

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

TIBBİ LABORATUVAR

**MİROBİYOLOJİK PREPARAT
HAZIRLAMA
725TTT104**

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. Araç Gereçler.....	3
1.2. Cihazlar	4
1.3. Preparatın Hazırlanması	4
1.3.1. Direkt Boyasız Preparatın Hazırlanması	4
1.3.2. Boyama İçin Preparat Hazırlanması	5
1.4. Boyama	7
1.4.1. Boya Çeşitleri	8
1.4.2. Bakterileri Boyama Yöntemleri.....	10
1.5. Preparatın Saklanması.....	11
UYGULAMA FAALİYETİ.....	12
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	14
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	15
2. GRAM BOYAMA.....	15
2.1. Gram Boyama Yöntemi	15
2.2. Gram Boyamada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....	16
2.2.1. Kristal Viyole	16
2.2.2. Gram İyot Çözeltisi (Lugol).....	16
2.2.3. Bazik Fuksin (Stok Solüsyon)	17
2.2.4. Sulu Fuksin Solüsyonu.....	17
2.2.5. Eosin Boya Solüsyonu	17
UYGULAMA FAALİYETİ.....	18
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	20
ÖĞRENME FAALİYETİ-3	21
3. METİLEN MAVİSİ İLE BOYAMA	21
3.1. Metilen Mavisıyla Boyama Yöntemi	21
3.2. Metilen Mavisi Stok Boyasının Hazırlanması	22
UYGULAMA FAALİYETİ.....	23
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	24
ÖĞRENME FAALİYETİ-4	25
4. EHRLICH-ZIEHL-NEELSON İLE BOYAMA.....	25
4.1. Ehrlich Ziehl-Neelson Boyama Yöntemi	25
4.2. Ehrlich – Ziehl – Neelson Boyamada Kullanılan Solüsyonlarının Hazırlanması	26
UYGULAMA FAALİYETİ.....	28
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	29
ÖĞRENME FAALİYETİ-5	30
5. KAPSÜL BOYAMA	30
5.1. Nigrosin Solüsyonunun Hazırlanması.....	30
5.2. Negatif Boyama Yöntemi.....	31
5.2.1. Yaş Boyama Yöntemiyle Negatif Boyama	31
5.2.2. Kuru Boyama Yöntemiyle Negatif (Diferensiyal) Boyama	31
5.3. Muir Yöntemi	32

5.4. Burri Yöntemi.....	32
5.5. Hiss Yöntemi.....	32
UYGULAMA FAALİYETİ.....	33
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	34
ÖĞRENME FAALİYETİ-6.....	35
6. SPOR BOYAMA.....	35
6.1. Spor Boyama Yöntemleri.....	35
6.1.1. Schaffer Fulton Yöntemi.....	35
6.2. Spor Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması.....	36
UYGULAMA FAALİYETİ.....	37
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	38
ÖĞRENME FAALİYETİ-7.....	39
7. BAKTERİLERDE KİRPİK BOYAMA.....	39
7.1. Kirpik Boyama İçin Preparat Hazırlanması.....	39
7.2. Kirpik Boyama Yöntemleri.....	40
7.3. Flagella Boya Solüsyonunun Hazırlanışı.....	41
UYGULAMA FAALİYETİ.....	42
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	43
ÖĞRENME FAALİYETİ-8.....	44
8. LAKTOFENOL PAMUK MAVİSİ İLE BOYAMA.....	44
8.1. Mantar Aranması.....	44
8.1.1. Direkt Preparat Hazırlama.....	44
8.1.2. Boyalı Preparat Hazırlama.....	45
8.1.3. Mantar Aranmasında Kullanılan Diğer Boyama Yöntemleri.....	45
8.1.4. Laktofenol Pamuk Mavisini Boya Solüsyonunun Hazırlanışı.....	45
UYGULAMA FAALİYETİ.....	46
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	47
MODÜL DEĞERLENDİRME.....	48
CEVAP ANAHTARLARI.....	50
KAYNAKÇA.....	52

AÇIKLAMALAR

KOD	725TTT104
ALAN	Tıbbi Laboratuvar
DAL/MESLEK	Tıbbi Laboratuvar Teknisyenliği
MODÜLÜN ADI	Mikrobiyolojik Preparat Hazırlama
MODÜLÜN TANIMI	Enfeksiyon hastalıklarının tanısında; kültür kolonilerinden ve çeşitli mikrobiyolojik örneklerden etkenleri izole etmek için tekniğine uygun preparat hazırlama ve boyama becerilerinin kazandırıldığı öğrenme materyalidir.
SÜRE	40/24
ÖNKOŞUL	“Tıbbi Laboratuvar Güvenliği” ders modüllerini ve “İnkübasyon Yapma” modülünü almış olmak
YETERLİK	Mikrobiyolojik örneklerden preparat hazırlamak ve boyamak
MODÜLÜN AMACI	Genel Amaç Mikrobiyolojik örneklerden preparat hazırlama tekniklerini kullanarak preparat hazırlayabileceksiniz. Amaçlar <ol style="list-style-type: none">1. Preparat hazırlayabileceksiniz.2. Gram boyama yapabileceksiniz.3. Metilen mavisi ile boyama yapabileceksiniz.4. Ehrlich-ziehl-neelson ile boyama yapabileceksiniz.5. Kapsül boyama yapabileceksiniz.6. Spor boyama yapabileceksiniz.7. Kirpik boyama yapabileceksiniz.8. Laktofenol pamuk mavisi ile boyama yapabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Donanım: Laboratuvar ortamı, santrifüj, örnek içeren eküvyon ve besiyerli tüp, bunzen beki/ mikro-insineratör, distile su, özeler, pastör pipeti, boya sehпасı, boya küvetleri, lam yıkama düzeneği, boya solüsyonları, örnek/kültür kolonisi, etil alkol, gazlı bez, dezenfektan madde, lam-lamel vb. araç gereçler Ortam: Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarı

**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,

Mikrobiyoloji bilim dalının ana konusu mikroorganizmalardır. Küçük canlılar olan mikroorganizmaların, diğer büyük canlılara zarar verdikleri her vesileyle anlatılmaktadır.

Mikrobiyoloji laboratuvarında esas olan, mikrobiyolojik örnekleri uygun besiyerine ekerek elde edilen kültür sonucuna göre mikroorganizmaları tespit etmektir. Bazen tek başına yapılan kültür incelemesinde, mikroorganizmaların tanımlanması güç olmakta, beraberinde preparat incelemesinin de mutlaka yapılması gerekmektedir. Bunun için, kültür kolonisinden ve mikrobiyolojik örneklerden (materyallerden) direkt preparatlar hazırlanır. İncelenecek örnek ve hastalık etkeni olabileceği düşünülen mikroorganizma türüne göre uygun boyama yöntemi ile hazırlanan preparatlar boyanır. Burada mikroorganizmaların; şekillerine, sporlu, kapsüllü, hareketli olup olmadıklarına ve aldıkları boyanın rengine göre ayrımları yapılarak hastalık etkeni ortaya çıkarılır.

Siz bu modülle kazandığınız yeterlikle, yöntemine uygun boyalı ve boyasız (direkt) preparatlar hazırlayabilecek ve inceleme yapabileceksiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-1

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle mikroorganizmaları tanımlamak için, yöntemine uygun olarak preparatlar hazırlayıp tespit edebilecek ve boyamaya hazır hâle getirebileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Preparat hazırlama ve tespit etme hakkında bilgi edininiz.
- Mikrobiyoloji laboratuvarında preparat hazırlama işlemlerini gözlemleyiniz ve gözlemlerinizi arkadaşlarınızla paylaşınız.

1. PREPARAT HAZIRLAMA

Mikrop terimi, 1878 yılında Sedillot tarafından “yalnızca mikroskopla görülebilen küçük canlıları” tanımlamak için kullanılmıştır. Mikroskopla görülebilen mikroorganizmalar genel olarak; bakteriler, virüsler, riketsiyalar, mantarlar ve protozoonlardır.

Mikroorganizmaların identifikasyonu (mikroorganizmaların tür ve cins adının belirlenmesi) çeşitli analizler sonucunda yapılır. Hastadan alınan mikrobiyolojik örnekten ve kültür kolonisinden preparat hazırlanır. Preparat hem direkt olarak hem de boyanarak incelenir.

Boyalı preparatı hazırlamak için önce usulüne uygun preparat hazırlanır, kurutulur, tespit edilir ve daha sonra da boyama işlemleri yapılır. Bu işlemleri yapmak için kullanılan birtakım araç gereçler ve cihaz vardır.

1.1. Araç Gereçler

- Hastadan alınan mikrobiyolojik örnekler
- Kültür kolonisi
- Eküvyon
- Lam – lamel
- Pastör pipeti/pipet
- Öze
- Tespit solüsyonları
- Gazlı bez
- Distile su
- Bek
- Kurutma kâğıdı
- Boya solüsyonları (çözeltileri)

- Boyama sehпасı
- Lam yıkama düzeneği
- Maşa
- Dezenfektanlar

1.2. Cihazlar

- Mikroskop
- Etüv
- Santrifüj
- Mikro-insineratör

1.3. Preparatın Hazırlanması

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında (bakteriyolojide) mikroorganizmaları tanımlamak amacıyla hem direkt boyasız olarak hem de boyanarak inceleme yapmak gerekir.

1.3.1. Direkt Boyasız Preparatın Hazırlanması

Boyasız preparat incelemeѕi daha çok; protozoonların (kist, trofozoit ve parazit yumurtasının) araştırılması ve bakteri hareketlerinin görülmesi amacıyla yapılır.

Bakteri hareketlerini sağlayan organeller hassas olduğu için ilgili örnekten preparat hazırlarken birtakım noktalara dikkat etmek gerekir. Bunlar;

- Kültür, etüvden çıkarıldıktan hemen sonra preparat hazırlanıp incelenmelidir.
- Kullanılan lam soğuk olmamalı, oda ısısında olmalı, gerekirse etüvde ısıtılmalıdır.
- Lam üzerindeki kültür sıvısında bir akma hareketi varsa akma durduğunda inceleme yapılmalıdır.

1.3.1.1. Hareket Muayenesinin Yapılması

- **Lam-lamel arası preparatın incelemeѕi**
 - Temiz lam üzerine sıvı kültürden bir damla konur.
 - Üzerine lamel kapatılır.
 - Buharlaşmayı önlemek için lamelin etrafı sıvı parafin (sıvı vazelin, oje) ile kaplanır.
 - Mikroskopta 10'luk objektifle saha bulunur.
 - 40'luk objektifle incelemeye geçilir.
 - Gerçek hareket ya da brownier hareket (hep aynı yöne suyun akış yönüne doğru hareket) yönünden inceleme yapılır.
- **Asılı damla preparatı ile hareket incelemeѕi**
 - Sıvı kültür örneğinden bir damla lama konur ve lam ters çevrilerek çukur lamın çukur kısmına kapatılır.

- Gerekirse lamelin etrafı sıvı parafin (sıvı vazelin) ile kaplanır.
- Mikroskopta 10'luk objektifle saha bulunur.
- 40'luk objektifle incelenir. Mikroorganizmaların hareket organelleri ince yapılı olduğu için ışık mikroskobunda görülmeleri mümkün değildir. Bu nedenle karanlık alan mikroskobundan kullanılır. Bu mikroskopta mikroorganizmalar, karanlık zemin üzerinde parlak görüntü verir.

1.3.1.2. Direkt Preparat İncelemesi

Genellikle gaita örnekleri boyanmadan direkt olarak incelenir.

- Temiz lam üzerine bir damla distile su (gaita için lugol) damlatılır.
- Damlanın üzerine yeteri kadar (mercimek tanesi kadar gaita) örnek konur.
- Homojen bir şekilde ezilir.
- Üzerine lam kapatılarak (gaita parazit yumurtası, kist vb. yönünden) incelenir.
- Bazı örneklerden bir damla konur, lam kapatılır ve incelenir.

1.3.2. Boyama İçin Preparat Hazırlanması

Boyama amacıyla kültür ve materyalden preparat hazırlanır. Burada kullanılan lam temiz ve çizilmemiş olmalı, hatta kutusundan yeni çıkartılmalıdır. Lam kirli ise, üzerine etil alkol veya ksilol damlatılıp temiz gazlı bezle silinmeli, sonra bek alevinden geçirilmelidir.

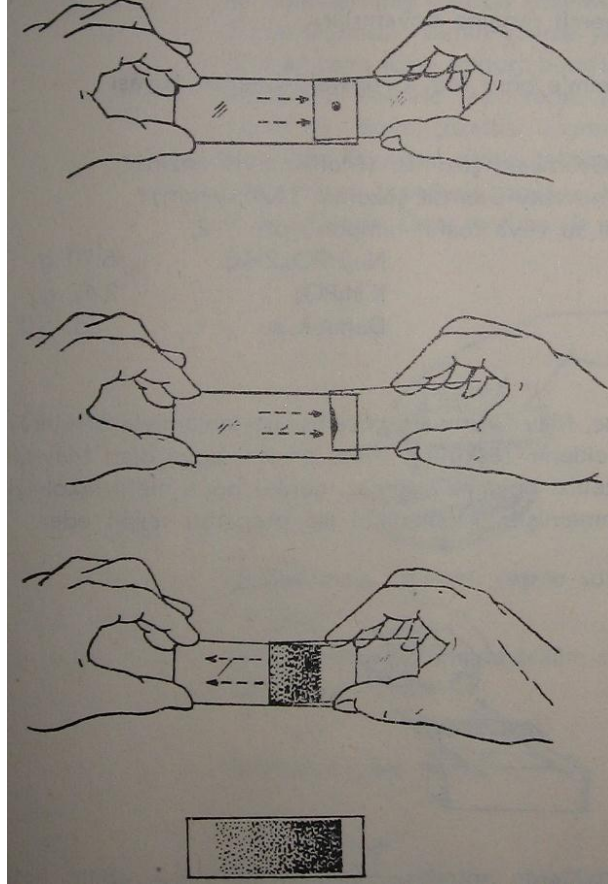
- **Preparatlar, mikrobiyolojik örneğin çeşidine göre şu şekilde hazırlanır:**
 - Sıvı materyal ya da sıvı kültürden bir öze dolusu örnek alınır. Temiz bir lamın ortasına konarak ince bir tabaka hâlinde yayılır. Katı ve yarı katı materyalden de yine özeye yeteri kadar örnek alınır; lam üzerine konan bir damla distile su içinde ezilerek homojen bir şekilde yayılır.
 - Biyopsiden alınan yeteri kadar örnek (1-2 mm³), temiz iki lam arasında ezilerek preparat hazırlanır. Diğer bir yolla pensle tutulan biyopsisi yapılan organ parçası lama sürülür ya da lam organa sürülerek ince bir preparat hazırlanır.
 - Eküvyon ile alınan materyal, temiz lam üzerine sürülerek yayma yapılır. Gerekirse lama konulan bir damla serum fizyolojik ya da distile su içinde eküvyon döndürülerek sürülür ve yayılır.



Resim 1.1: Eküvyonla materyalin lama yayılması

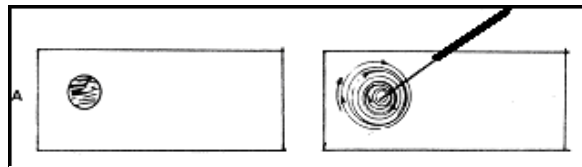
- Kan örneğinden hem ince hem de kalın yayma yapılır.

İnce yayma hazırlarken temiz bir lam ucuna bir damla taze kan konur. Bir lamel ya da diğer bir lamın kısa kenarıyla kan seri bir şekilde ince ve homojen olarak lama yayılır. Daha açık ifadeyle lamel kandamlasının önüne, 45 derece açı yapacak şekilde konur; hafif geriye çekip kana temas ederek lamel kenarı boyunca kanın yayılması sağlandıktan sonra lamel tek hamlede ileri doğru sürülerek ince yayma yapılır.



Şekil 1.1: İnce yaymanın yapılışı

Kalın yaymada ise luplu öze ile alınan bir damla kan, lamelin uca yakın kısmına konur ve daire şeklinde yayılır. Hazırlanan preparatlar kurutulur.



Şekil 1.2: Kalın yaymanın yapılışı

➤ **Preparatın tespiti (fiksasyon) şu şekilde yapılır:**

Tespit işleminde materyalin lama yapışması ve yıkarken akması amaçlanır. Bu işlem sırasında mikroorganizma enzimleri koagüle olarak aktivitesini yitirir ve mikroorganizmalar ölür. Preparatın tespiti üç yolla yapılır. Bunlar:

- **Isı ile tespit:** Bakteriyolojide preparatların tespitinde, daha çok bu yöntem kullanılır. Pensle bir ucundan tutulan preparat, örneğin bulunduğu taraf üste gelecek şekilde, alevden üç defa ve seri bir şekilde geçirilerek tespit edilir. Tespit esnasında preparatı yakmamaya özen gösterilir.



Resim 1.2: Preparatın alevde tespiti

- **Kimyasal yolla tespit:** Isıyla temasta bozulabilen kan ve doku gibi örnekler bu yolla tespit edilir; laminin üzerine örtecek şekilde % 95'lik etil alkol konur ve 10 dakika (metil alkolle 3-4 dakika, eter-alkolle 10-15 dakika, aseton-alkolle 5 dakika) bekletilerek tespit işlemi yapılır. Bazı durumlarda tespit işlemi yapılmadan direkt boyama yapılır. Örneğin yağ boyama yöntemiyle negatif boyamada direkt boyama yapılır.
- **Havada kurutarak tespit:** Preparatı oda ısısında en az 2-3 saat, en iyisi 18-24 saat bekleterek kurutmak gerekir. Uzun süreli ve pek güvenli bir yöntem olmadığı için tercih edilmez.

➤ **Preparatın boyama işlemine geçilmesi**

Yayma yapılan ve tespit edilen preparat, aranacak bakteri türüne uygun boyama yöntemi seçilerek tekniğine uygun boyanır.

1.4. Boyama

Bakteriler genel olarak renksiz ve şeffaf görünür. Mikroskopta boyanmadan direkt lam üzerinde incelendiğinde, bakterilerin ayırt edilmeleri güçtür. Bu nedenle, bakteriler boyanarak bakteri hücresi ve bölümleri görünür hâle getirilir. Boya molekülleri ışığı farklı şekilde absorbe ederek mikroorganizmaların görülmelerini sağlar.

Boyama yapılarak mikroorganizmaların morfolojisinin incelenmesi amaçlanır. Boyamada bakteri hücresi ve bakterinin bölümleri; hücre duvarı, kapsülü, sporu, flagella ve bakterinin bulunduğu ortam zemin boyanabilir ve incelenebilir.

Bakterileri boyamak amacıyla vücuttan alınan tüm mikrobiyolojik örneklerden ve taze kültür (18-24 saatlik) kolonisinden preparat hazırlanır; genel veya özel boyama yöntemleriyle boyanarak mikroskopta incelenir.

Preparatın iyi bir şekilde boyanması, tekniğine uygun olarak hazırlanan boya solüsyonlarının kullanılmasıyla mümkündür. İyi bir boya çözeltisi elde edebilmek için şu noktalara dikkat edilmesi gerekir:

- Toz boyalar havanda çok iyi ezilmelidir.
- Boya hazırlandıktan sonra renkli ve damlalıklı şişelerde, karanlıkta saklanmalıdır.
- Boyalar hazırlandıktan sonra en az 24 saat oda ısısında bekletilmelidir.
- Boyalar hem hazırlanma sonrası hem de kullanım öncesinde süzülerek kullanılmalıdır.

1.4.1. Boya Çeşitleri

Boyalar doğal ve sentetik olarak iki gruba ayrılır.

1.4.1.1. Doğal Boyalar

Doğal boyalar bitkisel ve hayvansal kökenli olup bakteriyoloji laboratuvarında çok kullanılmaz. Kullanılan boyalardan bitkisel boyaya hematoksilen, hayvansal boyaya ise carmen örnek verilebilir. Doğal boyalar daha çok histolojide kullanılır.

1.4.1.2. Sentetik Boyalar

Bu boyalara anilin boyaları da denir. Genelde katrandan elde edilir. Sentetik boyalar genelde tuz yapısındadır; hem asit köke (anyon) hem de bazik köke (katyon) sahiptir. Bu boyalar, boyaya rengini veren kromofor grup yani boyayıcı kısım (bazik kök-katyon, +) ve renksiz olan oksokrom grup yani boyama özelliği olmayan kısım (asit kök-anyon, -) olmak üzere iki gruptan meydana gelir.

Boyalar boya molekülünün elektrik yüküne ve pH durumuna göre asidik, bazik ve nötr boyalar olarak gruplara ayrılır.

- **Bazik boyalar:** Bazik boya çözelti içinde iyonize olduğu zaman, pozitif elektrik yükü verecek şekilde iyonlaşır yani, molekülün boyayıcı (kromofor) kısmı **pozitif** elektrik yüklenir.

Bakteri yüzeyi ve zengin nükleik asit içeren bakteri nükleusu (içindeki fosfat grupları nedeniyle) **negatif** yüklüdür. Bu nedenle pozitif yüklü bazik boyalarla birleşir (bakteri boyanır), fakat asit boyalarla birleşmez. Bakteriyolojide bakterileri boyamada genellikle bazik boyalardan yararlanır.

Bazik boyalar;

- Metilen mavisi,
- Bazik fuksin,
- Kristal viyole,
- Safranin'dir.



Resim 1.3: Bazik boyalar

- **Asit boyalar:** Asit boya çözelti içinde iyonize olduğu zaman, negatif elektrik yükü verecek şekilde iyonlaşır yani, molekülün boyayıcı kısmı negatif elektrikle yüklenir. Bakteri yüzeyi ve nüleusu negatif elektrik yük taşıdığından asit boyayla boyanmaz. Asit boyalar, zemin boyamada ya da asit pH'lı ortamları boyamada kullanılır.

Asit boyalar;

- Asit fuksin,
- Asit pikrik,
- Malaşit yeşili,
- Eosin,
- Nigrosin'dir.

- **Nötral boyalar:** Bazik ve asidik boyaların uygun oranda karışımlarından elde edilir. Bu boyalar özellikle kan, doku ve gaita preparatlarının boyanmasında kullanılır. Bu grupta en çok giemsa boyası kullanılır.

Nötral boyalar;

- Giemsa,
- Wright,
- May-Grünwald,
- Leishman'dır.

1.4.2. Bakterileri Boyama Yöntemleri

Preparat hazırlama işleminden sonra inceleme amacına göre, değişik boyama yöntemlerinden biri seçilerek bakteriler boyanır.

1.4.2.1. Basit Boyama

Bu yöntemde bir çeşit boya ile boyama yapılır ve daha çok bazik boyalar kullanılır. En çok kullanılan **metilen mavisi** ile yapılan boyama yöntemidir.



Resim 1.4: Boyalar, alkol ve distile su şişeleri

Basit boyamada bakteriler, hangi boyayla boyanırsa o boyanın rengini alır. Örneğin kristal viyole ile boyandığında **mor**, sulu fuksinle **kırmızı** rengi alır.

Basit boyama işleminde hep aynı yol izlenir. Sadece kullanılacak boya ve bu boyanın etki süresi değişir.

➤ Basit boyamada şu işlemler yapılır:

- Preparat hazırlanır (yayma, kurutma, tespit).
- Preparatın üzeri kullanılacak boya çözeltisiyle kaplanır, seçilen boyaya göre uygun süre beklenir. Metilen mavisiyle 30-60 saniye karbol fuksinle 5-10 saniye, kristal violetle 20-30 saniye vb.
- Boya dökülerek preparat distile suyla yıkanır.
- Preparat kurutulur.
- Mikroskopta immersiyon objektifiyle incelenir.

1.4.2.2. Bileşik Boyama (Differensiyal Boyama)

Boyama işleminde preparat birden fazla boya ile boyanır. Bu yöntem **bakterileri gruplara ve cinslere göre ayırt eden** bir yöntemdir.

➤ **Bileşik boyama yöntemleri;**

- Gram boyama yöntemi,
- Erlich-ziehl-neelson boyama yöntemi,
- Spor boyama yöntemi,
- Flagella boyama yöntemi,
- Negatif (kapsül) boyama yöntemleridir.

Gram boyama yöntemi, bakteriyoloji laboratuvarlarında en çok kullanılan yöntemdir. Bileşik boyama işleminde de basit boyamada olduğu gibi aynı yol izlenir. Sadece kullanılacak boyalar ve bu boyaların etki süresi değişir.

➤ **Bileşik boyamada şu işlemler yapılır:**

- Preparat hazırlanır (yayma, kurutma, tespit).
- İlk boya kullanılır.
- Preparat, etil alkol veya başka bir maddeyle dekolorizasyona (renk giderme işlemine) tabi tutulur.
- Bu işlemden sonra karşıt boya olan diğer boya ile preparat boyanır.
- Renk giderme işleminde ilk boyayı almayan bakteriler, karşıt boya ile boyanır. Boyayı bırakmayan bakteriler ilk boyayı alarak boyanır.

Boyanan preparatlar incelenmek üzere uzmana gönderilir. Uzman tarafından, preparat üzerine immersiyon yağı (sedir yağı) damlatılarak immersiyon objektifi (100'lük büyütme objektifi) ile mikroskopta incelenir.

1.5. Preparatın Saklanması

Boyalı preparatları hazırladıktan ya da hazırlayıp inceledikten sonra, daha ilerde tekrar incelemek üzere saklamak gerekir. Bu amaçla;

- Preparat üzerinde immersiyon yağı varsa bu yağ ksilol ile yıkanır.
- Preparat havada kurutulur.
- Preparat üzerine bir damla kanada balsamı damlatılır.
- Üzerine lamel kapatılır.
- Lamel üzerine hafif bastırılarak lamel altındaki balsamın iyice yayılması sağlanır.
- 2-3 dakika süreyle lamel üzerine baskı yapılır.
- Nemsiz bir ortamda iki hafta süreyle kurumaya bırakılır.
- Lamel çevresindeki balsam artıkları temizlenerek son şekli verilir.
- Bu şekilde preparat yıllarca bozulmadan saklanır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını tamamladığınızda, sıvı veya katı örneklerden preparat hazırlayabileceksiniz.

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ Temiz bir lam üzerine öze ile bir damla su koyunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Önlük, eldiven ve maske kullanınız.➤ Yağsız ve pürüzsüz bir lam seçiniz.➤ Lam kirli ise üzerine alkol veya ksilol damlatarak temiz gazlı bezle siliniz.➤ Lamın yayma yapılacak taraflarını alevden geçiriniz.➤ Lam soğuduktan sonra yayma yapınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Yeterli miktarda örnek veya kültür kolonisinden alıp su damlasıyla karıştırarak froti (yayma) yapınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Örnek ve kültürün çeşidine göre, patolojik olan kanlı, müküslü, iltihaplı vb. gibi yerlerinden alınız.➤ Alınan katı veya yarı katı örneği önce damlanın kenarında eziniz, sonra damlanın tamamıyla karıştırarak homojen hâle getiriniz.➤ Karışımı, dairesel hareketlerle 1-2 cm çapındaki alana ince bir şekilde yayınız.➤ Yayılan örneği, lamın kenarına bulaştırmamaya ve çevreye sıçratmamaya özen gösteriniz.➤ Örnek ve kültür sıvı ise, bir damla alarak direkt yayma yapınız.➤ Metal öze kullanıyorsanız; işlemten önce ve sonra mutlaka steril ediniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatı havada kurutunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatı turnusol kâğıdı arasında hafifçe bastırarak da kurutabilirsiniz.

<p>➤ Preparatı, hazırlandığı örneğin çeşidine göre tespit ediniz.</p>	<ul style="list-style-type: none">➤ Lamın bir ucundan özel pensle tutarak yayma üste gelecek şekilde üç kez, alevden yalatarak geçirin.➤ Alkolle tespit için preparatın konulduğu boya küvetinin, düz bir zemin üzerinde olmasına dikkat ediniz.➤ Preparatın üzerine % 95'lik etil alkol damlatarak 8-10 dakika bekleyiniz.➤ Preparatın üzerini tam örtecek şekilde alkol damlatınız.
<p>➤ Preparatı kurutunuz.</p>	<ul style="list-style-type: none">➤ Süre bitiminde preparat üzerinde kalan alkolü döktükten sonra kurumaya bırakınız.➤ Preparatı havada kendi hâlinde kurumaya bırakınız.➤ Hemen inceleme durumunda preparatı kurutma kâğıdı ile kurutunuz.
<p>➤ Boyama yöntemini belirleyerek boyama yapınız.</p>	<ul style="list-style-type: none">➤ Boyama yapılan alan için sakın ve güneşten uzak bir yer seçiniz.➤ Aranacak bakteri türüne uygun boyama yöntemini seçiniz.➤ Boyayı hazırlayınız.➤ Boyama işlemini tekniğine uygun yapınız.➤ İncelenmek üzere preparatı uzmana gönderiniz.➤ Kullandığınız malzemeleri aldığınız yere koyunuz.➤ Çalışma alanını dezenfektan maddeyle temizleyiniz.➤ Ellerinizi yıkayıp antiseptik solüsyondan geçirin.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Gaita örneklerini boyamadan direkt olarak incelemek için, hangi **solüsyonla** gaita preparatı hazırlanır?
A) Alkol
B) Asit
C) Lugol
D) Aseton
E) Eter
2. Aşağıdakilerden hangisi, asit boya olup **ortamı ve zemini boyamada** kullanılır?
A) Nigrosin
B) Wright
C) Metilen mavisi
D) Safranin
E) May-Grünwald
3. Aşağıdakilerden hangisi, bazik boya değildir?
A) Safranin
B) Metilen mavisi
C) Sulu fuksin
D) Giemsa
E) Kristal viyolet
4. Kan ve doku preparatlarının tespit işleminde hangi kimyasal madde kullanılmaz?
A) Etil alkol
B) Asit
C) Metil alkol
D) Aseton
E) Eter alkol
5. Aşağıdakilerden hangisi, bileşik boyama yöntemi değildir?
A) Gram boyama yöntemi
B) Erlich-ziehl-neelsen boyama yöntemi
C) Spor boyama yöntemi
D) Flagella boyama yöntemi
E) Metilen mavisi boyama yöntemi

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 bilgilerle preparatı gram boyama yöntemi ile boyayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Bakteriler boyandıkları gram boyasına göre nasıl sınıflandırılır, araştırınız.
- Bakterioloji laboratuvarına giderek gram boyanın yapılışını izleyiniz.

2. GRAM BOYAMA

Gram boyama bakteriyolojinin temel boyama tekniğidir. Danimarkalı bakteriyolog Christian Gram tarafından 1884’de geliştirilmiştir. Bu nedenle bilim adamının adıyla “gram boyama yöntemi” olarak anılır.

2.1. Gram Boyama Yöntemi

Gram boyama yönteminde, önce kristal viyole boyası sonra lugol uygulanması ile boyanabilen tüm bakteriler boyayı alır. Ardından etil alkolle renk giderme işlemi yapılır; bir kısım bakteriler boyandıkları rengi bırakmazken, bir kısmı ise boyayı bırakarak renksizleşir. Bu bakterileri görünür hâle getirmek için zıt boya olan sulu bazik fuksin ya da safranin uygulanır. İmmersiyon objektifi ile incelenen preparatta; ilk boyayı alan bakteriler **mor renkte** görünür ve genel olarak **gram pozitif** veya **gram olumlu** diye adlandırılır. Son boyayı alan bakteriler ise **kırmızı-pembe** renkte görünür ve **gram negatif** veya **gram olumsuz** olarak adlandırılır.

Bakterilerden kokların (streptococcus, staphylococcus) büyük bir kısmı ile basillerin (bacillus, lactobacillus) yarısına yakını ve mantarlar (maya) gram pozitifdir. Bakterilerden spiraller (borrelia’lar) ise gram negatifdir.

Gram pozitif ya da gram negatif olması, bakterilerin hücre duvarının yapısının farklı olmasıyla ilgilidir.

12-24 saatlik kültürlerde bulunan mikroorganizmalar, genellikle kuvvetli gram pozitif görünmelerine rağmen, eski kültürlerde gram negatifliğe doğru bir eğilim görülür. Bu nedenle 12-24 saatlik kültürler kullanılmalıdır, eski kültürler yanıltıcı olabilir; gram pozitif bakteriler gram negatif gibi görünebilir.

Ayrıca renk giderme işleminde alkolün fazla kullanılması, boyanın fazla akmasına, dolayısıyla bakterinin gram pozitif iken gram negatif görünmesine, alkolün az kullanılması ise boyanın az akmasına, dolayısıyla bakterinin gram negatif iken gram pozitif görünmesine neden olabilir.

Waitger'in, Hucker'in ve Brucke'nin değişik gram boyama yöntemleri vardır.

Gram boyama yöntemiyle mikroorganizmaların büyük bir kısmı kolaylıkla boyandığından, bakteriyolojide en çok kullanılan boyama yöntemidir. Gram boyasıyla hazırlanmış preparatların incelenmesi, mikroorganizmaların birçok özelliği hakkında bilgi edinilmesini sağlar.

➤ **Gram boyama yönteminin sağladığı faydalar şunlardır:**

- Genel olarak mikroorganizmaları gram pozitif ve gram negatif diye iki ana gruba ayırır.
- Mikroorganizmaların morfolojisi ve dizilimi göz önüne alınarak ön tanı konur.
- Alınan örneğin usulüne uygun alınıp alınmadığı konusunda bilgi verir.
- Tespit edilen mikroorganizmanın anaerob mikroorganizma olup olmadığı hakkında bilgi verir.

2.2. Gram Boyamada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

2.2.1. Kristal Viyole

➤ **A Çözeltisi**

- Kristal viyole 2 g
- %95'lik Etil alkol (etanol) 20ml(cc)
- Kristal viyole etil alkol içinde karıştırılarak eritilir.

➤ **B Çözeltisi**

- Amonyum oksalat (0,8)80ml
- Distile su
- Amonyum oksalat distile suda karıştırılarak eritilir.

➤ **Kullanılması:** A ve B solüsyonu karıştırılarak 24 saat bekletilir ve kullanılmadan önce süzülür.

2.2.2. Gram İyot Çözeltisi (Lugol)

- İyod 1 g
- Potasyum iyodür 2 g
- Distile su 300 ml

- İyot ve potasyum iyodür bir cam beher içinde 20ml distile suyla eritilir, kalan suyun tamamı üzerine ilave edilir. Süzülür, koyu renkli şişeye konur ve saklanır.

2.2.3. Bazik Fuksin (Stok Solüsyon)

- Bazik Fuksin 10 g
- % 95'lik Etil alkol 100ml
- Bazik fuksin havanda ezilir ve alkolle eritilir, 370C'de bir gece bekletildikten sonra filtre kâğıdında süzülür ve cam kapaklı şişelerde saklanır.

2.2.3.1. Boyamada Kullanılan Karbol Fuksin

- Karbol fuksin (stok) 1ml alınır,
- 9 ml distile su ile karıştırılır.

2.2.3.2. Karbol Fuksin Solüsyonu

- Kristal Fenol 5 g
- Distile su 100ml
- Kristal fenol distile suda karıştırılarak eritilir. Bu karışımdan 100cc alınıp 10cc (stok) bazik fuksinle karıştırılarak karbol fuksin solüsyonu elde edilir.

2.2.4. Sulu Fuksin Solüsyonu

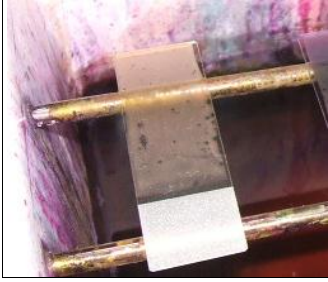


- Bazik fuksin (stok) 10 ml
- Distile su 100 ml
- Fuksin, distile suda iyice karıştırılır ve filtre kâğıdında süzülür.


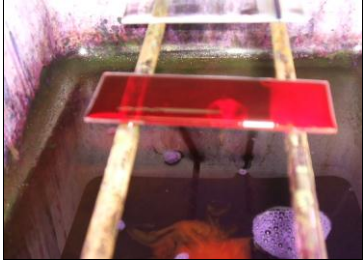

2.2.5. Eosin Boya Solüsyonu

- Eosin 1g
- Distile su 100cc
- Boya distile suda çalkalanarak eritilir ve sonra süzülür.

UYGULAMA FAALİYETİ

Preparatı gram boyasıyla boyayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>➤ Tespit edilen preparatı boya setine yerleştiriniz.</p> 	<p>➤ Önlük, eldiven ve maske kullanınız.</p> <p>➤ Boya setini düz zemin üzerine yerleştiriniz.</p>
<p>➤ Preparatın üzerine kristal viyole damlatarak 1-2 dakika bekletiniz.</p> 	<p>➤ Aynı amaçla gentiana viyole boyasını kullanabilirsiniz.</p> <p>➤ Boyaları kontrol ediniz.</p> <p>➤ Boya şişelerini alt-üst ederek karıştırınız.</p> <p>➤ Gerekirse boyaları süzünüz.</p> <p>➤ Süre bitiminde preparat üzerindeki boyayı dökünüz.</p>
<p>➤ Preparatı yıkayınız.</p> 	<p>➤ Yavaş akan suda yıkayınız.</p>
<p>➤ Preparata lügol (gram iyod) damlatıp 1 dakika bekleyiniz.</p>	<p>➤ Süre bitiminde lugolü dökünüz.</p>

<p>➤ Alkolde dekolore ediniz.</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ % 95'lik etil alkolde dekolore ediniz. ➤ Renk giderme işlemini özenle yapınız. ➤ Renksiz sıvı akana kadar yıkama işlemini sürdürünüz.
<p>➤ Sulu fuksin damlatarak 30 saniye bekletiniz.</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Aynı amaçla eosin veya safranin de kullanabilirsiniz. ➤ Süre bitiminde boyayı dökünüz.
<p>➤ Su ile yıkayarak boyayı gideriniz.</p>	<p>➤ Tazyiksiz suda yıkayınız.</p>
<p>➤ Preparatı havada kurutunuz.</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hemen inceleme yapılacaksa preparatı kurutma kâğıdı arasında hafifçe bastırarak kurutunuz. ➤ Kullandığınız malzemeleri aldığınız yere koyunuz. ➤ Çalışma ortamını dezenfektan maddeyle temizleyiniz. ➤ Ellerinizi yıkayıp antiseptik solüsyondan geçiriniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Gram boyama yönteminde gram negatif bakteriler, hangi boyayı alarak kırmızı renge boyanır?
A) Kristal viyole
B) Jansian viyole
C) Lugol
D) Metilen mavisi
E) Sulu fuksin
2. Gram boyama yönteminde kullanılan boyaların sırası, hangi seçenekte **doğru** olarak verilmiştir?
1-Kristal viyole 2- Sulu fuksin 3-Gram iyod 4-Alkol
A) 1-2-3-4
B) 3-1-2-4
C) 1-3-4-2
D) 2-4-3-1
E) 3-1-4-2
3. Aşağıdakilerden hangisi, gram boyama yönteminde gram pozitif bakterilerin aldığı renktir?
A) Yeşil
B) Kırmızı
C) Siyah
D) Mor
E) Mavi

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-3

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle preparatı metilen mavisi boyama yöntemi ile boyayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Basit boyaları araştırınız.
- Metilen mavisi boyasının dezenfektan olarak da kullanılıp kullanılmadığını araştırınız.
- Bakteriyoloji laboratuvarına giderek metilen mavisi ile boyama yapılışını izleyiniz.

3. METİLEN MAVİSİ İLE BOYAMA

Bu yöntemde preparatları boyamak için Löffler'in metilen mavisi solüsyonu kullanılır. Bakterilerin çoğu, bu boyayı yoğun bir şekilde absorbe ettikleri için, bakterilerin görünür hâle gelmeleri kolaylaşır. Bakterilerin kolay boyanmasından dolayı metilen mavisi boyasıyla boyama yöntemi sık kullanılır. Bakteriyolojide gram boyasının bulunmadığı yerlerde metilen mavisi kullanılarak boyama yapılır. Gram boyası kadar etkili olmasa da mikroorganizmaların morfolojisi ve mikroskop sahasında dizilimi göz önüne alınarak ön tanı konulduğu gibi, hangi besiyerine ekim yapılacağı konusunda da bilgi verir.

Metilen mavisi tek başına kullanıldığı gibi diğer boyalarla bir arada da bileşik boya olarak da kullanılır.

3.1. Metilen Mavisiyle Boyama Yöntemi

Bu boyama yöntemiyle *Corynebacterium diptheriae*'nin içinde bulunan ve besin deposu olan metakromatik cisimciklerin (granüllerin) ayrımı difteri hastalığının teşhisi önemlidir. Metilen mavisi, granüllerin görünümünü ortaya koyan en iyi boyadır.

Metakromatik granülleri boyamada kullanılan diğer bir yöntem de neisser boyama yöntemidir.

- **Metilen mavisi ile boyamada sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılır.**
 - Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.
 - Preparatın üzerine, metilen mavisi solüsyonu konarak beklenir.


- Su ile yıkanır, kurutulur.
 - İmmersiyon objektifi ile incelenen preparatta, basiller açık mavi, granüller ise koyu mavi renkte görünür.
- **Neisser boyama yöntemi ile boyamada sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılır.**
- Tespit edilen preparat üzerine neisser A-B solüsyonundan damlatılır, 2 dakika bekletilir.
 - Boya dökülüp yıkanmadan kurutma kâğıdıyla kurutulur.
 - Krisoidin boyasıyla 10 saniye boyanır.
 - Yıkamadan kurulanır.
 - İmmersiyon objektifi ile incelenen preparatta, basiller açık mavi, granüller ise koyu mavi renkte görünür.

3.2. Metilen Mavisi Stok Boyasının Hazırlanması

- **A Solüsyonu**
- Metilen mavisi 0,3 g
 - %95 etil alkol 30 ml
 - Metilen mavisi, etil alkolde eritilir. Bu doymuş bir çözeltidir.
- **B solüsyonu**
- Potasyum hidroksit (KOH) 0,01 g
 - Distile su 100 ml
 - KOH, distile suda eritilir.
- **Kullanılması:** A ve B solüsyonları eşit oranda karıştırılarak kullanılır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Preparatı metilen mavisi ile boyayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ Alevde tespit edilmiş preparatı boya sehпасına yerleştiriniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Önlük, eldiven ve maske kullanınız.➤ Boya setinin yerinin düz olmasına dikkat ediniz. 
<ul style="list-style-type: none">➤ Preparat üzerine metilen mavisi boyası damlatarak 30 – 60 saniye bekletiniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Boyayı kontrol ediniz.➤ Boya şişesini alt-üst ederek karıştırınız.➤ Gerekirse boyayı süzünüz.➤ Boyayı preparatın üzerini, tamamen kaplayacak şekilde koyunuz.➤ Preparattaki yaymanın kalınlığına göre boya solüsyonunu 30 ya da 60 saniye bekletiniz.➤ Preparatın az veya çok boyanmaması için süreyi, verilen süreden az ya da uzun tutmayınız.➤ Süre sonunda preparat üzerindeki boyayı dökünüz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatı yıkayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatı distile suyu ile yıkayınız.➤ Suyun tazyiksiz olmasına özen gösteriniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatı kurutunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatı havada ya da kurutma kâğıdı arasında kurutunuz.➤ Kullandığımız malzemeleri aldığımız yere koyunuz.➤ Çalışma alanını dezenfektan maddeyle temizleyiniz.➤ Ellerinizi yıkayıp antiseptik solüsyondan geçirin.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Metilen mavisiyle boyamalarda *Corynebacterium*'ların metakromatik granülleri, renkte, basiller ise açık mavi renkte görünür.
2. Bakterilerin çoğu, metilen mavisi boyasını kolay ettikleri için, bu boya sık kullanılır .
3. Metilen mavisi boyası, hem basit boyama yöntemi hem de boyama yöntemi olarak kullanılır.

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-4

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle preparatı Ehrlich-Ziehl-Neelson boyama yöntemi ile boyayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

Dispanserlere giderek Ehrlich-Ziehl-Neelson boyama işlemini izleyiniz.

4. EHRLICH-ZIEHL-NEELSON İLE BOYAMA

Tüberküloz hastalığının tanımlanmasında, özellikle balgam olmak üzere vücuttan alınan örneklerden, basil aranmasında değerli bir boyama yöntemidir.

Amaç, bakteriyolojik boyalarla boyanamayan Mycobacterium'ları ehrlich ziehl-neelson boyama yöntemi ile boyamaktır. Mycobacterium'lar, asit ve alkole rezistans (dayanıklı) bakteriler olmalarından dolayı bu kelimelerin baş harfleri alınarak AARB şeklinde kısaca ifade edilir.

➤ Mycobacterium grubunda yer alan bakteriler şunlardır:

- Mycobacterium tuberculosis
- Mycobacterium leprae
- Atipik mycobacterium
- Saprofit mycobacterium

4.1. Ehrlich Ziehl-Neelson Boyama Yöntemi

Mikobakteriumlar, hücre duvarının özelliğinden dolayı diğer boyama yöntemleri ile kolay boyanmaz. Boyanmaları için, fenollü bazik fuksin ile boyama yapılması ve bu boyanın alttan ısıtılması ya da uzun süre bu boya solüsyonunda tutulması gerekir. Bu şekilde boyanan bakteriler bir kez boyandıktan sonra asit ve alkolle muamele edilse dahi boyayı bırakmaz. Daha sonra kullanılan boyayı da almaz. Bu bakterilerin hücre duvarında diğer bakterilere göre **bol lipit** bulunur. Bu lipitler bakterinin güç boyanmasına ve geç üremesine neden olur.



Resim 4.1: Ehrlich ziehl-neelson boyaları

- Ehrlich ziehl-neelson ile boyamada sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılır.
 - Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.
 - Preparat karbol fuksin boyası ile boyanır, alttan ısıtılarak boyayı alması sağlanır, yıkanır.
 - Alkol-asit karışımı ile renk giderilir, yıkanır.
 - Metilen mavisiyle boyanır, yıkanır ve kurutulur.
 - İmmersiyon objektifi ile incelenen preparatta, tüberküloz basilleri kırmızı renkte, diğer bakteri ve oluşumlar mavi renkte görünür.

4.2. Ehrlich – Ziehl – Nelson Boyamada Kullanılan Solüsyonlarının Hazırlanması

- **Karbol fuksin hazırlanışı (stok)**
 - Bazik Fuksin 1 g
 - Fenol kristalize 5 g
 - Saf alkol 10 ml
 - Saf su 100 ml içinde eritilir.
- **Boyamada kullanılan karbol- fuksinin hazırlanışı**
 - Bazik fuksin (stok) 10 cc
 - Distile su (% 5 fenollü) 100 cc
 - Bazik Fuksin havanda alkolle ezildikten ve fenollü su ilave edilip karıştırıldıktan sonra bir şişeye aktarılır. Geriye kalan su tekrar havana konup iyice yıkandıktan sonra şişeye alınır. 24 saat bekletildikten sonra filtre kâğıdında süzülür ve cam kapaklı şişelerde saklanır.

-
- **Asit alkol karışımı**
 - Etil alkol %95'lik 97 ml
 - Konsantre HCl 3ml karıştırılır, kullanılır.

 - **Metilen mavisi boyası (stok çözeltisi)**
 - Metilen mavisi 2 g
 - %95 etil alkol 10 ml içinde eritilir.

 - **Boyamada kullanılan metilen mavisinin hazırlanışı**
 - Stok metilen mavisi çözeltisi 20 ml
 - Distile su 80 ml karıştırılır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Preparatı Ehrlich Ziehl-Neelson boyasıyla boyayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Tespit edilmiş preparatı boya sehпасının üzerine yerleştiriniz.	➤ Önlük, eldiven ve maske kullanınız. ➤ Preparatı düz bir zemine yerleştiriniz.
➤ Preparat üzerine fenollü bazik fuksin solüsyonu dökünüz.	➤ Boyayı kontrol ediniz. ➤ Boya şişesini alt-üst ederek karıştırınız. ➤ Gerekirse boyayı süzünüz. ➤ Preparatı kaplayacak şekilde fenollü bazik fuksin solüsyonu dökünüz.
➤ Preparatı buhar çıkacak şekilde 2 dakika kadar ısıtınız.	➤ Boyayı kaynatmadan ısıtınız. ➤ Bek yerine, bir tele pamuk sarıp alkol damlatarak alev oluşturup lamı alttan ısıtabilirsiniz.
➤ Isıtmayla eksilen fenollü bazik fuksini kadar tekrar solüsyon ekleyiniz.	➤ Boyanın azalıp kurumamasına özen gösteriniz. ➤ Sıcak boyayı dökünüz.
➤ Preparatı yıkayınız.	➤ Tazyiksiz suda yıkayınız.
➤ Lamı pensle tutarak asit-alkolde yıkayınız.	➤ %95'lik metil alkol-%3'lük HCl karışımını kullanınız. ➤ Renksiz sıvı akana kadar asit-alkolle renk gideriniz.
➤ Preparatı yıkayınız.	➤ Tazyiksiz suda yıkayınız.
➤ Preparat üzerine metilen mavisi dökerek 1 dakika bekletiniz.	➤ Preparatın üzerini kaplayacak şekilde boya dökünüz.
➤ Preparatı havada kurutunuz.	➤ Preparatı kurutma kâğıdıyla da kurutabilirsiniz. ➤ Kullandığımız malzemeleri aldığınız yere koyunuz. ➤ Çalışma alanını dezenfektan maddeyle temizleyiniz. ➤ Ellerinizi yıkayıp antiseptik solüsyondan geçirin.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Tüberküloz etkeni mavi zeminde renkte görülür.
2. Mycobacterium'lar direkt boyalarla boyanmazlar
3. Mikobakteriumların hücre duvarında bol bulunduğu için, bu bakteriler güç boyanır.
4. Tüberküloz hastalığının tanımlanması için özellikle örneği alınarak boyama yapılır.
5. Ehrlich-ziehl-neelsen boyama yönteminde karşıt boya olarak kullanılır.

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-5

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle preparatı kapsül boyama yöntemi ile boyayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

Bakteri kapsül boyama yöntemleri hakkında bilgi ediniz.

5. KAPSÜL BOYAMA

Mikroorganizmaların morfolojilerini incelemek için uygulanan ve mikroorganizmaları değil, **bunların yayıldığı ortamı** boyamayı amaçlayan bir boyama yöntemidir.

Bakterilerin hepsi kapsüllü değildir, bazılarında kapsül bulunur. Kapsül, bakteri duvarının etrafında oluşur. Bakterinin canlılığını sürdürebilmesi için gerekli bir yapı değildir. Örneğin; *Klebsiella pneumoniae*, *streptococcus pneumoniae*, *bacillus anthracis* gibi bakterilerin kapsülü vardır.

Kapsül, insan vücudunda ve protein içeren zenginleştirilmiş besiyerlerinde daha iyi oluşur ve M veya S koloni şeklinde görünür. Bu kolonilerden lam üzerine alınarak preparat hazırlanır ve özel boyalarla boyanarak kapsüllü bakteriler incelenir.

Kapsülü incelemek için daha çok negatif boyama yöntemleri kullanılır. Bu yöntemde preparat asit yapıda olan **nigrosin boyası** ve **çini mürekkebi** ile boyanır. Negatif boyama yönteminden başka muir, burri ve hiss yöntemleri de vardır.

5.1. Nigrosin Solüsyonunun Hazırlanması

- Nigrosin 10 g
- Distile su 100 ml
- %40'lık formalin 0,5 ml
- Nigrosin, distile su içinde 30 dakika kaynatılarak eritilir. Koruyucu olarak soğuduktan sonra 0,5 ml formalin ilave edilir, filtreden 2 defa süzülür. 5'er ml'lik kısımlar hâlinde küçük şişelere paylaştırılır, sonra ağzları kapatılır.

5.2. Negatif Boyama Yöntemi

İki çeşit negatif boyama yöntemi vardır: Birinci yöntem yaş boyama yöntemiyle negatif boyama, ikinci yöntem ise kuru boyama yöntemiyle negatif (diferensiyel) boyamadır.

5.2.1. Yaş Boyama Yöntemiyle Negatif Boyama

Bakteriyolojide kapsül varlığını ortaya koymak için daha çok yaş boyama yöntemi tercih edilir. Çünkü kapsüllerin çoğu yaklaşık % 99 oranında su içerir; bu durumda preparat kurutularak incelendiğinde kapsül büzülebilir.

Yaş boyama yönteminden iyi sonuç alınabilmesi için, preparatın çok ince yayılması, bu şekilde üzerine lam kapatılması gerekmektedir. Preparatın kurumaması için kapatılan lamelin kenarları, buharlaşmayı önlemek amacıyla yapıstırılır ve bekletmeden incelenir.

Yaş boyama yönteminde çini mürekkebi boyası kullanılır. Çini mürekkebi içindeki partiküller, kapsülün jel benzeri matris (iç kısmını dolduran dolgu maddesi) yapısından geçemez ve hücre içine giremez. Bu nedenle, boyama sonucunda mikroskopla incelemede; bakteri hücresi ve kapsül yapısı, karanlık sahada siyah zemin üzerinde saydam bir zonla ayrılmış renksiz boşluklar hâlinde görünür.

- **Yaş boyama yöntemiyle negatif boyamada sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılır.**
 - İncelenecek kültür besiyerinden alınan bakteri kolonisi veya bir öze dolusu alınan sıvı kültür, temiz bir lam üzerinde, bir damla serum fizyolojik içerisinde süspanse edilir.
 - Üzerine bir damla çini mürekkebi ilave edilir.
 - Karışım üzerine hemen bir lamel kapatılarak karanlık alan mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenir.
 - İncelenen preparatta, bakteri hücresi ve kapsül yapısı, karanlık sahada siyah zemin üzerinde saydam bir zonla ayrılmış renksiz boşluklar hâlinde görünür.

5.2.2. Kuru Boyama Yöntemiyle Negatif (Diferensiyel) Boyama

Kuru boyama yöntemiyle boyamada çini mürekkebi veya nigrosin kullanılır. Çini mürekkebi ve nigrosin boyasının etki tarzları farklı olmasına rağmen preparatı aynı renge siyaha boyar ve kapsülün çevresinde siyah bir saha oluşturur.

Bu yöntemde yaş boyama yönteminden farklı olarak froti yapılır yani, incelenecek kültür örneğinden lama yayma yapılır ve kurutulur. Ayrıca preparat hücrelerin boyanması amacıyla bir karşıt boya ile muamele edilir. Bu yöntemde, kuruma sırasında kapsül büzülebileceğinden dolayı pek tercih edilmez.

- **Kuru boyama yöntemiyle negatif boyamada sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılır.**
 - İncelenecek kültür besiyerinden alınan bakteri kolonisi veya bir öze dolusu alınan sıvı kültür, temiz bir lam üzerinde, bir damla çini mürekkebi veya nigrosin boyası içinde süspanse edilir.
 - İnce bir froti hazırlanır.
 - Kuruduktan sonra alevde tespit edilir ve karanlık alan mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenir. Boyanan kapsül, aynı şekilde siyah zemin üzerinde, renksiz boşluklar hâlinde görülür.
 - Tespit edilen preparatlar metilen mavisi kullanılarak basit boyama yöntemi ile boyandığında, bakterinin kendisi mavi, kapsül yapısı ise bakteri etrafında renksiz şekilde görülür.

5.3. Muir Yöntemi

- İnce yayma kurutulur, alevde tespit edilir.
- Üzeri yoğun asit fenikli fuksin ile kaplanır, kaynatmadan alttan ısıtılarak 2-3 dakika bekletilir.
- % 95'lik etanol ile renk giderilir, su ile yıkanır.
- Lugol ilave edilerek 30 saniye bekletilir, tekrar yıkanır.
- Metilen mavisi ile 1 dakika boyanır, yıkanır, kurutulur ve incelenir.
- Bakteriler kırmızı, kapsüller mavi renkte görülür.

5.4. Burri Yöntemi

- İnce yayma kurutulur, alevde tespit edilir.
- Üzeri sulu fuksin ile kaplanır, 15-20 saniye bekletilir.
- Yıkanır, kurutulur ve incelenir.
- Siyah zeminde bakteriler kırmızı ve kapsül renksiz görülür.

5.5. Hiss Yöntemi

- Lam üzerinde, bir damla normal serum ile incelenecek kültür besiyerinden alınan koloni, serum fizyolojik içinde karıştırılarak süspansiyonu yapılır ve yayılır.
- İnce yayma kurutulur, alevde tespit edilir.
- Üzeri (kristal) karbol viyolenin % 1'lik solüsyonu ile kaplanır, alttan ısıtılarak (kaynatmadan) 1 dakika bekletilir.
- % 20'lik bakır sülfat solüsyonu ile yıkanır ve incelenir.
- Kapsül yapısı, mor renkli hücre etrafında açık mavi renkte görülür.

UYGULAMA FAALİYETİ

Bakteri kapsülünü negatif boyama yöntemiyle boyayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ Temiz bir lamın ortasına bir iki damla çini mürekkebi koyunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Önlük, eldiven ve maske kullanınız.➤ Boyayı kullanmadan önce kontrol ediniz.➤ Lama özeyle çini mürekkebi koyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Boyaması yapılacak kültür örneğinden aynı oranda alınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Kültür örneğinden öze ile kolonileri tek tek seçerek alınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Öze ile alınan örneği, lamdaki çini mürekkebi ile karıştırıp süspansiyon hâline getiriniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Karışımı homojen hâle getiriniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Lamdaki karışımın üzerini lamelle kapatınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Karışımı biraz yaydıktan sonra üzerine 45 derecelik eğimle lameli dikkatlice bırakınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Lamelin üzerine kurutma kâğıdı ile bastırılarak fazla boyayı alınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Lamelin kenarına ayrı, üzerine ayrı kurutma kâğıdı parçası koyunuz.➤ Lamelin üzerine koyduğunuz kurutma kâğıdına (çok dikkatli ve lameli kaydırmadan) bastırarak aradaki fazla solüsyonun dışarı akmasını sağlayınız.➤ Kurutma kâğıdını antiseptik bulunan kaba bırakınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Lamelin kenarlarını kapatınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Lamelin kenarlarını sıvı parafin ya da sıvı vazelin ile kapatınız.➤ Kenarlar kapatılsa dahi hemen incelemeyi yapınız.➤ Kapsül ile bakteri hücrelerini birbirinden ayırt etme güçlüğünden dolayı incelemeyi, faz-kontras mikroskobu ile yapınız.➤ Kullandığınız malzemeleri aldığınız yere koyunuz.➤ Çalışma alanını dezenfektan maddeyle temizleyiniz.➤ Ellerinizi yıkayıp antiseptik solüsyondan geçirin.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Negatif boyama yönteminde, besiyerlerinde üreyen kolonilerden alınır, lam üzerinde preparat hazırlanır ve özel boyalarla boyanarak kapsüllü bakteriler incelenir.
2. Bakteriolojide % 99 oranında su içeren kapsülün, büzülmesini önleyerek varlığını ortaya koyabilen yöntem yöntemidir.
3. Nigrosin, asidik bir boya olup bakterinin bulunduğu ortamı renkte boyar.
4. Yaş boyama ve kuru boyama yöntemiyle negatif boyama yöntemlerinde boyası kullanılır.
5. Yaş boyama yönteminde preparatın buharlaşıp kurumaması için lamelin etrafıile kapatılır.

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-6

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle preparatı spor boyama yöntemi ile boyayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

Bakterilerde ve mantarlarda sporun önemini araştırınız.

6. SPOR BOYAMA

Bazı bakteriler uygun olmayan koşullarda yaşamlarını idame ettirebilmek için, hücre içinde endospor adı verilen özel formlar oluşturur; bu oluşumdan sonra bakteriler parçalanabilir ya da ölebilir, endosporlar açığa çıkabilir, buna kısaca spor adı verilir. Spor çevreye yayılarak yıllarca bu hâlde canlılığını sürdürür. Uygun koşullar (nem, sıcaklık, oksijen durumu, besin ortamı) oluştuğunda her spor, tekrar bir bakteri hücresi hâline yani, üreyip çoğalabilen bakteri hâline dönüşür. Spor bulundurmeyen ve üreyip çoğalabilen bakteri hücresine “vegatatif hücre” denir. Spor oluşmuş hücrede, sporu çevreleyen hücre kısmına “sporangium” adı verilmektedir.

Bakteriyolojide genellikle kullanılan boyalar gram boya ve bazik boyalardan metilen mavisidir. Sporlar, kullanılan bazik boyaları içlerine almamak için büyük direnç gösterir. Bu nedenle, boyama sonucunda vegatatif şekil ile sporangium boyanırken spor boyanmaz, boyasız sporlar tanımlanır ancak, sporlar boyanmadığı için hem metilen mavisi ile boyama yöntemi hem de gram boyama yöntemi, spor boyama yöntemi olarak kabul edilmez.

6.1. Spor Boyama Yöntemleri

Spor boyama yöntemi olarak birçok yöntem varsa da genelde **schaffer fulton yöntemi** kullanılır.

6.1.1. Schaffer Fulton Yöntemi

Sporların hücre çeperi çok kalın olduğu için alttan ısıtmak suretiyle spor boyayı alır. Spor boyama için genel olarak malaşit yeşili boyası kullanılır.

- **Schaffer fulton yöntemiyle boyamada sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılır.**
 - Preparat üzerine malaşit yeşili boyası konur ve alttan ısıtılarak boyanın, spor içine girmesi sağlanır.

- Ppreparat soğutulup yıkanır.
- Bunun sonucunda, sporlar yeşil renkli boyanır, sporangium ise renksiz kalır.
- Sporun sporangium içindeki konumunu görmek önemli olduğundan boyama işlemine devam edilir.
- Dekolarizasyon yapılmadan preparat, karşıt boya olan sulu fuksin veya safraninle boyanır. Bu durumda sporangium kaşıt boyayı alarak kırmızı, spor ise yeşil renkte görünür.

6.2. Spor Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması

➤ Malaşit yeşili boya solüsyonu

- Malaşit yeşili 1g
- Distile su 100 cc
- Malaşit yeşili havana konur, distile su azar azar ilave edilir. Sonra suyun bir kısmı tekrar havana ilave edilerek havan yıkanır ve tekrar şişeye alınır. Bir gün bekletildikten sonra süzülür ve şişelerde saklanır.

➤ Sulu fuksin solüsyonu

- Bazik fuksin (stok solüsyonu) 10 cc
- Distile su 100 cc
- Fuksin, distile suda iyice karıştırılır, filtre kâğıdında süzülür ve şişeye konur.

➤ Safranin boya solüsyonu

- Safranin 0,5 g
- Alkol(%95'lik) 10 cc
- Distile su 100 cc
- Safranin alkolle eritilir ve distile su ilave edildikten sonra şişeye konur ve bir gün sonra filtre kâğıdında süzülür.

UYGULAMA FAALİYETİ

Preparatı ehrlich-ziehl-neelson boyasıyla boyayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Tespit edilen preparatı boyama sehпасına koyunuz.	➤ Önlük, eldiven ve maske kullanınız. ➤ Boya sehпасını düz zemin üzerine yerleştiriniz.
➤ Preparatın üzerini malaşit yeşili boyası ile kaplayınız.	➤ % 5'lik malaşit yeşili kullanınız. ➤ Boyayı kontrol ediniz. ➤ Boya şişesini alt-üst ederek karıştırınız. ➤ Gerekirse boyayı süzünüz. ➤ Süre bitiminde preparat üzerindeki boyayı dökünüz.
➤ Preparatı bek alevinde, alttan 5-6 dakika buhar çıkıncaya kadar ısıtınız.	➤ Alevi çok kısık olarak ayarlayınız. ➤ Boyayı kaynatmadan ısıtınız. ➤ Buharla birlikte boya azaldıkça ilave ediniz. ➤ Isıtma işlemini sıcak su banyosunda da yapabilirsiniz.
➤ Preparatı suyla yıkayınız.	➤ Preparatı tazyiksiz suda yıkayınız. ➤ Yıkanan preparatı boya sehпасına yerleştiriniz.
➤ Preparatı sulu fuksin ile 20-30 saniye boyayınız.	➤ % 0,5'lik sulu fuksin kullanınız. ➤ Sulu fuksin yerine safranin de kullanabilirsiniz. ➤ Boyayı kontrol ediniz. ➤ Süre bitiminde preparat üzerindeki boyayı dökünüz.
➤ Preparatı suda yıkayınız.	➤ Suyu yavaş akıtarak yıkayınız.
➤ Preparatı kurutunuz.	➤ Preparatı kurutma kâğıdı arasında hafifçe bastırılarak ya da havada kurutunuz. ➤ Kullandığınız malzemeleri aldığınız yere koyunuz. ➤ Çalışma alanını dezenfektan maddeyle temizleyiniz. ➤ Ellerinizi yıkayıp antiseptik solüsyondan geçirin.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Bakteriler uygun olmayan koşullarda yaşamlarını idame ettirebilmek için, hücre içinde adı verilen özel formlar oluşturur.
2. Ortamda nem, sıcaklık, oksijen, pH, besin gibi uygun koşullar oluştuğunda her spor, tekrar birhâline dönüşür.
3. Schaffer fulton yöntemiyle boyamada; kullanılan ilk boyaya işlemi uygulanmadan preparat ,karşıt boya ile boyanır
4. Schaffer fulton yöntemiyle boyamada spor.....,..... sporangium ise kırmızı renkte boyanır.
5. Sporların hücre çeperi çok olduğu için alttan ısıtmak suretiyle spor boyayı almaktadır.

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-7

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle preparatı kirpik boyama yöntemi ile boyayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

Bakteri kirpikleri hakkında bilgi ediniz.

7. BAKTERİLERDE KIRPIK BOYAMA

Flagella, bakterinin aktif hareket etmesini sağlayan ve bakteri hücre duvarından dışa doğru uzanan yapısıdır. Her bakteride kirpik bulunmaz. Bazı bakteriler kirpikleri olmadığı hâlde buldukları yerde titreşim tarzında hareket eder.

7.1. Kirpik Boyama İçin Preparat Hazırlanması

Kirpikler, mikroskopta direkt preparatta görülmeyecek kadar ince (12-30 nm) olduğu için ancak, özel yöntemlerle görünür hâle getirilir. Bu amaçla hazırlanan yayma, önce tannik asitle muamele edilir; bakteri kirpikleri üzerinde çökelti meydana getirilir, bu şekilde kirpik ve bakteri çeperi gözlenebilir kalınlığa ulaşır. Bu işlemden sonra yapılan boyamada kirpikler net olarak incelenir.

Kirpik yapılarının gösterilmesi için leifson boyama yöntemi yaygın olarak kullanılır. Boyama işlemi yapabilmek için de, kesinlikle sıvı bir ortamda bakterilerin üretilmesi; bakterilerin kirpiklendirilmesi gerekir.

Bakteriler sıvı besiyerlerinde ve içinde bol birikme suyu bulunan yatık katı besiyerlerinde iyi kirpiklenir. Bu besiyerlerinde bakteriler birikme suyuna ekilir.

12 -24 saatlik kültürlerin birikme suyundan alınan bir öze dolusu kültür yeni bir besiyerine aynı şekilde ekilir ve üretilir. Çok temiz bir tüp içine 1-2 ml steril saf su konur. Son kültürün birikme suyundan alınan 1-2 damla kültür aynı sıcaklıkta ısıtılmış olan bu saf suyun içine damlatılır. Bu ekim optimum sıcaklıkta 7-18 saat enkübe edilir.

Kirpik boyaması yapılacak olan lam ve lamellerin olabildiğince temiz ve yağdan arındırılmış olması gerekir. Yeni lam ve lameller kullanılır. Bunlar önce saf alkole daldırılıp yumuşak bir bez ile silindikten sonra potasyum kromatlı sülfürik asit eriyiğinde birkaç gün bekletilir. Lam maşaları ile alınan lam ve lameller önce musluk sonra saf suda iyice yıkanır. Kullanılırken yine maşa ile tutularak alevde üzerlerindeki alkol yakılır. Kesinlikle el ile tutulmaz.

Preparatın hazırlanması özen gerektirir. Kullanılacak lamaların iki yüzü aleve yalattılır. İlinmaları için bırakılır.

Preparat yapmak için yukarıda anlatıldığı şekilde kirpiklendirilen bakterilerin bulunduğu süspansiyondan öze ile alınıp lamaların üzerine yavaşça 1-2 cm alanında yayma yapılır. Bu esnada lamaların hafif sıcak olmaları ve yaymanın hemen kurumaması uygundur. Bir materyalden birkaç preparat hazırlanır. Preparatlar kurumaları için 34 derecelik etüve konur ve bir saat bekletilir. Alevde tespit, kirpikleri bozduğundan kullanılmaz. Preparatların tespiti ılık havada kurutma ile yapılır ancak bu iyi bir tespit şekli değildir. Bu nedenle boya eriyiklerinin ve yıkama esnasında suyun çok yavaş ve lam yüzeyine darbe yapmayacak biçimde kullanılması preparatların akıp gitmemesi yönünden önemlidir.

Yaymaların çok yavaş hareketlerle yapılması bazı araştırmacılara göre gerek öze gerekse cam kullanılarak yapılan yaymalarda kirpikler bozulabileceğinden lama bırakılan damlanın değdirilerek yayılması ya da makasla kesilmiş bir kâğıt şeridin kenarı ile yayılması önerilmektedir.

7.2. Kirpik Boyama Yöntemleri

Bakterilerin kirpikleri çok ince olduğu için ışık mikroskopunda görülmeleri zordur. Boyama yöntemleri ile boyanarak kirpiklerin üzerinde boyaların birikmesi ve bu suretle kalınlaşması sonucunda kirpikler görünür hâle gelir. Kirpikler çok duyarlı olduğundan başarılı sonuç almak için boyama yöntemlerinin özenle uygulanması ve aynı anda birkaç preparatın incelenmesi gerekir.

Aynı anda aynı kültürden birkaç preparat hazırlanıp değişik sürelerle boyanmalı sonra hepsi incelenerek en iyi sonuç veren saptanmalıdır.

➤ Kirpik boyama yöntemi ile boyamada sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılır.

- Aynı anda aynı kültürden birkaç preparat hazırlanır, tespit edilir ve kurutulur.
- Preparatlar boyama sehпасına bırakılır.
- Hepsinin üzeri boya eriyiğı kaplanır ve hemen kronometreye basılır.
- Preparatların her biri sıra ile 6, 8, 10, 12 dakika ve gerekirse daha uzun sürelerin sonunda tek tek lam maşası ile tutulur.
- Üzerindeki boya dökülmeksizin yavaş damlayan musluğun altına tutulup yavaşça yıkanır.
- Bir süzgeç kâğıdının üzerine eğik olarak bırakılarak süzdürülür.
- Tüm preparatların boyanma ve yıkanması tamamlanınca hepsi yeniden boyama sehпасına dizilir.
- Preparatların üzeri löfflerin metilen mavisi boyası kaplanarak 30'ar saniye boyanır.
- Sonunda yine aynı titizlikle ve yavaşça yıkanıp süzdürülür.
- Preparatlar havada kurutulur.

- İmmersiyon objektifi ile incelenen preparatta; bakterilerin mavi renkte kirpiklerin pembe renkte görülmesi gerekir. Tüm preparatlar incelenerek en iyileri seçilir.

7.3. Flagella Boya Solüsyonun Hazırlanışı

➤ Boya solüsyonu

- Tannik asit..... 1 g
- Sodyum klorür..... 0,5 g
- Bazik Füksin..... 0,4 g
- %95 lik alkol..... 33 ml
- Distile su 100 ml
- Tanik asit, sodyum klorür ve bazik füksin bir havanda ezilirken alkol eklenerek eritilir. 100 ml işaretli bir balona aktarılır. Havan distile su ile yıkanır ve ilave edilir, kalan su ile 100 ml'ye tamamlanır. Solüsyonun pH'ı 5'e ayarlanır. Boya kapaklı ve renkli şişede, 3oC-5oC'de buzdolabında birkaç hafta saklanır.

➤ Löfflerin metilen mavisi

- Metilen mavisi 0,3 g
- %95 etil alkol 30 ml
- %10 luk KOH 0,1 ml
- Distile su 100 ml
- İçinde eritilir ve şişelerde saklanır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Preparatı kirpik boyasıyla boyayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Tespit edilen preparatları boyama sehпасına koyunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Önlük, eldiven ve maske kullanınız.➤ Kirpikler çok hassas olduğundan boyama işlemini özenle yapınız.➤ Birkaç preparat hazırlayınız ve boyayınız.
➤ Preparatların üzerine boyayı dökünüz ve hemen kronometreye basınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Boya solüsyonunu kontrol ediniz.➤ Boya solüsyonunu yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde preparata dökünüz.➤ Süreleri belirlemede kronometre veya laboratuvar saatlerini kullanınız.
➤ Preparatların her biri sıra ile 6, 8, 10, 12 dakika ve gerekirse daha uzun sürelerde tutunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Bekleme sürelerine mutlaka uyunuz.➤ Sürelerin sonunda preparatları elinizle değil, tek tek lam maşası ile tutunuz.
➤ Preparatların üzerindeki boya dökülmeksizin yavaş damlayan musluğun altında yavaşça yıkayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Üzerindeki boyayı dökmeden suyu damlatarak yavaşça yıkayınız.➤ Lamdaki yaymanın akmamasına özen gösteriniz.
➤ Bir süzgeç kâğıdının üzerine eğik olarak bırakıp süzdürünüz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Yaymanın olduğu tarafı, hiçbir yüzeyele temas ettirmeyiniz.
➤ Tüm preparatları yeniden boyama sehпасına diziniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Süzülme işleminden sonra tüm preparatları tekrar boyamak üzere boya sehпасına yerleştiniz.
➤ Preparatların üzerini löfflerin metilen mavisi boyası ile kaplayarak 30'ar saniye boyayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Tüm preparatlara, üzerini tamamen örtecek şekilde metilen mavisi boyası koyunuz.➤ Her lamı sırasıyla 30 saniye mutlaka bekletiniz.
➤ Preparatları yavaşça yıkayıp süzdürünüz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatların yine aynı titizlikle ve suyu damlatarak yavaşça yıkayınız.
➤ Preparatları havada kurutunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Kurutma kâğıdı kullanmayınız.➤ Kullandığınız malzemeleri aldığınız yere koyunuz.➤ Çalışma alanını dezenfektan maddelerden birini kullanarak temizleyiniz.➤ Ellerinizi yıkayıp antiseptik solüsyondan geçiriniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Bakterinin aktif hareket etmesini sağlayan yapısına denir.
2. Kirpiklerin büyüklüğü nanometre kadardır.
3. Kirpik yapılarının gösterilmesi için yöntemi yaygın olarak kullanılır.
4. Bakteri kirpiklerini görebilmek için öncelikle sıvı bir ortamda gerekir.
5. Kirpiksiz bakteriler, buldukları yerde hareket eder.

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-8

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle mantarların tanımlanabilmesi için preparatı laktofenol pamuk mavisi boyasıyla boyayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

Mantar enfeksiyonlarından alınan örnekler ve incelenmeleri hakkında bilgi edininiz.

8. LAKTOFENOL PAMUK MAVİSİ İLE BOYAMA

Mantarların yaptıkları hastalıkların (mikozların) tanımlanmasında kullanılan bir boyama yöntemidir. Kandidalardan başka insanlarda hastalık yapan mantarların birçok cins ve bunlarında türleri vardır.

Mantarlar, genel olarak maya ve küf mantarları olmak üzere iki gruba ayrılır. Mayalar, bakteriler gibi gram boyası vb. boyalarla boyanabilir. Küf mantarlar ise laktofenol gibi özel boyalarla boyanır. Boyamada küf mantarlarının; hif yapıları ve mantar sporların daha iyi görülmesini sağlamak amaçlanır.

8.1. Mantar Aranması

Deri, saç ve tırnak örnekleri başta olmak üzere, vajen ve üretra akıntıları, balgam, doku parçaları, kan örneklerinde mantar analizi yapılır. Örneklerden preparatlar hazırlanır; direkt ya da boyanarak mikroskopta incelenir.

8.1.1. Direkt Preparat Hazırlama

- Temiz bir lamın üzerine birkaç damla % 10-20'lik KOH veya NaOH konur. Bu maddelerle mantar örneğindeki kitin tabakasının çözülmesi ve hiflerin ortaya çıkması sağlanır.
- Pens veya cımbızla çekilen, wood ışığı altında yeşil görünen saç telleri, kazıma yolu ile alınan tırnak ve deri (lezyon) döküntüleri lam üzerindeki KOH damlasıyla karıştırılır, üzerine lamel kapatılır.
- Nemli bir bez veya pamuk içeren bir petri kutusu içine ya da içinde su bulunan büyük saat camı içine preparat yerleştirilir ve üstüne diğer saat camı kapatılır. Bu şekilde oda sıcaklığında beklemeye bırakılır ve mantarın nemlenmesi sağlanır.

- 2-2,5 saat sonra preparat mikroskopta azaltılmış ışıktta önce 10'luk sonra 40'luk objektif ile incelenir. Preparatların aynı gün içinde incelenmesi gerekir.

8.1.2. Boyalı Preparat Hazırlama

Bu yöntemde boyama uygulaması diğerlerinden farklı olup preparata konulan boyayla birlikte inceme yapılmaktadır.

- Temiz lam üzerine bir damla etil alkol konur.
- Pastör pipeti ile bir miktar kültür örneği alınır, alkol içinde karıştırılır.
- Preparat üzerine bir damla laktofenol pamuk mavisi boyası damlatılır ve üzerine temiz bir lamel kapatılır.
- Lam etrafına yayılan sıvı kâğıtla alınır ve etrafı sıvı parafin veya sıvı vazelin ile kapatılır.
- İmmersiyon objektifi ile incelenen preparatta, boyanan mantarlar açık mavi renkte görünür.

8.1.3. Mantar Aranmasında Kullanılan Diğer Boyama Yöntemleri

- **Laktofenol pamuk mavisi boyasıyla pratik olarak preparatın boyanması:** Temiz bir lam üzerine bir damla laktofenol pamuk mavisi eriyiğinden konur. Selofan bandın yapışkan tarafı petri kutusunda üretilmiş olan mantar kolonisi üzerine temas ettirildikten sonra lamın üzerindeki lakto fenolpamuk mavisi üzerine bastırılarak, yapışkan kısmın lamın yüzeyine yapışması sağlanır ve mikroskopta incelenir.
- **Gram boyama:** Daha çok maya formlarını gözlemek amacıyla kullanılır ve bütün mantarlar gram pozitif boyanır.
- **Peryodik asit shift (PAS) boyama yöntemi:** Genel olarak doku içindeki mantarların gösterilmesi amacıyla kullanılır.

8.1.4. Laktofenol Pamuk Mavisi Boya Solüsyonun Hazırlanışı

- **Boya solüsyonu:**
 - Laktik Asit 20 ml
 - Fenol kristal 20 g
 - Gliserin 40 ml
 - Distile su 20 ml
 - Pamuk mavisi (poirrier mavisi) 0,075 g
 - Distile su, gliserin ve laktik asit karıştırılır. Hafif ateşte ısıtılırken fenol kristalleri ilave edilerek eritilir. Sonra da boya ilave edilip eritilir.
- **%95'lik etil alkol**

UYGULAMA FAALİYETİ

Preparatı laktofenol pamuk mavisi boyasıyla boyayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Temiz bir lamı boyama sehpasına yerleştiriniz.	➤ Önlük, eldiven ve maske kullanınız. ➤ Temiz, pürüzsüz hatta kutusundan yeni çıkartılan lamı kullanınız.
➤ Lam üzerine bir damla alkol damlatınız.	➤ % 95'lik etil alkol kullanınız.
➤ Kültürdeki şüpheli koloniden iğne öze ile bir miktar örnek alınız.	➤ Steril iğne öze kullanınız. ➤ Kolonileri tek tek özellikle alınız.
➤ İğne öze ile aldığınız örneği, lamdaki alkolle karıştırarak lama yayınız.	➤ Özedeki örneği lamdaki alkol içinde homojenize ederek lama yayınız. ➤ Lamdaki fazla alkolün uçmasını sağlayınız.
➤ Lam üzerine bir damla laktofenol pamuk mavisi boyası damlatıp üzerine lamel kapatınız.	➤ Boyayı kullanmadan önce kontrol ediniz. ➤ Lameli kapatırken hava kabarcığı olmamasına dikkat ediniz. ➤ Lamelin kenarlarına taşan fazla boyaları kurutma kâğıdıyla alınız.
➤ Preparatın kurumaması için lamelin kenarlarını sıvı vazelin ile kapatınız.	➤ Sıvı vazelin yoksa yerine, sıvı parafin kullanabilirsiniz. ➤ Kullandığınız malzemeleri aldığınız yere koyunuz. ➤ Çalışma alanını dezenfektan maddeyle temizleyiniz. ➤ Ellerinizi yıkayıp antiseptik solüsyondan geçirin.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Laktofenol pamuk mavisi boyasıyla, hif yapılarının ve sporların daha iyi görünmelerini sağlamak amaçlanır.
2. Gram boyasıyla mantarların boyanır.
3. Gram boyasıyla boyanan bütün mantarlar boyanırlar.

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 soruları cevaplandırınız.

1. Fiksasyon nedir?
2. Sporangium nedir?
3. Vegetatif nedir?

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

4. () Mikrobiyolojik boyalarda oksokrom, boyaya rengini veren boyayıcı kısımdır.
5. () Boyasız preparat incelemesi daha çok protozoonların araştırılması ve bakteri hareketlerinin görülmesi amacıyla yapılır.
6. () Örnek ve kültürlerin kan ve mukus olmayan yerlerinden öze ile alınarak yayma yapılır.

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

7. Fiksasyonda yani, bakterilerin lam üzerine tespit işleminde amaç ve yıkarken akmaması amaçlanır.
8. Taze kültür yani, saatlik kültür kolonisinden preparat hazırlanır.
9. Bakteriyoji laboratuvarlarında genellikle boyalar kullanılır.
10. Kirli lamın temizliği, lama etil damlatılıp temiz bezle silinerek yapılır.
11. Löffler'in metilen mavisi boyasıyla boyamada, Corynebacterium diptheriae'nın içinde bulunan ve besin deposu olan tespit edilir.

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

12. Aşağıdakilerden hangisi, nötral boya grubundan değildir?
A) Giemsa
B) Wright
C) May-Grünwald
D) Eosin
E) Leishman

13. Aşağıdakilerden hangisi, preparat hazırlama ile ilgili yanlış bir ifadedir?
A) Sıvı materyalden veya sıvı kültürden bir öze dolusu alınır, lam üzerine konan bir damla distile su içinde homojen bir şekilde yayılır.
B) Katı ve yarı katı materyalden özeye küçük bir parça alınır, lam üzerine konan bir damla distile su içinde ezilerek homojen bir şekilde yayılır.
C) Biyopsiden alınan küçük bir parçacık (1-2 mm³), temiz iki lam arasında ezilerek preparat hazırlanır.
D) Eküvyon ile alınan materyal, temiz lam üzerine sürülerek yayma yapılır.
E) Temiz bir lam ucuna bir damla taze kan konup diğer bir lamın kısa kenarıyla ince, homojen ve seri bir şekilde lama yayılır.
14. Aşağıdaki örneklerden hangisi, alevde tespit edilmeyip alkol, eter vb. gibi kimyasal maddelerle tespit edilir?
A) Gaita örneği
B) Kan örneği
C) Balgam örneği
D) Yara örneği
E) Akıntı örneği
15. Aşağıdakilerden hangisi, kapsül boyama yöntemlerinden değildir?
A) Negatif boyama yöntemi
B) Muir yöntemi
C) Erlich-Ziehl-Neelson boyama yöntemi
D) Burri yöntemi
E) Hiss yöntemi
16. Erlich-ziehl-neelson boyama yönteminde renk giderici olarak kullanılan kimyasal madde hangisidir?
A) Alkol
B) Eter
C) Eter-alkol
D) Aseton
E) Asit- alkol
17. Aşağıdaki boyama yöntemlerinden hangisi, mantar boyamada kullanılır?
A) Eosin
B) Giemsa
C) Laktofenol
D) Nigrosin
E) Fuksin

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırmınız. 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	A
3	D
4	B
5	E

ÖĞRENME FAALİYETİ 2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	E
2	C
3	D

ÖĞRENME FAALİYETİ 3'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	koyu mavi
2	absorbe
3	bileşik boyama

ÖĞRENME FAALİYETİ 4'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	kırmızı
2	asidik ve bazik
3	lipit
4	balgam
5	metilen mavisi

ÖĞRENME FAALİYETİ 5'İN CEVAP ANAHTARI

1	M veya S
2	yaş boyama yöntemiyle negatif boyama
3	siyah
4	çini mürekkebi
5	Sıvı parafin ya da öje

ÖĞRENME FAALİYETİ 6'NİN CEVAP ANAHTARI

1	endospor
2	bakteri hücresi
3	renk giderme
4	yeşil renkte
5	kalın

ÖĞRENME FAALİYETİ 7'NİN CEVAP ANAHTARI

1	Flagella
2	12-30
3	leifson boyama
4	Bakterilerin üretilmesi
5	Titreşim yaparak

ÖĞRENME FAALİYETİ 8'İN CEVAP ANAHTARI

1	küf mantarların
2	maya formları
3	gram pozitif

MODÜL DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI

1	Materyalin lam üzerine tespit edilme işlemine fiksasyon denir..
2	Spor oluşmuş bakteri hücresinde, sporu çevreleyen hücre kısmına sporangium adı verilmektedir.
3	Bakteri hücresinin üreyip çoğalabilen şekline vegatatif denir.
4	Yanlış
5	Doğru
6	Yanlış
7	Materyalin lama yapışması
8	18-24
9	Bazik
10	Alkol veya ksilol
11	Metakromatik cisimcikler-granüller
12	D
13	A
14	B
15	C
16	E
17	C

KAYNAKÇA

- AKŞİT Filiz, Yurdanur AKGÜN, Nuri. KİRAZ, **Mikrobiyoloji**, Anadolu Üniversitesi A.Ö.F. Hemşirelik Önlisans Eğitimi, 1991.
- BARUTÇU Gülşen, Tufan BARUTÇU, **Mikrobiyoloji ve Bağışıklama**, Öz-El Matbaası, 1993.
- BİLGEHAN Hakkı, **Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi**, Barış Yayınları, 1993.
- BİLGEHAN Hakkı (editör), **Klinik Mikrobiyoloji Tamı**, 2.baskı, İzmir Fakülteler Kitabevi, 1995.
- **Hacettepe Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı**, Taş Kitapçılık, 1994-1995.
- KOCATÜRK Utkan, **Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü**, Ankara Basımevi, 1991.
- POLAT Şeyda, **Mikrobiyoloji ve Bağışıklama**, Türk Sağlık Eğitim Vakfı, Ankara, 2001.
- SEZGİN Nazan, **Mikrobiyoloji Laboratuvarı**, Baran Ofset Ankara, 2002.
- TEMUR Nermin, **Klinik Mikrobiyoloji**, Türk Sağlık Eğitim Vakfı, Ankara, 2001.
- USTAÇELEBİ Şemsettin, **Tıbbi ve Klinik Mikrobiyoloji**, Güneş Kitabevi, 1999.