

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

ORTA ÖĞRETİM PROJESİ

LABORATUVAR HİZMETLERİ

BOYAMA YÖNTEMLERİ
524LT0020

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	iii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. PREPARAT HAZIRLAMA	3
1.1. Lamların Temizlenmesi.....	3
1.2. Preparat Hazırlama Aşamaları	4
1.3. Boyama.....	5
1.3.1. Boya Çözeltileri.....	6
1.3.2. Boyama Yöntemleri	7
UYGULAMA FAALİYETİ.....	9
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	11
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	12
2. DİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ	12
2.1. Basit Boyama	12
2.2. Gram Boyama	12
2.3. Spor Boyama	14
2.3.1. Malaşit Yeşili ile Spor Boyama	15
2.3.2. Bartholomew ve Mittwer Spor Boyama	16
2.4. ARB Boyama	16
2.5. Boyanmış Preparatların Muhafazası	18
UYGULAMA FAALİYETİ.....	19
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	27
ÖĞRENME FAALİYETİ-3	29
3. İNDİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ	29
3.1. Yaş Preparasyon Tekniği ile Negatif Boyama	29
3.2. Yayma Yöntemi ile Negatif Boyama	30
3.3. Negatif Differensiyal Boyama	31
3.4. Kapsül Boyama	32
UYGULAMA FAALİYETİ.....	33
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	37
MODÜL DEĞERLENDİRME	38
CEVAP ANAHTARI.....	40
KAYNAKÇA	41

AÇIKLAMALAR

KOD	524LT0020
ALAN	Laboratuvar Hizmetleri
DAL/MESLEK	Ortak Alan
MODÜLÜN ADI	Boyama Yöntemleri
MODÜLÜN TANIMI	Preparat hazırlama ve boyama yöntemleri ile ilgili bilgi ve becerilerin kazandırıldığı öğrenme materyalidir.
SÜRE	40/32
ÖN KOŞUL	Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon-1 modülünü başarmış olmak
YETERLİK	Preparatı boyamak
MODÜLÜN AMACI	Genel Amaç Gerekli ortam sağlandığında tekniğine uygun olarak preparat hazırlayıp farklı boyama yöntemleri ile boyayabileceksiniz. Amaçlar 1. Preparat hazırlayabileceksiniz. 2. Direkt boyama yöntemleri ile boyama yapabileceksiniz. 3. İndirekt boyama yöntemlerini ile boyama yapabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Ortam Laboratuvar ortamı, kütüphane, internet, bireysel öğrenme ortamları vb. Donanım Lam, lamel, öze, bunzen beki, küvet, baget, pipet, beher, kurutma kâğıdı, kültür, saf su, kristal viyole, metilen mavisi, lugol, sulu fuksin, safranin, çini mürekkebi, nigrosin, etil alkol, malaşit yeşili, karbol fuksin, asit-alkol karışımı, çini mürekkebi, bazik fuksin, kristal viyole, sedir yağı
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	Modül içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen ölçme araçları ile kendinizi değerlendireceksiniz. Öğretmen modül sonunda ölçme aracı (çoktan seçmeli test, doğru yanlış testi, boşluk doldurma, eşleştirme vb.) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığınız bilgi ve becerileri ölçerek sizi değerlendirecektir.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Mikroorganizmalar çok küçük ve genellikle şeffaf olduklarından mikroskop altında bile incelenmeleri zordur. Bu nedenle mikroskopik incelemelerini daha kolay yapabilmek, daha net görüntü ve kesin bilgi elde edebilmek amacıyla boyanarak incelenmeleri gerekir. Mikroorganizmaların mikroskopik morfolojileri (şekilleri, büyüklükleri, dizilişleri, belirli hücre organellerinin varlığı ve yapısı) ve çeşitli boyalara karşı davranışları (gram pozitif, gram negatif, aside dirençli bakteri) boyanarak belirlenebilir.

Mikroskopik inceleme amacıyla şüpheli kültürlerden veya marazi (hastalık etmeni) maddelerden (organlardan, patolojik sıvılardan, kandan, idrar, gaita, sperma, süt vb.) preparatlar hazırlanır. Hazırlanan yayma preparatlara, alınan örneğe ve muhtemel etkene yönelik farklı boyama yöntemleri uygulanır.

Bu modül preparat hazırlama ve boyama yöntemleri ile ilgili bilgi ve becerileri kazanmanızda sizlere yardımcı olacaktır.

ÖĞRENME FAALİYETİ-1

AMAÇ

Gerekli ortam sağlandığında tekniğine uygun olarak preparat hazırlayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Mikrobiyolojide kullanılan boyaları, boyanma mekanizmalarını ve en sık kullanılan boyama yöntemlerini araştırınız.

1. PREPARAT HAZIRLAMA

Mikroskopta incelenmeye hazır hale getirilmiş numuneye “preparat” denir. Preparata boyama işlemi yapılırsa bunlar boyalı preparat olarak belirtilir. Mikroskopik inceleme amacı ile şüpheli kültürlerden veya marazi maddelerden (organlardan, patolojik sıvılardan, kandan, idrar, gaita, sperma, süt vb.) preparatlar hazırlanır. Lamın üstüne kültür veya numuneden konulup lamel kapatılarak yayma, kurutma, fikse etme gibi işlemler yapılarak preparat hazırlanır.

Preparat hazırlamada kullanılacak lamaların kalitesi (şeffaflığı, yüzeylerinin çiziksiz olması, kenarlarının ve ölçülerinin düzgünlüğü, kalınlığının homojenliği ve camın sağlamlığı) ve temizliği son derece önemlidir. Lam üzerinde bulunan çok küçük bir leke, toz, kalıntı veya çizik mikroskopta yanlış algılamalara neden olabilir ve görüntünün net olarak görülmesini engelleyebilir.

1.1. Lamaların Temizlenmesi

Yeni hiç kullanılmamış lamaların yüzeylerinde parlak görünmesi amacıyla kullanılan bazı kimyasal maddeler vardır. Lamalar temizlenerek bu kimyasallar uzaklaştırılmaz ise lam üzerine yayılan numunenin lama tutunması (yapışması) azalır. Yıkama sırasında numune lamdan ayrılır veya aralarda boşluklar oluşur. Bu nedenle, hiç kullanılmamış yeni lamaların da kullanılmadan önce yıkanması ve temizlenmesi gerekir.

1

Hiç kullanılmamış (yeni) lamaların temizliği toplu olarak yapılacaksa kromik asit çözeltisinde bekletilerek, tek tek veya kullanılacağı anda yapılacaksa % 96'lık etil alkol - eter (1:1) karışımı ile yapılmaktadır.

Hiç kullanılmamış (yeni) lamaların kromik asit çözeltisi ile temizliğinin yapılışı:

- Lamalar, birbirine temas etmeyecek şekilde ızgaralara yerleştirilir.
- Kromik asit çözeltisinin bulunduğu kaba konularak 12 saat bekletilir.
- Lamalar, kromik asit çözeltisinden alınarak musluk suyu altında iyice durulanır.
- Saf su ile son durulama yapılır.
- Yumuşak dokulu, temiz ve kuru pamuklu bir bezle veya kâğıtla silinir.

Kullanılmış (kültürle temas eden) lamalar, kullanım sonrasında mutlaka dezenfektan içerisinde konulmalıdır. Dezenfektan içerisinde biriken lamalar yeniden kullanılacaksa mutlaka temizlenmesi gerekir. Günümüzde lamaların tekrar tekrar kullanılmasına ihtiyaç (ekonomik ve teknik prosedür gereği) azalmıştır.

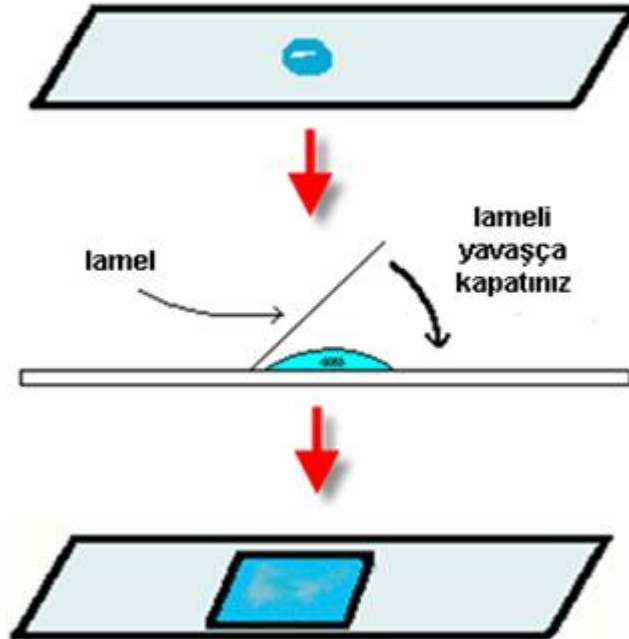
Kullanılmış kirli lamaların temizliğinde aşağıdaki işlem basamakları takip edilir:

- Yıkama kabına deterjanlı su (mümkünse sıcak su) hazırlanır.
- Lamlar deterjanlı suyun içerisinde konularak 1–2 gün bekletilir.
- Lamlar yumuşak pamuklu bezle ovularak veya fırça ile fırçalanarak kirler tamamen uzaklaştırılır.
- Kirli su boşaltıldıktan sonra daha az deterjanlı su ile lamalar bir kez daha yıkanır.
- Musluk suyu altında iyice durulanır.
- Saf su ile son durulama yapılır.
- Yumuşak dokulu, temiz ve kuru pamuklu bezle veya kâğıtla silinir.

Silme, paketlenme ve kullanıma hazırlama işlemleri sırasında lamalar kenarlarından tutulmalı ve lamaların yüzeyine asla dokunulmamalıdır. Yıpranmış, çizilmiş ve yeterince temiz görünmeyen lamalar kullanılmadan atılmalıdır.

1.2. Preparat Hazırlama Aşamaları

Preparat hazırlamada kullanılacak lam, ksilol veya etil alkolle ıslatılarak temiz bir bezle silinip alevden geçirilir ve aşağıdaki aşamalar takip edilerek preparat hazırlanır.



Şekil 1.1: Lam-lamel arası preparat hazırlama

- **Boyasız inceleme için preparat hazırlama**
 - Temiz bir lamın ortasına 2–3 öze dolusu sıvı kültür konur.
 - Lam üstündeki kültür sıvısının kenar kısmına yaklaşık 450 eğimle bir lamel temas ettirilir.
 - Lamel yavaşça (lam ile lamel arasında hava kabarcığı kalmaya cak şekilde) lam üzerine kapatılır.
- **Direkt boyama yöntemleri için preparat hazırlama**
 - Temiz bir lamın ortasına bir damla damıtık su veya FTS konur (Sıvı kültürlerden preparat hazırlanacaksa kültür yoğunluğuna bağlı olarak buna gerek görülmeyebilir.).
 - Kültürden öze ile alınan örnek, su damlası yanında ezilerek su damlası ile azar azar karıştırılır.
 - Lamın üzerine ince bir tabaka halinde ve yavaşça (etrafa sıçratmadan) yayılır.
 - Havada kuruması sağlanır (Kurutma işlemi, preparatlar oda veya etüv ısısında bırakılmak suretiyle yapılabilir. Kurutma işlemi sırasında, lam üzerinde bulunan mikroplar hafifçe lama yapışırlar. Ancak, su ile yıkandıklarında düşebilirler.).
 - Mikroorganizmaların lam üzerine tespiti (fiksasyon) yapılır.

Preparatların tespit (fiksasyon) edilmesindeki temel amaç bakterilerin lama yapışmalarını sağlayarak tutturmandır. Bu suretle üzerlerine uygulanacak sıvılarla lamdan ayrılmaz. Tespit işlemi genellikle “ısı uygulama ile tespit” veya “kimyasal maddelerle tespit” olmak üzere iki yöntemle yapılır.

Laboratuvarda, bakteriyolojik preparatların tespitinde en sık kullanılan yöntem ısı uygulama ile tespit yöntemidir. Kurutulan preparat, bir ucundan özel pensle tutulup alevden 3-4 defa geçirilerek tespit edilir. Tespit sırasında preparatın yanmamasına dikkat edilir. Yanmış preparatlarda mikroorganizmalar dağılmış, şişmiş ve deforme olmuş bir şekilde görülür.

Isı ile bozulabilecek ökaryot hücrelerden ve protein yönünden zengin numunelerden (kan ve dokulardan) yapılan preparatlara kimyasal tespit uygulanır. Kimyasal tespit işlemi etil alkol, metil alkol, alkol-eter, alkol-aseton gibi kimyasal maddeler içerisinde bekletilerek yapılır. Metil alkol de 3–4 dakika, etil alkol de 10 dakika bekletilen preparat çok hafif akan suda yıkanıp kurutulur.

1.3. Boyama

Mikroorganizmalar, mikroskop altında boyasız incelenemediği gibi iyi ve detaylı görebilmek, identifikasyonlarına (tanıma, tanımlama, mikroorganizmanın cins ve türünün belirlenmesi) yarayacak bazı bilgileri (spor, kapsül, şekil, boya reaksiyonları vb.) elde edebilmek için boyanarak incelenmeleri de gerekir. Bu amaçla, kültürlerden veya marazi maddelerden usulüne uygun olarak preparatlar hazırlanır, boyanır ve mikroskopta incelenir.

1.3.1. Boya Çözeltileri

Boya, bir benzen halkasına bağlı kromofor ve oksokrom gruplarını taşıyan bir bileşiktir. Kromofor grup boyaya renk, oksokrom grup ise boyanacak materyale bağlanma özelliğini verir. Günümüzde, mikrobiyoloji alanında doğal boyalar (karmin, orsein, indigo, kınakına vb.) yerine daha çok sentetik boyalar kullanılmaktadır.

1.3.1.1. Boya Çeşitleri

Boyalar, boya molekülünün elektriksel yüküne göre asidik, bazik ve nötr boyalar olmak üzere üç gruba ayrılır:

- Asidik Boyalar: İyonize oldukları zaman, negatif elektrikle yüklenirler. Bunlar renkli asitlerin tuzlarıdır (Genellikle sodyum tuzudur, bazen potasyum, kalsiyum veya amonyum tuzları da olabilir.). Asidik boyalar arasında asit fuksin, safranin, pikrik asit, eozin, nigrosin, kongo kırmızısı bulunmaktadır.
- Bazik Boyalar: İyonize oldukları zaman, pozitif elektrikle yüklenirler. Bunlar renkli bazların tuzlarıdır (genellikle klorid benzen sülfat, okzalat ve asetat). Bazik boyalar arasında metilen mavisi, kristal viyole, bazik fuksin, safranin, malaşit yeşili bulunmaktadır.
- Nötr Boyalar: Asidik ve bazik boyaların uygun oranda karışımlarından elde edilir (Giemsa, Wright, Leishman vb.).

1.3.1.2. Boya Çözeltilerinin Hazırlanması

Boya çözeltileri hazırlanırken boyanın özelliği ve kullanılma amacına uygun olarak farklı işlemler veya farklı çözücü sıvılar kullanılabilir.

Genel olarak boya çözeltisi hazırlanmasında takip edilen işlem basamakları şunlardır:

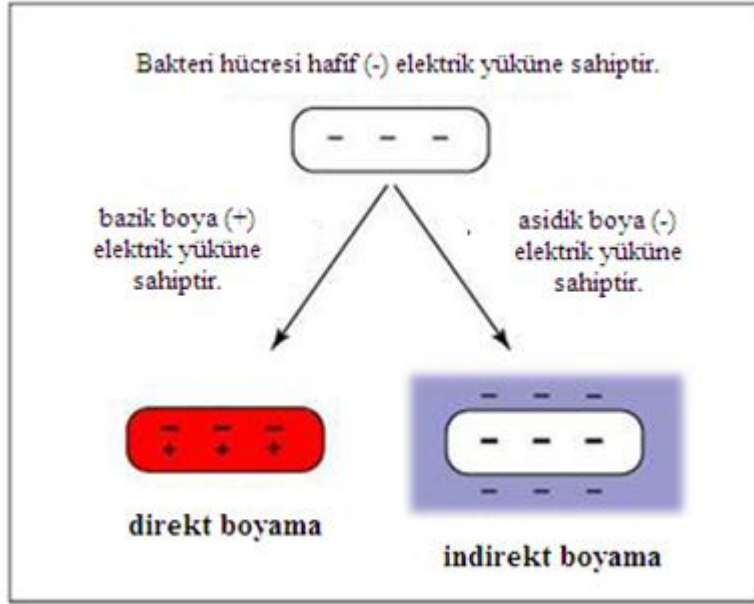
- Tablo 1.1'de belirtilen miktarda boya tartılır.
- Tartılan boya porselen havan içinde havan eli ile ezilir.
- Havana belirtilen miktarda çözücü (bazik boyalarda alkol, asidik ve nötr boyalarda ise su) azar azar eklenir ve havan eliyle ezme işlemine devam edilir.
- Boya maddesi tamamen çözündürülüp uygun bir kaba aktarılır.
- Saf su ile hacmi tamamlanır.
- Çözelti filtre kâğıdından süzülür.
- Koyu renkli şişelerde 1–2 gün dinlendirildikten sonra kullanılır.

BOYA ÇÖZELTİSİ	KULLANIM AMACI	HAZIRLANIŞI
Bazik fuksin	Basit ve gram boyama	0,1 g boya tartılır ve 100 ml distile su içerisinde çözündürülür.
Karbol fuksin	ARB boyama	0,3 g boya tartılır ve 10 ml etanol (%95'lik) içerisinde çözündürülür. 90 ml %5'lik fenol çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırılır. 1 gün dinlendirildikten sonra kullanılır.
Sulu Karbol fuksin	Basit ve gram boyama	Karbol fuksin boya çözeltisi 10 kat sulandırılarak hazırlanır.
Kristal viyole	Basit ve gram boyama	2 g boya tartılır ve 20 ml etanol (%95'lik) içerisinde çözündürülür. 0,8 g amonyum okzalat tartılır ve 80 ml distile su içerisinde çözündürülür. İki çözelti iyice karıştırılır.
Safranin	Basit ve spor boyama	0,5 g boya tartılır ve 10 ml etanol (%95'lik) içerisinde çözündürülür. 100 ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılır ve süzülür.
Malaşit yeşili	Spor boyama	5 g boya tartılır ve 100 ml distile su içerisinde çözündürülür.
Metilen mavisi	Basit ve ARB boyama	0,3 g boya tartılır ve 30 ml etanol (%95'lik) içerisinde çözündürülür. 70 ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılır ve filtre kâğıdından süzülür.
Laktofenol	Küflerin boyasız incelenmesi	100 g fenol tartılır ve 100 ml distile su içerisinde hafifçe ısıtılarak çözündürülür. Üzerine 100 ml laktik asit ve 200 ml gliserol ilave edilerek iyice karıştırılır.
Laktofenol blue	Küflerin boyalı incelenmesi	100 g fenol tartılır ve 100 ml distile su içerisinde hafifçe ısıtılarak çözündürülür. Üzerine 0,075 g metilen mavisi, 100 ml laktik asit ve 200 ml gliserol ilave edilerek iyice karıştırılır.
Laktofenol pikrik asit	Küflerin boyalı incelenmesi	100 g fenol tartılır ve 100 ml doymuş pikrik asit çözeltisi içerisinde çözündürülür. Üzerine 100 ml laktik asit ve 200 ml gliserol ilave edilerek iyice karıştırılır.
Nigrosin	Negatif boyama	10 g boya tartılır ve 100 ml distile su içerisine aktarılır ve kaynar su banyosunda yarım saat tutulur. Üzerine 0,5 ml formalin koruyucu olarak eklenir. Çift katlı filtre kâğıdından süzülür.

Tablo 1.1: Boya Çözeltileri

1.3.2. Boyama Yöntemleri

Mikroorganizmalar oldukça küçük ve genellikle şeffaf olduklarından dolayı mikroskop altında bile incelenmeleri zordur. Mikroorganizmaların mikroskopik incelemelerini daha kolay yapabilmek, daha net ve kesin bilgi elde edebilmek amacı ile boyanarak incelenmeleri gerekir. Mikroorganizmalar boyandığında mikroskopik morfolojileri (şekilleri, büyüklükleri, diziliş şekilleri, belirli hücre organellerinin varlığı ve yapısı) ve çeşitli boyalara karşı davranışları (gram pozitif, gram negatif, aside dirençli bakteri) belirlenebilir.



Şekil 1.2: Direkt ve indirekt boyama

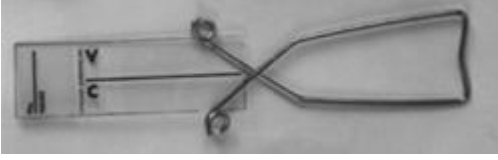
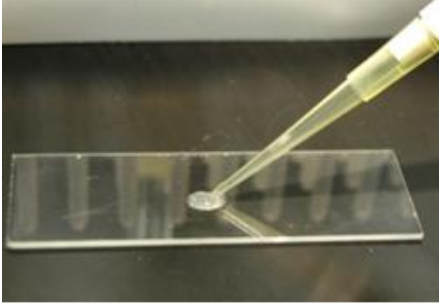


Bakteri hücresi negatif elektriksel yüke sahip olduğundan bazik boyalar ile boyanır. Boyama işleminde bazik boya kullanılıyor ise bakterinin kendisi boyanır, bu tip boyama “direkt boyama” olarak adlandırılır. Asidik boyalar bakterileri boyamaz zemini boyar böylece bakteriler renksiz görünür. Bu boyama türüne “indirekt (dolaylı) boyama” adı verilir. Nötr boyalar kan ve doku preparatlarının boyanmasında, kanın şekilli elemanları, hücreler ve bazı parazitlerin daha etrafıca gözlenmelerinde kullanılır.

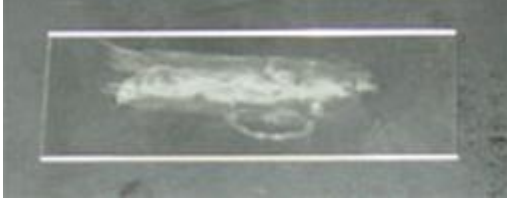

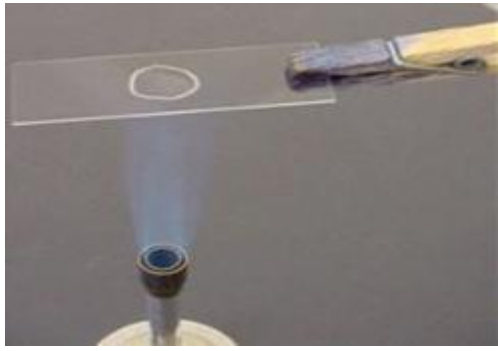
Kullanılan boya sayısına göre de boyama yöntemleri 2 grupta değerlendirilmektedir. Boyamada bir boya çözeltisi kullanılıyorsa “basit boyama”, birden fazla boyanın iştiraki ile yapılıyorsa “bileşik boyama” olarak adlandırılmaktadır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak preparat hazırlayınız.

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç gereçler: Lam, öze, kültür, bunzen beki

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>➤ Temiz bir lam alınız.</p> 	<p>➤ Bütün lamlar (hiç kullanılmamış olsa bile) mutlaka yıkanmalı, temizlenmeli ve ondan sonra kullanılmalıdır.</p>
<p>➤ Lamın ortasına bir damla saf su koyunuz (Sıvı kültürlerde buna gerek duyulmayabilir.).</p> 	<p>➤ Steril kabin veya bunzen bek alev çatısı altında çalışınız.</p> <p>➤ Aseptik teknik uygulayınız.</p>
<p>➤ Özeyi steril ettikten sonra kültürden örnek alınız.</p> 	<p>➤ Özeyi bunzen bek alevinde steril edip soğuttuktan sonra kullanınız.</p>
<p>➤ Alınan örneği su damlasının yanında eziniz.</p> 	<p>➤ Seri çalışınız.</p>

<p>➤ Su damlası ile karıştırarak lamın üzerine yayınız.</p> 	<p>➤ İnce bir film tabakası oluşturacak şekilde yayınız.</p>
<p>➤ Havada kurumasını sağlayınız.</p> 	<p>➤ Tamamen kuruyuncaya kadar bekleyiniz.</p>
<p>➤ Lamın alt yüzünü üç defa bek alevinden geçiriniz.</p> 	<p>➤ Alevde aşırı bekletmeyiniz. ➤ Preparatın yanmamasına dikkat ediniz.</p>

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Asidik boyalar bakterileri boyamaz zemini boyar böylece bakteriler renksiz görünür. Bu boyama türü aşağıdakilerden hangisidir?
A) Direkt boyama
B) Basit boyama
C) İndirekt boyama
D) Bileşik boyama
2. Preparat hazırlamada kullanılacak lamlar ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?
A) Çok temiz olmalıdır.
B) Hiç kullanılmamış (yeni) lamlar temizlenmeden kullanılmalıdır.
C) Saydam olmalıdır.
D) Çiziksiz ve pürüzsüz olmalıdır.
3. Boya ile boyanacak yüzey arasındaki tutuculuğu artırma etkisini ifade eden terim aşağıdakilerden hangisidir?
A) Mordant
B) Fiksasyon
C) Kromofor
D) Oksokrom
4. Bakteri hücresi bazik boyalar ile boyanır. Bunun sebebi aşağıdakilerden hangisidir?
A) Bakteri hücresinin pozitif elektriksel yüke sahip olması
B) Bakteri hücresinin negatif elektriksel yüke sahip olması
C) Bazik boyaların kromofor grup içermesi
D) Bazik boyaların oksokrom grup içermesi
5. Mikrobiyolojide kullanılan boylarla ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?
A) Boya bir benzen halkasına bağlı kromofor ve oksokrom gruplarını taşıyan bir bileşiktir.
B) Kromofor grup boyaya renk özelliğini verir.
C) Oksokrom grup boyanacak materyale bağlanma özelliğini verir.
D) Bütün boylar bakteri hücrelerini boyar.
6. İncelemesi biten preparatlar ne yapılır?
A) Çöpe atılır.
B) Hemen yıkanır.
C) Dezenfektanın içine atılır.
D) Antiseptiğin içine atılır.

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

Gerekli ortam sağlandığında tekniğine uygun olarak direkt boyama yöntemleri ile boyama yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Direkt boyama yöntemlerini ve yapılış amaçlarını araştırınız.
- Gram pozitif ile gram negatif bakteriler arasındaki farkları araştırınız.

2. DİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ

Direkt boyama yöntemlerinde bazik boya kullanılarak bakterilerin kendisi boyanmaktadır. Çünkü bakteri hücresi negatif, bazik boyalar ise pozitif elektriksel yüke sahiptir. Zıt elektriksel yük birbirini çektiğinden bakteri hücresi boyanır. Direk boyama yöntemleri içerisinde basit, gram, spor, ARB boyama yöntemleri yer almaktadır.

2.1. Basit Boyama

Mikroorganizmaların ve özellikle bakterilerin mikroskopik morfolojilerinin incelenebildiği boyama yöntemidir. Bu amaçla farklı boyalar kullanılsa da en yaygını Löffler'in metilen mavisi çözeltilisidir. Bakteriler, kullanılan boyanın rengini alır.

Basit boyama yönteminde aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanır:

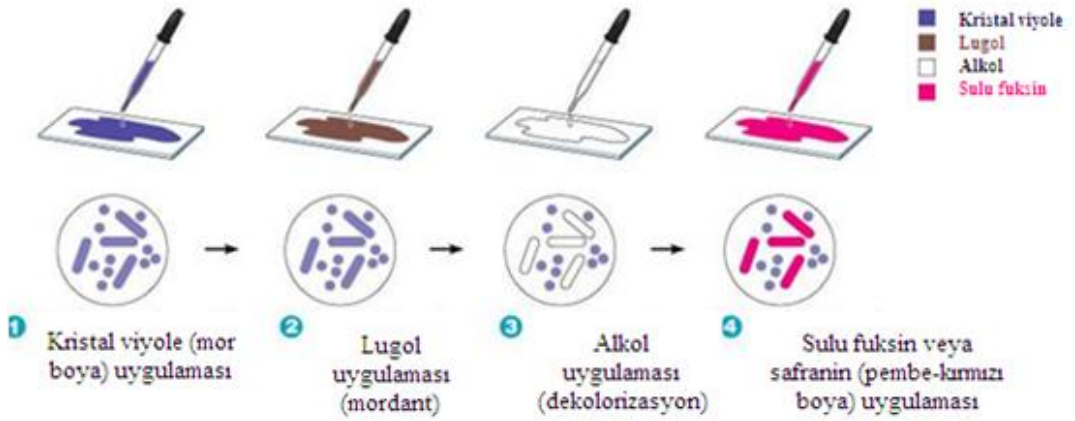
- 1.2’de belirtildiği şekilde preparat hazırlanır (yayma, kurutma, tespit).
- Preparatın üzerine boya çözeltisi eklenerek kaplanır.
- Yeterli süre (Löffler'in metilen mavisi kullanılmışsa 30–60 saniye, karbol fuksin kullanılmışsa 5–10 saniye, kristal viyole kullanılmışsa 20–30 saniye) beklenir. Eğer daha uzun süre temas olursa bakteriler ile diğer cisimlerin ayırt edilmesi güçleşir.
- Boya dökülerek preparat distile suyla yıkanır.
- Preparat havada veya kurutma kâğıdı ile kurutulur.
- Mikroskopta incelenir.

2.2. Gram Boyama

Gram boyama tekniği, mikrobiyolojide sık kullanılan bir boyama yöntemi olup mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılır. Gram boyama ile bakteriler “gram pozitif” (gram olumlu) ve “gram negatif” (gram olumsuz) olarak ikiye ayrılır.

Basillerin yaklaşık yarısı, kokların büyük kısmı ve mantarlar gram pozitifdir. Spiral şekilli bakteriler ise gram negatiftir. Gram pozitif bakterilere örnek olarak *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* verilebilir. Gram negatif bakterilere örnek olarak *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes* verilebilir.

Gram boyama için hazırlanacak preparatlarda kullanılacak kültürlerin genç (18–24 saatlik) olması gerekir. Daha yaşlı kültürlerle çalışılması durumunda yanlış sonuçlar alınabilir. Gram (+) bakteriler de gram (-) gibi değerlendirilebilir.



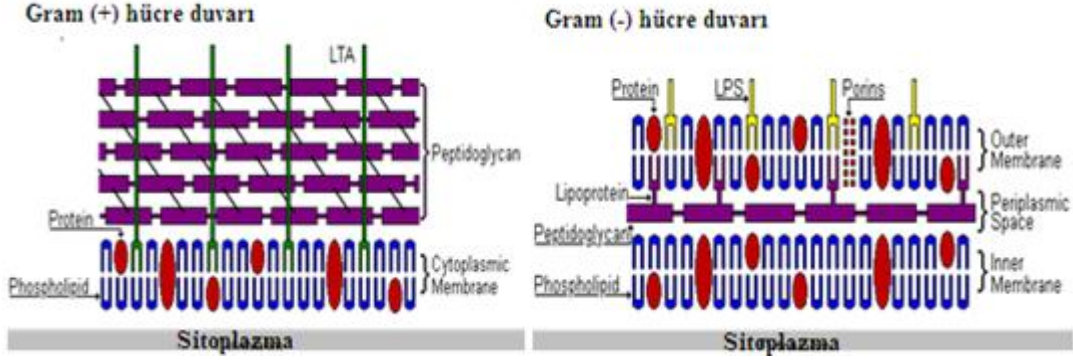
Şekil 2.1: Gram boyama aşamaları ve her aşamada bakterilerin renkleri

En sık uygulanan gram boyama yönteminde aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanır:

- 1.2’de belirtildiği şekilde preparat hazırlanır (yayma, kurutma, tespit).
- Preparatın üzerine kristal viyole boya çözeltisi eklenerek kaplanır ve 1 dakika beklenir.
- Preparat bol distile suyla yıkanır.
- Preparatın üzerine lugol çözeltisi eklenerek kaplanır ve 1 dakika beklenir.
- Preparat distile suyla yıkanır.
- Preparatın üzerine %95’lik etanol veya asit-alkol karışımı eklenerek 10–15 saniye beklenir.
- Preparat distile suyla yıkanır.
- Preparatın üzerine sulu füksin veya safranin boya çözeltisi eklenerek kaplanır ve 30 saniye beklenir.
- Preparat bol distile suyla yıkanır.
- Preparat havada veya kurutma kâğıdı ile kurutulur.
- Mikroskopta incelenir. Mor renkte görülen mikroorganizmalar gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise gram (-) olarak değerlendirilir.

Gram (+) ve gram (-) mikroorganizmaların tamamı kristal viyole boyası ile mor renge boyanırlar. Preparata eklenen lugol solüsyonu ile gram (+) bakterilerin oluşturdukları yapı, daha sonra ortama eklenen alkol ile giderilemez. Oysa gram (-) bakterilerin oluşturduğu yapı alkol ile giderilebilir. Bir başka deyişle, boya, bakteri hücrelerinden dışarıya çıkarılır (dekolorizasyon).

Gram (-) bakterilerin renkleri alkolle gittiğinden ortama daha sonra eklenen sulu füksin ile boyanır. Böylece gram (+) bakteriler mor renkte (kristal viyole rengi), gram (-) bakteriler pembe-kırmızı renkte (sulu fuksin rengi) boyanır.



Şekil 2.2: Gram pozitif ve gram negatif hücre duvarı

Gram boyanma özelliği bakteri hücre duvarının (çeperi) yapısı ile ilgilidir. Hücre duvar yapıları arasındaki farklar:

- Gram (+) bakterilerin hücre çeperinde gram (-) bakterilere göre daha kalın peptidoglikan tabakası mevcuttur.
- Gram (+) bakterilerin hücre çeperinde karbonhidratlar, gram (-) bakterilerin hücre çeperinde lipidler fazladır. Karbonhidratlar alkolle dekolaryasyon esnasında dehidratasyona (su molekülünün açığa çıkması) uğrar. Porlar iyice büzülür, daralır ve boya dışarı çıkamaz. Lipitler de ise alkol çözücüdür ve hücre çeperinde olan porlar daha çok açılarak genişler.
- Gram (+) hücre çeperinde teikoik asit olmasına rağmen gram (-) yoktur.

2.3. Spor Boyama

Bazı bakteriler, hücre içerisinde dış etkenlere karşı daha dirençli olan ve “endospor” olarak adlandırılan özel formlar oluşturur. Endospor oluşumundan sonra bakteri hücresi ölebilir veya çeşitli etkenlerle hücre parçalanarak dağılır. Bu durumda endosporlar serbest hale geçer. Bunlara “spor” denir. Sporların soğuk, sıcak, UV (ultraviyole), ozmotik basınç gibi fiziksel etkilere ve kimyasal maddelere karşı vejetatif hücrelerden daha dayanıklı olması, kimyasal ve fiziksel yapılarının farklılığından kaynaklanmaktadır.

Vejetatif hücre normal boyalarla boyanmasına karşın sporun etrafında kalın muhafazaların bulunması ve bunların geçirgen olmaması boyanmalarını zorlaştırır. Bundan dolayı özel spor boyama yöntemleri geliştirilmiştir. Endosporların normal çevre sıcaklıklarında boyaları içlerine almaya karşı dirençleri vardır. Ancak boyama esnasında ısı işlem uygulanması endosporların bu direncini kırmakta ve endosporların boyayı içlerine alarak boyanmalarını sağlamaktadır. Spor boyaması için başlıca iki metot geliştirilmiştir.

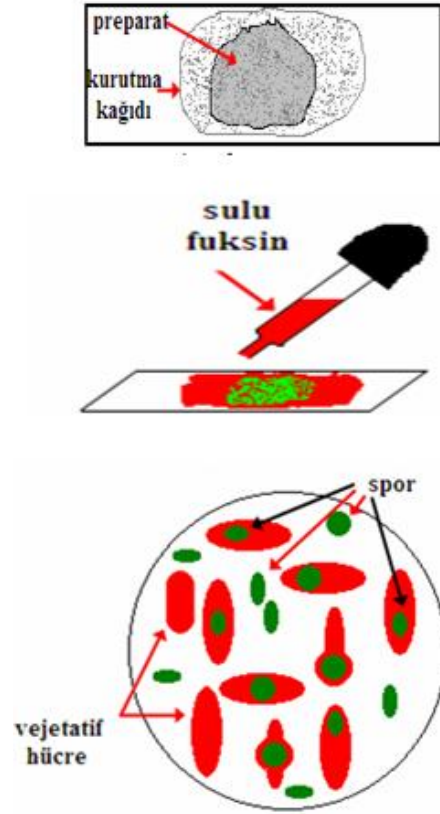
2.3.1. Malaşit Yeşili ile Spor Boyama

Malaşit yeşili ile spor boyama aşamaları aşağıda açıklanmıştır.

- 1.2’de belirtildiği şekilde incelenecek bakteri kültürü ile preparat hazırlanır (yayma, kurutma ve tespit).
- Preparat uygun bir kaynar su banyosu düzeneğinin üstüne yerleştirilir.
- Preparatın üzeri % 5’lik malaşit yeşili boya çözeltisi ile kaplanır. Bunun üzerine daha önceden lamdan daha küçük boyutta olacak şekilde kesilerek hazırlanmış olan bir kurutma kâğıdı yerleştirilir. Kurutma kâğıdı boya çözeltisini çekerek ıslanır.

Kurutma kâğıdının üzerine malaşit yeşili boya çözeltisi damlatılarak kâğıdın sürekli ıslak kalması sağlanır.

- Kurutma kâğıdının ıslaklığı azaldıkça malaşit yeşili boya çözeltisi damlatılarak preparat bu şekilde 5–6 dakika boyanır.
-
- Süre sonunda kurutma kâğıdı bir pensle alınarak atılır, preparat yıkanır.
-
- Sulu fuksin veya % 0,5’lik safranin ile 20–30 saniye boyanır.
-
- Yıkanır ve havada kurutulur.
-
- Mikroskopta incelenir. Bu boyamada bakteriler pembe-kırmızı, sporlar yeşil olarak görülür.



Şekil 2.3: Spor boyama

2.3.2. Bartholomew ve Mittwer Spor Boyama

- 1.2’de belirtildiği şekilde incelenecek bakteri kültürü ile preparat hazırlanır (yayma, kurutma ve tespit).
- Preparat, alttan 20 kez bunzen bek alevinden geçirilir.
- Preparatın üzeri doymuş sulu malaşit yeşili çözeltisi ile kaplanır ve 10 dakika bekletilir.
- Boya, soğuk su altında 10 saniye kadar yıkanır.
- Preparat karşıt boya olarak % 0.25’lik safranin çözeltisi ile kaplanır ve 15 saniye bekletilir.
- Su ile yıkanır ve kurutulur.
- Mikroskopta incelenir.

2.4. ARB Boyama

Bazı bakteri türleri hücre duvarlarındaki farklı özelliklerinden dolayı asitlere karşı daha dirençlidirler. Aside dirençli bakterilerin hücre yapısında diğer bakterilere göre daha fazla lipit bulunur. Ayrıca hücrenin etrafında balmumumsu bir tabaka vardır. Tüberküloz, lepra basili, nokardialar ve diğer mikobakteriler bu gruba girer.

Aside dirençli bakteriler diğer boyama yöntemleri ile kolay boyanamazlar. Boyanmaları için fenollü ve yoğun boya eriyiklerinin uzun süre ya da sıcaklık etkisi ile uygulanması gerekir. ARB boyama tüberküloz (verem) hastalığının tanısında en hızlı, ucuz ve pratik bir yöntemdir.

Preparat hazırlama aşaması, personel ve çevreyi korumak için güvenlik kabini içinde yapılmalıdır. Hazırlanan preparat korunaklı bir yerde kurutulmalı, tespit işleminden sonra da basilin canlı kalabileceği unutulmamalıdır.

ARB boyamada yaygın olarak kullanılan üç farklı yöntem vardır: İki karbol fuksin esaslı olan “Ziehl-Neelsen” ve “Kinyoun” boyama, üçüncüsü ise “florokrom” boyamadır. Florokrom boyama daha duyarlı ve daha az zaman alıcı bir yöntem olmakla birlikte, daha pahalı laboratuvar donanımı (floresan mikroskop ve boyalar) ve tecrübeli personel gerektirmesi nedeniyle sınırlı olanaklara sahip laboratuvarlar için pek uygun değildir. Ayrıca Florokrom boyama yöntemi ile pozitifliği saptanan örneklerde de EZN boyama yöntemi ile teyit edilmesi önerilmektedir.

Ehrlich Ziehl-Neelsen (EZN) ve Kinyoun yöntemlerinde birinci boya olarak karbol fuksin, zıt boya olarak metilen mavisi kullanılır. Bu nedenle aside dirençli hücreler mavi zeminde pembe-kırmızı renkte görünürler.

EZN boyama metodu, ARB boyama yöntemlerinden en sık kullanılanıdır. EZN boyama yönteminde aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanır:

- 1.2’de belirtildiği şekilde incelenecek bakteri kültürü ile preparat hazırlanır (yayma, kurutma ve tespit).
- Preparatlar boya sehпасı üzerine dizilir. Preparatlar arasında belirli bir aralık bırakılmalıdır. Preparatların birbiriyle temas etmesi çapraz kontaminasyona yol açabilir.
- Preparatın üzerine bütün lamı kaplayacak şekilde karbol fuksin boya solüsyonu damlatılır.
- Preparat alttan 5 dakika boyunca ısıtılır (Isıtma işlemi, bunzen beki veya pamuklu tel ile yapılabilir. Bunun için yaklaşık 30 cm uzunluğundaki bir telin ucuna pamuk sarılır ve bastırılarak sıkılaştırılır. Pamuk alkole batırıldıktan sonra yakılır, lamaların altlarında gezdirilerek ısıtma işlemi gerçekleştirilir. Isıtma öyle olmalıdır ki boyadan buhar çıkmalı ama kesinlikle kaynamamalıdır. Lamin üstünde buharlaşmadan dolayı boyasız yer görülürse hemen boya ilave edilmelidir.)
- Preparatların soğuması beklenir. Soğuyunca üzerindeki boya akıtılır. Preparatlar sudan geçirilerek geride kalan boya artıkları uzaklaştırılır.
- Preparat asit-alkol karışımı ile dekolorize edilir (Preparatların üzeri asit-alkol ile kaplanır, bir süre bekletildikten sonra asit-alkol akıtılır, preparat sudan geçirilir. Bu işlem boya akmayıncaya kadar ‘en fazla 3 dakika’ sürdürülür. Preparatlar üzerinde kalan fazla su akıtılarak maksimum düzeyde uzaklaştırılır.)
- Tekrar boyama sehпасına koyulan lamaların üzeri metilen mavisi ile kaplanır. 1 dakika beklenir.
- Boya dökülür ve distile su ile yıkanır.

- Havada (Kurutma sehmasına dizilerek) kurutulur ve mikroskopta incelenir. Aside dirençli bakteriler pembe-kırmızı renkte, diğerk mikroorganizmalar ise mavi renkte görülürler. Preparatlar tamamen kurumadan incelemeye alınmamalıdır. Boyanmış preparatlar, aside dirençli basillerin renginin solmaması için güneş ışığından korunmalıdır.

2.5. Boyanmış Preparatların Muhafazası

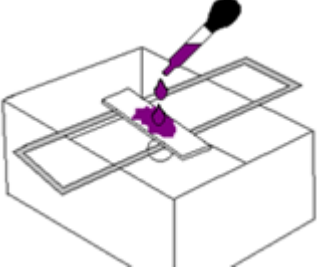

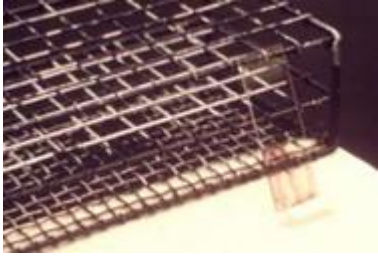

Boyanmış preparatlardan bazılarının inceleme sonrasında ileride tekrar faydalanılmak üzere muhafaza edilmesi gerekebilir. Aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmış preparat uzun süre bozulmadan saklanabilir.

- Preparat üzerinde immersiyon yağı varsa ksilol ile yıkanarak uzaklaştırılır.
- Havada kurutulur.
- Preparat üzerine bir damla kanada balsamı damlatılır.
- Üzerine lamel kapatılır ve lamelin üzerine hafifçe bastırılarak balsamın lamelin altında iyice yayılması sağlanır.
- 2–3 dakika süreyle lamel üzerine parmakla baskı yapılarak beklenir.
- Nemsiz, kuru bir ortamda iki hafta kurumaması için bekletilir.
- Lamel çevresindeki balsam artıkları temizlenir.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak basit boyama yapınız.

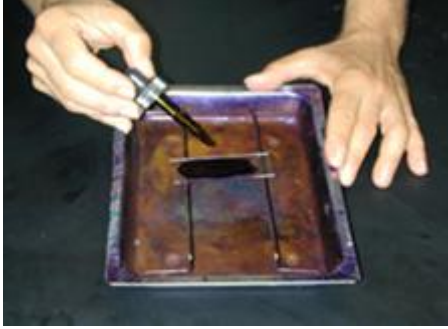

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç gereçler: Lam, öze, saf su, kültür, bunzen beki, kristal viyole

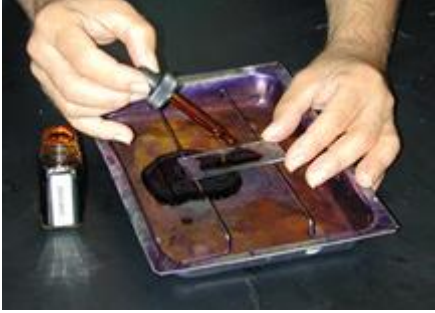

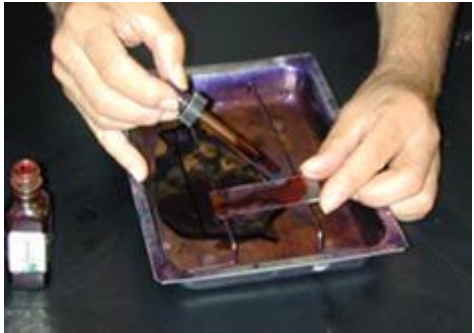
İşlem Basamakları	Öneriler
<p>➤ Preparatı hazırlayınız.</p> <p>➤ Preparat üzerini kristal viyole ile kaplayarak 1 dakika bekletiniz.</p> 	<p>➤ 1. öğrenme faaliyetinde belirtildiği şekilde preparat hazırlayınız.</p> <p>➤ Yeterli miktarda boya damlatınız.</p> <p>➤ Gereğinden fazla bekleterek boyanın kurumasına fırsat vermeyiniz.</p>
<p>➤ Boyayı dökerek preparatı saf su ile yıkayınız.</p> 	<p>➤ Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.</p>
<p>➤ Preparatı kurutunuz.</p> 	<p>➤ Preparatı kendi halinde bekleterek (oda sıcaklığında) veya kurutma kâğıdı ile kurutunuz.</p> 

UYGULAMA FAALİYETİ

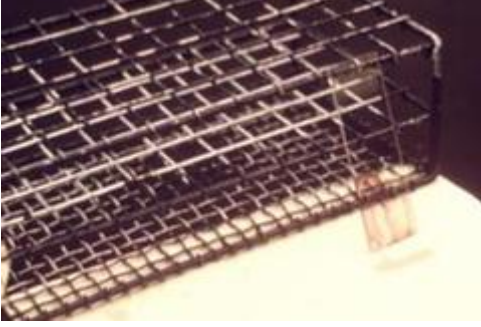
Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak gram boyama yapınız.

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç ve gereçler: Kültür, metilen mavisi, kristal viyole, lugol, sulu fuksin, safranin, çini mürekkebi, nigrosin, öze, küvetler, bağıt, % 96'lık etil alkol, pipet, saf su, bunzen beki

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>➤ Preparatı hazırlayınız.</p>	<p>➤ 1. öğrenme faaliyetinde belirtildiği şekilde preparat hazırlayınız.</p>
<p>➤ Preparatı kristal viyole ile kaplayarak 1-2 dakika bekletiniz.</p> 	<p>➤ Yeterli miktarda (preparatın üzerine tamamen kaplayacak şekilde) boya damlatınız.</p> <p>➤ Gereğinden fazla bekleterek boyanın kurumasına fırsat vermeyiniz.</p>
<p>➤ Preparatı bol saf su ile yıkayınız.</p> 	<p>➤ Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.</p>

<p>➤ Preparatın üzerini lugol ile kaplayarak 1-2 dakika bekletiniz.</p> 	<p>➤ Yeterli miktarda (preparatın üzerini tamamen kaplayacak şekilde) lugol damlatınız.</p>
<p>➤ Lugolü akıtıp saf su ile yıkayınız.</p>	<p>➤ Lugol çözeltisi kalmayacak şekilde yıkayınız.</p>
<p>➤ Preparatın üzerine % 95'lik etil alkol yayararak 10-15 saniye bekletiniz.</p> 	<p>➤ Alkolle beraber boya akmayıncaya kadar alkol damlatınız.</p>
<p>➤ Preparatı saf su ile hemen yıkayınız.</p>	<p>➤ Alkol kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız</p>
<p>➤ Preparatı karşıt boya sulu fuksin veya safranin ile kaplayıp 30 saniye bekletiniz.</p> 	<p>➤ Yeterli miktarda (preparatın üzerini tamamen kaplayacak şekilde) boya damlatınız. ➤ Gereğinden fazla bekleterek boyanın kurumasına fırsat vermeyiniz.</p>

➤ Preparatı saf su ile yıkayıp kurutunuz.

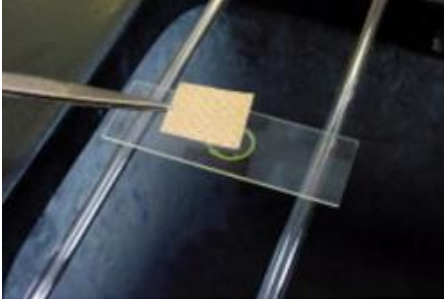
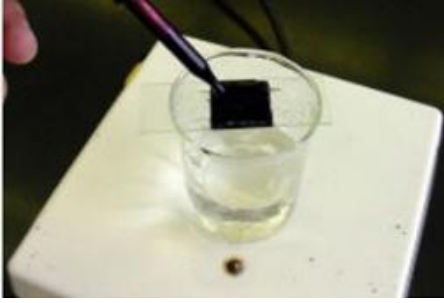
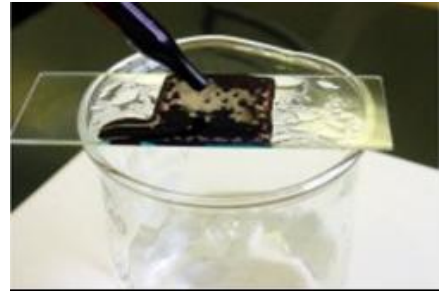


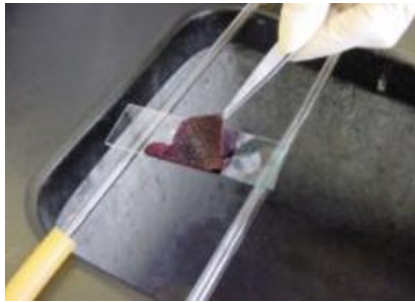

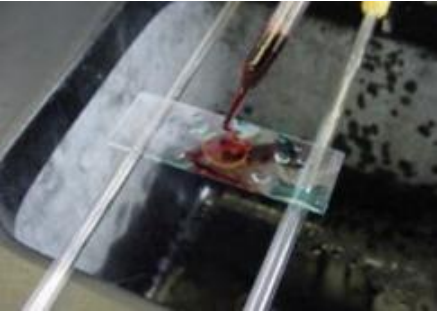
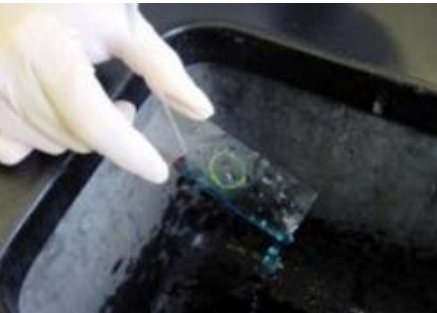
- Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.
- Preparatı kendi halinde bekleterek (oda sıcaklığında) veya kurutma kâğıdı ile kurutunuz.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak spor boyama yapınız.

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç gereçler: Kültür, lam, beher, bek, malaşit yeşili, sulu fuksin ya da safranin, saf su, metilen mavisi, kurutma kâğıdı

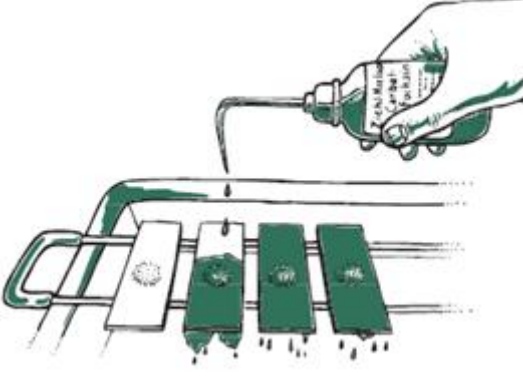

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ Preparat hazırlayınız.➤ Üzerine kurutma kâğıdı yerleştiriniz. 	<ul style="list-style-type: none">➤ 1. öğrenme faaliyetinde belirtildiği şekilde preparat hazırlayınız.➤ Kurutma kâğıdını lam ebatlarından küçük olacak şekilde hazırlayınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatı beher kullanılarak hazırlanan su banyosu düzeneği üzerine yerleştiriniz.➤ Preparatın üzerini % 5'lik malaşit yeşili boya çözeltisi ile kaplayınız. 	<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatı düşmeyecek şekilde yerleştiriniz.➤ Isıtma düzeneğinin devrilmemesi için dikkatli olunuz.➤ Yeterli miktarda boya damlatınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Kurutma kâğıdının üzerinde boya azaldıkça boya ilave ederek 5–6 dakika bekletiniz. 	<ul style="list-style-type: none">➤ Boyanın kurummasına fırsat vermeden sürekli boya ekleyiniz.

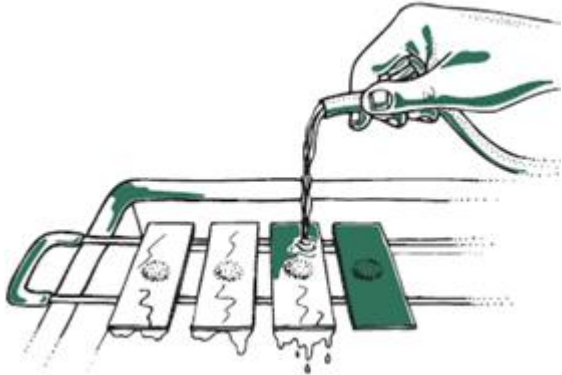
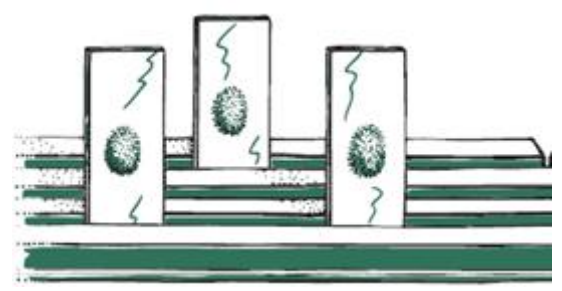
<p>➤ Süre sonunda kurutma kâğıdını kaldırarak atınız.</p> 	<p>➤ Kurutma kâğıdını pens yardımıyla alarak dezenfektan içerisine atınız.</p> 
<p>➤ Preparatı saf su ile yıkayınız.</p>	<p>➤ Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.</p>
<p>➤ Preparatı sulu fuksin ya da safranin ile 30 sn. boyayınız.</p> 	<p>➤ Yeterli miktarda boya damlatınız.</p>
<p>➤ Saf su ile yıkayınız.</p> 	<p>➤ Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.</p>
<p>➤ Preparatı kurutunuz.</p>	<p>➤ Preparatı kendi halinde bekleterek oda sıcaklığında kurutunuz.</p>

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak ARB boyama yapınız.

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç ve gereçler: Kültür, lam, bek, karbol fuksin, asit-alkol karışımı, saf su, metilen mavisi, kurutma kâğıdı

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>➤ Preparat hazırlayınız.</p>	<p>➤ 1. öğrenme faaliyetinde belirtildiği şekilde preparat hazırlayınız.</p> <p>➤ Risk etmeni yüksek numunelerden hazırlanacak preparatlar için güvenlik kabinini kullanınız.</p>
<p>➤ Preparatları boya sehпасı üzerine diziniz.</p>	<p>➤ Preparatlar arasında belirli bir aralık bırakınız.</p> <p>➤ Preparatların birbiriyle temas etmesinin çapraz kontaminasyona yol açabileceğine dikkat ediniz.</p>
<p>➤ Preparatların üzerine karbol fuksin boya solüsyonu damlatınız.</p> 	<p>➤ Bütün lamı kaplayacak şekilde yeterli miktarda boya damlatınız.</p>
<p>➤ Preparatları 5 dakika boyunca alttan ısıtınız.</p> 	<p>➤ Isıtma işlemini için bunzen bek veya pamuklu tel ile yapabilirsiniz.</p> <p>➤ Alevi lamaların altlarında gezdirilerek ısıtma işlemini yapınız.</p> <p>➤ Isıtma işleminde kesinlikle boyanın kaynamasına fırsat vermeyiniz.</p>
<p>➤ Boya azaldıkça tekrar damlatarak ekleyiniz.</p>	<p>➤ Lamın üstünde buharlaşmadan dolayı boyasız yer görülürse hemen boya ilave ediniz.</p>

<p>➤ Preparatları soğuyuncaya kadar bekleterek saf su ile yıkayınız.</p> 	<p>➤ Preparat üzerindeki boyayı önce aktınız daha sonra saf sudan geçiriniz. ➤ Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.</p>
<p>➤ Asit alkol karışımı ile renk gideriniz.</p>	<p>➤ Preparatların üzerini önce asit-alkol karışımı ile kaplayarak bir süre bekletiniz daha sonra boya akmayıncaya kadar damlatınız.</p>
<p>➤ Saf su ile yıkayınız.</p>	<p>➤ Asit alkol kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.</p>
<p>➤ Metilen mavisi ile 1 dakika boyayınız.</p>	<p>➤ Yeterli miktarda boya damlatınız. ➤ Süre sonunda boyayı dökünüz</p>
<p>➤ Saf su ile yıkayınız.</p>	<p>➤ Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.</p>
<p>➤ Preparatları kurutunuz.</p> 	<p>➤ Varsa kurutma sehpasına diziniz. ➤ Preparatı oda sıcaklığında bekleterek kurutunuz.</p>

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Gram boyamada gram pozitif bakteriler mikroskopta hangi renkte görülür?
A) Pembe- Kırmızı
B) Yeşil
C) Renksiz
D) Mor
2. Gram boyamada gram negatif bakteriler mikroskopta hangi renkte görülür?
A) Pembe-Kırmızı
B) Yeşil
C) Mor
D) Mavi
3. Gram boyamada dekolorizasyonda aşağıdaki maddelerden hangisi kullanılır?
A) Lugol çözeltisi
B) Etil alkol
C) Metil alkol
D) Isı
4. Gram boyamada mordant etkisinden dolayı aşağıdakilerden hangisi kullanılır?
A) Metil alkol
B) Etil alkol
C) Lugol çözeltisi
D) Kristal viyole
5. Boyanmış preparattan ileride tekrar faydalanılması için muhafaza edilmek istenirse aşağıdaki maddelerden hangisinden faydalanılır?
A) Metil alkol
B) Etil alkol
C) İmmersiyon yağı
D) Kanada balsamı
6. Basit boyamada aşağıdaki boyalardan hangisi kullanılamaz?
A) Malaşit yeşili
B) Kristal viyole
C) Metilen mavisi
D) Nigrosin
7. Spor boyamada sporlar hangi renkte görülür?
A) Mavi-mor
B) Pembe-kırmızı
C) Renksiz
D) Yeşil

8. Spor boyamada aşağıdaki boyalardan hangisi kullanılır?
A) Karbol fuksin-metilen mavisi
B) Kristal viyole-sulu fuksin
C) Malaşit yeşili-sulu fuksin
D) Sulu fuksin-nigrosin
9. Spor boyamada dekolorizasyonda aşağıdaki maddelerden hangisi kullanılır?
A) Metil alkol
B) Etil alkol
C) Dekolorizasyon işlemi yapılmaz.
D) Ethanol+HCl
10. Vejetatif hücre normal boyalarla boyanmasına karşın, sporun etrafında kalın muhafazaların bulunması ve bunların geçirgen olmaması boyanmalarını zorlaştırır. Bundan dolayı diğer boyama yöntemlerinden farklı olarak sporları boyamak için ne yapılır?
A) Boyama esnasında ısı işlem uygulanması
B) Konsantrasyonu yüksek boyaların kullanılması
C) Boya çözeltisi hazırlanırken alkol kullanılması
D) Boyama esnasında UV ışın uygulanması
11. Ehrlich-Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyamada tüberküloz basilleri hangi renkte görülür?
A) Pembe-kırmızı
B) Mavi
C) Kırmızı zeminde mavi basil
D) Yeşil
12. Ehrlich-Ziehl-Neelsen yönteminde renk giderici olarak kullanılan madde hangisidir?
A) Alkol
B) Eter
C) Asit-alkol
D) Lugol-alkol
13. Aşağıdakilerden hangisi ARB boyama yöntemlerinden değildir?
A) Florokrom boyama yöntemi
B) EZN boyama yöntemi
C) Kinyoun boyama yöntemi
D) Mittwer boyama yöntemi

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarı ile karşılaştırınız. Doğru cevap sayınızı belirleyerek kendinizi değerlendiriniz. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt yaşadığınız sorularla ilgili konuları faaliyete dönerek tekrar inceleyiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-3

AMAÇ

Gerekli ortam sağlandığında tekniğine uygun olarak indirekt boyama yöntemleri ile boyama işlemlerini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- İndirekt boyama yöntemlerini araştırınız.
- Negatif boyama işlemi yaparken dikkat edilmesi gereken hususları araştırınız.

3. İNDİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ

Mikroorganizmaların morfolojilerini incelemek için uygulanan ve mikroorganizmaları değil, yayıldığı ortamı (zemini) boyamayı amaçladığından asidik boya kullanılan bir boyama yöntemidir. Karanlık olan sahada mikroplar renksiz veya parlak olarak görünür. Bu yöntem daha çok bakterilerde morfoloji ve kapsül varlığını ortaya koymak için uygulanmaktadır. Boyama işlemi sırasında çini mürekkebi veya nigrosin boyası kullanılır.

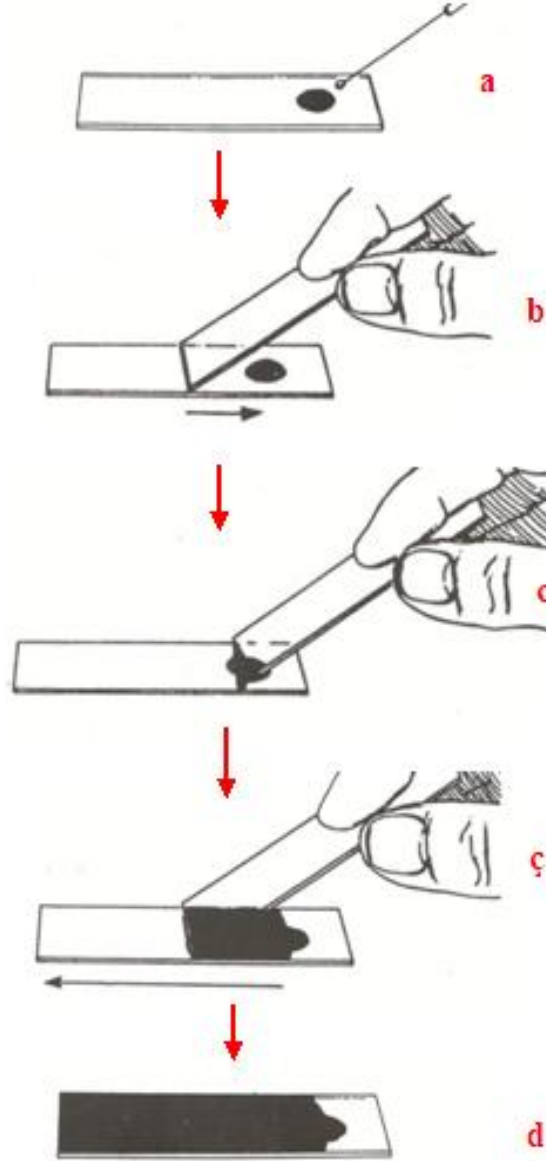
3.1. Yaş Preparasyon Tekniği ile Negatif Boyama

Klasik boyama yöntemlerinden farkı preparat kurutulmadan fikse edilmeden hazırlanıp incelenmesidir. Böylece hücre orijinal haliyle incelenir. Çünkü kurutulan ve fikse edilerek hazırlanan preparatlarda hücreler az veya çok büzüşmektedir. Yaş preparasyon yöntemi ile negatif boyamada çini mürekkebi kullanılmaktadır. İyi sonuç alabilmek için preparatın çok ince yayılması gerekmektedir.

- Temiz, kuru ve yağsız bir lam alınır.
- Katı kültürle çalışılacaksa lamın ortasına bir öze dolusu saf su aktarılır. İncelenecek katı kültürden öze ile bir miktar alınarak lam üzerindeki su içerisinde çözündürülür.
- Sıvı kültürle çalışılacaksa lam üzerine direkt kültürden bir öze dolusu aktarılır.
- Kültürün üzerine bir damla nigrosin veya çini mürekkebi konarak öze ile yaymadan karıştırılır.
- Karışımın kenar kısmına yaklaşık 45° eğimle bir lamel değdirilir ve yavaşça üzerine kapatılır.
- Preparatın altına ve üstüne kurutma kâğıdı konularak başparmak ile lamele bastırılır ve karışımın fazlası alınır.
- Kurutma kâğıtları alınarak dezenfektan içerisine atılır ve eller dezenfekte edilir.
- Preparatın kurumaması için kibrit çöpü veya kürdan yardımıyla lamelin çevresi immersiyon yağı ile kaplanır.
- Preparat mikroskopta incelenir.

3.2. Yayma Yöntemi ile Negatif Boyama

Bu yöntemde preparat kurutulur fakat fiksasyon işlemi yapılmaz. İyi bir görüntü elde edebilmek için yayma işleminin çok ince yapılmış olması gerekir. Bir lam yardımıyla örneğin ince bir film tabakası şeklinde yayıldığı işleme kısaca “ince yayma” veya “fruti” denilmektedir.



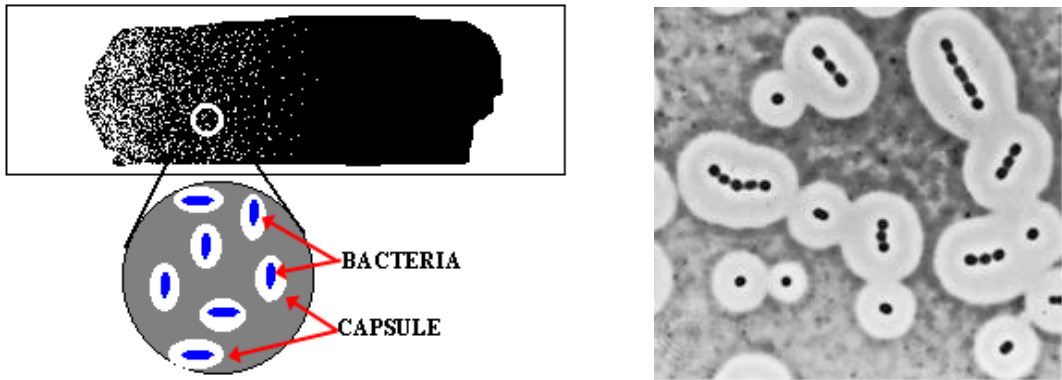
Şekil 3.1: Yayma yöntemi ile negatif boyama

- Temiz, kuru ve yağsız bir lamin uç kısmına yakın bir bölgesine bir damla çini mürekkebi damlatılır.
- İncelenecek kültürden öze ile alınarak çini mürekkebi damlası içerisinde ezilip çözündürülür.
- Lamin ortasına yaklaşık 45° eğimle yardımcı lam değdirilir ve karışıma temas edinceye kadar karışıma doğru çekilir.
- Yardımcı lam karışıma temas edince lam hattı boyunca yayılır.
- Yardımcı lam seri, tek bir hareketle (sabit hızla) lamin diğer ucuna doğru kaydırılır.
- Preparatın havada kuruması sağlanır.
- Preparat mikroskopta incelenir. Zemin siyah, bakteri hücreleri saydam, renksiz olarak görünür.

3.3. Negatif Differensiyel Boyama

Kapsül ya boyanarak ya da zemin ve bakteri gövdesinin boyanması sonucunda boyasız bir bölge olarak görülebilir. Kapsülü, boyanmayan boşluk görünümünde incelemek için zemin boyamada en sık çini mürekkebi, bakteri hücrelerini boyamada ise kristal viyole kullanılır.

- Yayma yöntemi ile negatif boyama (3.2’de olduğu gibi) yapılır.
- Preparat üzerine kristal viyole veya bazik fuksin boyası eklenerek kaplanır ve 1 dakika beklenir.
- Preparat saf suyla çok yavaş ve hassas (tespit işlemi yapılmadığı için) bir şekilde yıkanır.
- Preparatın havada kuruması sağlanır.
- Preparat mikroskopta incelenir. Bakteri hücresi kristal viyole kullanılmışsa mor, bazik fuksin ile boyanmışsa kırmızı renkli görünür. Zemin siyah, incelenen bakteri kapsüllü ise kapsül hücre çevresinde saydam, renksiz olarak görünür



Şekil 3.2: Negatif differansiyel boyama yönteminde kapsül varlığın tespiti

3.4. Kapsül Boyama

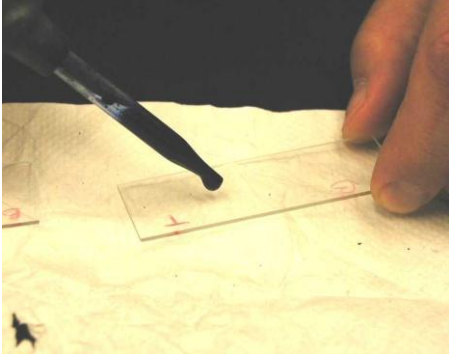
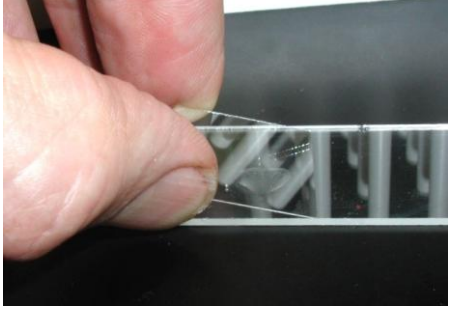
Kapsülün boyanarak incelenmesinde Muir, His veya Antony yöntemleri kullanılır. His metodunda boyama işlemi aşağıda belirtilen işlem basamakları takip edilerek yapılmaktadır.


- Temiz bir lamın ortasına bir damla saf su veya FTS konur (sıvı kültürlerden preparat hazırlanacaksa kültür yoğunluğuna bağlı olarak buna gerek görülmeyebilir.).
- Kültürden öze ile alınan örnek, su damlası yanında ezilerek su damlası ile azar azar karıştırılır.
- Lamın üzerine ince bir tabaka halinde ve yavaşça (etrafa sıçratmadan) yayılır.
- Havada kuruması sağlanır.
- Preparatın üzerine kristal viyole boya çözeltisi eklenerek kaplanır ve 1–2 dakika bekletilir.
- Preparat %20'lik bakır sülfat çözeltisi ile yıkanır.
- Preparat havada kurutulur.
- Mikroskopta incelenir. Mikroskopta incelenirken kapsül açık mavi, bakteri hücresi ise koyu mor renkte görülür.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak yaş preparasyon tekniği ile negatif boyama yapınız.

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç ve gereçler: Lam, lamel, çini mürekkebi, bazik fuksin veya kristal viyole, kurutma kâğıdı, öze, kültür, sedir yağı


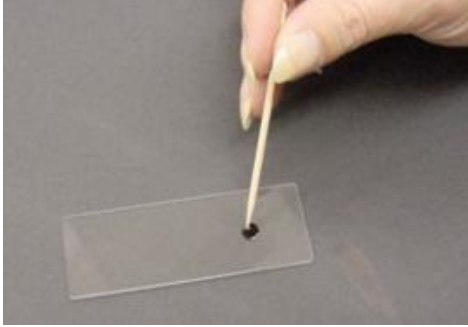
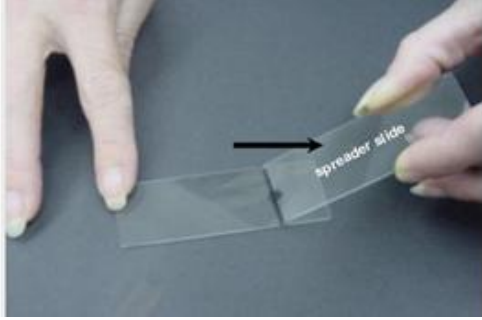
İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ Temiz bir lam alınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Lamı kenarlarından tutunuz ve lamın yüzeyine parmağınızla dokunmayınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Lam üzerine bir damla saf su koyunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Kenara yakın koymayınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Öze ile incelenecek kültürden örnek alınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Aseptik çalışma kurallarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Örneği lam üzerindeki su damlası içinde ezerek karıştırınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Kültürün su damlası içerisinde tamamen çözünmesini sağlayınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Bir damla çini mürekkebi damlatarak öze ile karıştırınız. 	<ul style="list-style-type: none">➤ Boya ile kültürün homojen bir şekilde karışmasını sağlayınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Lamel kapatınız. 	<ul style="list-style-type: none">➤ Karışımın kenar kısmına yaklaşık 45° eğimle bir lamel değdiriniz ve yavaşça üzerine kapatınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatı kurutma kâğıdının üzerine yerleştirerek lamelin üzerine de kurutma kâğıdı koyunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Kurutma kâğıdının temiz ve kullanılmamış olmasına dikkat ediniz.

<p>➤ Lamel üzerindeki kurutma kâğıdına bastırarak örneği yayınız.</p> 	<p>➤ Kurutma kâğıdının üzerinden başparmağınız ile lamele bastırınız ve karışımın fazlasının alınmasını sağlayınız.</p> <p>➤ Lamelin kırılmaması için dikkatli ve dengeli bastırınız.</p>
<p>➤ Kurutma kâğıtlarını dezenfektan çözeltiliye atınız.</p>	<p>➤ Uygun dezenfektan kullanınız.</p>
<p>➤ Lamelin çevresini ince bir tabaka halinde immersiyon yağı ile kaplayınız.</p>	<p>➤ Temiz bir kibrit çöpünden veya kürdandan faydalanabilirsiniz.</p>
<p>➤ Elinizi yıkayınız.</p>	<p>➤ Ellerinizi sabunla köpürterek bol suyla durulayınız.</p>

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak negatif differansiyel boyama yapınız.

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç ve gereçler: Lam, lamel, çini mürekkebi, bazık fuksin veya kristal viyole, kurutma kâğıdı, öze, kültür, sedir yağı

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>➤ Temiz bir lamın uç kısmına bir damla çini mürekkebi damlatınız.</p> 	<p>➤ Lamı kenarlarından tutunuz ve lamların yüzeyine dokunmayınız.</p>
<p>➤ Kültürden öze ile örnek alarak mürekkep damlasının içerisinde eziniz.</p> 	<p>➤ Seri ve hızlı çalışınız.</p>
<p>➤ Lamın ortasına yaklaşık 45° eğimle yardımcı lamı değdiriniz ve karışıma temas edinceye kadar karışıma doğru çekiniz.</p> 	<p>➤ Yardımcı lam karışıma temas edince lam hattı boyunca yayılmasını bekleyiniz.</p>

<p>➤ Yardımcı lamı seri, tek bir hareketle (sabit hızla) lamın diğer ucuna doğru kaydırınız.</p>	<p>➤ Preparat lamını resimdeki gibi zemin üzerinde veya kısa kenarlarından baş ve işaret parmaklarınızla elinizde tutunuz.</p>
<p>➤ Preparatı havada kurutunuz.</p>	<p>➤ Fiksasyon yapmayınız. Isıtmayınız, alevden geçirmeyiniz. ➤ Preparatı kendi halinde bekleterek (oda sıcaklığında) kurutunuz.</p>
<p>➤ Kristal viyole veya bazik fuksin ile preparatı 1 dakika boyayınız.</p>	<p>➤ Gereğinden fazla bekleterek boyanın kurumasına fırsat vermeyiniz.</p>
<p>➤ Boyayı dökerek preparatı yıkayınız.</p>	<p>➤ Yıkama işlemini çok yavaş ve hassas (tespit işlemi yapılmadığı için) bir şekilde yapınız.</p>
<p>➤ Preparatı havada kurutunuz.</p>	<p>➤ Preparatı kendi halinde bekleterek (oda sıcaklığında) kurutunuz.</p>

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Negatif boyamada aşağıdaki boyalardan hangisi kullanılabilir?
A) Sulu fuksin
B) Kristal viyole
C) Metilen mavisi
D) Çini mürekkebi
2. Negatif boyamada fiksasyon işleminde aşağıdakilerden hangisi kullanılır?
A) Metil alkol
B) Etil alkol
C) Ethanol+HCl
D) Fiksasyon işlemi yapılmaz.
3. Kapsülün boyanarak incelenmesinde aşağıdaki yöntemlerden hangisi kullanılamaz?
A) Muir
B) Negatif differansiyel
C) His
D) Antony
4. Zeminin çini mürekkebi ile bakteri hücresinin ise kristal viyole ile boyandığı kapsülün boyanmadan boşluk şeklinde görüldüğü boyama yöntemi aşağıdakilerden hangisidir?
A) Muir
B) Negatif differansiyel
C) His
D) Antony
5. Bir lamel veya başka bir lam yardımıyla örneğin ince bir film tabakası şeklinde yayıldığı işlem aşağıdakilerden hangisi ile ifade edilebilir?
A) Fruti
B) Preparat
C) Fiksasyon
D) Yayma

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

Laboratuvarda bulunan herhangi bir katı bakteri kültüründen 2 tane preparat hazırlayınız. Hazırladığınız preparatlardan birine gram, diğerine spor boyama yapınız. Ayrıca aynı kültürden negatif diferansiyel boyama yöntemi ile boyama yapınız. İşlemlerden sonra aşağıdaki kontrol listesini doldurunuz. Cevabı “Hayır” olan soruları öğretmeninize danışınız.

Gerekli araç, gereç ve kimyasallar: Öze, bunzen bek, kültür, saf su, FTS, kristal viyole, lugol, metil alkol, sulu fuksin, malaşit yeşili, çini mürekkebi, pens, kurutma kâğıdı

Değerlendirme Ölçütleri		Evet	Hayır
1	Laboratuvar kıyafetinizi giyip çalışma öncesi hazırlıklarınızı yaptınız mı?		
2	Aseptik ortam oluşturduunuz mu?		
Preparat Hazırlama			
3	Temiz lamın ortasına bir damla damıtık su veya FTS koydunuz mu?		
4	Kültürden öze ile alınan örneği, su damlası yanında ezerek su damlası ile azar azar karıştırdınız mı?		
5	Lamın üzerine ince bir tabaka halinde ve yavaşça (etrafa sıçratmadan) yaydınız mı?		
6	Havada kurummasını sağladınız mı?		
7	Lamın alt yüzünü üç defa bek alevinden geçirdiniz mi?		
Gram Boyama			
8	Hazırladığınız preparatın üzerine kristal viyole boya çözeltisi ekleyerek 1 dakika beklettiniz mi?		
9	Preparatı bol distile suyla yıkadınız mı?		
10	Preparatın üzerine lugol çözeltisi ekleyerek 1 dakika beklettiniz mi?		
11	Preparatı distile suyla yıkadınız mı?		
12	Preparatın üzerine %95'lik etanol veya asit-alkol karışımı ekleyerek 10–15 saniye bekletip distile suyla yıkadınız mı?		
13	Preparatın üzerine sulu fuksin veya safranin boya çözeltisi ekleyerek 30 saniye beklettiniz mi?		
14	Preparat bol distile suyla yıkayarak havada veya kurutma kâğıdı arasında kuruttunuz mu?		
Spor Boyama			
15	Hazırlanan preparatı uygun bir kaynar su banyosu düzeneğinin üstüne yerleştirdiniz mi?		
16	Preparatın üzerini % 5'lik malaşit yeşili boya çözeltisi ile kaplayarak üzerine kurutma kâğıdı yerleştirdiniz mi?		
17	Kurutma kâğıdının üzerine malaşit yeşili boya çözeltisi damlatarak kâğıdın sürekli ıslak kalmasını sağladınız mı?		
18	Kurutma kâğıdının ıslaklığı azaldıkça malaşit yeşili boya çözeltisi damlatarak preparatı bu şekilde 5–6 dakika boyadınız mı?		

19	Süre sonunda kurutma kâğıdını bir pensle alarak preparatı yıkadınız mı?		
20	Karşıt boya sulu fuksin veya %0,5'lik safranin ile 20–30 saniye boyadınız mı?		
21	Preparatı distile su ile yıkayıp havada kuruttunuz mu?		
Negatif Diferansiyel Boyama			
22	Temiz bir lamın uç kısmına bir damla çini mürekkebi damlattınız mı?		
23	Kültürden öze ile örnek alarak mürekkep damlasının içerisinde ezdiniz mi?		
24	Başka bir lam yardımıyla örneği ince bir film halinde (fruti) yaydınız mı?		
25	Preparatı havada kuruttunuz mu?		
26	Kristal viyole veya bazık fuksin ile preparatı 1 dk boyadınız mı?		
27	Boyayı dökerek preparatı yıkadınız mı?		
28	Preparatı havada kuruttunuz mu?		

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.	C
2.	B
3.	A
4.	B
5.	D
6.	C

ÖĞRENME FAALİYETİ-2'NİN CEVAP ANAHTARI

1.	D
2.	A
3.	B
4.	C
5.	D
6.	D
7.	D
8.	C
9.	C
10.	A
11.	A
12.	C
13.	A
14.	D
15.	B

ÖĞRENME FAALİYETİ-3'ÜN CEVAP ANAHTARI

1.	D
2.	D
3.	B
4.	B
5.	A

KAYNAKÇA

- AKDUR Recep, **Sıtma Laboratuvar Teknisyeni El kitabı**, Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara, 1997.
- AKŞİT Filiz, Yurdanur AKGÜN, Nuri KİRAZ, **Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji**, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, Eskişehir, 1995.
- ARDA Mustafa, **Temel Mikrobiyoloji**, Medisan Yayınları, Ankara, 2000.
- GÜNALP Ayfer, Yakut Akyön YILMAZ, Ahmet PINAR, **Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı**, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 2003
- HALKMAN A. Kadir, Nezihe TUNAL, **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları**, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Ankara, 2000.
- TEMİZ Ayhan, **Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri**, Şafak Yayınları, Ankara, 1994.
- World Health Organization, **Basic Malaria Microscopy**, WHO yayınları, Geneva, 2002.
- <http://www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/pages/101lab7.html>
- <http://homepages.wmich.edu/~rossbach/bios312/LabProcedures/Negative%20Stain%20Procedure.html>
- <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab6/index.html>
- http://www.rshm.gov.tr/index.php?option=com_content&task=view&id=214&Itemid=250
- <http://www.klimik.org.tr/UserFiles/file/Nevin%20Sar%C4%B1g%C3%BCzel%20SAR.pdf>
- www.mikrobiyoloji.org