uygulama sonuçlarının değerlendirme kriterlerine göre biyokimyasal testler sınıflandırılarak örnek çalışmalar verilmiştir. Bu kapsamda; renk değişimine bağlı, pıhtı oluşumuna bağlı bir de gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testler olarak sınıflandırılmıştır.

Renk değişimine bağlı biyokimyasal testler; besiyerine konulan ayıraçlar ve indikatörler sayesinde renk değişikliği gözlemlenerek tanı konulmasına yardımcı olan testlerdir. Bunlar: indol testi, metil kırmızısı testi, voges-proskauer testi, sitrat testi, fosfotaz testi, üre testi ve Triple Sugar Iron agar testi vb.dir.

11.1.1. İndol Testi

İndol testi, bakterilerin besiyeri içerisinde bulunan triptofanı kullanarak indol oluşturup oluşturmadığını belirlemede kullanılır. Test sonucunda kırmızı halka oluşması pozitif, sarı halka oluşması negatif olarak değerlendirilir. Bazı bakterilerin cins ve tür ayrımında kullanılır. Bunlar; *Salmonella*(-), *Edwardsiella* (+), *E. coli* (+), *Enterobacter* (+), *Klebsiella* (-), *P. multocida* (+), *P. haemolytica* (-), *P. mirabilis* (-), *P. vulgaris* (+) 'tir.

11.1.2. Metil Kırmızısı Testi

Metil kırmızısı testi; incelenen bakteri türünün glikozu kullanarak organik asit oluşturup oluşturmadığını belirlemede kullanılmaktadır. Organik asit oluşması ortam pH değerinin düşmesine sebep olur. Ortam pH'sındaki düşüşü belirlemek için, metil kırmızısı indikatörü eklenir. Metil kırmızısı indikatörü, pH 6.0 da sarı renk ve pH 4.4 ve altında kırmızı renk gösterir. Metil kırmızısı testi; *Escherichia coli*'de pozitif, *Klebsiella pneumoniae*'da negatif sonuç verir.

11.1.3. Voges - Proskauer (VP) Testi

Bazı bakteriler glikozu kullanarak nötral ürünler (asetil metil karbinol yani acetoin) oluştururlar. Voges-proskauer testi; bakterilerin glikoz bulunan besiyerinde nötral ürünler oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla uygulanır. Test sonunda pembe renk pozitif, sarı renk negatif olarak değerlendirilir. *K. pneumoniae* (+), *E. coli* (-) gibi bakteri türlerini belirlemede kullanılır.

11.1.4. Sitrat Testi

Bakterilerin besiyerindeki sitratı, karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadığını tespit etmek amacıyla uygulanır. Böylece bakterinin türü ve cinsi hakkında bilgi sahibi olunur. Sitrat, bakteri tarafından sitritaz enzimi yoluyla ayrışır. Bu reaksiyonlar sonucunda orijinal rengi yeşil olan besiyeri maviye döner ve pozitif olarak değerlendirilir. *Klebsiella aerogenes*'ta sitrat pozitif, *Escherichia coli* de negatiftir.

11.1.5. İMVİC Testi

İMVİC testi; indol, metil kırmızısı, Voges-proskauer ve sitrat testlerinin birlikte uygulanmasıyla oluşan testlerdir. Bu testler bir bakteriye tek tek uygulanıp bir bütün olarak değerlendirildiğinde **İMVİC testi** adını alır. Bu testler çoğunlukla koliform grubu bakterileri ayırmak için kullanılır. Özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinin ilk tanımlama basamağında mikrobiyoloji laboratuvarları için vazgeçilmez testlerdir. Tablo 11.1'de bazı bakterilerin İMVİC testine reaksiyonları gösterilmiştir.

Tablo 11.1: Bazı Bakterilerin İMVİC Testine Gösterdiği Reaksiyonlar

Bakteri	İndol	Metil Kırmızısı	Voges - Proskauer	Sitrat
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	+	-	-/+
<i>Salmonella spp.</i>	-	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-/+	-	+	+
<i>Shigella spp.</i>	+/-	+	-	-

11.1.6. Oksidaz Testi

Aerobik bakterilerin ürettiği oksidaz enzimini tespit etmek amacıyla uygulanır. Bu test *Pseudomonas* türlerini *Enterobacteriaceae* üyelerinden ayırmada kullanılır. Suların analizinde koliform grubu bakterilerden şüphe duyulduğunda özellikle oksidaz testi uygulanır.

Testte koloni doğrudan kullanılabilirdiği gibi genellikle CASO agar, Nutrient agar veya Plate Count agar gibi besiyerinde kültürü yapıldıktan sonra test uygulanır. Testte 1 g tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür, 100 mL saf suda çözündürülür. Oluşan bu çözelti ile filtre kâğıdı ıslatılır. Kâğıt üzerine koloni platin öze ile yayılır ve 10 sn. bekledikten sonra mavi-menekşe renk gözlemlenirse sonuç pozitifdir (Görsel 11.1). Pozitif şahit olarak *Pseudomonas spp.*, negatif şahit olarak *E. coli* kullanılabilir.



Görsel 11.1: Oksidaz test sonucu

11.1.7. Fosfotaz Testi

Bu test; stafilokok bakteriler tarafından sentezlenen fosfotaz enziminin varlığını tespit etmek amacıyla uygulanır. Böylece bakterinin türü ve cinsi hakkında bilgi sahibi olunur. Tüpte veya kolonide pembe-kırmızı rengin oluşması testin pozitif olduğunu; renk değişikliği olmaması testin negatif olduğunu gösterir. *S. Aureus* pozitif, *S. epidermidis* negatiftir.

SIRA SİZDE

Suların mikrobiyolojik analizinde *E.coli* varlığından şüphe ediliyor. Su numunesinden yapılan ekimlerde elde edilen şüpheli kolonileri doğrulamak için hangi test veya testler yapılmalıdır?

11.1.8. Triple Sugar Iron (TSI) Agar Testi

TSI, özellikle *Salmonella* gibi bakterileri tanımlamak amacıyla kullanılan bir besiyeridir. Adından da anlaşılacağı üzere üç şekerli ve üç demirlidir. Bu besiyerinde; şekerlerin fermentasyonu, gaz oluşumu ve hidrojen sülfür (H_2S) oluşumu olmak üzere, bakterilerin üç temel özelliği incelenir. Besiyeri; laktoz, glikoz ve sakkaroz olmak üzere üç farklı şeker, indikatör olarak fenol kırmızısı ve H_2S oluşumunun göstergesi olan ferrik amonyum sülfat içerir. *Salmonella*, laktoz ve sakkaroz şekerlerini parçalayamaz. Bundan dolayı inkübasyon sonunda besiyeri pembe-kırmızı rengini korur. Eğer besiyeri inkübasyon sonunda sarı renk olursa test edilen bakteri, laktoz ve sakkarozu kullanmıştır. Dolayısıyla bu bakterinin *Salmonella* olmadığı anlaşılır. Tüpteki besiyeri yüzeyinin kırmızı olması, dipte siyahlık ve gaz delikleri olması *Salmonella* için pozitif sonuçtur. Tüpün dibinde sarı renk de olması beklenir ancak siyah renk sarı rengi baskıladığı için görünmez.

Görsel 11.2’de kültürden TSI agara ekim yapma işlemi gösterilmiştir.

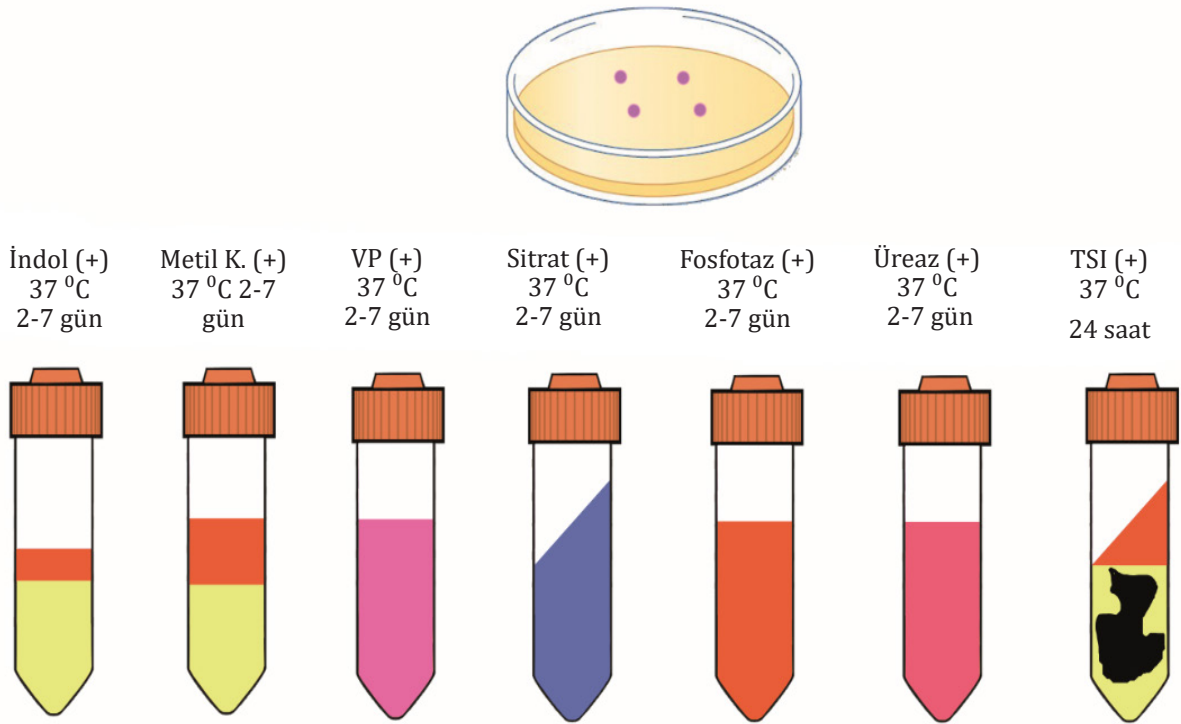


Görsel 11.2: TSI agara ekim yapma

11.1.9. Üreaz Testi

Mikroorganizmaların, üreyi hidrolize eden üreaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla yapılır. Bakteriler, üreyi üreaz enzim yardımıyla parçalayarak karbondioksit ve amonyak oluşturur. Besiyerinde amonyak oluşması pH'ın yükselmesine yani ortamın alkali olmasına sebep olur. Amonyakın ortamda olduğu, indikatör boya ve nessler ayırıcı ile anlaşılır. Testte üre içeren Christensen besiyerleri (ürelü buyyon veya agar) kullanılır. Reaksiyon sonunda kültürde meydana gelen kırmızı renk pozitif, hiçbir değişikliğin olmaması negatif olarak değerlendirilir. *P. vulgaris* üreaz (+) ve *E. coli* üreaz (-) bakterilerdir.

Renk değişikliği pozitif olarak değerlendirilen biyokimyasal testler Görsel 11.3'te gösterilmiştir.



Görsel 11.3: Renk değişimine bağlı pozitif reaksiyon gösteren test tüpleri

NOT ALINIZ



.....

.....

.....

56. UYGULAMA

RENK DEĞİŞİMİNE BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak renk değişimine bağlı biyokimyasal testler çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Renk değişimine bağlı çok sayıda test bulunmaktadır. Bu testlerden bazılarının işlem basamakları aşağıda verilmiştir. Laboratuvar imkânlarına göre bir veya birkaçını uygulayınız.

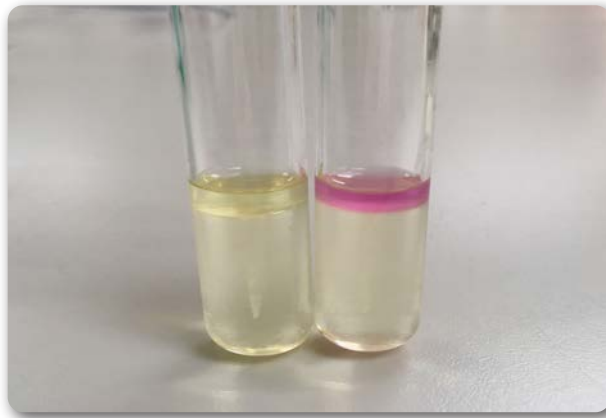
İNDOL TESTİ

Kullanılacak
Araç Gereç

İnkübatör, öze, pipet, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, cam yazar kalem, Kovac's veya Ehrlich's ayırıcı, peptonlu su veya triptofanlı sıvı besiyeri, saf kültür.

İşlem Basamakları

1. Peptonlu su veya triptofanlı sıvı besiyerinden alınız.
 - Besiyerinin usulüne uygun ve steril olduğundan emin olunmalıdır.
 - Peptonların bileşiminde glikoz varsa indol testinde kullanılmamalıdır.
 - Sonucun daha iyi gözlemlenebilmesi için besiyeri hafif alkali (pH 7.4-7.8) olmalıdır.
2. İncelenecek bakteri kültüründen besiyerine ekim yapınız.
 - Koloniden özeyle alarak tüpe ekim yapılmalıdır.
3. Tüpü 37 °C'de 2-7 gün inkübasyonda bekletiniz.
4. İnkübasyon bitiminde 0,5 mL Kovac's veya Ehrlich's ayırıcını tüplere aktarıp çalkalayınız.
 - Yavaşça aktarmaya dikkat edilmelidir.
 - Ayıraçlar buzdolabında muhafaza edilmelidir.
5. 1-2 dakika içinde besiyerinde meydana gelen renk değişimini gözlemleyiniz.
 - Tüpün üst kısmında kiraz kırmızısı renkte bir tabaka oluşursa test pozitif; sarı renkli tabaka oluşursa test negatiftir (Görsel 11.4).
 - Test sonucu hakkında kesin bir karara varılamaz ise kültür birkaç gün daha inkübasyona bırakılmalıdır.



Görsel 11.4: İndol test sonucu

METİL KIRMIZISI TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç	İnkübatör, öze, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, cam yazar kalem, Glukoz-Fosfat broth besiyeri, metil kırmızısı indikatörü, saf kültür.
--------------------------------	--

İşlem Basamakları

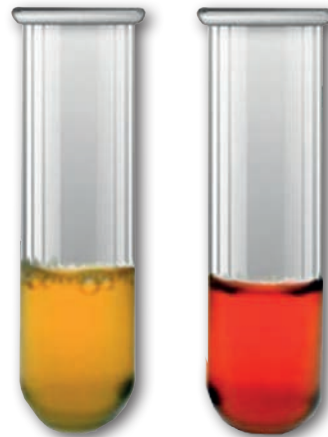
1. İncelenecek bakteri kültüründen öze ile alınarak glukoz-fosfat broth besiyerine ekim yapınız.
2. Tüpü 37 °C'de 2-7 gün inkübasyona bırakınız.
3. İnkübasyondan sonra üzerine 4-5 damla metil kırmızısı indikatörü damlatıp kuvvetlice karıştırınız.
4. Renk değişimini gözlemleyiniz.
 - Besiyerinde, kırmızı-pembe renk oluşması testin pozitif olduğunu; sarı renk oluşması ise testin negatif olduğunu gösterir (Görsel 11.5).

VOGES - PROSKAUER (VP) TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç	İnkübatör, öze, pipet, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, cam yazar kalem, Glukoz-Fosfat broth besiyeri, %40'lık KOH çözeltisi, %5'lik alfa naftol çözeltisi, saf kültür.
--------------------------------	--

İşlem Basamakları

1. İncelenecek bakteri kültüründen öze ile alarak glukoz-fosfat broth besiyerine ekim yapınız.
2. Tüpü 37 °C'de 2-7 gün inkübasyona bırakınız.
3. İnkübasyondan sonra üzerine, 1 mL %40'lık KOH çözeltisi, daha sonra 3 mL %5'lik alfa naftol çözeltisi aktararak karıştırınız.
4. Renk değişimini gözlemleyiniz.
 - Besiyerinde 2-5 dakika içinde pembe-kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu gösterir (Görsel 11.6).
 - Bazen ayıraç ilavesinden 1 saat sonra bakır renkli gibi bir görünüm oluşabilir. Negatif olarak dikkate alınmalıdır.

**Görsel 11.5:** Metil kırmızı testi**Görsel 11.6:** Voges-proskuer testi

SİTRAT TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç

İnkübatör, öze, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, cam yazar kalem, Simmon's Sitrat agar, saf kültür.

İşlem Basamakları

1. İncelenecek bakteri kültüründen iğne öze ile alarak tüpteki Simmon's Sitrat yatık agar besiyerinin yüzeyine ekim yapınız.
 - İğne öze kullanılmasının sebebi; besiyerine çok miktarda inokülüm (aşılana örnek materyal), organik madde aktarımının önlenmesidir.
 - Besiyerleri taze hazırlanmalı, orijinal rengini kaybedenler kullanılmamalıdır.
 - Besiyerlerine çok fazla ekim yapılmamalıdır. Yanlış pozitif sonuç görülmemesi için inokülüm uygun oranda sulandırılmalıdır.
 - Ekim yapılırken pepton, glikozun veya azotun sitratlı besiyerine karışması, yanlış pozitif sonuca neden olabilir.
2. Tüpü 37 °C'de 2-7 gün inkübasyona bırakınız.
3. Renk değişimini gözlemleyiniz.
 - Orijinal rengi yeşil olan besiyerinin maviye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilir. Renk değişmemişse negatiftir (Görsel 11.7).

FOSFOTAZ TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç

İnkübatör, öze, pipet, damlalık, tüp standı, cam yazar kalem, fenolftalein fosfatlı besiyeri, %40'lık amonyum hidroksit (NH_4OH) çözeltisi veya %40'lık sodyum hidroksit çözeltisi, saf kültür.

İşlem Basamakları

1. Mikroorganizma kültüründen fenolftalein fosfatlı besiyerine tekniğine uygun olarak ekim yapınız.
2. 37 °C'de 2-7 gün inkübasyona bırakınız.
3. İnkübasyon sonunda, katı besiyeri kullanılmış ise petri kutusunun kapağına %40'lık amonyum hidroksit (NH_4OH) çözeltisinden 1 mL aktararak kültürü ters olarak kapatınız. Eğer sıvı besiyeri kullanılmışsa tüplere, %40'lık sodyum hidroksitten bir damla damlatınız.
 - Alkali ilavesinin çok fazla veya çok az olmamasına dikkat edilmelidir. Aksi takdirde yanlış sonuç verebilir.
4. Renk değişimini gözlemleyiniz.
 - Kültürde veya tüpte kırmızı rengin meydana gelmesi sonucun pozitif olduğunu gösterir. Negatif durumda renk değişikliği olmaz.



Görsel 11.7: Sitrat testi



ÜREAZ TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç

İnkübatör, öze, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, cam yazar kalem, Christensen'in üreli agar, saf kültür.

İşlem Basamakları

1. Christensen'in üreli agara veya üreli broth besiyerine ekim yapınız.
2. 37 °C'de 2-7 gün inkübasyona bırakınız.
3. Renk değişimini gözlemleyiniz.
 - **İnkübasyon sonunda, kırmızı rengin meydana gelmesi pozitif; hiçbir değişikliğin olmaması negatif olarak değerlendirilir (Görsel 11.8).**

TRİPLE SUGAR IRON (TSI) AGAR TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç

İnkübatör, öze, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, cam yazar kalem, TSI Agar, saf kültür.

İşlem Basamakları

1. Katı besiyerinde üremiş olan kültürden *Salmonella* olduğu tahmin edilenlerden, TSI agara öze ile ekim yapınız.
2. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
3. Renk değişimini gözlemleyiniz.
 - **İnkübasyon sonucunda tüpün dip kısmının sarı olması, bakterinin glikozu fermente ettiğini siyah oluşu, hidrojen sülfür oluşumunu; yüzeyin kırmızılığı, laktoz ve sakkarozu kullanmadığını; gaz oluşumu da glikozun gaz oluşturduğunu gösterir. Bu sonuca göre *Salmonella* pozitif olarak değerlendirilir (Görsel 11.9).**



Görsel 11.8: Üreaz testi



Görsel 11.9: TSI Agar testi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Uygun besiyerini seçti.				
2	Ekim işlemlerini tekniğine uygun biçimde yaptı.				
3	İnkübasyon işlemlerini yaptı.				
4	İndikatör veya ayıraç ekleme işlemlerini yaptı.				
5	Sonuçların değerlendirmesini yaptı.				
TOPLAM PUAN					



11.2. GAZ VEYA HAVA KABARCIĞI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER

Bazı bakteriler, enzimlerini kullanarak ortamdaki kimyasal maddeleri ayrıştırır ve bu tepkime sonucunda gaz veya hava kabarcıkları oluşumuna neden olurlar. Biyokimyasal testler bu özellikler dikkate alınarak değerlendirme yapıp bakterilerin tanımlanmasını sağlayan testlerdir. Bunlar; katalaz testi, eijkman testi, karbonhidrat fermantasyon testidir.

11.2.1. Katalaz Testi

Katalaz, genellikle aerobik mikroorganizmalar tarafından üretilen bir enzimdir. Katalaz testinde, bakteri kültürüne hidrojen peroksit damlatarak katalaz enzim varlığını tespit etmek amaçlanmaktadır. Stafilokokları, streptokoklardan ayırt edebilmek için katalaz testi kullanılır. Sıvı veya katı bakteri kültürüne hidrojen peroksit damlatıldığında oksijen açığa çıkarak hava kabarcığı oluşursa bu durum katalaz enzim varlığını gösterir. *Stafilokoklar* katalaz pozitif, *Streptokoklar* ise katalaz negatiftir. Test; tüpte, petride ve lamda yapılabilir.

11.2.2. Eijkman Testi

Koliform bakterilerin içinde fekal koliformlar önemli bir bakteri grubudur. Fekal koliform bakterilerin safra tuzları ve laktoz içeren besiyerinde laktozdan asit ve gaz oluşturmalarıyla ilgili test Eijkman testidir. Fekal koliformları ayırmada, *E. coli*'nin tanısında kullanılır. Koliform olduğu bilinen safkültürden sıvı besiyerine ekim yapıp, 44-45 °C inkübasyondan sonra mikrobiyel gelişim ve gaz oluşumu varsa Eijkman testi pozitif demektir. *E. coli*, 44-45 °C'de indol testi uygulandığında pozitif sonuç verir ise Eijkman testinden de pozitif sonuç alınan bakteridir.

11.2.3. Karbonhidrat Fermantasyon Testi

Karbonhidratların, mikroorganizmalar tarafından oksijensiz ortamda parçalanması işlemine **fermantasyon** denir. Bu test, mikroorganizmaların karbonhidratları fermente edip etmediğini belirlemek amacıyla yapılır. Bakteriler; ortamda bulunan glikoz, sükroz, laktoz gibi karbonhidratları parçalayarak çeşitli ürünler (organik asitler, nötral ürünler ve gaz) oluşturur. Bu maddeler çeşitli testler ile ortaya konulup mikroorganizmaların tanısında kullanılır. Ayrışmayı ortaya koyabilmek

için besiyerine bazı indikatörler eklenir veya bileşiminde indikatör ve karbonhidrat bulunan hazır besiyerleri kullanılır. Bu indikatörlerin renklerinde meydana gelen değişimler, ortamdaki maddelerin parçalandığını gösterir. Besiyerinde bakterilerin glikozu parçaladığı; ortamda asit oluşumu ve indikatör renginin değişmesiyle anlaşılır. Gaz oluşumu ise katı besiyerinde gaz yarıkları ile sıvı besiyerinde durham tüpünde hava kabarcığı oluşması ile anlaşılır (Görsel 11.10). Bu testte sıvı veya katı besiyerleri kullanılabilir. Örnek: içinde karbonhidrat bulunan steril peptonlu su, KIA, laktoz broth, TSI agar gibi.



Görsel 11.10: Durham tüpünde gaz oluşumu

57. UYGULAMA

GAZ VEYA HAVA KABARCIĞI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testler çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı çok sayıda test bulunmaktadır. Bu testlerden bazılarının işlem basamakları aşağıda verilmiştir. Laboratuvar imkânlarına göre bir veya birkaçını uygulayınız.

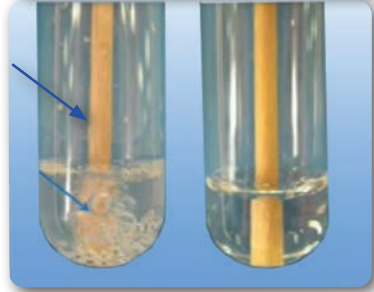
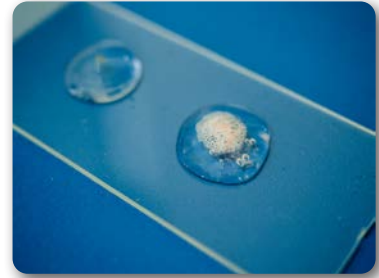
KATALAZ TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç

İnkübatör, öze, pipet, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, cam yazar kalem, %30'luk H_2O_2 çözeltisi, FTS, saf kültür.

İşlem Basamakları

1. %30'luk H_2O_2 çözeltisi hazırlayınız.
 - H_2O_2 çözeltileri dayanıksız oldukları için günlük hazırlanıp kullanılmalıdır.
 - Bu çözelti, buzdolabında muhafaza edilmelidir.
2. Temiz bir deney tüpü veya lam alarak bir damla serum fizyolojik damlatınız.
3. İncelenecek bakteri kültüründen özeyle alarak tüp veya lamdaki serum fizyolojik ile karıştırınız.
 - Ekim işlemleri, aseptik tekniğe uygun olarak yapılmalıdır.
4. Üzerine %30'luk H_2O_2 çözeltisinden damlatınız.
 - Koruyucu malzeme (gözlük ve eldiven) kullanılmalıdır.
5. Karıştırma işlemini yapınız.
 - Deriye temas etmemesine dikkat edilmelidir.
6. Hava kabarcığı oluşup oluşmadığını gözlemleyiniz.
 - Hava kabarcığı, testin pozitif olduğunu gösterir.



Görsel 11.11: Tüpte ve lamda katalaz testi

EİJKMAN TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç

İnkübatör, öze, pipet, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, cam yazar kalem, McConkey's broth besiyeri, saf kültür.

İşlem Basamakları

1. İçinde durham tüpü bulunan McConkey's broth besiyerinden alınız.
 - Besiyerinin steril ve tekniğe uygun olarak hazırlandığından emin olunmalıdır.
 - Besiyeri olarak Brilliant Green Bile Lactose broth da kullanılabilir.
2. İncelenecek kültürden öze ile ekim yapınız.
3. Tüpü 44-45 °C'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
 - Fekal koliformların test edilmesinde, inkübasyon işleminin su banyosunda yapılması önerilir.
4. Durham tüpünde hava kabarcığı ve besiyerinde mikrobiyal gelişim olup olmadığını gözlemleyiniz.

KARBONHİDRAT FERMANTASYON TESTİ - 1**Kullanılacak Araç Gereç**

İnkübatör, öze, pipet, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, cam yazar kalem, Kligner Iron agar besiyeri, saf kültür.

İşlem Basamakları

- Deney tüplerinde yatık olarak hazırlanmış Kligner Iron agar besiyerini alınız.
 - Bu besiyeri enterik bakterileri tanımlamak amacıyla kullanılır.**
- İncelenecek kültürden öze ile yoğun miktarda numune alınız.
- Yatık agar yüzeyine sürme yöntemine uygun ekim yapınız.
 - Ekim yapıldıktan sonra öze, besiyerinin dip kısmına batırılıp çıkarılmalıdır.**
- Besiyerlerini 37 °C'de 24-48 saat inkübasyonda bekletiniz.
- Renk değişimini gözlemleyiniz.
 - Yatık yüzeyde ve dipteki sarı renk asitliği, kırmızı renk alkaliliği gösterir.**
- Gaz oluşumunu kontrol ediniz.
 - Agarda gaz kabarcığı ya da çatlakları varsa aerobik mikroorganizmaların, yoksa anaerobik mikroorganizmaların varlığına işaret eder.**
- Sonuçları değerlendiriniz (Görsel 11.12).
 - Kırmızı yatık yüzey/sarı dip → bakterilerin sadece glikozu fermente ettiğini,**
 - Sarı yatık yüzey/sarı dip → laktoz ve glikozu fermente ettiğini,**
 - Kırmızı yatık yüzey/kırmızı dip → laktoz ve glikozu fermente etmediğini göstermektedir.**

KARBONHİDRAT FERMANTASYON TESTİ - 2**Kullanılacak Araç Gereç**

İnkübatör, öze, pipet, damlalık, tüp standı, bunzen bek, cam yazar kalem, durham tüplü karbonhidrat fermantasyon test sıvı besiyerleri, saf kültür.

İşlem Basamakları

- Durham tüplü karbonhidrat fermantasyon test sıvı besiyerleri alınız.
- Besiyerine incelenecek mikroorganizmanın saf kültüründen 0,1 mL olarak ekim yapınız.
- Besiyerlerini 37 °C'de 1-10 gün inkübasyonda bekletiniz.
- Gaz ve asit oluşumunu kontrol ediniz (Görsel 11.13).
 - Değerlendirilmelerde kullanılan indikatörlerin asit baz durumuna göre aldığı renk değişimleri iyi bilinmelidir (Tablo 11.2).**
 - Sonuçlar, pozitif (+) veya negatif (-) olarak değerlendirilmelidir.**
 - Mikroorganizma karbonhidratı kullandıysa ortam asidik olacaktır.**



Görsel 11.12: Karbonhidrat kullanımına göre oluşan renkler



Görsel 11.13: Karbonhidrat test sonucu

Tablo 11.2: Bazı İndikatörlerin Ortamdaki Renk Değişim Reaksiyonları

İndikatör	Asit	Nötr	Alkali
Andrade	kırmızı	sarı	renksiz
Fenol kırmızısı	sarı	renksiz	pembe
Bromkresol moru	sarımsı	morumsu	mor
Bromtimol mavisi	sarı	hafif mavi	mavi-koyu mavi

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Gerekli çözeltileri hazırladı.				
2	Uygun besiyerlerini seçti.				
3	Ekim işlemlerini tekniğine uygun biçimde yaptı.				
4	İnkübasyon işlemlerini yaptı.				
5	Sonuçların değerlendirmesini yaptı.				
TOPLAM PUAN					

NOT ALINIZ

This image shows a full page of white paper with horizontal dashed lines, typical of primary school writing paper. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

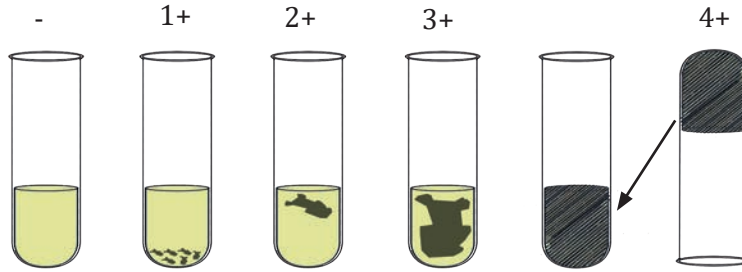
11.3. PIHTI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER

Bazı bakteriler, enzimleri yardımıyla bulundukları ortamdaki maddeleri koagüle (katılaşma) ederler. Sonuçta pıhtı oluşumuna sebep olurlar. Biyokimyasal testler bu özellikler dikkate alınarak değerlendirme yapıp bakterilerin tanımlanmasını sağlayan testlerdir. Bunlar; koagülaz testi, aglütinasyon testi, jelatin hidroliz testidir.

11.3.1. Koagülaz Testi

Koagülaz, fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştıran enzimdir. Özellikle patojen stafilokoklar tarafından üretilir. Koagülaz testi, patojen stafilokokları diğer stafilokoklardan ayırt etmek için kullanılan bir testtir. *Staphylococcus aureus* serbest koagülaz ve bağlı koagülaz olarak iki enzime sahiptir. Koagülaz, hücre tarafından ortama salınırsa buna **serbest koagülaz** denir. Hücre duvarında bulunan ve fibrinojeni bağlayana ise **bağlı koagülaz** denir. Serbest koagülaz testi tüpte yapılırken bağlı koagülaz testi lamda yapılır. Klinik mikrobiyoloji uygulamalarında genellikle bağlı koagülaz testi yapılır. Bu test lam üzerinde kümeleşmenin gözlenmesi ile olur ancak genelde tüp koagülaz testi, daha güvenilir sonuç verdiği için tercih edilir. Koagülaz enzimi, kan plazmasını pıhtılaştırır, bunun için bu testte kan plazması kullanılır. Kan plazması; içine pıhtılaşmayı önleyen madde (okzalot, heparin) eklenerek kanın santrifüjlenmesi sonucu elde edilir.

Görsel 11.14'te 3. ve 4. tüpler pozitif olarak kabul edilir.



Görsel 11.14: Koagülaz testinde pıhtı oluşumu

11.3.2. Aglütinasyon Testi

Kültürlerde, bir bakterinin *Salmonella* veya *Shigella* türlerinden biri olup olmadığına karar verilmesi için lam aglütinasyonu yapılması gerekir. Ayrıca, *Escherichia coli*'nin alt türleri de yalnız lam aglütinasyonu yapılarak tespit edilir. Lam aglütinasyonu kolay ve hızlı sonuç veren serolojik doğrulama testidir. Pozitif çıkan serumların laboratuvar şartlarında miktarının tespiti için tüp aglütinasyon testi uygulanır. Tüp aglütinasyon testinde antikor varlığı saptanarak hastalık tanısı konulabilir. Hayvanların bağışıklık durumu bu testle saptanabilir.

11.3.3. Jelatin Hidroliz Testi

Jelatin, proteindir ve kollajenin su ve asit içinde kaynatılarak hidrolizi ile elde edilir. Bu test, mikroorganizmaların jelatini hidrolize eden jelatinaz enzim varlığını ortaya koymak amacıyla yapılır. Bakterilerin tanımlanmasında önemli bir yeri vardır. Jelatin büyük molekül olduğu için bakterinin hücre duvarından geçemez. Bu nedenle daha küçük moleküllere jelatinaz enzimi yardımıyla parçalanır. Yüksek ısıda uzun süre bulunan jelatin kısmen hidrolize olur ve katılaşma özelliğini kaybeder.

58. UYGULAMA

PIHTI OLUŞUMUNA BAĞLI BİYOKİMYASAL TESTLER

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak pıhtı oluşumuna bağlı biyokimyasal testler çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Pıhtı oluşumuna bağlı çok sayıda test bulunmaktadır. Bu testlerden bazılarının işlem basamakları aşağıda verilmiştir. Laboratuvar imkânlarına göre birini veya birkaçını uygulayınız.

TÜPTE KOAGÜLAZ TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç

İnkübatör, öze, pipet, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bunzen bek, cam yazar kalem, kan plazması, saf kültür.

İşlem Basamakları

1. İki tane test tüpüne aseptik koşullarda 0,5 mL kan plazması aktarınız.
 - Plazmalar kuru formda üretilebilmektedir. Genel olarak 1/5 veya 1/10 oranında sulandırılarak kullanılmalıdır.
2. Birinci tüpe Stafilokok şüphesi olan bakteri kültüründen, ikinci tüpe koagülaz sonucu negatif olduğu bilinen bakteri kültüründen aseptik koşullarda aktarınız.
 - Yatık agarda ise kültür öze ile, sıvı kültürde ise steril pipetle 0,1 mL aktarılmalıdır.
 - Test edilen kültürün 18-24 saatlik kültür olmasına özen gösterilmelidir.
3. Tüpleri ayrı ayrı öze ile karıştırınız.
4. Tüplerin ağzını parafilmle veya pamukla kaplayınız.
5. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakınız.
6. Pıhtılaşma olup olmadığına bakılarak değerlendirme yapınız (Görsel 11.15).
 - Pıhtılaşma görülmezse inkübasyona devam edilir. 6. ve 24. saatte kontroller tekrarlanır.



Görsel 11.15: Tüpte koagülaz

LAMDA KOAGÜLAZ TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç

İnkübatör, öze, pipet, damlalık, bunzen bek, lam, cam yazar kalem, kan plazması, saf kültür.

İşlem Basamakları

1. Temiz bir lamı, cam yazar kalemle ikiye ayırınız.
2. Her bölgenin ortasına saf su damlatınız.
3. Birinci bölgedeki damlanın yanına incelenen kültürden öze ile aktarma yapınız.
4. Kültür ile suyu homojen hale gelinceye kadar öze ile karıştırınız.
5. Lamın ikinci bölgesinde negatif olduğu bilinen bakteri kültürü ile aynı işlemleri yapınız.

6. Birinci ve ikinci bölgedeki süspansiyonlara kan plazmasından birer damla aktarınız ve ayrı özelerle karıştırınız.
7. Lamı 5-10 sn. sağa-sola ve aşağı-yukarı eğerek hareket ettiriniz.
8. Pıhtılaşma olup olmadığına göre değerlendirme yapınız (Görsel 11.16).

- Lamın birinci bölgesinde partiküllerin oluşması sonucun pozitif olduğunu gösterir.
- Lamın koyu bir zeminde incelenmesi daha kolay gözlem yapılmasını sağlar.



Görsel 11.16: Lamda koagülaz

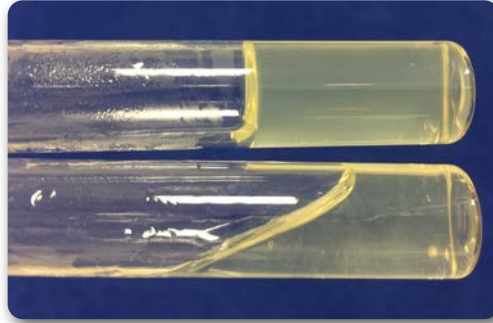
JELATİN HİDROLİZ TESTİ

Kullanılacak Araç Gereç

İnkübatör, öze, pipet, damlalık, tüp standı, deney tüpü, bek, cam yazar kalem, jelatinli nutrient broth besiyeri, saf kültür.

İşlem Basamakları

1. İçerisinde jelatinli nutrient broth besiyeri bulunan deney tüpünü alınız.
 - Besiyeri %10-15 jelatin içerecek şekilde tekniğine uygun olarak hazırlanmış olmalıdır.
2. İncelenecek kültürden besiyerine saplama yöntemine göre ekim yapınız.
3. Ekim yapılmamış bir besiyerini şahit olarak kullanınız.
4. 20-25 °C'de 10-30 gün süreyle inkübasyona bırakınız.
5. Tüplerde sıvılaşma olup olmadığını her gün kontrol ediniz.
6. Süre sonunda şahit tüp katılığını korurken ekim yapılan tüp sıvılaşırsa sonuç pozitif olarak değerlendirilir.



Görsel 11.17: Jelatin hidroliz test sonucu

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Besiyerleri veya plazma hazırladı.				
2	Besiyeri veya plazma aktarma işlemi yaptı.				
3	Ekim işlemlerini tekniğine uygun biçimde yaptı.				
4	İnkübasyon işlemlerini yaptı.				
5	Sonuçların değerlendirmesini yaptı.				
TOPLAM PUAN					



A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. Biyokimyasal testlerde sonuçların güvenilir olması için taze ve kullanılmalıdır.
2. Bazı bakteriler besiyerindeki triptofanı kullanarak.....oluşturur.
3. Katalaz testinde bakteri kültürüne damlatıldığında oksijen açığa çıkarsa sonuç pozitifdir.
4. Karbonhidratların mikroorganizmalar tarafından oksijensiz ortamda parçalanması olayına denir.
5. Koagülaz, fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmada.....oluşturur.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevabını işaretleyiniz.

6. Biyokimyasal testlerle ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi **yanlıştır**?
 A) Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılır.
 B) Mikroorganizmaların enzim oluşturma yeteneğini belirler.
 C) Mikroorganizmaların besin maddelerini kullanıp kullanmadığını ortaya koyar.
 D) Mikroorganizmaların koloni sayısını artırmak amacıyla yapılır.
 E) Mikroorganizmaların bazı maddeleri fermente edip etmediğini anlamak için yapılır.
7. Aşağıdakilerden hangisi IMViC testinde kullanılan testlerden **değildir**?
 A) Metil kırmızısı testi
 B) Katalaz testi
 C) Sitrat testi
 D) İndol testi
 E) Voges-proskauer testi
8. Aşağıdaki testlerden hangisi stafilokokları streptokoklardan ayırt etmek amacıyla yapılır?
 A) Katalaz testi
 B) Koagülaz testi
 C) Karbonhidrat fermantasyon testi
 D) Aglütinasyon testi
 E) Eijkman testi
9. Aşağıdakilerden hangisi gaz veya hava kabarcığı oluşumuna bağlı biyokimyasal testlerdendir?
 A) Voges-proskauer testi
 B) Eijkman testi
 C) Aglütinasyon testi
 D) TSI testi
 E) Üreaz testi
10. Aşağıdakilerden hangisi karbonhidrat fermantasyon testinin özelliklerinden **değildir**?
 A) Besiyerinde glikozun parçalanması indikatör renginin değişmesiyle anlaşılır.
 B) Sıvı besiyerinde gaz oluşumu durham tüpünde hava kabarcığı birikmesiyle anlaşılır.
 C) Testte sıvı ve katı besiyerleri kullanılabilir.
 D) Jelatini hidroliz eden jelatinaz enzim varlığını anlamak için yapılır.
 E) Agarda gaz kabarcığı ya da çatlakları varsa aerobik mikroorganizmaların varlığını gösterir.





11. Yandaki şekle göre değerlendirme yapıldığında TSI agar testi pozitif olan bakteri aşağıdakilerden hangisidir?

- A) *Escherichia coli*
- B) *Shigella*
- C) *Enterobacter aerogenes*
- D) *Klebsiella*
- E) *Salmonella*

12. Aşağıdakilerden hangisi aglütinasyon testi için doğrudur?

- A) *Salmonella* ve *Shigella* türlerinin tanımlanmasında kullanılır.
- B) Patojen stafilokokları ayırt etmek için kullanılır.
- C) Plazmanın pıhtılaşma durumuna göre değerlendirilir.
- D) Ortamda asit oluşumu olup olmadığı belirlenir.
- E) Bu testte değerlendirme renk değişimine göre yapılır.

C) Aşağıdaki soruları cevaplayınız.

13. Ekim yapılırken iğne öze kullanılmasının sebebi nedir?

14. IMViC testi genellikle hangi amaçla kullanılır?

12.

ÖĞRENME BİRİMİ



ANTİMİKROBİYAL MADDE TESTLERİ

TEMEL KAVRAMLAR

Antibiyogram
Antimikrobiyal madde
Zon çapı
Antibiyotik
Duyarlılık
MİK değeri
Direnc
Antimikrobiyal disk

KONULAR

- 12.1. DİSK DİFÜZYON (ANTİBİYOGRAM) TESTİ
- 12.2. TÜP DİLÜSYON (ETKİNLİK) TESTİ

NELER ÖĞRENECEĞİZ?

- Tekniğine uygun disk difüzyon (antibiyogram) testi yapmayı,
- Tekniğine uygun tüp dilüsyon (etkinlik) testi yapmayı öğreneceğiz.

BİRLİKTE DÜŞÜNELİM

1. Antibiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı için önemi nedir?
2. İnsanlarda ve hayvanlarda antibiyotik kullanımının yan etkileri nelerdir?
3. Hasta olduğumuzda ilaçlarımızı belirlenen saat aralıklarını takip ederek düzenli almamızın nedenleri nelerdir?
4. Günlük hayatta dezenfektanları çok fazla kullanmanın ne gibi etkileri olabilir?



12.1. DİSK DİFÜZYON (ANTİBİYOGRAM) TESTİ

Mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen veya öldürücü etki gösteren maddelere **antimikrobiyal maddeler** denir. Bunlar; antibiyotikler, antiseptikler, dezenfektanlar, gıda koruyucu katkı maddeleridir. Bakteri, mantar gibi mikroorganizmalar tarafından doğal olarak sentezlenen veya sentetik olarak hazırlanan mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen veya öldüren maddelere **antibiyotik** denir. Örneğin *Penicillium notatum* kültüründen elde edilen metabolik ürünler, başka birçok mikroorganizma türünün gelişmesini engeller veya öldürücü etki gösterebilir.

Hastalıkların önlenmesi için patojen (hastalık yapıcı) mikroorganizmaların üremelerinin engellenmesi veya öldürülmesi gerekir. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotikler kullanılır ancak canlılarda bazı olumsuz etkilere de (yan etki) sebep olabilmektedir. Bunun için antibiyotiklerin en düşük miktarda en etkili düzeyde kullanılması önemlidir.

Enfeksiyon teşhisi yapılmış olsa bile hastalığa sebep olan mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi gerekir. Mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı çok farklı şekillerde duyarlılık gösterirler (Görsel 12.1). Tedavi için kullanılan antimikrobiyal ilaç; sadece hastalığa yönelik değil, mikroorganizmaların duyarlılığına göre de seçilir. Antibiyotiklerin etkinliğinin belirlenmesi için iki kritere dikkat edilir. Bunlardan biri minimal inhibitör konsantrasyon (MİK veya MİC), diğeri ise minimal letal konsantrasyondur (MLK veya MLC). Antibiyotiğin mikroorganizmanın üremesine engel olduğu en düşük yoğunluğa **MİK değeri** denir. Antibiyotiğin mikroorganizmayı öldürdüğü en düşük yoğunluğa ise **MLK değeri** denir.



Görsel 12.1: Antibiyogram test örneği

Antibiyotiklerin incelenen mikroorganizma türüne karşı etkinliğini saptamak ve en etkili antibiyotiğin belirlenmesi amacıyla uygulanan testlere **antimikrobiyal duyarlılık testi** veya **antibiyogram testi** denir. Laboratuvarlarda bu amaçla; disk difüzyon testi, dilüsyon testleri, E-test yöntemi ve antimikrobik ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması gibi yöntemler kullanılabilir. En yaygın kullanılanı, disk difüzyon tekniğidir.

Disk difüzyon yöntemi belirli patojen mikroorganizmaların duyarlılık testi için kullanılır. Örneğin *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Streptokok* türleri gibi. Laboratuvarlarda uygulanması basit ve ucuz olmasından dolayı disk difüzyon tekniği tercih edilir. Petri kutusundaki besiyerine, uygun şekilde yerleştirilen disklerin içeriğindeki maddenin besiyerine yayılması ve bu alanda mikroorganizmanın gelişip gelişmediğinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır.

Bunları Biliyor musunuz?

Difüzyon yöntemi; disk difüzyon ve delik agar difüzyon yöntemi olarak iki şekilde uygulanabilir. Delik (kuyucuk) agar difüzyon yönteminin işlem basamakları, disk difüzyon yöntemi ile aynıdır. Farkı ise kağıt disk yerine agar yüzeyine uygun aralıklarla belli sayıda delik (kuyucuklar) açılması ve içine antimikrobiyal çözeltilerin konulmasıdır.

12.1.1. Antibiyotiklerin Aktivitesi

Antibiyotikler; mikroorganizmalarda hücre duvarı, sitoplazmik zar, protein ve nükleik asit sentezlerine engel olarak yapılarını bozar. Böylece antibiyotikler, mikroorganizmaların üremesini durdurur veya mikroorganizmaları öldürür. Antibiyotiklere örnek olarak; sefazolin, amoksisilin oral, ofloksasin, vankomisin, klindamisin, kolistin, daptomisin, penisilin, tetrasilin, oksasilin verilebilir. Görsel 12.2’de antibiyotik emdirilmiş antimikrobiyal diskler gösterilmiştir.



Görsel 12.2: Antimikrobiyal diskler

Antibiyotiklerde Aranacak Özellikler

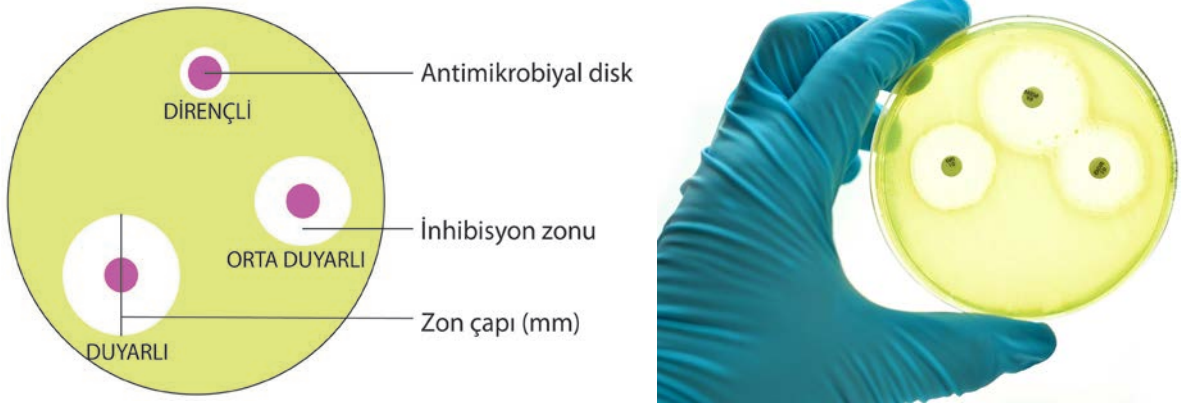
- Az yoğunlukta bile mikroorganizmaya etki etmeli.
- Toksin etkileri olmamalı.
- Birçok bakteri türüne etki etmeli.
- Organizmada uzun süre metabolize olmadan kalmalı.
- Başka ilaçlarla kombine edildiğinde etkinliği artmalı.
- Raf ömrü uzun olmalı.

Antibiyotiklerin Aktivitesini Etkileyen Faktörler

- İlacın miktarı, uygulanma şekli ve süresidir.
- Enfeksiyon alanına ulaşma süresidir.
- Patojenin ilaca duyarlılığıdır.
- Hastalık etkeninin ilaca karşı dirençli olmamasıdır.

12.1.2. Antibiyogram Testinin Yapılışı

Öncelikle agarlı besiyerine mikroorganizma kültürününün aşılması yapılır. Sonrasında antibiyotik emdirilmiş antimikrobiyal diskler besiyerine yerleştirilir. Diskler, bir süre sonra agara doğru çözünüp yayılırken aşılana mikroorganizma da çoğalmaya başlar. İnkübasyon süresi sonunda disklerin etrafında üreme olmayan dairesel bir alan oluşur. Diskin çevresinde mikroorganizma gelişiminin gözlenmediği dairesel alana **inhibisyon zonu** denir. Mikroorganizma ilaca ne kadar duyarlı ise disklin etrafında oluşan dairesel alan da o kadar büyük olur (Görsel 12.3). Dairesel alanın çapı mm olarak ölçülür ve zon tablolarına göre değerlendirme yapılır. Değerlendirme sonunda incelenen mikroorganizmanın duyarlı, orta duyarlı veya dirençli olarak duyarlılık durumu belirlenir. Disk difüzyon yönteminde belirli miktarlarda antimikrobiyal madde emdirilmiş kağıt diskler kullanılır.



Görsel 12.3: Mikroorganizmaların duyarlılık durumu

12.1.2.1. Besiyerinin Hazırlanması

Genellikle Mueller-Hinton agar kullanılmaktadır. Güç üreyen mikroorganizmalar için (*Streptococcus pneumoniae* gibi) Mueller-Hinton Fastidious (MHA'ya at kanı ve 20 mg/L β -NAD eklenmiş) kullanılır. Besiyeri etiket bilgilerine uygun olarak hazırlanır. Petri kutusundaki kalınlığı 4 mm olmalıdır. Çünkü kalın besiyerinde antimikrobiyal madde iyi bir şekilde yayılmaz. Besiyeri yüzeyi kuru olmalı, çatlak ve yırtık olmamalıdır. Hazırlanan besiyerleri hemen kullanılmayacaksa buzdolabında 8-10 °C'de 7 gün saklanabilir ancak 7 günden daha uzun süre muhafaza edilecekse plastik torba içinde ağzı kapalı olarak 4-8 °C'de saklanması gerekir.

12.1.2.2. Örnek Alma ve Kültür Oluşturma

İncelenecek mikroorganizma uygun gereçlerle, ilgili bölgeden alınır. Örneğin ağız, burun mukozasından, yüzeylerden örnek alınacaksa eküvyon (swab); hayvanın derisinden alınacaksa lezyonlu bölgeyi kazımak için bistüri; iç organlardan alınacaksa bölgedeki sıvıyı almak için pastör pipeti kullanılır. Hastalık etkeni mikroorganizmanın, saflaştırılması için tek koloni düşürme tekniğiyle ekim yapılır.

12.1.2.3. İnokülümün Hazırlanması

Besiyerine aktarılan mikroorganizmaya **inokülüm** denir. Hastalık etmeni olarak izole edilen, 24 saatlik kültürden morfolojik yapıları benzer olan 3-5 adet koloni seçilir. Eküvyon veya öze yardımıyla 5 mL'lik sıvı besiyerine (serum fizyolojik, mueller hinton broth veya tryptone soya broth) aktarılır ve koloni süspansiyonu edilir. Eküvyon, tüpün dibine daldırılır ve kolonilerin besiyerine iyice karışması sağlanır. İki yöntemle göre hazırlanır. Bunlar; üretim ve direkt koloni süspansiyon yöntemidir.

Üretim Yöntemi: Tüm organizmalarda kullanılır. Hazırlanan süspansiyon 2-6 saat 35 °C'de inkübe edilir. İnkübe sonunda bulanıklığı standarta uygun mu diye kontrol edilir. Oluşan bulanıklık yeterli değilse inkübasyona devam edilir.

Direkt Koloni Süspansiyon Yöntemi: 24 saat inkübe edilmiş agarlı besiyerinde oluşan koloniler doğrudan kullanılır (Kanlı agar veya çikolata agar gibi seçici olmayan besiyeri kullanılır.). Alınan koloniyi süspansiyon etmek için serum fizyolojik veya uygun sıvı besiyeri kullanılabilir. İstenen bulanıklık inkübasyonla sağlanmaz. Direkt koloni aktarma (deriştirme) veya serum fizyolojik (seyreltme) ile bulanıklığı ayarlanır. Bu yöntem özellikle streptokoklar gibi güç üreten mikroorganizmalarda kullanılır.



Görsel 12.4: Koloni seçme



Görsel 12.5: İnokülüm süspansiyonu

12.1.2.4. İnokülümün Standardizasyonu

Hazırlanan süspansiyonun bulanıklılığı 0,5 McFarland bulanıklık standardına eş değer olarak ayarlanır. Her iki çözeltinin bulanıklığı denk olmalıdır. Süspansiyonun bulanıklığı fotometrik yöntem (türbidimetre) ile ayarlanabilir ya da gözlem yaparak test süspansiyonun bulanıklılığı, 0,5 McFarland bulanıklılığı ile karşılaştırılır. Doğru gözlem yapmak için test solüsyonu ve standardı, üzerinde siyah çizgiler olan beyaz bir kağıt üzerinde karşılaştırılır (Görsel 12.6). Karşılaştırma sonunda üretim yöntemine göre süspansiyon, 0,5 McFarland standardına göre açık renkli kalırsa, istenilen bulanıklık oluşuncaya kadar inkübasyona devam edilir. Direkt koloni süspansiyon yönteminde süspansiyon açık renk ise koloni eklenir. Her iki yöntemde de süspansiyon yoğun ise broth veya serum fizyolojik ile rengi açılarak ayarlanır.

12.1.2.5. 0,5 Mcfarland Bulanıklık Standardının Hazırlanması

0,05 mL %1.175'lik baryum klorid dihidrat ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ile 9,95 mL %1'lik hidroklorik asit H_2SO_4 karıştırılır. Karışımın yoğunluğu spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda absorbansı 0,08-0,13 arasında olacak şekilde ayarlanır. Tüplere 5-6 mL dağıtılıp kapakları sıkıca kapatılır. Buzdolabında muhafaza edilebilir. Kullanımdan önce vortekste karıştırılır. Ticari olarak hazır standartlar da vardır ancak kullanım öncesi absorbansları kontrol edilmelidir.

12.1.2.6. Ekim İşleminin Yapılması

Antibiyogram testinde ekim işlemi petri plağının tüm yüzeyine eşit olacak şekilde yapılmalıdır. Test edilecek mikroorganizma yeterli yoğunlukta ise sıvı kültür oluşturmaya gerek kalmadan direkt eküvyon ile ekim işlemi yapılır. Sıvı kültürden ekim yapılacaksa inokülüm iyice karıştırılır, eküvyon ya da öze inokülümüne daldırılır. Eküvyon kullanılıyorsa fazla sıvının akması için eküvyon tüpün iç çeperinde döndürülür. Fazla sıvının uzaklaştırılması çok fazla inokülüm aktarılmasına engel olmak adına önemlidir. Alınan kültürün, petrinin bir köşesinden başlanarak sık ve birbirine yakın zikzaklar çizilerek ekimi yapılır (Görsel 12.7). Bu işlem üç kez tekrarlanır ve kuruması beklenir. Her tekrarda petri 60° döndürülür. Ekim yapıldıktan sonra agar yüzeyine diskler 15 dk. içerisinde yerleştirilmelidir. Aksi takdirde mikroorganizmalar üremeye başlayıp zon ölçümlerinde hatalı sonuç çıkmasına sebep olur. Sıvı kültürden ekim, dökme yöntemi ile petri yüzeyini tamamen ıslatıp yüzeyi kuruduktan sonra fazla sıvının uzaklaştırılması ile de yapılabilir.



Görsel 12.6: 0,5 McFarland standardı (sağdaki tüp) ile süspansiyonun bulanıklık ayarlaması



Görsel 12.7: Agar yüzeyine ekim yapma

12.1.2.7. Antimikrobiyal Disklerin Yerleştirilmesi

Diskler agar yüzeyine aralarında 25-30 mm, petri kutusu kenarından 15 mm mesafede olacak şekilde yerleştirilir (Görsel 12.8). Zonların iç içe girmemesi için diskler petride sınırlı sayıda kullanılır. Disk sayısı test edilecek mikroorganizmaya ve petri kutusunun çapına göre değişmektedir. Genellikle 90 mm çapındaki petri için 6 adet; 150 mm çapındaki petri için 12 adet disk kullanılır.

Diskler: 6 mm çapında belli miktarlarda antimikrobiyal madde emdirilmiş yüksek kalitede Whatman kâğıdından oluşur.

Disk yerleştirme, pens veya disk dağıtıcı (Görsel 12.9) yardımı ile üzerine hafifçe bastırılarak yapılır. Yerleştirilen diskler yerinden oynatılmamalıdır. Çünkü disklere emdirilmiş olan antimikrobiyal maddeler hızlı bir şekilde agara nüfuz etmeye başlar. Kağıt diskler nem çekici madde ile birlikte ağzı sıkıca kapatılıp ışıktan korunmalıdır. Disk stokları -20 °C ile +8 °C'de saklanır ancak tercihen -20 °C'de dondurularak saklanmalıdır. Kullanım sırasında en önce eski diskler kullanılır ve açılmamış ambalajlı diskler kullanımdan 1-2 saat önce buzdolabından çıkarılmalıdır.



Görsel 12.8: Disklerin pens ile yerleştirilmesi



Görsel 12.9: Disk dağıtıcı

12.1.2.8. İnkübasyon İşlemi

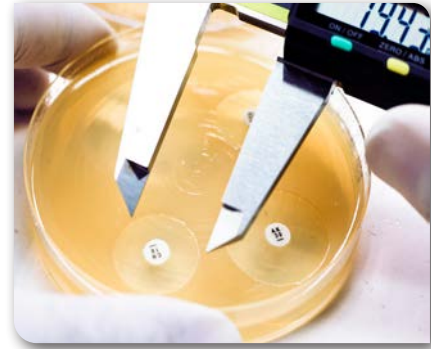
Diskler yerleştirildikten sonra 15 dk. içerisinde inkübasyon başlatılır. Petri 35 °C'de 16-18 saat inkübasyonda bırakılır. Sıcaklık, süre ve ortam şartları mikroorganizmanın türüne göre değişmektedir. Bazı mikroorganizmaların inkübasyon şartları Tablo 12.1'de gösterilmiştir. Anaerob mikroorganizmalar için oksijensiz ortamda inkübasyon sağlanır. Bunun için anaerobik kavanozda % 3-5 CO₂ ile zenginleştirilmiş atmosfer veya oksijensiz ortam sağlayarak mikroorganizma üretilir.

Tablo 12.1: Antimikrobiyal Madde Duyarlılık Testi İçin İnkübasyon Koşulları (www.eucast.org)

Mikroorganizma	İnkübasyon Koşulları
Enterobacteriaceae	35±1°C, normal atmosfer, 16-20 saat
Pseudomonas türleri	35±1°C, normal atmosfer, 16-20 saat
Staphylococcus türleri	35±1°C, normal atmosfer, 16-24 saat
Enterococcus türleri	35±1°C, normal atmosfer, 16-24 saat
Stenotrophomonas maltophilia	35±1°C, normal atmosfer, 16-20 saat
Acinetobacter türleri	35±1°C, normal atmosfer, 16-20 saat
Streptococcus grup A, B, C ve G	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
Streptococcus pneumoniae	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
Haemophilus türleri	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
Moraxella catarrhalis	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
Listeria monocytogenes	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat
Pasteurella multocida	35±1°C, %4-6 CO ₂ içeren atmosfer, 16-20 saat

12.1.2.9. Zonların Ölçümü ve Duyarlılığın Değerlendirilmesi

Ekim yapılan petriler inkübasyon sonrasında makroskobik olarak incelenir. Doğru ekim yapılmış ise petride oluşan koloniler tüm yüzeyi kaplar ve aralarda boşluk oluşmaz. Koloniler birleşmeyip tek tek oluşmuşsa inokülümün yoğunluğu az olmuş demektir ve test tekrarlanmalıdır. Disklerin etrafında düzgün dairesel alanların oluşması, üremenin petriye eşit şekilde dağıldığını gösterir. İnkübasyon sonunda antibiyotik disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapı milimetrik olarak ölçülür (Görsel 12.10). Bu işlem koyu renkli zeminde petri kutusu ters çevrilerek aydınlık bir ortamda yapılır. Zon çapı; cetvel, kumpas veya otomatik zon ölçer ile ölçülür. Üreme olup da zon belirgin değilse ölçüm yapılmaz. İnhibisyon zonu içinde üreyen koloniler var ise o koloniler pasaj yapılmalı ve tanımlanmalıdır. Gerek görülürse test tekrar edilmelidir.



Görsel 12.10: Zon çapı ölçümü

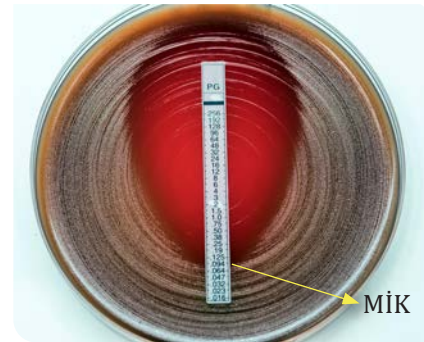
Mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlı veya dirençli olup olmadıklarını ya da antibiyotiklerin mikroorganizmalara olan etkisinin yorumlanması, değerlendirme tablolarına göre yapılır. Tablo 12.2' de bazı antibiyotikler ve sınır değerleri gösterilmiştir.

Tablo 12.2: Antibiyogram Değerlendirme Tablosu (www.eucast.org)

Antibiyotikler	S ≥	I	R <		
Piperasilin	20	20-17	17	Duyarlı (S)	İlacın standart dozda kullanıldığında başarılı bir şekilde tedavi edilebileceğini gösterir.
Seftriakson	25	25-22	22	Orta derecede duyarlı (I)	İlacın yüksek dozlarının kullanıldığında klinik olarak etkili olacağını gösterir.
Sefotaksim	20	20-17	17		
Aztreonam	26	26-21	21	Dirençli (R)	İlacın tedavide başarısız olduğunu gösterir.
Levofloksasin	23	23-19	19		
Ofloksasin	24	24-22	22		

12.1.3. E-test

Katı besiyerinde difüzyon yöntemi kullanılarak MİK değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlere **E-test** denilmektedir. E-test yönteminde test edilecek bakterinin süspansiyonu 0,5 McFarland bulanıklığına göre ayarlanır. Bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar yüzeyine eküvyonla tekniğine göre yayılır. Agar yüzeyine, gittikçe artan konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş E-test şeritleri yerleştirilir. Hazırlanan petri 35 °C'de 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakılır. Elips şeklindeki inhibisyon alanının şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta MİK değerini verir (Görsel 12.11).



Görsel 12.11: E-test ile MİK değeri belirleme

59. UYGULAMA

ANTİBİYOGRAM TESTİ

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak antibiyogram testi çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulamasonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

**Kullanılacak
Araç Gereç**

Serum fizyolojik, Mueller-Hinton agar, farklı antibiyotik diskleri, pens, antimikrobiyal disk dağıtıcısı, deney tüpü, baget, eküvyon, petri kutusu, pipet, öze, inkübatör, buzdolabı, vorteks tüp karıştırıcı, cetvel veya kumpas.

İşlem Basamakları

1. MHA (Müller Hinton Agar) besiyeri hazırlayınız.
 - Petrilere dökülen besiyeri kalınlığının 4 mm olmasına dikkat edilmelidir.
2. Test edilecek mikroorganizmayı seçiniz ve serum fizyolojikte süspansiyon ediniz (Görsel 12.12).
 - Aseptik tekniğe uygun ve temiz çalışılmalıdır.
 - Serum fizyolojikte homojen bulanıklık elde edecek şekilde süspansiyon edilmelidir.
 - Tüpü karıştırmak için vorteks kullanılmalıdır (Görsel 12.13).
3. 0,5 McFarland standardına göre sıvı kültürün bulanıklığını ayarlayınız.
 - Seyreltmek için serum fizyolojik, deriştirmek için öze veya eküvyonla koloni aktarılmalıdır.
4. Sıvı kültürden 0,1-0,2 mL kadar petri kutusundaki agarlı besiyerine aktarınız.
 - Kültür, eküvyon veya drigalski spatülü ile agarın tüm yüzeyine yayılmalıdır (Görsel 12.14).
 - Yayma veya eküvyonla sürme yöntemlerinden biri seçilerek yapılmalıdır.
 - Petri plağının tüm yüzeyine kültürden eşit şekilde ekim yapılmalıdır.
5. Agar yüzeyinin kuruması için bir süre bekletiniz.
 - Ağzı kapalı olarak beklenmelidir.
 - Bekleme sonunda agarda emilmeyen fazla kültür pipet yardımıyla alınmalıdır.
6. Farklı antibiyotik içeren diskleri, tekniğine uygun olarak agar yüzeyine yerleştiriniz.
7. 35 ± 1 °C'de 16-24 saat inkübasyona bırakınız.
8. Antibiyotik disklerin etrafında oluşan inhibisyon alanlarının çapını ölçünüz.
9. Antibiyotik direnç tablolarına göre sonucu değerlendiriniz.



Görsel 12.12: Bakteri süspansiyonu



Görsel 12.13: Vorteks ile karıştırma



Görsel 12.14: Ekim yapma

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	İnokülüm süspansiyonunu tekniğine uygun biçimde hazırladı.				
2	Besiyerine ekim işlemlerini yaptı.				
3	Diskleri tekniğine uygun olarak yerleştirdi.				
4	İnkübasyon işlemlerini yaptı.				
5	Zon ölçümünü yaptı ve değerlendirdi.				
TOPLAM PUAN					

12.2. TÜP DİLÜSYON (ETKİNLİK) TESTİ

Antimikrobiyal maddeler; temizlik, dezenfeksiyon, gıdaların korunması için katkı maddesi olarak kullanılırken enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde de antibiyotik ilaç olarak kullanılır.

Dezenfektanlar; hastane vb. kuruluşlarda, gıda işletmelerinde, hayvan üretim çiftliklerinde, restoranlarda, odaların atmosferinde ve su gibi cansız ortamlarda dezenfeksiyon amacıyla kullanılmaktadır. Antimikrobiyal maddelerin fazla ve kontrolsüz kullanımı; çevre, insan ve hayvan sağlığını, ekolojik dengeyi ve ekonomiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu sebeple optimum düzeyde en etkili şekilde kullanımları önemlidir. Optimum seviye; mikroorganizma üzerinde etkili olan en düşük dozu ifade eder.

Dezenfektanların etkinliği, dilüsyon yöntemiyle veya yüzeyde ne kadar canlı mikroorganizma kaldığının belirlenmesi ile test edilebilir. Buna göre yüzeylerden dezenfeksiyon öncesi ve sonrası tekniğine uygun olarak örnek alınır ve canlı mikroorganizmaların sayısının hangi durumda fazla olduğu belirlenir. Yüzeyden örnek alınırken nemli eküvyon, agar çubuğu veya selobant tekniği kullanılabilir.

MİK değeri; test edilecek mikroorganizmanın üremesini engelleyen en düşük antimikrobiyal madde yoğunluğunu ifade eder. Daha önce de bahsedilen MİK ve MLK değerleri tüp dilüsyon yöntemi ile belirlenmektedir. MİK değeri; besiyeri içeriği ve pH'ı, inkübasyon sıcaklık ve süresi, mikroorganizma türü gibi etkenlere göre değişmektedir. Sonuç yorumlanırken MİK değeri ile birlikte koşullar da belirtilmelidir.

12.2.1. Tüp Dilüsyon Testinin Yapılışı

Bu test, antimikrobiyal maddelerin etkinliklerini veya farklı mikroorganizmaların aynı antimikrobiyal maddeye olan duyarlılıklarını karşılaştırmada kullanılır. Tüp dilüsyon yöntemi; kademeli olarak seyreltilen antibiyotik çözeltisi ile test edilecek kültürün süspanse edilmesinden sonra besiyerinde üreme kontrolleri yapılarak MİK değerinin belirlenmesi esasına göre yapılır. Sıvı mikrodilüsyon ve makrodilüsyon olarak iki şekilde uygulanır. Temelde ikisinin de prensibi aynıdır. Makrodilüsyonda deney tüpleri, mikrodilüsyonda mikropate kuyucukları kullanılır.

12.2.1.1. Antimikrobiyal Madde Çözeltisi Hazırlama

Üretici firmalardan alınan toz halindeki antimikrobiyal maddeden stok çözelti hazırlanır veya sıvı stok çözelti hazır olarak temin edilir. Hazır çözeltilerde konsantrasyon ayarlanır. Antimikrobiyal maddelerin konsantrasyonu genelde 1000 µg/mL olacak şekilde hazırlanır ancak test edilecek antibiyotiğin konsantrasyonunun 10 katı şeklinde de hazırlanabilir. Örneğin konsantrasyon 128 µg/mL ile başlayacaksa stok çözelti 1280 µg/mL olarak hazırlanmalıdır. Firmanın etiket bilgileri doğrultusunda hareket edilmelidir. Antimikrobiyal madde olarak antibiyotik kullanılacaksa steril su veya uygun çözücü ile çözündürülüp konsantrasyonu ayarlanır. Sterilize edilmezler ancak istenirse membran filtrasyondan geçirilebilir. Hazırlanan çözelti cam veya polietilen kaplarda -60 °C ile -20 °C arasında dondurularak saklanır.

Hazır dezenfektanlar da antimikrobiyal madde olarak kullanılabilir. Antibiyotiklerde bozulma olup olmadığı kalite kontrol kültürleri ile duyarlılık testi yapılarak anlaşılabılır. Stok antibiyotik çözelti hazırlanırken gerekli miktar antibiyotik üzerinde yazan potense (% veya µg/mg) göre aşağıdaki formülle hesaplanır.



$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim(mL)} \times \text{Konsantrasyon}(\mu\text{g/mL})}{\text{Potens}(\mu\text{g/mg})}$$

Ağırlık: Tartılması gereken toz miktarı

Konsantrasyon: Çözelti konsantrasyonu

Hacim: Çözücü miktarı

Potens: İlacın gücü (etkili olduğu konsantrasyon)

ÖRNEK 1



Potensi %80 olan streptomisin antibiyotiğinin çözücü miktarı 20 mL ve stok çözelti konsantrasyonu 5120 $\mu\text{g/mL}$ olarak hazırlanmak isteniyor ise kaç gram antibiyotik tartılmalıdır?

Cevap:

Potens = %80 (100 mg'de 80 mg, 1 mg'de 0,8 mg=800 μg ; potens 800 $\mu\text{g/mg}$)

V= 20 mL

Konsantrasyon= 5120 $\mu\text{g/mL}$

Tartılması gereken antibiyotik miktarı=?

Ağırlık= (20x5120)/800=128 mg=0,128 g antibiyotik tartılır, 20 mL saf su veya uygun çözücü ile çözündürülür.

ÖRNEK 2



Tüp dilüsyon için konsantrasyonu 5120 $\mu\text{g/mL}$ olan stok çözeltiden yeni 100 mL'lik konsantrasyonu 512 $\mu\text{g/mL}$ olan başlangıç çözeltisi nasıl hazırlanır?

Cevap:

$C_1.V_1=C_2.V_2 \rightarrow 5120.V_1=512.100 \rightarrow V_1=10 \text{ mL}$ (Stok çözeltiden 10 mL alınır ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanır. Böylece konsantrasyonu 512 $\mu\text{g/mL}$ olan yeni çözelti hazırlanmış olur.)

12.2.1.2. Tüp Dilüsyon İçin Besiyerinin Hazırlanması

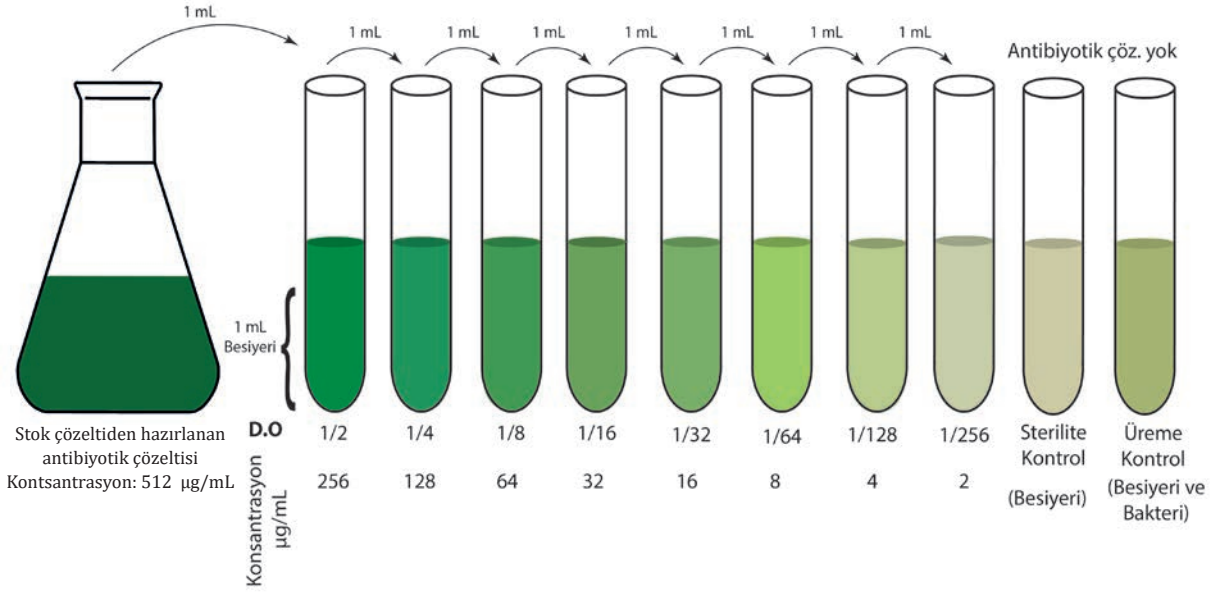
Bu yöntemde Mueller Hinton broth besiyeri kullanılır. MHB duyarlılık testlerinde tekrar edilebilirliği yüksek bir besiyeridir. Patojen bakterilerin üremesi için avantajlı bir ortamdır. Üremeyi engelleyen inhibitörleri düşük miktardadır. Duyarlılık testlerinde kullanılan MHB besiyeri katyon ayarlı olmalıdır. Katyon ayarlı; besiyerinin istenen oranda kalsiyum ve magnezyum içermesidir. Ayarı yapılmış hazır besiyerleri de mevcuttur. Besiyerinde kalsiyum; 20-25 mg/L, magnezyum; 10-12,5 mg/L oranlarında olmalıdır. Hazırlanan besiyerinden test tüplerine birer mL olacak şekilde analize hazırlanır.

12.2.1.3. Katlı Dilüsyon Hazırlama

Etkinliği test edilecek olan antibiyotik veya dezenfektanın sıvı besiyerinde Görsel 12.15'de gösterildiği gibi giderek azalan şekilde iki katlı seyreltmeleri yapılır. Öncelikle her tüpe birer mL besiyeri dağıtılır. Daha sonra birer mL antibiyotik çözeltisi katlı dilüsyon serisi şeklinde aktarılır.



Testte antibiyotik çözeltisi içermeyen bir üreme kontrol ve bir de bakteri inokülasyonu yapılmayan sterilite kontrol tüpü hazırlanmalıdır. Analizin daha duyarlı olması ve kesin sonuç vermesi için hazırlanan seri dilüsyonlar artırılabilir.



Görsel 12.15: Dilüsyon serisi hazırlama

12.2.1.4. İnokülüm Hazırlanması

İnokülüm disk difüzyon yönteminde anlatıldığı gibi üretme yöntemine veya doğrudan koloni süspansiyonuna göre hazırlanır. 0,5 McFarland bulanıklılık standardına göre ayarlanır. İnokülüm hazırlandıktan 15 dk. içinde sıvı besiyeri veya serum fizyolojik ile dilüsyon yöntemine göre sulandırılmalıdır. Sulandırma sonrası inkübasyona bırakılır.

12.2.1.5. Bakteri İnokülasyonu ve İnkübasyonu

Yapılan testte iki tane tüp kontrol tüpü olarak hazırlanır. Besiyerine bakteri inoküle edilmiş tüpe **üreme kontrol tüpü**; sadece besiyeri olan tüpe **sterilite kontrol tüpü** denir. İçeriğinde 1'er mL besiyeri (KAMHB) bulunan tüpler hazırlanır. Hazırlanan inokülüm 1/100 oranında seyreltilir ve tüplere dağıtılır. İki katlı seyreltilmiş şekilde antimikrobiyal madde bulunan tüpler de besiyerine eklenir ve tüplerin inkübasyonu sağlanır. İnkübasyon 35 °C'de 16-20 saatte yapılmalıdır ancak stafilokok ve enterokoklarda oksasilin ve vankomisin maddelerinin test edilmesi için inkübasyon süresi 24 saattir.

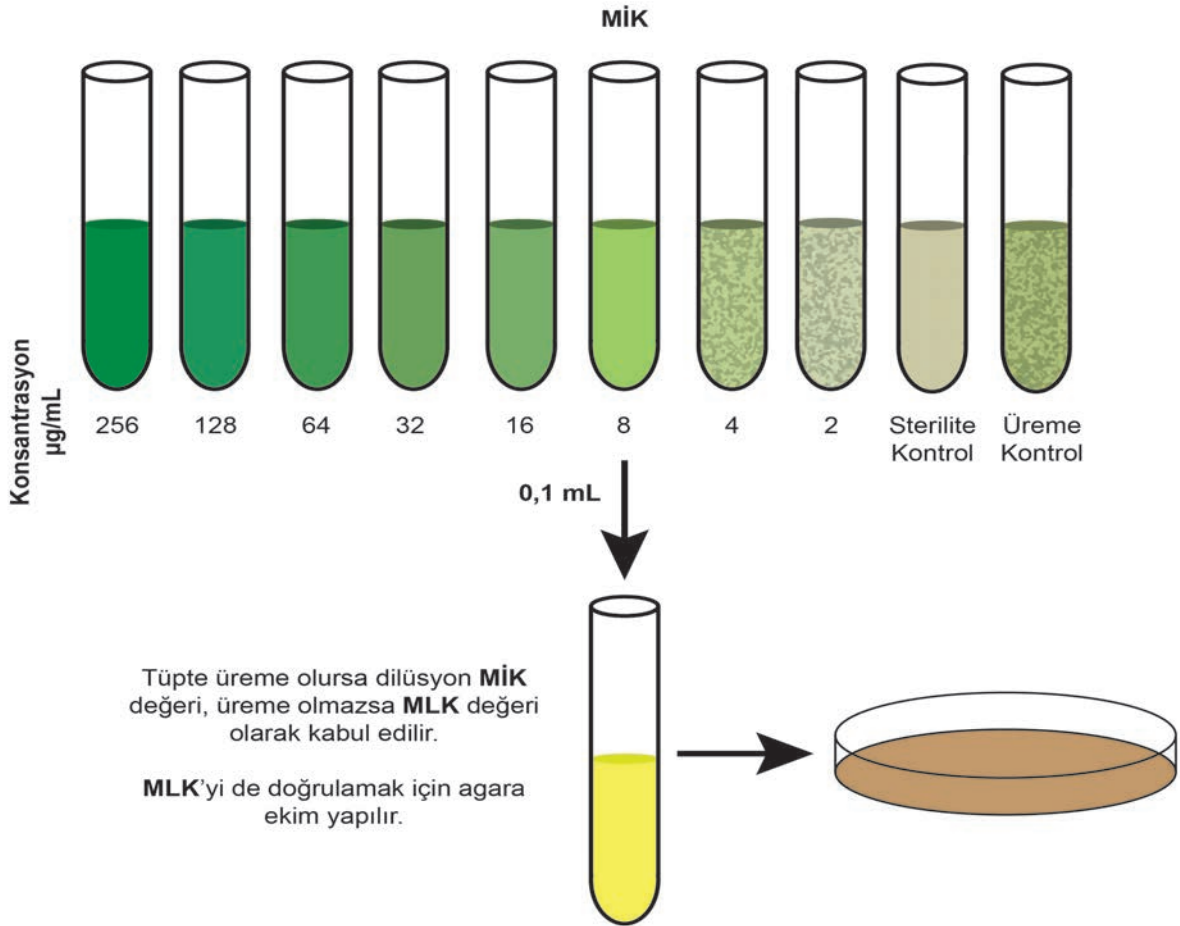
12.2.1.6. MİK ve MLK Değerinin Belirlenmesi

İnkübasyon sonunda tüplerde üreme olup olmadığı kontrol edilir. Besiyerinde bulanıklık oluşumu üreme olduğunu gösterir. Üreme takibi; kontrol tüp baz alınarak ya gözlem ya da spektrofotometre ile ölçüm şeklinde yapılır. Üreme olmayan en düşük antimikrobiyal madde içeren tüp seçilir ve o tüp MİK değeri (minimal inhibitör konsantrasyonu) olarak kabul edilir.



İleri bir test için; MİK değeri olarak belirlenen tüpten 0,1 mL alınır ve içinde 10 mL sıvı besiyeri olan tüpe ekim yapılır, sonra inkübasyonu sağlanır. Tüpte üreme olursa MİK değeri adını korur ancak tüpte üreme olmaz ise MLK (minimal letal konsantrasyon) değeri olarak adlandırılır. Tüpte üreme olmaması durumunda o tüpten petri kutusunda hazırlanmış agarlı besiyerine tekrar ekim yapılır ve inkübasyonu sağlanır. Agarlı besiyerinde üreme olmaması durumunda sonuç doğrulanmış olur.

Görsel 12.16'da MİK ve MLK değerinin belirlenmesi gösterilmiştir.



Görsel 12.16: MİK ve MLK değerini belirleme

NOT ALINIZ



.....

.....

.....

.....



60. UYGULAMA

TÜP DİLÜSYON TEKNİĞİ İLE DEZENFEKTAN VE ANTİBİYOTİKLERDE ETKİNLİK TESTİ

Yönerge: Aşağıdaki işlem basamaklarını dikkate alarak tüp dilüsyon tekniği ile dezenfektan ve antibiyotiklerden etkinlik testi çalışmasını yapmanız beklenmektedir. Çalışmanız, uygulama sonundaki ölçütlere göre değerlendirilecektir.

Kullanılacak Araç Gereç

Serum fizyolojik, katyon ayarlı Mueller-Hinton broth, dezenfektan veya antibiyotik çözeltisi, spatül, erlen, balon, bunzen bek, deney tüpü, baget, eküvyon, petri kutusu, pipet, öze, spektrofotometre, türbidimetre, inkübatör, otoklav, hassas terazi, buzdolabı, vorteks tüp karıştırıcı.

İşlem Basamakları

1. MHB içeren tüplerde farklı konsantrasyonlarda antibiyotik çözeltisi hazırlayınız.
 - Dilüsyonlar iki katlı (256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL...) olacak şekilde hazırlanır. Sıvı besiyeri olan tüp ile inokülüm olan tüp kontrol tüpü olarak belirlenmeli ve içine antibiyotik çözeltisi eklenmemelidir.
 - Besiyeri üzerine antibiyotik aktarıldığında tüplerin son hacmi aynı olmalıdır.
2. Test edilecek mikroorganizmayı seçiniz ve serum fizyolojikte süspanse ediniz.
 - Aseptik tekniğe uygun çalışılmalıdır.
 - Mikroorganizma seçici olmayan katı besiyerinde 24 saatlik üreme sonrası izole edilen kolonilerden öze ile alınmalıdır.
 - Serum fizyolojikte homojen bulanıklık elde edecek şekilde süspanse edilmelidir.
 - Tüpü karıştırmak için vorteks kullanılmalıdır.
3. 0,5 McFarland standardına göre sıvı kültürün (inokülüm süspansiyonu) bulanıklığını ayarlayınız.
 - Fotometrik olarak veya gözlem yaparak bulanıklık ayarlanmalıdır.
 - Seyreltmek için serum fizyolojik, deriştirmek için eküvyonla koloni aktarılmalıdır.
4. Sıvı kültürden kontrol tüpü de dahil her tüpe eşit miktarda ekleyiniz ve karıştırınız.
 - Aseptik koşullarda çalışılmalıdır.
 - Sıvı kültürden gelişme özelliğine göre 0,1 mL, 1 mL veya antibiyotik çözeltisi ile aynı hacimde olacak şekilde eklemeler yapılabilir.
5. Tüpleri mikroorganizmaya uygun sıcaklık ve sürede genelde 35 °C'de 16-24 saat inkübasyona bırakınız.
6. İnkübasyon sonunda üreme olup olmadığını kontrol ediniz.
7. Üreme olmayan en düşük konsantrasyonlu antibiyotik çözelti içeren tüpü MİK değeri olarak belirleyiniz.
8. MİK değeri olan tüpten 10 mL sıvı besiyeri içeren başka bir tüpe 0,1 mL ekim yapınız ve inkübe ediniz.
 - Sonucu doğrulamak adına bu işlem yapılır.
9. Üreme olup olmadığını kontrol ediniz.
 - Üreme varsa bu tüp MİK değeri olarak belirlenirken üreme yoksa MLK değeri olarak belirlenir.

DEĞERLENDİRME ÖLÇÜTLERİ		Çok iyi (20)	İyi (15)	Orta (10)	Geliştirilebilir (5)
1	Besiyerini hazırladı ve tüplere eşit miktarlarda dağıttı.				
2	Antibiyotik çözeltisinden dilüsyon hazırladı.				
3	Sıvı kültür ekleme işlemlerini yaptı.				
4	MİK değerini belirledi.				
5	MLK değerini belirledi ve sonucu yorumladı.				
TOPLAM PUAN					



A) Aşağıdaki boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. İnhibisyon zon ölçümü genellikle.....ile yapılır.
2. Test edilecek bakteri süspansiyonun bulanıklığı.....çözeltisine göre ayarlanır.
3. Farklı konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş şeritlerle, katı besiyerinde yapılan testlere denir.
4. Agarlı besiyerine yerleştirilen diskin etrafında mikroorganizma üremesinin oluşmadığı dairesel alana.....denir.
5. Mikroorganizmaların üremesini engelleyen veya onlarda öldürücü etki gösteren maddelere denir.
6. Yüzeylerden örnek almada genellikle.....kullanılır.
7. Tüp dilüsyon yönteminde antimikrobiyal maddeler olarak seyreltilir.

B) Aşağıda verilen soruların doğru cevabını işaretleyiniz.

8. Aşağıdakilerden hangisi antibiyotiklerde istenen özelliklerden değildir?

- A) Başka ilaçla kombine kullanıldığında etkinliği artmalı
- B) Birçok bakteri türüne etki etmeli
- C) Yüksek konsantrasyonlarda etkili olabilmeli
- D) Raf ömrü uzun olmalı
- E) Toksik etkisi olmamalı

9. Aşağıdakilerden hangisi test edilecek mikroorganizmanın üremesini engelleyen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunu ifade eder?

- A) MAK B) MLK C) MCL D) MİK E) MEK

10. Antibiyogram testinde, antimikrobiyal disklerin yerleştirilmesiyle ilgili hangisi yanlıştır?

- A) Diskler agar yüzeyine aralarında 25-30 mm mesafe olacak şekilde yerleştirilmelidir.
- B) Diskler yerleştirilirken üzerine hafifçe bastırılmalıdır.
- C) Disklerin inokülümün yoğunluğuna göre sayısı artırılmalıdır.
- D) Diskler yerleştirildikten sonra yerinden oynatılmamalıdır.
- E) Diskler aseptik tekniğe uygun yerleştirilmelidir.

11. İnhibisyon zone ile ilgili ifadelerden hangisi doğrudur?

- A) İnhibisyon zone içinde koloni olmamalıdır.
- B) Diskler etrafında silik üremelerin olduğu zone ölçülür.
- C) İnhibisyon zone mikroskopta ölçülür.
- D) İnokülüm yoğunluğu arttıkça zone çapı büyür.
- E) Zonların belirgin olması üremenin az olduğunu gösterir.



12. Antibiyogram testinde kullanılacak besiyeri ile ilgili hangisi yanlıştır?

- A) Genellikle MHA kullanılır.
- B) Petri kutusundaki kalınlığı 4 mm olmalıdır.
- C) Yüzeyinde çatlak, yırtık olmamalıdır.
- D) Besiyeri hemen kullanılmayacaksa buzdolabında saklanmalıdır.
- E) Mikroorganizmanın iyi üremesi için üzerinde su damlacıkları olmalıdır.

13.

- I. Eküvyon veya öze ile ekim yapmadan önce fazla sıvının uzaklaştırılması gerekir.
- II. Ekim, birbirine paralel ve mesafe olacak şekilde çizilerek yapılır.
- III. Çizim yaparken üç kez tekrarlanır ve kuruması beklenir.
- IV. İnokülüm aktarılmasında fazla sıvı olmasına dikkat edilir.

Antibiyogram testinde ekim işlemi için yukarıdaki ifadelerden hangileri doğrudur?

- A) I ve II
- B) I, III, IV
- C) Yalnız I
- D) Yalnız IV
- E) I ve III

14. Aşağıdakilerden hangisi disk difüzyon testi yaparken kullanılacak antimikrobiyal disklerle ilgili doğru bir ifade değildir?

- A) Kullanım sırası dışında aydınlık yerde tutulmalıdır.
- B) Diskler nem çekici madde ile korunmalıdır.
- C) Diskler tercihen -20 °C'de muhafaza edilmelidir.
- D) Kullanım sırasında önce eski olanlar kullanılmalıdır.
- E) Diskler kullanımdan 1-2 saat önce buzdolabından çıkarılmalıdır.

15. Tüp dilüsyon yönteminde MİK değeri nasıl belirlenir?

- A) Antibiyotik çözelti konsantrasyonu en yüksek olan tüp ile
- B) Üremenin en fazla, antibiyotik çözelti konsantrasyonunun en az olduğu tüp ile
- C) Üremenin olmadığı en düşük antibiyotik çözelti konsantrasyonunun olduğu tüp ile
- D) Bulanıklığın olduğu ancak antibiyotik çözeltinin olmadığı tüp ile
- E) En az üremenin olduğu en düşük antibiyotik çözelti konsantrasyonunun olduğu tüp ile

KAYNAKÇA

ARDA, M. (2011). <i>Temel Mikrobiyoloji</i> . Ankara: Medisan Yayınevi, Yayın Serisi No: 46.
CEMEROĞLU, B. S. (2018). <i>Gıda Analizleri</i> . Ankara: Bizim Grup Basımevi.
ÇEKER, E., TÖMAN, U. (2019). <i>Mikroorganizma ve Hijyen Kavramlarına Yönelik Gelişimsel Bir Araştırma</i> . İhlara Eğitim Araştırmaları Dergisi, 4(1), 53-72.
ÇOTUK, A. (2003). <i>Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri</i> . Ankara: Nobel Yayınları.
DEMİRTÜRK, N. (2005). <i>Süzme ile Sterilizasyon Sağlanabilir mi? Süzgeç Çeşitleri Nelerdir? Etkinliği Nasıl Ölçülür? Hangi Amaçlarla Nasıl Kullanılırlar?</i> 4. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kongre Kitabı. DAS Yayınları.
<i>Dezenfeksiyon Antisepsi Sterilizasyon Rehberi</i> (2019). İstanbul:DAS Derneği Yayınları.
ERGİN, Ç. (Editör). (2020). <i>Antibiyotik Duyarlılık Testleri</i> . Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. İstanbul: Logos Yayıncılık.
ERTÜRK Ö., BAŞKAN C., KARAMAN Ü., KOLÖREN Z. (2019). <i>Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu</i> . Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık.
GENÇ, M., ETİ ASLAN, F. (2007). <i>Sterilizasyon Döngüsünde Vazgeçilmez Adımlardan Birisi; Paketleme</i> . 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi. Antalya: 5. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kongre Kitabı.
GÜNALP, A., AKYÖN YILMAZ, Y., PINAR, A., (2003). <i>Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı</i> . Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
GÜRGÜN, V., HAKMAN, A. K. (1990). <i>Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri</i> . Ankara: Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları.
HALKMAN, A. K. (2005). <i>Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları</i> . Ankara: Başak Yayınları.
HALKMAN, A. K. (Editör). (2019). <i>Gıda Mikrobiyolojisi</i> . Ankara: Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri.
KARADAĞ, A. (2005). <i>Otoklav ile Sterilizasyon</i> . 4. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kongre Kitabı. DAS Yayınları.
KARAHAN, A. G., CİCİOĞLU ARIDOĞAN, B., ÇAKMAKÇI, L. (2002). <i>Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu</i> . Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
KILIÇ, L. (Editör). (2015). <i>Temel Veteriner Mikrobiyoloji ve İmmunoloji</i> . Eskişehir: T.C. Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi Yayınları.
ÖNER, M. (2001). <i>Genel Mikrobiyoloji</i> . İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları.
ÖZBAYIR, T. (2009). <i>Malzemelere Göre Hazırlık Bakım, Paketleme, Konteynırlar ve Kullanımı, Transfer ve Depolama</i> . 6. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kongre Kitabı. DAS Yayınları.
ÖZÇELİK S. (1998). <i>Gıda Mikrobiyolojisi Uygulama Kılavuzu</i> . Isparta:Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
ÖZDEMİR S., SERTS. (2001). <i>Gıda Mikrobiyoloji Tatbikat Notları</i> . Erzurum: Atatürk Üniversitesi Yayınları.
ÖZYILMAZ, Ü. (2015). <i>Fitopatoloji Laboratuvarında Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Yöntemleri</i> . Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2015; 12(1) : 129 – 138.
PEKBAY, A. (2005). <i>Pastör Fırını ve Yakma ile Sterilizasyon</i> . 4. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kongre Kitabı. DAS Yayınları.
RAY, B., BHUNIA, A. (2016). <i>Temel Gıda Mikrobiyolojisi</i> . (Çeviren: D.Heperkan). Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık.
ŞAHİN İ. (1999). <i>Genel Mikrobiyoloji</i> . Bursa: Uludağ Üniversitesi Yayınları.
ŞAHİN İ., BAŞOĞLU, F. (2011). <i>Gıda Mikrobiyolojisi</i> . Bursa: Dora Yayınları.
T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, Mesleki ve Teknik Eğitim Genel Müdürlüğü, Laboratuvar Hizmetleri Alanı Çerçeve Öğretim Programı, Ankara (2020).
T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, Mesleki ve Teknik Eğitim Genel Müdürlüğü, Laboratuvar Hizmetleri Alanı, Mikrobiyolojik Analizler Ders Bilgi Formu. Ankara (2020).

TDK Sözlük. (2012). Ankara: TDK Yayınları.
TDK Yazım Kılavuzu. (2012). Ankara: TDK Yayınları.
TEMİZ, A. (2016). <i>Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri</i> . Ankara: Alp Ofset Matbaacılık.
TUNAIL, N. (2009). <i>Mikrobiyoloji</i> . Ankara: Pelin Ofset Tipo Matbaacılık.
TÜRKÖZ BAKIRCI, G., KAYAARDI, S. (2017). <i>Mikrobiyoloji Analiz Metotları</i> . İzmir: Sidas Medya.
ÜNLÜTÜRK, A., TURANTAŞ F. (2002). <i>Gıdaların Mikrobiyolojik Analizleri</i> . İzmir: META Basım Matbaacılık Hizmetleri.
ÜNLÜTÜRK, A., TURANTAŞ F. (2003). <i>Gıda Mikrobiyolojisi</i> . İzmir: META Basım Matbaacılık Hizmetleri.
YILMAZ, A. (2004). <i>Laboratuvarında Güvenli Çalışma</i> . Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.

GENEL AĞ KAYNAKÇASI

ÇOBAN, A. Y. MİK, Mikrodilüsyon ve Makrodilüsyon Hazırlanması ve Ekimi. https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf (Erişim Zamanı: 29.12.2020, 11.00).	
DEMİRPEK, U. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri. https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/128201112107-49.pdf (Erişim Zamanı: 20.01.2021, 09.00).	
TMMBO Kimya Mühendisleri Odası. Dezenfektanlar ve Dezenfektan Kullanımı Hakkında Bilgi Notu. https://www.kmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=5068&tipi=3&sube=0 (Erişim Zamanı: 26.10.2020, 13.00).	
İstanbul Üniversitesi Açık ve Uzaktan Eğitim Fakültesi Laborant ve Veteriner Sağlık Ön Lisans Programı, Temel Laboratuvar Uygulama ve Prensipleri Uygulama Kitabı. http://auzefkitap.istanbul.edu.tr/kitap/laborantveveterinersaglik_ao/tluprensipleri.pdf (Erişim Zamanı: 19.10.2020, 16.25)	
<i>Salmonella</i> Hakkında Bilgi https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/bulasici-hastaliklar/salmonella/salmonella-liste/salmonella.html (Erişim Zamanı: 19.01.2021, 19.20).	
T.C. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Biyosidal Ürün Analizleri ve Yetki Verilen Laboratuvarlar Hakkında Talimat. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/cevre-sagligi/haberler/Biyosidal_Urun_Analiz_Laboratuvarlarinin_Calisma_Usul_ve_Esaslari/_analiz.pdf (Erişim Zamanı: 20.10.2020, 19.50).	
https://acikders.ankara.edu.tr	http://depo.btu.edu.tr
https://avys.omu.edu.tr	https://www.das.org.tr
https://cdn.bartın.edu.tr	http://www.eucast.org
https://cdn.istanbul.edu.tr	http://www.mikrobiyoloji.org

Kaynakça APA sistemine göre düzenlenmiştir.

GÖRSEL KAYNAKÇASI

<http://kitap.eba.gov.tr/karekod/Kaynak.php?KOD=1664>



CEVAP ANAHTARI

1. ÖĞRENME BİRİMİ

1. mikroorganizma 2. mikoloji 3. ökaryotik 4. fakültatif 5. su 6. kamçı 7. maya
8. streptokok 9. kapsid 10. tomurcuklanma

										11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
										E	E	D	E	C	B	A	A	C	E

2. ÖĞRENME BİRİMİ

1. steril 2. paketlenme 3. ısı işlem 4. alevden geçirme 5. kuru ısı 6. otoklav 7. gama 8. UV
9. dezenfektan 10. filtrasyon 11. sporlar 12. tinalizasyon

										13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
										D	B	C	B	B	C	E	B	C	B

3. ÖĞRENME BİRİMİ

1. besiyeri 2. selektif besiyeri 3. dehidre besiyerleri 4. ısıtma 5. otoklav 6. asit (HCl)
7. kimyasal 8. soğuk 9. kontaminasyon 10. tampon maddeler

										11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
										D	A	D	B	D	A	D	B	B	C

4. ÖĞRENME BİRİMİ

1. vorteks 2. ¼ ringer çözeltisi 3. 1000 4. tampon

				5	6	7	8	9	10										
				C	D	E	D	C	E										

5. ÖĞRENME BİRİMİ

1. kültür 2. pasaj 3. hareketsiz, hareketli 4. saf kültür, karışık kültür 5. R, S, L, M

					6	7	8	9	10	11									
					A	C	C	C	E	E									

6. ÖĞRENME BİRİMİ

1. lamel 2. fiksasyon 3. bazik 4. pozitif 5. endospor 6. ısıtma 7. ARB 8. Kanada balsamı
9. asidik 10. EZN

										11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
										E	C	B	B	D	D	D	E	C	B

7. ÖĞRENME BİRİMİ

1. mikrometre 2. stereo 3. ksilol 4. şaryo 5. objektif mikrometre 6. bir 7. kamçı
8. pasif hareket 9. saf 10. diyoetri

11	12	13	14	15	16	A. Oküler B. Revolver C. Objektif D. Diyafram E. Şaryo													
D	B	C	A	A															

8. ÖĞRENME BİRİMİ

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
C	C	D	D	A	D														

9. ÖĞRENME BİRİMİ

1. Thoma lamı 2. mikroskop 3. objektif 4. streptokok 5. on (10) 6. %10'luk asetik asit
7. on bin (10.000) 8. renksiz 9. Howard 10. refraktometre

										11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
										D	D	E	C	D	C	E	C	E	C

10. ÖĞRENME BİRİMİ

1. patojen 2. intoksikasyon 3. indikatör 4. koliform 5. fekal 6. gıda güvenliği

						7	8	9	10	11	12	13	14						
						E	C	E	B	A	B	E	A						

11. ÖĞRENME BİRİMİ

1. saf kültür 2. indol 3. hidrojen peroksit 4. fermentasyon 5. pıhtı

					6	7	8	9	10	11	12								
					D	B	A	B	D	E	A								

12. ÖĞRENME BİRİMİ

1. kumpas 2. 0,5 McFarland 3. E-test 4. inhibisyon zonu 5. antimikrobiyal madde
6. eküvyon 7. kademeli

								8	9	10	11	12	13	14	15				
								C	D	C	A	E	E	A	C				

[illegible]

This image shows a full page of primary-ruled paper. It features numerous horizontal dotted lines spaced evenly apart, providing a guide for handwriting practice. The lines extend across the entire width of the page, leaving no margins or other markings.