

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ  
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ BÖLÜMÜ

# ÇEVRE MİKROBİYOLOJİSİ LABORATUVAR FÖYÜ

PROF. DR. GAMZE TURAN

Arş Gör. Handan Atalay  
Arş. Gör. Sevda Esmâ Akkaya

SAMSUN-2019

## İÇİNDEKİLER

Çevre Mikrobiyolojisi Laboratuvarının Amacı.....	1
Laboratuvar Kapsamında Sık Kullanılan Terimler.....	1
Laboratuvarda Kullanılan Araç-Gereç ve Malzemeler.....	1
<b>1. MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR.....</b>	<b>3</b>
<b>2. DEZENFEKSİYON VE STERİLİZASYON.....</b>	<b>3</b>
<b>3. SIVI BESİYERİ HAZIRLANMASI VE EKİM.....</b>	<b>9</b>
<b>4. KATI BESİYERİ HAZIRLANMASI VE EKİM.....</b>	<b>11</b>
<b>5. YAŞ ÖRNEKLEME.....</b>	<b>14</b>
<b>6. MİKROORGANİZMALARIN BOYANMASI.....</b>	<b>14</b>
<b>7. KOLİFORM TAYİNİ.....</b>	<b>16</b>
<b>8. ALKOLİK FERMANTASYON .....</b>	<b>20</b>

## Çevre Mikrobiyolojisi Laboratuvarının Amacı

Çevre mikrobiyolojisi laboratuvarında amaç, mikroorganizmaların insan sağlığına ve toprak, hava, su vasıtasıyla çevreye olan etkilerini çabuk ve doğru bir şekilde ortaya koymak, bu mikroorganizmaların özelliklerini belirlemek ve olumsuz etkilerinin giderilmesine yardımcı olmaktır.

## Laboratuvar Kapsamında Sık Kullanılan Terimler

**Preparat:** Mikroskop altında incelenmek üzere hazırlanmış maddeye denir.

**Besiyeri :** Mikroorganizmaların cinsine göre hızlı çoğalıp gelişmesi için gerekli maddeleri ihtiva eden sıvı ve katı ortamlara denir.

**Kültür :** Besiyerlerine yerleştirilmiş mikroorganizmalara denir.

**Saf Kültür:** Sadece bir cins mikroorganizmayı barındıran kültürlerle denir.

**İnokülasyon :** Mikroorganizmaları bir yerden alıp üremeleri için başka bir besiyerine koyma işlemidir. Aşılama veya ekim olarak da adlandırılır.

**İzolasyon :** Bir besiyerinde yerleştirilmiş çeşitli mikroorganizmalardan bir cinsini diğerinden ayırt etme işlemidir.

**Aseptik :** Laboratuvar çalışmaları ve inokülasyon boyunca kültürlerin çevreden etkilenmesini önlemek amacıyla uygulanan işlemdir.

**Fiksasyon :** Mikroorganizmaların lam üzerinde tesbit edilmesi işlemidir.

## Laboratuvarda Kullanılan Araç-Gereç ve Malzemeler

**Deney Tüpü :** Deney tüpleri besiyeri konarak kültür yapılması için kullanıldığı gibi serolojik çalışmalar ve diğer çalışmalarda da kullanılmaktadır. Çeşitli genişlikte ve uzunlukta olanları vardır. Daha çok iç çapı 1,5 cm ve uzunluğu 15 cm olan tüpler kullanılır.

**Durham Tüpü :** Bakterilerin karbonhidratları kullanarak gaz oluşturup oluşturmadığını anlamak için genişçe bir tüpün içerisinde ters olarak yerleştirilmiş küçük tüplere denir.

**Balon :** Şekli küre biçiminde, altı düz olan ve dar silindir şeklinde boynu bulunan cam kaptır Besiyerlerinin ve çözeltilerin yapılmasında ve saklanmasında kullanılır.

**Erlenmayer: Şekli** koni biçiminde, dar silindir şeklinde boynu olan ve altı düz cam kaptır. Balonlar gibi besiyerlerinin hazırlanması ve saklanmasında kullanılır.

**Petri Kutusu :** Yuvarlak 1 – 2 cm yüksekliğinde cam kutu ile bunun üstüne geçen aynı şekilde cam kapaktan ibarettir. Katı besiyerlerinin hazırlanmasında ve bakteri kolonilerinin incelenmesinde kullanılır.

**Pipet: Bir** ucu daralmış 20–30 cm uzunluğunda, 5–7 mm çapında cam borudur. Çözeltilerin ve bakteri süspansiyonlarının bir yerden başka bir yere belirli bir miktarda alınması işleminde kullanılır.

**Su Banyosu (Benmari) :** Yuvarlak veya dört köşeli madenden yapılmış çeşitli derinliklerde olabilen ve sıcaklık ayarı yapılabilen bir kaptır. Sıvıların belirli bir sıcaklığa getirilmesi ve inkübasyon işlemlerinde kullanılır.

**Öze: 6–7 cm** kadar uzunlukta metal ve tutma yeri olan bir çubuğun ucunda yer alan 2–4 mm çapında krom veya platinden yapılmış halkadan ibarettir. Mikroorganizmaların inokülasyonu işleminde kullanılır.

**İğne :** Platin, nikrom, öreka gibi dayanıklı ve okside olmayan tellerden yapılmış, 5-6 cm kadar uzunlukta ve 0.3-1 mm kalınlıktaki tahta veya plastik tutma yeri olan malzemedir, Katı besiyerlerinin içerisine inokülasyon işleminde ve bakteri kolonilerini seçmede kullanılırlar.

**Bunzen Beki :** Hava gazı veya tüpgaz ile çalışan ve ayarlı bir şekilde alev elde etmede kullanılan aletlerdir. Sterilizasyon işleminde kullanılır.

**Etüv** : Gerek mikroorganizmaların geliştirilmesi, gerekse cam malzemelerin sterilizasyonu için kullanılan dört köşe veya silindirik şekilde fırınlardır.

**Otoklav** : Sıcaklık ve basınç ayarı bulunan, madenden yapılmış ve silindirik şekilde 100 °C 'nin üstünde çalışan sterilizatörlerdir.

**Mikroskop** : Mikroskop küçük cisimleri büyütür görünmelerini sağlayan, merceklerden yapılmış optik bir alet olarak tanımlanabilir. Mikroskop çeşitli kısımlardan ibarettir. Bunlar mekanik kısım, aydınlatma sistemi ve optik kısım olmak üzere üçe ayrılır.

Mekanik kısım, aydınlatma sistemi ve optik kısmın taşıyıcısıdır. Ayak, kol, tabla, revolver, tüp ve vidalardan oluşur.

*Mikroskopun ayağı* U,V veya daire şeklinde olma üzere madenden yapılmış ve ağırdır. Mikroskopun koluna bir vida ile bağlıdır ve mikroskopun devrilmemesini sağlar. *Mikroskopun kolu* mikroskopun tutulmasına yarar. Buradan tutularak üst kısım eğik duruma r Bu durum okülerin göze daha kolay uyumunu sağlar. Kolun alt kısmına *mikroskopun tablası* Bu dört köşe veya yuvarlaktır ve ortasında delik vardır. Tabla incelenecek preparasyonları koymaya ve ortasındaki delik, ışık kaynağından gelen ışınların geçmesine yarar. *Mikroskopun tüpü* bazı optik kısımları taşıyan madeni bir borudur. Uzunluğu sabittir veya üst kısmın içine çekilince uzayabilen bir kısım vardır. Tüp kola bağlıdır ve vidalarla aşağı yukarı hareket ettirilir. Tüpün üst ucunda oküler bulunur. Alt ucunda objektifleri taşıyan revolver vardır. *Revolver* eksen etrafında hareket eder; bu hareketi ile taşıdığı 3 veya 4 objektiften her birini tüpün altına, görüş doğrultusuna getirmek mümkün olur. Objektifler revolverdeki deliklere vidalanmıştır. Tüpü dik konumda hareket ettiren iki vida vardır. Büyük olanı *makrometre vidası* tüpü fazla hareket ettirir. Bununla ancak ortalama bir ayarlama yapılabilir. Küçük olan *mikrometre vidası* tüpü çok az hareket ettirir. Bununla net ayarlama yapmak mümkündür.

Aydınlatma sistemi ışık kaynağından gelen ışınları preparasyonun üzerine düşürüp görme doğrultusuna getirir; cismi aydınlatarak görünmesini sağlar. Mikroskopla incelemede, ışık preparasyondaki cisimden geçtikten sonra göze geleceğinden aydınlatma sistemi tablanın altında bulunur ve ayna, kondansatör, diyaframdan meydana gelir. *Aynanın* bir tarafı düz, diğer tarafı konkavdır. Her yönde hareket edebilir. Işınları incelenecek maddenin üzerine yansır. *Kondansatör*, tablanın altında bulunan, bazı mikroskoplarda aşağı yukarı hareket edebilen ve gerektiğinde yerinden çıkarılabilen, madeni bir parçaya yerleştirilmiş merceklerden ibaret bir sistemdir. Aynadan gelen ışınları preparasyon üzerine toplayarak yeterli derecede aydınlatmayı sağlar. *Diyafram* kondansatörün altına yerleştirilir. Bir kol veya vida ile ortasındaki delik kısım istenildiği kadar daraltılıp genişletilebilir. Bu şekilde ışığın şiddeti ayarlanır ve cismin daha net görülmesi sağlanır.

Optik kısım objektif ve okülerden ibarettir. Bunlar cismi büyütür görülmesini sağlayan mercek sistemleridir. *Objektif* mikroskopun en önemli parçasıdır Objektif cisme yakındır, bunun büyütülmüş ters gerçek hayalini verir. Birkaç mercekten ibaret olan bu sistem silindirik şekilde madeni muhafaza içindedir. Tüpün alt ucundaki revolvere vidalıdır. *Oküler* iki ucuna mercekler yerleştirilmiş kısa madeni bir tüpten ibarettir, mikroskop tüpünün üst ucunun içine geçecek şekilde yapılmıştır. Gözle buradan bakılır. Oküler objektifin meydana getirdiği hayali büyütür zahiri hayal verir. Tek okülerli mikroskoplar monoküler, çift okülerli mikroskoplar binoküler mikroskop olarak tanımlanır. Binoküler mikroskoplarda objektifle oküler arasında bir prizma sistemi vardır. Bu prizmalar sayesinde objektiften çıkan ışınları ikiye ayrılarak yani kırılarak her iki oküleye de gönderilir.

Normal olarak mikroskopta 5 ve 10 büyütürmeli oküler kullanılır. Bu okülerler değiştirilebilirler. Objektif ise üç adet olup 10x, 40x, 100x büyütürmelidir. Bazı mikroskoplarda dört objektif bulunur. Bunlar dönen bir revolver üzerine yerleştirilmişlerdir. Şekil 1' de basit bir mikroskopun bölümleri gösterilmektedir.

## 1. MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA UYULMASI GEREKEN KURALLAR

- Çalışma alanı sınırlı olduğu için laboratuara sadece önemli malzemeler (laboratuar föyü, defter ve kalem) getiriniz.
- Kıyafetlerinizi korumak için laboratuarda önlük giyiniz.
- Kalem, etiket vb gibi materyallerinizi ağızınıza kesinlikle götürmeyiniz
- Aldığınız ekipman ve malzemeleri, laboratuar çalışması sonunda tekrar aldığınız yere götürünüz.
- Kesik ve yanık gibi kazalarda derhal laboratuar sorumlusuna başvurunuz.
- Eğer kültürler kaza ile dışarıya dağılırsa, hemen laboratuar sorumlusuna haber verip dezenfekte ediniz.
- Kültürleri kesinlikle laboratuardan dışarı çıkarmayınız
- İnkibatörde bulunan inoküle edilmiş (aşılınmış) tüp ve petrilerin üzerine isminizi, tarihi ve özelliğini yazan bir etiket yapıştırınız.
- Ekim iğnelerini ve özeleri, kullanımdan önce ve sonra uçlarındaki halka kızarıncaya kadar yakarak sterilize ediniz. Kültürlerin etrafa sıçramasını önlemek için telin ucunu önce alevde tutunuz, daha sonra alevde yakınız.
- Kültürlerin ağızını daima kapalı tutunuz.
- Kültür süspansiyonlarını hiçbir zaman ağızınızla çekmeyiniz
- Kullanılan pipetleri, içerisinde dezenfektan solüsyonu bulunan cam şişelerde bekletiniz. Mikroskop lam ve lamellerine de aynı işlemi uygulayınız.
- Bunzen bekini kullanılmadığı sürece kapalı tutunuz ve laboratuardan çıkarken kapalı olduğundan emin olunuz.
- Kullanılan tüm kağıt, pamuk vb gibi materyalleri laboratuar sonunda çöp sepetine atınız, yere veya masaların üzerine bırakmayınız.
- Ellerinizi kirlenmiş ve bulaşmış olduğundan başınıza veya yüzünüze dokunmayınız.
- Laboratuardan ayrılmadan önce mutlaka elinizi sabunla yıkayınız, gerekirse dezenfektan kullanınız.
- Laboratuarda hiçbir şey yiyip içmeyiniz.

## 2. DEZENFEKSİYON VE STERİLİZASYON

Dezenfeksiyon, hastalık yapıcı mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan bir yöntemdir. Dezenfeksiyonda sadece mikroorganizmaların vejetatif kısımları ölür, spor formları zarar görmez. Dezenfeksiyonda genellikle kimyasal maddeler kullanılır.

Sterilizasyon ise, mikroorganizmaların vejetatif ve spor şekillerinin öldürülmesidir. Bir mikroorganizmanın tesbiti ancak saf kültür halinde üretilmesi ile mümkündür. Bu da ancak besiyeri, cam eşya ve diğer aletlerle steril şartlarda çalışarak diğer mikroorganizmaların karışmasını önlemekle olur.

Sterilize edilen malzemenin mikroplar ile tekrar kirlenmemesi için ortamla ilgisinin kesilmesi gereklidir. Steril malzeme açık kalırsa havadan gelen tozların üzerindeki bakterilerle kirlenir ve sterilitesi bozulur. Bunun için ısı ile sterilizasyondan önce malzeme hazırlanır. Tüp, balon gibi cam eşyanın ağzı pamuklanır. Tüp, balon ve diğer cam malzemelerin ağzını kapatacak pamuk uzun elyafı olmalı ve tozlu olmamalıdır. Bunun için yağlı alınmamış pamuk kullanılır. Yağlı alınmış pamuk absorban olduğundan tüpteki sıvının buharlaşması ile nemlenir ve üzerinde bir süre sonra mantar üreyebilir. Bu mantarla besiyeri kirlenebilir. Pipetler cam yada madenden yapılmış silindirik şeklindeki kutulara konur ve kutuların ağızları pamuk veya madeni kapak ile kapatılır. Pipetler teker teker veya birkaçı bir arada kağıtlara sarılarak da sterilize edilebilir. Petri kutularının

kapakları örtülür. İstenirse ambalaj kağıdına sarılır veya madeni kutuya konur. Diğer malzeme de ambalaj kağıdına sarılır ve ipe bağlanır. Bazı yünle karışık pamuk tıkaçlardan sterilizasyon esnasında çıkan uçucu maddeler camın üzerine birikir ve pnömokok gibi hassas bakterilerin üremesine neden olabilir.

Besiyerleri veya çözeltiler uzun süre saklanacaksa cam kabın ağzı ayrıca kağıt ile sarılıp bağlanır ya da plastik bir tıpa ile ağzı kapatılır. Bu şekilde dışarıdan tozlanma ve sıvının buharlaşması önlenir. Uzağa gönderilecek kaplar da plastik tıpa ile kapatılır. Steril malzemenin ağzı ve üstü kapalı bulunduğu bunların dışına ellendiği halde iç kısmı dış ortamla temas etmez ve steril kalır. Herhangi bir işlem yapılırken açılacak steril kabın ağzının kesinlikle alevden geçirilmesi ve mümkün olduğu kadar kısa zamanda ağzının tekrar kapatılması gereklidir.

Başlıca sterilizasyon yöntemleri şunlardır:

## I. Isı İle Sterilizasyon

### I.1. Kızıl Dereceye Isıtma İle Sterilizasyon

### I.2. Alevden Geçirme İle Sterilizasyon

### I.3. Kuru Sıcak Hava Fırını (Pasteur Fırını) İle Sterilizasyon

## II. Nemli Isı İle Sterilizasyon

### II.1. Kaynatma İle Sterilizasyon

### II.2. Tindelizasyon İle Sterilizasyon

### II.3. Basınçlı Buharla Sterilizasyon

### II.4. Basınçsız Buharla Sterilizasyon

## III. Filtrasyonla Sterilizasyon

## IV. Kimyasal Maddelerle Sterilizasyon

## V. Işınlama İle Sterilizasyon

## I. Isı İle Sterilizasyon

Yapılması kolay, ucuz olduğundan ve iyi sonuç verdiği için sterilizasyonda en çok ısı kullanılır. Yalnız sterilize edilecek malzemenin ısıya dayanıklı olması gereklidir. Sterilizasyonda ısı kuru ve nemli olmak üzere iki şekilde kullanılır.

### **I.1. Kızıl Dereceye Isıtma İle Sterilizasyon**

Alevde tutulduğunda bozulmayan iğne, öze gibi madeni aletler alevde kızıl dereceye gelinceye kadar ısıtılarak sterilize edilir ve soğuduktan sonra kullanılır. Kızıl dereceye ısıtılan pensin uçları da steril olarak kullanılır. Fakat böyle pensler çabuk bozulur.

### **I.2. Alevden Geçirme İle Sterilizasyon**

Bisturi, şırınga iğnesi, cam malzemenin ağzı, cam çubuk, lam ve lamel gibi malzemeler alevden birkaç defa geçirilerek sterilize edilebilir. Alevde fazla ısıtılan bisturinin keskinliği azalır. Cam eşya alevden geçirildikten sonra henüz sıcakken soğuk bir şeyle temas etmemelidir. Temas ettiğinde kırılır.

### **I.3. Kuru Sıcak Hava Fırını (Pasteur Fırını) İle Sterilizasyon**

Kuru sıcak sterilizasyon için fırın kullanılır. 170 °C'de 1 saat, 160 °C'de 2-2.5 saat ısıtmak sterilizasyon için yeterlidir. Tüp, balon, petri kutusu, pipet, her tarafı cam şırınga gibi cam malzemelerin sterilizasyonu için en uygun fırındır. Eküvyon da fırında sterilize edilir. Bisturi, pens, makas gibi madeni malzemeler de fırında sterilize edilebilirler, ancak keskinlikleri gittikçe azalır. Toz ve yağ gibi maddeler de ağzı sıkıca kapalı kaplarda Pasteur fırınında sterilize edilebilir. Pasteur fırınında sterilize edilecek cam malzemenin tamamen kuru olması gerekmektedir. Islak cam malzeme önce 70 °C kuru sıcak havada kurutulmalı ve sonra yüksek derecedeki fırına konmalıdır. Alet çalışırken kapağına açıp kapamak doğru değildir, ısı derecesi düşer ve sterilizasyon olmayabilir. Alet kapatıldıktan sonra 2 saat kadar soğuması beklenir ve kapağı açılır. Sıcakken açılırsa cam malzeme

birden soğuyacağından çatlayıp kırılabilir.

## **II. Nemli Isı İle Sterilizasyon**

### **II. 1. Kaynatma İle Sterilizasyon**

100 °C'de 5-10 dakika kaynamakla bakterilerin vejetatif şekilleri ve bazı bakterilerin spor şekilleri ölür. Fakat *Clostridium tetani* gibi bazı bakterilerin sporları kaynatmaya 5-10 dakika dayanır. Bu nedenle kaynatma her zaman bir sterilizasyon temin edemez.

Kaynatma için madeni ve ağzı kapaklı kaplar kullanılır. Kabın içindeki su 100 °C'de kaynar. Sıvılar cam tüpler içinde olarak kaynayan suya daldırılır ve maddenin bozulma derecesine göre kaynar suya bırakılır (15 dakika-1 saat). Cam eşya, pens, makas, bisturi gibi madeni eşya, cam ve madeni kısımları olan şırıngalar kaynatılarak sterilize edilir. Musluk suyu fazla kireçli ise aletlerin üzerindeki kalsiyum tuzları çökeceğinden damıtık su ile kaynatmak uygundur.

### **II.2. Tindelizasyon İle Sterilizasyon**

Tindelizasyon yüksek sıcaklık derecelerinde bozulan maddeler için kullanılır. Kullanılan ısı dereceleri çoğunlukla hidrolize olabilen çözeltiler için 70 °C, kan, serum gibi proteinli maddeler için 56 °C, bazı aşılar için 56–60 °C, şekerli çözeltiler için ise 100 °C'dir.

Tindelize edilecek maddeler tüplere dağıtıldıktan sonra istenen dereceye ayarlanmış olan su banyosuna dizilirler. Su banyosundaki su seviyesi içine konan tüpteki maddenin seviyesinin aşmamalıdır. Ancak bu şekilde maddenin istenen sıcaklığa kadar ısıtıldığından emin olunabilir. Tüpler konduktan sonra besiyerinin derecesi düşer, ısı tekrar istenen dereceye yükseldiği andan itibaren ısıtma süresi hesaplanır.

Isıtma süresi çoğunlukla günde 1 saat olmak üzere 3 gün arka arkaya yapılır. Bunun nedeni birinci gün yapılan 1 saatlik ısıtma ile sadece vejetatif bakteriler öldürülür, sporlar zarar görmez. Daha sonra yapılan inkübasyon esnasında ise zarar görmemiş olan sporlar açılarak vejetatif şekle dönüşmesi sağlanır. İkinci gün yapılan 1 saatlik sıcaklık uygulamasında da birinci gün olduğu gibi inkübasyon esnasında sporların açılmasından meydana gelen vejetatif bakteri hücreleri ölür. Hala açılmamış spor kalabileceği göz önünde bulundurularak bu uygulamaya üçüncü gün de devam edilir.

### **11.3.Basınçlı Buharla Sterilizasyon**

Bu tip sterilizasyon otoklavda yapılır. Otoklav doymuş basınçlı su buharı ile 100 °C'nin üzerinde çalışmaktadır. Yüksek ısıya dayanıklı maddeler ve besiyerleri otoklavda sterilize edilebilirler. Otoklavda sterilizasyon için 121 °C'de, 1 atmosfer basınç altında 15 dakika veya 115 °C'de 0.5 atmosfer basınç altında 30 dakika yeterli olmaktadır.

### **11.4.Basınçsız Buharla Sterilizasyon**

Bu tip sterilizasyonda koch kazanı kullanılır veya sterilizasyon basınç düğmesi kapatılmış otoklavda gerçekleştirilir. Basınç olmadığından ve yüksek sıcaklıkta çalışılmadığından açılıp kapanması basittir. 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bozulan maddeler bu yöntemle sterilize edilirler.

## **III.Filtrasyonla Sterilizasyon**

Bir sıvıda süspansiyon halinde bulunan katı parçacıkların çeperden ya da zardan süzülerek ayrışmasına *filtrasyon* denir. Filtrasyon esnasında bütün bakteriler filtre tarafından tutulursa filtreden geçen kısım süzüntü bakterisi içermez. Filtrasyon filtre denilen aletlerde yapılır. Bazı filtrelerden süzme işlemi ile steril sıvılar elde edilir. Fiziksel ve kimyasal özellikleri ısı ile bozulan maddelerin sterilizasyonu en kolay olarak filtrasyon ile yapılır. Bakterileri süzmek için genellikle 0.45µm, virüsleri süzmek için ise 0.2 µm gözenek çapına sahip membran filtreler kullanılır.

## **IV.Kimyasal Maddelerle Sterilizasyon**

Sterilizasyon kimyasal maddelerle de yapılabilmektedir Kimyasal maddelerin mikroorganizmalar üzerine etkisi değişiklik gösterdiğinden bu amaçla farklı kimyasallar kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan kimyasallar etil alkol, borik asit, heksakorofen, izopropil alkol, klor, hidrojen peroksit ve potasyum permanganattır

## **V.Işınlama İle Sterilizasyon**

Işınlama ile sterilizasyonda UV, X ve gamma gibi düşük dalga boyuna ve yüksek enerjiye sahip ışınlarla sterilizasyon amaçlanır.

Bu ışınlar düşük dalga boyuna sahip olduklarından bakterilerin sporlarına oranla vejetatif şekillerine daha fazla etkilidir. Sporları öldürmek için daha yüksek dozlarda, daha uzun sürelerde ışınlama gereklidir.

### **Mikrobiyoloji Çalışmalarında Kullanılan Besiyerleri**

Mikroorganizmalar konakçı ile ilişkilerine göre üç kısımda incelenirler:

- a. Zorunlu parazitler : Yaşayabilmek için mutlaka canlı hücreye gereksinim duyarlar.
- b. Fakültatif parazitler : Cansız ortamda da üreyebilirler.
- c. Saprofit parazitler : Cansız ortamda da üreyebilirler.

Bu özelliklerine göre mikroorganizmaların laboratuarda üremeleri için iki ortam kullanılır:

- I. Canlı ortamlar
- II. Cansız ortamlar

#### **I. Canlı Ortamlar**

1. Embriyolu Yumurta : En çok kullanımı alanları virüslerin izolasyon ve ayırımı, riketsiyalar ve klamidyalar gibi bakterilerin üretilmesidir.

2. Doku Kültürü:

- a. Primer Kültürler : Maymun böbrek hücreleri, insan amniyon zarları v.b.'den elde edilir. RMK (Rhesus maymun böbreği hücresi), RK (tavşan böbreği hücresi) dir.
- b. Sekonder (Diploid) Kültürler : En çok kullanılanları INI-38 (insan embriyojenik akciğerlerinden elde edilmiş hücreler), HEK (insan embriyojenik böbrek hücresi), MRC-5 (insan embriyojenik akciğer hücresi) dir.
- c. Heteroploid (Sürekli Doku) Kültürleri: Bazı neoplazmalardan ve transforme hücrelerden elde edilen doku kültürleri olup, sürekli pasajlarda uzun süre devam edilir. HeLa (insan serviks kanserinden), Hep-2 (insan larinks kanserinden), Vero (Afrika yeşil maymun böbreğinden) 'dur.

3. Deney Hayvanları: Mikroorganizmaları üretmek, patojenlik ve virulanslarını saptamak, bağışık serum elde etmek, kan, serum ve organlardan yararlanmak amacıyla deney hayvanları kullanılır. Mikrobiyolojide en çok kullanılan deney hayvanları, kobaylar, fareler ve tavşanlardır.

#### **II. Cansız Ortamlar**

Bakterilerin büyük bir çoğunluğu ve mantarlar cansız ortamlarda üretilmektedir. Bu gibi mikroorganizmaların üretilmeleri, saf olarak elde edilmeleri, koloni ve biyokimyasal özelliklerinin incelenebilmesi için onları organizmanın dışında üretmek amacıyla kullanılan cansız, besleyici ortamlara BESİYERİ denir.

Besiyerleri kullanım amaçlarına, kimyasal yapılarına ve biçimlerine göre değişik şekillerde sınıflandırılabilirler.

#### **A. Kullanım Amaçlarına ve Kimyasal yapılarına Göre Besiyerleri**

##### **1.Kimyasal Yapılan Kesin Olarak Bilinen Sentetik Besiyerleri**

Saf kimyasal maddelerden hazırlanır. Eritici olarak saf su ya da deiyonize su kullanılır. Özellikle mikroorganizmaların metabolizmasını incelemek ve biyolojik ürünleri saf olarak elde etmek amacıyla kullanılır.

##### **2.Genel Üretim Besiyerleri**

Güncel laboratuvar çalışmalarında kullanılan insan ve hayvanlarda hastalık yapıcı olarak veya florada bulunan mikroorganizmaların çoğunluğunun üretilbildiği besiyerleridir.



### **a. Temel (Basit) Besiyerleri**

Bu besiyerlerinde başlıca pepton+ tuz (peptonlu su) ya da et suyu + pepton + tuz (buyyon)

gibi maddelerle su bulunur. Buyyona agar eklenerek jeloz elde edilir.

### **b. Zenginleştirilmiş Besiyerleri**

Temel besiyerlerine kan, serum, haben sıvısı, glikoz, yumurta gibi besleyici maddelerin eklenmesiyle elde edilen besiyerleridir. Basit besiyerlerinde üretilmeyen bazı mikroorganizmalar bu besiyerlerinde üretilbilirler.

## **3. Özel Besiyerleri**

### **a. Özgül Besiyerleri**

Yalnız bir çeşit ya da sınırlı sayıda mikroorganizmaların üretilmesi için hazırlanan besiyerleridir.

### **b. Seçici Besiyerleri**

Belli bir grup bakterinin üremesini sağlarken, istenmeyen bakterilerin üremesini engeller. Seçici önleyici ve seçici çoğaltıcı olmak üzere iki şekilde seçici etki görülür.

Seçici önleyici etkide antibiyotik, kimyasal madde, boya besiyerlerine eklenerek istenmeyen bakterilerin üremesi önlenir.

### **c. Ayırt Edici Besiyerleri**

İçindeki ayıraçlarla benzer bakterilerin aynı görünümünde koloniler oluşturmasını sağlayarak bakterileri ayırt ettiren besiyerleridir.

### **d. Ayıraçlı Besiyerleri**

Bakterilerin metabolizmalarına bağlı biyokimyasal özelliklerini inceler. İçlerine ayıraçlar metabolizma etkisinin öğrenildiği maddeler konur.

## **B. Biçimlerine Göre Besiyerleri**

Bu tip besiyerleri dört gruba ayrılır:

- a) Katı: %1,5–3
- b) Yarı Katı: %0,3–0,5
- c) Yan Sıvı: %0,05–0,2 agar içerir
- d) Sıvı: agar içermez

Besiyerleri iki türlü katılaştırılır.

1. Pişirerek Katılaştırma: İçinde bol proteinli maddeler (serum, yumurta v.b) içeren besiyerlerinin katılaştırılmasında kullanılan yöntemdir.

2. Agar Kullanarak Katılaştırma: Agarın yapısında polisakkarit niteliğinde çeşitli karbonhidratlar bulunur. Mikrobiyolojideki iyi bir ağarın özelliği sıvıların içinde ısıtılınca 95 °C 'de erimesi ve sonra soğumaya bırakıldığında 42-45 °C 'de katılaşması gerekir.

## **Besiyerlerinin Hazırlanmasında Kullanılan Maddeler**

### **Su**

Mikrobiyolojide kullanılan besiyerleri ve çözeltiler su ile yapılır. Çeşme suyunda birçok madde bulunduğundan özel besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanmasında ya da özel çalışmalarda kullanılan aletlerin yıkanması için kullanılmaz. Bunun yerine damıtık su veya deiyonize su kullanılır. Salmonella typhi gibi bazı bakteriler kanalizasyon sızıntıları ile kirlenen sularda haftalarca canlı kalabilirler. Damıtık suda bakterilerin canlı kalma süresi daha kısadır. Suda çok az miktarda ağır metal iyonları bulunsun bile toksik etkisi çok fazladır. Böyle bir suda organik maddeler varsa toksik etki azalır.

### **Pepton**

Çeşitli kaynaklı proteinlerin pepsin, tripsin, papain gibi enzimlerle hidrolize edilmeleri sonucunda suda kolayca eritilebilen ve ısıtıldığında yeniden koagüle olmayan, polipeptit, dipeptit ve aminoasit gibi maddelerin karışımını içeren maddelerdir. Bakterilerce azot kaynağı olarak kullanılır. Et, kazein, kan, soya küspesi gibi proteinli maddelerin enzimlerle sindirilmesi sonucu elde edilirler. Peptonlar elde edildikleri protein kaynağına ve elde edilme yöntemine göre içerikleri yönünden değişiklik gösterirler.

### **Agar**

Uzun zincirli polisakkaritlerden meydana gelir. D-Galaktopiranoz ve inorganik tuzlar, az miktarda proteine benzer maddeler içerirler. Agarlar yapılarında bulunan değişik bağ dokusundan dolayı mikroorganizmalar tarafından besin kaynağı olarak kullanılamazlar, Birkaç özel durum dışında agarın fonksiyonu sadece besiyerini katılaştırmaktır. Agarların içerisinde bulunan başlıca metaller kalsiyum ve magnezyumdur.

Agarların çoğu 98 °C 'de erir ve 42 °C 'de katılaşır. Agarların besiyerlerini katılaştırma miktarı yaklaşık olarak % 1,5–3 civarındadır. Ancak her besiyeri için ayrı agar miktarı kullanılır. Katı besiyerleri için % 1–3, yarı katı besiyerleri için % 0,3–0,5, yarı sıvı besiyerleri için % 0,05–0,2 gibi oranlar kullanılmaktadır.

### **Et ve Et Yerine Kullanılan Maddeler**

Besiyerlerinin çoğunun hazırlanmasında et ve et ürünleri kullanılmaktadır. Et suyu temel besiyerlerinde kullanılan önemli ve besleyici bir sıvıdır. Kolay üreyebilen bakteriler için et yerine et unu, balık unu ve soya unu kullanılabilir. Et suyu temel besiyerlerinde kullanılan önemli ve besleyici bir sıvıdır. Kolay üreyebilen bakteriler için et yerine et unu, balık unu ve soya unu kullanılabilir.

### **Proteinli Hidrolizatlar**

Kazein karaciğer vb proteinli maddelerin asit ve çeşitli enzimlerle hidrolizasyonu sonucu elde edilen ve besiyerlerini zenginleştirmek amacıyla kullanılan maddelerdir.

### **Zenginleştirici Maddeler**

#### ***Kan***

Besiyerlerinde kullanılacak kanın steril olmasına dikkat etmek gerekmektedir. Diğer yandan kan pıhtılaşmaması için defibrine edilir veya sitrat, okzalot çözeltilerine alınır. Defibrine kan besiyerlerine %5–10 oranında eklenir.

#### ***Serum***

Koyun, tavşan, at gibi hayvanlardan ya da insanlardan steril koşullarda alınan kan santrifüj edilir. Yüzeyde biriken serum süzülerek veya pipetle alınır. Serum genellikle besiyerlerine %5-10 oranında kullanılmaktadır.

#### ***Safra***

Belirli bazı besiyerlerine katılmak ya da safra ile ilgili deneyler yapmak amacıyla kullanılmaktadır.

#### ***Haben Sıvısı***

Sirozlu hastaların karın boşluğunda toplanan sıvıdır. Steril balonlara alınır, kontamine olmasını önlemek için süzme işlemi ile steril hale getirilir.

**Maya Özüü :** Bol vitamin ve çeşitli aminoasitler içerdiğinden çeşitli besiyerlerinde zenginleştirici olarak kullanılmaktadır.

### 3. SIVI BESİYERİ HAZIRLANMASI VE EKİM

Sıvı besiyerleri tüpte ve erlende, katı besiyerleri ise tüpte ve petrielerde hazırlanabilmektedir.

Besiyerleri genellikle toz halinde kurutulmuş şekildedir ve ticari besiyerlerinde ne kadar hacim için ne kadar madde kullanılacağı ve besiyerinin bileşimine giren maddeler kaplarının üzerinde belirtilir.

Besiyerlerinin hazırlanacağı cam malzemeler temiz olmalı ve pH her besiyeri için uygun şekilde ayarlanmalıdır.

Besiyerleri hazırlanırken gerekli maddeler tartıldıktan sonra balonda az bir miktarda su ile iyice karıştırılır. Daha sonra eklenecek su balonun çepçerindeki maddeleri yıkayarak ilave edilir.

Bazı besiyeri bileşenleri suda kolay erimezler. Böyle durumlarda ılık damıtık veya deiyonize su kullanılmalı veya besiyeri 50 °C'ye kadar karıştırılarak ısıtılmalıdır.

#### Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması

Deneyde sıvı besiyeri olarak *Nutrient Broth* besiyeri hazırlanacaktır. Bu besiyerinin hazırlanmasında kullanılan maddelerin miktarları aşağıda verilmiştir.

#### *Nutrient Broth Besiyeri*

Beef ekstrakt	3g
Pepton	5g
Damıtık su	1000 ml

İstenen miktarlar dikkatle tartıldıktan sonra, az miktarda su ile çözülür ve daha sonra damıtık su veya deiyonize su ile 1 litreye tamamlanır. Besiyerinin pH kontrolü yapılır ve gerekirse istenen pH'ya ayarlanır.

pH'sı ayarlanan sıvı besiyeri direkt olarak temiz tüplere 8-10 ml olarak taksim edilir tüplerin ağızları pamuklanır. Daha sonra tüpler büyük bir beher içerisine yerleştirilir beherin üzeri alüminyum folyo ile kapatılır.

Tüpler üzeri kapatılmış bir şekilde otoklavda 121 °C'de, 1 atmosfer basınçta, 15 dakika ve 115 °C'de, 0.5 atmosfer basınçta, 30 dakika sterilize edilir. Ekim yapılmayacak tüp buzdolabında saklanır.

#### Sıvı Besiyerlerine Ekim

İçerisinde mikroorganizmaların bulunduğu şüpheli veya bilinen her türlü materyalden ekim yapılabilmektedir. Bunlar ya sıvı şekilde olur veya katı besiyerlerinde üremiş olarak bulunur. Mikroplar buralardan alınarak amaca göre katı veya sıvı, tüp, balon veya petri kutularında bulunan besiyerlerine ekilir.

Ekim materyalinin şekline, içerdiği bakterinin cins ve miktarına, ekileceği amaca ve ekileceği besiyerinin özellik ve şekline göre mikrobiyolojide çeşitli ekim metodları geliştirilmiştir.

Ekimde göz önünde bulundurulacak faktörler;

- Ekim yapılacak masanın üzerine antiseptik eriyikle ıslanmış bez veya filtre kağıtları yayılır.
- Yeni ekilecek besiyerinin üzerine cam kalemi veya etiket üzerine yazıp yapıştırmak suretiyle ekim maddesinin cinsi ve ekim tarihi kaydedilmelidir.
- Gerek ekim materyali ve gerekse ekilecek besiyerleri kolayca alınıp bırakılabilecek bir yere konmalı, özellikle alevin, çalışmaya engel olmayacak ve kolayca kullanılabilir bir yerde bulunmasına dikkat edilmelidir.
- Tozlu ve hava cereyanlı yerlerde ekim yapılmamalıdır.
- Ekimde sterilizasyona önem verilmelidir.

- Uçlarında enfekte materyal bulunan öze, iğne gibi aletler kullanılmadan önce alevde uçları iyice koralaşıcaya kadar yakılmalıdır ve kullanıldıktan sonra tekrar yakılmadan yerlerine bırakılmamalıdır. Kullanıldıktan sonra yakarken materyalin ani sıçraması ile çevreyi enfekte etmesine engel olmak için bu aletler hemen aleve daldırılmamak, uç kısımlarındaki maddeler kuruyup karbonize oluncaya kadar aleve yakın bir yerde tutulmalı, daha sonra alevde iyice yakılmalıdır.

- Ekim işlemi esnasında gerek materyal alınan ve gerekse ekim yapılan tüp ve balonların ağız kısımları tıkaçları açıldıktan sonra ve kapatılmadan önce alevde yakılmalıdır. Enfekte materyal tüplerin ağzına bulaşacak olursa iyice kuruyup yanıcaya kadar aleve yaklaştırıp uzaklaştırarak yakmak gerekir.

### **Sıvı Besiyerlerine Ekim**

Ekim sıvı materyalden yapılacaksa, sıvı materyalin bulunduğu tüp yarı yatık şekilde sol el ile tutulur. Parmakların tüpün içerisini görüğe engel olmamasına dikkat edilir.

Öze, sapından sağ elde kalem tutar gibi tutulur. Önce uygun şekilde yakılır, soğuması beklenir. Tüpten ekim yapılırken tüpün tıkaçı özeyi tutan elin küçük parmağı ile sarılarak çıkarılır ve tüpün ağzı alevde gezdirilir. Bu sırada tüpün mümkün olduğu kadar yatık şekilde tutulması gerekir. Bu şekilde havadan tozların düşmesine engel olunur.

Öze yavaşça tüp içerisine daldırılır. Halka kısmı ile bir miktar ekim materyali alındıktan sonra yavaşça çekilerek özellikle tüp ağzına dokundurulmadan dışarı alınır, tüpün ağzı alevde gezdirilir ve kapağı kapatıldıktan sonra tüp yerine bırakılır. \_\_\_\_\_

Daha sonra sol el ile ekim yapılacak tüp veya balon alınarak aynı tarzda tutulur. Sağ elin küçük parmağı ile kapağı alınarak ağzı alevde gezdirilir. Üzerinde ekim materyali bulunan" öze yavaşça tüp kenarına değdirilmeden sıvı besiyerinin üst kenarına dokundurularak ve tüpün kenarında iyice ezilerek besiyerine karışması sağlanır. Öze dikkatlice dışarı alınır. Tüpün ağzı tekrar alevden geçirilir ve kapağı kapatıldıktan sonra yerine bırakılır. Kullanılan öze de uygun şekilde yakılır.

Eğer ekim petri kutusundan alınan katı materyalden yapılacaksa, masa üzerine petri kutusunun kapağı üste gelecek şekilde konulur. Daha sonra sol el ile alevin yanında kapağı aralanarak öze ile katı besiyerini yırtmadan materyal alınır ve tekrar alevin yanında kapak kapatılır. Sol el ile ekim yapılacak tüp alınır. Sağ elin küçük parmağı ile kapağı çıkarıldıktan sonra öze yavaşça sıvı besiyerinin üst kısmına dokundurularak materyal iyice karıştırılır. Tüpün ağzı tekrar alevden geçirilir ve kapağı kapatıldıktan sonra yerine bırakılır. Kullanılan öze de uygun şekilde yakılır.

## 4. KATI BESİYERİ HAZIRLANMASI VE EKİM

### Katı Besiyerlerinin Hazırlanması

Deneyde katı besiyeri olarak *Eosin Methylene Blue (EMB) Agar* hazırlanacaktır. Besiyerin hazırlanmasında kullanılacak maddelerin miktarları aşağıda verilmiştir.

#### *Eosin Methylene Blue (EMB) Agar*

Pepton	10 g
K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
Eosin Y	0.4 g
Laktoz	10g
Sakkaroz	5g
Methylene Blue	0.063 g
Agar	15 g
Damıtık su	1000 ml

İstenen miktarlar dikkatle tartıldıktan sonra, az miktarda su ile çözülür ve daha sonra damıtık su veya deiyonize su ile 1 litreye tamamlanır. Besiyerinin pH'sı 6,8'e ayarlanır.

Besiyeri hazırlanan erlenin ağzı pamukla kapatıldıktan sonra alüminyum folyo ile sıkıca sarılır.

Ağzı sıkıca kapatılmış eden otoklavda 121 °C'de, 1 atmosfer basınçta, 15 dakika veya 115 °C'de, 0.5 atmosfer basınçta, 30 dakika sterilize edilir.

Sterilize edilen besiyeri sıvı forma getirildikten sonra petri veya tüplere dik ya da yatık olarak ağız katılaşmadan hızlı bir şekilde taksim edilir. Laboratuarda spor formdaki mikroorganizmalar besiyerlerini kolaylıkla kontamine edebildikleri için bu işlem aseptik şartlarda, alevin yanında yapılır. Besiyerleri petrilere ve/veya tüplere döküldükten sonra katılaşması için bir süre beklenir. Petri kutuları ters çevrilir.

Ekim yapılmayacak tüp ve petri buzdolabında saklanır.

### Katı Besiyerlerine Ekim

Sıvı ekim materyalinden katı besiyerlerine ekim genellikle öze ile yapılmaktadır. Materyal alınması sıvı besiyerine ekimde anlatıldığı gibidir.

Katı besiyerlerine ekim amaca ve besiyerine göre üç şekilde yapılır:

- Tüpte yatık olarak hazırlanmış besiyerine ekim
- Tüpte dik olarak hazırlanmış besiyerine ekim
- Petri kutularına hazırlanmış besiyerine ekim

#### ***a. Tüpte yatık olarak hazırlanmış besiyerine ekim***

Tüpte yatık olarak hazırlanmış besiyerine ekim çizgi ekimi ve yüzey ekimi olmak üzere iki şekilde yapılır.

Çizgi ekimi daha çok saf kültür üretmek pigment oluşumunu görmek ve bazı proteinli besiyerlerinde proteolitik etkiyi izlemek amacıyla yapılır. Çizgi ekimi yapmak için, öze veya iğne ile alınmış materyal, tıkaçı alınıp ağzı yakılan yatık besiyerinin alt ucuna kadar sokulur. Öze veya iğne dibe dokundurulduktan sonra orta yerde bir çizgi çizecek şekilde geri doğru çekilir.

Antijen hazırlamak veya başka amaçlarla bol üreme elde etmek için yatık besiyerine yüzey ekimi yapılır. Bunun için öze veya iğne ile alınan materyal yatık besiyeri sathının dibine dokundurulur ve ortadan geriye çekilerek bir çizgi ekimi yapılır. Sonra besiyerinin dibine dokundurulan öze ve iğnenin ucu bu sefer sağa sola zikzaklar yapacak şekilde yavaşça geri çekilir. Böylece bütün yüzeye ekim yapılmış olur.

#### ***b. Tüpte dik olarak hazırlanmış besiyerine ekim***

Tüpte dik olarak hazırlanmış besiyerine ekim için daha çok iğneler kullanılır. Sıvı veya katı besiyerlerindeki saf kültürden materyal steril şartlarda alınır. Sol elde tutulan dik olarak hazırlanmış besiyerinin tıkaçı açılıp ağzı yakıldıktan sonra iğne tüpün kenarına değdirilmeden yavaşça besilerine dik olarak batırılır ve çekilir. İstenirse aynı yerlere 1-2 batırma daha yapılabilir. Ekilen bakterilerin 1-3 ay canlı kalabilmesi isteniyorsa bu şekilde yapılan ekimler ağzı parafinlenerek veya lastik mantar ile kapatılarak buzdolabında saklanır.

#### ***c. Petri kutularına hazırlanmış besiyerine ekim***

Ekim materyalindeki bakteri sayısına göre petri kutularında hazırlanmış besiyerlerine;

- Zikzak ekim
- Her çizikte çaprazlayarak ekim
- Her çizikte çaprazlamadan ekim
- Plak şeklindeki besiyerlerinin içine ekim
- Plak besiyeri yüzeyine ekim

olmak üzere beş şekilde ekim yapılabilmektedir.

#### **Zikzak ekim**

Ekim materyalinde bakteri sayısının az olduğu tahmin edilen durumlarda yapılır. Besiyerinin bir kenarına öze ile konulan materyal zikzaklar yapmak suretiyle yayılır. Bakteri sayısı çok az ise bu yayma esnasında dağılırarak tek tek düşeceklerinden etüvde inkübasyondan sonra ayrı koloniler şeklinde ürerler.

#### **Her çizikte çaprazlayarak ekim**

Ekim materyalinde bakteri sayısının orta derecede olduğu tahmin ediliyorsa bu metotla iyi sonuçlar alınabilmektedir. Besiyerinin bir köşesine ekim materyalinden bir damla konularak, steril öze ile birbirine paralel 3-4 çizgi çizilir. Öze yakılır, soğutulur ve çizilmiş bu çizgileri her çizikte çaprazlamak şartı ile bunlara dik şekilde 4-5 adet birbirine paralel çizgi daha çizilir. Öze yine yakılıp soğutulur ve bu sefer ikinci çizilen çizgileri her defasında çaprazlayan ve bunlara dike, fakat birbirlerine paralel olmak üzere 4-5 çizgi daha çizilir ve besiyerinin elverdiği ölçüde bu işleme devam edilir. Bakteriler son çizimlerde çok azalacaklarından tek koloni haline düşerler.

#### **Her çizikte çaprazlamadan ekim**

Ekim materyalinden çok bol miktarda bakteri olduğu tahmin ediliyorsa bu yöntem uygulanır. Öze ile ekim materyali alınır ve besiyerinin bir kenarına bırakılır. Aynı öze ile bu noktadan başlamak suretiyle birbirine paralel 3-4 çizgi çizilir. Öze yakılır, soğutulur ve besiyerinin boş bir köşesine daldırılmak suretiyle soğuduğu kontrol edilir. Sonra ilk çizilen çizgilerin üzerine çaprazlama olarak bir tek defa sürülür ve besiyerinin başka bir yerine ilk çizilen çizgilere hiç dokunmayacak şekilde 7-8 çizgi çizilir. Tekrar yakılıp soğutulan öze ile bu defa ikinci çizilen çizgiler bir tek defa çaprazlandıktan sonra yine boş bir yere birbirine paralel birkaç çizgi daha çizilir. Burada bakterilerin azalması daha fazla olduğundan tek koloniye düşme ihtimali daha fazladır.

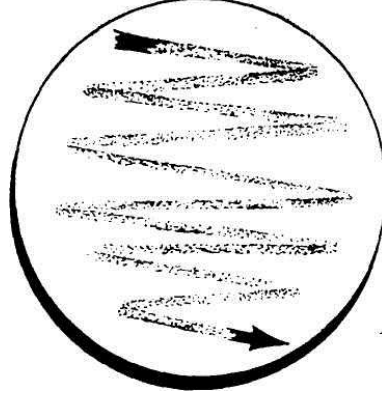
#### **Plak şeklindeki besiyerlerinin içine ekim**

Bakterilerin besiyerleri içindeki kolonileri görmek ayrıca onları uygun oksijen konsantrasyonlarında üretmek için

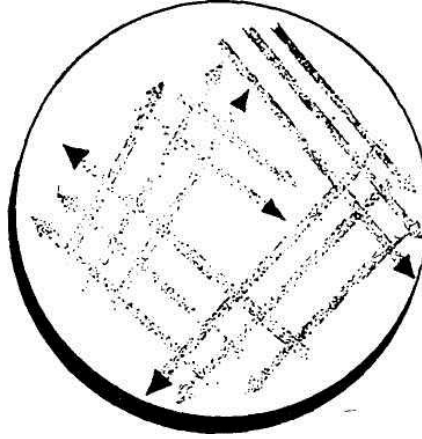
kullanılan ekim metodudur. Bu ekimde içinde dik olarak hazırlanmış katı besiyeri bulunan tüpler önce 100 °C'de su banyosunda kaynatılarak eritilir. Sonra su içerisine bir termometre konularak soğumaya terk edilir. Ekimler termometrenin 45-48 °C'yi gösterdiği zaman yapılmalıdır, aksi halde bakteriler ölürler. Ekim yapıldıktan sonra besiyeri katılaşmadan pamuk tıkaç çıkarılıp, ağzı alevden geçirildikten sonra masada hazır bulunan boş ve steril petri kutularının içerisine dökülür. Besiyeri donduktan sonra ters olarak etüve konur. Seyrek oldukları durumda bakteriler besiyeri içerisinde ve tek koloni halinde ürerler.

### **Plak besiyeri yüzeyine ekim**

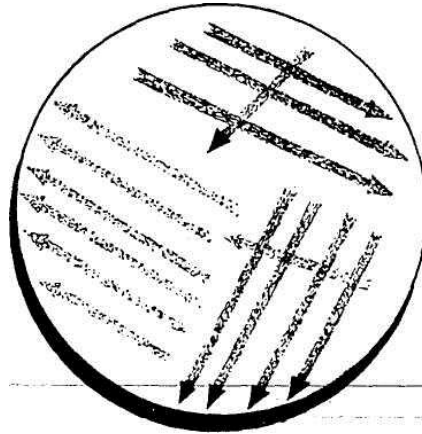
Özellikle antibiyotik hassasiyet testi ve buna benzer testler için plağın bir köşesine damlatılan materyal, bir baget ile tamamen eşit olarak dağılacak şekilde yayılır. Burada üreme genellikle bir tabaka halinde veya bakteriler az ise tek tek koloniler halinde olur.



**Şekil 1.** Petri Kutularına Hazırlanmış Besiyerine Zikzak Ekimi



**Sekil 2.** Petri Kutularına Hazırlanmış Besiyerine Her Çizişte Çaprazlayarak Ekim



**Sekil 3.** Petri Kutularına Hazırlanmış Besiyerine Her Çizişte Çaprazlamadan Ekim

## 5. YAŞ ÖRNEKLEME

Yaş örnekleme tekniğinin en önemli avantajı, numunedeki mikroorganizmaların canlı ve hareketli kalmalarıdır (hareketleri varsa). Bu nedenle yaş örnekleme özellikle mikroorganizmaların hareketliliğini ve davranışını gözlemlemek için tercih edilir.

Malzemeler

- Işık Mikroskobu
- Lam-Lamel
- Pastör pipeti
- Bunsen beki
- Alkol
- Pens
- Öze
- Numune

Deneyin yürütülüşü

Kondenser ayarı yapılır ve öze sterilize edilir. Lam üzerine bir damla numune damlatılır ve 450lik açılı ile lamel ile kapatılır. 10X ve 40X mercekleri altında mikroskopta incelenir.

## 6. MİKROORGANİZMALARIN BOYANMASI

Mikrobiyolojide boyalar geniş bir uygulama alanına sahiptir. Mikroorganizmaların boyanması ile

•Mikroorganizmaların tam görünümünü, hücre zarı, protoplazmayı, protoplazma içindeki önemli yapıları, spor, kapsül, kirpik gibi kısımları incelemek,

• Materyalden mikroskopik inceleme yaparken mikroorganizmalar boyandıkları zaman çok daha kolay gördükleri için mikrobiyolojik teşhisi yapmak,

• Mikroorganizmalar özel boyalarla kendilerine özgü boyandıklarından, bu mikroorganizmaların cins ve gruplarını tayin etmek,

• Boyaların bazı mikroorganizmaların üremesini engelleme yeteneği olduğundan besiyerlerine belirli konsantrasyonlarda bu boyalan katarak istenmeyen mikroorganizmaların üremesini önlemek mümkün olabilmektedir.

Boyalar doğal ve sentetik boyalar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Doğal boyaların yapılan iyi bilinmediğinden kendi aralarında kesin bir sınıflandırma yapılamamaktadır. Sentetik boyalar ise çeşitli gruplara ayrılarak incelenir. Nitroso, nitro, azo ve fenil metan boyalar sentetik mikrobiyolojide kullanılan sentetik boyalara örnek olarak verilebilir.

Mikrobiyolojide kullanılan boyama teknikleri,

• Basit boyama metodu, -Bileşik boyama metodu olmak üzere ikiye ayrılır.

### • Basit Boyama

Basit boyama, kültürlerdeki veya materyal içindeki mikroorganizmaların bir tek boya ile boyanması işlemidir. Basit boyama ile mikroorganizmanın şekli büyüklüğü, mikroskop sahasındaki dizilişi hakkında bilgi edinmek mümkündür. Basit boyalarla bazı mikroorganizmalar özel şekilde boyanarak gözlemlenmesi sağlanır. Diğer yandan bu boya tekniği ile patolojik materyal içindeki mikroorganizmaları görebilmek için mikrobiyolojik teşhisleri sağlanır. Materyaldeki mikroorganizmalar,



hücreler ve çeşitli kısımlar boyayı ayrı tonlarda aldığından mikroskop alanındaki mikroorganizmaların varlığı kolaylıkla anlaşılır.

Basit boyamada en sık kullanılan boyalar metilen mavisi, sulu fuksin, Jansien moru, Malaşit yeşili ve Safranin'dir.

### **Bileşik Boyama**

Bileşik boyalar mikroorganizmaların basit boyalara oranla daha ayrıntılı boyarlar ve bazı özelliklerini ortaya çıkararak cinslerinin tayinine yardım ederler. Bu boyaların içerisinde birkaç boya beraber bulunur veya preparata bunlar sıra ile ayrı ayrı uygulanır.

Mikrobiyolojide en sık kullanılan boyalar gram boyası, asite dirençli mikroorganizmalar için boyalar, spor, kapsül, granül ve flegella boyalarıdır.

### ***Gram Boyama İle Mikroorganizmaların Boyanması Solüsyonların Hazırlanması***

**Kristal viyole boya solüsyonu:** 2 g kristal viyole, %95'lik etil alkolde çözülür. Diğer bir kaptaki da 0.8 g amonyum okzalat, 80 ml saf suda çözülerek bu iki solüsyon karıştırılır.

**İyot Solüsyonu:** 1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür, 300 ml saf suda çözülür.

**Bazik Fuksin solüsyonu:** 3 g bazik fuksin, 100 ml %95'lik etil alkolde çözülür.

Stok boya solüsyonları renkli cam kapaklı şişelerde ve karanlık dolaplarda saklanmalıdır. Kullanılmakta olan boyalar ise tercihe göre renkli ve damlalıklı şişelere konmalıdır. Şişelerin üzerlerine boya ismi yazılı bir etiket ve bu etiketin boyalardan bozulmasına engel olmak için yapışkan, şeffaf selofan bant yapıştırılmalıdır. Boya köşesinde üzerinde preparat bırakmaya yarayan cam çubukları olan bir küvet bulunmalıdır.

### **Denevin Yapılışı**

- İncelenmesi istenen materyal temiz bir lam üzerine öze veya iğne yardımıyla steril şartlarda alınır ve homojen şekilde ince bir film tabakası halinde yayılır ve havada kurutulur.
- Lam hafifçe alev üzerinden geçirilerek mikroorganizmaların lama fikse edilmesi sağlanır.
- Preparatın üzerine kristal viyole boya solüsyonu dökülerek 1 dakika beklenir ve boya dökülerek saf su ile yıkanır.
- İyot solüsyonu ile 1 dakika boyandıktan sonra tekrar saf su ile yıkanır.
- % 95'lik etil alkol preparatın üzerine dökülür. Preparat hafifçe sağa sola eğilerek alkol ile çalkalanır. Alkol 2-3 defa değiştirilerek renksizleşinceye kadar bu işleme devam edilir.
- Preparat bazik fuksin solüsyonu ile 30 saniye muamele edilerek tekrar saf su ile yıkanır.
- Havada kurutulduktan sonra mikroskopta incelenir. Mor renkli bakteriler **Gram(+)**, pembe renkli bakteriler ise **Gram (-)'tir.**

## 7. KOLİFORM TAYİNİ

Su numunelerinin mikrobiyolojik incelenmesi suyun kullanım amaçları için uygunluğunu belirleme amacı ile yapılır. Kullanılan metotlar suyun hayvan ve insan atıkları ile kirlenmesinin derecesini belirlemeye yarar. Alışlagelmiş testlerde esas, patojenler yerine bazı indikatör organizmaların belirlenmesi ve sayılmasıdır. İçme ve kullanma sularının uygunluğunu belirleme amacı ile genellikle koliform grubu bakterilerden indikatör olarak yararlanılır. Koliform bakteri tayini ve sayımı mikrobiyolojide çok kullanılan bir testtir. Mikrobiyolojik tekniklerdeki ve kültür ortamlarındaki gelişmelerle en eski tekniklerden biri olan çoklu tüp fermantasyon tekniğinin duyarlılığı artırılmış olup günümüzde çok kullanılan bir tekniktir.

Koliform grubu, aerobik ve fakültatif anaerobik, gram negatif, spor oluşturmeyen çubuk şekilli bakterilerdir. Bunlar laktozu 48 saatte 35 °C'de gaz çıkışı ile fermente ederler. Metot, çok sayıda tüplerde değişik seyreltmelerde incelemenin yapılması ve en muhtemel sayı (EMS) nın bulunmasına dayandığından, bu testin hassaslığı kullanılan tüplerin sayısına bağlıdır. Bakteri içeriğinin sayısal değeri; çok sayıda hazırlanmış, negatif ve pozitif sonuçlar gösteren tüpler yardımıyla hesaplanır ve belli bir kritik seyrelmede istenen hassa sonuç elde edilebilir. Test sonuçlarının EMS olarak ifadesinde, istatistiksel olarak değerlendirmeler yapılır. İçme suyu analizlerinde her biri 10 ml ya da 100 ml numune içeren 5 fermantasyon tüpü kullanılır. Genellikle 100 ml'den daha büyük kısımların kullanılması pratik değildir. Sık incelenen sularda 5 adet 10 mL ya da 5 adet 100 ml'lik kısımların analizi yeteri kadar kesin sonuç verir. Diğer içme suyu analizlerinde en az 3 seyreltme ve her seyreltmede 5 tüp kullanılması gerekmektedir.

Genellikle içme sularının rutin analizlerinde içilebilirlik değerlendirilmesi mikrobiyolojik kaliteye göre yapılmaktadır. Bu numunelerin % 95'inden daha fazlasında negatif sonuçlar alınacağı beklenir. Pozitif sonuç çıkarsa aynı numune alma noktasında tekrarlanan deneylerde pozitif sonuç alınmadıkça ihmal edilebilir. Zaman içerisinde pozitif numune sayısındaki artış, su kalitesinde bozulmaya işaret eder

Çoklu tüp fermantasyon tekniğinde istatistiksel olarak EMS değerlerinin tahmini için seri, minimum 3, tercihen 5 tüp içermelidir. Çoklu tüp tekniği tuzlu sulardaki analizler için de uygundur. İçme suyu amacı ile kullanılmayan sularda da mikrobiyolojik kirlenmeyi bulmak üzere uygulanmaktadır.

Çoklu tüp fermantasyon tekniği; (1) tahmin testi, (2) doğrulama testi ve (3) tamamlama testi olarak üç kademe yapılar.

### (1) Tahmin Testi:

Tahmin testinde çoğunlukla laktozlu buyyon (laktoz broth) kullanılır. Bu besiyeri tek ve çift

<i>Tek güçlü besiyeri</i>	
Pepton	5g
Et ekstraktı	3g
Laktoz	5g
Saf su	1000 ml
<i>Çift güçlü besiyeri</i>	
Pepton	10 g
Et ekstraktı	6g
Laktoz	10g
Saf su	1000 ml

İstenen maddeler belirtilen miktarlarda tartıldıktan sonra 1000 ml saf suda çözülür ve pH'sı 6,8-7'ye ayarlanır.

0.1, 1 ve 10 ml'lik ekimler yapılmak üzere, her bir ekim için 3'er tüp hazırlanır. 10 ml ekim yapılacak tüpe çift güçlü besiyerinden; 1 ml ve 0.1 ml ekim yapılacak tüplere de tek güçlü besiyerinden 10'er ml taksim edilir ve ağzı pamukla kapatıldıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilir.

Alınan su numuneleri seyreltilerek veya seyreltilmeden tahmin testine tabi tutulur. İçme suyu numunelerinde genellikle seyreltme işlemi uygulanmazken; yüzey suyu numunelerinde seyrelme yapılır. Hazırlanan çift güçlü besiyerlerine üç tane 10 ml' lik, tek güçlü besiyerlerine de üçer tane 1 ml ve 0,1 ml' lik ekimler yapılır. Örneğin 4 seyreltme için 12 tüp kullanılır.

Ekim yapılan tüpler 35 °C'de 24 saat inkübe edilir. 24 saat sonra gaz çıkışı olanlar doğrulama deneyine alınır. Gaz çıkışı olmayanlar ise 24 saat daha bekletilir. Ekilen tüplerde 48 saat içerisinde herhangi bir gaz oluşmamışsa bu suyun koliform bakteri içermediği kabul edilir.

### (2)Doğrulama Testi

Doğrulama testi, 24 veya 48 saat sonunda oluşan gazların gerçekten koliformlar tarafından oluşturulup oluşturulmadığını saptamak için gerçekleştirilir, Tahmin testinde gaz çıkışı olanlar direkt olarak doğrulama deneyine alınır. Doğrulama testinde Brilliant green laktoz safra broth besiyeri kullanılır. Bu besiyeri piyasada hazır olarak satılmakta olup, hazırlanışı üzerinde yazılıdır.

Besiyeri hazırlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir ve tahmin testinde gaz çıkışı olan tüplerden bu besiyerine öze ile ekimler yapılır.

Doğrulama testinde 24 veya 48 saat sonucunda gaz çıkışı varsa, bu analiz edilen numunede koliform bulunduğunu gösterir. İçinde gaz çıkışı olmayanlarda ise koliform bulunmamaktadır. Gaz çıkışlarının gerçekten koliformdan kaynaklanıp kaynaklanmadığını tesbit etmek amacıyla tamamlama testine geçilir.

### (3)Tamamlama Testi

İlk iki deney sonucu yeterli görülüyorsa tamamlama testine geçilir. Doğrulama testinde pozitif sonuç veren tüplerden Laktoz broth ve yatık jeloz besiyerine ekim yapılır ve 35 °C'de 48 saat inkübe edilir. Bu süre sonunda Laktoz broth besiyerinde gaz oluşmamış ise sonuç negatif (-) olarak kabul edilir. Eğer gaz oluşmuş ise koloniden ekim yapılmış yatık jelozdan preparat hazırlanır ve gram boyama yapılır. Boyama sonucunda Gram (-)'in tespit edilmesi koliform varlığını doğrular.

### Koliform Sayısının Hesaplanması

Çok tüplü fermantasyon tekniğinde sonuçlar en muhtemel bakteri sayısı (EMS) metoduna göre hesaplanmaktadır. Herhangi bir seyrelme yapılmamış su numunelerindeki 10, 1 ve 0,1 ml' lik ekimlerin pozitif ve negatif sonuçlarına göre EMS değerleri ve % 95' lik güvenilirlik sınırları tabloda verilmiştir.

Tablo XII.1. Seyrelme Yapılmamış Sularda Koliform Tayini İçin EMS Değerleri ve Güvenilirlik Sınırları

Pozitif sonuç veren tüp sayısı			%95 güvenilirlik sınırları		
10 ml	1 ml	0.1 ml	Her 100 ml için EMS	Alt sınır	Üst sınır
0	0	0	3	0.5	9
0	1	0	3	0.5	13
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36

2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3-	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	1	0	89	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Seyreltme yapılmış numunelerdeki koliform sayısının hesaplanmasında ise aşağıdaki tablo kullanılmaktadır.

**Tablo XII.2.** Seyrelme Yapılmış Sularda Koliform Tayini İçin EMS Değerleri

Pozitif Tüp Sayısı					100 ml için EMS
$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	
3	3	0	0	0	$23 \times 10^6$
3	2	0	0	0	$93 \times 10^5$
3	2	1	0	0	$150 \times 10^5$

### Mikrotitrasyon plakalarının aşılama ve inkübasyonu

#### Aşılama

İlk seyreltme tüpünün içeriği 90mm çaplı boş, steril bir petri kabına aktarılır.

8 steril uçlu, çok kanallı bir pipet kullanılarak mikrotitrasyon plakasının her bir kuyucuğuna 200µl, ilk seyreltmeye tekabül edecek şekilde ilave edilir.

Takip eden seyreltmeler için (1/20, 1/200, vs.) aynı şekilde hareket edilir, her bir seyreltme arasında petri kabı ve 8 steril uç değiştirilir.

**UYARI**—Bir kuyucuktan diğer kuyucuğa geçiş yoluyla kirlilik olabilir.

### **İnkübasyon**

Mikrotitrasyon plakalarını aşıladıktan sonra, bu amaç için sağlanan tek kullanımlık steril yapışkan şeritlerle kapatılır.

Mikrotitrasyon plakaları 44 °C ± 0.5 °C 'da en az 36 en çok 72 saat inkübe edilir.

**Not-** Mikrotitrasyon plakaları çok dikkatle eğmeden taşınmalıdır.

### **Sonuçların okunması**

Her mikrotitrasyon plakası, yapıştı ricasıyla birlikte UV gözlem bölmesine (Madde 5.4) yerleştirilir.

Mavi floresan gözlenen tüm kuyucuklar pozitif olarak alınır.

**Not-** Okuma 36 saatten sonra herhangi bir zamanda yapılabilir çünkü floresan zamanla değişmez.

### **Sonuçların ifade edilmesi**

#### **Karakteristik sayının tayini**

Seçilen her seyreltme için pozitif (+) kuyucuk sayısı not edilir.

#### **1. Örnek:** Banyo suyu

1/2 64'de 32 +

1/20 32'de 5 +

32/5 karakteristik sayı olarak kaydedilir

#### **2. Örnek:** Diğer yüzey suları

1/2 24'de 24 +

1/20 24'de 18+

1/200 24'de 5+

1/2000 24'de 1 +

18/5/1 karakteristik sayı olarak kaydedilir

#### **3. Örnek:** Atık su

1/2 16'da 16+

1/20 16'da 16+

1/200 16'da 12+

1/2000 16'da 5+

1/20 000 16'da 0+

1/200 000

16'da 0+

12/5/0 karakteristik sayı olarak kaydedilir.

3 veya daha fazla seyreltme aşılandığında mümkün olan yerde 0 ile biten 3 rakamlı karakteristik bir sayı göre kaydedilir.

### MPN'in hesaplanması ve güven aralığı

MPN, mikroorganizmaların yoğunluğunun istatistiki tahminidir, ve aşılana hacimlerdeki Poisson dağılımına tekabül ettiği varsayılır. Güven aralıkları bu MPN'ye eklenmiştir.

Ek A veya B' de gösterilen program, her aşılama grubu için mililitre suya düşen Bağırsak enterokoklarının MPN'ini ve % 95'teki güven aralığını hesaplayabilir.

1.Örnek : Varsayılan CN karakteristik sayısı, LO en alt limit ve UP en üst limit demektir.

CN=32 / 5 ise EkA' daki program ml' deki enterokok sayısını 7,56 olarak verir.

[LO = 5,42 -UP- 10,54] Mesela 756/100 ml (542 ila 1054)

2 Örnek :

CN = 18/5/1 ise Ek A' daki program 159,08/ml,

[LO = 101,99-UP = 248,11]

3 Örnek:

CN = 12/5/0 ise EkA' daki program 1 724,61/ml,

[LO = 1 003,98 - UP = 2 962,50]

Kuyucukların hiçbirisi pozitif değilse, sonuçlar aşağıdaki şekilde ifade edilir: < n/100 ml  
Burada n seyreltme koşulları gerçekleştirildiğinde 1 pozitif kuyucuk karşılığı gelen MPN'dir.

## 8. ALKOLİK FERMANTASYON

Mayalarda iki kemoorganotrofik metabolizma bulunur. Bunlar; fermantasyon ve solunum. Oksijen solunumunun meydana gelmesi durumunda: mayalar şekerler üzerinde verimli bir şekilde büyür, bunları e-verici (enerji kaynağı) ve C-kaynağı (substrat) olarak kullanır, yeni maya hücreleri (mikrobiyal büyüme) ve CO<sub>2</sub> (katabolik son ürün) üretir ve ortam anaerobik olana kadar oksijeni tüketir. Oksijen tükendiğinde, mayalar anaerobik bir metabolizmaya geçer, fermantasyon başlar, hücre veriminin azalmasına ancak önemli miktarda alkol ve CO<sub>2</sub> üretimine neden olur.

Malzemeler

- Karbon Kaynağı (Meyve suyu)
- Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Erlen
- Pipet
- Balon
- pH Metre

Deneyin yürütülüşü

Erlene belirli miktar meyve suyu alınır, pH I ölçülür, kaydedilir. İçerisine belirtilen miktarlarda maya eklenir, erlenlerin üzerine balonlar takılarak 2-3 gün oda sıcaklığında inkübe edilir. İnkübasyon sonrası değişimler gözlenir.