

Bakteriyoloji Laboratuvarında Çalışma Kuralları

1- Laboratuvara çamurlu veya tozlu ayakkabı ile girilmemeli, mümkünse ayakkabılar temizlenmeli veya dışarıda bırakılmalı ve temiz bir ayakkabı giyilmelidir.

2- Laboratuvara girerken beyaz (veya diğer renkte) bir gömlek giyilmeli, çalışma bittikten sonra da çıkarılmalı ve laboratuvarda özel yerine asılmalıdır. Gömlek dışarı götürülmelidir.

3- Laboratuvara palto, kitap, defter, vs. ile girilmemelidir.

4-Laboratuvara yemek getirmek, yemek yemek, sakız ve çiklet çiğnemek, ıslık çalmak, sesli konuşmak, şarkı söylemek yasaktır. Çay ve sigara da içilmemelidir.

- 5- Laboratuvar masalarının üzerine oturulmamalıdır.
- 6- Laboratuvara ziyaretçi sokulmamalıdır. Eğer zorunluluk varsa, ayakkabılarının üzerine plastik steril galoş geçirilmeli ve onunla laboratuvara girilmelidir.
- 7- Çalışma masalarının üzeri, çalışmaya başlamadan önce ve çalışma bittikten sonra dezenfektan bir madde ile silinmelidir (%0.5 formol, %5 lizol, vs.).
- 8- Çalışma masasının üzerinde, lüzumlu malzemedен başka eşya bulundurmamalıdır.
- 9- Çalışırken elleri ağza, buruna, yüze veya göze sürmemeli ve kalem, kağıt, iplik, etiket vs. ağza götürülmemelidir.
- 10- Mikroplu tüp veya petri kutularını açık olarak masa üzerine bırakmamalıdır.
- 11- Gömlek ceplerine sıvı veya katı kültür ihtiva eden tüp veya petri kutusu koymamalıdır.
- 12- Ekim yaparken veya çalışırken pencereler kapalı olmalı, konuşmamalı, lüzumsuz el-kol hareketleri yapmamalıdır.

13- Etrafa mikroplu bir madde saçılınca veya kültür tüpleri kırılınca üzeri, dezenfektan bir maddeye batırılmış pamukla örtülmeli ve uygun bir etki süresinden sonra toplanarak alınmalıdır. Böyle durumlarda laboratuvar yetkililerine hemen haber verilmelidir.

14- Çalışma bittikten sonra kirlenen tüp, pipet, vs. kendilerine ait kaplara konulmalıdır.

15- Kullanılan lâm ve lâmeller, içinde dezenfektan bir madde bulunan özel kaplara veya kavanozlara konulmalıdır.

16- Öze veya iğneleri kullanmadan önce iyice sterilize etmeli (yakmalı), soğuduktan sonra kullanmalı ve tekrar yaktıktan sonra yerine koymalıdır.

17- Çalışma bittikten sonra eller önce sabunlu su ile yıkanmalı ve sonra dezenfektan bir madde ile dezenfekte edilmelidir.

18- Pipetlerin steril olması ve ağıza gelen kısmında pamuk bulunması gereklidir. Pamuksuz olanlar, kâğıt sargısından ucu dışarı çıkanlar ve kâğıt sargısı açık olan pipetler kullanılmamalıdır. En iyisi manuel çalışan (yarı otomatik) pipetler tercih edilmelidir.

19- Pipetle tehlikeli sıvı çekerken pamuğa kadar çekilmemeli ve arada 6-7 cm. lik bir güven boşluğu bırakılmalıdır.

20- Sterilitesinden şüphe edilen bir malzeme kullanılmamalıdır.

21- İnfekte bir materyali havanda ezerken, başlık, gözlük, burun maskesi ve eldiven kullanılmalıdır.

22- Laboratuvarda kullanılan malzeme ve maddelerin kırılmasına, bozulmasına meydan verilmemelidir.

23- Mikroskop, pH metre, terazi, su banyosu, santrifüj vs. gibi lüzumlu ve hergün kullanılabilecek malzeme çok dikkatlice kullanılmalı, kullanılmadan önce ve sonra temizlenmelidir.

24- Etüv, buzdolabı ve dipfirize konacak tüp, petri kutusu, vs. malzemenin üzeri okunacak şekilde yazılmalı veya etiketlenmelidir. Silinmiş olanlar çıkarılmalıdır.

25- Laboratuvardan ayrılırken gömlek, başlık, maske ve eldiven çıkarılır. Eldivenler dezenfektan içine konur ve diğerleri sterilizasyon için kendilerine ait yerlere asılırlar veya bırakılırlar.

26- Laboratuvarlarda sinek veya böcek bulunmamalı ve yok edilmelidir. Mikrop taşıyarak tehlikeli olabilirler.

27- Çalışma bittikten sonra her şey yerine konur. Havagazı, elektrik, su ve vakum muslukları kapatılır ve iyice kapatılmış olduğuna da dikkat edilir.

28- Çalışırken dağınık olmamalı, temiz, derli-toplu ve bilinçli olmalı ve aseptik koşullara azami derecede riayet edilmelidir.

29- Çalışma programı bir gün önceden veya Laboratuvara girmeden önce hazırlanmalıdır.

30- Laboratuvardan dışarı herhangi bir tehlikeli kültür veya materyal çıkarılmamalıdır.

31- Kullanılmış kağıt, pamuk, vs. kendine ait özel kutulara bırakılmalıdır.

32- Yapılan bütün çalışmaların kayıtları doğru ve zamanında tutulmalıdır.

33- Laboratuvar havası tozsuz olmalıdır.

34- Çalışmanın özelliğine göre "steril kabinet" kullanılmalıdır.

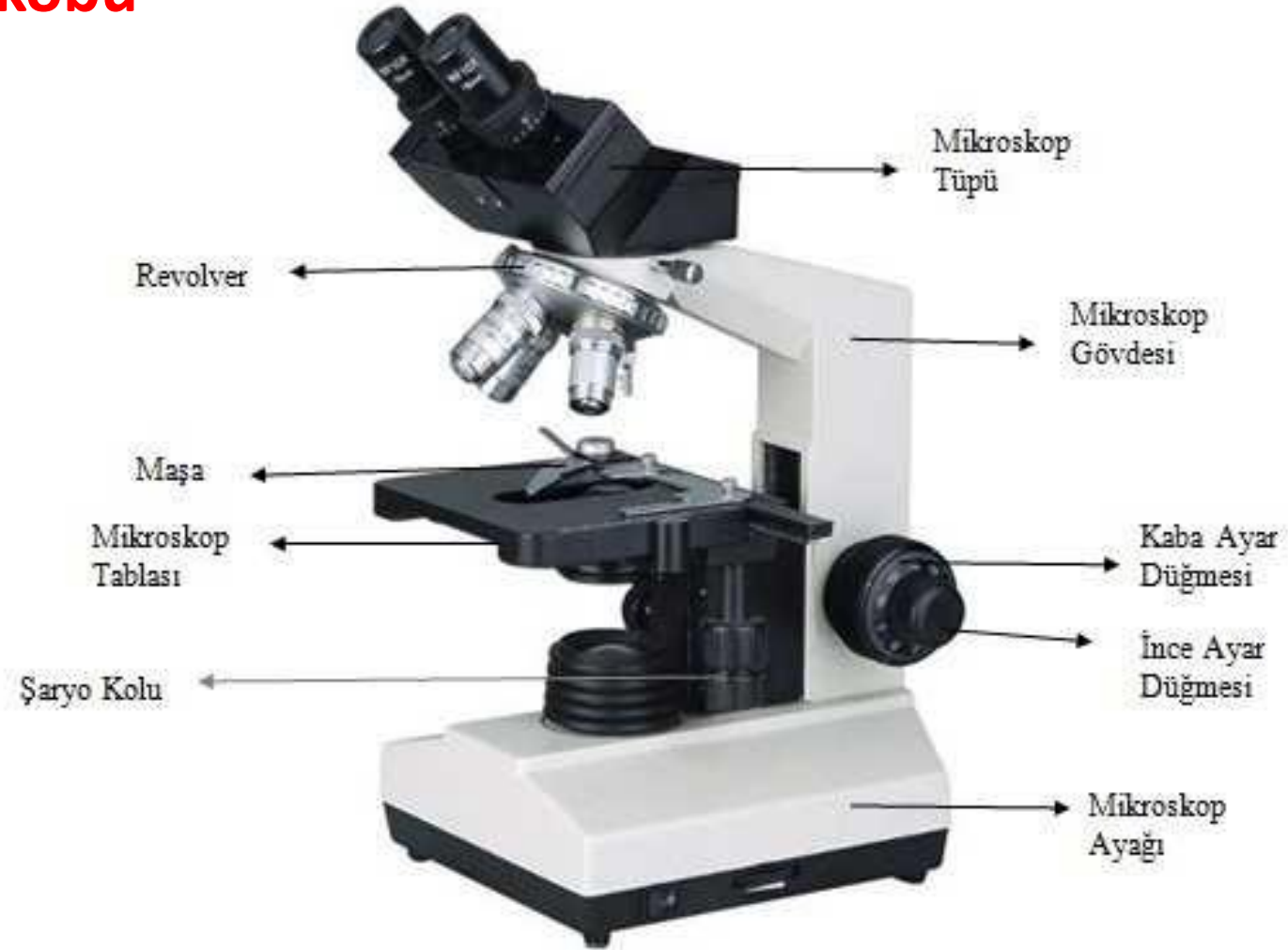
Mikroskoplar

- Günümüzde çeşitli amaçlar için yapılan mikroskoplar başlıca 5 temel bölüme ayrılırlar.
 - 1- Işık mikroskopları,
 - 2- Karanlık saha mikroskopları,
 - 3- Floresens mikroskopları,
 - 4- Faz-kontrast mikroskobu,
 - 5- Elektron mikroskopları.

1. Işık Mikroskobu

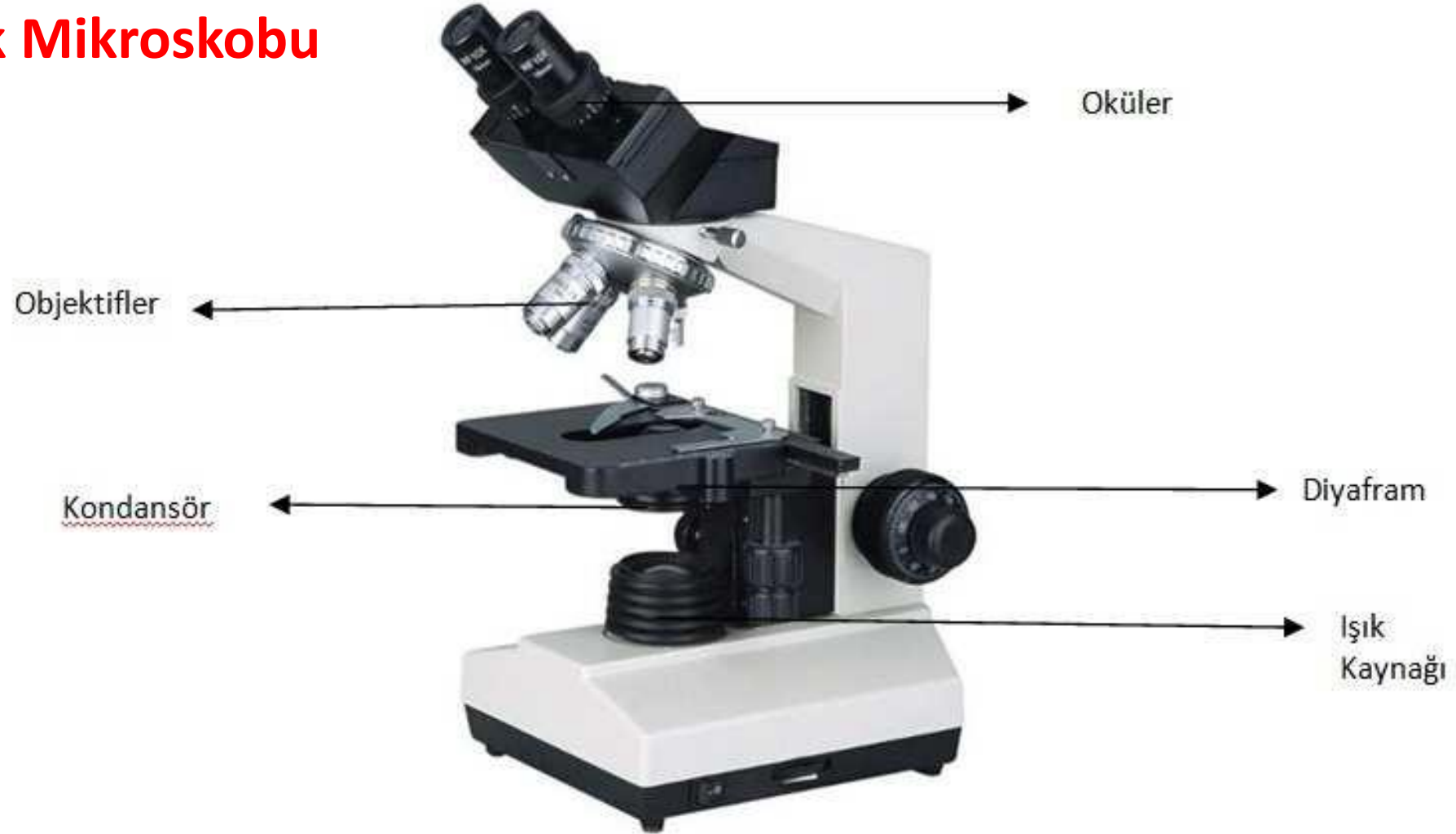
- Laboratuvarlarda genel amaçlar için her zaman kullanılan ve büyütme kapasitesi 1000-3000 arası olan mikroskoplardır.
- Bu tür mikroskoplar başlıca 3 kısımdan oluşmaktadır.
 - 1- Optik kısmı,
 - 2- Aydınlatma kısmı,
 - 3- Mekanik kısım.

1. Işıık Mikroskobu

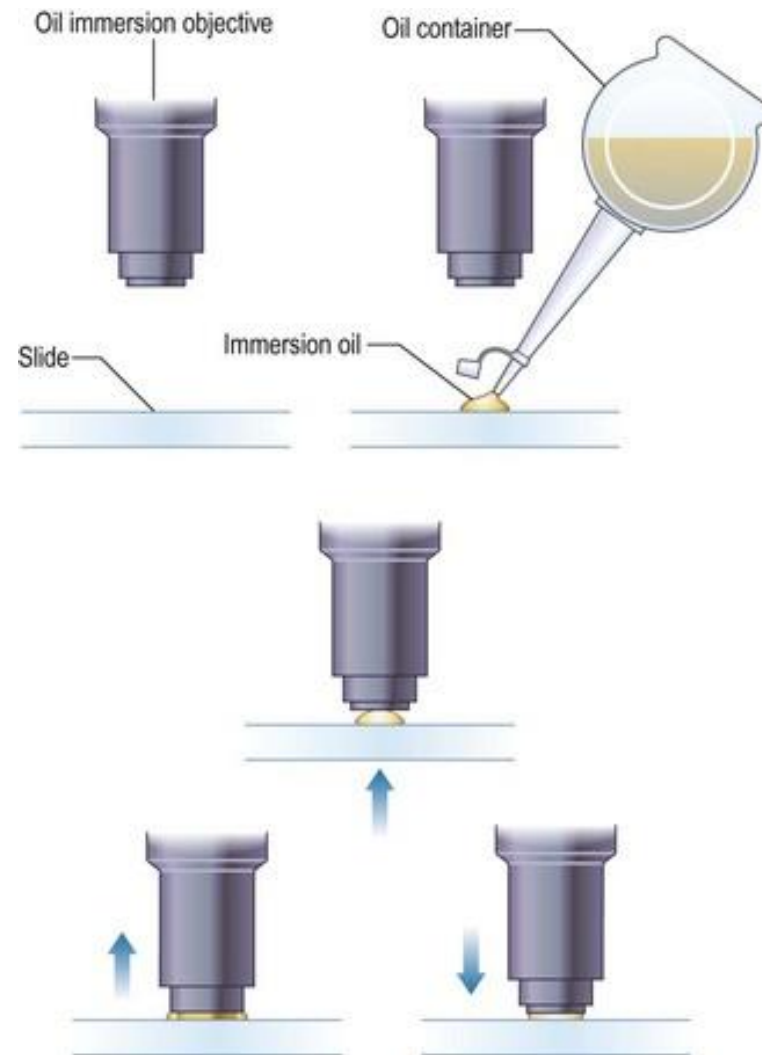


<http://www.jret.org/FileUpload/ks281142/File/18.cetin.pdf>

1. Işık Mikroskobu

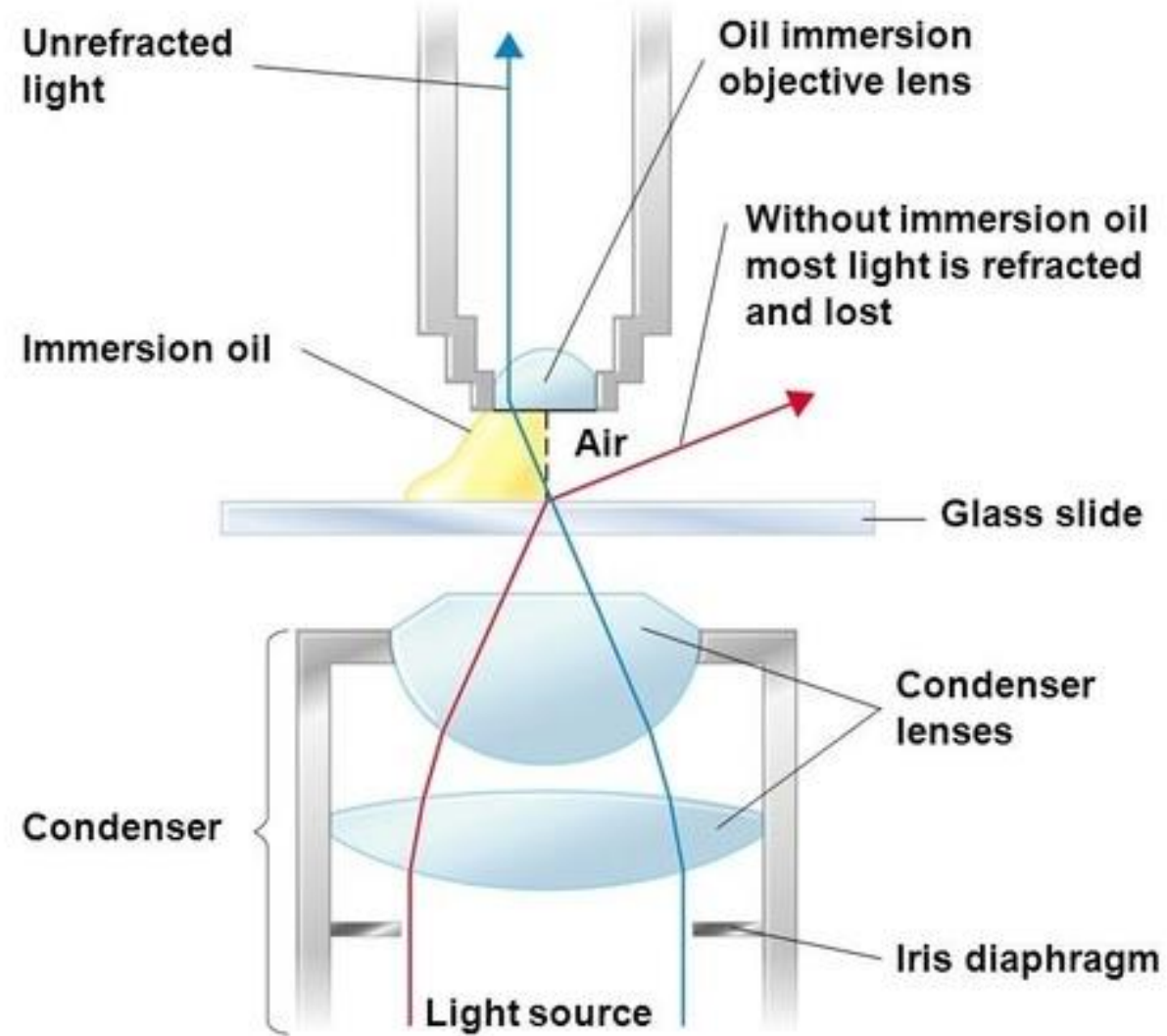


<http://www.jret.org/FileUpload/ks281142/File/18.cetin.pdf>



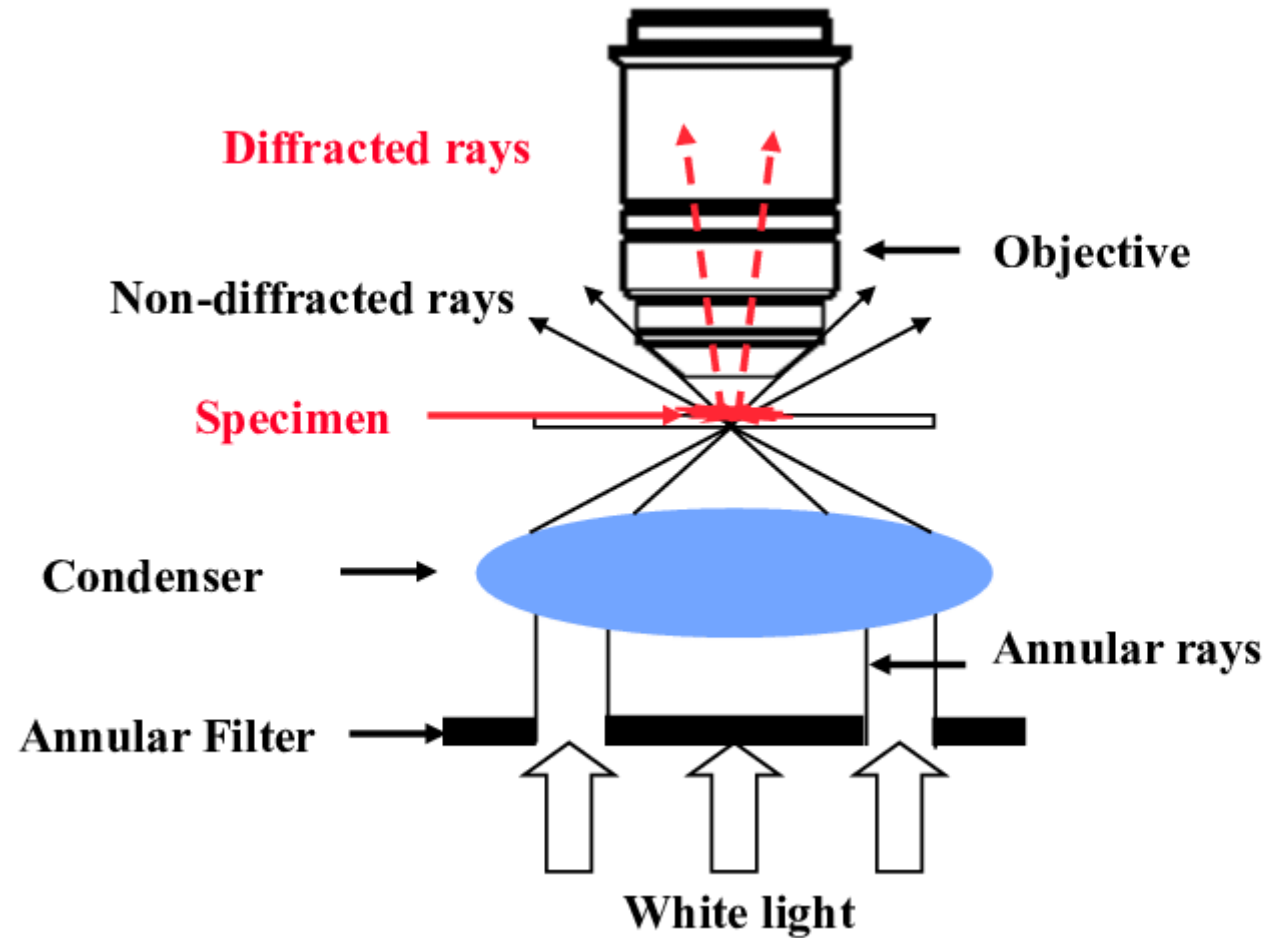
<https://veteriankey.com/laboratory-techniques/>

Figure 3.3 Refraction in the compound microscope using an oil immersion objective lens.



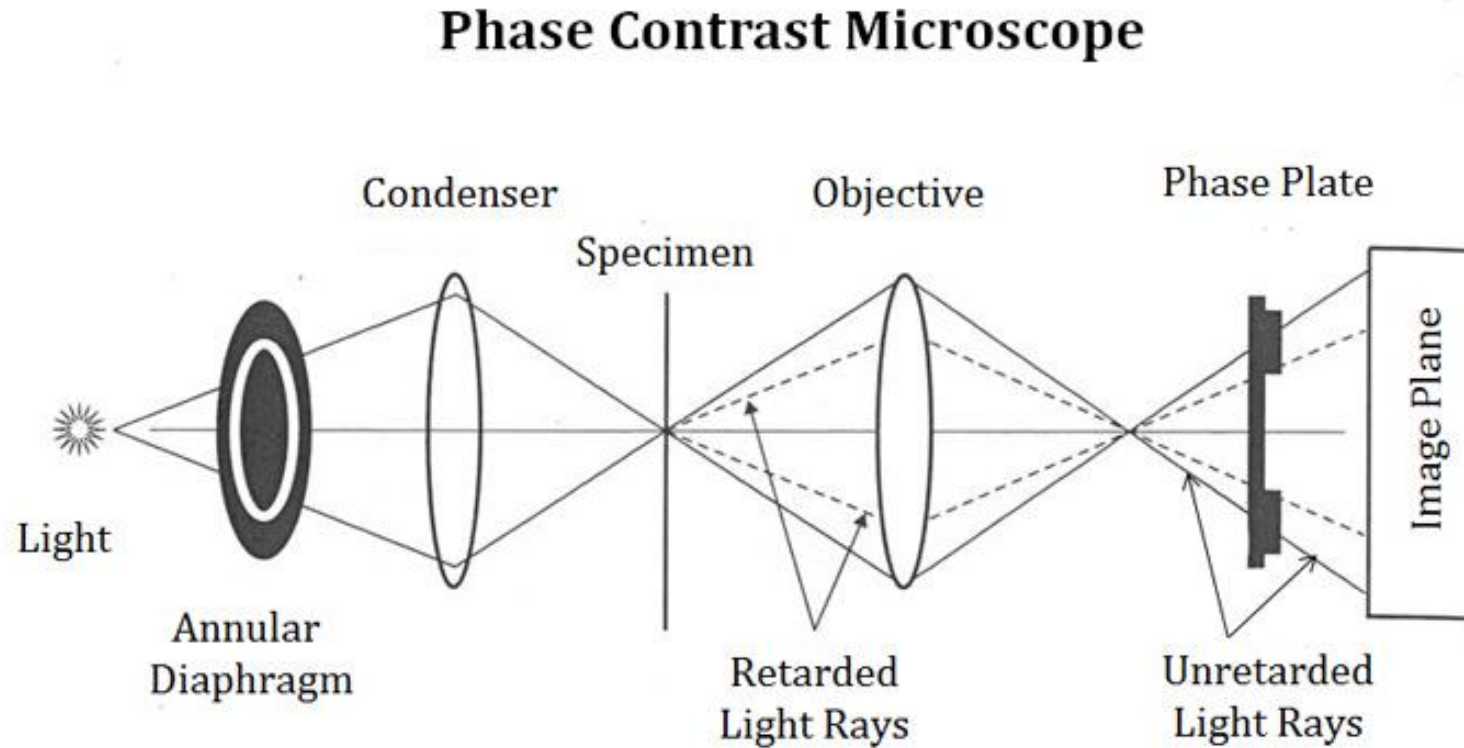
<https://www.quora.com/Why-does-immersion-oil-increase-magnification>

2. Karanlık saha mikroskobu



Bailleul, J., Simon, B., Debailleul, M., & Haeberlé, O. (2017). An Introduction to Tomographic Diffractive Microscopy: Toward High-Speed Quantitative Imaging Beyond the Abbe Limit. Micro-and Nanophotonic Technologies.

3- Faz-kontrast mikroskobu



<https://microbenotes.com/phase-contrast-microscopy/>

4-Fluoresens mikroskopları



<https://tr.aliexpress.com/item/32467955258.html>

5- Elektron mikroskopları



https://www.hitachi-hightech.com/eu/product_detail/?pn=em-ht7800&version=

Bakterilerin makroskopik morfolojileri

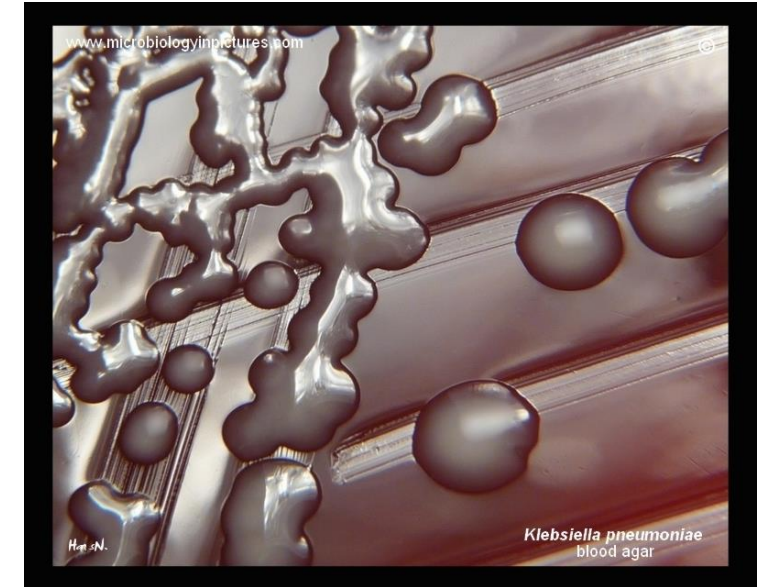


1. Smooth (S) koloni

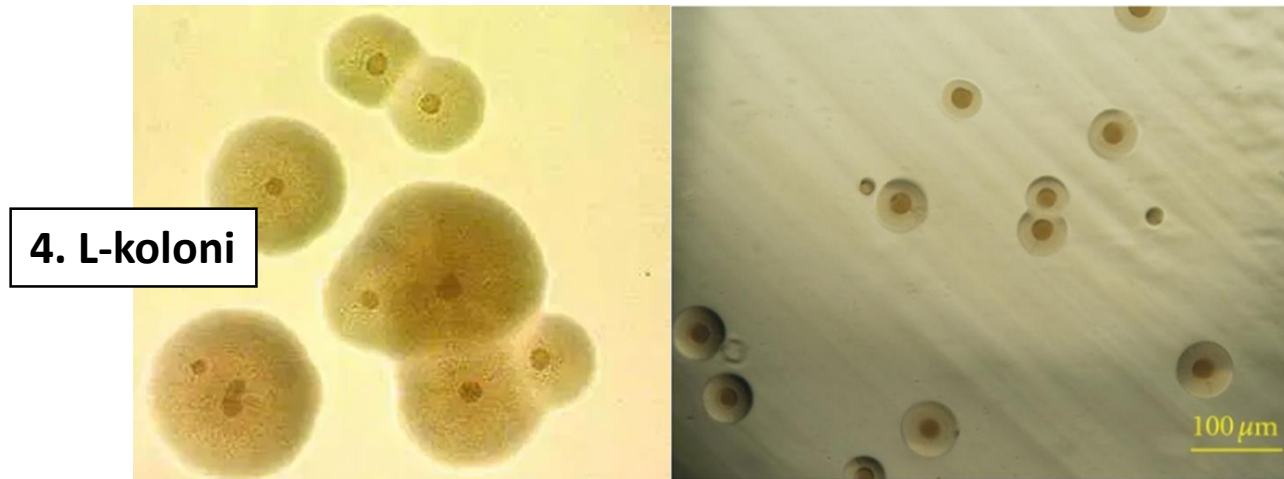


<http://www.mvm.pitt.edu/node/238>

2. Rough (R) koloni



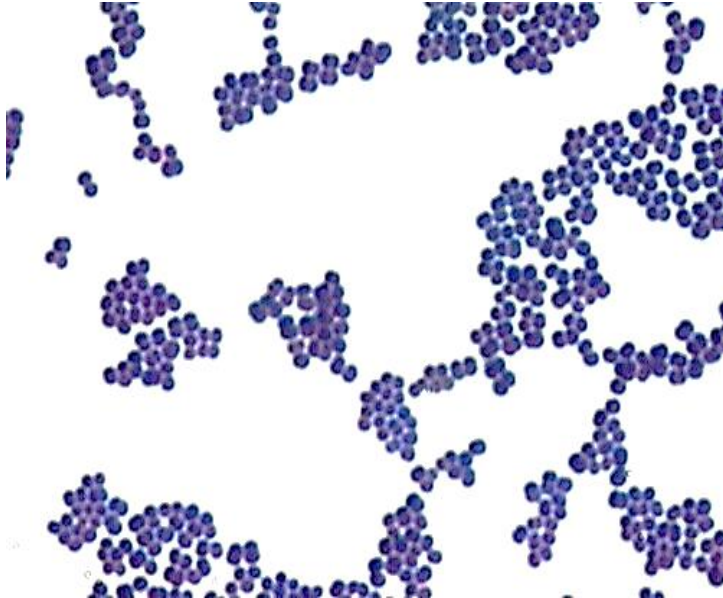
3. Mukoid (M) koloni



4. L-koloni

<https://mycoplasma blog.wordpress.com/mollicutes/>

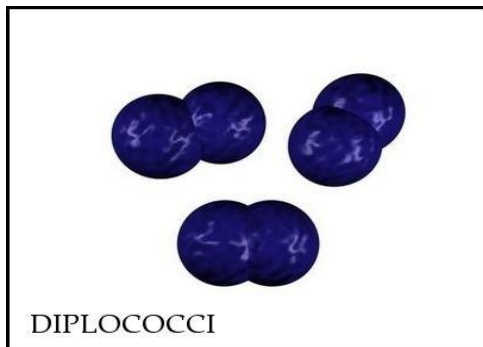
Bakterilerin mikroskopik morfolojileri



<https://www.atsu.edu/faculty/chamberlain/mosdoh/gramstainingrules.htm>

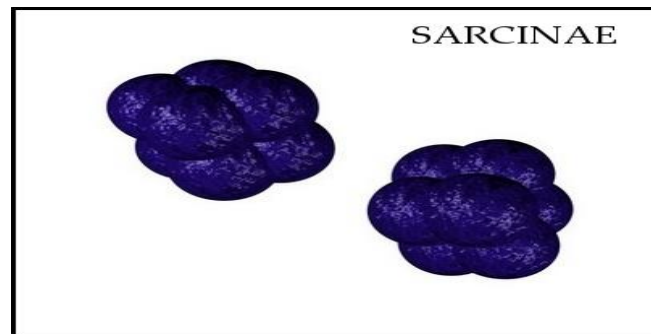


https://claremont.sd63.bc.ca/pluginfile.php/52078/mod_resource/content/1/kinndomarchaea_eubacteria_cfaughtedit.pdf



DIPLOCOCCI

<https://alchetron.com/Diplococcus>



SARCINAE

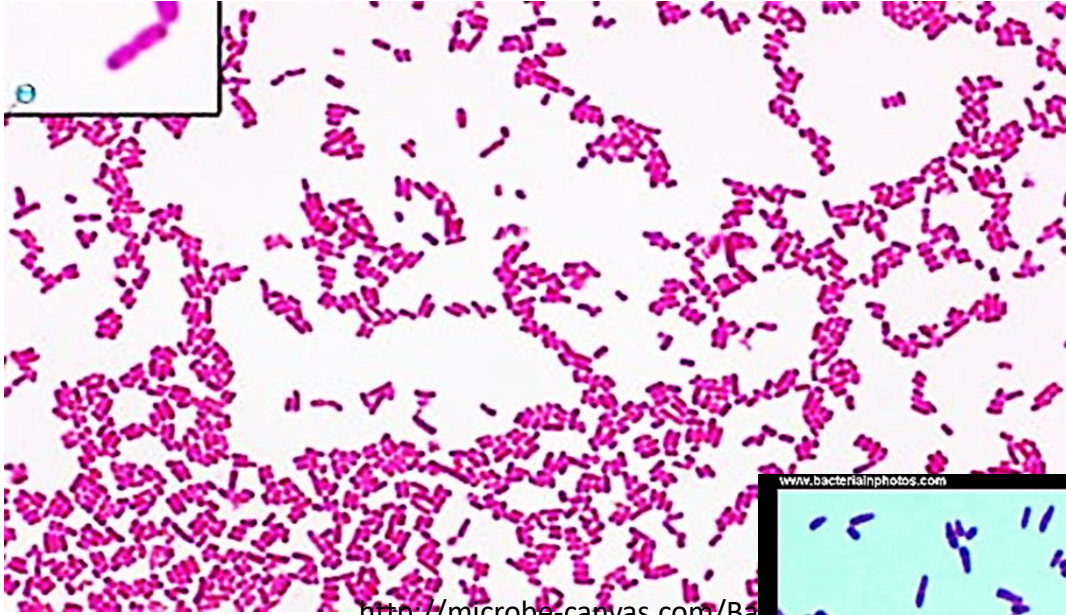
<https://www.microbiologyinpictures.com/morphology%20of%20bacterial%20cells.html>



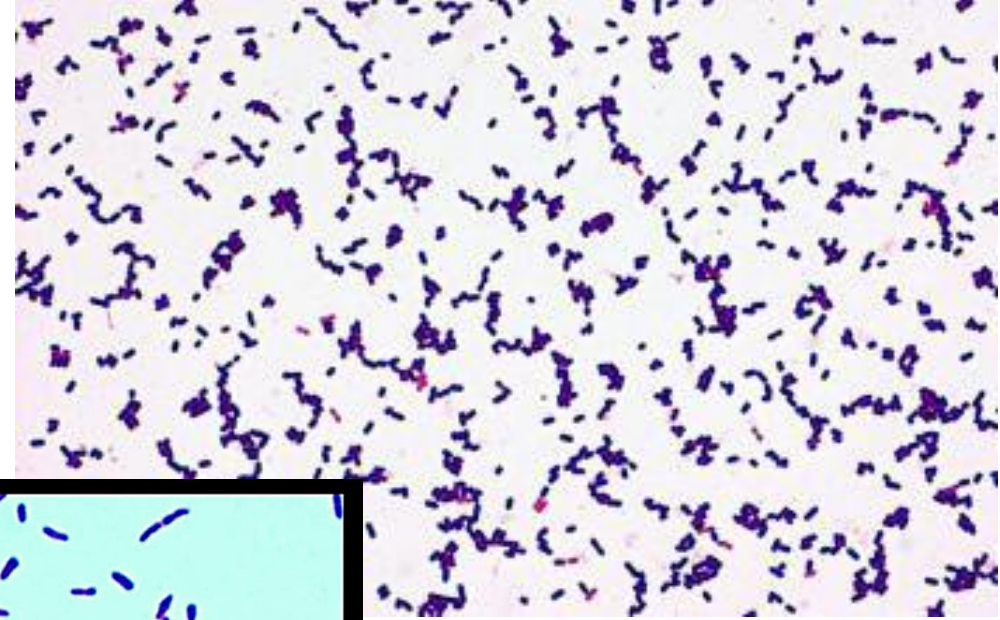
Tetrad

<https://microbiologyinfo.com/different-size-shape-and-arrangement-of-bacterial-cells/>

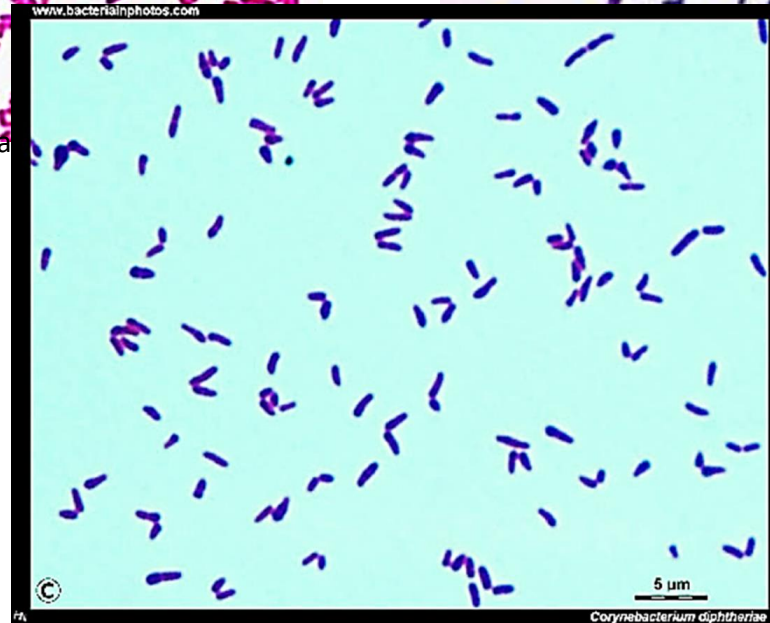
Bakterilerin mikroskopik morfolojileri



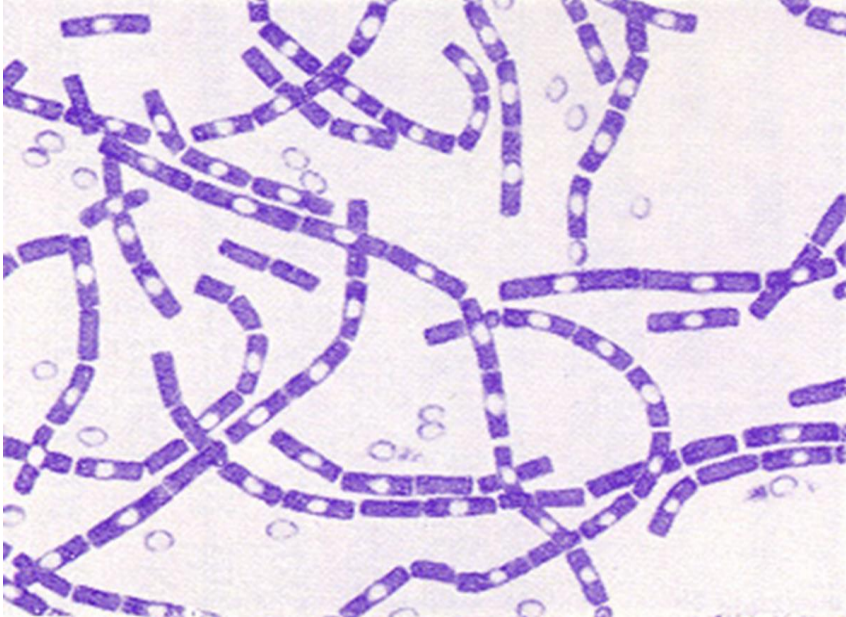
<http://microbe-canvas.com/Ba>



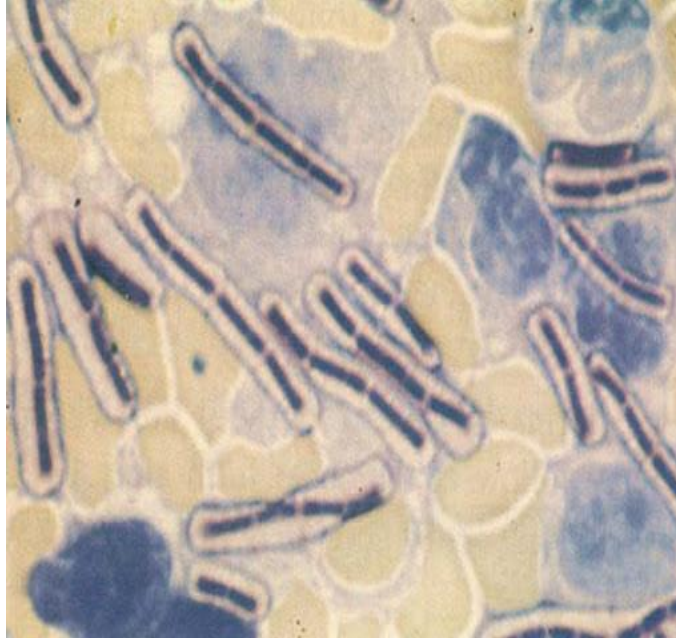
<http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1248>



Bakterilerin mikroskopik morfolojileri



<http://textbookofbacteriology.net/Anthrax.html>

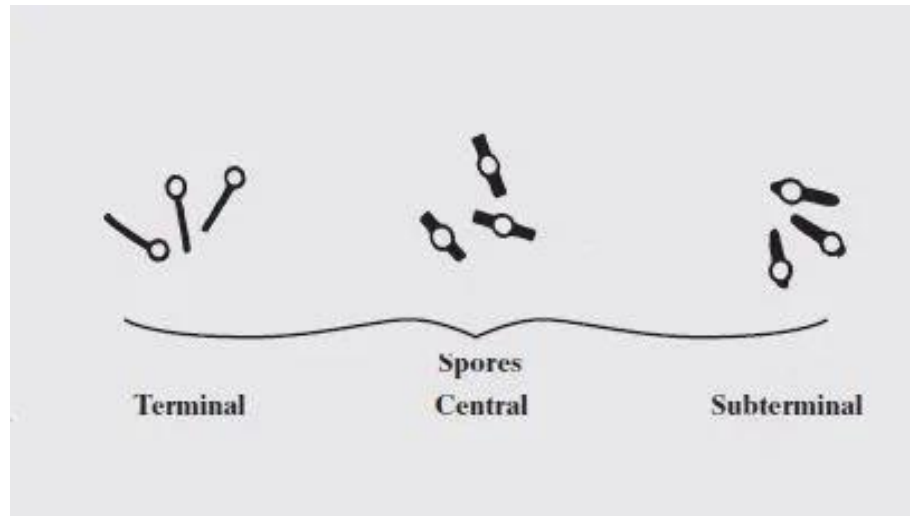


<http://www.fao.org/3/t0756e/T0756E03.htm>



http://apha.defra.gov.uk/External_OV_Instructions/Anthrax/Veterinary_Inquiry/index.htm

Bakterilerin mikroskopik morfolojileri



<https://microbeonline.com/endospore-staining-principle-procedure-results/>



<https://www.tipacilar.com/clostridium-botulinum/>

Bakterilerin mikroskopik morfolojileri

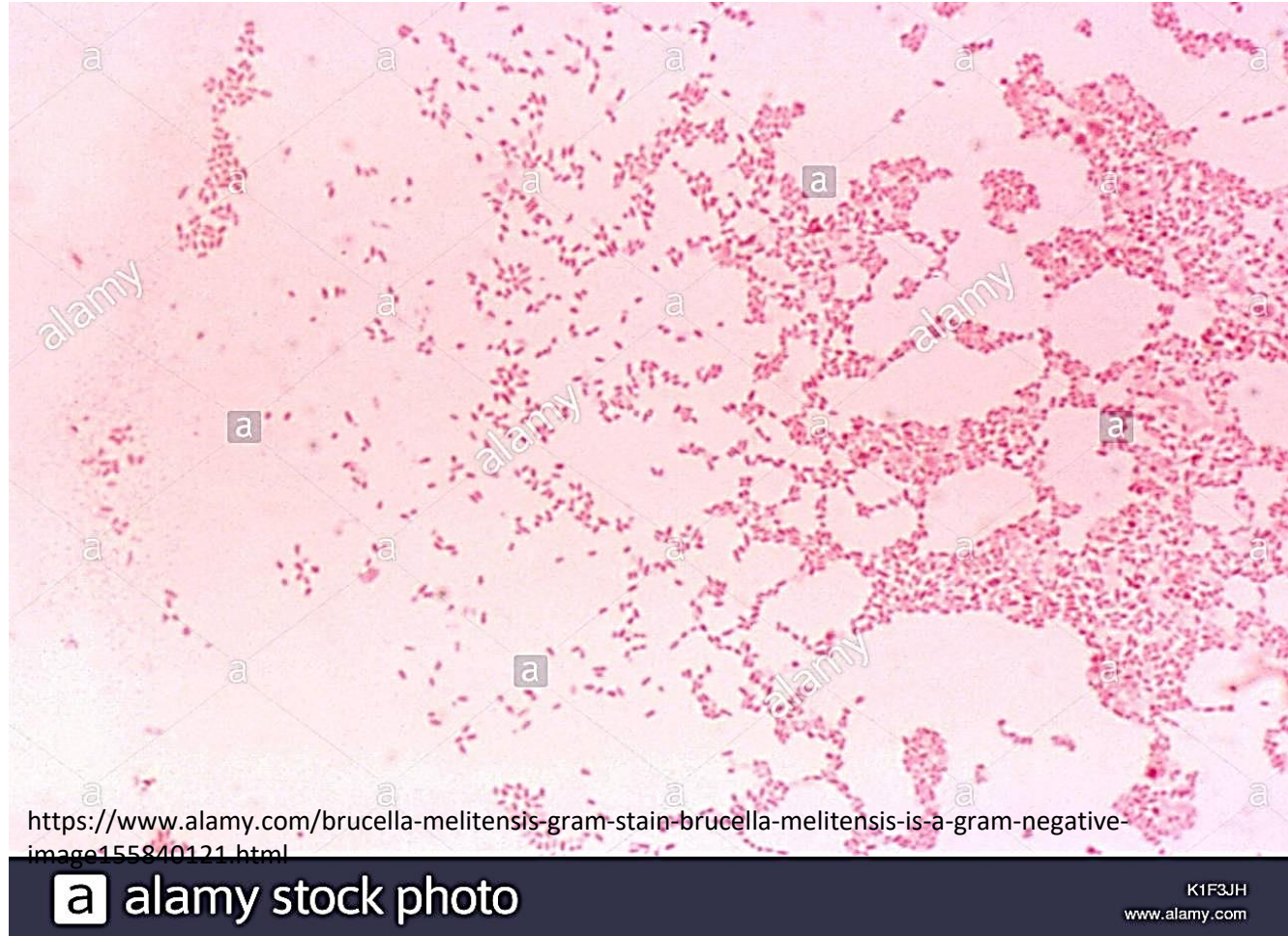


https://www.oerafrica.org/FTPFolder/health/cases_in_microbiology/content/campylobacter.html



<https://www.alamy.com/stock-photo/b-anthraxis.html>

Bakterilerin mikroskopik morfolojileri

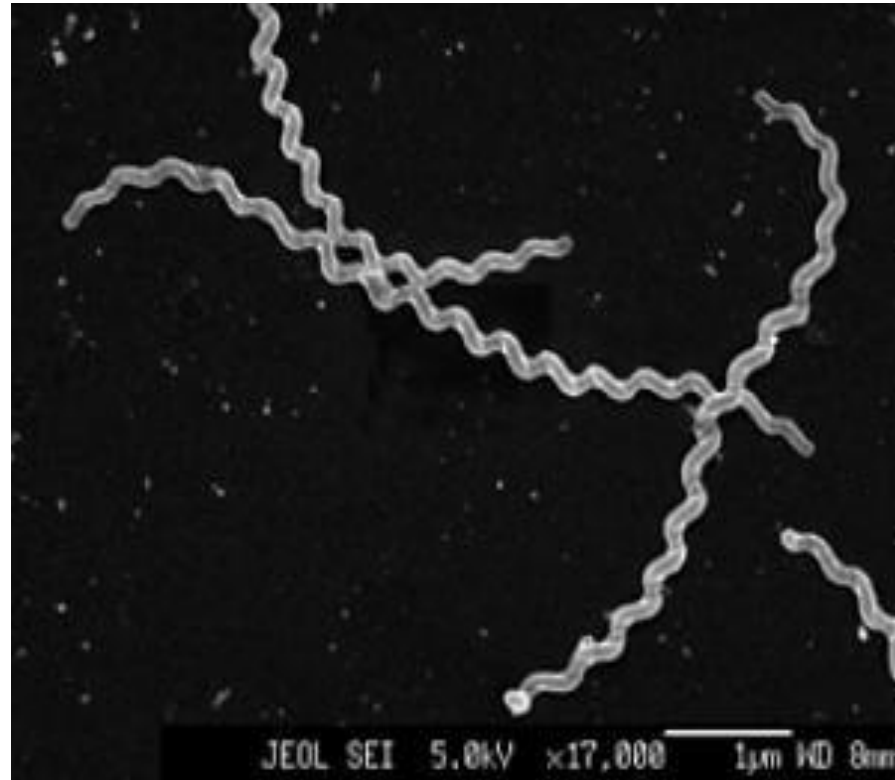


<https://www.alamy.com/brucella-melitensis-gram-stain-brucella-melitensis-is-a-gram-negative-image155840121.html>

 alamy stock photo

K1F3JH
www.alamy.com

Bakterilerin mikroskopik morfolojileri



<https://gordonvet.com.au/leptospirosis-outbreak-sydney-july-2019/>

MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI

Boyama için preparat hazırlanması

- Boyamak amacı ile, şüpheli kültürlerden veya marazi maddelerden (organlardan, patolojik sıvılardan, kandan, idrar, gaita, sperma, süt, vs) preparatlar hazırlanır, genel ve/veya özel boyama teknikleriyle boyanarak mikroskopla muayene edilirler.
- **Otopside**n veya **biopsi**den elde edilen 1-2 mm³ miktarlarındaki küçük parçacıklar temiz ve kullanılmamış iki lâm arasında ezilerek, veya pensle tutulan organ parçası lâma sürülerek veya lâm organ parçasının kesit yüzüne sürülerek ince bir preparat hazırlanır. Organın veya parçanın yüzeyinde kontaminasyon olasılığı varsa, bu takdirde, kızdırılan bir spatül organın yüzeyine kısa bir sürede tutularak (değdirilerek) organın yüzeyi steril hale getirilir. Bundan sonra, bu bölgeden içeri sokulan pens veya öze ile alınan küçük parçalar hem froti yapmak ve hem de ekim için kullanılır.

MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI

- Boyama için preparat hazırlanması
- Organ, süt, eklem sıvısı, sıvap gibi materyallerden peraparat hazırlama

1. Örneğin yüzeyi bek alevinde kızdırılan bir spatül ile yakılır



<http://www.veteriner.cc/hasta/tuberkiloz.asp>

2. Steril pastör pipeti ile içerik çekilir veya organdan steril makas ile küçük bir parça kesilir

3. Lam üzerine froti çeker gibi içerik yayılır veya doku parçasının kesit yüzeyi ile temiz bir lama sürülerek sürme veya tuşe preparat hazırlanır

4. Preparat kurutulur

5. Tespit

a) Fiziksel (alevden 3 defa geçilerek) veya

b) Kimyasal tespit yapılır (metil alkol ile 3-4 dk., etil alkolde 10 dk.) ve sonra hafif akan suda yıkanır

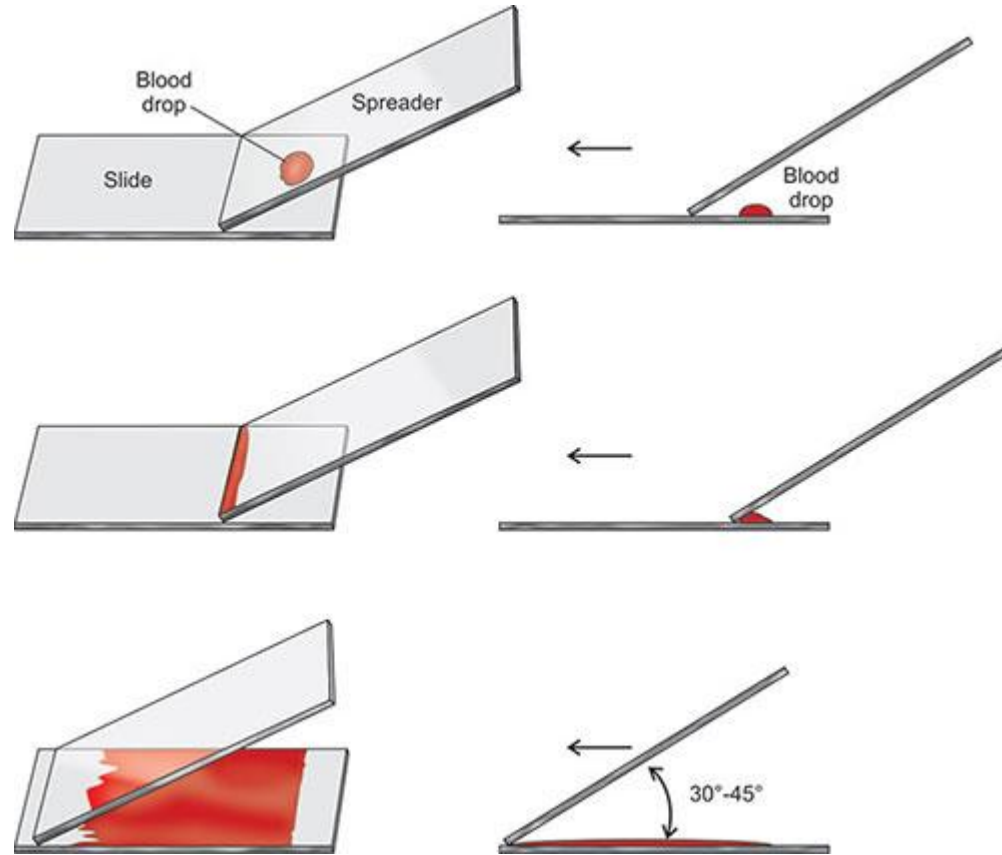
6. Boyanır ve kurutma kağıdı arasında kurutulup 1 damla immersiye yağı damlatılıp mikroskopta 100X objektifte diyafram sonuna kadar açılarak incelenir

MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI

- Boyama için preparat hazırlanması
- Patolojik sıvılardan ve sıvı kültürlerden preparat hazırlamada öze kullanılır.
- Bu sıvılardan alınan bir öze dolusu materyal lâmin tam ortasına konarak ince bir tabaka halinde ve yavaşça (etrafa sıçratmadan) yayılır. Eküvyonun marazi madde içeren ucu, lâma sürülerek froti hazırlanır.
- Kandan preparat hazırlamada, temiz bir lâmin uçlarından birine yakın yere bir damla taze kan konur ve diğer bir lâmin kısa kenarı veya lâmel ile ileri itilmek suretiyle ince bir preparat hazırlanır. Kanı yaymada kullanılan lâm veya lâmel, kan ihtiva eden lâm ile 45 derecelik açı yapacak şekilde eğik tutulur. Hazırlanan kan frotisinin ince ve homojen olması gereklidir.
- İdrar örneğinden preparat hazırlamak için önce idrar örneği santrifüj edilir ve dipteki tortudan preparat hazırlanır

MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI

- Boyama için preparat hazırlanması



<https://veteriankey.com/laboratory-techniques/>

MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI

- Preparatlar amaca ve usulüne göre hazırlandıktan sonra yapılacak ikinci işlem, bunların **kurutulmasıdır**.
- Preparatların genellikle, havagazı alevinin üstünde ve döndürülerek (dairesele ve yatay) çabuk kurumaları sağlanır. Lâmb, alevinin üstünde ve yanmayacak bir yükseklikte pensle veya parmaklarla tutularak kurutulur.
- Kurutma işlemi, ayrıca, preparatlar oda veya etüv ısısında bırakılmak suretiyle de yapılabilir.
- Kurutma işlemi sırasında, lâmb üzerinde bulunan mikroplar hafifce lâmba yapışırlar. Ancak, su ile yıkandıklarında düşebilirler.

MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI

- Preparatlar kurutulduktan sonra tespit edilirler.
- Bunun birçok yararları bulunmaktadır;
 - 1- Mikroorganizmalar, genellikle, ölürler,
 - 2- Mikroplar lâma yapışırlar,
 - 3- Mikropların protoplasmaları koagule olur ve
 - 4-Sütrüktürleri muhafaza edilir. Ancak, fazla ısıda mikropların şekillerinde bozukluklar gözlenebilir.

MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI

Tespit başlıca iki tarzda yapılır.

1- Fiziksel (termal) tespit: Kurutulan preparat, bir ucundan özel pensle tutularak alevin içinden 3 defa geçirilerek tespit edilir. Tespit sırasında preparatın yanmamasına dikkat edilir. Yanmış preparatlarda mikroorganizmalar dağılmış, şişmiş ve deforme olmuş bir şekilde görülürler. **2- Kimyasal tespit:** Kan ve dokulardan yapılan preparatlar kimyasal maddeler (metil alkol, alkol-eter, alkol-aseton, etil alkol, vs.) yardımı ile tespit edilirler. Metil alkol ile 3-4 veya etil alkol de 10 dakika süre ile tespit yapıldıktan sonra fiksatifler dökülür ve preparat çok hafif akan suda yıkanır.

- Böylece preparatlar boyanmak için hazır hale gelmiştir. Amaca göre basit, kompleks veya özel boyama yöntemleri kullanılır.

MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI

- Boyama için preparat hazırlanması
- Kültürden preparat hazırlanması

Katı besiyerinden preparat hazırlama

1. Öncelikle temiz bir lam alınır, önlüğün iç yüzü ile lam silinir.
2. Lamın altı bir kalemle çizilerek lamın yönü belirlenir ve lamın altında bir halka çizilerek örneğin konulacağı yer belirlenir
3. Alttan halka şeklinde çizilen yere bir öze dolusu steril fizyolojik tuzlu su (FTS) konulur.
4. Şüpheli bakteri kolonisinden öze ile alınır ve lam üzerine konulan FTS de homojen hale getirilir.
5. Kurutulur, tespit edilir, boyanır, kurutma kağıdında kurutulduktan sonra 1 damla immersion yağı damlatıldıktan sonra 100X objektifte diyafram sonuna kadar açılarak incelenir

MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN PREPARAT HAZIRLANMASI

- Boyama için preparat hazırlanması
- Kültürden preparat hazırlanması

Sıvı kültürden preparat hazırlama

1. Öncelikle temiz bir lam alınır, önlüğün iç yüzü ile silinir.
2. Lamın altı bir kalemle çizilerek lamın yönü belirlenir ve lamın altında bir halka çizilerek örneğin konulacağı yer belirlenir
3. Alttan halka şeklinde çizilen yere çalkalanarak homojen hale getirilen sıvı kültürden bir öze dolusu alınıp konulur ve dairesel olarak yayılır.
4. Kurutulur, tespit edilir, boyanır, kurutma kağıdında kurutulduktan sonra 1 damla immersion yağı damlatılır ve 100X objektifte diyafram sonuna kadar açılarak incelenir

Boyalar ve Boyama Metotları

- Bakterinin yapısı, içinde üredikleri ortamdan, çok az bir refraktif indeksle ayrıldığından, laboratuvarlarda genel amaçlar için kullanılan ışık mikroskoplarıyla iyi görülmeleri zordur.
- Bu semitransparent yapı, ancak boyanarak ve bulundukları yerle olan kontrastları artırılarak daha belirgin hale getirilebilirler.
- Mikroorganizmalar boyandıktan sonra, mikroskopta kolay görülebildikleri gibi, büyüklük, şekil, spor, kapsül, internal sütrüktürleri hakkında da gerekli bilgiler elde edilebilir.
- Ayrıca, boyanma özelliklerine göre de bazı mikroorganizmalar (mikobakteriler gibi) identifiye edilebilirler. Bu nedenle, mikroorganizmaları tanımda, boyama çok önemli role sahiptir. Bunun için çok özel boyama yöntemleri ortaya konulmuştur.

Boyalar ve Boyama Metotları

- Günümüzde, mikrobiyoloji alanında doğal boyalar (karmin, orsein, indigo, kınakına, v.s) çok az kullanılmasına karşın, sentetik boyalardan çok daha fazla yararlanılmaktadır.
- İlk sentetik boya, anilinden elde edildiği için bütün sentetik boyalara anilin boyaları adı verilmiştir. Ancak, bunların çoğu anilinden elde edilmediği gibi, anilinle de ilişkili değildirler.

Boyalar ve Boyama Metotları

- Boyalar, boya molekülünün elektrik yüklerine göre, asit, bazik ve nötr olarak üç bölüme ayrılır;

- **Asit Boyalar**

İyonize oldukları zaman, molekülün porsiyonu negatif elektrikle yüklenir. Bunlar da renkli asitlerin tuzlarıdır (genellikle, sodyum tuzu). Bazen potasyum, kalsiyum veya amonyum tuzları olabilir. **Asit boyalar arasında, asit fuchsin, safranin, asit pikrik, eosin, v.s bulunmaktadır.**

- **Bazik Boyalar**

İyonize oldukları zaman, molekülün boya kısmı pozitif elektrikle yüklenir. Bunlar da renkli bazların tuzlarıdır (genellikle, klorid benzen sulfat, okzalat ve asetat). **Bazik boyalardan, metilen mavisi, Jansiyana violet, bazik fuchsin çok kullanılır.**

Boyalar ve Boyama Metotları

- Nötr Boyalar

Asit ve baz boyaların uygun oranda karışımlarından elde edilir (Giemsa, Wright, Leishman vs).

Bakterilerde asit yapıda olan organizasyonları (özellikle, nükleer sistemi) ve molekülleri boyamada bazik boyalardan fazla yararlanılır. Asit boyalar da sitoplasmayı boyamada kullanılır.

Hücre içinde bulunan asit ve bazik karakterdeki yapıların, bazik veya asit boyalarla birleşme yetenekleri bulunmaktadır. Böylece boyanma, asit ve bazik sükrüktürlerle oluşan karşılıklı kimyasal ilişkilere dayanmaktadır.

Boyalar ve Boyama Metotları

Mikrobiyolojide kullanılan boyama yöntemlerini başlıca 2 gruba ayırmak mümkündür.

1. Basit boyamalar: Bu tarz boyamada, preparatlardaki mikroorganizmalar hakkında kısa süre içinde bilgi edinmek için **tek boya solusyonu** kullanılır. Boya, preparata bir defa uygulanır ve bakteriler boyaların karakterine göre boyanırlar. **Bu amaçla karbol fuchsin, kristal violet ve metilen mavisi gibi genellikle bazik boya solusyonlarından birisi seçilir.**

2. Bileşik boyamalar: **Birden fazla boyanın iştiraki** ile yapılan boyama yöntemleridir. Bunlar arasında:

a) Diferensiyel boyamalar: Mikroorganizmaları birbirinden ayırmada kullanılır (**Gram, Ziehl-Neelsen**).

b) Sütrüktürel boyamalar: Bakterilerin iç ve dış yapıları hakkında bilgi edinmek için kullanılan bileşik boyama yöntemleridir (**spor, kapsül, flagella, çekirdek, lipid, v.s.**).

Boyalar ve Boyama Metotları

Basit Boyama Yöntemleri

- **Karbol Fuchsin ile Boyama:** preparat üzerine karbol fuchsin solusyonu konur ve **5-10 saniye** boyama için bırakıldıktan sonra, boya dökülür ve hafif akan su ile yıkanır. Kurutma kağıdı ile (veya havada) kurutulduktan sonra, üzerine sedir (immerison) yağı konarak 100X objektifi ile bakılır. Mikroorganizmalar **kırmızı** renkte görülürler.
- **Kristal Violet ile Boyama:** Hazırlanan preparat üzerine boya solusyonundan (kristal violet) konarak **20-30 saniye** kadar bekletilir. Sürenin sonunda boya dökülür, preparat su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroorganizmalar **mor** renkte görülürler.

Boyalar ve Boyama Metotları

Basit Boyama Yöntemleri

- **Metilen Mavisi ile Boyama:** Bu amaçla Löffler metilen mavisi solusyonu kullanılır. Preparat üzerine boya solusyonu konarak 5-8 dakika bekletilir. Boya dökülür, yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroplar mavi renkte görülürler.
- **Negatif Boyama:** Bu tür boyama yönteminde mikroorganizmalar değil, saha boyanır. Karanlık olan sahada mikroplar renksiz veya parlak olarak görülürler. Bu amaç için nigrosin veya çin mürekkebi kullanılır. Lam üzerine bir damla boya ve sonra bir damla kültür konarak yayılır ve ince bir froti hazırlanır. Kuruduktan sonra muayene edilir. Bu yöntemden kapsül ve spiroketleri görmek için yararlanılır.

Boyalar ve Boyama Metotları

Bileşik Boyamalar

- Gram Boyama Tekniği

- a) Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir
- b) Kristal violet (veya metil violet) solusyonu ile 2-3 dakika boyanır.
- c) Boya dökülür ve preparat üzerine lugol solusyonu konarak 1-2 dakika beklenir. Lugol solusyonu dökülür.
- d) Absolut alkolde dekolere edilir (alkol renksiz akıncaya dek).
- e) Su ile yıkanır.
- f) Safranin (veya eosin, sulu fuchsin) ile 5-10 saniye boyanır.
- g) Su ile yıkanarak boya giderilir.
- h) Kurutma kağıdında (veya havada) kurutulur.
- i) Sedir yağı konarak immersiyon objektifi ile muayene edilir. Bu yöntemle mor görülen mikroorganizmalar Gram pozitif ve pembe görülenler de Gram negatif olarak değerlendirilirler.

Boyalar ve Boyama Metotları

- Gram Boyama Tekniğı

Gram pozitiflik ve negatiflik üzerine birçok görüşler ileri sürülmüştür.

1. Gram pozitif mikroorganizmalar, negatiflerden daha düşük pH limitlerine sahiptirler. Bu nedenle de bazik boyalara karşı affiniteleri fazladır.

a) Asit boya ile Gram pozitif görülen mikroplar, boyanın alkalinitesi artırılırsa Gram negatif olabilirler.

b) Bazik boya ile Gram pozitif görülen mikroplar, boyanın asiditesi artırılırsa Gram negatif olabilirler.

2. Gram pozitiflerden elde edilen lipoidal maddelerin özelliğı, Gram negatiflerinkinden farklıdır. Birincide sature olmamış yağ asitleri daha fazladır ve aynı zamanda oksidan maddelere olan ilişkisi de yüksektir. Kullanılan mordanların oksidan olması, bazik boyalara karşı affiniteyi artırır.

3. Gram pozitif mikropların hücre duvarı peptidoglikan yapısında olup miktarca çok fazladır. Bu strüktür Gram negatiflerde ise çok azdır. Bu tabakanın giderilmesi, Gram pozitif mikropları, Gram negatif hale sokar. Gram pozitiflerde aynı zamanda Magnesium ribonukleate'da fazla bulunur. Bu madde negatiflerde yoktur.

4. Alkolle dekolorasyonun gereğinden fazla yapılması Gram negatifliğe eğilimi artırır.

5. Gram pozitiflerde hücre duvarında **teikoik asit** vardır

Boyalar ve Boyama Metotları

- Asidorezistans Etkenleri Boyama Tekniği

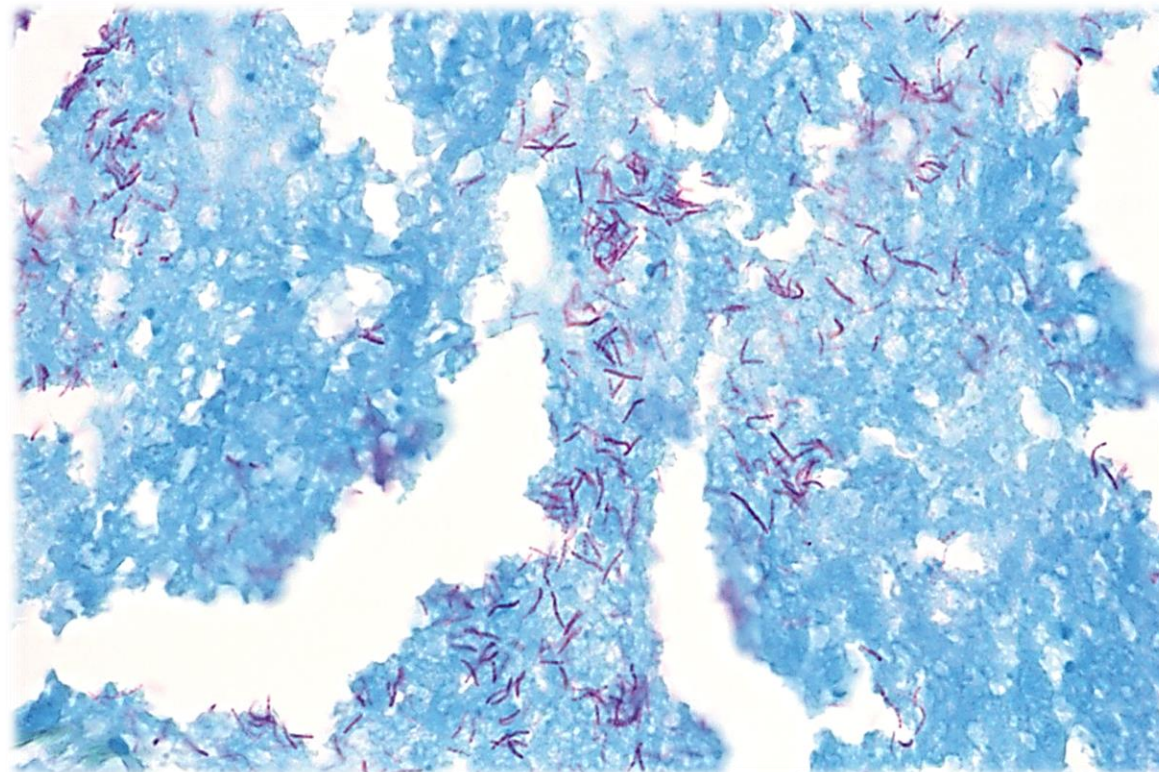
Tuberküloz etkenleri boyamak için önceleri kullanılan Ehrlich (1882) metodu sonradan Ziehl-Neelsen tarafından değiştirilmiştir. Mikroorganizmaların etrafında balmumu tabakasının bulunması, bunların normal boyama yöntemleri ile boyama olanağını ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle boya içine fenol konur ve alttan hafifçe ısıtılarak balmumu tabakası yumuşatılır. Böylece boyayı kolayca alan balmumu tabakası, asit-alkolde dekolore olmaz ve boyayı bırakmaz.

Boyalar ve Boyama Metotları

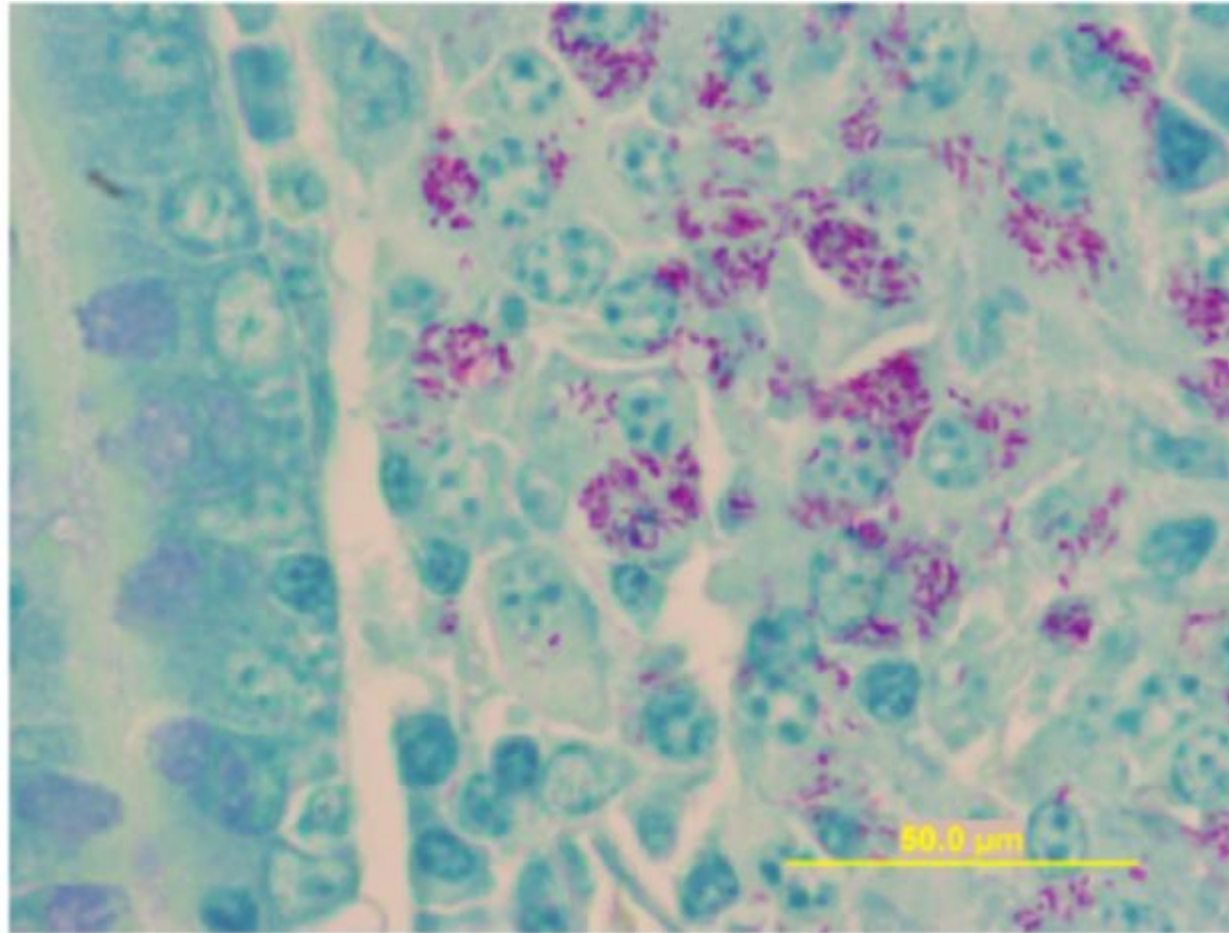
- Asidorezistans Etkenleri Boyama Tekniği

Ehrlich-Ziehl - Neelsen (EZN) Mikobakterileri boyama yöntemi

- a) Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.
- b) Lam üzerine ve bütün lâmi kaplayacak tarzda karbol fuchsın solusyonu konur.
- c) Preparat alttan 4-5 dakika ve aralıklı olarak hafifçe ısıtılır. Preparatın yanmamasına ve kabarcıkların çıkmamasına dikkat edilir (preparat üzerinden hafif buharlar çıkabilir).
- d).Boya dökülür ve preparat asit-alkolde (% 95 alkol + % 3 HCl asit) dekolore edilir.
- e) Su ile yıkanır.
- f) Preparat üzerine metilen mavisi solusyonu konur ve 10-15 saniye boyanır.
- g) Boya dökülür ve su ile yıkanır.
- h) Kurutulur ve immersiyonla muayene edilir. Mikobakteriler veya asidorezistens mikroorganizmalar pembe kırmızı renkte ve diğ er mikroplar ise mavi renkte görülürler.



<https://www.biognost.com/product/tb-stain-histo-kit/>



Fecteau, M., Ross, J., Tennent-Brown, B.S., Habecker, P.L., Sreevatsan, S., Sweeney, R.W., & Whitlock, R.H. (2009). *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* High Shedding in an Adult Female Alpaca, and its Implications for the Rest of the Herd. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 1311 - 1314.

Boyalar ve Boyama Metotları

- Modifiye Ziehl - Neelsen yöntemi (Stamp boyaması)

brucella ve chlamydia etkenlerini boyamada da kullanılabilir.

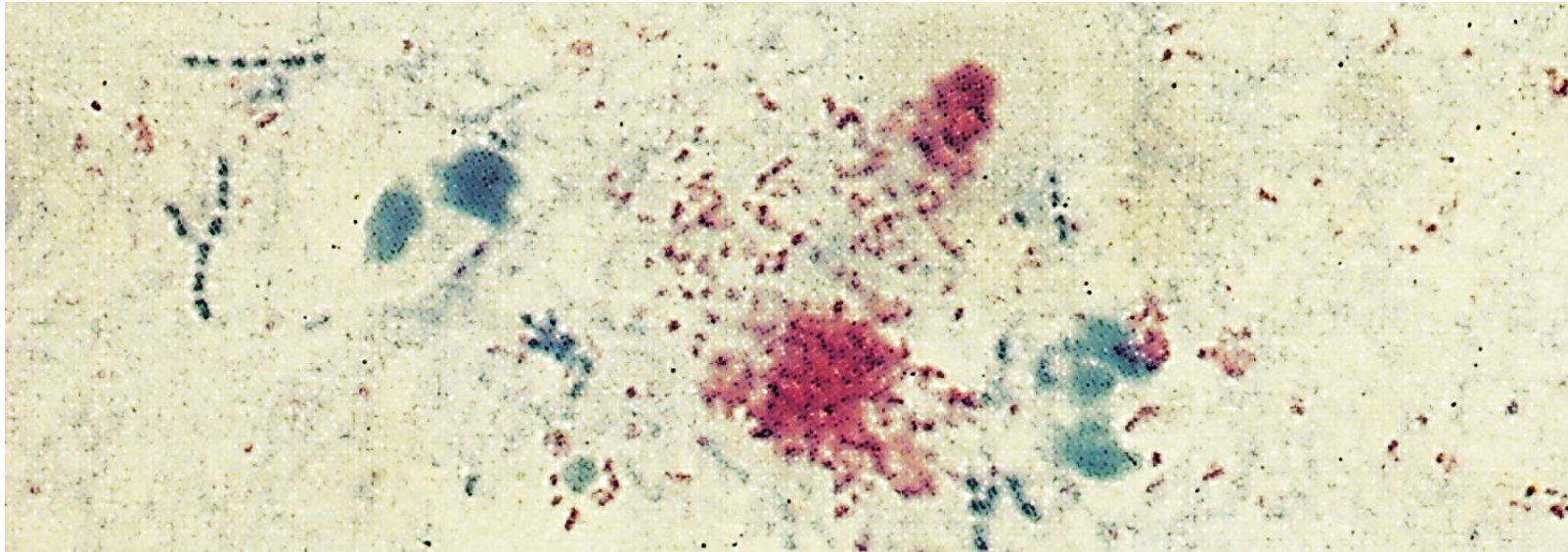
a) Preparat hazırlanır, kurutulur ve tespit edilir.

b) Karbol fuchsin (1/10) ile 10 dakika boyanır.

c) Asetik asit (% 0.5) ile yıkanarak boya giderilir.

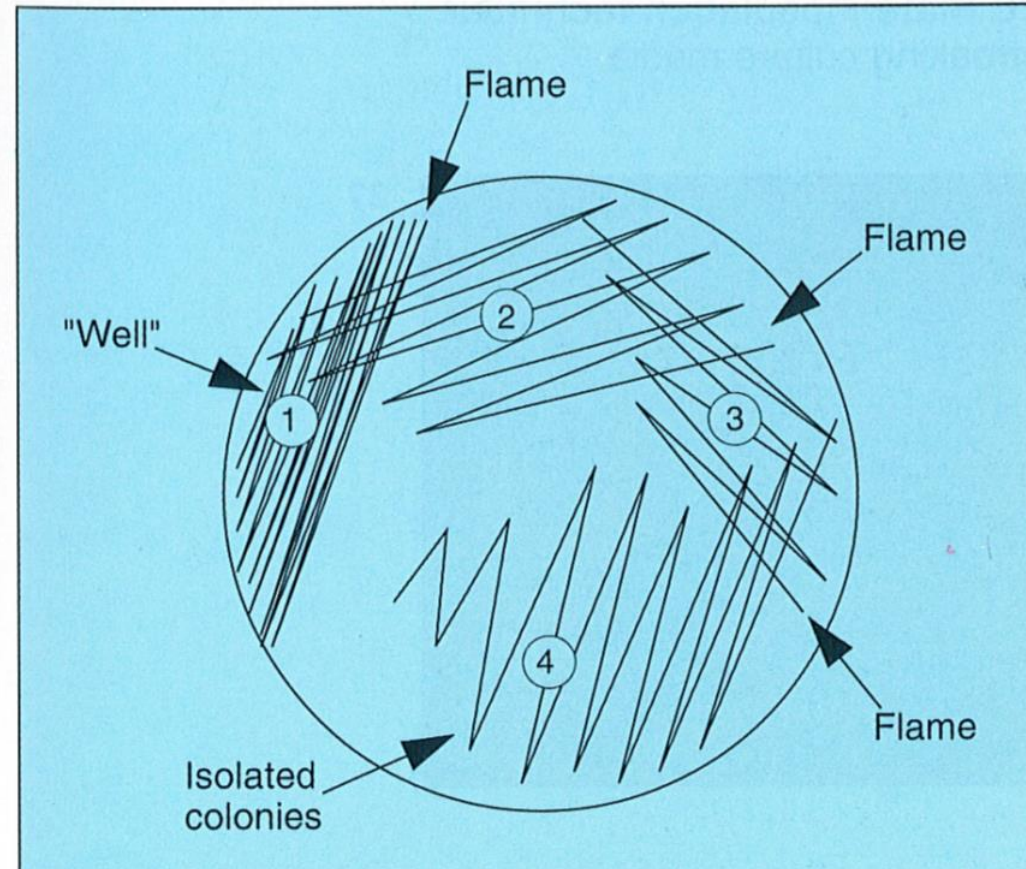
d) Su ile yıkanır.

e) Malaşit yeşili (% 1) veya metilen mavisi ile birkaç saniye boyanır. Brusella, Klamidia'lar kırmızı renkte ve noktacıklar halinde (tek tek veya kümeler) görülür.



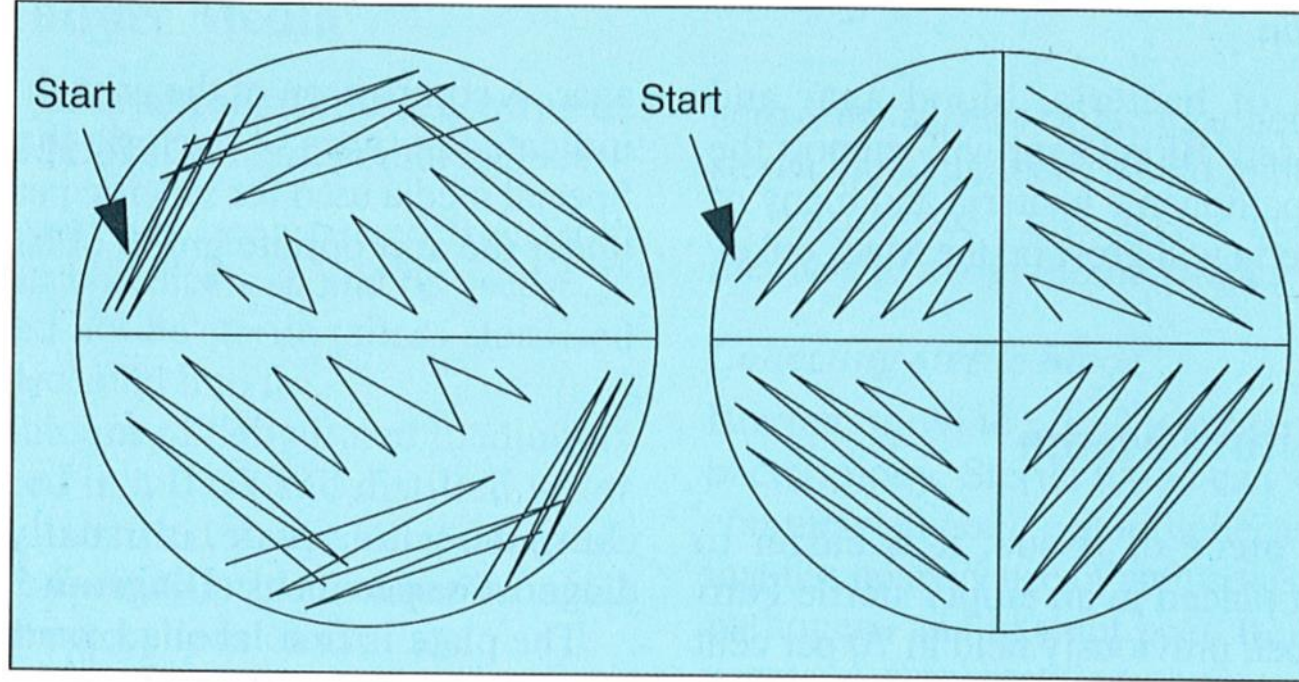
<https://www.anipedia.org/resources/bovine-brucellosis/922>

Ekim Teknikleri



Quinn P. J. et al., 1999

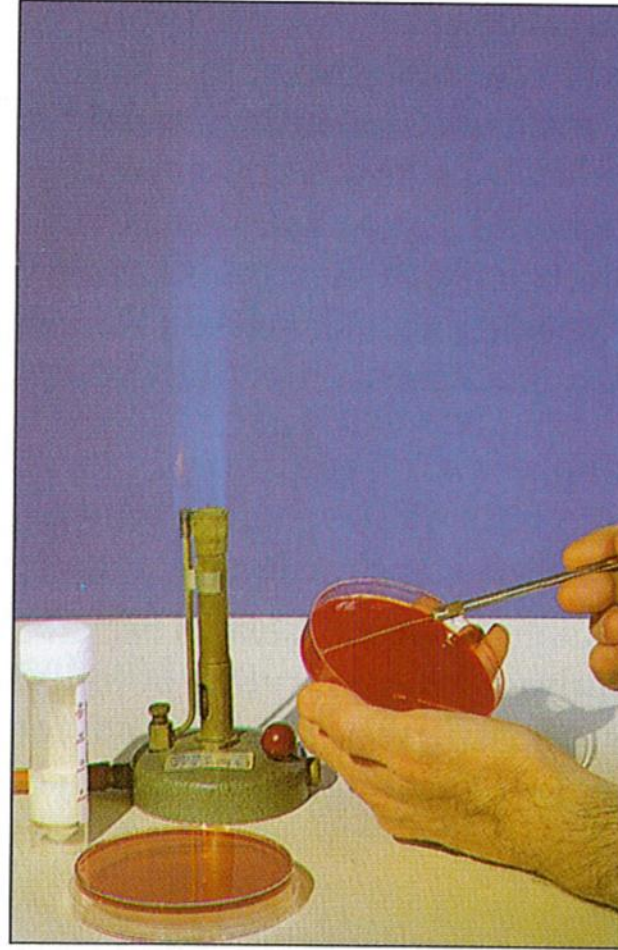
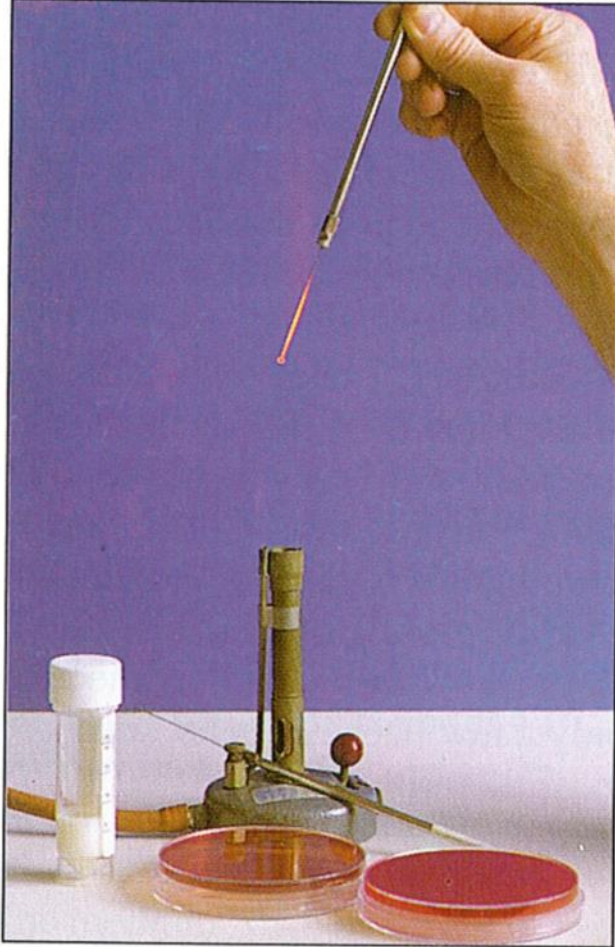
Ekim Teknikleri



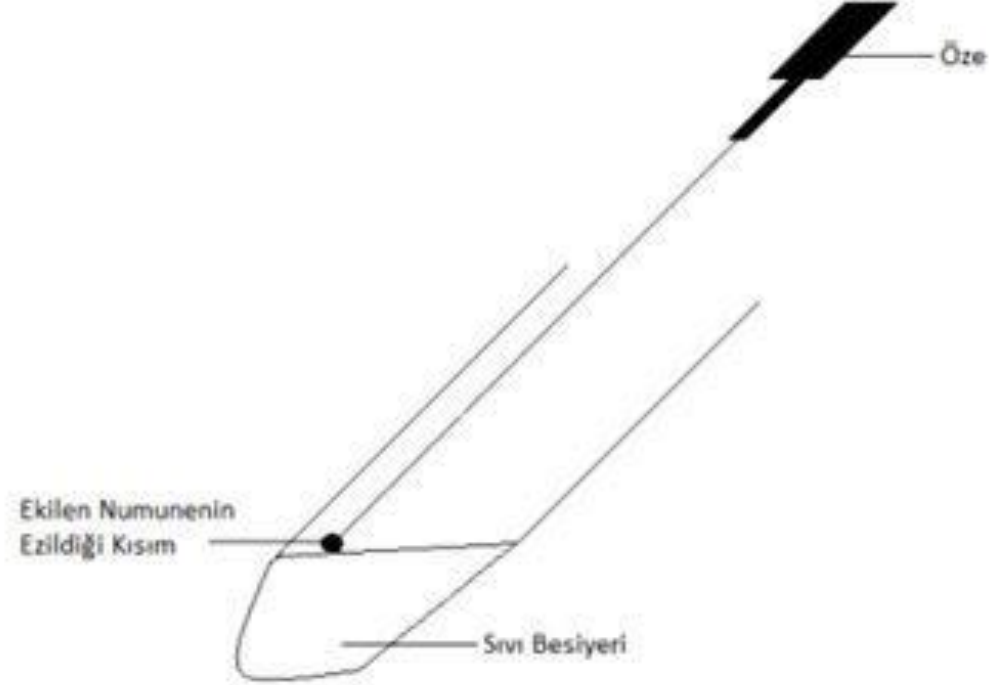
Quinn P. J. et al., 1999

Ekim Teknikleri

5



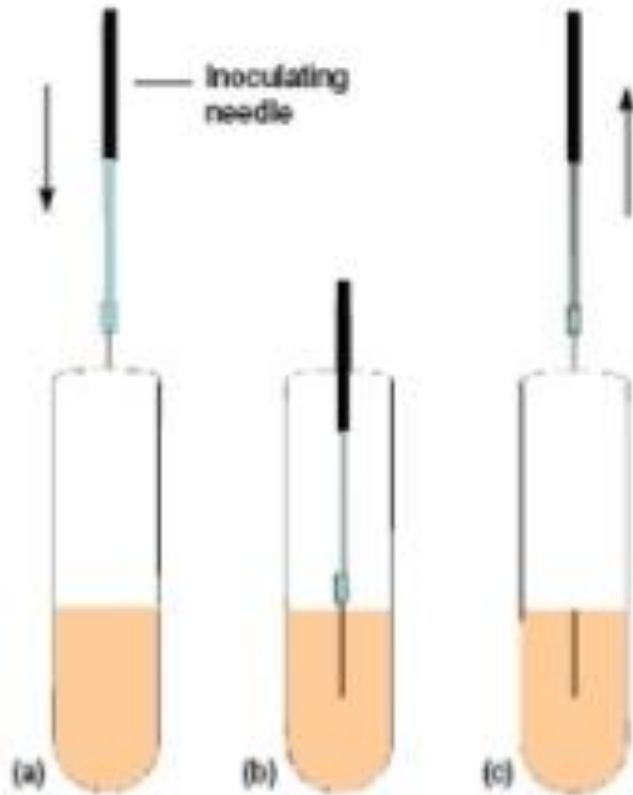
Quinn P. J. et al., 1999



Katı Besi Ortamından Sıvı Besi Ortamına Ekim

<https://labakademi.com/mikroorganizmalarin-ekim-yontemleri/>

Yarı katı besi yerine ekim

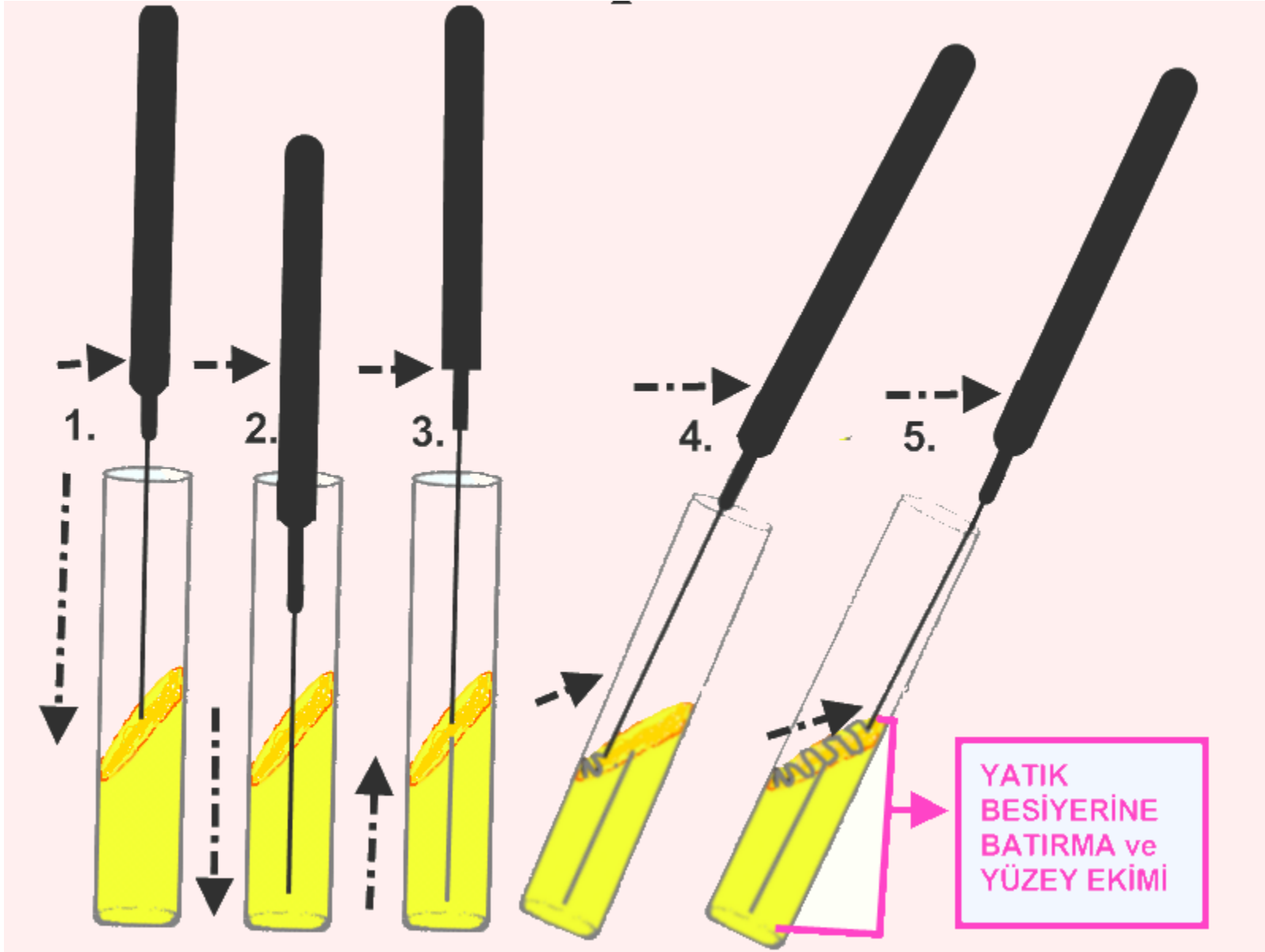


<https://www.slideshare.net/NhutTran8/2015-mibi-labmanual>

Microbiology Laboratory manual

Prepared by: Dr. Ha Mai Dung, Tong Thi Hung

Revised by: Dr. Nguyen Thi Thu Hoai



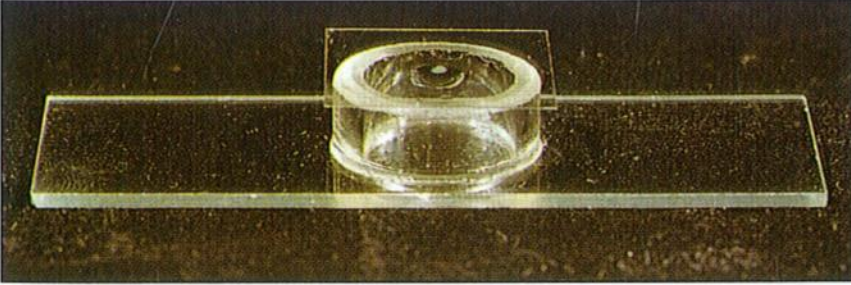
<https://docplayer.biz.tr/15674648-T-c-mglli-eggtgm-bakanligi-laboratuvar-kati-besgyergne-ekgm-725ttt102.html>

Hareket muayenesi

1. Lam-lamel arası muayene
2. Asılı damla tekniği
3. Yarı katı ortamda üretme
4. Flagella boyama
5. Elektron mikroskopla boyama
6. Antiflagellar serumla yapılan test

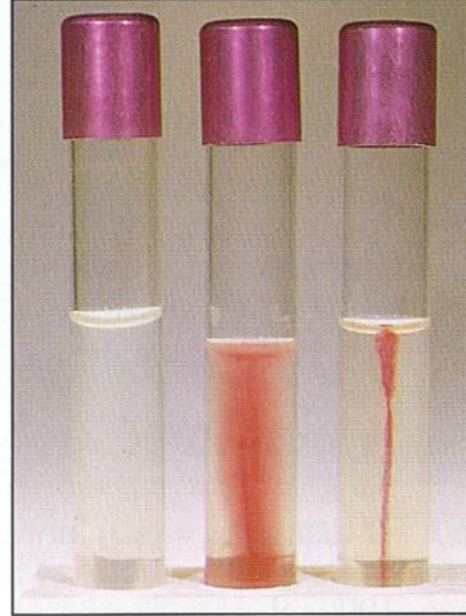
Hareket Muayenesi

37

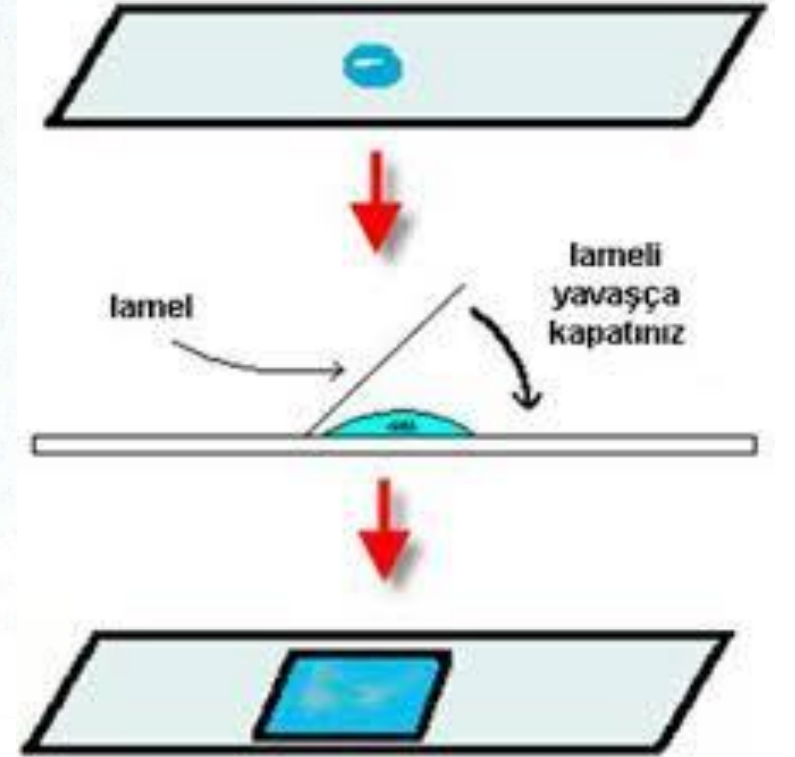


37 The hanging-drop method for detection of motility.

38 Motility medium (semi-solid) with TTC indicator; from left, uninoculated, motile and non-motile bacteria.



38

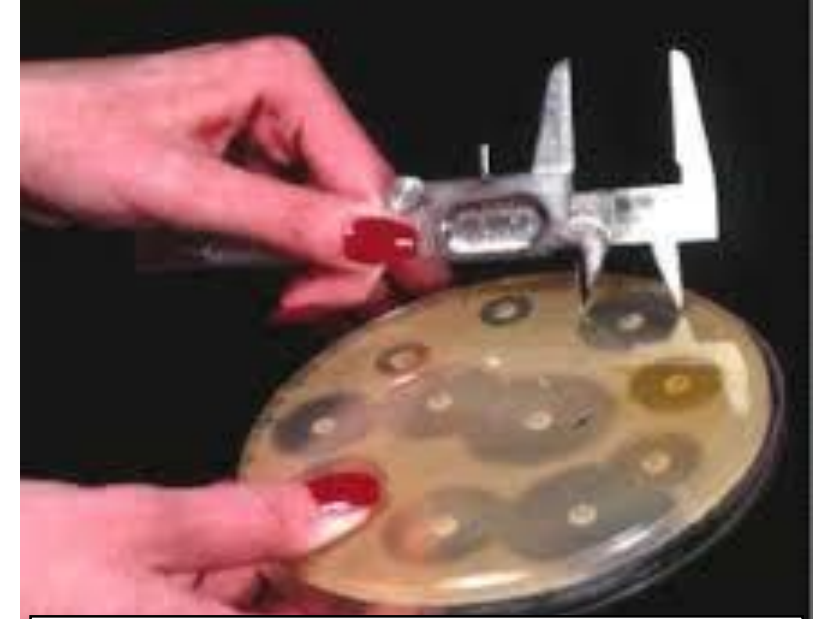
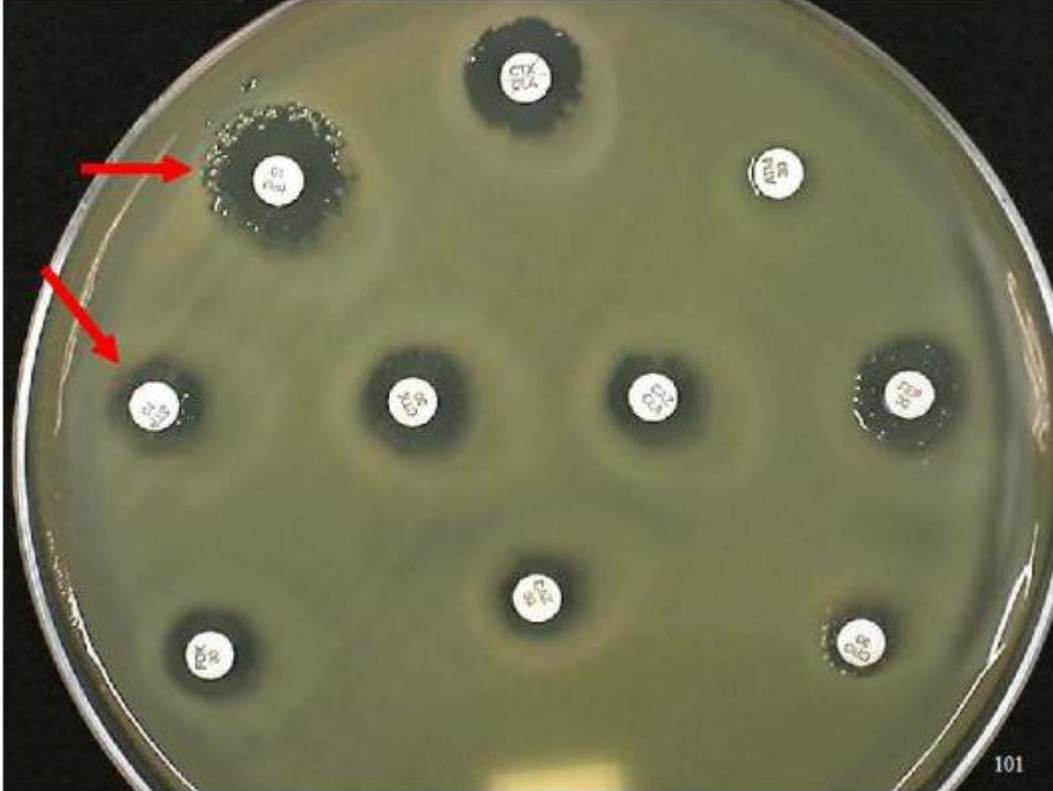


Quinn P. J. et al., 1999

<https://microbiologylaboratoryturkey.blogspot.com/2019/02/lam-lamel-aras-preparat-hazrlama-lam.html>

İzolasyon ve identifikasyonu yapılan bakteriyel etkenin antibiyotik duyarlılığı *in-vitro* yöntemler ile test edilir
Rutinde sıklıkla disk difüzyon yöntemi kullanılır

Disk difüzyon Yöntemi

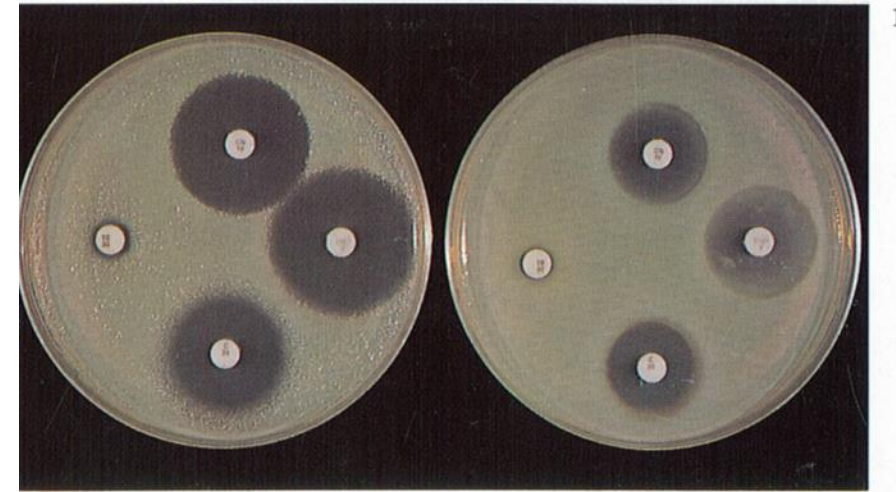
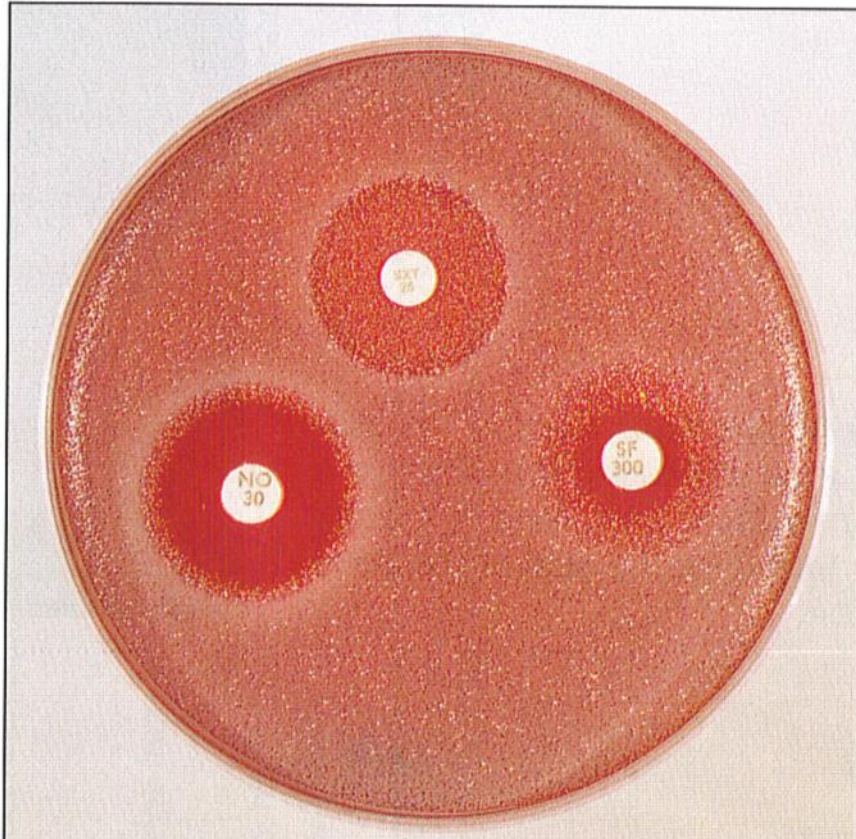


http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Anti_mikrobiyal%20Madde%20Testleri.pdf

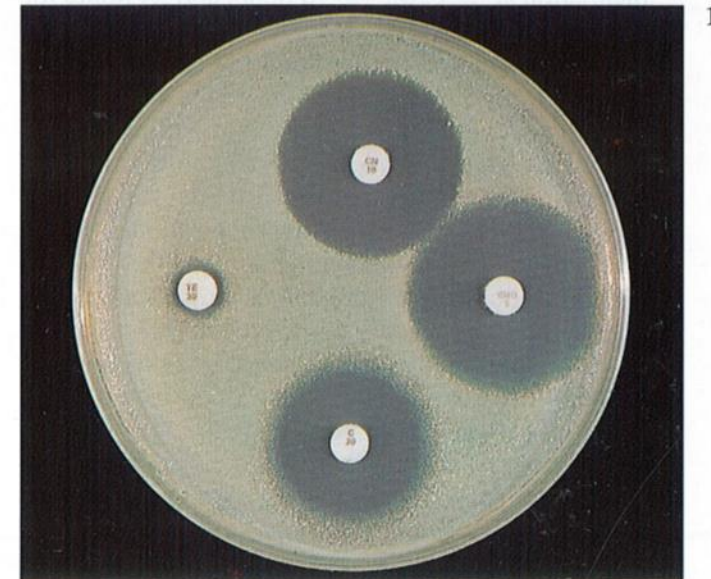


<https://azkurs.org/antimikrobiyal-maddeler-antibiyotik.html>

Antibiyogram testi Disk diffüzyon testi



ted against
amphenicol
in inoculum



7



Quinn P. J. et al., 1999

Örnek tablo

Tablo 1. Çalışmada Test Edilen Antibiyotiklerin Disk İçeriği ile CLSI (2014) ve EUCAST (2014) Sınır Değerleri

Sıra no	CLSI'a göre bildirim grubu	Antibiyotik disk adı	CLSI ve EUCAST disk içeriği (µg)	CLSI-2014			EUCAST-2014	
				Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
1	A	Ampisilin	10	≥ 17	14-16	≤ 13	≥ 14	< 14
2	A	Gentamisin	10	≥ 15	13-14	≤ 12	≥ 17	< 14
3	B	Amikasin	30	≥ 17	15-16	≤ 13	≥ 16	< 13
4	B	Ampisilin-sulbaktam	10/10	≥ 15	12-14	≤ 11	≥ 14	< 14
5	B	Sefuroksim aksetil	30	≥ 23	15-22	≤ 14	≥ 18	< 18
6	B	Siprofloksasin	5	≥ 21	16-20	≤ 15	≥ 22	< 19
7	B	Levofloksasin	5	≥ 17	14-16	≤ 13	≥ 22	< 19
8	B	İmipenem	10	≥ 23	20-22	≤ 19	≥ 22	< 16
9	B	Trimetoprim-sülfametoksazol	1.25/23.75	≥ 16	11-15	≤ 10	≥ 16	< 13

Süzük, S., Kaşkatepe, B., Avcıküçük, H., Aksaray, S., & Başustaoğlu, A. (2015). CLSI'dan EUCAST'e geçişte üriner sistem enfeksiyonu etkeni *Escherichia coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının karşılaştırılması. Mikrobiyol Bül, 49(4), 494-501.

Hayvan Sahibinin Adı Soyadı:
Adresi:
Kayıt No:
Laboratuvara Gelen Numune:
İzolasyon ve İdentifikasyon Sonucu:

Antibiogram Test	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
P Penisillin G			
S Streptomycin			
AML Amoxycillin			
AMC Amoxycillin+Clavulanic Acid			
SAM Ampicillin+Sulbactam			
AMP Ampicillin			
OB Cloxacillin			
E Erythromycin			
G Gentamicin			
N Neomycin			
R Rifamycin			
L Linecomycin			
DAN Danofloxacin			
CIP Ciprofloxacin			
ENR Enrofloxacin			
EFT Cefotiofur			
CEF Cefoperazone			
CXM Cefuroxime			
T Tetracycline			
OT Oxytetracycline			
DO Doxycycline			
SXT Trimetoprim/Sulfamethoxazole			
TY Tylosin			
TIL Tilmicosin			
FFC Florfenicol			
TOB Tobramycin			
MET Methicillin			

Bakterilerde izolasyon ve identifikasyon

Aşamalar:

A-İZOLASYON

1- bakteriyoskopi

2- kültür yapma

B-İDENTİFİKASYON

1-Bakterilerin mikroskopik özellikleri

2-Bakterilerin koloni morfolojileri ve kültürel özellikleri

a-Katı ortamda koloni morfolojileri

b- Sıvı ortamda üreme özellikleri

c- Fizyolojik özellikleri

d- Metabolik özellikleri

e-Biyokimyasal özellikleri

f- Bakteriyofajlara duyarlılık

g- antibiyotiklere duyarlılık

h- patojenite ve toksijenite

3- Genetik ve Biyoteknolojik Özellikleri

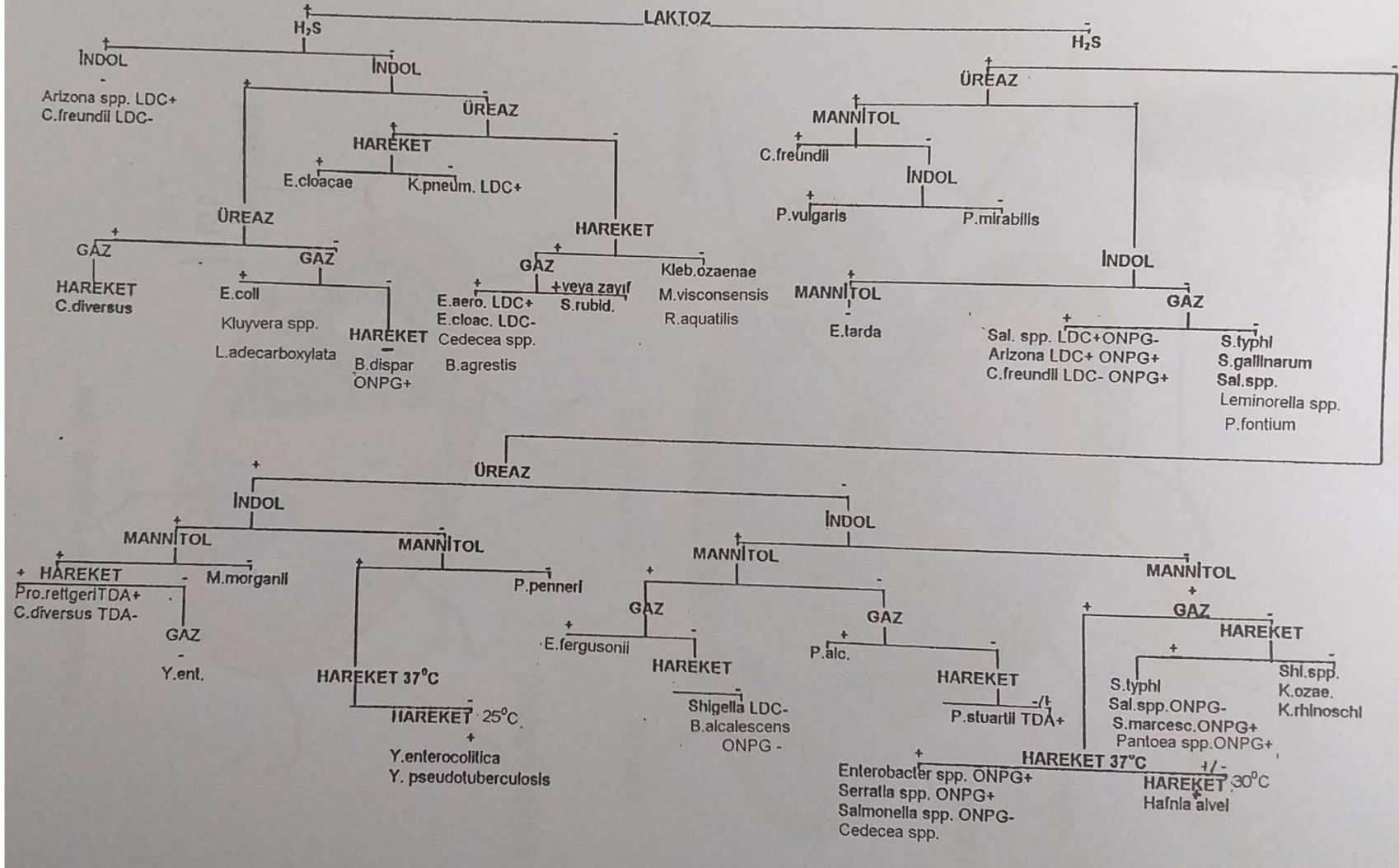
a- Genetik özellikleri

b-Biyoteknolojik Yöntemler

4- Serolojik Özellikleri

-serotiplendirme

ENTEROBACTERiaceae'LERİN İDENTİFİKASYON ŞEMASI



Kaynak:

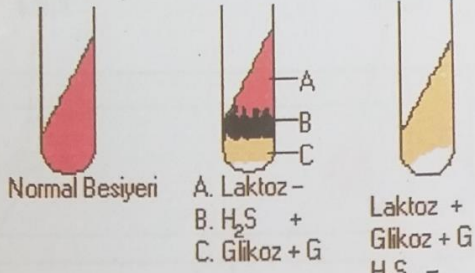
Bekar M. Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmaların genel karakterleri ve tanı yöntemleri. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Etlik-Ankara. Yayın No:97-1.

ÜÇLÜ TÜP BESİYERLERİNDE GÖZLENEBİLEN BİYOKİMYA KARAKTERLERİ

I. Tüp (Glikoz-Laktoz-H₂S Besiyeri)

-Besiyeri Katı-

Şekil II



Normal Besiyeri

A. Laktoz -

B. H₂S +

C. Glikoz + G

Laktoz +

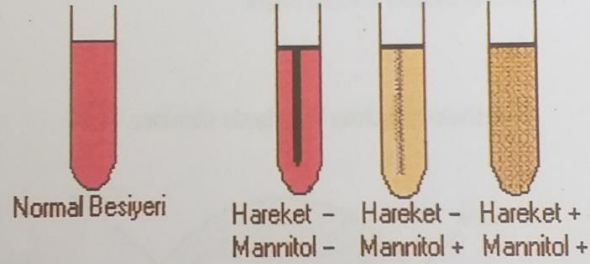
Glikoz + G

H₂S -

II. Tüp (Mannitol-Mobilite Besiyeri)

-Besiyeri Yarıkatı-

Şekil III



Normal Besiyeri

Hareket -

Mannitol -

Hareket -

Mannitol +

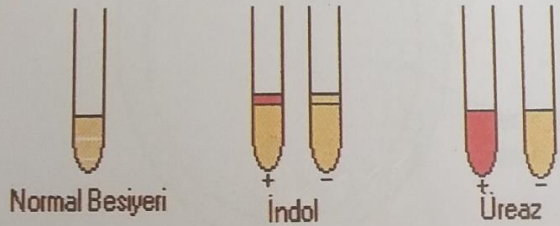
Hareket +

Mannitol +

III. Tüp (Üre-İndol Besiyeri)

-Besiyeri sıvı-

Şekil IV



Normal Besiyeri

İndol +

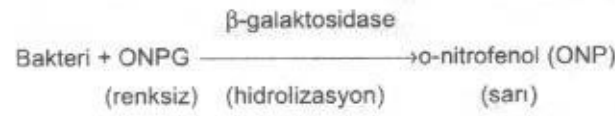
Üreaz +

Kaynak:

Bekar M. Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmaların genel karakterleri ve tanı yöntemleri. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Etlik-Ankara. Yayın No:97-1.

- **ONPG TESTİ:**

- Bu test, o-nitrophenyl - beta-D-galactoside'in (ONPG) ayrışmasını katalize eden beta-galaktosidase enziminin varlığının belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Beta galaktosidase ortamda bulunan basit galoktozid'leri (laktoz dahil) ayrıştıran ve indüklenabilen intrasellüler bir enzimdir.
- Bakterilerin, laktozu fermentasyon kabiliyeti, ortamda bulunan ONPG 'nin ayrışması için gerekli olan beta-galaktosidase enziminin varlığına bağlıdır. Eğer besiyerinde galaktosidase pozitif bir bakteri varsa, renksiz olan ONPG hidrolize edilerek, sarı kromojenik bir madde olan O-nitrofenol (ONP) serbest kalır. Pozitif reaksiyon da bu maddenin tespiti üzerine dayanır. Serbest kalan o-nitrofenol, alkali bir solusyonda bulunursa, tautometrik değişmelere maruz kalarak sarı renk meydana getirir.



Bu reaksiyon, özellikle, laktozu geç parçalayan veya şüpheli reaksiyon veren mikroorganizmalara kesinlik kazandırmada işe yarar. Böyle bakterilerin çoğu β -galaktosidase pozitif reaksiyon vermektedirler. Pozitif reaksiyon laktozun fermente olduğunu gösterir.

Materyal

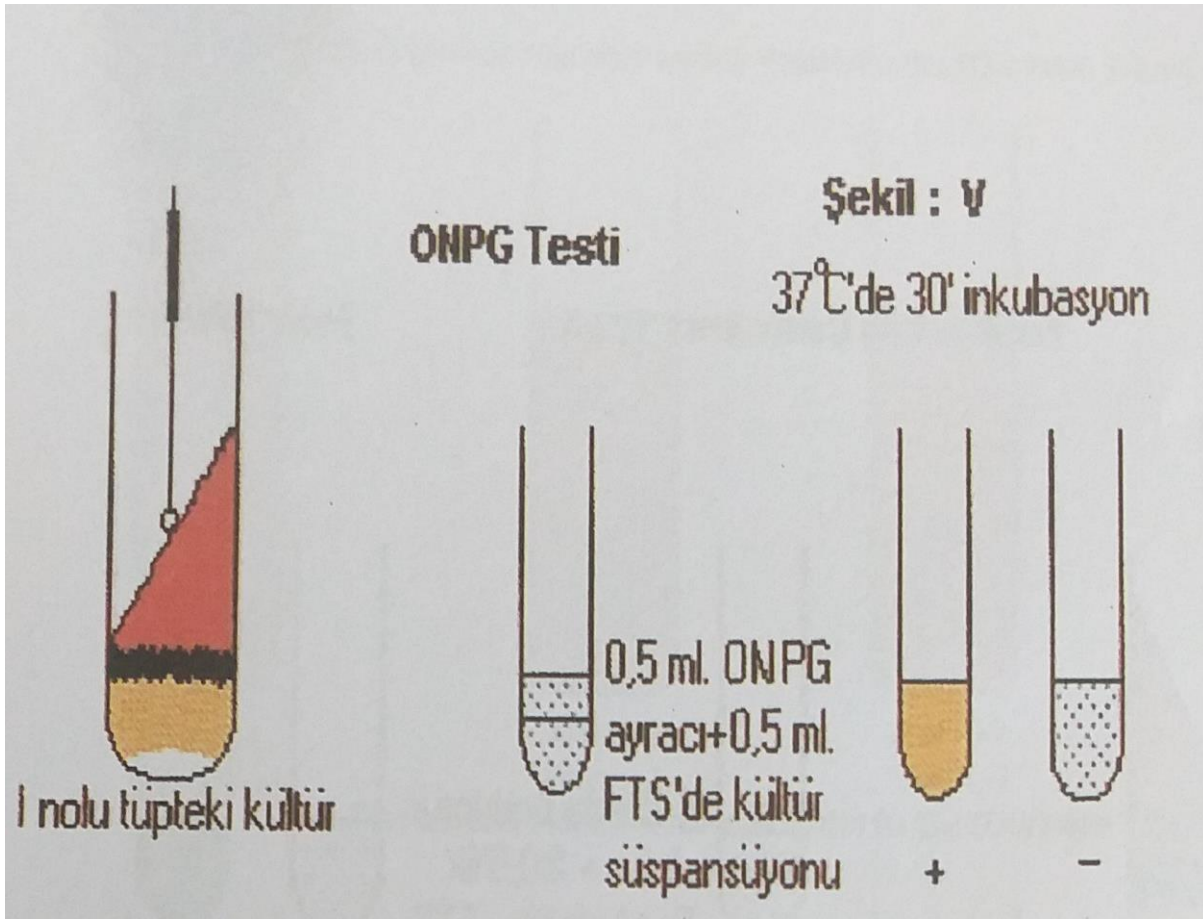
- 1) İçinde ONPG bulunan 5 ml miktarında sıvı besiyeri.
- 2) Muayene edilecek mikroorganizmaların saf ve taze sıvı kültürleri.
- 3) Kontrol pozitif (E. coli) ve negatif (P. morganii) suşların kültürleri

Metot

ONPG brothda mikroorganizmalar bolca ekildikten sonra 37 °C de 18-24 saat inkubasyona bırakılırlar. Sürenin sonunda kültürler santrifuje edilerek üst taraf atılır. Bakteri tortusuna 0.25 ml fizyolojik su ilave edilerek homojen bir suspansiyon yapılır. Buna bir damla toluene konularak iyice çalkalanır. Tüp 37 °C de 5-10 dakika su banyosuna bırakılır. Sonra, buna 0.25 ml ONPG solusyonu katılır ve tekrar su banyosuna 20 dakika ile 24 saat süre ile konulur. Tüplerdeki renk değişimine dikkat edilir. Tüplerde 20 dakika içinde bir değişiklik yoksa inkubasyona devam edilir.

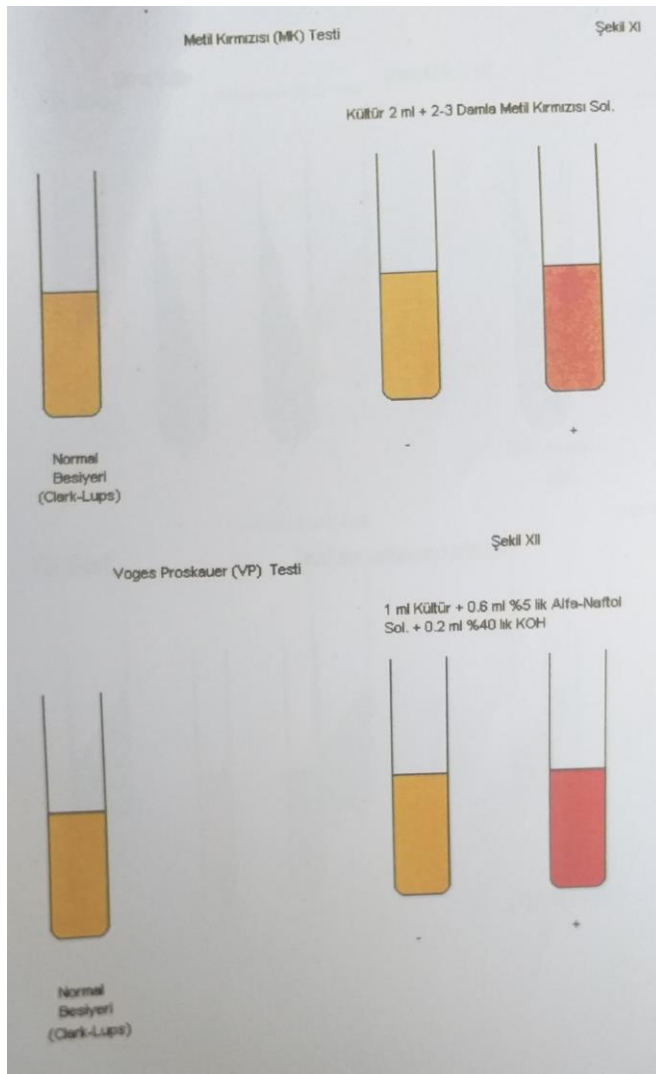
Değerlendirme

Tüplerde sarı rengin meydana gelmesi ONPG nin hidrolize edildiğini (pozitif reaksiyon) ve renksiz olması da negatif reaksiyonu gösterir.



Kaynak:

Bekar M. Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmaların genel karakterleri ve tanı yöntemleri. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Etlik-Ankara. Yayın No:97-1.



Kaynak:

Bekar M. Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmaların genel karakterleri ve tanı yöntemleri. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Etlik-Ankara. Yayın No:97-1.

Voges - Proskauer (VP) Testi

Bu test, bazı mikroorganizmaların glikozu fermente edilerek, nötral bir ürün olan acetylmethylcarbinol'u (acetoin) meydana getirme yeteneğini tayinde kullanılır.

Bakteri türlerini (*K. pneumoniae* (+), *E. coli* (-) belirlemede kullanılır.

Glikoz, önce pirüvik asit'e metabolize olur. Pirüvik asit, glikolizisde en önemli kilit intermedierdir. Pirüvik asidin ayrışması, bakterilerin türlerine göre aerobik veya anaerobik yolla olur. Glikozun fermentasyonu sonu acetoin ve bunun bir nötral redüksiyon ürünü olan 2,3 -butanediol'da ($\text{CH}_3\text{.CHOH.CH}_3$) meydana gelmektedir.

Voges Proskauer testi ile metil red testi, ortamlarının aynı olması nedeniyle birlikte uygulanabilirler. Metil red pozitif olanlarda (organik asit fazla olması nedeniyle), VP reaksiyonu negatif olabilir. Nötral ürünler meydana gelmeyebilir (genel bir kural değil). İlk başlangıçta MR testi pozitif görülebilir. İnkubasyon süresi uzarsa acetoin oluşabilir.

Materyal

- 1) MR/VP besi yeri (Clark-Lubs, pH 6.9,5 ml)
- 2) Mikroorganizmaların saf ve taze kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (*E.cloacae*, *K.pneumoniae*) ve negatif (*E.coli*) suşlarının kültürleri
- 4) O'Meara ayırıcı (veya Barzit VP ayırıcı)
- 5) Ekilmemiş besi yerleri

Metot

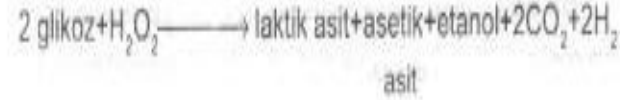
İçinde glikoz bulunan bufferlı besi yerine kültürlerden ekilir ve 37°C de 2-7 gün inkube edilir. Bu sürenin sonunda kültürlerle ve ekilmemiş tüplere ayıraçtan (O'Meara) 1 ml ilave edilerek hafifçe çalkalanır ve su banyosunda (37°C de) 4 saat tutulur. Aralıklı olarak hafifçe çalkalanır.

Değerlendirme

Besiyerinin üstünde 2-5 dakika içinde pembe rengin oluşu, acetoin varlığını ortaya koyduğundan pozitif reaksiyon olarak kabul edilir. Eğer sarı renk meydana gelirse negatif olarak dikkate alınır. O'Meara testi, ortamda oluşan acetoin'e bağlıdır. Bu madde de, oksijenin bulunduğu durumda alkali ortamda okside olur ve diasetil ($\text{CH}_3\text{.CO.CO.CO}_3$) meydana gelir. Bu son madde de, kreatin'le reaksiyona girerek pembe renk meydana getirir.

Metil Kırmızısı Testi

- Bu test, glikozun fermentatif metabolize olması sonu besi yerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılır. Deney, mikroorganizma cinslerinin (*E. coli* +, *Enterobacter aerogenes* -, *E. cloacae* -) ve türleri (*L. monocytogenes* +) ayırmada kullanılır. Metil kırmızısı solusyonu pH 6.0 da sarı renk ve pH 4.4 den aşağıda kırmızı renk gösterir.
- E. coli* tarafından glikozun ayrıştırılması aşağıda gösterilmiştir.



Materyal

- 1) Tüpte hazırlanmış Clark ve Lubs besi yeri (MR/VP buyyonu)
- 2) Saf ve taze mikroorganizma kültürleri
- 3) Kontrol pozitif (*E. coli*) ve negatif (*E. cloacae*) mikroorganizma kültürleri
- 4) Metil kırmızısı pH indikatörü
- 5) Ekilmemiş besiyerleri

Metot

Üremiş kültürlerden, besi yerlerine ekimler yapılır ve tüpler 37 °C de 2-7 gün inkubasyona bırakılır. Üzerine metil kırmızısı solusyonunundan 4-5 damla damlatılır ve iyice karıştırılır.

Değerlendirme

Metil red, besi yerine damlatıldıktan sonra üstte kırmızı renkli bir halkanın meydana gelişi pozitif metil kırmızısı testi olarak kabul edilir. Negatif reaksiyon halinde üst tarafta sarı bir halka görülür.

Sitrat Testi:

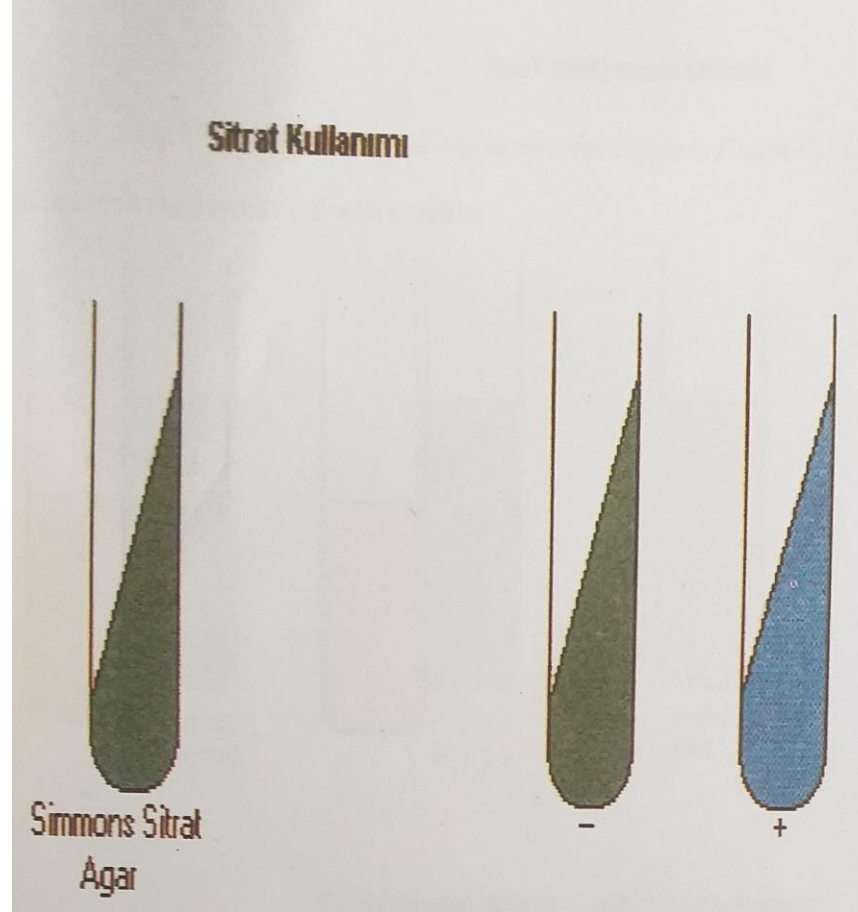
Bu test, mikroorganizmaların, besi yerlerine katılan sitratı karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada, bakteri cins ve türlerini identifikasyonda kullanılır. Bakteriler tarafından sitratın ayrışması (sitrat metabolizması) enzim sistemi tarafından gerçekleştirilir. Bu enzime citritase (citrate oxalacetate-lyase) veya citrate demolase adı v

Materyel:

- 1) Tüp içinde yatık Simmons citrate agar besi yeri (4-5 ml, pH 6.9 ve yeşil renkte)
2) Test edilecek mikroorganizmaların taze ve saf kültürleri
3) Kontrol pozitif (*Klebsiella aerogenes*) ve negatif (*E. coli*) mikroorganizmaları
4) Ekilmemiş besi yerleri
- **Metot**
- Muayeneleri yapılacak saf kültürler steril fizyolojik su veya buffer ile biraz sulandırıldıktan sonra besi yerlerine ekimler yapılır ve tüpler 2-7 gün 37 °C inkubasyonda tutulur.
- **Değerlendirme**
- 1) Simmons citrate besi yerinde, uygun bir inkubasyon süresi sonunda hiçbir üremenin olmaması ve ortamın orijinal yeşil rengini muhafazası negatif reaksiyon ve ekim hattı boyunca üreme ile birlikte koyu mavi rengin meydana gelmesi de pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir.

Kaynak:

Bekar M. Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmaların genel karakterleri ve tanı yöntemleri. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Etlik-Ankara. Yayın No:97-1.



- Kaynak:

Bekar M. Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmaların genel karakterleri ve tanı yöntemleri. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Etlik-Ankara. Yayın No:97-1.

MİKROORGANİZMALARI ÜRETME ORTAMLARI

1-Cansız ortamlar

2- Canlı ortamlar

1- Cansız Ortamlar (Besi Yerleri)

A-Genel Besiyerleri

- Herhangi bir inhibitör madde içermeyen, besin maddelerince yeterli veya zengin, herhangi bir mikroorganizma grubunun gelişmesini özel olarak desteklemeyen, bazı zor gelişenlerin de dahil olduğu çok sayıda mikroorganizmanın gelişmesini sağlayan besiyerleridir.
- Bu grupta değerlendirilen besiyerleri genel olarak bakteriler için kullanılır. Bununla beraber, bu besiyerlerinde maya ve küfler de gelişebilir.

Dehidre besi yerleri



Besiyeri bileşenleri, formülasyonda belirtilen oranlarda bir araya getirilip kurutularak toz veya granül şekilde ambalajlarda hazır karışım hâline getirilmiş ticari besiyerlerine, dehidre besiyerleri denilmektedir.

Resimler: T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Laboratuvar hizmetleri modülü, Besi yerleri, Ankara-2015

Storage : Hygroscopic; Store in a cool dry place below 25°C away from light.

Directions for Use :
Dissolve 51.55 gm in 1000 ml distilled water. Gently heat to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 15 psi (121°C) for 15 minutes. Cool to room temperature before use.

Caution :
Keep the container tightly closed and away from sunlight after use.
For best performance use within the expiry limit and as per standard operating procedure.

Disposal : User must ensure safe disposal by autoclaving and/or by incineration, used or unusable preparation of this product and derivatives thereof on completion of work to avoid contagion.

Disclaimer : No liability accepted for accidents arising while handling or use.

MacConkey Agar w/cr & 1% Lactose
Recommended for isolation of coliform and lactose fermenting enteric bacteria.

Standard Formula	gm/liter
Peptic digest animal tissue	20.0
Agar	15.0
Lactose	10.0
Sodium chloride	5.0
Bile salt	1.5
Neutral red	0.05
Crystal violet	0.001
pH (at 25°C)	7.2±0.2

Product Code: 1MAC31
Pack Size: 100 gm

RFCL
Science, Nutrition & Life
RFCL Limited, A-3, Okhla Industrial Area, Phase-I, Delhi - 110020
e-mail: RFCL-00@rfcl.in, Website: www.rfcl.in

Labels: Xi, Xn, Xi

Date of Receiving: _____
Date of Opening: _____

Batch No.: _____
Month and year of Mfg.: _____
Best Before: 18 months from month of Mfg.
M.R.P. (Inclusive of all taxes): _____

Packed for servicing industry (including industrial quality control laboratories, academic and research institutions, universities etc.): _____

Hazırlanışı Depolama Koşulları

Besiyerinin Adı

Bileşim

Ambalaj Özellikleri

Ürün Kodu

Uyarı İşaretleri

Ürün Özellikleri

Resim: T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Laboratuvar hizmetleri modülü, Besi yerleri, Ankara-2015

- Genel besiyerleri başlıca toplam mezofil aerob bakteri sayımı, toplam psikrofil aerob bakteri sayımı, bozulma ya da hastalık etmeninin ön izolasyonu gibi amaçlar için kullanılır. Buna göre;
- #-Başta gıda maddeleri olmak üzere pek çok örnekte "toplam mezofil aerob bakteri sayısı" ile "toplam psikrofil aerob bakteri sayısı" tayinleri önemli kalite kriterleridir. Toplam mezofil aerob bakteri sayısından kasıt 28–30 oC'da (kimi kaynaklara ve amaca göre 35–37 oC'da) gelişebilen aerob bakterilerin sayısıdır.
- #-Günlük kullanımdaki bakterilerin aktiveleştirilmesi, basit olarak korunması vb. amaçlarla da genel besiyerleri yaygın olarak kullanılır.
- #-Nedeni hakkında bir ön fikir edinilemeyen bozulma ya da hastalık etmeninin izolasyonu için de genel besiyeri kullanılır. Burada amaç, etmenin her ne olursa olsun öncelikle izole edilmesidir ve genel bir besiyeri kullanmak bir anlamda zorunludur.
- Tüm bakterilerin geliştirilebileceği nitelikte bir besiyeri yoktur. Genel besiyerleri zor gelişen bakterilerin sadece bir bölümünün gelişmesini sağlayabilir. Klinik mikrobiyolojide farklı gruptaki zor gelişen bakteriler için genel besiyerlerine başta kan olmak üzere katkılar ilave edilerek zenginleştirmeler yapılmaktadır.
- Genel besiyerleri, inkübasyon koşullarının değiştirilmesi ile psikrofillerin, termofillerin, mikroaerofillerin, aerotolerantların ve özel inkübasyon koşullarının sağlanması ile kısmen anaerobların geliştirilmesinde de kullanılır
- Nutrient Agar ve Nutrient Broth, Tryptic Soy Agar ve Tryptic Soy Broth , Brain–Heart (Infusion) Broth ve Brain–Heart Agar, Tamponlanmış Peptonlu Su genel besiyeri olarak değerlendirilir. Kanlı Agar ise, basit bileşimli bir genel besiyerine kan ilavesi ile hazırlanır.
- Kanlı agar, klinik mikrobiyolojide standart genel besiyerlerinde gelişemeyen "zor gelişen" bakterilerin izolasyonu için kullanıldığında "zenginleştirilmiş genel besiyeri" olarak değerlendirilir. Gıda mikrobiyolojisinde elde edilen bir izolatın hemoliz reaksiyonunun belirlenmesi amacı ile kullanıldığında ise identifikasyon besiyeridir. Bir klinik örnekten sadece 1 hemoliz yapan bakterilerin izolasyonu için kullanılıyorsa bu kez diferansiyel besiyeri olarak değerlendirilir



https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Tryptic-Soy-agar,MDA_CHEM-105458

B- Selektif Besi yerleri

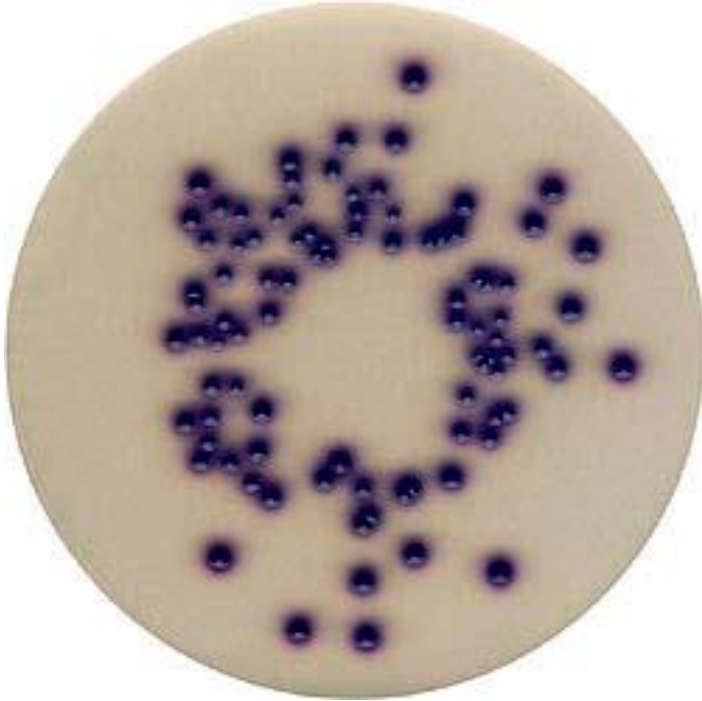
Selektif besiyerleri, karışık bir mikrobiyel floradan gelişmesi istenmeyenleri olabildiğince fazla baskılamak, ancak gelişmesi istenenler için -tersine olarak- minimum düzeyde olumsuz etki yapmak üzere formülize edilir. Bu amaçla genellikle çeşitli inhibitör maddeler kullanılır

Yüksek selektivite gösteren besiyerleri, tek cins ya da türde mikroorganizma gelişmesine izin vereceğinden bu besiyerleri selektif izolasyon, selektif sayım ve hatta ön identifikasyon amaçları ile kullanılabilir.

Bir besiyerine selektivite kazandırılması sadece inhibitör madde ilavesi ile yapılmaz. Geliştirilmesi istenilen mikroorganizmanın kullanabileceği, ancak refakatçi mikroflora tarafından kullanılamayan besin maddeleri besiyerine karbon ve azot kaynağı olarak verilerek de selektivite sağlanabilir. Örneğin, gıda sanayisinde *Pseudomonas* aranması için kullanılan GSP Agar besiyerinde glutamat ve nişastadan başka besin maddesi yoktur. Nişasta ve glutamat *Pseudomonas* ve *Aeromonas* türleri tarafından besin maddesi olarak kullanılırken, gıda maddeleri, atık sular ve gıda endüstrisi ekipmanında bu bakteriler ile birlikte bulunan refakatçi mikroflora bu maddeleri metabolize edemediği için gelişemez.

C. Diferansiyel (Ayırt Edici, Fark Ettirici) Besiyerleri

- Diferansiyel besiyerlerinde gelişmesi istenen mikroorganizma yanında diğer mikroorganizmalar da gelişebilir. Ancak başta koloni morfolojisi olmak üzere çeşitli farklılıklar ile hedef mikroorganizma diğerlerinden ayrılır.
- Ayırt edici koloni özelliği, çeşitli pH indikatörleri, boya maddeleri, indirgeyiciler, diğer indikatörler vb. maddelerin besiyerine ilavesi ile yapılır. Pek çok mikroorganizma belirli bir karbohidratı kullanırken asit oluşturur ve bu asitlik pH indikatörü ile kolayca belirlenebilir. Ayrıca mikroorganizmanın jelatinaz, lipaz, lesitinaz vb. enzim aktiviteleri besiyerinde oluşan berrak zonlar ile belirlenebilir.
- Bu besiyerleri sıvı ya da katı olabilir. Katılardan koloni izolasyonu mümkündür ancak, sıvı besiyerinde sadece hedef mikroorganizmanın var/yok olduğu anlaşılır.
- Diferansiyel besiyerleri, amaca göre selektif izolasyon, selektif sayım ve ön identifikasyon amaçları ile kullanılmaktadır.



Choromocult Coliform Agar (Merck 1.10426)

Hazırlanmış besiyeri opalesent ve sarımsı renktedir. *E. coli* kolonileri koyu mavi-mor, *Citrobacter freundii* kolonileri kırmızı renkli, *Salmonella* kolonileri renksiz gözlenir.

Alıntı: <https://www.microbiyoloji.org>

D. Zenginleştirme Besiyerleri

- Karışık bir mikroflora içinde hedeflenen bir mikroorganizmayı geliştirmek, sayısını artırmak için kullanılan zenginleştirme besiyerleri, ön zenginleştirme besiyerleri ve selektif zenginleştirme besiyerleri olarak 2 alt gruba ayrılır.
- Ön zenginleştirme besiyerleri genel olarak hasar görmüş (yaralanmış, stres altında) mikroorganizmaların aktivitelerini kazanmaları için kullanılan, bileşiminde inhibitör içermeyen, dolayısı ile aktivite kazanması istenen mikroorganizma yanında refakatçi mikrofloranın da gelişmesini sağlayan sıvı besiyerleridir. Buna göre "özel amaçla kullanılan genel besiyerleri" olarak da nitelendirilebilirler.
- Bu besiyerlerine en tipik örnek, gıdalarda *Salmonella* aranmasına yönelik çalışmaların ilk aşaması olan ön zenginleştirmede kullanılan "Tamponlanmış Peptonlu Su" besiyeridir. Bileşimi 10 g/L et peptonu, 5 g/L NaCl ve 10 g/L fosfat tampon olan bu besiyerinde *Salmonella* yanında ortamdaki diğer bakteriler de kolaylıkla ve iyi bir şekilde gelişebilir.



<https://www.merckmillipore.com>

- Selektif zenginleştirme besiyerleri ise özel amaçla kullanılan selektif sıvı besiyerleridir. Bunlara en tipik örnekler *Listeria* ve *Salmonella* aranmasında kullanılan besiyerleridir.
- Selektif zenginleştirme aşamasında karışık kültür olarak bulunan bakterilerden gelişmesi istenmeyenler, çeşitli selektif inhibitörlerin kullanımı ile kısmen ya da tümüyle engellenir.
- Selektif zenginleştirmenin amacı, selektif izolasyonda başarı şansını artırmak için aranan bakterinin karışık kültür içindeki sayısını artırmaktır.

E. İdentifikasyon Besiyerleri

- Selektif ve diferansiyel besiyerlerinin ön identifikasyonda kullanılabileceğine yukarıda değinilmiştir.
- Tam selektif bir besiyerinde gelişen bir mikroorganizmanın identifikasyonu cins ve hatta tür bazında tamamlanabilir. Diferansiyel besiyerlerinde de aynı durum geçerlidir.
- Bir mikroorganizma izolatının tanımlanması için halen en çok kullanılan testler biyokimyasal nitelikli olanlardır. İdentifikasyon besiyerleri, mikroorganizmanın belirli bir besin maddesini (örneğin, laktoz) kullanıp kullanmadığının saptanması, belirli bir besin maddesinden metabolizma sonunda tayin edilebilecek metabolitleri (örneğin, triptofandan indol) oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi vb. amaçlar ile kullanılır. Bakterinin hareketli olup olmadığının saptanması amacıyla kullanılan yarı katı besiyerleri de bu gruba dahil edilmektedir. Yarı katı olarak Nutrient Agar gibi genel besiyeri kullanılabilir.

- Bir besiyerinde birden çok mikrobiyolojik tanımlama testi aynı anda beraberce yapılabilir. Bunun en tipik örneği *Salmonella* analizinde yaygın olarak Triple Sugar Iron Agardır. Yatık agar olarak tüplerde hazırlanan bu besiyerinde tek ekim ile glikoz, laktoz ve sakkarozdan asit oluşturma, glikozdan gaz oluşturma ve H₂S oluşturma testleri yapılmaktadır. Bu gibi identifikasyon amaçlı ve birden çok test uygulananlar "kombine besiyeri" olarak adlandırılır

F- Diğerleri

- Agar disk difüzyonu (Mueller Hinton Agar) ile yapılan antimikrobiyel duyarlılık ve minimal inhibisyon konsantrasyonu (Mueller Hinton Broth) testleri, vitamin ve aminoasitlerin mikrobiyel yolla belirlenmesi, saf kültürlerin korunması (koleksiyonu), taşınması gibi özel amaçlara yönelik olarak kullanılan çeşitli besiyerleri de vardır.
- Endüstriyel üretimde kullanılan besiyerleri ise oldukça farklı bir gruptur. Bunların dışında istenilen formülde "sipariş üzerine" üretilen besiyerleri de vardır. Bunlar talebe göre dehidre, sıvı, şişede ya da Petri kutusuna dökülmüş şekilde hazırlanabilmektedir.

Besi yeri Bileşimine Katılan Başlıca Maddeler

Su: Besiyeri hazırlamada kullanılan suyun damıtma veya deiyonizasyon ile taze hazırlanmış olması, başta bakır olmak üzere toksik metalleri içermemesi gerekir. Damıtık (distile) su için en ideali, cam sistemlerden elde edilen suyun kullanılmasıdır.

- Taze hazırlanmış saf suyun pH'sı 6,5–7,5 arasında olmalıdır. Depolanmış saf su atmosferik karbondioksitin absorbe edilmesi sonucu asit pH gösterir. Eğer saf suyun pH'sı 5,5'in altında ise, bu su ısıtılarak CO₂ uzaklaştırılır ve pH yeniden kontrol edilir. Eğer pH hala düşük ise, NaOH ile nötral pH'ya getirilir ve saf su sistemi kontrol edilir.
- Özellikle klinik ve veteriner mikrobiyolojiyi ilgilendiren bazı bakteriler, besiyeri hazırlamada kullanılan suyun içindeki safsızlıklara karşı çok duyarlıdır. Bu gibi bakterilerle çalışıldığında suyun çok özenle hazırlanması gerekir.

Pepetonlar: Pepton terimi, proteinlerin hidrolizi ile elde edilen ürünlere verilen genel isimdir.

- Yaşayan tüm hücrelerde olduğu gibi mikroorganizmalar da azot, karbon, tuzlar ve diğer besin maddelerine gereksinim duyarlar. İstisnalar dışında, mikroorganizma gruplarının oldukça büyük bir bölümü, proteinleri azot kaynağı olarak kolaylıkla kullanamaz. Bu nedenle azotlu bileşikler, çok daha kolay kullanabildikleri protein hidrolizatlarından sağlar.
- Peptonlar sadece azot değil, karbon kaynağı olarak da mikroorganizmalar tarafından kullanılır. Bunun yanında, peptonların bileşiminde bulunan bazı aminoasitler ve vitaminler de bazı mikroorganizmalar için gelişme faktörü olarak oldukça önemli işlev görür.
- Proteinler; kuvvetli asitler ve kuvvetli alkaliler ile ya da enzimatik olarak temel bileşenleri olan peptit ve aminoasitlere ayrışır. Bu amaçla en çok kullanılan proteolitik enzimler papain, pepsin ve pankreatindir.
- Peptonlar, birçok ticari firma tarafından çeşitli hayvansal dokulardan, süttten ve soyadan farklı yöntemlerle elde edilir ve farklı ticari isimlerle pazarlanır ve/veya dehidre besiyerleri içine katılır.
- Aksine bir belirtme yoksa, mikrobiyolojide "pepton" denildiğinde, pankreatin enzimi ile hidrolize edilmiş et peptonu (Peptone from meat, pancreatic) anlaşılır. Bu pepton ticari firmalar tarafından farklı isimlerle anılır. #

Maya Ekstraktı:Maya ekstraktı (maya özütü, yeast extract), proteolitik olarak otolize edilmiş (parçalanmış) bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) sulu ekstraksiyonu ile elde edilir. Özellikle, yüksek B kompleks vitamini konsantrasyonu sayesinde çoğu mikroorganizmanın iyi bir şekilde gelişmesini sağlar.

- Bileşimindeki aminoasitler, peptitler, vitaminler, karbohidratlar ve mineraller nedeniyle pek çok mikrobiyolojik çalışmada besiyeri katkısı olarak kullanılır. Karbohidrat içermesi nedeniyle karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılmaz.

Et Ekstraktı : Et ekstraktı (et özütü, meat extract), genellikle yağı ve tendonları ayrılmış, ekstraksiyon öncesi hafifçe hidrolize edilmiş etten elde edilir. Karbohidrat içermez. Bu nedenle karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılabilir. Çeşitli besiyerlerinde et peptonlarının yerini alabilir.

Malt Ekstraktı : Malt ekstraktı (malt özütü, malt extract), biralık arpanın çimlendirilmesi ve kavrulması ile elde edilen malttan üretilir. Başta maltoz olmak üzere, çeşitli karbohidratların yüksek konsantrasyonuna bağlı olarak maya ve küflerin geliştirilmesi için kullanılır. %1,7 konsantrasyondaki çözeltisi maya ve küflerin geliştirilmesi için uygun bir besiyeridir. Gerekirse bu çözelti çeşitli peptonlar ile desteklenebilir ve/veya asitlendirilebilir ve/veya agar ve pepton eklenerek Malt Extract Agar şeklinde katı besiyeri olarak kullanılabilir.

Beyin ve Kalp Ekstraktı: Beyin ekstraktı (brain extract) ve kalp ekstraktı (heart extract) streptokoklar, pneumokoklar, meningokoklar, gonokoklar vb. gibi zor gelişen (fastidious) patojen bakterilerin geliştirilmesi için Brain Heart Broth ve Brain Heart Infusion gibi isimlerle anılan besiyerlerinin bileşimine katılır.

Agar: Besiyerlerinin katı hale getirilmesi için en çok kullanılan jelleştiricidir. Çoğu kez diğer agarlı besiyerleri ile karıştırılmaması için "agar agar" olarak anılır. Agar bir poligalaktozid olup, "Agarophytes" olarak adlandırılan bazı kırmızı deniz yosunlarından (*Gelidium*, *Eucheuma*, *Gracilaria*, *Acanthopeltis*, *Ahnfeltia*, *Pterocladia* türleri) elde edilir. Bazı hidroksil grupları sülfürik asit ile esterleştirilmiştir. Mikrobiyolojik kullanım amacıyla en iyi kalitedeki agar *Gelidium* türünden elde edilenidir.

Agarın katılaştırma (jelleştirme) özelliğini bileşimindeki D-galakton sağlar. Bileşiminde ayrıca inorganik tuzlar, çok az miktarda protein benzeri maddeler ve eser miktarda yağ vardır. Mikrobiyolojide kullanılan agarlar özel olarak saflaştırılarak antimikrobiyel maddeler ve pigmentlerden arındırılır.

Agar, besiyeri bileşimine sadece jelleştirici olarak katılır. Uzun ve dallanmış zincir yapısı nedeniyle - bir kaç istisna dışında- mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılamaz.

Agar Yaklaşık olarak 85–90 oC'da erir, 40–45 oC'da jelleşir.

Besiyerine amaca göre %0,05–2 gibi geniş bir sınırdan ilave edilebilir. Düşük agar konsantrasyonları (%0,05–0,3) genellikle hareketliliğin belirlenmesi, mikroaerofil karakterdeki bakterilerin geliştirilmesi gibi özel amaçlarla kullanılır. Standart kullanım konsantrasyonu %1–1,5'tir.

- **Karbonhidratlar:**Bazı besiyerlerinin bileşimine bakteriler için enerji ve karbon kaynağı olarak katılan karbohidratların bir başka kullanım şekli karbohidratlardan asit oluşturmaya dayalı identifikasyon testleridir
- Besiyeri bileşiminde karbon kaynağı olarak en çok kullanılan karbohidratlar glikoz, laktoz ve sakkarozdur. Bunlardan glikoz pek çok bakteri tarafından kullanılabilirdiği için, daha çok genel besiyeri bileşimlerinde yer alır.
- Adonitol, arabinoz, dekstroz (glikoz), dulsitol, galaktoz, inositol, inulin, laktoz, levuloz (früktoz), maltoz, mannitol, mannoz, melezitoz, melibiyoz, nişasta, rafinoz, ramnoz, sakkaroz (sukroz), salisin, sellobiyoz, selüloz, sorbitol, trehaloz ve ksiloz çeşitli karbohidrat testlerinde kullanılmak üzere çoğunlukla sıvı ya da katı besiyerlerine katılabilmektedir.
- **Tuz:** Aksine bir belirtme yoksa "tuz" denilince sodyum klorür anlaşılır. Çoğu besiyerinin bileşimine izotonik bir ortam oluşturmak için katılır. %0,85 NaCl, serum fizyolojik adı ile seyreltme çözeltisi olarak yaygın olarak kullanılır.
- Tuza dayanıklı (halotolerant) ve tuz seven (halofil) bakterilerin selektif izolasyonu için yüksek konsantrasyonlarda özel besiyerlerinin bileşimine katılır.

Tampon Maddeler: Mikroorganizmalar genel olarak nötr ve nötre yakın pH'larda iyi gelişir. Bazı mikroorganizmalar alkali pH'ları yeğlerken (örneğin *Rhizobium* bakterileri), bazıları (örneğin mayalar, küfler, asidofilik bakteriler) asidik ortamları severler.

Besi yerlerinde pH değişiminin minimumda tutulması amacıyla besiyerine çeşitli tampon maddeler ilave edilir. Tampon (buffer) olarak en çok kullanılan maddeler, fosfatlar (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , β gliserofosfat), karbonatlar, asetatlar ve sitratlardır.

pH İndikatörleri : Mikrobiyel metabolizma sonunda bazı besiyeri bileşenlerinden çeşitli asit veya alkali ürünler meydana gelir. pH'daki değişme en kolay olarak pH indikatörleri ile belirlenir ve bunların renk değişimine bağlı reaksiyonlar o besiyerinde gelişen mikroorganizmalar için önemli göstergeler olur.

- Aşağıda, besiyeri bileşimlerinde yaygın olarak kullanılan pH indikatörleri ve pH'ya bağlı renkler verilmiştir.

Çizelge : pH İndikatörleri ve Renk Değişim Sınırları

<u>İndikatör</u>	<u>Asit pH / renk</u>	<u>Alkali pH / renk</u>
Fenol blue	3,0 / sarı	4,9 / mavi
Fenol red	6,8 / sarı	8,4 / kırmızı
Bromocresol green	3,8 / sarı	5,4 / mavi
Bromocresol purple	5,2 / sarı	6,3 / menekşe
Bromothymol blue	6,0 / sarı	7,6 / mavi
Cresol red	7,2 / sarı	8,8 / kırmızı
Litmus	5,6 / kırmızı	8,3 / mavi
Metil red	4,4 / kırmızı	6,2 / sarı
Neutral red	6,8 / kırmızı	8,0 / sarı
Rosalic acid	6,8 / sarı	8,2 / kırmızı

- **Diğer İndikatörler:** Mikrobiyel metabolizmaya bağlı olarak bazı kimyasalların çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşturdıkları belirli ürünlerin saptanması, bu besiyerlerinde gelişen mikroorganizmaların ön identifikasyonunda kullanılır. Bu tip reaksiyonlarda kullanılan indikatör örnekleri aşağıda verilmiştir.
- MUG (4-Methylumbelliferyl- β -Glucuronide): *E. coli* tanımında son yıllarda en yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir.
- Kan: Aksine bir uyarı yoksa besiyeri bileşimine giren "defibrine koyun kanı"dır. Hemoliz reaksiyonunun belirlenmesi için kullanılır.
- Jelatin ve kazein: Bunlar, proteolitik bakterilerin belirlenmesi amacıyla besiyeri bünyesine katılır.
- Lesitin: Yumurta sarısı ve soya fasulyesinde bulunan lesitin, çeşitli bakterilerdeki lesitinaz enzim aktivitesi sonunda parçalanır ve lesitin katılmış katı besiyerinde koloni etrafında berrak zonlar görülür. Gıda mikrobiyolojisinde *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* besiyerlerinin bileşiminde yer alır.
- Kromojenik substratlar: Katı besiyerinde şeker ve pH indikatörüne bağlı selektif izolasyon sistemi yerine, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl, 5-bromo-6-chloro-3-indolyl ya da 6-chloro-3-indolyl gibi indolil türevleri olan kromojenik substratların kullanımı giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu sistemin prensibi, kromojenik substratın hedef bakteri ya da bakteri grubu için özgün olan enzim ile şeker ve kromojene parçalanması, oksijen varlığında sıvı besiyerinin ya da katı besiyerindeki koloninin renk değiştirmesidir. Klasik pH indikatöründen farklı olarak bu sistemde koloni etrafında zon oluşmaz, doğrudan koloni rengi değişir ve bu değişim pH'dan etkilenmez.

İnhibitörler: Selektif besiyeri bileşimlerinde, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini baskılayan çeşitli inhibitör maddeler kullanılır. İnhibitör maddelerin etki şekilleri çok farklıdır ve güçleri konsantrasyonlarına bağlıdır.

- Besiyerlerinde inhibitör olarak kullanılan maddeler genel ve selektif inhibitörler olarak kabaca ikiye ayrılabilir. Genel inhibitörler daha geniş bir spektrumda istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini engellerken, selektif inhibitörler belirli mikroorganizmaların gelişimini etkiler. Bununla beraber, en çok kullanılan inhibitörler hakkında aşağıda kısaca bilgi verilmiştir:
- Boyalar: Metakrom sarısı (metachrome yellow) *Proteus* kolonilerinin yayılmasını, eosin Y ve metilen mavisi (methylen blue) Gram pozitif bakterilerin gelişimini, malaşit yeşili *Pseudomonas aeruginosa* dışındaki pek çok refakatçi floranın gelişimini baskılar.
- Sodyum azid: Gram negatif bakterilerin gelişimini engeller.
- Safra tuzları (Bile salts, Ox bile): Gram pozitif bakterilerin gelişimini engeller.
- Antibiyotikler: Genellikle bakterileri engellemek için geniş spektrumlu olarak küf geliştirme besiyerlerinde ya da refakatçi bakteriyel florayı inhibe etmek için dar spektrumlu olarak kullanılırlar. Örneğin, *Bacillus cereus* refakatçi floraya göre Polimiksin B sülfattan daha az etkilendiği için, bu bakteri ile ilgili çalışmalarda besiyeri bileşimine katılır. Benzer şekilde *E. coli* O157:H7 serotipi ile ilgili çalışmalarda sefiksim yaygın olarak kullanılır.
- Ayrıca, selenit, tetrasyonat, bizmut, lauryl sülfat, yüksek konsantrasyonda asetat vb. maddeler çeşitli besiyerlerinde inhibitör madde olarak kullanılır.

Diğer Maddeler:

İnaktivatörler: Lesitin, sistein, Tween 20, Tween 80 gibi.

Stimülatörler: vitaminler, glisin, piruvat, Tween 80 ve çeşitli elementler gibi.

Özel besin maddeleri : Nitrat ve glutamat gibi.

İndirgeyiciler: Anaerobik ortam oluşturmak için çeşitli maddeler kullanılır. Bunlar arasında ilk akla gelen thioglycollate'tır.

Besi Yeri Hazırlama Aşamaları

1- Tartım



Resim: T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Laboratuvar hizmetleri modülü, Besi yerleri, Ankara-2015

- 2- Çözündürme: Su ile çözündürülür. Ben mari veya ısıtıcı tabla ile ısıtarak çözdürme gerekebilir.

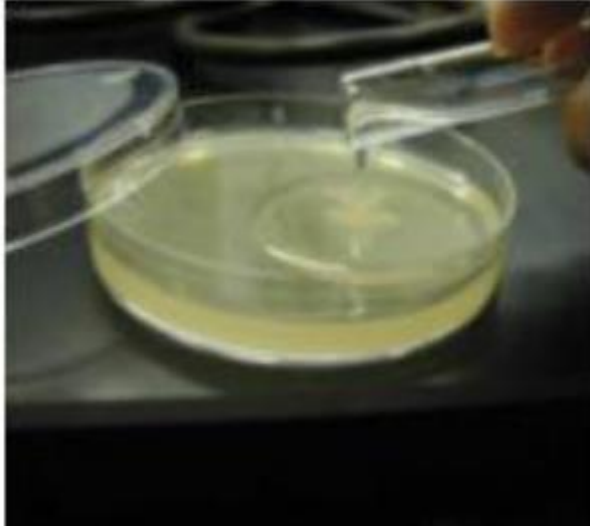


- 3-pH ayarlama
- 4-Sterilizasyon

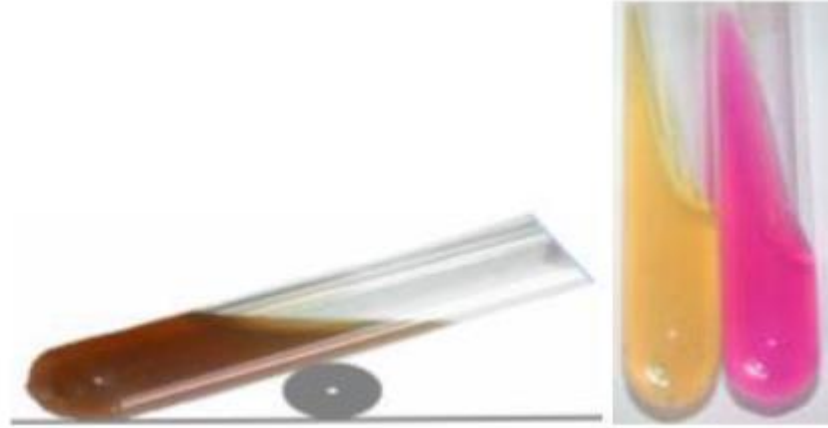


Sterilizasyon için hazırlanmış besi yerleri

- Ardından besi yerleri petri kutularına dökülebilir ve katılaştırması için beklenir.



Eğer besi yerleri tüpte isteniyorsa, tüpe altarılır ve katılaştırması için tüp eğik olarak beklenir. Eğer tüpte dik agar isteniyorsa tüp dik olarak beklenir ve besi yeri katılaşır.



Resimler: T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Laboratuvar hizmetleri modülü, Besi yerleri, Ankara-2015.

2- Canlı Ortamlar

A-Embriyolu kanatlı yumurtaları

B- Doku-hücre kültürleri

C- Deney Hayvanları

- Konvansiyonel Deney Hayvanları

- Spesifik Patojen Free Deney Hayvanları

- Germ Free deney Hayvanları

- Kaynaklar:

1- www.mikrobiyoloji.org

2- T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Laboratuvar hizmetleri, Besi yerleri, Ankara-2015 (Fotoğrafların alıntısı bu kaynaktan yapılmıştır)

3-ARDA Mustafa, Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınları, Ankara, 2007.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

- Nukleik asitlerin (DNA veya RNA) in vitro amplifikasyonları (sayısal çoğaltılması), patojenlerin ve dolayısıyla da infeksiyonların, tümörlerin, genetik hastalıkların teşhisinde ve adli tıpta, en fazla kullanılan yöntemlerin arasında yer almaktadır.
- **DNA Amplifikasyon Teknikleri**
- Bu teknik, klinik materyallerde bulunan veya izole edilen etkenlere ait DNA'ların veya bazı spesifik sekansların in vitro olarak enzimatik amplifikasyonlarını amaçlar. Pratikte de, bu DNA amplifikasyon yöntemi, diğerlerine oranla daha fazla uygulama alanı bulmuştur. RNA karakterindeki genomik materyaller de önce, revers transkriptaz (RT) ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilerek amplifikasyonu yapılır.
- DNA amplifikasyonunun en yaygın ve önemlisini Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) oluşturmaktadır. Bu nedenle teknik hakkında aşağıda gerekli bilgiler verilmektedir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR)(Polymerase Chain Reaction, PCR)

PZR'ın geliştirilmesi, moleküler teknolojinin ve aynı zamanda, kullanım alanının da genişlemesine yol açmıştır. PZR, son yıllarda, biomedikal araştırmalar yanı sıra enfeksiyöz ajanların teşhisinde, epidemiyoloji, genetik defektlerin saptanmasında, adli tıp ve diğer alanlarda da geniş bir uygulama ortamı bulmuştur.

- Bir çok disiplinde olduğu gibi, insan ve veteriner hekimlikte de çok büyük yararlar sağlayan PZR'ın çalışma prensibi, oldukça basittir. Özet olarak, izole edilen veya patolojik materyallerde bulunan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA), spesifik kısa zincirli oligonukleotid primerler yardımı ile, enzimatik olarak sayısal çoğaltılması (amplifikasyon) olarak tanımlanabilir. Bu hedef genetik materyal çok az sayıda ve hatta, bir çok veya sayısız diğer veya ilgisiz DNA'lar arasında olsa bile çoğaltılabilir ve homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve kolayca da identifiye edilebilir.
- PZR küçük volumler halinde hazırlanır. Şöyle ki, 0.5 ml mikrofüj tüpüne 50 µl hacimde materyal konur. Bu materyaller arasında,
 - 1) Aranılan hedef DNA sekansları,
 - 2) İki tür spesifik oligonukleotid primerleri (15-30 bazlık, tek iplikcikli),
 - 3) Termotabil DNA polimeraz (Taq polimeraz veya diğerleri)
 - 4) Dört tür dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) bulunur.



<https://www.indiamart.com/proddetail/pcr-reagents-9533428833.html>



<https://www.indiamart.com/proddetail/pcr-reagents-9533428833.html>



PCR kabini

<https://www.labunlimited.co.uk/pdf/UV-Cabinet-PCR-Workstation-UVT-B-AR-Grant.pdf>



www.memorial.com.tr

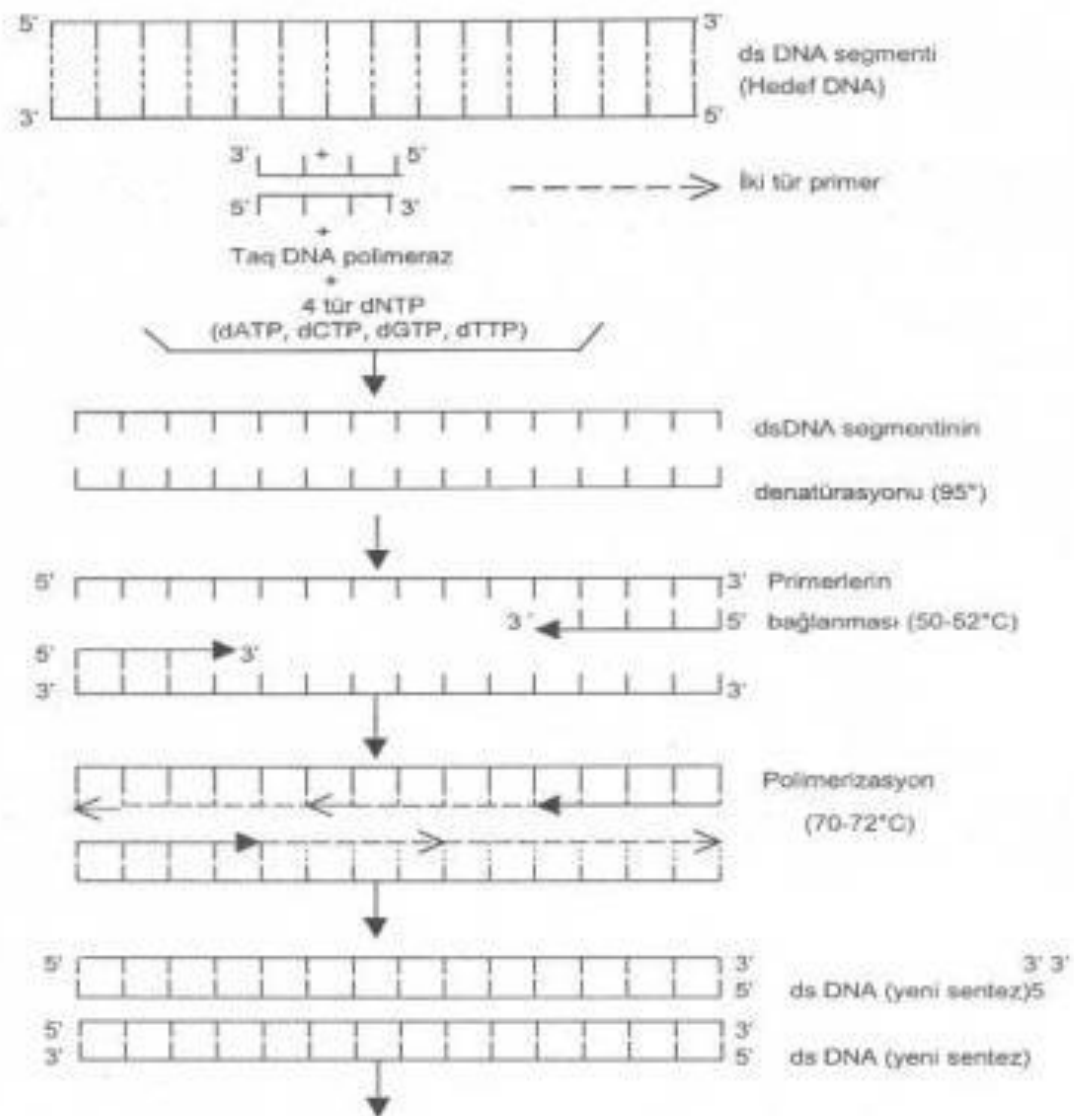


PCR thermocycler
www.thermofisher.com



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b5/Loading_PCR_mixture_to_thermocycler_machine.jpg

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR, PCR)



- 1) Tekrar aynı işlemlere devam
 - 1) denatürasyon (95°C)
 - 2) primerlerin bağlanması (50-52°C)
 - 3) polimerizasyon (70-72°C)
- 2) Aynı işlemlere devam (25 kez)

- Bu ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra, PZR başlıca 3 aşamada gerçekleştirilir. Bunlar da,
- **1) Hedef DNA'nın denatürasyonu:** Bütün gerekli materyaller çok küçük miktarlarda mikrofüj (Ependorf, vs.) tüplerine konduktan sonra özel bir aletin (Thermal cycler) gözlerine yerleştirilir. Alet otomatik olarak ısıyı 95°C'ye yükselterek bu ısıda hedef DNA'ların denatürasyonu (nukleik asitin iki iplikçiğinin birbirlerinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi) sağlanır. Bu işlem için, materyalin türüne göre değişmek üzere 3-5 dakika kadar bir süre yeterli olmaktadır.
- **2) Primerlerin bağlanması:** Ayarlanmış olan süre sona erdikten sonra, alet ısıyı, 50-52°C'ye indirerek ortamda bulunan iki tür primerin, her birinin komplementeri olduğu tek iplikçik hedef DNA üzerindeki spesifik sekanslara bağlanması gerçekleştirilir. Şöyle ki, primerlerden biri kendine ait 5'-terminusu ile hedef DNA'lardan birinin 3'-ucu ile ve diğer primerler de, ikinci tek iplikçik DNA'nın, antiparalel olan diğer ucunda bulunan 3'-ucuna bağlanarak, DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak (5'®3') bağlanırlar. Bu işlemlerin tamamlanması da yaklaşık yine 3-5 dakika kadar devam eder.
- **3) Polimerizasyon:** Bu bağlanma süresi bitince aletin ısısı hemen 70- 72°C'ye çıkarak, tüpler içinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi, 5®3 yönünde olmak üzere, ortamdaki nukleotidleri kullanarak, primerlerin 3'-terminusuna nukleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir. Polimerizasyon reaksiyonunda, hedef DNA'nın tek iplikçik sekansları kalıp ödevi görür. Bu süre de yaklaşık 3-5 dakika sürmektedir.

- Böylece, PZR'ın 3 aşamadan oluşan ve yaklaşık olarak 10-15 dakika kadar devam eden birinci amplifikasyon aşaması, tekrar ısının 95°C'ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25-30 kez tekrarlanması durumunda tek bir hedef DNA segmenti, 2^n formülüne göre, yaklaşık 33.6 milyon çoğaltılmış olur. Ancak, deney koşullarında gerçekleşen verim oranı %85 kadardır.
- Termostabil Taq polimeraz veya diğer termostabil enzimler, bilinçli olarak seçilmelidirler. Başlangıçta enzimin bir defa ve 25-30 siklus için yeterli olabilecek miktarda katılması da önemlidir.

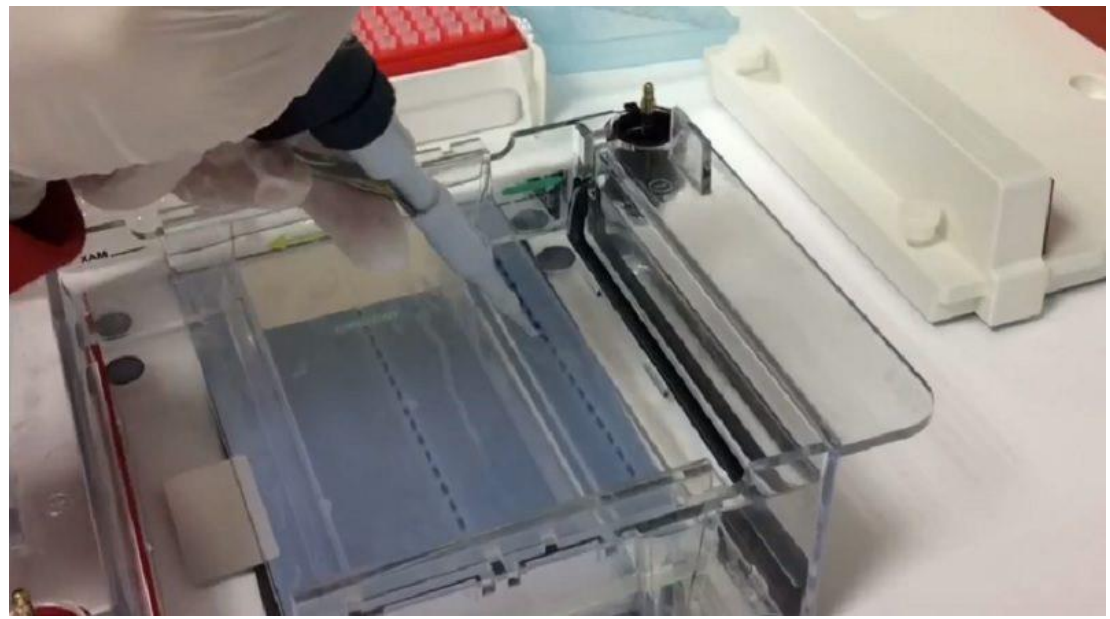
Amplifiye Edilmiş Ürünlerin Saptanması

- PZR'dan sonra amplifiye edilmiş ürünlerin ortaya konulması önemli ve yapılması gereken bir işlemdir. Bu amaçla başlıca 4 tür uygulama kullanılmaktadır.
- 1) Ethidium bromide bantların boyanması: Reaksiyon tüplerinde bulunan amplifikasyon ürünleri, buradan direkt olarak agarose jel elektroforezise (veya PAGE) tatbik edilir. Bu ortamda, ürünler molekül ağırlıklarına göre bir separasyona tabi tutulurlar. Bu işlem sonunda, jel, Ethidium bromide solusyonuna daldırılarak, oluşan bantlar görülür hale getirilirler. Meydana gelen bantlar, bilinen kontrol bantlarla karşılaştırılarak bir değerlendirme yapılır.
- 2) Southern blot analizi
- 3) Solüsyon hibridizasyon tekniği
- 4) Diğer teknikler:

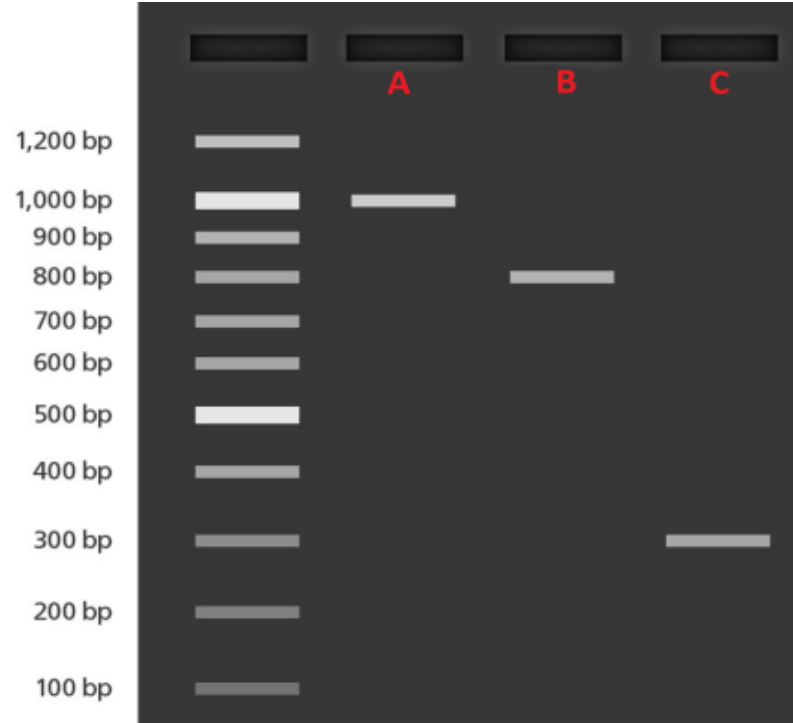


Elektroforez ekipmanı

<https://labakademi.com/agaroz-jel-elektroforezi-pcr-sonrasi-dna-orneklerinde/>



PCR ürünlerini jele yükleme



Elektroforez sonucu

<https://labakademi.com/pcr-sorunlari-ve-cozum-onerileri/>

- **Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) Modifikasyonları**
- Yukarıda açıklanan ve çok yararlanılan konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonunun bir çok modifikasyonları yapılmıştır. Bunlardan önemli bazılarının çok kısa olarak çalışma mekanizmaları aşağıda bildirilmiştir.
- 1) İnvers (tersine dönmüş) polimeraz zincir reaksiyonu
- 2) Asimetrik polimeraz zincir reaksiyonu
- 3) Homopolimerli polimeraz zincir reaksiyonu
- 4) İn situ polimeraz zincir reaksiyonu
- 5) Hot start polimeraz zincir reaksiyonu
- 6) Multipleks polimeraz zincir reaksiyonu
- 7) Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
- 8) Nested polimeraz zincir reaksiyonu
- 9) RNA'nın amplifikasyonu

- **PZR'ın Başlıca Kullanım Alanları**

- PZR'ın hekimlikte bir çok kullanım alanı bulunmakta ve kontrollü çalışmalarda güvenilir, çabuk, spesifik ve sensitif olması nedeniyle de tercih edilmektedir.
- 1) Mikrobiyolojik çalışmalarda PZR: Rutin klinik muayenelerde hastalık ajanlarının izolasyon ve identifikasyonları oldukça zaman almakta ve bazen de herhangi bir etken ayıramamaktadır. Serolojik yoklamalar da, şüpheli veya negatif sonuçlar verdiği gibi yanlış negatif ve pozitif reaksiyonlar da elde edilebilmektedir. Bunun gibi olgularda PZR büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Her ne kadar PZR direkt teşhis yöntemi olmamakla beraber, amplifikasyondan sonra işaretli problemlerin kullanılması veya elektroforezden sonra oluşan kanıtların boyanarak (ethidium bromide) görüntülenmesi, tanıyı kolay hale getirmektedir. PZR'n başlıca kullanıldığı durumlar aşağıda kısaca belirtilmiştir.
- a) Kültürü yapılması, izolasyonu ve identifikasyonu çok zor veya yapılamayan mikroorganizmaların teşhisinde,
- b) Toksin oluşturan ajanların, saptanması güç olan toksinlerin ortaya konulmasında,
- c) Antimikrobial ilaçlara karşı dirençli olan bakterilerin belirlenmesinde,
- d) Mikroorganizmalar içinde alt tiplerin saptanmasında,
- e) Gıdalarda, sularda ve yiyeceklerde bulunan mikroorganizmaların tanısında,
- f) Diğer mikrobiyolojik araştırmalarda (moleküler immunoloji ve epidemiyoloji, parazitoloji, bakteriyoloji, viroloji, vs.) PZR dan büyük yararlar sağlanmaktadır.
- 2) Adli tıp: DNA fingerprintleri cinayetlerin aydınlatılmasında büyük yardımlar sağlamaktadır. Babalık tayini ve HLA (histokompatibilite antijenleri) testleri PZR ile çok kolaylaşmış bulunmaktadır. Cinayet olgularında çok az bir kan, çok az saç veya sperma test için yeterli olabilmektedir. Böyle olgularda, PZR güvenilir ve çabuk sonuçlar vermektedir.
- 3) Genetik bozuklukların belirlenmesinde: Canlılarda genetik karakter gösteren bozuklukların belirlenmesinde de aynı etkinlikte kullanılmaktadır.

- Kaynak:
- 1-Arda M (2006) Temel Mikrobiyoloji 3. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara
- 2- www.mikrobiyoloji.org (Temel mikrobiyoloji Ders notları).

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Toplanması

Patolojik maddeler, genellikle, herhangi bir sağaltım yapılmamış olanlardan ve yeteri miktarda alınır.

Materyaller, ağzı vidalı kapalı şişelere veya petri kutularında toplanır.

Alma işleminde kullanılan makas, pens, bistüri, küret, vb. malzeme ile şişe veya petri kutularının çok iyi sterilize edilmiş olmaları gereklidir.

Nemli malzeme, saprofitik mantar sporlarının germinasyonunu kolaylaştırır.

Alınan materyal en seri vasıta ile mikoloji laboratuvarına gönderilir. Eğer, göndermede gecikme olacaksa, bu zaman materyal buzdolabında muhafaza edilebilir.

Materyalle birlikte, gerekli bilgi içeren bir yazı da gönderilir.

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Toplanması

Kutan Mikozesler

Kutan (süperfisial) mikozelelere genellikle dermatofitler (Microsporum, Trichophyton ve Epidermophyton cinslerine ait türler) neden olurlar.

Bu infeksiyonları teşhis için aşağıda bildirilen materyaller alınır

1. Deri kazıntısı
2. Kıllar
3. Tırnaklar

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Toplanması

Subkutan ve Sistemik Mikozeles

Subkutan mikozeleslerden Rhinosporidiosisde, burundan gelen akıntılar ve burunda meydana gelen polip benzeri oluşumlardan; Sporotrichosisde de deride teşekkül eden ülserlerden akan irinler, lenf yumrusu içeriği ve diğer lezyonlardan alınan patolojik materyaller gönderilir.

- **Aspergillosisde** : Bu hastalık daha ziyade akciğerlerde lokalize olduğundan, bronşial sekretler ve biopsi materyalleri alınır.
- **Blastomycosisde** : Bu infeksiyonda lezyonlu deri, lenf yumrusu içeriği, lezyonlardan akan irinler, bronşial sekretler ve biopsi materyalleri,

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Toplanması

Subkutan ve Sistemik Mikozesler

- **Candidiasisde** : Lezyonlu doku ve organ parçaları, çeşitli patolojik sıvılar ve biopsi materyalleri,
- **Coccidioidomycosisde** : Lenf yumrusu içeriği, pleural ve peritoneal eksudatlar ve diğer biopsi materyalleri,
- **Cryptococcosisde** : Deri ve deri altında oluşan lezyonlu kısımlar, lenf yumrusu içeriği, idrar, spinal sıvı, kraşe, irin, vs.
- **Histoplasmosisde** : Periferik kan, periton sıvısı, lenf yumruları içeriği, lezyonlu organlardan alınan biopsi materyallerin ve çeşitli eksudatlar.
- **Nocardiosisde** : Lezyonlardan, lenf düğümü içeriklerinden, sekret ve ekskretlerden yeteri oranda materyal alınarak ve laboratuara gönderilir.

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Muayenesi

Kutan Mikozesler

1- Ultraviolet ışığında (Wood ışığı) muayene

2- Direkt mikroskopik muayene

- Kıllar ve Tüyler
- Deri kazıntıları
- Tırnaklar

A) Ektotriks

B) Endotriks

C) Endo-ektotriks

D) Kıllarda herhangi bir invazyon yok.

E) Kıl içinde hifalar

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Muayenesi

Subkutan ve Sistemik Mikozesler

- İrin, idrar ve eksudatlar
- Spinal sıvı
- Kan ve kemik iliği
- Biopsi ve otopsi materyalleri
- Kraşe ve bronşial eksudat
- Pleura ve periton eksudatları

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Ekilmesi

Laboratuvara gönderilen materyallerden, şüphelenilen infeksiyonun türüne göre uygun besi yerlerine ekimler yapılır.

Materyal,

1-Mikroskopik muayeneler için,

2-Ekimler için,

3-Histopatolojik yoklamalar için,

4-Muhtemelen, tekrar gerekli olabilecek muayeneler için

şeklinde gruplandırılır.

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Ekilmesi

- Laboratuara gönderilen patolojik materyal, hemen ekilemeyecek veya muayene edilemeyecekse, bu takdirde buz dolabı ısısında muhafaza edilirler.
- Ancak, 0°C ile 4° C arası ısısı, bazı flamentöz mantarlar için uygun olmayabilirler.
- Mantar örnekleri rutubetli bir ortamda, veya rutubetli bir tüpte, petri kutusunda, şişede, vs. kaplar içinde bulundurulmamalı veya muhafaza edilmemelidir.

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Ekilmesi

- Laboratuara gönderilen patolojik materyal, hemen ekilemeyecek veya muayene edilemeyecekse, bu takdirde buz dolabı ısısında muhafaza edilirler.
- Ancak, 0°C ile 4° C arası ısısı, bazı flamentöz mantarlar için uygun olmayabilirler.
- Mantar örnekleri rutubetli bir ortamda, veya rutubetli bir tüpte, petri kutusunda, şişede, vs. kaplar içinde bulundurulmamalı veya muhafaza edilmemelidir.

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Ekilmesi

- Kutan Mikozesler

Kutan mikozes olgularında, genellikle, kıl, tüy, deri ve tırnak kazıntıları gönderilir. Bu materyallerden petri kutusundaki besi yerlerinin 4-5 yerine, steril pensle ekimler yapılır. Kıl veya deri kazıntılarının, besi yerlerinin içine biraz batırılmasının, üreme şansını artırması bakımından önemi fazladır. Özellikle, kıl follikülleri pensle agarın içine biraz daldırılmalıdır.

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Ekilmesi

- Subkutan ve Sistemik Mikozeles

Vesikül sıvıları, irin ve bunun gibi materyaller, petri kutusundaki katı besi yerinin yüzeyine iyice yayılarak ekilirler. Serobrospinal sıvı, pleural ve peritoneal eksudatlar, hem sanrfüje edildikten sonra tortudan ve hem de sanrfüje edilmeden ekimleri yapılır. Doku parçaları iyice ezildikten veya çok küçük parçalara ayrıldıktan sonra ekilirler.

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Ekilmesi

- Mantarlar genellikle aerobik bir karaktere sahiptirler.
- Kùltùrler, inkubasyonda 15-20 gùnden ařađı olmamak üzere tutulurlar.
- Laboratuarlarda, dermatofit ve diğer patojenik mantarların ilk izolasyonu için, bileşiminde kloramfenikol ve sikloheksamid (cyclohexamide) bulunan, Sabouraud dekstrozu agar (SDA) kullanılır.
- İnokule edilen besi yerleri, dermatofit izolasyonu için 25o - 26o C. aralarında inkubasyona konurlar. Ekimlerin çift olarak yapılması ve birinin 37oC tutulması gereklidir. Ancak, bu ısı (37oC) dermatofitlerin çoğunu inhibe eder. Sistemik infeksiyonlara neden olan mantarların izolasyonu için de çift ekimler yapılır ve biri 37oC. tutulur. Bu ısıda dermatofit mantarların parazitik formu (maya benzeri form) elde edilir.

Patojenik Mantarların İncelenmesi

Materyallerin Ekilmesi

- Mantarlar genellikle aerobik bir karaktere sahiptirler.
- Kùltùrler, inkubasyonda 15-20 gùnden ařađı olmamak üzere tutulurlar.
- Laboratuarlarda, dermatofit ve diğer patojenik mantarların ilk izolasyonu için, bileşiminde kloramfenikol ve sikloheksamid (cyclohexamide) bulunan, Sabouraud dekstrozu agar (SDA) kullanılır.
- İnokule edilen besi yerleri, dermatofit izolasyonu için 25o - 26o C. aralarında inkubasyona konurlar. Ekimlerin çift olarak yapılması ve birinin 37oC tutulması gereklidir. Ancak, bu ısı (37oC) dermatofitlerin çoğunu inhibe eder. Sistemik infeksiyonlara neden olan mantarların izolasyonu için de çift ekimler yapılır ve biri 37oC. tutulur. Bu ısıda dermatofit mantarların parazitik formu (maya benzeri form) elde edilir.

Kültürlerin Muayenesi

Kutan, Subkutan ve Sistemik Mikozeles

Kolonilerin Makromorfolojisi

Dermatofitlerin identifikasyonunda kolonilerin makromorfolojilerinin incelenmesi önemli yer tutar. Bu muayenede, üreyen saf mantar kolonileri, morfolojik olarak çeşitli yönlerden tetkike tabi tutulur. Bunlar da;

1. Üreme durumu
2. Koloni şekli
3. Koloni topografisi
4. Koloni yapısı (maya benzeri yapı, flamentöz yapı, granüler yapı, tüysüz membranöz yapı)
5. Koloni rengi (üstten ve alttan)
6. Pleomorfizm
7. Faviform dejenerasyon

Kültürlerin Muayenesi

Kutan, Subkutan ve Sistemik Mikozesler

Kolonilerin Mikromorfolojisi

1. Koloniye stereomikroskop altında inceleme
2. Üremiş koloniler boyanarak incelenir
 - a. Hifa
 - b. Mikrokonidiumlar
 - c. Makrokonidiumlar
 - d. Klamidosporlar
 - e. Artrosporlar
 - f. Blastosporlar

Preparat Hazırlama Yöntemleri

Kutan Mikozesler

a) Potasyum Hidroksit (%10)

Potasyum hidroksit veya Sodyum hidroksit, kıl, tüy, deri ve tırnak kazıntılarını muayenede, materyaldeki debrisleri hidrolize etmek ve materyali berraklaştırmak amacı ile kullanılır.

Fungal elementleri iyice görebilmek için, lamdaki preparat hafifçe ısıtılır ve oda ısısında 30-60 dakika bekletilir.

Eğer, çok fazla preparat hazırlanacaksa, bu takdirde % 5 KOH veya NaOH solusyonu kullanılır ve preparatlar bir gece bekletildikten sonra mikroskopta muayene edilirler.

Preparat Hazırlama Yöntemleri

Kutan Mikozesler

a) Potasyum Hidroksit (%10)

Preparatlar aşağıdaki tarzda hazırlanır.

1- Temiz ve kuru bir (veya birkaç) lâmin ortasına bir veya iki damla %10 KOH (veya %10 NaOH) solusyonundan damlatılır.

2- Bu solusyonun üzerine, steril bir pensle tutularak alınan yeterince materyalden konur.

3- Lâmelle kapatılır.

4- Alevde çok hafifçe ısıtılır (50 °C – 60 °C 'de, hiç bir zaman kabarcık çıkmamalı veya kaynatılmamalıdır.)

5- Preparat oda ısısında 30-60 dakika bekletilir. Eğer, alevde ısıtılmış ise, bu süre daha kısa olur.

6- Preparat, önce 100 veya 200 büyütme ile ve sonra da 450-500 büyütme ile muayene edilir.

Preparat Hazırlama Yöntemleri

Kutan Mikozesler

b) Lacto Phenol Pamuk Mavisi

Bu yöntemle muayene, genellikle, kültürlerden yapılır. Solusyonun içindeki laktik asit özellikle mantar elementlerinin muhafazasında, fenol mantarların öldürülmesinde ve pamuk mavisi (anilin mavisi) de boyamada görev alarak iyi bir görünüm sağlarlar.

Preparat Hazırlama Yöntemleri

Kutan Mikozesler

b) Lacto Phenol Pamuk Mavisi

Preparat aşağıdaki tarzda hazırlanır.

- 1- Temiz ve kuru bir lâmin ortasına bir veya iki damla lacto phenol pamuk mavisi solusyonu damlatılır.
- 2- Steril iğne ile, koloninin bir kaç yerinden materyal alarak, bu solüsyon üzerine konur.
- 3- Üzeri temiz bir lâmelle kapatılır.
- 4- Preparat önce, 100-200 ve sonra da 450-500 büyütme ile mikroskop altında muayene edilir.

Preparat Hazırlama Yöntemleri

Kutan Mikozesler

c) Lam kültürü hazırlama

Lâm kültürü aşağıdaki tarzda hazırlanır:

- 1- Bir tüpte eritilmiş ve 45-50oC 'ler arasına kadar ılıklaştırılmış olan SDA (veya patates dekstroz agar, v.s.) steril temiz bir lâm üzerine ince tabaka şekilde dökülür.
- 2- Agar içeren lâm, steril boş bir petri kutusunda bulunan (U) veya (V) şeklindeki bir cam borunun üzerine yerleştirilir.
- 3- Lâm üzerindeki besi yerine, mantar elementlerinden (sporlar, koloni parçaları, miselyum, v.s.) ekilir.
- 4- Petri kutusunun yanlarına steril distile suya batırılmış pamuk yerleştirilir (veya gliserinli su).

Preparat Hazırlama Yöntemleri

Kutan Mikozesler

c) Lam kültürü hazırlama

5- Petri kutusunun kapağı kapatılarak uygun ısıda (25°C - 27°C) ve 4-8 gün inkubasyonda tutulur (koloniler iyice belli oluncaya kadar).

6- Bu sürenin sonunda, kültür kuru bir etüvde 37°C 'de 24 saat bırakılır.

7- Lâm, petri kutusundan çıkarılarak, mikroskop altında muayene edilir. Ancak tehlikeli bir mantar üremesinden şüphe edilirse, bu zaman, kültür % 40 formol buharı ile 2 gün muamele edilerek öldürülür ve sonra muayene edilir.

Rivalier Seydel Yöntemi de kullanılabilir

Preparat Hazırlama Yöntemleri

Kutan Mikozesler

d) Agar blok yöntemi

- 1- Eritilmiş SDA (veya diğer katı besi yerleri) steril bir petri kutusuna ince bir tabaka (2-3 mm. kalınlıkta) halinde dökülür ve katılaşması beklenir.
- 2- Üzerinde, steril ve keskin bir bistüri ile 10 X 10 mm. boyutlarında bloklar çizilir.
- 3- Bunlardan bir tane, steril bir pensle tutularak, steril bir lâmin üzerine (ortasına) yerleştirilir.
- 4- Bu agar içeren lâm, steril petri kutusunda bulunan (U) veya (V) şeklindeki cam borunun (veya cam çubuğun) üzerine yerleştirilir.
- 5- Agar bloğun kenarlarının orta yerine ekimler yapılır.

Preparat Hazırlama Yöntemleri

Kutan Mikozesler

d) Agar blok yöntemi

6- Agar bloğun üzerine lâmel kapatılır.

7- Petri kutusunun içine, distile suya batırılmış pamuk konur (veya %20 su + %80 gliserin karışımı).

8- Kapak kapatıldıktan sonra, 25-27 °C' de 4-8 gün inkubasyonda tutulur (koloniler iyice görülünceye kadar). Petri kutusu mikroskop altına konarak üreyen mantar kolonileri incelenirler.

9- Bu sürenin sonunda, agar bloğun üzerindeki lâmel bir pensle tutularak kaldırılır.

Preparat Hazırlama Yöntemleri

Kutan Mikozesler

d) Agar blok yöntemi

10-Lâmelin mantarlı yüzü üzerine bir damla % 96'lık alkol konur ve bunun mantar kolonileri üzerine yayılması sağlanır. Tam bir kuruma elde edildikten sonra, lâmel, temiz bir lâm üzerinde bulunan lakto fenol pamuk mavisi solusyonuna, mantarlı yüz alt tarafa gelecek tarzda, yatırılır.

11-Preparat mikroskop altında incelenir (fazla boya solusyonu akıtıldıktan sonra etrafı oje ile kapatılabilir).

Geride kalan agar bloğu, üzerinde lakto fenol pamuk mavisi olan lâm üzerine tersine döndürülerek yatırılır ve üzerine lâmel kapatılır. Preparat mikroskop altında incelenir.

Kaynaklar

- 1- Arda M (2006) Temel Mikrobiyoloji 3. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara
- 2- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (1999). Clinical Veterinary Microbiology. London, England: Mosby-Wolfe.
- 3- T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Laboratuvar, Katı Besiyerine Ekim 725TTT102, Ankara 2011. <https://docplayer.biz.tr/15674648-T-c-mglli-eggtgm-bakanligi-laboratuvar-kati-besgyergne-ekgm-725ttt102.html>
- 4- www.mikrobiyoloji.org (Temel mikrobiyoloji Ders notları).
- 5-Bekar M. Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmaların genel karakterleri ve tanı yöntemleri. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Etlik-Ankara. Yayın No:97-1.