

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

TIBBİ LABORATUVAR

**İNKÜBASYON
725TTT103**

Ankara, 2011

- Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
- Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.

PARA İLE SATILMAZ.

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR.....	ii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. AEROB MİKROORGANİZMALARIN İNKÜBASYONU.....	3
1.1. Mikroorganizmalarda Üremeyi Etkileyen Çevre Faktörleri.....	3
1.1.1. Fiziksel Faktörler.....	3
1.1.2. Kimyasal Faktörler	5
1.1.3. Biyolojik Faktörler.....	7
1.2. Mikroorganizmalarda Üreme ve Çoğalma	7
1.2.1. Mikroorganizmaların Üreme Hız ve Dönemleri.....	9
1.3. İnkübasyon	10
1.3.1. Etüvde İnkübasyon	11
1.3.2. Otomatik Kan Kültür Cihazında İnkübasyon	14
1.4. Mikroorganizmaların Besiyerinde Üremeleri.....	17
1.4.1. Mikroorganizmaların Sıvı Besiyerinde Üreme Özellikleri	17
1.4.2. Mikroorganizmaların Katı Besiyerinde Üreme Özellikleri	17
UYGULAMA FAALİYETİ.....	20
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	22
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	23
2. ANAEROB MİKROORGANİZMALARIN İNKÜBASYONU	23
2.1. Tüpteki Katı Besiyerinde Oksijensiz Ortam Oluşturulması	23
2.2. Besiyerinin Redüksiyon Şiddetinin Artırılması	24
2.3. Kimyasal Yöntemlerle Ortamdaki Oksijenin Giderilmesi	24
2.3.1. Kimyasal Anaerob Kavanoz / İnkübasyon Torbası	24
2.3.2. Burri –Wright Tüp Metodu	28
2.4. Mekanik Yöntemlerle Ortamdaki Oksijenin Giderilmesi	29
2.4.1. Anaerob Kavanoz Yöntemi	29
2.4.2. Mumlu Kavanoz Yöntemi.....	29
2.4.3. Karbondioksitli Etüv Yöntemi.....	30
2.5. Biyolojik Yöntemlerle Ortamdaki Oksijenin Giderilmesi.....	30
UYGULAMA FAALİYETİ.....	31
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	32
MODÜL DEĞERLENDİRME.....	33
CEVAP ANAHTARLARI.....	35
KAYNAKÇA	36

AÇIKLAMALAR

KOD	725TTT103
ALAN	Tıbbi Laboratuvar
DAL/MESLEK	Tıbbi Laboratuvar Teknisyeniği
MODÜLÜN ADI	İnkübasyon
MODÜLÜN TANIMI	Uygun besiyerine ekimi yapılmış aerob ve anaerob mikroorganizmaların inkübasyonlarını yapma becerilerinin kazandırıldığı öğretim materyalidir.
SÜRE	40/16
ÖN KOŞUL	Tıbbi Laboratuvar Güvenliği, Mikrobiyolojik Analiz Öncesi Hazırlık ve Sterilizasyon, Besiyeri Hazırlama, Mikrobiyolojik Örnek Alma, Sıvı Besiyerine Ekim ve Katı Besiyerine Ekim modüllerini almış olmak
YETERLİK	İnkübasyon yapmak
MODÜLÜN AMACI	Genel Amaç Ekim yapılmış besiyerlerinin inkübasyonlarını yapabileceksiniz. Amaçlar 1. Aerob mikroorganizmaların inkübasyonunu yapabileceksiniz. 2. Anaerob mikroorganizmaların inkübasyonunu yapabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Donanım: Etüv, karbondioksitli etüv, otomatik kan kültür cihazı, plak besiyeri, tüp içindeki besiyeri, kan kültür şişesi, desikatör / kapaklı kavanoz, mum, anaerob jar / anaerob torba, anaerobik indikatör (anaerotest), gas generating kit (anaerob veya mikroaerofilik), termometre, petri kutusu, beher, öze, pipet, pamuk tıkaç, tüp sporu, distile su, yayvan kap vb. Ortam: Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarı
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	Modülün içinde yer alan, her faaliyetten sonra verilen ölçme araçları ile kazandığınız bilgileri ölçerek kendi kendinizi değerlendireceksiniz. Öğretmen, modülün sonunda, ölçme aracı (test, çoktan seçmeli, doğru-yanlış, vb.) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığınız bilgi ve becerileri ölçerek sizi değerlendirecektir.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

İnkübasyon, mikrobiyolojik örnek alma, ekime hazırlama ve ekim sonrası kültür elde etme işlemlerinin son aşamasıdır. Mikroorganizmaların üreyebilmeleri için birbirinden farklı besin maddelerine; ısı, nem, oksijen, karbondioksit gibi çevresel faktörlere ihtiyaç vardır.

Kültürü yapılacak mikroorganizmaların bu özellikleri bilinmeli, üremelerini sağlayacak ihtiyaçlar inkübasyon süresince uygun şekilde sağlanmalıdır.

Bu modülde, elde edeceğiniz kazanımlarla ekimi yapılmış aerob ve anaerob mikroorganizmalar için uygun üreme ortamları hazırlayacak ve tekniğine uygun inkübasyon yapabileceksiniz.



ÖĞRENME FAALİYETİ-1

AMAÇ

Bu faaliyette, kazandığınız bilgilerle aerob mikroorganizmaların inkübasyonunu yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

Ev ortamında, mayalanmış sütün, yoğurt hâline gelinceye kadar hangi koşullar altında beklendiğini öğreniniz.

1. AEROB MİKROORGANİZMALARIN İNKÜBASYONU

İnkübasyon; besiyerine ekimi yapılmış mikroorganizmaları, üreyebilecekleri optimum sıcaklıkta, etüv ya da inkübatör adı verilen cihazlarda, belirli bir süre tutma işlemidir. Bu süre, mikroorganizmanın katı besiyerlerinde tipik koloni yapılarını oluşturmasına kadar geçen süre; sıvı besiyerinde ise mikroorganizmanın bulanıklık göstermesine kadar geçen süredir.

İnkübasyon, kültür elde etme işleminin son aşamasıdır. İnsanlarda hastalık yapan mikroorganizmaların besiyerlerinde üremelerini sağlamak için inkübasyon süresince gerekli olan ısı, nem, oksijen, karbondioksit vb. ihtiyaçlar karşılanır ve mikroorganizmaların kültürleri gerçekleştirilir.

1.1. Mikroorganizmalarda Üremeyi Etkileyen Çevre Faktörleri

Mikroorganizmaların üreyebileceği besiyerinin özellikleri ve buldukları ortamdaki fiziksel, kimyasal, biyolojik ve mekanik faktörler üremelerine etki eder.

1.1.1. Fiziksel Faktörler

Besiyerinde mikroorganizmaların üremesini etkileyen ısı, osmotik basınç, nem ve kuruluğun etkisi gibi fiziksel faktörler aşağıda belirtilmiştir.

1.1.1.1. Isının Etkisi

Mikroorganizmalar, kendi türlerine özgü farklı ısı derecelerinde ürer. Minimum ve maksimum sınırlar arasında en iyi üreme gösterdikleri ısı derecesine **optimal ısı (uygun ısı)** denir. Mikroorganizmaların üreme ısısı, minimal ısı derecelerinin altında ise hücre içindeki su kristalleşir ve hücre içi yoğunluk artar, üreme durur. Üremelerinin durmasına rağmen mikroorganizmalar, canlılıklarını muhafaza eder. Maksimum üreme ısısının üzerinde üreyemezler. Isının artışına bağlı olarak enzimlerinin denatüre olması nedeniyle ölümler de başlar.

Patojen mikroorganizmaların optimum üreme ısı dereceleri, yaşamaya uyum sağladıkları konakçının vücut ısısıyla uyum içindedir.

Mikroorganizmalar, üreyebildikleri ısı derecelerine göre **psikrofil**, **mezofil** ve **termofil** olmak üzere üç grupta incelenir:

- **Psikrofil (soğuk seven) bakteriler:** Bu grupta toprak, su, deniz ve göllerde yaşayan bazı mikroorganizmalar bulunur. Bu mikroorganizmalar, balıklarda ve soğukkanlı hayvanlarda hastalık oluşturur. Psikrofil mikroorganizmalar, -10 ile $+20$ °C'de ürer. $+4$ °C'de buzdolabı sıcaklığında ürer ve gıdaların bozulmasına sebep olur. Psikrofil mikroorganizmaların optimum üreme ısıları $15-20$ °C'dir.
- **Mezofil (ılık seven) bakteriler:** İnsanlarda hastalık yapan mikroorganizmalar, bu grupta yer alır. Bu mikroorganizmalar, $20-45$ °C'de üremelerini sürdürebilir. Mezofil bakterilerin optimum üreme ısıları $35-42$ °C'dir. İnsanlarda hastalık yapan türleri laboratuvar ortamında, inkübatörlerde, 37 °C'de üretilir.
- **Termofil (sıcak seven) bakteriler:** Hayvan gübrelisinde, sıcak su kaynaklarında yaşayan bazı mikroorganizmalar bu grupta yer alır. Özel enzimleri sayesinde $50-70$ °C'de kolaylıkla yaşayabilir.

1.1.1.2. Ozmotik Basıncın Etkisi

Suyun seçici geçirgen bir zardan difüzyon (maddelerin çok yoğun ortamdan az yoğun ortama geçişi) una **ozmoz** denir. Bir ortamın ozmotik basıncı, içinde eriyen maddelerin konsantrasyonu ile ilişkilidir. Hücre içi ozmotik denge, hücrenin seçici geçirgen olan hücre zarı ile sağlanır. Mikroorganizmaların içinde üredikleri sıvı besiyerinin ozmotik basıncıyla hücre içi ozmotik basıncı, dengede (izotonik / izoozmotik) olmalıdır. Mikroorganizmaların üremesi, izotonik ortamlarda daha kolay gerçekleşir.

Bakteri hücresi, ozmotik basıncı azalmış ortamda (hipotonik) ise dışarıdan bakteri içine fazla sıvı girer ve bakteriyi şişirir. Olay devam ederse bakteri hücresi patlar. Bu olaya **plazmoptiz** adı verilir.

Bakteri hücresi ozmotik basıncı yükselmiş ortamda (hipertonik) ise hücre içinden fazla miktarda sıvı çıkışı meydana gelir. Fazla miktarda sıvı kaybeden bakteri hücresinin stoplazmik membranı, hücre duvarından ayrılarak büzülür ve ortada toplanır. Bu olaya da **plazmoliz** adı verilir.

1.1.1.3. Nem ve Kuruluğun Etkisi

Mikroorganizmaların üremesinde gerekli olan besin maddelerinin hücre içine alınabilmeleri için suda erimiş olmaları gerekir. Hücre içi reaksiyonlar, metabolizma atıkları, hücre dışı enzimlerin dışarı salınması vb. olaylarda da su gereklidir. Mikroorganizmaları üretmek için kullanılan inkübatör havasındaki nem azalırsa mikroorganizmaların üremesinde yavaşlama veya durma görülür. İnkübatör havasındaki nem oranının uygun olması gerekir. İnkübatör havasındaki nemle, katı besiyerlerinin kuruması önlenir ve böylece mikroorganizmaların üremeleri için uygun ortam sağlanır.

1.1.2. Kimyasal Faktörler

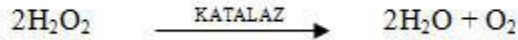
Laboratuvarda mikroorganizmaların üremesinde etkili olan kimyasal faktörlerden oksijen ve karbondioksitin etkileri aşağıda belirtilmiştir.

1.1.2.1. Oksijenin Etkisi

Mikroorganizmaların metabolizmaları için gerekli enerjinin sağlanmasında yani oksido–redüksiyon (yükseltgenme-indirgenme / elektron alışverişinin olduğu kimyasal tepkimeler) olaylarında elektron aktarımı hidrojen iyonları ile gerçekleşir. Herhangi bir madde, hidrojen kaybetmekle elektron da kaybetmiş ve bu sayede hücreye enerji vermiş olur.

Mikroorganizmalar oksijeni kullanıp kullanmamalarına göre dört grupta incelenir:

- **Aerob mikroorganizmalar:** Oksido–redüksiyon basamağının sonunda oluşan hidrojen iyonunu atmosferin serbest oksijenine bağlayan, son ürün olarak H₂O ve H₂O₂ (hidrojen peroksit) oluşturan mikroorganizmalara **aerob mikroorganizmalar** denir. Aerob mikroorganizmaların solunumu sırasında oluşan H₂O₂ mikroorganizmalar için zararlıdır ve toksik etkilidir. Ancak zararlı olan bu son ürünleri, bünyelerinde bulunan katalaz enzimi ile su ve oksijene çevirirler.



Aerob mikroorganizmalar, besiyerlerine ekildikten sonra üremeleri için (normal atmosfer havasının oksijeni yeterli olduğundan) hiçbir işleme tabi tutulmadan inkübatöre bırakılır.

Mikroorganizmaların üremelerinde oksijenin etkisini araştırmak için dik jelozda yapılan çalkalama kültürlerinde ve sıvı besiyerlerinde bu türdeki bakteriler, besiyeri yüzeyinde ürer.

- **Mikroaerofil mikroorganizmalar:** Bu tür mikroorganizmalar, % 1–4 oranında oksijen bulunan veya % 5–10 CO₂ katılarak karbondioksit oranı artırılmış, oksijen miktarı düşürülmüş ortamlarda iyi ürer. Katalaz enzimleri vardır. Oksijenli ortamlarda metabolizma sonucu fazla miktarda H₂O₂ oluşur, katalaz enzimi yetersiz kalırsa üremeleri durur.

Bu gruptaki mikroorganizmaların inkübasyonları şu ortamlarda yapılır:

- Mum yakılarak oksijenin azaltıldığı mumlu kavanoz
- Karbondioksitli etüv
- % 5–10 oranında CO₂ ilave edilmiş jar kavanoz
- Mikroaerofilik gas pak kit ilave edilmiş kavanoz

Mikroorganizmaların üremelerine oksijenin etkisini araştırmak için yapılan dik jelozda çalkalama kültüründe bu türdeki bakteriler besiyeri yüzeyinden 1 – 1,5 cm kadar aşağıda ürer.

- **Anaerob mikroorganizmalar:** Bu tür mikroorganizmaların solunumu oksijensiz ortamda gerçekleşir. Oksijenli ortamda üreyemezler. Anaerob mikroorganizmaların oksido–redüksiyon basamağının sonunda oluşan hidrojen iyonunu atmosferin serbest oksijenine bağlayacak enzimleri yoktur. Son hidrojen alıcısı olarak oksijen dışındaki azot, kükürt ve karbon gibi maddelere hidrojen bağlayan enzimleri vardır. Bu enzimler azot, kükürt ve karbona hidrojeni bağlayarak amonyak (NH₃), hidrojen sülfür (H₂S) ve metan (CH₄) gibi son ürünleri oluşturur.

Bu gruptaki mikroorganizmaların inkübasyonları;

- Vakum pompası ile havası alınan besiyerlerine CO₂ ilave edilerek
- Anaerobik gas pak kit ilave edilen jarlarla yapılır.

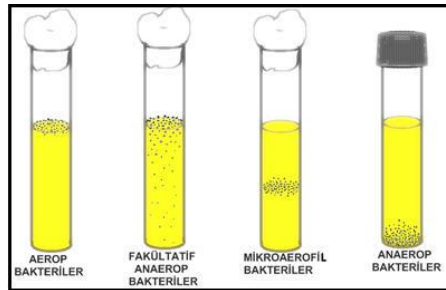
Mikroorganizmaların üremelerine oksijenin etkisini araştırmak için yapılan dik jelozda çalkalama kültüründe bu türdeki bakteriler besiyerinin dip kısmında ürer.

Anaerob mikroorganizmaların üreyebilmesi için üreme ortamlarında kesinlikle % 10 CO₂li ortam sağlanmalıdır.

- **Fakültatif anaerob mikroorganizmalar:** Hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda üreyen mikroorganizmalardır. Oksijen varlığında aerobik solunum; yokluğunda anaerobik solunum yapabilecek enzimlere sahiptir.

Mikroorganizmaların üremelerine oksijenin etkisini araştırmak için yapılan dik jeloz çalkalama kültüründe ve sıvı besiyerinde bu türdeki bakteriler, besiyerinin her yerinde yaygın olarak ürer.

Bu gruptaki mikroorganizmalar, daha fazla enerji sağlayan aerobik koşullarda daha iyi ürer.



Şekil 1.1: Bakterilerin sıvı besiyerinde oksijen ihtiyaçlarına göre üreme görünüşleri

1.1.2.2. Oksido–Redüksiyon Potansiyeli (E_h)

Oksidan maddeler elektron verici, redüktan maddeler elektron alıcıdır. Besiyeri içinde bulunan bu maddelerin aralarında elektron aktarımıyla oluşturdukları elektriksel potansiyele, **oksidoreduksiyon potansiyeli** denir. Besiyerindeki oksido–redüksiyon potansiyel fark milivolt cinsinden “E_h” simgesi ile ifade edilir. Elektron alıcı veya elektron alıcı gücünü gösterir.

1.1.3. Biyolojik Faktörler

Mikroorganizmalar, içinde kendilerine karşı etkili antibiyotik ve antikor bulunduran kanlı ve serumlu besiyerlerinde üreyemez.

1.1.3.1. Mekanik Faktörler

Sıvı besiyerine ekim yapılmış, zayıf üreme özeliği gösteren, hareketsiz mikroorganizmaların üremelerini hızlandırmak amacıyla mekanik olarak çalkalama yapan inkübatörler tercih edilebilir. İnkübasyonları yapılan sıvı besiyerinin çalkalanması çok hafif şekilde olmalıdır. Çalkalama hareketleri hızlı ve sert olursa mikroorganizmalarda ölüm meydana gelebilir.

1.2. Mikroorganizmalarda Üreme ve Çoğalma

Mikroorganizmaların üremesi, ortamdaki besin maddeleri ve uygun şartların varlığıyla ilişkilidir.

Mikroorganizmaların üremesi ve çoğalması, ortamdaki aminoasitlerin, karbonhidratların ve suyun kullanılmasını gerektirir. Bu da enzimlerin yardımıyla mümkün olan bir dizi metabolik olaylarla gerçekleşir.

➤ Mikroorganizmaların Metabolizması ve Enzimleri

- **Mikroorganizmaların metabolizması:** Vücudun temel fonksiyonlarını devam ettirebilmek için vücut içinde meydana gelen kimyasal reaksiyonların tümüne **metabolizma** denir. Aynı zamanda metabolizma, canlılarda meydana gelen anabolizma ve katabolizma olaylarının tümüdür. *Katabolizma:* Alınan besin maddelerinin yıkılıp enerji açığa çıkması, yapı taşlarına ayrılması olayına denir. Bu yolla mikroorganizma için gerekli enerji sağlanır. *Anabolizma:* Besinlerin yapı taşlarının yeniden sentezlenmesi işlemlerinin tümüdür. Sentez işlemi için gerekli enerji ise, genellikle adenosin trifosfat (adenosine triphosphate = ATP) tarafından karşılanır. Metabolizma olayı bir mikroorganizmada enerji sağlanması, büyüme ve çoğalması için sindirim olaylarının kullanılmaya başladığı andan itibaren, artıkların ortaya çıkmasına kadar olan değişikliklerin hepsini kapsar. Protozoa ve virüs dışındaki mikroorganizmaların metabolizması ile ilgili olaylar dış enzimatik sindirim ile başlar. Virüs dışındaki mikroorganizmalar diğer canlılarda olduğu gibi metabolizmalarını enzimleri ile sağlarlar. Mantar ve bakterilerin hem hücre içi hem de hücre dışında görev yapan çok güçlü enzimleri vardır. Virüslerin hücre yapısı nedeniyle hücre metabolizmaları ve enzimleri yoktur. Girdikleri hücrenin metabolizmasına egemen olarak kendi öz maddelerini (DNA, RNA, kapsit) sentezlerler.

- **Mikroorganizma enzimleri:** Enzimler, protein yapısında, biyolojik kimyasal reaksiyonları katalize eden ve küçük miktarlarda bulunan, organizma için önemli maddelerdir. Enzimler reaksiyon sonrasında harcanmaz ve ortamda kalır. Her enzimin bir substratı (enzimin etki ettiği madde) vardır. Her enzim özgül bir kimyasal reaksiyonu katalize eder. Mikroorganizmalar, metabolizma faaliyetini sürdürebilmesi için bir değil birden çok enzim sistemine ihtiyaç duyar. Bu enzimlerin bir kısmı hücre içinde (endoenzimler), bir kısmı da hücre dışında (ekzoenzimler) görev yapar. *Ekzoenzimler*, hücre dışında bulunan besinleri hücre içine alınacak hale getirir. *Endoenzimler* ise hücrenin yapı taşlarının oluşturulmasında ve hücre için gerekli enerjinin sağlanmasında görev alır. Enzimler çok etkili maddelerdir. Bir molekül enzim bir dakika içinde bir milyon substrat molekülünü etkileyebilir. Enzimler, genellikle etkiledikleri maddenin sonuna ase (az) eki getirilerek adlandırılır. Örneğin; hidrolase (hidrolaz = hidroliz yapan), lactase (laktaz = laktozu parçalayan), ürease (üreaz = üreyi parçalayan) gibi. Bir kısım enzimler işlevleri sırasında kendilerini aktive eden protein yapıda olmayan organik moleküllere gerek duyar. Bu moleküllere prostetik grup ya da **koenzim** adı verilir. Bazı enzimler ise, aktive olabilmek için koenzimler dışında **kofaktör** denilen bazı aktivatör maddelere ihtiyaç duyar. Bu enzimler kofaktör olmaksızın etkinlik gösteremez. Kofaktörler çoğunlukla metalik iyonlardır. Başlıcaları ise Fe⁺⁺, Mg⁺⁺, Ce⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺'dur. Enzimler, aktivite gösterirken birçok dış etmenden etkilenir. Bu dış etmenler şunlardır:
 - Enzimler etkinlik gösterirken çevre ısısından direkt olarak etkilenir.
 - Ortamın pH derecesinden etkilenir.
 - Substrat, ortamda ne kadar yoğunsa, enzim etkinliği o denli azalır.
 - Ortamda tuz yoğunluğu fazla ise enzimatik etkinlik azalır.
 - Ortamda bulunan çeşitli kimyasal maddeler, enzimlerin yapısında bozulmaya neden olacağından etkinliklerinde de azalmaya neden olur.
 - Ultraviyole, X ışınları gibi fiziksel etmenlerden enzimlerin işlevleri olumsuz etkilenir.
- **Mikroorganizmaların Üremesi:** Mikroorganizmalar bitkiler ve hayvanlara göre çok hızlı şekilde ve ikiye bölünerek çoğalır. İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan bakteriler ve spiroketler kısa eksen boyunca ortadan ikiye bölünmek suretiyle ürer. Genel olarak küfler, bakteri ve mayalara göre daha geç çoğalırlar.

Bölünme başlamadan önce bakteri, iki kardeş hücreye yetecek kadar enzimleri, gerekli diğer organik ve inorganik maddeleri hazırlar ve biriktirir. Bu işlem yapılırken toplu hâlde bulunan nukleus, orta bölgede uzamaya başlar, nukleus sitoplazmik membrandaki mezozoma bağlanarak replikasyon (DNA'nın kendini eşlemesi, kopyalama) başlar. Buna sitoplazmik membran da iştirak eder ve septumlar içeri doğru uzayarak hücreyi ortasından iki kardeş hücreye ayırır. Bu iki hücre, birbirinden ayrılarak tam bağımsız hâle gelir veya birbirine bitişik olarak kalır.

Bakteri popülasyonunda meydana gelen her bölünmeye **jenerasyon**; iki jenerasyon arasında geçen zamana **jenerasyon süresi** adı verilir. Jenerasyon süresi, bakterinin türüne özgü genetik yapısına bağlı olmakla birlikte, bir yandan da bulunduğu üreme ortamı ve çevre koşullarına bağlıdır. Örneğin; *Escherichia coli*'nin jenerasyon süresi inorganik tuzlar ve glikozdan ibaret bir besiyerinde 37 °C'de 60 dakika iken uygun üreticilik özelliği gösteren bir besiyerinde ve optimum çevre koşullarının sağlandığı ortamlarda 18-20 dakikadır.

Bazı bakterilerin optimum koşullarda üreme jenerasyon süreleri şöyledir: *Pseudomonas aeruginosa*'da 10 dakika; *Staph. aureus*'ta 27-30 dakika; *Brucella melitensis*'te 60-70 dakika; *Mycobacterium tuberculosis*'te 790-930 dakikadır.

1.2.1. Mikroorganizmaların Üreme Hız ve Dönemleri

Besiyerine ekimi yapılmış, uygun üreme koşulları sağlanmış mikroorganizmaların üreme dönemleri:

- **Latent (gizli) dönem:** Mikroorganizmaların buldukları ortama alışma dönemidir. Bakteri sayısında artış olmaz. Yeni ortamına alışamayan bakterilerin ölmesiyle sayıca azalma da meydana gelebilir.
- **Üremenin hızlandığı dönem:** Mikroorganizmalar bulunduğu ortama alışmış, beslenmeye başlamalarıyla metabolizma faaliyetleri artmıştır. Yavaş yavaş bölünerek üremeye başlarlar. Bu dönemde mikroorganizmalar, türlerinin standartlarına göre en büyük hücre yapısını gösterir. Bu dönemin süresinin uzun ya da kısa olması mikroorganizmanın türüne bağlıdır. Jenerasyon süresi ekimi yapılan mikroorganizmanın sayısı, ısı, pH, oksijen vb. çevre koşulları, besiyerinin bileşimi gibi faktörler de etkili olur.
- **Logaritmik üreme dönemi:** Bu dönemde mikroorganizmalar buldukları ortama alışmıştır. Mikroorganizma türüne göre jenerasyon süresinin en kısa ve hücre yapısının türünün standartlarına göre en küçük olduğu dönemdir. Besiyerindeki mikroorganizma sayısı, en üst seviyeye çıkar. Mikroorganizmalar, bu dönemde fizyolojik olarak genç ve biyoaktiftir. Fiziksel olaylara, kimyasal maddelere ve antibiyotiklere karşı çok duyarlı oldukları dönemdir.
- **Üremenin durması dönemi:** Ortamdaki besin maddelerinin, oksijenin azalması, toksik ürünlerin artması, hücre bölünmesini yavaşlatır ve ölümler başlar. Bu dönemde mikroorganizma sayısında artış veya azalış meydana gelmez. Çoğalma ve ölüm sayısı eşit düzeydedir.

- **Azalma ve ölüm dönemi:** Besiyerindeki besin maddelerinin tükenmesi, ortamda toksik ürünlerin artması nedeniyle canlı mikroorganizma sayısında hızlı bir şekilde azalma meydana gelir. Bir süre sonra tüm bakteriler ölebilir. Ancak bu süre, bakteri cinsine göre değişir. Canlı kalabilen birkaç bakteri bulunduğu ortamda aylarca canlılığını sürdürebilir.



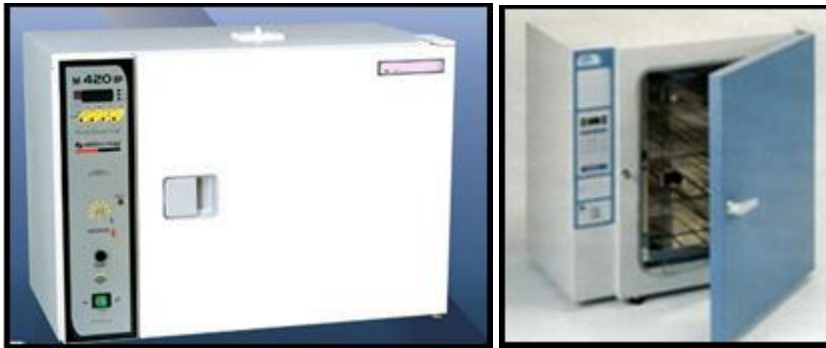
Şekil 1.2: Bakterilerin üreme eğrisi

1.3. İnkübasyon

Mikroorganizmaların inkübasyonu mikrobiyoloji laboratuvarında ısı, O₂, CO₂, nem vb. optimum çevre koşullarının sağlandığı inkübatörlerde, belirli bir süre tutulmaları ile sağlanır. Bu amaç için inkübatör olarak **etüv** kullanılır.

Etüv, çeşitli mikroorganizmaların üretilmesi için uygun olan ısıya ayarlanabilen, normal atmosfer havasında inkübasyon yapılan inkübatördür.

İnkübasyonda üç temel konu **sıcaklık, süre ve gaz atmosferidir**. Analizi yapılmakta olan hedef mikroorganizmaların özelliklerine göre bu üç faktör tam olarak sağlanmalıdır.



Resim 1.1: Etüv

- **İnkübasyon sıcaklığı:** İnkübasyon, insanlarda hastalık yapan mezofil mikroorganizmaların en iyi üreme gösterdikleri sıcaklık olan 37 °C'de yapılır.

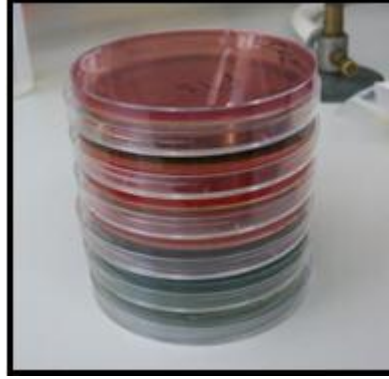
- **Aerop inkübasyon gaz atmosferi:** İnkübasyon, aerob ve fakültatif anerop bakterilerin üremek için ihtiyaç duyduğu gaz atmosferleri sağlanarak gerçekleştirilir.

Mikroorganizmalar, inkübasyon sırasında oksijene ihtiyaç duymalarına göre iki gruba ayrılır:

- **Aerop mikroorganizmalar:** Bu tür mikroorganizmaların üreyebilmesi için normal atmosfer havası yeterlidir. Ekimi yapılmış besiyerleri direkt olarak inkübatöre yerleştirilir. İnkübatör içindeki atmosfer havası, bunların gelişmesi için yeterlidir.
 - **Anaerop mikroorganizmalar:** Zorunlu anaerop ve mikroaneorop mikroorganizmaların üretilmesi amacıyla çeşitli araç gereç ve yöntemler kullanılarak ve uygun atmosfer ortamı yaratılarak inkübasyon gerçekleştirilir.
- **İnkübasyon süresi:** Mikroorganizmaların inkübasyon süresi, üremeye bağlı sıvı besiyerinde meydana getirdiği bulanıklık, zar oluşturma, çöküntü vb. görünüm değişikliği ve katı besiyerinde gözle görülebilir incelemeye müsait mikroorganizmaların türüne özgü koloni oluşturma sürelerini ifade eder.

1.3.1. Etüvde İnkübasyon

- Etüv inkübasyona hazırlanır. Bu amaçla;
 - Etüvün temizliği kontrol edilerek gerekli temizlik işlemleri yapılır.
 - İnkübasyonu yapılacak besiyerlerinin durumuna göre iç raf aralıkları ayarlanır.
 - Etüv ısısı inkübasyon ısısına getirilir.
 - Etüv havalandırma kapaklarının açıklığı kontrol edilir.
- Ekim işlemi yeni bitmiş petri kutularındaki besiyerleri 10-15 dakika bekletilerek besiyerinin ekim örneğini iyice absorblaması sağlanır. Yüze yaygın ekimlerde, fazla miktardaki sıvı örneğini besiyerinin absorblaması için bu süre önemlidir.
- Petri kutuları, kapakları altta olacak şekilde hazırlanır. İnkübasyon ısısına bağlı plak içinde meydana gelecek buharlaşmanın petri kutusu kapağında birikmesiyle oluşan su damlacıklarının besiyeri yüzeyine damlaması sonucu oluşabilecek aşağıdaki olumsuzluklar önlenir. Bunlar;
 - Oluşan koloni yapılarını bozması,
 - Olduğundan büyük koloni yapılarının oluşması,
 - Kontaminasyon sebebi olarak besiyeri yüzeyinde olduğundan daha fazla bakteri kolonisinin oluşmasıdır.
- Fazla miktarda plak besiyeri varsa etüve sığdırabilmek amacıyla üst üste en fazla 6 petri kutusu konularak sıralanır.



Resim 1.2: Petri kutularının inkübasyona hazırlanması

- Ekim yapılmış tüpteki besiyerleri tüp sporlarına konur.
- Ekimi yapılmış örnek raporları besiyerlerinin etüve kaldırılış sırasına göre sıralanır. Raporlar inkübasyon süresince uygun bir yerde saklanır. Etüv içi hava sirkülasyonunu bozması nedeniyle raporların ekim örnekleriyle birlikte etüve konması uygun değildir.
- Petri kutuları, tüp sporları kendi aralarında ve etüvün iç cidarına 2,5 cm boşluk oluşturacak, etüv içi ısı dağılımı ve hava sirkülasyonuna engel olmayacak şekilde yerleştirilir.



Resim 1.3: Etüve plak besiyerlerinin yerleştirilmesi



Resim 1.4: Etüve plak ve tüpteki besiyerlerinin yerleştirilmesi

- Etüv içinde besiyerlerinin inkübasyon sıcaklığına bağlı kurummasını önlemek ve bazı etüvlerde uygun nem sağlamak amacıyla su cepleri bulunabilir. Su cepleri distile su ile doldurulur.



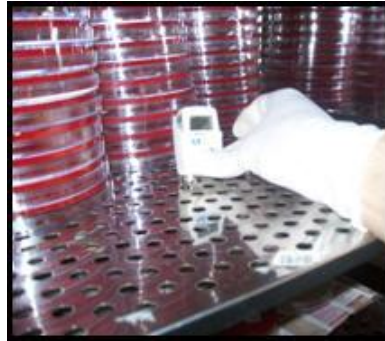
Resim 1.5: Etüv su cebine su eklenmesi

- Su cebi bulunmayan etüvlerde uygun nem sağlamak amacıyla kapaksız, ağzı geniş petri kutusu, beher vb. bir kaptaki su konur.



Resim 1.6: Etüve yayvan kaptaki su konması

- Etüv iç sıcaklığı ve raflar arası sıcaklığı kontrol amacıyla etüv içine termometre yerleştirilir. Etüv iç ısı inkübasyon süresince zaman zaman bu termometreyle kontrol edilir. İnkübasyon ısısından 0,5 °C'lik ısı sapmalarında gerekli ısı ayarlamaları yapılır.



Resim 1.7: Etüv iç ısını kontrol için termometre yerleştirilmesi

- Etüv iç camı ve dış kapağı sıkıca kapatılır.



Resim 1.8: Etüv iç cam kapak ve dış kapağının kapatılması

- İnkübasyon süresince etüv kapaklarının gereksiz yere açılmamasına dikkat edilir.

1.3.2. Otomatik Kan Kültür Cihazında İnkübasyon

Otomatik kan kültür sistemleri pahalı olmasına rağmen mikroorganizmaları erken izole etmesi açısından tercih edilmektedir. Bu tür cihazlarda şişelerde hazırlanmış geniş üreticilik özelliği olan besiyerleri kullanılır. Besiyerlerinde karbondioksit gazına duyarlı ayıracılar bulunmaktadır. Besiyeri şişesinde üremeye bağlı oluşan karbondioksit gazının indikatörlerde meydana getirdiği renk değişiklikleri sensörler aracılığıyla algılanarak üremenin olduğu besiyeri bilgisi bilgisayar ekranına aktarılır.



Resim 1.9: Otomatik kan kültür cihazı



Resim 1.10: Otomatik kan kültür cihazı

Otomatik kan kültür sistemleri şu bölümlerden oluşur:

- **İnkübasyon bölümü:** Otomatik olarak çalışan, uygun inkübasyon ısısında, çalkalamalı inkübasyonun yapıldığı asıl bölümdür. Bu bölümde aynı anda çok sayıda hasta örneğinin inkübasyonu yapılabilir.



Resim 1.11: Otomatik kan kültür cihazının inkübasyon bölümü

- **Barkod okuyucu:** Besiyeri şişesinin üzerindeki barkod okutularak hasta bilgileri ve inkübasyon tarihini otomatik olarak hafızasına alan bölümdür. Üreme olmuş, besiyeri ve inkübasyon süresi dolmuş besiyerlerinin barkodları barkod okuyucuya okutularak inkübasyondan çıkarılır.
- **Bilgisayar kısmı:** İnkübasyon ve barkod okuyucularına bağlı olarak hasta bilgilerinin ve inkübasyondaki besiyerleri sensörlerinden gelen bilgilerin izlendiği bölümdür.

Bu sistemlerde inkübasyon ve inkübasyon takibi aşağıda belirtilen şekilde uygulanır:

- Ekim yapılmış besiyeri şişelerinin barkodu, barkod okuyucuya okutulur.



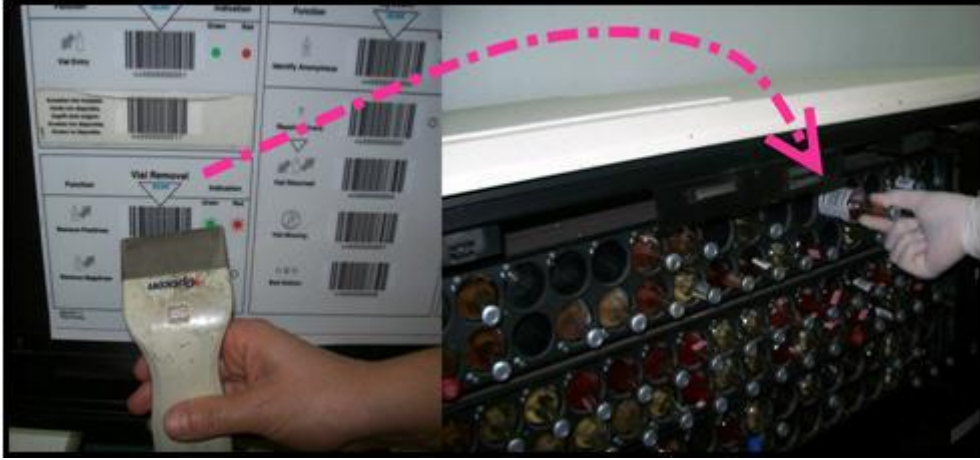
Resim 1.12: Kan kültür barkodunun okutulması

- İnkübasyon bölümünde; bilgisayar ekranında örnek sıra numarası belirtilen alana besiyeri şişesi yerleştirilir.



Resim 1.13: Kültür tüpünün cihazın inkübasyon bölümüne yerleştirilmesi

- Bilgisayar ekranında üreme uyarısı beliren besiyeri numarası okunarak inkübasyon bölümünden barkod okuyucuya okutulup çıkarılır.
- Bilgisayar ekranında inkübasyon süresi dolmuş üreme görülmeyen besiyeri yine barkod okuyucuya okutularak inkübasyondan çıkarılır.



Resim 1.14: Üreme görülmeyen kan kültürünün inkübasyondan çıkarılması

1.4. Mikroorganizmaların Besiyerinde Üremeleri

Mikroorganizmaların besiyerinde üremeleri ile ilgili özellikleri aşağıda açıklanmıştır.

1.4.1. Mikroorganizmaların Sıvı Besiyerinde Üreme Özellikleri

Mikroorganizmalar uygun koşullarda sıvı besiyerinde, katı besiyerine göre daha hızlı ürer. Mikroorganizmaların ekildikleri sıvı besiyerinin tüm besin kaynaklarından yararlanması hızlı üremede etkilidir.

Bakteriler ürettikleri sıvı besiyerinde, besiyerine farklı görünümler kazandırır. Bunlar;

- Az veya çok yoğun homojen bulanıklık,
- Sıvı besiyeri yüzeyinde zar oluşumu,
- Sıvı besiyeri dibinde çökelti meydana gelmesi,
- Sıvı besiyeri dibinde, çalkalamayla kaldırılan hücrelerin birbirine yapışık kümeler oluşturmasıdır.

Yukarıda belirtilen üreme şekillerinin birden fazlası bir arada olacak şekilde üreme de olabilir.

1.4.2. Mikroorganizmaların Katı Besiyerinde Üreme Özellikleri

Katı besiyerine ekilen mikroorganizmalar, sıvı besiyerine göre daha sınırlı üreme özelliği gösterir.

Katı besiyerine ekilen mikroorganizmalar, düştüğü alanda bölünüp çoğalarak koloniler oluşturur. Koloniler, birçok hücrenin üst üste, yan yana gelmesiyle oluşan bir hücre yığıdır.

Katı besiyerinin bazı özellikleri ve üreme sonucu oluşan kolonilerin yapıları nedeniyle inkübasyon süresinin ilerlemesiyle üremeyi engelleyici ve durdurucu faktörler oluşmaya başlar.

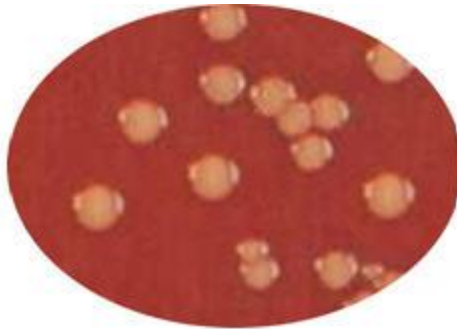
- Koloni üst kısmındaki bakterilerin basıncı, koloni tabanındaki bakteriler üzerinde dejenerasyonlara neden olur.
 - Koloninin üst ve alt kısmındaki bakterilere, besin maddelerinin difüzyonu güçleştiği için dejenerasyon başlar.
 - Bakteriler birbirine bitişik olduğundan üreme güçleşir.
- Katı besiyerinde difüzyonun zor olması ve inkübasyon sıcaklığının besiyeri yüzeyini kurutması sonucu;
 - Ortamdaki besin maddelerinin hücre içine difüzyonu güçleşir.
 - Metabolizma sonucu oluşan toksik maddelerin difüzyonunun güçleşmesi nedeniyle hücre içinde birikerek toksik etki yaratır.
 - Hücre içinden ortama salınması gereken enzimler hücre dışına çıkarılamaz.
- Ortamdaki diğer bakteri kolonilerinin gelişmesiyle, uzaktaki besin maddelerinin kullanılması engellenir.

1.4.2.1. Katı Besiyerinde Bakteri Koloni Özellikleri

Bakteri kolonileri her bakteri için özeldir. Prensip olarak belirli bir cins bakteri, aynı birleşimdeki besiyeri ve aynı ortam koşullarında her zaman aynı morfolojik özellikte koloniler oluşturur. Bakteri kolonilerinin büyüklüğü, biçimi, rengi, kokusu, hemolitik aktivitesi bakteri türlerinin ayırt edici özelliklerindedir.

Genel olarak bakterilerde dört farklı tip koloni gözlenir:

- **S (smooth) koloni:** Yuvarlak, düzgün kenarlı, düzgün yüzeyli, hafif kabarık, nemli ve homojen kolonilerdir. Klinik önemi olan bakterilerin çoğu S-koloni oluşturur. İngilizce smooth (düzgün) sözcüğünün ilk harfine bakılarak S-koloni adı verilmiştir.



Resim 1.15: Katı besiyerinde S-koloniler

- **R (rough) koloni:** Düzgün olmayan, yüzeyleri buruşuk veya tanecikli, kenarları girintili çıkıntılı, yassı, basık görünümlüdür. *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*'in kolonileri R şeklindedir. S ve M koloni oluşturan bakterilerin kültürleri uzun süre bekletilir veya uygun olmayan besiyerlerinde üretilirlerse R-koloni tarzında üreme gösterirler. İngilizce rough (pürtüklü) sözcüğünün ilk harfine bakılarak R-koloni adı verilmiştir.



Resim 1.16: Katı besiyerinde R-koloniler

- **M (mucoïd) koloni:** Polisakkarit kapsüllü bakterilerin oluşturduğu koloni tipidir. Bu bakteriler, uygun zenginleştirilmiş besiyerinde üretildiklerinde, sümüksü görümlü, yapışkan, parlak koloniler oluşturur. Koloniye öze ile dokunulup çekildiğinde koloni iplik gibi uzar. Örneğin; *Klebsiella pneumoniae* gibi M-koloni oluşturan bakteriler, uygun olmayan zenginleştirilmemiş besiyerlerinde S tipi koloniler oluşturur. Bu kolonilerden uygun zenginleştirilmiş besiyerlerine pasajlarda tekrar M-koloni oluşturur.



Resim 1.17: Katı besiyerinde M-koloniler

- **L tipi koloni:** Yüzeyleri kabarık, granüllü, besiyeri içine doğru mıh gibi uzantı yapan, bu kolonilerin görünümü aynı zamanda “sahanda yumurta” görünümü olarak da tarif edilir. Bakterilerin L formları ve Mycoplasma türleri L-koloni oluşturur. Bu bakterilerin kolonileri büyüteçle görülebilecek kadar küçüktür.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aerob mikroorganizmaların inkübasyonunu yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Etüvün inkübasyon öncesi kontrolünü yapınız.	➤ Kişisel güvenlik önlemlerini alınız, ➤ Etüvün temizliğini kontrol etmeden çalıştırmayınız.
➤ Etüv iç raf aralıklarını ayarlayınız.	➤ İnkübasyonu yapılacak besiyeri sayısına göre etüv iç raf aralıklarını ayarlayınız, ➤ Raf aralıklarının hava sirkülasyonunu engellemeyecek yükseklikte olmasına özen gösteriniz.
➤ Etüv inkübasyon ısısını ayarlayınız.	➤ Etüv inkübasyon ısısını kültürü yapılacak mikroorganizmaların optimum üreme ısılarına göre ayarlayınız, ➤ İnsan vücut ısısının ortalama 37 °C olması nedeniyle hastalık yapan mikroorganizmaların optimum üreme ısılarının da genelde 37 °C olduğunu unutmayınız.
➤ Etüv havalandırma kapaklarının açıklık kontrolünü yapınız.	➤ Etüv havalandırma kapaklarının açıklık kontrolünü yapmayı unutmayınız.
➤ Ekim işlemi yeni bitmiş petri kutusundaki besiyerlerini 10-15 dakika bekleterek besiyerinin ekim örneğini iyice absorblamasını sağlayınız.	➤ Henüz ekim işlemi bitmiş besiyerinin ekim örneğini absorblaması için bekletme süresine uyunuz. ➤ İnkübasyon ısısına bağlı plak içinde meydana gelecek buharlaşmanın petri kutusu kapağında birikmesiyle oluşan su damlacıklarının besiyeri yüzeyine damlaması sonucu oluşabilecek olumsuzlukları unutmayınız, ➤ Besiyerinin absorblamadığı ekim örneğinin kontaminasyona neden olacağını unutmayınız.
➤ Petri kutularını kapakları altta olacak şekilde inkübasyona hazırlayınız.	➤ Petri kutularını, kapakları kesinlikle altta olacak şekilde inkübasyona kaldırınız. ➤ İnkübasyonu yapılacak besiyerleri fazla miktarda ise en fazla 6 petri kutusunu üst üste sıralayarak inkübasyona kaldırınız.
➤ Tüpteki besiyerlerini tüp sporlarına yerleştirerek inkübasyona hazırlayınız.	➤ Tüp pamuk tıkaçlarını kontrol ediniz.

<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ekim örnekleri raporlarını besiyerlerinin etüve kaldırılış sırasına göre sıralayınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Raporları kesinlikle besiyerleri ile birlikte etüve kaldırmayınız.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Petri kutuları ve tüp sporlarını etüv iç cidarı ve kendi aralarında 2,5 cm boşluk olacak şekilde etüve yerleştiriniz. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aralıklı konmayan petri kutusu ve tüp sporlarının etüv iç ısısının homojen dağılımını önleyeceğini unutmayınız.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Etüvün su cepleri distile su ile doldurunuz. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Etüv içinde besiyerlerinin inkübasyon sıcaklığına bağlı kurumamanın önlenmesi ve uygun nemin sağlanmasını unutmayınız.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Geniş ağızlı su dolu kapı etüve koyunuz. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Su seviyesini sık sık kontrol ediniz.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Etüv içine termometre yerleştiriniz. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Termometre sıcaklığını aralıklarla kontrol ediniz. ➤ 0,5 °C'den büyük ısı değişimlerinde gerekli ayarlamaları yapınız.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Etüv iç ve dış kapaklarını kapatınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Etüv kapaklarını gereksiz yere açmayınız. ➤ Yapmanız gereken kontrolleri iç cam kapağı açmadan yapınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aerob mikroorganizma kültüründe hangi ekim yöntemi uygulanır?
A) Besiyeri yüzeyine yaygın ekim
B) Yatık besiyerine batırma ve yüzey ekimi
C) Çizgi ekimi
D) Dik besiyerine batırma ekimi
E) Çalkalama kültürü
2. Aşağıdakilerden hangisi, mikroorganizmaların üremesini etkileyen fiziksel çevre faktörüdür?
A) Oksijenin etkisi
B) Karbondioksitin etkisi
C) Oksido-redüksiyon potansiyeli
D) Biyolojik faktörler
E) Isı
3. İnsanlarda hastalık yapan mikroorganizmaların genellikle optimum inkübasyon ısısı aşağıdakilerden hangisidir?
A) 35–42 °C
B) 37 °C
C) 45 °C
D) 15–20 °C
E) 32 °C
4. Bir araştırmacı elindeki beş farklı bakteri örneğinin jenerasyon sürelerini araştırmak amacıyla aynı özellikteki katı besiyerine ekimlerini yaparak inkübasyona bırakıyor. 1. bakteri örneğinin 120; 2. bakteri örneğinin 504; 3. bakteri örneğinin 24; 4. bakteri örneğinin 216 ve 5. bakteri örneğinin 48 saat sonra koloni oluşturduğunu gözlemliyor. Araştırmacı bu sonuçlar karşısında en kısa jenerasyon süresi olarak hangi bakteriyi seçmelidir?
A) 1. bakteri örneğini
B) 2. bakteri örneğini
C) 3. bakteri örneğini
D) 4. bakteri örneğini
E) 5. bakteri örneğini
5. Mikroorganizmalar, hangi üreme döneminde antibiyotiklere daha duyarlıdır?
A) Latent (gizli) dönem
B) Üremenin hızlandığı dönem
C) Azalma ve ölüm dönemi
D) Logaritmik üreme dönemi
E) Üremenin durması dönemi

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

AMAÇ

Bu faaliyette, kazandığınız bilgiler ile anerob mikroorganizmaların inkübasyonunu yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

Sağlık işletmelerinin mikrobiyoloji laboratuvarlarında anaerob mikroorganizmaların inkübasyon yöntemlerini araştırınız.

2. ANAEROB MİKROORGANİZMALARIN İNKÜBASYONU

Anaerob mikroorganizmalar, insan normal florasının önemli bir kısmını oluşturur. Bu bakteriler, fırsatçı patojen olarak insanda hastalık oluşturur. Ayrıca çeşitli yaralanma ve travmalar sonucu, dışarıdan veya vücut florasında bulunan bakteriler, hasara uğramış nekrotik dokulara ulaşarak anaerob bakteri infeksiyonlarını meydana getirir.

2.1. Tüpteki Katı Besiyerinde Oksijensiz Ortam Oluşturulması

Anaerob kültür yapılacak bu tür besiyerleri içinde indirgen maddelere de yer verilir. Bu amaçla içinde indirgen madde olarak % 0,5-1 glikozun bulunduğu, glikozlu jeloz besiyerleri vb. kullanılarak aşağıdaki yöntemle oksijensiz ortam oluşturulur.

- Tüpte hazırlanmış besiyeri, yüksekliği en az 8–10 cm olan sıcak su banyosunda eritilir.
- Besiyeri içinde bulunan oksijeni uzaklaştırmak amacıyla 10 dakika kaynar suda bekletilir.
- Besiyeri 45 oC'ye kadar soğutularak çalkalama kültürü yapılır, ani olarak soğuk suda katılaşması sağlanır.
- Besiyeri kapağı, vidalı kapaklarla sıkıca kapatılır.
- Üreme sırasında gaz oluşurarak üreyen türlerde vidalı kapaklar kullanılmaz. Vida kapakları sıkıca kapatılmış besiyeri içinde gaz oluşumuna bağlı basınç, tüplerin kırılmasına neden olur. Vidalı kapaklar yerine pamuk tıkaçlar kullanılır. Pamuk tıkaçlar, üzeri eritilmiş parafin, vazelin, vaspar (bir kısım vazelin bir kısım parafin karışımı) ile kaplanarak inkübasyona hazırlanır.
- Normal atmosfer koşullarında inkübasyonu yapılan bu besiyerinde anaerob bakteriler besiyerinin dip kısmında ürer.

2.2. Besiyerinin Redüksiyon Şiddetinin Artırılması

Sıvı ve katı besiyerine çeşitli redüktan maddeler eklenerek besiyeri ortamındaki oksijen giderilir. Besiyerleri içine metilen mavisi veya rezasurin gibi indikatör maddeler konularak anaerob ortam denetlenir. Bu indikatör maddelerin renkleri oksijensiz ortamlarda renksizken oksijenle temasta mavi renk meydana gelir. Besiyeri ekim öncesi sıcak suda bekletilerek besiyeri içindeki oksijen giderilir. Besiyeri ısıtılarak oksijenin uzaklaştırılmasıyla renginin tekrar renksizleşmesi görsel olarak anaerob ortam sağlandığının belirtisidir. Bu tür besiyerleri, normal atmosferde bekletildiklerinde bir süre bu özelliklerini korur.

Besiyerlerinin redüksiyon şiddetinin artırılması besiyerlerine indirgen madde olarak % 1-5 glikoz, % 0,1 sodyum tiyoglikolat, % 0,1 askorbik asit, kıyma, karaciğer kalp vb. maddeler katılarak gerçekleştirilir.

- Redüksiyon şiddeti artırılmış jeloz besiyerlerine iğne öze ile batırma ekimi yapılır.
- Ekim yapılmış besiyerinin kapağı sıkıca kapatılır. Kapak etrafı parafilmle hava almayacak şekilde kaplanır.
- Üremeye gaz oluşturan mikroorganizma kültür tüplerinde vida kapaklar yerine pamuk tıkaçlar kullanılır. Pamuk tıkaç üzeri, hava geçişine izin vermeyecek şekilde parafin, vazelin, vaspar vb. maddelerle kaplanır.

2.3. Kimyasal Yöntemlerle Ortamdaki Oksijenin Giderilmesi

Sınırlı hacimde bulunan havadaki oksijenin, çeşitli kimyasal maddelerle tepkimeye sokularak ortamdaki kaldırılmasıdır.

2.3.1. Kimyasal Anaerob Kavanoz / İnkübasyon Torbası

Jar kavanoz ve inkübasyon torbası sistemleri kullanılarak anaerob ve mikroaerofilik ortam yaratılır.

Bu sistemlerde ticari olarak temin edilebilen gaz paketleri (gas generating kit) kullanılarak anaerobik / mikroaerofilik ortam yaratılır. Gaz paketleri içeriği su ile reaksiyon sonunda anaerobik kavanoz veya inkübasyon torbası içinde atmosferik oksijenin tümünün ya da bir kısmının bağlanması ve aynı anda CO₂ açığa çıkmasını sağlayan bileşimler vardır. Reaksiyon sonunda jar kavanoz ve inkübasyon torbası içinde bulunan atmosfer havası CO₂ açısından zenginleşirken oksijen tümüyle uzaklaştırılmış olur. Gaz paketlerinin içinde hidrojen oluşturu sodyum borohidrit ve CO₂ oluşturu sodyum bikarbonat bulunur. Gaz paketlerinin bir ucu yırtılarak içerisine 10 ml su eklenir. Reaksiyon sonucu ortaya çıkan hidrojenin ortamdaki oksijenle birleşerek su oluşturmasıyla oksijensiz ortam sağlanır. Bunun yanında % 6 oksijen veya % 10 karbondioksit atmosferi içeren mikroaerofilik ortam oluşturan paketlerde mevcuttur.

➤ **Anaerob kavanoz yöntemi:** Kimyasal olarak ortamdaki oksijenin uzaklaştırılmasında kullanılan anaerobik jarlar kavanoz gövdesi ve kapaktan oluşur.

- Jar petri sepetine petri kutuları üst üste yerleştirilir.



Resim 2.1: Jar petri sepeti ve petri kutularının sepete yerleştirilmesi

- Petri sepeti, jar içine yerleştirilir.



Resim 2.2: Petri sepetinin jar'a yerleştirilmesi

- Jar içerisine anaerobik indikatör (anaerotest) yerleştirilir. İndikatörde meydana gelen uygun renk değişimi görsel olarak anaerob ortamın yaratılıp yaratılmadığını ve anaerob ortamın devamlılığını gösterir. Örnek metilen mavisi emdirilmiş şerit kâğıt ayıracağı, normal atmosfer koşullarında mavi; anaerob koşullarda beyaz renk alır.
- Uygun gas generating kit'in (anaerob veya mikroaerofilik) köşesi kesik çizgiler ile işaret edildiği gibi makasla kesilir.



Resim 2.3: Gas generating kit ve kit'in kesilmesi

- Poşet içine 10 ml su eklenerek hemen jar içine yerleştirilir. Gas generating kit poşetinin katlamadan ve ezilmeden yerleştirilmesine dikkat edilir.



Resim 2.4: Gas generating kit'e su eklenmesi

- Anaerop jar kavanozunun kapağı vakit geçirmeden gaz sızdırmayacak şekilde kapatılır.



Resim 2.5: Jar kavanoza besiyerleri ile gas generating kitin yerleştirilmesi ve jar kapağının sıkıştırılması

- Anaerop jar kavanozu, inkübasyon için etüve kaldırılır.



Resim 2.6: Jar'ın etüve yerleştirilmesi

- İndikatör ayıraç renginde ortamın anaerobluğu kontrol edilir.

- **Anaerobik torba:** Anaerobik veya mikroaerofilik mikroorganizmaların inkübasyon koşullarını petri kutularının yerleştirildiği özel torba içinde sağlayan sistemdir.

Bu sistemde inkübasyon işlemi aşağıdaki şekilde uygulanır:

- Anaerobik torba seti hazırlanır. İnkübasyonu yapılacak örneğe ait hasta bilgileri ve ekim tarihi yazılı bilgi etiketi hazırlanır.



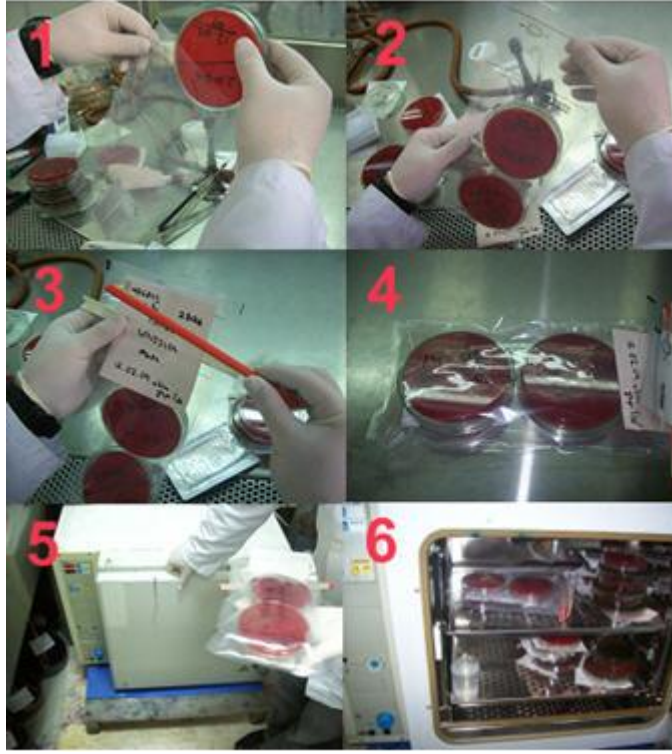
Resim 2.7: Bilgi etiketinin hazırlanması

- Torba içine anaerobik indikatör yerleştirilir.
- Torba içine anaerob veya mikroaerofilik gas generating kit yerleştirilir.



Resim 2.8: Anaerobik torba içerisine gas generating kit'in yerleştirilmesi

- Ekim yapılmış petri kutuları anaerobik torbaya yerleştirilir.
- Torbanın ağzı gaz geçişine izin vermeyecek şekilde özel klipsi ile kapatılır.
- Torba, istenilen inkübasyon ısısındaki etüve kaldırılarak besiyeri inkübasyonu gerçekleştirilir.



Resim 2.9: Petri kutularının anaerobik torbaya yerleştirilme aşamaları ve etüve kaldırılması

- İnkübasyon süresince belirli aralıklarla indikatör ayıraç rengiyle ortamın anaerobluğu kontrol edilir.

2.3.2. Burri –Wright Tüp Metodu

Ekim yapılmış tüp ya da petri kutusu içindeki sınırlı hacimde havanın oksijenini, oluşturulan kimyasal reaksiyonla sarf ederek anaerob ortam yaratma yöntemidir. Bu amaçla;

- Tüpte hazırlanmış uygun besiyerine ekim yapılır.
- Yağlı pamuktan hazırlanmış tıkaç, cam çubuk ile besiyerine değmeyecek şekilde tüpün içine itilir.
- Su emici özellikteki hidrofil pamuktan 1- 2 cm yüksekliğinde yeni bir tıkaç yapılır. Hidrofil pamuk tıkaç, aynı yöntemle tüp içine itilir.
- Hidrofil pamuk tıkaç üzerine, 1 ml 2,5 N NaOH daha sonra 1 ml % 20 pirogallik asit çözeltisi damlatılır.
- Tüpün ağzı vidalı kapak veya lastik tıkaçla hemen sıkıca kapatılır. Sodyum hidroksit, progallik asit ile tepkimeye girerek ortamdaki oksijeni bitirir. Ortam havası anaerob mikroorganizmaların üreyebileceği duruma gelir.

2.4. Mekanik Yöntemlerle Ortamdaki Oksijenin Giderilmesi

Ortamdaki oksijenin mekanik olarak giderilmesi yöntemleri aşağıda açıklanmıştır.

2.4.1. Anaerob Kavanoz Yöntemi

Mekanik olarak ortamdaki oksijenin uzaklaştırılmasında kullanılan anaerobik jarlar kavanoz gövdesi ve kapaktan oluşur. Kapak üzerinde anaerobik jar içerisinde gaz basıncını gösteren bir manometre ve gaz giriş çıkışlarını sağlayan hava vanaları mevcuttur. Bu yöntemle ortamdaki oksijenin giderilmesi için;

- İçine besiyeri konmuş jar kapağı gaz geçişine izin vermeyecek şekilde sıkıca kapatılır.
- Jar kapağındaki gaz çıkış vanası kullanılarak jar içindeki atmosfer havası mekanik olarak boşaltılır.
- Kapakta bulunan diğer vanadan jar içine, içinde oksijen içermeyen gaz karışımı verilir.



Resim 2.10: Anaerob kavanoz

2.4.2. Mumlu Kavanoz Yöntemi

Bu yöntem desikatör kavanozlarında mikroaerofilik mikroorganizmaların üremeleri için uygun CO₂li ortam aşağıdaki şekilde oluşturulur:

- Desikatör kavanoz içine besiyeri plakları veya tüpteki besiyerleri yerleştirilir.
- Tüp besiyerlerinin içine ortamdaki karbondioksitli havanın ulaşması için pamuk tıkaçları gevşek olacak şekilde yerleştirilir.
- Kavanoz içine yanan bir mum yerleştirilerek desikatör kapağı kapatılır.
- Desikatör kapağına sıvı vazelin sürülerek desikatör içine atmosfer havasının girişi önlenir.

2.4.3. Karbondioksitli Etüv Yöntemi

İçinde basınçlı gaz karışımı bulunan tüplerden anaerob inkübasyon havası (% 5-10 oranında CO₂) sağlayan inkübasyon cihazlarıdır. Bu cihazlarla inkübasyon sırasında CO₂ basıncı sık sık kontrol edilmelidir.



Resim 2.11: Karbondioksitli etüv

2.5. Biyolojik Yöntemlerle Ortamdaki Oksijenin Giderilmesi

Sınırlı bir atmosfer ortamında (petri kutusu içinde) oksijeni çok seven aerob mikroorganizmalarla, anaerob mikroorganizmaları bir arada üretmek temeline dayanır. Besiyeri içinde bulunan normal atmosfer havasında önce aerob mikroorganizma üreyip ortamdaki oksijeni kullanarak anaerob ortam oluşmasını sağlar. Oluşan anaerob ortamda, anaerob mikroorganizma üremeye başlar. Besiyerinde anaerob ortam oluşturmak amacıyla oksijeni seven *Serratia marcescens* veya *Bacillus subtilis* gibi bakteriler kullanılır. Bu yöntemle ortamın oksijeni şu şekilde giderilir:

- Uygun plak besiyeri seçilir.
- Aseptik koşullarda, steril bistüri ve penset kullanılarak besiyeri ortasında 0,5 cm genişliğinde besiyeri kesilip çıkarılır ve iki ayrı besiyeri elde edilir.
- Besiyerinin bir alanına oksijeni seven mikroorganizma türünün yoğun şekilde ekimi yapılır.
- Besiyerinin boş alanına anaerob mikroorganizmanın tek koloni ekimi yapılır.
- Plak besiyerinin kapak kenarları hava geçirmeyecek şekilde parafin ya da camcı macunu ile kapatılır.
- Besiyeri bu hâliyle inkübasyona kaldırılır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Anaerob mikroorganizmaların inkübasyonunu yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ İnkübasyona kaldırılacak besiyerlerinin bulunduğu petri kutularını çalışma masasına sıralayınız.	➤ Kişisel güvenlik önlemlerini alınız.
➤ Jar petri sepetine petri kutularını yerleştiriniz.	➤ Petri kutularını düzgün yerleştirmeye dikkat ediniz.
➤ Jar petri sepetini jar içine yerleştiriniz.	➤ Petri kutularını jar sepetine düzgün yerleştiriniz.
➤ Jar içine anaerobik indikatör (anaerotest) yerleştiriniz.	➤ Anaerobik indikatörü dışarıdan rahatlıkla gözlenecek şekilde yerleştiriniz.
➤ Uygun gas generating kit'in (anaerob veya mikroaerofilik) köşesini makasla kesiniz.	➤ Gas generating kit'in işaretli gösterilmiş çizgili kısmından kesmeye özen gösteriniz.
➤ Gas generating kit'in içine 10 ml su ekleyiniz.	➤ Su miktarının tam olmasına dikkat ediniz.
➤ Gas generating kit'ini jar içine yerleştiriniz.	➤ Gas generating kit'in, katlamadan ve ezilmeden yerleştirilmesine dikkat ediniz.
➤ Jar kapağını kapatınız.	➤ Jar kapağını zaman geçirmeden kapatınız, ➤ Jar kapağını gaz geçişine izin vermeyecek şekilde kapatınız.
➤ Jar kavanozu inkübasyon için etüve kaldırınız.	➤ Etüv sıcaklığını kontrol ediniz.
➤ Peryodik aralıklarla indikatör ayıraç rengini kontrol ediniz.	➤ İndikatör ayıracında meydana gelen olumsuz renk değişimlerinde gerekli önlemleri alınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Oksijensiz ortam oluşturulan tüpteki katı besiyerinde zorunlu anaerob bakteriler besiyerinin hangi kısmında ürer?
A) Besiyerinin yüzeye yakın kısmında
B) Besiyerinin yüzeyinde
C) Besiyerinin orta kısmında
D) Besiyerinin dip kısmında
E) Besiyerinin tüm alanlarında
2. Oksijensiz ortam oluşturulan tüpteki katı besiyerinde mikroaerofilik bakteriler besiyerinin hangi kısmında ürer?
A) Besiyerinin yüzeye yakın kısmında
B) Besiyerinin yüzeyinde
C) Besiyerinin orta kısmında
D) Besiyerinin dip kısmında
E) Besiyerinin tüm alanlarında
3. Aşağıdakilerden hangisi, anaerob inkübasyon yöntemlerinden biri değildir?
A) Besiyerinin redüksiyon şiddetinin artırılması
B) Anaerob kavanoz yöntemi
C) Mumlu kavanoz yöntemi
D) CO₂'li etüv yöntemi
E) Normal atmosfer ortamı
4. Besiyerlerinin redüksiyon şiddetinin artırılması amacıyla indirgen madde olarak aşağıdaki maddelerden hangisi eklenir?
A) % 1-3 agar
B) % 1-5 jelatin
C) % 1-5 glikoz
D) % 1-4 pepton
E) % 1-5 Buyyon

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise “Modül Değerlendirme”ye geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümlelerin başında boş bırakılan parantezlere, cümlelerde verilen bilgiler doğru ise D, yanlış ise Y yazınız.

1. () Anaerop mikroorganizmaların üreyebilmeleri için üreme ortamlarında kesinlikle % 10 CO₂'li ortam sağlanmalıdır.
2. () Mikroorganizmalar, içinde kendilerine karşı etkili antibiyotik ve antikor bulunduran kanlı, serumlu besiyerlerinde iyi ürer.
3. () Otomatik kan kültür sistemleri pahalı olmasına rağmen mikroorganizmaları erken izole etmesi açısından tercih edilir.
4. () Fazla miktarda plak besiyeri varsa etüve sığdırabilmek amacıyla üst üste en fazla 4 petri kutusu konularak sıralanır.

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

5. Aşağıdakilerden hangisi, katı besiyerinde üremeyi olumsuz yönde etkileyen faktörlerden biri değildir?
A) İnkübasyon sıcaklığının besiyeri yüzeyini kurutması
B) Katı besiyerinde, uzak ortamdaki besin maddelerine ulaşamamaları
C) Hücre içi toksik maddelerin difüzyonunun zorlaşması
D) Koloni yapısının büyüklüğü
E) Bakterilerin katı ortamda besin maddelerini kolaylıkla hücre içine difüze etmeleri
6. Mezofil bakterilerin hangi sıcaklık aralığında üremelerini sürdürürler?
A) -10 - 0 °C
B) 10 - 20 °C
C) 35 - 42 °C
D) 45 - 60 °C
E) 50 - 70 °C
7. Katı besiyerinde inkübasyon süresi neyi ifade eder?
A) Mikroorganizmaların besiyerindeki besin maddelerini bitirmesine kadar geçen süreyi
B) Mikroorganizmaların ortamdaki oksijeni bitirmesine kadar geçen süreyi
C) Mikroorganizmanın tanımlanmasını sağlayacak tipik koloni yapılarını oluşturmasına kadar geçen süreyi
D) Mikroorganizmaların ortamdaki karbondioksiti bitirmesine kadar geçen süreyi
E) Mikroorganizmaların besiyerinde üremeleriyle besiyeri ozmotik basıncında değişiklik meydana getirdiği süreyi

8. Anaerob inkübasyon hangi atmosfer ortamında yapılır?
A) Normal atmosfer ortamı
B) Karbondioksit oranı artırılmış atmosfer ortamı
C) Karbondioksit oranı azaltılmış atmosfer ortamı
D) Oksijen miktarı artırılmış atmosfer ortamı
E) Oksijen miktarı azaltılmış atmosfer ortamı
9. Aşağıdakilerden hangisi, inkübasyonda yanlış bir uygulamadır?
A) Etüv havalandırma kapakları kontrol edilmelidir.
B) Etüve petri kutuları en fazla 6 kutu üst üste konulmalıdır.
C) Petri kutularının etüv cidarı ve kendi aralarında en az 2,5 cm aralıkla dizilmelidir.
D) Petri kutularının kapakları üste olacak şekilde etüve kaldırılmalıdır.
E) Etüv iç ısısı devamlı kontrol edilmelidir.
10. Katı besiyerinde yuvarlak, düzgün kenarlı, besiyerinden hafif kabarık, nemli ve homojen koloniler hangi tip kolonidir?
A) S (smooth) koloni
B) R (rough) koloni
C) M (mucoid) koloni
D) L koloni
E) D koloni

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki modüle geçmek için öğretmeninize başvurunuz.

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ 1'İN CEVAP ANAHTARI

1	A
2	E
3	B
4	C
5	D

ÖĞRENME FAALİYETİ 2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	A
3	E
4	C

MODÜL DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI

1	Doğru
2	Yanlış
3	Doğru
4	Yanlış
5	E
6	C
7	C
8	A
9	D
10	A

KAYNAKÇA

- HALKMAN A. Kadir, **Gıda Mikrobiyoloji Uygulamaları**, Ankara, 2007.
- POLAT Şeyda, **Sağlık Meslek Liseleri İçin Ders Kitabı (Laboratuvar Bölümü) Genel Mikrobiyoloji**, Ankara, 2002.
- Türkiye’de Bulaşıcı Hastalıkların Epidemiyolojik Sürveyansı ve Kontrolü Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi (TR 0403.06) “Temel Laboratuvar Yönetimi Eğitimi” Kurs Kitabı Ankara, Mart, 2007.
- ÇOTUK Aysin, **Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri**, Nobel Tıp Kitabevleri, 2003.
- TEMİZ Ayhan, **Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri**, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 2000.
- SEZGİN Nazan, **Mikrobiyoloji Laboratuvarı**, Ankara, 2002.
- BİLGEHAN Hakkı, **Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi** (11 Baskı), İzmir, 2005.
- BİLGEHAN Hakkı, **Klinik Mikrobiyolojik Tanı** (4. Baskı), İzmir, 2004.
- USTAÇELEBİ Şemsettin, **Temel ve Klinik Mikrobiyoloji**, Güneş Kitapevleri, 1999.
- Bildirimi Zorunlu Bulaşıcı Hastalıkların Laboratuvar Tanısına Yönelik Standart Uygulama Prosedürleri Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıkları Araştırma Müdürlüğü Mart, 2008.
- ÖZGÜVEN Volkan, **Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji**, Atlas Kitapçılık Ankara, 2000.
- AKMAN Muvaffak, Ekrem GÜLMEZOĞLU, **Tıbbi Mikrobiyoloji**, Hacettepe Üniversitesi Yayınları / A-15, Ankara, 1976.
- HAYRAN Murat, Tanıl KOCAGÖZ, **Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvar El Kitabı**, Ankara, 1991.
- TEMUR Nermin, **Sağlık Meslek Liseleri İçin Ders Kitabı (Laboratuvar Bölümü) Klinik Mikrobiyoloji**, Ankara, 2001.