

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

GIDA TEKNOLOJİSİ

**MİKROSKOBİK İNCELEME
541GI0068**

Ankara, 2011

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

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR	ii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. PREPARAT	3
1.1. Tanımı ve Preparat Hazırlamanın Önemi	3
1.2. Lamın Temizlenmesi	4
1.2.1. Kullanılmamış Lamaların Temizlenmesi	4
1.2.2. Kullanılmış Lamaların Temizlenmesi	6
1.3. Preparat Hazırlama Aşamaları	7
UYGULAMA FAALİYETİ	8
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	10
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	13
2. MİKROSKOP VE KULLANIMI	13
2.1. Mikroskop Çeşitleri	14
2.2. Mikroskobun Kısımları ve İşlevleri	15
2.3. Mikroskobun Büyütme Gücü	19
2.4. Mikroskopla Çalışma Teknikleri ve Bu Konuda Dikkat Edilecek Noktalar	20
2.5. Mikroskobun Temizliği ve Bakımı	21
2.6. Mikroskop Kullanımı	22
UYGULAMA FAALİYETİ	24
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	25
ÖĞRENME FAALİYETİ-3	29
3. BOYAMA YAPMA	29
3.1. Mikroorganizmaları Boyama Yöntemleri	29
3.1.1. Basit Boyama	30
3.1.2. Diferansiyel Boyama	31
3.1.3. Negatif Boyama	34
3.1.4. Spor Boyama	35
3.2. Boyanmış Preparatların Muhafazası	36
3.3. Boya Çözeltilisinin Hazırlanışı	37
UYGULAMA FAALİYETİ	38
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	41
ÖĞRENME FAALİYETİ-4	44
4. BAKTERİ MORFOLOJİLERİNİ İNCELEME	44
4.1. Bakteri Morfolojilerinin Mikroskopta İncelemeleri Sırasında Dikkat Edilecek Hususlar	45
4.2. Bakteri Hücre Morfolojisi ve Hücre Dizilişleri	46
4.3. Bakteri Morfolojisi ile İlgili Çeşitli Resimler	53
UYGULAMA FAALİYETİ	58
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	60
MODÜL DEĞERLENDİRME	64
CEVAP ANAHTARLARI	69
KAYNAKÇA	72

AÇIKLAMALAR

KOD	541GI0068
ALAN	Gıda Teknolojisi
DAL/MESLEK	Gıda Kontrol/ Gıda Laboratuvar Teknisyeni
MODÜLÜN ADI	Mikroskobik İnceleme
MODÜLÜN TANIMI	Preparat hazırlama, mikroorganizmaları boyayarak mikroskopta inceleme ve tanıma yöntemleri ile ilgili bilgi ve becerilerinin işlendiği bir öğrenme materyalidir.
SÜRE	40/32
ÖN KOŞUL	Bu modül için“ Mikrobiyolojik Analizlere Hazırlık ”, “ Mikrobiyolojik Numune Hazırlama ”, “ Besiyeri Hazırlama ”, “ Kültür Elde Etme ”, ” Genel Mikrobiyoloji ” modüllerini başarmış olmak ön koşuldur.
YETERLİK	Mikroskobik inceleme yapmak.
MODÜLÜN AMACI	Genel Amaç Bu modül ile uygun ortam sağlandığında tekniğine uygun olarak boyama yaparak mikroskobik incelemeleri yapabileceksiniz. Amaçlar 1. Preparat hazırlayabileceksiniz. 2. Mikroskobun temizlik ve bakımını yaparak mikroskobu kullanabileceksiniz. 3. Tekniğine ve amaca uygun olarak boyama yapabileceksiniz. 4. Tekniğine uygun olarak bakteri hücre morfolojisini inceleyebileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Ortam: Laboratuvar ortamı, bilgisayar, internet. Donanım: Lam, kültür, öze, bek, hazırlanmış preparat, gram boya seti, metilen mavisi, kristal violet, sulu fuksin, safranin çini mürekkebi, nigrosin, küvetler, baget, % 96 'lık etil alkol binoküler mikroskop, lamel, çini mürekkebi, kurutma kâğıdı.
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	Sınıf Geçme Yönetmeliğine uygun olarak modülün içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen çoktan seçmeli ve eşleştirmeli test sınavları ile kendinizi ölçeceksiniz. Modül sonunda ise kazandığınız bilgi ve becerileri ölçmek amacıyla, uygulama faaliyetlerindeki işlem basamaklarında gösterdiğiniz başarıya göre değerlendirileceksiniz.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Mikroskopik inceleme, mikroorganizmaları tanımak ve saymak amacıyla yapılan bir işlemdir. Birçok alanda mikroskopik tanımlamaya ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroorganizmaların cins ve türlerinin belirlenmesi, bilimsel çalışmalar için önem taşımaktadır.

Mikroorganizmalar çeşitli boyama yöntemleri ile boyanarak mikroskopta incelenir. Boyama yöntemlerinde tek bir boya kullanıldığı gibi birden fazla boyadan da yararlanır.

Bu modül ile istenilen kültür örneğinden preparat hazırlayıp uygun boyama yapabileceksiniz. Boyadığınız preparatları mikroskobu rahatlıkla kullanarak inceleyebilecek ve elde ettiğiniz görüntülerin hangi bakteri cinsine ait olduğunu anlayabileceksiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-1

AMAÇ

Gerekli ortam sağlandığında usulüne uygun olarak preparat hazırlayabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- İnternet ortamından ve kitaplardan preparat hazırlama çeşitlerini araştırınız.
- Çevrenizdeki mikrobiyoloji laboratuvarına giderek preparat hazırlama çalışmalarını gözlemleyiniz.
- Araştırmalarınızı rapor hâline getirerek sınıfta arkadaşlarınızla paylaşınız.

1. PREPARAT

1.1. Tanımı ve Preparat Hazırlamanın Önemi

Preparat, canlı bakterilerin mikroskopik açıdan incelemesi için hazırlanmış numuneli lam olarak tanımlanır. Mikroskopik inceleme için preparat hazırlamak büyük önem taşımaktadır. Çeşitli şekillerde bakteriyolojik preparatlar hazırlanmaktadır.

Mikroorganizmaların boyutlarının çok küçük oluşu ve renksiz görünmeleri nedeni ile canlı hâlde incelenmeleri zordur. Fakat hücre hareketlerini ve bölünme özelliklerini gözlemek için canlı olarak incelenmeleri gerekir. Preparat hazırlama sırasında mikroorganizmaların şekil ve boyutlarında değişiklik meydana gelmez.

Preparat hazırlamada dikkat edilecek bazı önemli noktalar şunlardır:

- Lamlar çok temiz, yağsız ve çiziksiz olmalıdır.
- Lamlardan yağın uzaklaştırılması için % 50'lik alkol kullanılmalıdır. Alkolü uzaklaştırmak için lamlar saf sudan geçirilmeli ya da yakıldıktan sonra kurutulmalıdır.
- Lamların temizlenmesi için potasyum bikromatlı çözeltide bir gece tutulmaları sonra sırası ile çeşme suyu ve damıtık sudan geçirilmeleri gerekir. En iyisi her defasında yeni lam kullanılmalıdır.
- Preparatların hazırlanmasında kullanılan öze, iğne ve pastör pipetleri de temiz ve steril olmalıdır.

- Preparatlar, lamın ortası ile bir ucu arasındaki bölgede hazırlırsa diğer uçlarından tehlikesizce tutulabilir.
- Tüm preparatlar; işleri bitince % 4'lük formol, % 5'lik fenol veya % 3'lük hipokloritli suya bırakılarak dezenfekte edilmelidir.

1.2. Lamın Temizlenmesi

Preparat hazırlama da kullanılan yaklaşık 25 mm eninde ve 75 mm boyundaki dikdörtgen cama lam denir. Kaliteli bir lamın kalınlığı 1-1.5 mm olmalıdır. Bu kalınlık lama dayanıklılık kazandırır.

İyi bir görüntü elde etmek için lamın temiz ve kaliteli olması gerekir. Tasarruf nedeniyle, aynı lamın defalarca kullanılması zorunluluğu, bu konuyu daha da önemli kılmaktadır.

Lamların kullanılmasına ilişkin dikkat edilecek bazı önemli noktalar şunlardır:

- Lamların kalitesiz olması
- Kullanılmamış lamların kötü koşullarda depolanması
- Yeni veya eski lamların iyice temizlenmeden kullanılması
- Yeniden kullanılan lamların, temizleme sırasında kalitesinin bozulması

Bu nedenle lamların, piyasadan satın alınırken iyi seçilmesi, iyi saklanması/depolanması, gerek ilk kullanımda gerekse tekrar kullanımlarda özenle temizlenmesi gerekir.

1.2.1. Kullanılmamış Lamların Temizlenmesi

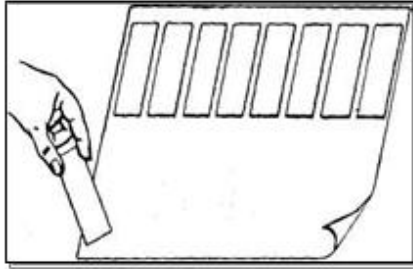
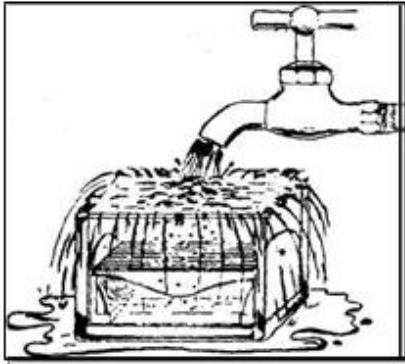
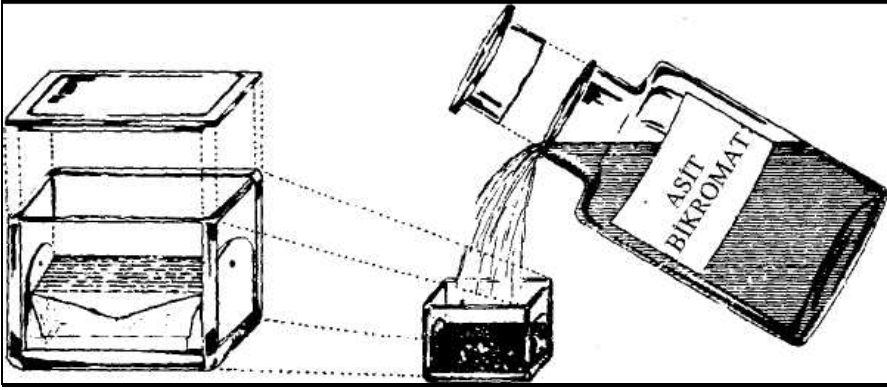
Hiç kullanılmamış lamların yüzeylerinde parlatmak amacıyla kullanılan, bazı kimyasalların kalıntıları vardır. Bu kimyasallar uzaklaştırılmaz ve lamlar temizlenmez ise kalın yayılan numune lama yapışmaz ve yıkama sırasında ayrılır. İnce yayılan numunede ise boşluklar oluşur ve iyi bir yayma elde edilemez. Ayrıca bu kimyasallar, depolanma sırasında leke yapar. İyi koşullarda depolanmayan lamlarda bu lekeler çok daha fazla oluşur. Bu nedenle, yeni kullanıma sokulan lamların da yıkanması ve temizlenmesi gerekir.

İster hiç kullanılmamış isterse kullanılmış olsun bütün lamlar mutlaka yıkanmalı, temizlenmeli ve kullanılmalıdır.

Hiç kullanılmamış lamlar, bikromatlı sülfirik asit çözeltisi içinde 12 saat tutulmak suretiyle temizlenir. Bir diğer yöntem ise bir kısım % 96'lık etil alkol ve bir kısım eter karışımının kullanılmasıdır. Yeni lamlar bu karışımlar ile temizlendikten sonra kullanılır ise yaymalar güzel olur ve sağlıklı sonuçlar verir. "Mikrobiyolojik Analize Hazırlık" modülündeki bilgileri hatırlayınız.

- Lamlar, birbirine temas etmeyecek şekilde ızgaralara yerleştirilir.
- Bikromatlı sülfirik asit çözeltisinin bulunduğu bir kaba konur.
- Burada 12 saat tutulduktan sonra lamlar, bikromatlı sülfirik asit çözeltisinden alınarak musluk altında durulanır.
- Son durulama saf su ile yapılmalıdır.
- Lamlar kuruduktan sonra vakit geçirmeden on ya da yirmilik paketler hâlinde paketlenir.
- Daha sonra, kabın içindeki sıvı saklama kabına aktarılır ve saklanır. Bu sıvı defalarca kullanılabilir (Şekil 1.1).

Paketleme ve kullanıma hazırlama işlemleri sırasında lamlar, kenarlarından tutulmalı ve lamların yüzeyine asla el ve parmaklar dokunmamalıdır. Aksi takdirde lam kirlenir ve tüm emekler boşa gider.

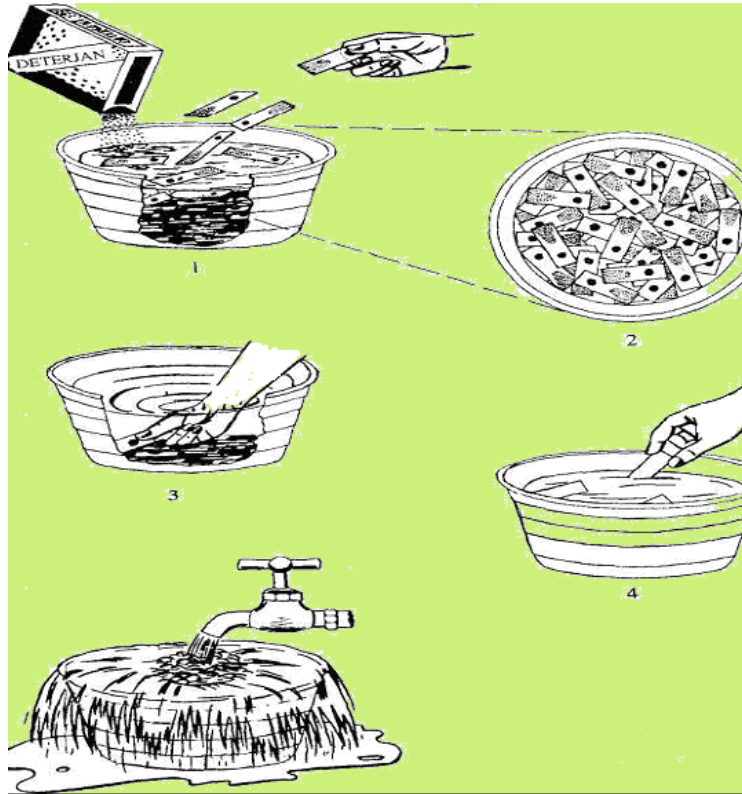


Şekil 1.1: Yeni lamların yıkanması

1.2.2. Kullanılmış Lamların Temizlenmesi

Kullanılmış, kirli lamların yeniden kullanımı için temizlenmesi gerekir. Bu amaçla;

- Derince bir kaba deterjanlı su hazırlanır.
- Lamlar bu suyun içine konulur ve 24 saat veya daha uzun bir süre bekletilir.
- Bu süre tamamlandıktan sonra lamlar yumuşak bir pamuklu bezle ovularak kirler tamamen temizlenir.
- Kirli su boşaltıldıktan sonra daha az deterjanlı bir su ile lamlar bir kez daha yıkanır.
- Musluk suyu altında iyice durulanır.
- Son durulamanın saf su ile yapılması gerekir.
- Kurumaya bırakılır.
- Kuruyan lamlar, vakit geçirmeden on ya da yirmilik paketler hâlinde paketlenir.



Şekil 1.2: Kullanılmış lamların yıkanması

1.3. Preparat Hazırlama Aşamaları

Preparat hazırlama aşamaları aşağıdaki gibidir:

- Temiz bir lam alınır.
- İncelenecek örnek sıvı ise lama damlatılmadan önce iyice çalkalanır. Steril bir pipet yardımıyla bir damla damlatılır.
- Katı ise lama bir damla saf su konur.
- Öze yakılıp soğutulur.
- Örnek alınıp damlanın bir kenarında ezilir.
- Sonra su damlası ile azar azar karıştırılarak lamın üzerine ince bir tabaka hâlinde yayılır (smear yapma).
- Öze tekrar yakılıp soğutulur.
- Lamın havada kuruması beklenir.
- Mikroorganizmaların lam üzerine tesbiti (fiksasyon) yapılır.
- Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelenir.



Preparatların Tesbit Edilmesi (Fiksasyon)

Tesbit, numunelerdeki mikroorganizmaların lama tutunmasını sağlamaktır. Böylece daha sonraki işlem aşamalarında lamdan akıp gitmeleri önlenir. Fiksasyon iki şekilde yapılır:

- **Alevle fiksasyon:** Mikrobiyolojide en çok kullanılan yöntemdir. Preparat havada kurutulduktan sonra lam kenarından tutularak materyalin olmadığı alt kısmı bek alevinin mavi kısmından 2-3 kez hızlıca geçirilir. Preparat uzun süre alevde tutulursa numune yanabilir. Tesbitten sonra lamın soğuması beklenmelidir.
- **Kimyasal maddelerle fiksasyon:** Kimyasal maddelerle tesbit etil alkol, metil alkol veya asetonla yapılabilir.
 - Etil alkolle tesbitte preparat düz bir yere konur. Üzerine saf alkol dökülür. 8-10 dakika sonra saf su ile yıkanır.
 - Saf metil alkolle tesbitte preparat düz bir yere konur. Üzerine metil alkol dökülür ve 3 dakika tutulur.
 - Aseton ile tesbitte preparat asetonunda 5 dakika tutulur. Aseton ile tesbit, özellikle floresans mikroskopisi için hazırlanan preparatlara uygulanır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Katı kültürden preparat hazırlayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>➤ Lamı temizleyiniz.</p>  <p>Resim 1.1: Lamaların bekletilmesi</p>	<ul style="list-style-type: none">➤ Laboratuvar kıyafetlerinizi giyiniz.➤ Ellerinizi her çalışma öncesinde yıkayınız ve dezenfekte ediniz.➤ Gerekli koruyucu malzemelerinizi giyiniz.➤ Çalışma ortamını temizleyiniz.➤ Kullanılan araç-gereçleri temizleyiniz.➤ Bikromatlı sülfirik asit çözeltisi kullanırken vücudunuzun herhangi bir yerine değdirmeyiniz.➤ Yanıcı sıvılarla ateş yanında çalışmayınız.➤ Lamaları temizledikten sonra mutlaka kurutunuz.
<p>➤ Lamın ortasına bir damla saf su koyunuz.</p>	<ul style="list-style-type: none">➤ Saf suyu pipet kullanarak lama aktarınız.➤ Kullandığınız pipetlerin steril olmasına dikkat ediniz.➤ Gereğinden fazla su kullanmayınız.
<p>➤ Özeyi yaktıktan sonra kültürden örnek alınız. Alınan örneği su damlası ile eziniz.</p>  <p>Resim 1.2: Özenin yakılması</p>	<ul style="list-style-type: none">➤ Ezilen örneği fazla dağıtmayınız

- Havada kuruması için bekleyiniz.



Resim 1.3: Havada kurutma

Acele etmeyiniz.

- Lamın alt yüzünü üç defa bek alevinden geçiriniz.



Resim 1.4: Lamı bek alevinden geçirme

- Lamı mavi alevden geçiriniz.
- Alevde fazla tutmayınız. Preparat kuruyabilir.
- Negatif boyamada alevde tesbit işlemi yapılmaz.
- Laboratuvar önlüğünüzü çıkarıp asınız.
- Ellerinizi her çalışma sonrasında yıkayınız.
- Koruyucu malzemelerinizi çıkarıp çöpe atınız.
- Çalışma ortamını temizleyiniz.
- Kullanılan araç-gereçleri temizleyiniz.
- Laboratuvar son kontrollerini yapınız.

Çalışmaya başlamadan önce lamlar mutlaka temizlenmiş olmalıdır.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki şıklardan doğru olanı işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi preparatın tanımıdır?
A) Temizleme çözeltisidir.
B) Mikroorganizmaları tespit etme işlemidir.
C) Bir sterilizasyon yöntemidir.
D) Mikroskopta incelenmek üzere hazırlanmış numeli lamdır.
2. Aşağıdakilerden hangisi preparat hazırlarken dikkat edilecek noktalardan birisidir?
A) Preparat hazırlamada kullanılan araçlar daha önceden kullanılmamış olmalıdır.
B) Preparat üzerinden elle tutulmalıdır.
C) Lamlar çok temiz, yağsız ve çiziksiz olmalıdır.
D) Hiç kullanılmamış lamların temizlenmesine gerek yoktur.
3. Hiç kullanılmamış lamlar aşağıdakilerden hangisi ile temizlenmelidir?
A) Hipokloritli su
B) Bikromatlı sülfirik asit çözeltisi
C) Fenol
D) Formol
4. Aşağıdakilerden hangisi smear yapma olarak tanımlanır?
A) İncelenecek örneğin lam üzerine ince bir şekilde yayılması
B) Lam üzerine örneğin kalın bir şekilde yayılması
C) Katı örneğin lam üzerinde incelenmesi
D) Sıvı örneğin lam üzerinde incelenmesi
5. Aşağıdakilerden hangisi numunelerdeki mikroorganizmaların lama tutunmasını sağlamak için yapılmaz?
A) Aseton ile tesbit
B) Alevden geçirme
C) Etil alkol ile tesbit
D) Havada kurutma

Aşağıdaki ifadeleri dikkatlice okuduktan sonra, parantezin içine doğru ise (D) harfi, yanlış ise (Y) harfi koyarak cevaplandırınız.

6. () Temizlenmiş lamlar, yumuşak dokulu bir tülbentle kurulanmalıdır.
7. () Kullanılmamış lamların kötü koşullarda saklanması incelemeyi olumsuz etkiler.
8. () Mikroorganizmalar, preparat hazırlama aşamasında şekil değişikliğine uğrar.
9. () Preparatlar, bek alevinin mavi kısmından geçirilir.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarı ile karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt yaşadığınız sorularla ilgili konuları tekrar ediniz.

Tüm sorulara doğru cevap verdiyseniz uygulamalı teste geçiniz.

UYGULAMALI TEST

Sıvı kültürden preparat hazırlayınız. Yaptığınız işlemleri aşağıdaki değerlendirme tablosuna göre kontrol ediniz.

Değerlendirme Ölçütleri	Evet	Hayır
1. Laboratuvar önlüğünüzü giydiniz mi?		
2. Çalışma ortamınızı temizlediniz mi?		
3. Kullanacağınız araç-gereçlerin temizliğini kontrol ettiniz mi?		
4. Beki yaktınız mı?		
5. Sıvı kültürü hazırladınız mı?		
6. Sıvı kültürü kullanmadan önce iyice çalkaladınız mı?		
7. Kültürden örneği steril bir pipetle aldınız mı?		
8. Lamın üzerine örneği yaydınız mı?		
9. Kuruması için beklediniz mi?		
10. Lamı mavi alevden geçirerek tespit yaptınız mı?		
11. Kullandığınız araç-gereçleri temizleyip kaldırdınız mı?		
12. Ellerinizi yıkayıp dezenfekte ettiniz mi?		
13. Laboratuvar son kontrollerini yaptınız mı?		
14. Önlüğünüzü çıkarıp astınız mı?		

DEĞERLENDİRME

Yapılan değerlendirme sonunda “**Hayır**” şeklindeki cevaplarınızı bir daha gözden geçiriniz. Kendinizi yeterli görmüyorsanız öğrenme faaliyetini tekrar ediniz. Cevaplarınızın tamamı “**Evet**” ise bir sonraki faaliyete geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

AMAÇ

Uygun ortam sağlandığında mikroskopun temizlik ve bakımını yaparak mikroskobu kullanabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Mikroskop ve kullanımının tarihçesini kütüphane ve internetten araştırınız.
- Mikroskopun kullanım alanlarını ve günümüzde en çok tercih edilen mikroskop çeşitlerini araştırınız.

2. MİKROSKOP VE KULLANIMI

Mikroorganizmalar, gözle görülmeyecek kadar küçük canlı varlıklardır. İnsan gözü 200–250 mikrometreden yukarı olan büyüklükteki objeleri görebilir. Bu limitin aşağısını göremez. Mikroorganizmaların boyutları ise 0.1 -10 mikrometre(μm) arasında değişir. Bu nedenle mikropları görmede ve bunlar hakkında bilgi edinmede özel ve büyütücü aletler kullanma zorunluluğu doğmuştur. Bu amaçla mikroskop denilen araçlar kullanılmaktadır.

Mikrometre(μm) = 10^{-3} (0.001) mm
Nanometre(nm)= 10^{-6} (0.000001) mm

Mikroskop kısaca; “gözle görülmeyecek kadar küçük objelerin görülmesine yarayan alettir”şeklinde tanımlanabilir.

İlk mikroskop 1660 yılında Hollandalı bir tüccar olan Anton ven Leuwenhoek tarafından bulunmuştur. Daha sonra İngiliz R.Hook tarafından geliştirilmiştir. Günümüzde büyütme gücü 100.000’leri geçen elektron mikroskobuna kadar gelinmiştir.

Mikroskopun işlevi, çıplak gözle görülmeyecek küçüklükteki cisimlerin görüntüsünü büyütüp gözle görünür hâle getirmek ve onların ayrıntılı bir şekilde incelenmesine olanak sağlamaktır.

Bunu, yapısındaki büyüteçler (mercekler) aracılığı ile yapar. Dolayısı ile mikroskop, özünde bir büyüteçler sistemidir. Objektifteki büyüteç tarafından büyütülerek şekillendirilen

cismin görüntüsü, oküler tarafından ikinci kez büyütülür, yeterli büyüklüğe ulaşır ve düzeltilir. Böylece, gözle görülemeyen cisimlerin incelenmesi sağlanır.

Mikroskopun, cismin görüntüsünü büyütme gücüne mikroskopun “ayırım (resolüsyon)/ büyütme gücü” denir.



Resim 2.1:Çeşitli mikroskoplar

2.1. Mikroskop Çeşitleri

Çeşitli amaçlara dönük olarak beş çeşit mikroskop geliştirilmiştir. Bunlar;

- Basit ışık mikroskobu
- Karanlık saha mikroskobu
- Faz-kontrast mikroskobu
- Fluoresant mikroskobu
- Elektron mikroskobudur.

Basit ışık mikroskobu: Görünür ışık yardımıyla, çıplak gözle görülemeyen organizma ya da organellerin görülmesini sağlayan mikroskoplardır. Büyütme gücü 1000–3000 arasındadır.

Karanlık saha mikroskobu: Özellikle Spiroketlerin teşhisinde ve mikroorganizmaların hareket muayenelerinde kullanılır. Özel kondansörler yardımıyla sağlanan karanlık sahada alttan gelen ışık, kondansatörün ortasındaki siyah, ışık geçirmeyen bir bölge nedeniyle yanlardan girerek preparat üzerine gelir. Bu sistemde ışık, tüp içine direk olarak geçmez ve yanlara dağılır. Ancak karanlık alanda bulunan mikroorganizmanın yansıttığı ışık göze ulaşır. Bunun sonucunda ise mikroorganizmalar parlak, saha ise karanlık görülür.

Faz-Kontrast mikroskopu: Boyanmamış canlı hücrelerin iç yapılarının incelenmesinde kullanılır. Hücre ve hücre içindeki yapıların derinlik ve yoğunlukları farklı olduğundan objeden geçen ışınların fazında değişiklik meydana gelir. Bu değişim, yapıların görüntüsünü de ortaya çıkarır. Faz kontrast mikroskopu bu presibinden hareketle geliştirilmiştir.

Fluoessant mikroskopu: Bu mikroskopta kısa dalga boyu ışınlar kullanılır. Çoğu 0.1 μm cisimlerin görünmesine olanak sağlar. Bazı maddeler ultraviole (UV) ışınlarına maruz bırakılırsa insan gözünün görebileceği dalga boyuna sahip, fluoessant boyalarla boyanarak, UV ışınları altında incelenirse ışık saçan parlak cisimler hâlinde görülürler.

Fluoessant mikroskopu yüksek basınçlı cıva lambası ile elde edilen UV ışınları ile çalışır. Gözü korumak için okülere yerleştirilen özel opak filtreler kullanılır. Diğer bir filtre sistemi de UV ışınları veren kaynağın önüne konur. Bu filtre sadece 420 nm dalga boyundaki mavi ışığın geçmesine izin verir.

Bu mikroskop antijen- antikor reaksiyonlarını belirlemek amacıyla da kullanılmaktadır.

Elektron mikroskopu: 50.000 ya da daha büyük büyütmelidir. Çapları 0.001 μm olan cisimleri ve mikroorganizmaları(virüsler) görme olanağı sağlar. Son yıllarda mikrobiyoloji alanında çok kullanılan ve geliştirilmiş bir mikroskop türüdür. Elektron mikroskopu ile her tür mikroorganizmayı ve hücreyi incelemek ve yapısı hakkında bilgi edinmek mümkündür.

Bu mikroskopta kullanılan elektronların dalga boyunun, normal ışığından 100.000 defa daha kısa olması, büyütmenin çok fazla olmasına temel teşkil eder.

Elektron mikroskopları ile ışık mikroskopları arasındaki temel farklar şunlardır:

- Elektron mikroskopu, ışık kaynağı olarak dalga boyu elektronlar kullanırken, ışık mikroskopunda basit ışık kaynaklarından yararlanır.
- Elektron mikroskopunda elektromanyetik kondansör bulunurken ışık mikroskopunda bunun yerine cam mercekler almıştır.

2.2. Mikroskopun Kısımları ve İşlevleri

Laboratuvarlarda en çok kullanılan basit ışık mikroskopudur. Basit ışık mikroskopu genel olarak iki kısımdan oluşur (Şekil 2.1) Bunlar:

- Mekanik kısım
- Optik kısımdır.

Mekanik Kısım: Mikroskobun optik parçalarının üzerine monte edildiği tüp, kol, ayak ve tabla gibi metal parçalardan oluşan kısımdır.

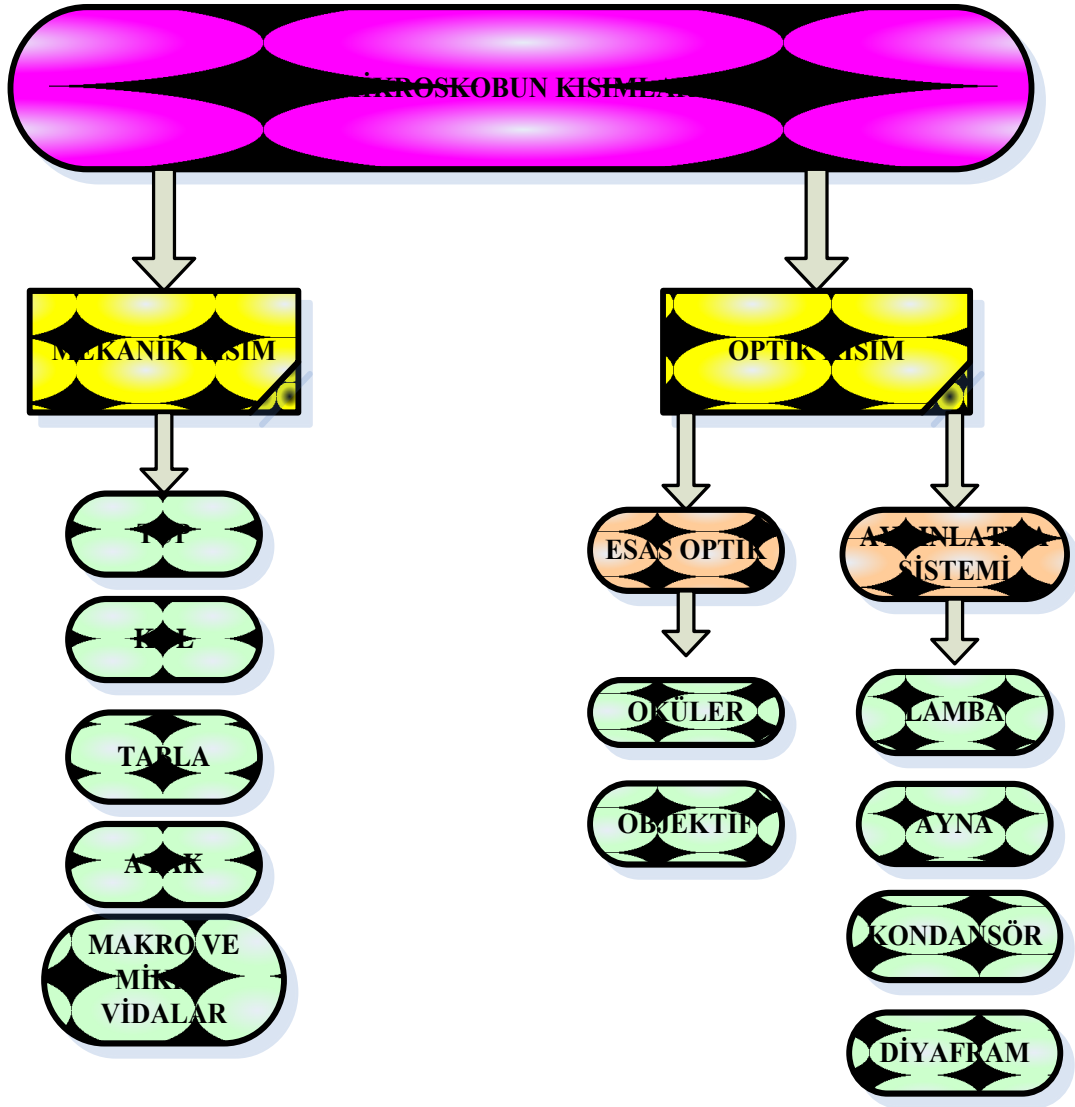
Tüp: Genellikle 160 mm uzunluğundadır. Bazen birbirine geçmeli iki tüpten oluşabilir. Bunlar ana tüp ve çekme tüptür.

Kol: Mikroskobu tutmaya yarar. Bazıları sabit, bazıları eklemli olarak ayağa bağlanmıştır. Mikroskobu taşımak için kullanılır.

Tabla: Üzerine obje konan metal kısımdır. Objeye masası olarak da adlandırılır. Tablanın, sabit ve hareketli olanları vardır. Ortasında pupilla adı verilen yuvarlak bir delik bulunur. Aşağıdan gelen ışık, bu delikten geçerek incelenecek cismi aydınlatır. Tabla üzerinde, incelenecek preparatı tutan (sabitlestiren) ileri geri hareket ettiren bir mekanizma bulunur. Bu sayede preparatın çeşitli bölgeleri objektifin altına getirilerek farklı alanlar incelenir. İki vidası vardır. Bunlardan birisi sağa sola harekete, diğeri ise ileri geri harekete kumanda eder.

Ayak: Mikroskobun yere oturmasını sağlar.

Makro ve mikro vidalar: Kolun yanında bulunan tüpü veya tablayı aşağı yukarı hareket ettiren vidalardır. Mikroskop tüpü, tablayı aşağı yukarı hareket ettiren özellikteyse, bu vidalar objektifin preparata yaklaşım uzaklaşmasını sağlar. Ters durumda ise aşağı yukarı hareketi sağlayan vidalar tablayı objektife yaklaştırmak uzaklaştırır. Tüpün ve tablanın bu hareketleri sayesinde mikroskobun ayar yapılarak cismin görüntüsü netleştirilir.

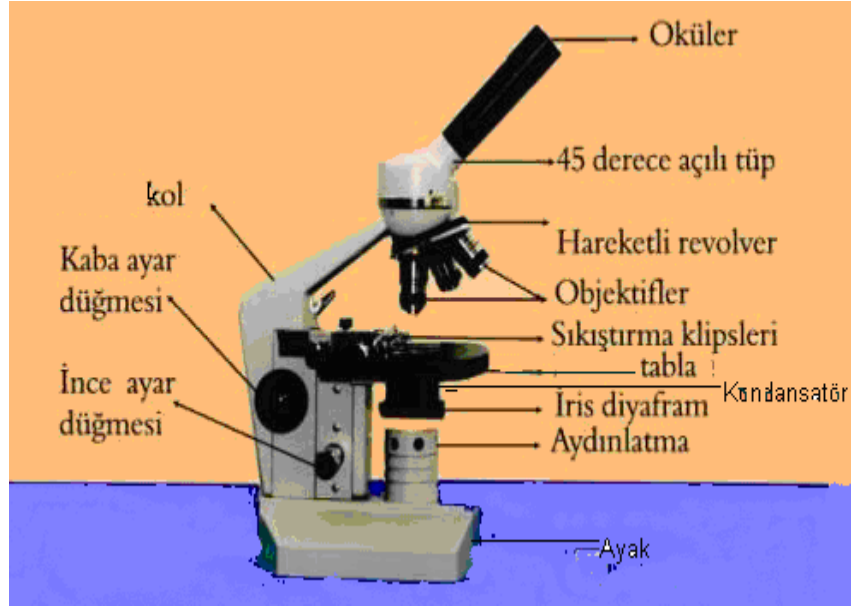


Şekil 2.1: Mikroskop kısımları

Mikroskopun ayar vidası iki çeşittir. Bunlar;

- Kaba ayar vidası (makro vida)
- İnce ayar vidasıdır (mikro vida)

Adlarından da anlaşılacağı üzere kaba ayar vidası, mikroskop tüpünü objektifi daha hızlı ve büyük adımlı hareket ettirir ve kaba ayar yapmaya yarar. İnce ayar vidası ise objektifi çok yavaş ve küçük adımlı hareket ettirir. Dolayısıyla daha ince ve detaylı ayar yapar. Preparattaki alanın görüntüsünü tam netleştirmek için bu vidadan yararlanılır.



Resim 2.2: Mikroskop kısımları

Optik Kısım

➤ Esas Optik Kısım

- **Oküler(mikroskop tüpünün gözle bakılan kısmı);** Bir mercek sistemidir Mikroskopun göze yakın olan büyüteci ve bu büyütecin yerleştirildiği tüpe oküler denir. Bu tüplerin yanlarında 3x, 5x, 10x, 20x gibi rakamlar yazılıdır. Bunlar okülerin büyütme gücünü gösterir. Mikroskopun tipine göre tek ya da iki adet oküler tüpü bulunur. Tek okülerli olan ve tek gözle bakılanlara, **monooküler mikroskop**, çift okülerli, yani iki gözle bakılanlara ise **binooküler mikroskop** denir. Binooküler mikroskoplarda, iki oküleri birbirine yaklaşıp uzaklaştıran bir düzenek vardır. Bu sayede iki oküler arasındaki uzaklık ayarlanabilir. Böylece, okülerler arasındaki uzaklık, inceleme yapan kişinin iki gözü arasındaki uzaklığa göre ayarlanabilir. Bazı mikroskoplarda oküleri taşıyan başlık değiştirilerek trinooküler başlık takılabilir. Buraya yerleştirilecek bir fotoğraf makinesiyle incelenen preparatın fotoğrafı çekilebilir.
- **Objektif (mikroskop tüpünün lama bakan kısmı):**Bu kısımda iki ile dört arasında değişen sayıda, delikleri olan bir döner başlık (revolver) bulunur. Büyüteçlerin bulunduğu tüpler (objektifler), bu döner başlık üzerindeki deliklere monte edilir. Her bir objektifin kenarında,10x, 40x, 60x, 90x, 100x gibi rakamlar yazılıdır. Bunlar, objektifin büyütme gücünü gösterir. Döner başlık, bu objektiflerden istenilenin kullanılmasına olanak sağlar.

Merceğin Adı	Objektif Büyütmesi	Çalışma Uzaklığı
İnceleme Merceği	X 2.5 -4 (4)	25 -55 mm
Düşük Büyütme Merceği	X 10 (10)	5 -10 mm
Yüksek Büyütme Merceği	X 40 -50 (43)	0.15 -0.60 mm
İmmersiyon Yağı Merceği	X 90 -100 (100)	0.05 -0.15 mm

Tablo 2.1: İnceleme yapmak için objektif mercekleri

- 100x objektife immersiyon objektifi de denir. Objektif üzerine immersiyon yağı damlatılarak kullanılır. Çünkü immersiyon objektifinin merceği çok küçüktür. Objeden geçerek gelen ışınlar yeteri kadar bu objektife giremez. Bunu sağlamak için immersiyon (sedir yağı) yağından yararlanır. İmmersiyon yağının kırılma indisi camın kırılma indisine çok yakındır. Bu nedenle ışınlar kırılmadan merceğe girebilir. Bu yağ preparat üzerine damlatılır ve objektif immersiyon yağı ile temas ettirilerek inceleme yapılır.
- **Aydınlatma Sistemi**
- **Işık kaynağı (lamba):** Mikroskoba ışık sağlayan aydınlatma kaynağıdır. Işık mikroskopları için en uygun ışık kaynağı elektrik lambasıdır. Mikroskoptan ayrı portatif lambalar olabileceği gibi mikroskobun ayakları arasına monte edilmiş sabit lambalar da olabilir.
 - **Ayna:** Kendi sabit ışık lambası bulunmayan ve dış kaynaktan ışığı yansıtan mikroskoplarda bulunur. İki ayak arasına, kondansörün altına monte edilen, hareketli yuvarlak ve ikiyüzlü bir aynadır. Işık kaynağından gelen ışıkları kondansöre yansıtmaya yarar. Bir yüzü düz, diğer yüzü ise çukur aynadır. Çukur tarafı, boyamasız ve kaba preparatların incelenmesinde küçük büyütmeli objektiflerle, düz tarafı ise yüksek büyütmeli objektiflerde kullanılır. Dolayısı ile immersiyon objektifi ile düz tarafı kullanılır.
 - **Kondansör:** Işık kaynağından gelen ışığı toplayan ve tabla deliğinden geçirerek, preparatın üst yüzeyine düşüren aygıttır. Altında süzgeç (filtre), üstünde ise diyafram bulunur. Kondansör, ayar vidası yardımı ile aşağı yukarı hareket ettirilebilir. Böylece ışınların toplanma yerinin cismin üzerinde olması sağlanır. Çukur ayna kullanılırken kondansör tamamen aşağıya indirilir. Düz aynada ise iyice yukarıya kaldırılarak preparata yaklaştırılır.
 - **Diyafram** Kondansörün altında yer alır ve kondansöre giden ışığın az veya çok olmasını sağlar. Yanında bulunan küçük bir kol (diyafram ayar kolu) yardımı ile diyaframın deliğinin genişliği büyütülüp küçültülebilir ya da açılıp kapatılabilir. Böylece, istenilen ışık miktarı ayarlanabilir. İmmersiyon çalışmalarında diyafram genellikle tam açılır. Hareket muayenelerinde ise iyi bir kontrast sağlamak için gerektiği kadar kapatılır veya kondansör hafifçe aşağıya indirilir.

2.3. Mikroskobun Büyütme Gücü

Objektif, kendi odak uzaklığının altında bulunan bir cismin görüntüsünü okülere hakiki, ters ve büyük olarak aktarır. Bu görüntü okülerde daha da büyütülerek göze iletilir.

Büyütme (B)= Objektif Büyütmesi x Oküler Büyütmesi

formülü ile bulunur. Objektif büyütmesi ise;

$$\text{Objektif Büyütmesi} = \frac{\text{Tüp Uzunluğu}}{\text{Objektif Odak Uzaklığı}} \text{ 'dır}$$

Örnek: Tüp uzunluğu 160 mm ve objektif odak uzaklığı 16 mm olan bir mikroskopta, 15x büyütmeli oküler kullanıldığında mikroskobun büyütmesi ne olur? Hesaplayınız.

$$\begin{aligned} \text{Objektif büyütmesi} &= 160 / 16 \\ &= 10 \text{ 'dur.} \end{aligned}$$

10x oküler kullanıldığında çeşitli objektiflere göre mikroskop büyütmeleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Merçeğin Adı	Objektif	Büyütme
Az büyütme güçlü	10x	100
Yüksek Büyütme	60x	600
İmmersiyon	97x	970
	100x	1000

Tablo 2.2: Mikroskop Büyütmeleri

2.4. Mikroskopla Çalışma Teknikleri ve Bu Konuda Dikkat Edilecek Noktalar

- Mikroskop, kullanılmadığı durumlarda özel kılıfı ve kutusu içinde tozsuz bir ortamda muhafaza edilmelidir.
- Mikroskop, bir yerden diğer bir yere taşınırken çarpma ve darbelerden korunmalı ve mikroskop iki elle destek vererek taşınmalıdır.
- Mikroskop kısımları hiçbir zaman ıslak bırakılmamalıdır.
- Her kullanımdan sonra mutlaka temizlenmelidir.

2.5. Mikroskopun Temizliği ve Bakımı

Bir mikroskoptan iyi görüntü elde edilmesi;

- Mikroskopun bakımına
- Optik kısımların temizliğine
- Lamin, kaliteli ve temiz olmasına
- Preparatın düzgün hazırlanmasına
- Işığ kaynağının iyi olması ve iyi ayarlanmasına
- Uygun ayna, oküler objektif kullanılmasına
- Kondansörün ve diyaframın iyi ayarlanmasına bağlıdır.

Bir mikroskoptan iyi bir görüntü elde edilmesi büyük oranda mikroskopun bakımı, temizliği ve ayarlanması ile ilgilidir. Bu nedenle mikroskopun temizlik ve bakımına önem vermek gerekir. Diğer bir ifade ile hem iyi görüntü elde etmek hem de mikroskopun ömrünü uzatmak için; mikroskopların kullanılmadan önce ve kullanıldıktan sonra çok dikkatli bir şekilde temizlenmesi zorunludur.

Preparat incelemelerinden sonra başta immersiyon objektifi olmak üzere mikroskopun herhangi bir yerinde immersiyon bulaşığı bırakılmamalıdır. İmmersiyon yağı bulaşık ve kalıntılarını temizlemek için çok az miktarda ksilol ile nemlendirilmiş yumuşak dokulu bir tülbent kullanılır.

Bu işlem sırasında, yumuşak dokulu tülbent fazla ıslatılmış olmamalıdır. Eğer fazla ıslatılır ise tülbentten taşan ksilol objektifin içine girerek ona zarar verir. Okülere immersiyon yağı bulaştırılmaması, özen gösterilecek diğer bir konudur.

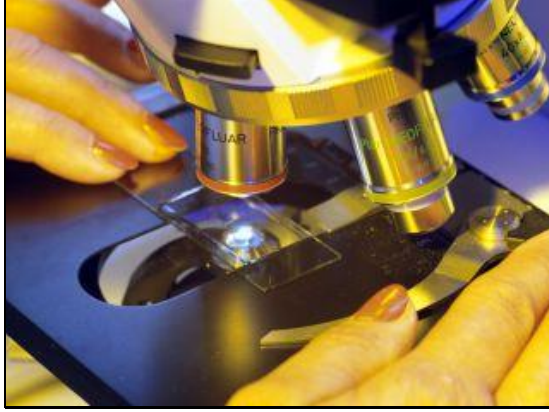
Mikroskopun dış kısımlarının temizlenmesinde toz bezi, tülbent, gözlük bezi gibi yumuşak ve pamuklu bezler kullanılır. Optik kısımların temizliğinde ise mercek kâğıdı veya yumuşak dokulu bir tülbent kullanılır. Optik kısma alkol asla değmemelidir.

Mikroskoptaki objektiflerin en büyük düşmanı toz, nem ve dikkatsiz kullanımdır. Mikroskopların mercekleri tozlu, nemli ve yüksek sıcaklıkta bırakıldığında bir yıl içinde bozulur ve özelliğini kaybeder. Mikroskop, asla güneşte veya sıcakta bırakılmamalıdır.

Günlük çalışma bittikten ve mikroskopun temizliği tamamlandıktan sonra mikroskopun örtüsü örtülmeli ve kabına yerleştirilerek muhafaza edilmelidir.

2.6. Mikroskop Kullanımı

- Mikroskopla çalışılmadan önce kutusundan çıkarılarak masaya yerleştirilir.
- Mikroskopun parçalarının tam olup olmadığı ve hareket edip etmediği kontrol edilir.
- Mercek sistemleri usulüne uygun şekilde temizlenir.
- Işık kaynağı devreye sokulur. Lamba portatif ise yeri ve yüksekliği kontrol edilir, ayarlanır ve çalıştırılır.
- Kondansörün en üst konumda, diyaframın tamamen açık, aynanın düz kısmının yukarıda olup olmadığı kontrol edilir. Uygunsuz olan ayar var ise düzeltilir.
- Binoküler mikroskopta okülerin aralığı incelemeyi yapan kişinin göz aralığına göre ayarlanır.
- Mikroskopun ışık ayarı ve temizliği kontrol edilir. Kir, leke varsa temizlenir.
- Tablanın kenarından bakılarak kondansöre yeterli düzeyde bir ışığın gelip gelmediği kontrol edilir. Daha sonra bu kontrol işlemi okülerden bakılarak tekrarlanır. Işık kaynağı ayarlanarak okülere yeterli ışığın gelmesi sağlanır. Mikroskop aynalı ise ayna ayarı yapılarak yukarıdaki şekilde bir yol izlenmelidir.
- Preparat tablaya daima üst yüzü (örnek konulan ve boyama yapılan yüzü) objektife bakacak şekilde yerleştirilir.
- Tablanın ayar vidaları ile oynanarak incelenecek kısım, görüş sahası hizasına gelecek şekilde preparat hareket ettirilir.
- İmmersiyon objektifi ile çalışılmıyorsa makro vida ile oynanarak, okülerden görüntü almaya çalışılır. Görüntü alındıktan sonra ışık kaynağı, diyafram ve kondansör ile oynanarak tekrar bir ışık ayarlaması yapılır. En son olarak da mikro vidayla oynanarak ince görüntü ayarı yapılarak incelemeye geçilir.
- İmmersiyon objektifi ile çalışılıyorsa preparat üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılır. Preparat, tablaya yerleştirilerek incelenecek kısım (immersiyon yağı damlatılan kısım) görüş hattının hizasına gelecek şekilde ayarlama yapılır. Tablanın kenarından bakarak makro vida yardımıyla immersiyon objektifinin yağa yavaşça dalması sağlanır. Daha sonra gözle okülerden bakılır ve makrovida çok yavaş olarak aksi yönde çevrilerek görüş almaya çalışılır. Görüntü alınca mikro vidaya geçilir ve ince ayar yapılarak gözlem gerçekleştirilir. İmmersiyon objektifi ile çalışırken objektifin hiçbir şekilde yağ damlasından ayrılmasına izin verilmemelidir. Aksi takdirde görüntü sağlanamaz.





Resim 2.3: Preparatın mikroskop tablasına yerleştirilmesi

- Mikroskopta hiçbir zaman ilk ayarlanan görüş sahasının incelenmesiyle yetinilmez. İlk görüş sahası, preparatın mikroorganizmaların yayılmadığı boş bir bölgesine ait olabilir. Buna bağlı olarak da hiçbir mikroorganizma görüntüsü alınmaz. Bu nedenlerle, tablanın ayar vidalarıyla oynanarak uygun birkaç görüş sahası bulunmalı ve bunların her biri ayrı ayrı incelemeye alınmalıdır.
- İnceleme sürdürülürken göz okülerde, bir el daima mikro vidada, diğer el ise tablanın ayar vidalarında olacak şekilde hareket edilmelidir. Böylece sağlıklı bir gözlem yapılabilir.
- İnceleme sürerken duruma göre ışık kaynağı, diyafram ve kondansör ile yeniden gerekli ışık ayarlamaları yapılabilir. Bazı mikroskobik incelemelerde diyafram belli ölçülerde veya tamamen kısılabılır, kondansör aşağı indirilebilir.
- İnceleme bittikten sonra mikroskop usulüne uygun olarak temizlenir, kurulanır ve kılıfına geçirilerek kutusu içinde muhafaza edilir.

UYGULAMA FAALİYETİ

Mikroskop kullanarak daha önceden hazırlanmış bir preparatı inceleyiniz.

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>➤ Mikroskobu usulüne uygun olarak temizleyiniz.</p> 	<ul style="list-style-type: none">➤ Laboratuvar kıyafetlerinizi giyiniz.➤ Ellerinizi her çalışma öncesinde yıkayınız ve dezenfekte ediniz.➤ Çalışma ortamını temizleyiniz.➤ Kullanılan araç gereçlerin temizliğini kontrol ediniz.➤ Optik kısma asla alkol değdirmeyiniz.➤ Islak bırakmayınız.➤ Optik kısımların temizliğinde mercek kâğıdı veya yumuşak dokulu bir tülbent kullanınız.
<p>➤ Preparatı tüm objektiflerle inceleyiniz.</p> 	<ul style="list-style-type: none">➤ Mikroskobu uygun yere yerleştiriniz.➤ Mikroskobu daima kolundan tutarak kullanınız.➤ Mikroskobun parçalarının eksiz olmasına dikkat ediniz.➤ Lambasını yakınız ya da aynayı ışık kaynağına çeviriniz.➤ İncelenecek preparatı yerleştiriniz.➤ Objektifi ayarlayınız.➤ Görüntüyü, netleştirmeyi unutmayınız.➤ Mikroskobun herhangi bir yerinde immersiyon bulaşığı bırakmayınız.➤ İşiniz bitince kılıfına koymayı ve yerine kaldırmayı unutmayınız.➤ Laboratuvar önlüğünüzü çıkarıp asınız.➤ Ellerinizi her çalışma sonrasında yıkayınız.➤ Çalışma ortamını temizleyiniz.➤ Kullanılan araç ve gereçleri temizleyiniz.➤ Laboratuvar son kontrollerini yapınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki sııklardan doğru olanı işaretleyiniz.

1. İmmersiyon objektifin büyütme gücü ne kadardır?
A) 10x
B) 40x
C) 100x
D) 60x
2. Işık kaynağı olarak ultraviyole ışınlarının kullanıldığı mikroskop hangisidir?
A) Fluoresant mikroskobu
B) Faz- kontrast mikroskobu
C) Elektron mikroskobu
D) Karanlık saha mikroskobu
3. En fazla büyütme olanağı olan mikroskop aşağıdakilerden hangisidir?
A) Işık mikroskobu
B) Karanlık saha mikroskobu
C) Elektron mikroskobu
D) Fluoresant mikroskobu
4. İlk mikroskop kim tarafından bulunmuştur?
A).Darwin B).Hooke C).Pasteur D).Leuwenhoek
5. Günümüzde en çok kullanım alanı olan mikroskop aşağıdakilerden hangisidir?
A) Basit ışık mikroskobu
B) Elektron mikroskobu
C) Faz-kontrast mikroskobu
D) Karanlık alan mikroskobu

Aşağıdaki ifadeleri dikkatlice okuduktan sonra, baş tarafta bulunan parantezin içine doğru ise (D) harfi, yanlış ise (Y) harfi koyarak cevaplandırınız.

6. () Mikroskopta hiçbir zaman ilk ayarlanan görüş sahasının incelenmesiyle yetinilmemelidir.
7. () İnceleme sürdürülürken makro ve mikro vidalar hareket ettirilmemelidir.
8. () İmmersiyon objektifi ile çalışılırken preparat üzerine yağ damlatılmamalıdır.
9. () Mikroskop güneşte ve sıcakta bırakılmamalıdır.
10. () Optik kısımların temizliğinde toz bezi kullanılmalıdır.

Aşağıdaki boşlukları uygun kelimelerle doldurunuz.

11. Gözle görülmeyecek kadar küçük objelerin görülmesine yarayan aletedenir.
12. Elektron mikroskopunda cam merceğe yerinekondansatör kullanılır.
13. Kaba ayar vidasına aynı zamanda vida da denir.
14. Oküler ve objektif mikroskopun kısmını oluşturur.
15. İki gözle bakılan mikroskoba mikroskop denir.

Mekanik kısım	Binoküler
Elektromanyetik	Mikroskop
Büyüteç	Makro
Mikro	Esas optik

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarı ile karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt yaşadığımız sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrar inceleyiniz.

Tüm sorulara doğru cevap verdiyseniz uygulamalı teste geçiniz.

UYGULAMALI TEST

Size verilen preparatı lambalı binoküler bir mikroskopta inceleyiniz. Yaptığınız işlemleri aşağıdaki değerlendirme tablosuna göre kontrol ediniz.

Değerlendirme Ölçütleri	Evet	Hayır
1. Laboratuvar önlüğünüzü giydiniz mi?		
2. Çalışma ortamınızı temizlediniz mi?		
3. Kullanacağınız araç- gereçleri temizlediniz mi?		
4. Mikroskobu kutusundan çıkararak masaya yerleştirdiniz mi?		
5. Mikroskobun parçalarının tam olup olmadığını ve hareket edip etmediği kontrol ettiniz mi?		
6. Mercek sistemlerini usulüne uygun şekilde temizlediniz mi?		
7. Mikroskobun lambasını yaktınız mı?		
8. Kondansörün en üst konumda, diyaframın tamamen açık, olup olmadığını kontrol ettiniz mi?		
9. Okülerlerin aralığını gözünüze göre ayarladınız mı?		
10. Tablanın kenarından bakarak kondansöre yeterli düzeyde bir ışığın gelip gelmediğini kontrol ettiniz mi?		
11. Kontrol işlemini okülerden bakarak tekrar ettiniz mi?		
12. Mikroskop tablasına incelenecek preparatı örnek üstte kalacak şekilde yerleştirdiniz mi?		
13. Tabla üstündeki kısıcağlar yardımıyla preparatı sabitleştirdiniz mi?		
14. Tablanın ayar vidaları ile oynayarak incelenecek kısmın, görüş sahasına girecek şekilde preparatı hareket ettirdiniz mi?		
15. Makro vida ile oynayarak okülerden görüntü almaya çalıştınız mı?		
16. Görüntü alındıktan sonra ışık kaynağı, diyafram ve kondansör ile oynayarak tekrar bir ışık ayarlaması yaptınız mı?		
17. Mikro vidayla oynayarak ince görüntü ayarı yaptınız mı?		
18. Tüm objektifleri kullanarak inceleme yaptınız mı?		
19. İmmersiyon objektifi ile çalışırken üzerine sedir yağı damlatarak incelediniz mi?		
20. İmmersiyon objektifinin sedir yağıyla temas hâlinde olmasına dikkat ettiniz mi?		
21. İnceleme bittikten sonra preparatı mikroskop tablasından aldınız mı?		
22. Mikroskobu usulüne uygun olarak temizlediniz mi?		
23. Mikroskobu kılıfına koyarak yerine kaldırdınız mı?		
24. Kullandığımız araç gereçleri temizleyip kaldırdınız mı?		
25. Ellerinizi yıkayıp dezenfekte ettiniz mi?		

26. Laboratuvar son kontrollerinizi yaptınız mı?		
27. Önlüğünüzü çıkarıp astınız mı?		
28. Çalışma alanınızı temizlediniz mi?		

DEĞERLENDİRME

Yapılan değerlendirme sonunda **“Hayır”** şeklindeki cevaplarınızı bir daha gözden geçiriniz. Kendinizi yeterli görmüyorsanız öğrenme faaliyetini tekrar ediniz. Cevaplarınızın tamamı **“Evet”** ise bir sonraki faaliyete geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-3

AMAÇ

Uygun ortam sağlandığında tekniğine ve uygun olarak boyama yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Mikroorganizmaların boyanmasında en çok hangi yöntemler kullanılmaktadır? İnternet ve kütüphane ortamında araştırınız.
- Çevrenizde bulunan mikrobiyoloji laboratuvarına giderek mikroorganizma boyama aşamalarını gözlemleyiniz. Gözlemlerinizi arkadaşlarınızla paylaşınız.

3. BOYAMA YAPMA

Mikroorganizmaları tanımlama yollarından birisi, onları boyayarak incelemektir. Boyama, kimyasal bir olaydır.

Mikroorganizmaların pek çoğu renksiz olduklarından normal ışık mikroskobu ile görünmeleri zordur. Mikroorganizmaların mikroskopta görünür hâle getirilmesi için preparat hazırlandıktan sonra uygun boya çözeltileriyle boyanmaları işlemine “**mikroorganizmaların boyanması**” denir.

3.1. Mikroorganizmaları Boyama Yöntemleri

Mikroorganizmaların boyanabilmesi için mikroorganizma içeren sıvının lam üzerine bir öze yardımıyla yayılması (smear) ve fiksasyon işleminin yapılması gereklidir.

Mikroorganizmaları boyamanın başlıca avantajları şunlardır:

- Mikroorganizmalar ve zemin arasında kontrast oluşturarak onları daha kolay incelemek
- Bakterinin hücre duvarı, vakuolleri gibi yapılarını daha kolay incelemek
- Değişik morfolojik tipler arasındaki farklılığı ortaya çıkarmak

Boyama işleminde çeşitli boyalar kullanılır. Bunlar doğal ve sentetik boyalar olarak ikiye ayrılmaktadır.

- **Doğal boyalar:** Doğal boyalar bitkisel ve hayvansal kaynaklı olabilir. Bunlardan bitkisel kaynaklı olanlara hematoksilen ve orcein, hayvansal kaynaklı olanlara ise carmen örnek gösterilebilir. Doğal boyalar daha çok histolojide kullanılmaktadır.
- **Sentetik boyalar:** Serbest asit ve bazlar suda çok az eridiklerinden sentetik boyalar daima nötr tuzlar hâlinde kullanılır. Bunların sayıları oldukça çoktur. Sentetik boyalara asit fuksin, metilen mavisi, bazik fuksin, safranin örnek gösterilebilir.

Boyalar;

- Bazik
- Asidik
- Nötr olmak üzere üç grupta toplanır.

Mikroorganizmaları boyama yöntemleri üç başlık altında toplanır. Bunlar:

- Basit boyama
- Diferansiyel boyama
- Negatif boyamadır.

3.1.1. Basit Boyama

Bu yöntem ile bakterilerin boyanmasında tek bir boya kullanılmaktadır. Basit boyamada Loeffler'in metilen mavisi, kristal violet, sulu fuksin ve safranin gibi boyalar kullanılabilir. Bakteriler boyamada kullanılan boyanın rengini alır. Örneğin kristal violet ile boyanan bakteriler mor renkli görünür.

3.1.1.1. Boyama Aşamaları:

Basit boyama aşamaları şunlardır:

- Preparat hazırlanır (yayma, kurutma, tesbit).
- Preparatın üzeri kullanılan boya çözeltisi (metilen mavisi, kristal violet, sulu fuksin) ile kaplanarak 1 dakika bekletilir.
- Boya dökülerek preparat damıtık su ile yıkanır.
- Kurutulan preparat mikroskopta immersiyon objektifi ile incelenir. "Genel Mikrobiyoloji" modülündeki mikroskop kullanımı konusunu hatırlayınız.

3.1.2. Diferansiyel Boyama

İki farklı renkteki boyanın aynı preparat üzerinde belli tekniklerle ve art arda uygulanması ile gerçekleştirilen bir boyama şeklidir.

Diferansiyel boyama tekniklerinde, hücreler birinci boyayla belli bir renge boyanır. Kullanılan bu ilk boyaya primer boya adı verilir. Bu işlemin fonksiyonu, rengi tüm hücreye dağıtmaktır. Birinci boyamayı takiben preparata genellikle bir renk giderme (dekolorizasyon) işlemi uygulanmaktadır.

Dekolorizasyon işlemini takiben uygulanan boyalara genel olarak karşıt boya adı verilmektedir. Dekolorize olmuş hücreler karşıt boya ile ilk boyanın renginden farklı bir renge boyanır.

Boyanmış hücreden boyayı uzaklaştıran etil alkol gibi maddelere renk giderici ajan (dekolorize edici madde) denilmektedir. Bazı hücreler diğerlerine göre daha kolay dekolorize olur. Gram boyama ve diğer differensiyel boyamalarda bakterilerin birbirinden ayırt edilmesinde dekolorizasyon özelliğinden yararlanılmaktadır.

Differansiyel boyamaya; gram boyama yöntemi, spor boyama yöntemleri, flegella boyama yöntemleri, negatif diferansiyel boyama yöntemi (kapsül boyama), yağ boyama yöntemi gibi yöntemler örnek gösterilebilir. Bu modülde bu yöntemlerden gram boyamaya değinilmiştir.

3.1.2.1. Gram Boyama Mekanizması

Gram boyama mekanizmasını açıklayan farklı teoriler vardır. Bir teoriye göre gram pozitif bakteriler, lugol ile muamele edildikten sonra hücrede meydana gelen kristal violet-iyot kompleksini, alkol ile dekolorizasyon sonrasında hücre dışına bırakamaz. Çünkü alkol hücre çeperindeki suyu alarak uzaklaştırır ve çeperi kurutur. Böylece bu bakteriler mikroskop altında mor renkli görünür.

Gram negatif bakterilerde hücre çeperindeki yağ oranı çok yüksektir (% 15–25). Alkol hücre çeperindeki yağı belli ölçülerde çözerek hücre çeperinde birtakım boşluklar meydana getirir. Kristal violet-iyot kompleksi bu boşluklardan hücre dışına çıkar ve hücre yine başlangıçtaki şeffaf hâline dönüşür. Bu aşamadan sonra bakteriler karşıt bir boya olan sulu fuksin ile boyandıklarında renkleri pembe-kırmızı görünür(Tablo 3.1).

Gram boyama aşamaları	Hücrelerin mikroskoptaki görünüşleri	
	Gram pozitif	Gram negatif
İlk boyama (kristal violet ile 1 dk.)	Mor	Mor
Mordant ile muamele(gram iyot çözeltisi)	Mor	Mor
Dekolorizasyon(etil alkol ile 15 sn.)	Mor	Renksiz
Karşıt boya ile boyama(sulu fuksin ile 10-30 sn)	Mor	Pembe

Tablo 3.1 Gram Boyama Mekanizması

Bir başka teoriye göre ise Gram pozitif bakteri hücreleri içerisinde iyot; kristal violet, Mg ve RNA (ribonükleik asit) ile birlikte dekolorizasyona dirençli bir kompleks oluşturmaktadır. Gram negatif bakterilerde bu kompleks oluşmamakta ve kristal violet dekolorizasyonla hücreden kolayca uzaklaşmaktadır.

Bütün bu görüşlere karşın Gram boyamanın mekanizması konusunda gereği kadar aydınlatılmamış birçok noktanın bulunduğu da bir gerçektir.

Bakterilerin yaşı, ortamın bileşimi ve pH bakterinin Gram reaksiyonunda değişikliklere yol açabilmektedir. Örneğin; *Bacillus subtilis* ve *Bacillus anthracis*, 3 saatlik kültürlerinde Gram negatif özellik gösterdikleri hâlde zamanla Gram pozitif özelliğe sahip olmaktadır. Eski, bekletilmiş kültürlerde Gram pozitif olan bakteriler Gram negatifmiş gibi boyanabilmektedir. Bazı bakteriler ise boyayı çok tuttukları hâlde, bazıları boyayı hücre içine az alırlar. Bu gibi bakterilere “Gram labil” denilmektedir.

Dekolorizasyon işlemi Gram boyamadaki en önemli aşamadır. Bu nedenle süresini çok iyi ayarlamak gerekmektedir. Preparat üzerinde kristal violetin alkolde çözünmesi gözle fark edilir düzeyde olduğunda, bu işleme hemen son verilmelidir. Aksi takdirde uzun süreli bir dekolorizasyonda, gerçekte Gram pozitif olan bakteriler dahi kristal violeti hücre dışına bırakabilir. Buna karşılık yetersiz bir dekolorizasyon, Gram negatif bakterilerin bile Gram pozitif olarak değerlendirilmesine neden olabilir.

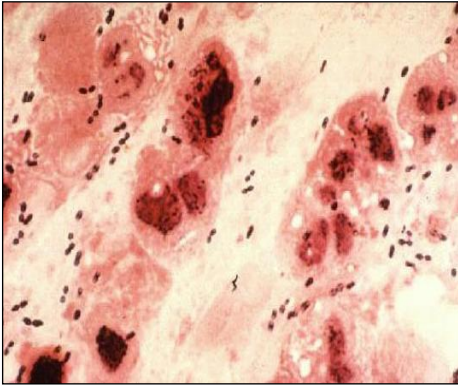
3.1.2.2. Gram Boyama Aşamaları

Bakteriyolojide çok önemli olan bu teknik 1884’te Christian Gram tarafından geliştirilmiştir. Gram boyama ile mor renk alan bakteriler Gram pozitif (+) veya Gram olumlu, kırmızı renk alan bakteriler ise Gram negatif (-) veya Gram olumsuz olarak adlandırılır.

Gram boyama aşamaları aşağıdaki gibidir,

- 18–24 saatlik kültürden preparat hazırlanır. Birinci öğrenme faaliyetinde öğrendiniz.
- Preparat kristal violet ile kaplanır ve 1 dakika bekletilir.
- Preparat bol damıtık su ile yıkanır (Lugol çözeltisi de kullanılabilir).
- Preparat üzeri lugol (Gram iyot çözeltisi) ile kaplanır, 1 dakika bekletilir.
- Lugol akıtılarak damıtık su ile yıkanır.
- Preparat üzerine % 96'lık etil alkol yayılarak veya uygun bir kaptaki alkol içerisine daldırılarak 10–15 saniye beklenir.
- Preparat hemen damıtık su ile yıkanır.
- Preparat karşıt boya olan sulu fuksin veya safranin ile kaplanarak 10–30 saniye beklenir.
- Preparat bol damıtık su ile yıkanarak havada ya da kurutma kağıdı arasında kurutulur.
- Mikroskopta immersiyon objektifinde incelenir.

Gram boyama uygulanan preparatlar mikroskopta incelendiğinde mor renkli bakteriler Gram pozitif, pembe kırmızı renkli bakteriler ise Gram negatif olarak değerlendirilir.



Resim 3.1: Gram pozitif



Resim 3.2: Gram negatif

Bakterilerin Gram pozitif veya Gram negatif olarak ayrılması onların hücre çeperlerindeki ayrıcalıklarından kaynaklanmaktadır. Kristal violeti hücre içinde tutabilen bakteriler Gram pozitif, tutamayıp hücre dışına bırakan bakteriler ise Gram negatiftir.

3.1.3. Negatif Boyama

Mikroorganizmaların morfolojilerini incelemek için uygulanan ve mikroorganizmaları değil, bunların yayıldığı ortamı (zemini) boyamayı amaçlayan bir yöntemdir. Bu yöntem daha çok bakterilerde kapsül varlığını ortaya koymak için uygulanmaktadır. Boyama işlemi sırasında çini mürekkebi veya nigrosin boyası kullanılır.

İki çeşit negatif boyama yöntemi vardır. Bunlar;

- Yaş preparasyon yöntemi ile negatif boyama,
- Negatif diferansiyel boyamadır.

Yaş preparasyon yöntemi ile negatif boyamada çini mürekkebi kullanılmaktadır. İyi sonuç alabilmek için preparatın çok ince yayılması gerekmektedir. Yaş preparasyon tekniği ile çalışılırken iki önemli sorun yaşanmaktadır. Bunlar;

- Preparat çok ince hazırlandığı için çok çabuk kuruyabilmektedir. Bu nedenle preparatın üzerine kapatılan lamelin kenarları, buharlaşmayı önlemek amacı ile yapıştırılmalı ve hiç beklemeksizin incelemeye geçilmelidir.
- Mikroskopik incelemede, kapsül ile bakteri hücrelerini birinden ayırt etmek güçtür. İncelemede faz-kontrast mikroskobu kullanılmalıdır. Faz kontrast mikroskopunda bakteri hücresi karanlık, kapsül tabakası saydam görülür.

3.1.3.1. Negatif Boyama Aşamaları

Negatif boyama aşamaları aşağıdaki gibidir:

- Preparat hazırlanır.
- Preparat 1 damla çini mürekkebi veya nigrosin ile kaplanır ve 1 dakika bekletilir.
- Saf su ile yıkanır.
- Preparat kurutulur.
- Mikroskopta incelemeye alınır.

3.1.4. Spor Boyama

Bazı bakteriler, belli koşullarda, hücre içerisinde dış etkenlere karşı daha dirençli olan ve endospor olarak adlandırılan özel formlar oluşturur. Endospor oluşumundan sonra bakteri hücresi ölebilir veya dağılır. Bu durumda endosporlar serbest hâle geçer. Bunlara “serbest spor” ya da kısaca “spor” denir.

Bir bakterideki endospor varlığı ve bunun çeşitli özellikleri mikroskopik incelemelerle ortaya konulabilmektedir.

Sporların soğuk, sıcak, UV (ultraviyole), osmotik basınç gibi fiziksel etkilere ve kimyasal maddelere karşı vejetatif hücrelerden daha dayanıklı olması, kimyasal ve fiziksel yapılarının farklılığından kaynaklanmaktadır. Sporların üç önemli özelliği vardır:

- Kimyasal maddelere karşı geçirgenlik (impermeabilite)
- Sıcaklığa karşı dayanıklılık (termostabilite)
- Kırılma indisinin artması (refraktibilite)

Sporların bu özellikleri, özel spor boyama yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur.

Endosporların normal çevre sıcaklıklarında boyaları içlerine almaya karşı dirençleri vardır. Ancak boya çözeltisinin sıcaklığı yaklaşık 100°C'ye yükseltildiğinde endosporların bu direnci kırılmakta ve endosporlar boyayı içlerine alarak boyanmaktadır.

Spor boyama ile ilgili birçok yöntem bulunmaktadır.

Malaşit yeşili ile spor boyama aşamaları:

- İncelenecek bakteri kültürü ile preparat hazırlanır (yayma, kurutma ve tesbit). Eğer karşılaştırmalı bir çalışma yapmak istiyorsanız aynı lam üzerinde sporlu bir bakteri kültürü ve sporsuz bir bakteri kültüründen ayrı ayrı yayma şeklinde preparat hazırlayabilirsiniz.
- Preparat uygun bir beher kullanarak hazırlanan kaynar su banyosu düzeneğinin üstüne yerleştirilir.
- Preparatın üzeri % 5'lik malaşit yeşili boya çözeltisi ile kaplanır. Bunun üzerine daha önceden lamdan daha küçük boyutta olacak şekilde kesilerek hazırlanmış olan bir kurutma kâğıdı yerleştirilir. Kurutma kâğıdı boya çözeltisini çekerek ıslanır.
- Kurutma kâğıdının üzerine malaşit yeşili boya çözeltisi damlatılır. Kâğıdın sürekli ıslak kalması sağlanır. Kurutma kâğıdının ıslaklığı azaldıkça malaşit yeşili boya çözeltisi damlatarak preparat bu şekilde 5–6 dakika boyanır.

- Süre sonunda kurutma kâğıdı bir pensle kaldırılarak atılır, preparat yıkanır.
- Karşıt boya sulu fuksin veya %0.5'lik safranin ile 20-30 saniye boyanır.
- Yıkanır, havada kurutulur.
- Mikroskopta immersiyon objektifinde incelenir. Bu boyamada bakteriler kırmızı, sporlar yeşil olarak görülür.

Bu yöntemde, ısıl işlem kullanarak gerçekleştirilebildiği gibi direkt bunzen beki alevi üstünde de uygulanabilmektedir. Ancak bu durumda alevin çok kısık olması gerekir.

Bartlholomew ve Mittwer Spor Boyama Aşamaları:

- Bir önceki yöntemde olduğu gibi preparat hazırlanır.
- Preparat, alttan 20 kez bunzen beki alevinden geçirilir.
- Preparatın üzeri doymuş sulu malaşit yeşili çözeltisi ile kaplanır ve 10 dakika bekletilir.
- Boya, soğuk su altında 10 saniye kadar yıkanır.
- Preparat karşıt boya olarak % 0.25'lik safranin çözeltisi ile kaplanır.
- 15 saniye beklenir.
- Su ile yıkanır ve kurutulur.
- Mikroskoptaki immersiyon objektifinde incelenir.

3.2. Boyanmış Preparatların Muhafazası

Boyanmış preparatları hazırladıktan ya da hazırlayıp inceledikten sonra daha ileride tekrar incelemek üzere muhafaza etmek gerekebilir. Bu durumda;

- Preparat üzerinde immersiyon yağı bulunuyorsa öncelikle bu yağı uzaklaştırmak gerekir. Bunun için preparat,ksilol ile yıkanır. Havada kurutulur.
- Preparat üzerine bir damla kanada balsamı damlatılır.
- Üzerine lamel kapatılır ve lamel üzerine hafifçe 2-3 dakika süre ile bastırarak balsamın lamel altında iyice yayılması sağlanır.
- Rutubetsiz bir yerde yaklaşık iki hafta kuruması sağlanır.
- Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra lamel çevresindeki balsam artıkları temizlenir.
- Bu şekilde preparat uzun süre bozulmadan muhafaza edilebilir.

3.3. Boya Çözeltisinin Hazırlanışı




Mikroskopik inceleme yapılırken mikrobiyoloji laboratuvarlarında genellikle aşağıdaki tabloda verilen boyalar kullanılmaktadır.




BOYA ÇÖZELTİSİ	HAZIRLANIŞI
KRİSTAL VİYOLET	0.5 g kristal viyolet 100 ml damıtık su içinde çözündürülür.
SAFRANİN	0.5 g safranin, 10 ml % 95'lik etil alkol içinde çözündürülür ve 100 ml damıtık suyla karıştırılır. Bartholomew ve Mittwer's spor boyama tekniğinde: 0.25 g safranin, 100 ml damıtık suda çözündürülür.
FUKSİN	% 90'lık boya içerikli 1 g bazik fuksin 1 L damıtık su içinde çözündürülür.
LUGOL(I) ÇÖZELTİSİ	2 g potasyum iyodür, 300 ml damıtık su içinde çözündürülür. Bu çözeltiliye iyice ezilmiş iyot kristali eklenir.
METİLEN MAVİSİ	1 g metilen mavisi, 100 ml damıtık su içinde çözündürülür.
MALAŞİT YEŞİLİ	5 g malaşit yeşili, 100 ml damıtık su içinde çözündürülür.
NİGROSİN	10 g nigrosin, 100 ml damıtık su içine aktarılır ve kaynar su banyosunda yarım saat tutulur. Üzerine 0.5 ml formalin koruyucu olarak eklenir.



Tablo 3.2: Boya çözeltilerinin hazırlanışı

UYGULAMA FAALİYETİ

Hazırlanan preparatları basit, gram ve negatif boyama yöntemleri ile boyayınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>➤ 3 ayrı preparat hazırlayınız.</p>  <p>Resim 3.3: Preparat</p>	<ul style="list-style-type: none">➤ Laboratuvar kıyafetlerinizi giyiniz.➤ Ellerinizi her çalışma öncesinde yıkayınız ve dezenfekte ediniz.➤ Gerekli koruyucu malzemelerinizi giyiniz.➤ Temiz araç-gereç kullanınız.➤ Laboratuvarında çalışma kurallarına uyunuz.➤ Zamanı iyi kullanınız.➤ Çalışmaya başlamadan önce kullanacağınız çözeltileri hazırlayınız.➤ Öğrenme Faaliyeti-1’de bilgilerinizi hatırlayınız.
Basit boyama için;	
<p>➤ Preparatın üzerini kristal violet ile kaplayarak 1 dakika bekleyiniz.</p>  <p>Resim 3.4: Kristal violet ile kaplama</p>	<ul style="list-style-type: none">➤ Eldivenlerinizi giyiniz.➤ Saatinizi hazırlayınız doğru çalıştığından emin olunuz.➤ Boyayı vücudunuza değdirmeyiniz. <p>SABIRLI OLUNUZ</p>
<p>➤ Boyayı dökerek preparatı saf su ile yıkayınız.</p>  <p>Resim 3.5: Yıkama</p>	<ul style="list-style-type: none">➤ Saf suyun direkt örnek üzerine temasından kaçınınız.➤ Preparatınızı yıkama sırasında eğik tutunuz.➤ Suyu çok basınçlı akıtmayınız.
<p>➤ Kurutulan preparatı mikroskopta incelemeye alınız.</p>	<ul style="list-style-type: none">➤ Preparatı kurutmayı unutmayınız.➤ 100 X büyütmeli objektif kullanacaksanız lamel kapatmadan immersiyon yağı damlatınız.

Gram boyama için;	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ 18–24 saatlik kültürden daha önce hazırladığınız preparat alınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Saatinizi hazırlayınız. ➤ Bekleme süresini aşmayınız.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparatı kristal violet ile kaplayarak 1 dk bekleyiniz. 	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparatı bol su ile yıkayınız. 	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparat üzerini lugol ile kaplayarak 1 dk. bekleyiniz.  <p>Resim 3.6: Lugol ile kaplama</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bekleme süresine dikkat ediniz.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Lugölü akıtıp saf su ile yıkayınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Süreye dikkat ediniz. ➤ Alkol ile ateş yanında çalışmayınız. <p>Dikkatli olunuz</p>
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparat üzerini % 96'lık etil alkol ile kaplayarak 10–15 sn. bekleyiniz.  <p>Resim 3.7: Alkolde bekleme</p>	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparatı saf su ile yıkayınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Safranin en az birgün önce hazırlanmalıdır. ➤ Saatinizi hazırlayınız. ➤ Bekleme süresini aşmayınız.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Preparatı karşıt boya olan sulu fuksin veya safranin ile kaplayıp 10-30 sn. bekleyiniz.  <p>Resim 3.8: Sulu fuksin ile kaplama</p>	

<p>➤ Preparatı saf su ile yıkayıp havada veya kurutma kağıdı arasında kurutunuz.</p>  <p>Resim3.9: Havada kurutma</p>	<p>➤ Havada kurutma tercih ediyorsanız tel ızgara üzerinde kurutunuz.</p>
<p>➤ Kurutulan preparatı mikroskopta incelemeye alınız.</p>	
<p>Negatif boyama için;</p>	
<p>➤ Daha önceden hazırladığımız preparat-1 alınız.</p>	
<p>➤ Preparatı çini mürekkebi veya nigrosin ile kaplayarak 1 dk. bekleyiniz.</p>	<p>➤ Saatinizi hazırlayınız. ➤ Bekleme süresine dikkat ediniz.</p>
<p>➤ Saf su ile yıkayıp kurutunuz.</p>	
<p>➤ Kurutulan preparatı mikroskopta inceleyiniz.</p>  <p>Resim 3.10: Mikroskopta inceleme</p>	<p>➤ Ellerinizi her çalışma sonrasında yıkayınız. ➤ Koruyucu malzemelerinizi çıkarıp çöpe atınız. ➤ Çalışma ortamını temizleyiniz. ➤ Kullanılan araç ve gereçleri temizleyiniz. ➤ Laboratuvar son kontrollerinizi yapınız. ➤ Laboratuvar önlüğünüzü çıkarıp asınız. ➤ Öğrenme faaliyeti 2 'deki mikroskop kullanımı bilgilerinizi hatırlayınız.</p>

Mutlaka eldiven giyiniz

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki sııklardan doğru olanı işaretleyiniz.

1. Gram boyama yönteminde ikinci sırada hangi boya kullanılır?
A) Kristal viyole
B) Lugol
C) Sulu fuksin
D) Metilen mavisi
2. Gram boyamadaki en önemli aşama aşağıdakilerden hangisidir?
A) İlk boyama
B) Dekolorizasyon
C) İkinci boyama
D) Yıkama
3. Gram boyama sonucunda mikroskopta gram negatif bakteriler hangi renkte görünür?
A) Pembe-kırmızı
B) Mor-pembe
C) Mavi-siyah
D) Pembe-mavi
4. Ortamın boyanarak mikroorganizmaların şeffaf görüldüğü boyama yöntemi aşağıdakilerden hangisidir?
A) Basit boyama
B) Gram boyama
C) Negatif boyama
D) Spor boyama
5. Negatif boyamada aşağıdaki boyalardan hangisi kullanılır?
A) Lugol
B) Sulu fuksin
C) Metilen mavisi
D) Nigrosin
6. Spor boyama yöntemlerinin geliştirilmesine sporun hangi özellikleri etkili olmuştur?
A) Kimyasal maddelere karşı geçirgenlik
B) Sıcaklığa karşı dayanıklılık
C) Kırılma indisinin artması
D) Hepsi
7. Preparat üzerinde bulunan immersiyon yağı aşağıdakilerden hangisi ile temizlenir?
A) Ksilol
B) Lugol
C) Kanada balsamı
D) Alkol

8. Negatif boyama aşağıdakilerden hangisinin varlığını tespit etmek için uygulanır?
A) Bakterilerin cinsini
B) Kapsül varlığını
C) Bakterinin yaşını
D) Hastalık yapma özelliğini
9. Asit fuksin, bazik fuksin, metilen mavisi gibi boyalar hangi cins boyalara örnek gösterilir?
A) Hayvansal kaynaklı boyalar
B) Bitkisel kaynaklı boyalar
C) Sentetik boyalar
D) Nötr boyalar
10. Aşağıdakilerden hangisi basit boyamada kullanılmaz?
A) Fuksin
B) Kristal violet
C) Nigrosin
D) Metilen mavisi

Aşağıdaki ifadeleri dikkatlice okuduktan sonra parantezin içine doğru ise (D) harfi, yanlış ise(Y) harfi koyarak cevaplandırınız.

11. () Boyanmış preparatlar çeşitli işlemlerden geçirildikten sonra muhafaza edilebilir.
12. () Malaşit yeşili ile boyama, basit boyama yöntemidir.
13. () Gram boyama yapmak için 18–24 saatlik kültürlerden Preparat hazırlanmalıdır.
14. () Nötral boyalar suda çözünmez.
15. () Gram boyama tekniğini Luis Pasteur geliştirmiştir.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarı ile karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt yaşadığımız sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrar inceleyiniz.

Tüm sorulara doğru cevap verdiyseniz uygulamalı teste geçiniz.

UYGULAMALI TEST

24 saat önce hazırlanmış kültürden preparat hazırlayarak Gram boyama ile boyayınız ve uygun koşullarda saklayınız. Yaptığınız işlemleri aşağıdaki değerlendirme tablosuna göre kontrol ediniz.

Değerlendirme Ölçütleri	Evet	Hayır
1. Laboratuvar önlüğünüzü giydiniz mi?		
2. Çalışma ortamınızı temizlediniz mi?		
3. Kullanacağınız araç ve gereçleri temiz mi?		
4. Kullanacağınız çözeltiler hazır mı?		
5. 24 saatlik kültürden preparat hazırladınız mı?		
6. Preparat hazırlarken steril koşullarda çalıştınız mı?		
7. Saatinizi hazırladınız mı?		
8. Preparatı kristal violet ile kapladınız mı?		
9. 1 dakika beklediniz mi?		
10. Boyadığınız preparatı saf su ile yıkadınız mı?		
11. Preparatın üzerini lugol ile kaplayarak 1 dakika beklediniz mi?		
12. Lugolu hemen saf su ile yıkadınız mı?		
13. Preparat üzerini % 96'lık etil alkol ile kapladınız mı?		
14. 10-15 saniye beklediniz mi?		
15. Preparatı hemen saf su ile yıkadınız mı?		
16. Preparatı sulu fuksin veya safranin ile kaplayıp 10-15 saniye beklediniz mi?		
17. Saf su ile yıkayıp havada veya kurutma kağıdı arasında kuruttunuz mu?		
18. Preparat üzerine kanada balsamı damlatıp üzerine lamel kapattınız mı?		
19. Lameli bastırarak balsamın yayılmasını sağladınız mı?		
20. Kurutmak için nemsiz bir ortama koydunuz mu?		
21. Kullandığınız araç gereçleri temizleyip kaldırdınız mı?		
22. Ellerinizi yıkayıp dezenfekte ettiniz mi?		
23. Laboratuvar son kontrollerinizi yaptınız mı?		
24. Önlüğünüzü çıkarıp astınız mı?		

DEĞERLENDİRME

Yapılan değerlendirme sonunda “Hayır” şeklindeki cevaplarınızı bir daha gözden geçiriniz. Kendinizi yeterli görmüyorsanız öğrenme faaliyetini tekrar ediniz. Cevaplarınızın tamamı “Evet” ise bir sonraki faaliyete geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-4

AMAÇ

Uygun ortam sağlandığında tekniğine uygun olarak bakterilerin hücre morfolojisini inceleyebileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Bakteri morfolojilerini resimleri ile birlikte araştırınız.
- Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin özelliklerini araştırınız.

4. BAKTERİ MORFOLOJİLERİNİ İNCELEME

Bakteri morfolojisi;

- Makroskobik,
- Mikroskobik morfoloji olmak üzere ikiye ayrılır.

Makroskobik Morfoloji, daha çok koloni morfolojisi olarak bilinmektedir. Bakterilerin katı ve sıvı besiyerlerindeki üreme şekilleri, oluşturdukları yapılar ve meydana getirdikleri değişimler makroskobik morfoloji içinde incelenmektedir.

Koloni; Renklendirilebilir tek bir hücrenin çoğalmasıyla meydana gelen milyonlarca hücrenin oluşturduğu yapıdır.

Bu tanıma göre bir kolonide yalnızca belli bir bakteri türüne ait hücreler bulunur. Her bakteri belli bir besiyerinde, koşullar değiştirilmediği sürece kendine özgü karakterde koloniler oluşturur. Aynı bakteri, değişik bir besiyerine ekildiğinde ise farklı bir koloni morfolojisi gösterebilir. Bakterilerin koloni morfolojileri farklı açılardan incelenmektedir. Bunlar:

- Besiyerinde oluşturdukları şekiller
- Büyüklük
- Renk
- Saydamlık

- Parlaklık
- Viskozite
- Kuruluk
- Yayılma
- Çözünürlük durumu
- Kokudur.

Mikroskobik Morfoloji, bakteriler genel olarak şeffaftır. Boyanarak bakteriler mikroskobik olarak incelenmektedir.

Bakteri morfolojilerini inceleme nedenleri;

- Bakteri şekillerini
- Büyüklüklerini
- Diziliş şekillerini
- Belirli hücre organellerinin varlığını
- Yapılarını tesbit etmektir.

4.1. Bakteri Morfolojilerinin Mikroskopta İncelemeleri Sırasında Dikkat Edilecek Hususlar

Mikroskobik incelemede iyi bir gözlem için;

- İncelemenin çok ince yayılmış preparat kısımlarında yapılması yararlı olur.
- İyi görüntü alınan bir mikroskop sahası yakalandığında saha kaybedilmeden (preparat oynatılmadan) lamın üzerine immersiyon yağı damlatılır.
- İmmersiyon objektifi ile ileri inceleme yapılır.
- (Daha detaylı bilgi için Mikroskop Kullanımı konusuna bakınız.)
- Mikroorganizmaların mikroskobik morfolojilerinin incelenmesinde bazı sorunlar ortaya çıkabilir. Örneğin;
- Kokobasil (eni boyu birbirine çok yakın) olarak isimlendirilen morfolojiye sahip basilleri incelerken bunların gerçekte kok mu yoksa basil mi olduğuna karar vermek çoğu zaman zordur. Bu nedenle preparatın mikroskopta çok titiz bir şekilde incelenmesi gerekir. Eğer preparat hazırlanan kültür saf ise incelenen her mikroskop sahasında, çok az sayıda da olsa eni boyu ayırt edilebilecek boyutlara sahip basillere rastlanabilir.
- Farklı besiyerlerinde geliştirilmiş bir bakteri farklı morfolojilere (şekil ve boyut yönünden) sahip olabilir.

- Özellikle preparat hazırlarken kurutma ve tesbit işlemleri sırasında hücrelerde büzüşmeler meydana gelebilmektedir. Bu da incelenen bakterinin gerçek boyutlarının belirlenmesini engelleyici bir durumdur.

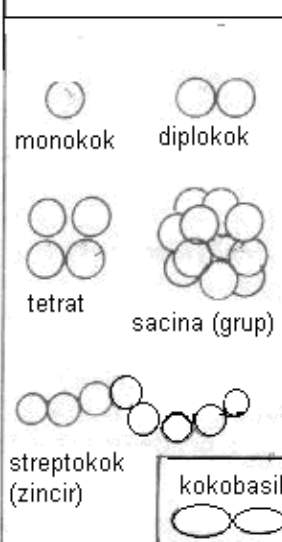
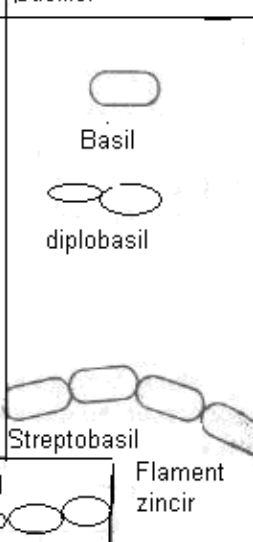
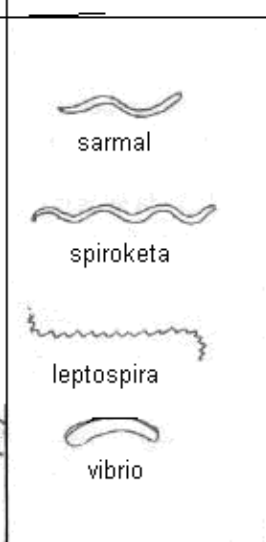
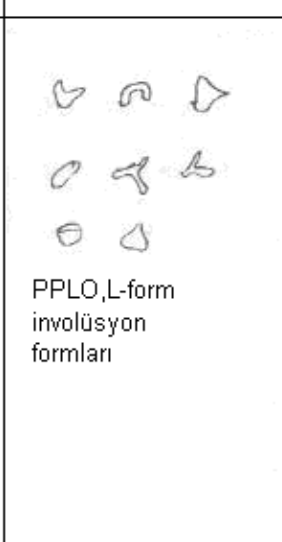
4.2. Bakteri Hücre Morfolojisi ve Hücre Dizilişleri

Mikroskopun keşfi, aynı zamanda mikrobiyoloji dalının da ilerlemesine yardımcı olmuştur. Laboratuvarlarda araştırma amacı ile çok kullanılan ışık mikroskoplarının (faz kontrast, ultraviyole, vs.) ve özellikle son yıllarda elektron mikroskopun keşfedilmesi mikroorganizmaların morfolojilerinin ve yapılarının ayrıntılı incelemesini kolaylaştırmıştır.

Bakteriler, üç temel morfolojik karaktere göre bir ayrıma tabi tutulmaktadır. Ancak, günümüzde bu formlara 4. bir ilave yapılmıştır (Tablo 4.1).

Başlıca bakteri şekilleri;

- Yuvarlak biçimli bakteriler (koklar)
- Çubuk biçimli bakteriler (basiller)
- Sarmal biçimli bakteriler (spiraller)
- Değişik biçimli bakteriler (pleomorfikler)

(a)	(b)	(c)	(d)
Yuvarlak Biçimli Koklar	Çubuk şekilli basiller	Sarmal Biçimli Spiral	değişik biçimli
 <p>monokok</p> <p>diplokok</p> <p>tetrad</p> <p>sacina (grup)</p> <p>streptokok (zincir)</p> <p>kokobasil</p>	 <p>Basil</p> <p>diplobasil</p> <p>Streptobasil</p> <p>Flament zincir</p>	 <p>sarmal</p> <p>spiroketa</p> <p>leptospira</p> <p>vibrio</p>	 <p>PPLO, L-form involüsyon formları</p>

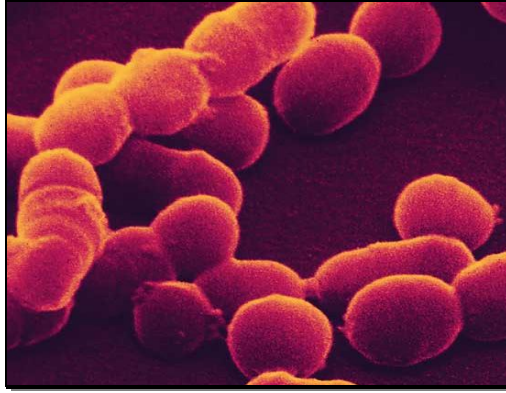
Tablo 4.1: Bakteri çeşitleri

Yuvarlak Biçimdeki Bakteriler

Yuvarlak şekilde görülen bakterilere genellikle, kok (kokkus) adı verilmektedir. Bunlar, çubuk veya spiral formda olanlara göre morfolojik olarak daha fazla homojenite gösterir. Çapları, ortalama, 0.8-1.0 mikrometre (μm) arasında değişmesine karşın daha küçük (0.4-0.8 μm) veya daha büyük (1.2-2.0 μm) olanları da bulunmaktadır. Genel bir kural olmamakla beraber hastalık oluşturan türlerin çapları 0.8-1.5 μm . arasında yer değişir. Koklar, yuvarlak biçimlerde olmalarına karşın bazı türlerde yumurta, kahve çekirdeği ve damla gibi değişik morfolojik formlara rastlanılmaktadır. Ayrıca koklarda bölünme sırasında çaplarında bir yönde uzamalar göze çarpmakta ve kokobasil görünümü oluşmaktadır.

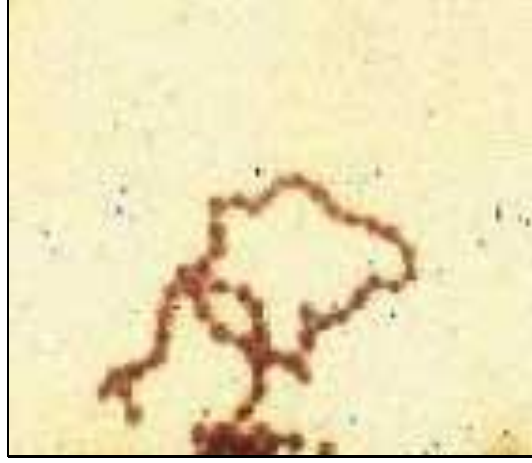
Üreme fazında, ortadan bölünme tarzlarına göre yan yana gelerek veya gruplar oluşturarak değişik morfolojik formlar oluşturmaktadırlar. Bu durum, aynı zamanda tanınmalarında ve isimlendirilmelerinde de yardımcı olur. Birbirinden farklı kok çeşitleri şunlardır:

- **Monokok (Monococcus):** Bölünmeden sonra birbirinden ayrılarak bağımsız, yani mikroskopta tek olarak görünen bakterilerdir.
- **Diplokokkus (Diplococcus):** Tek yönde bölündükten sonra oluşan iki kardeş hücre, ikişer ikişer birbirlerine yapışık olarak kalırsa mikroskop altında çift çift görülen diplokokları meydana getirirler.



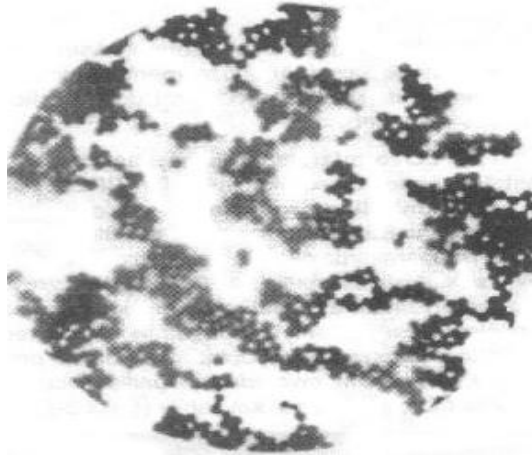
Resim 4.1: Kok

- **Streptokokkus (Streptococcus):** Bireysel koklar, birbirlerine paralel düzlemler üzerinde bölünüyor ve bölünme sonunda koklar birbirlerine, bir protoplasmik köprü ile bağlı kalıyorlarsa mikroskop altında az (10-20 kok) veya çok sayıda (100 'den fazla) koktan oluşmuş kısa veya uzun zincirlere (tespih tanesi gibi dizilmiş) rastlanır ki böyle görünüme sahip mikroorganizmalara streptokok adı verilir.



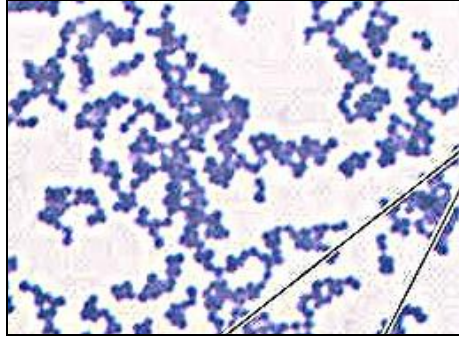
Resim 4.2: Streptokokkus (Streptococcus)

- **Stafilokokkus (Staphylococcus):** Bireysel koklar, çeşitli yönlerde bölünüyor ve bölünen koklar birbirlerine bağlı olarak kalıyorsa mikroskop altında az veya çok sayıda koktan oluşmuş kümeler üzüm salkımı şeklinde görülür. Bunlara stafilokok adı verilir.



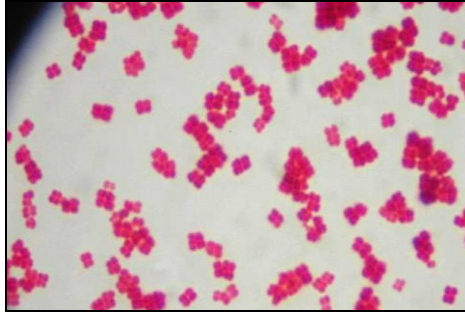
Resim 4.3: Stafilokokus

- **Sarsina (Sarcina):** Kokların bölünmesi birbirlerine dikey 3 yönde meydana geliyorsa, 8-12 veya 16 koktan oluşan paket veya balya görünümünde gruplar meydana gelir. Buna sarsina denir.



Resim 4.4: Sarsina

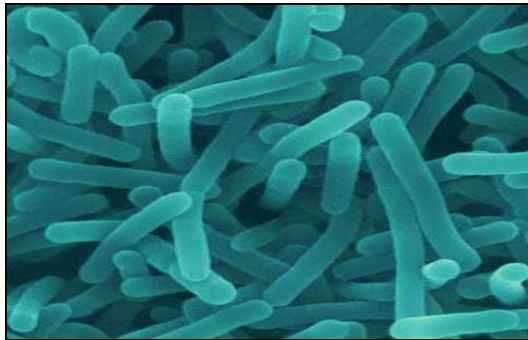
- **Tetrakokkus (Tetracoccus):** Kokların bölünmesi birbirlerine dikey iki yönde ve bir yüzey üzerinde meydana geliyorsa dörtlü koklardan yapılmış gruplar meydana gelir ki bunlara tetrakok (tetrad) adı verilir.



Resim 4.5: Tetrakokkus

Çubuk Biçimindeki Bakteriler

Çubuk biçimdeki bakteriler silindirik veya buna yakın bir görünüme sahip olduklarından boyları enlerinden daha uzundur. Bunlara basil denir. Ancak, bu formları cins ve türlere göre değişebileceği gibi, aynı tür mikroorganizma kültürünün çeşitli üreme fazlarında da farklılıklar meydana gelebilir.



Resim 4.6: Listeria

Çubuk biçimli mikroorganizmalardan bazıları, suni kültür ortamlarında (sıvı veya katı) ürediklerinde, bireysel bakteriler bölünmeyi takiben birbirlerinden ayrılmayarak saç benzeri uzun filamentler meydana getirir (Resim 4.7 bakınız).

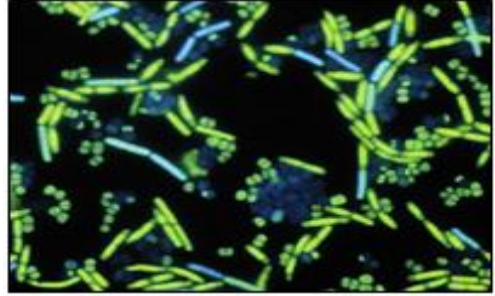


Resim 4.7: Salmonella

- **Diplo basil:** Mikroskopta ikiye bölündükten sonra birbirinden ayrılmayıp ikişerli görülen basillerdir (Resim: 4.8, 9 bakınız).

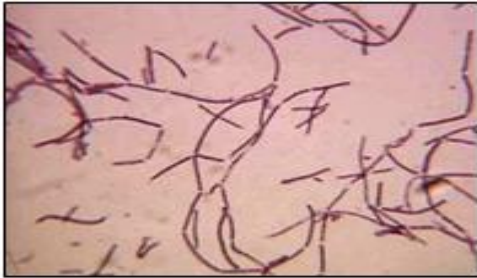


Resim 4.8: Negatif salmonella

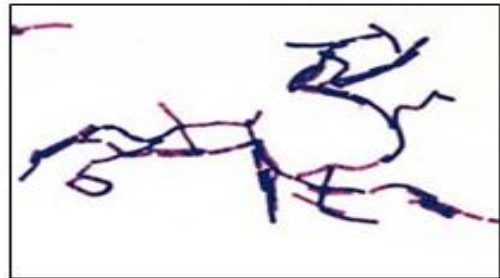


Resim 4.9:Stafilokokkus

- **Streptobasil:** mikroskopta bölünmeden sonra birbirinden ayrılmayıp zincir şeklinde görülen basillerdir(Resim 4.10,11,12 bakınız).



Resim 4.10:Streptokokus



Resim 4.11:Streptobasillus

Sarmal (Spiral) Biçimli Bakteriler

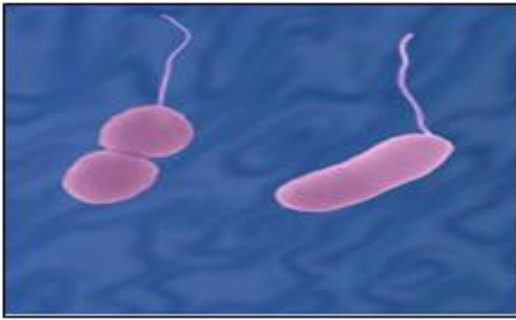
Sarmal biçimde olan mikroorganizmaların kendi etrafındaki kıvrımları az veya çok sayıda olabilir. Bunlar, bakteri hücresinin eksenine etrafında spiral biçimde sarılmıştır. Spiral şeklinde olan mikroorganizmaların boyları 4-20 µm arasında değişir. Cinsler uzunluk ve kıvrımların sıklığı bakımından farklıdır. Spiral bakteriler üç bölümde incelenir. Bunlar:

- Vibrio
- Spiril(spirillum)
- Spiroket(spirochaeta)

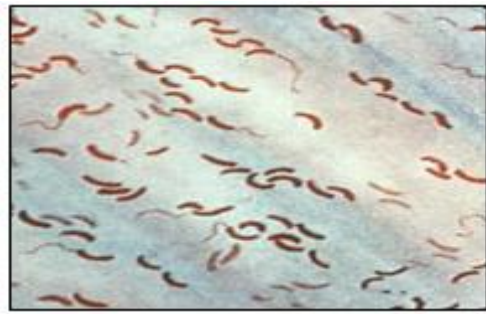


Resim 4.12: Vibrio

- **Vibrio:** Tek kıvrıma sahip olanlar (vibrio); genellikle virgül şeklinde olup iki tanesi yan yana geldiklerinde (S) şeklinde görülürler. Virgül şeklinde polar flagellaya sahip Gram negatif ve aktif hareketli mikroorganizmalardır.

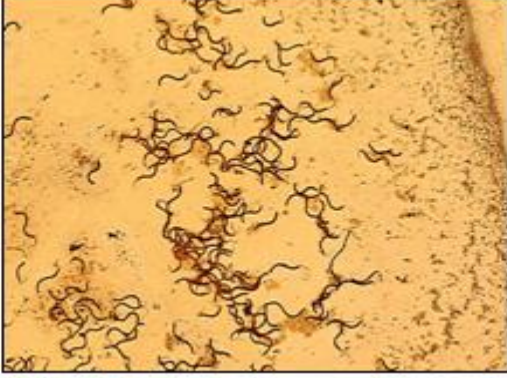


Resim 4.13: Vibrio



Resim 4.14: Vibrio

- **Spiril (spirillum):** Birden fazla kıvrıma sahip, sert vücutlu ve flagella yardımı ile aktif hareket eden mikroorganizmalardır. Gram negatiftirler.

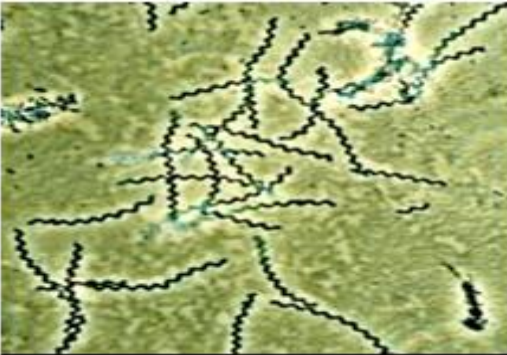


Resim 4.15: Spiril bakteriler

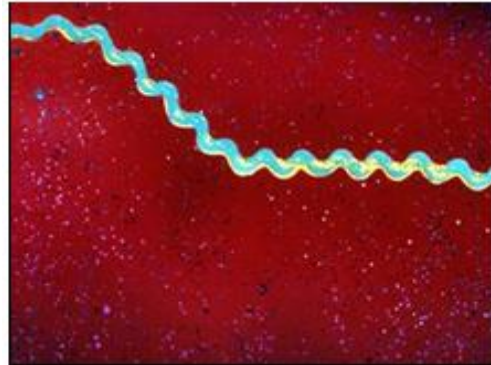


Resim 4.16: Spiril bakterisi

- **Spiroket (Spirochaeta):** Birçok sık kıvrımlara sahip ve vücutları bükülebilen bakterilerdir. Flagellaları yoktur. Ekseni etrafında dönerek aktif hareket ederler.

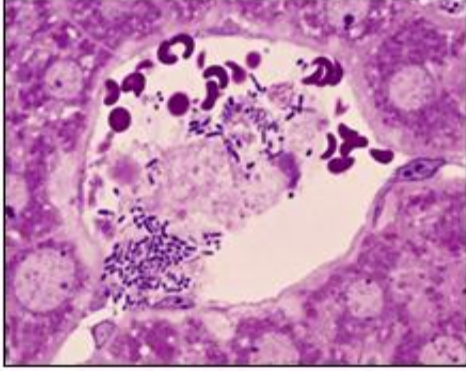


Resim 4.17: Spiroket

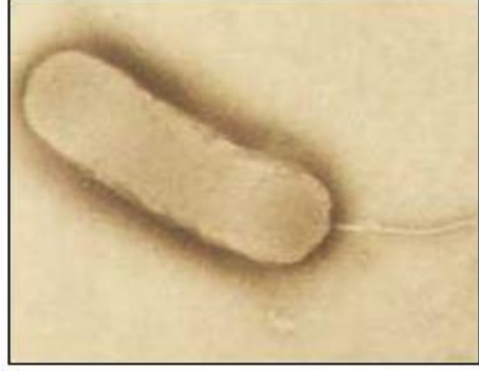


Resim 4.18: Spiroket

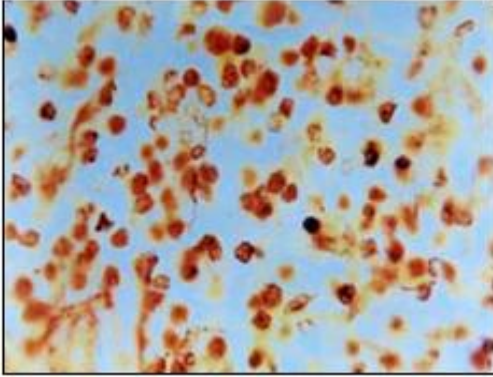
4.3. Bakteri Morfolojisi ile İlgili Çeşitli Resimler



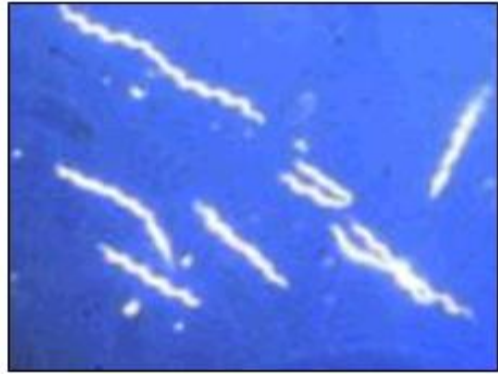
Resim 4.19: Salmonella



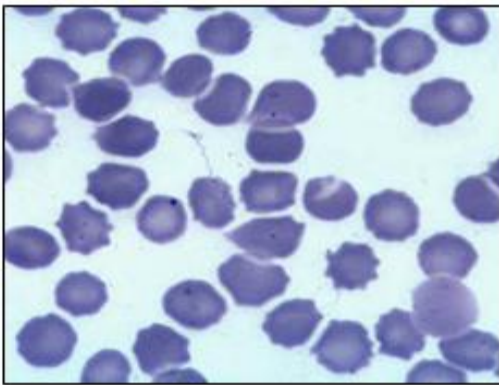
Resim 4.20: Salmonella



Resim 4.21: Spiroket



Resm 4.22: Spiroket



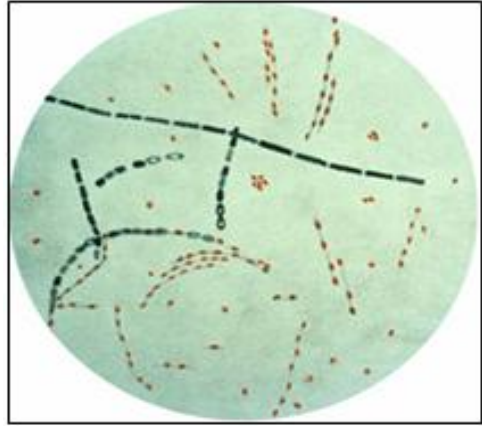
Resim 4.23: Spiroket



Resim 4.24: Gram negatif Basil



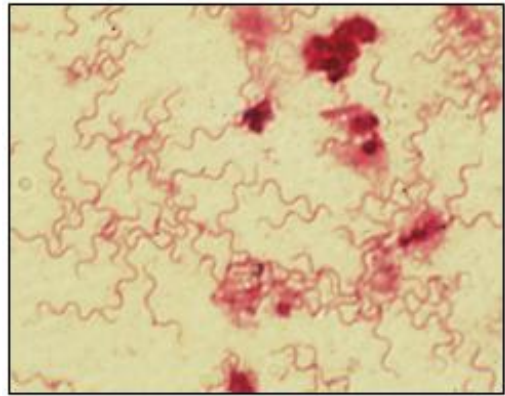
Resim 4.25:Çubuk basil



Resim 4.26: çubuk şeklinde basil



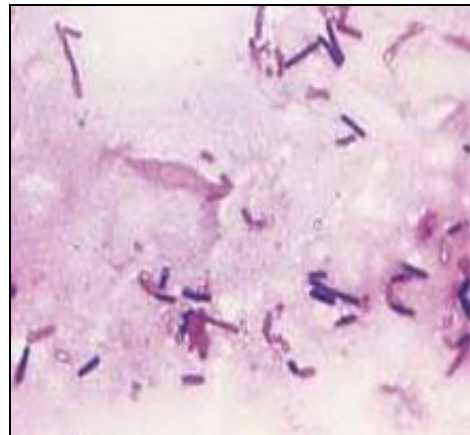
Resim 4.27: Spiril



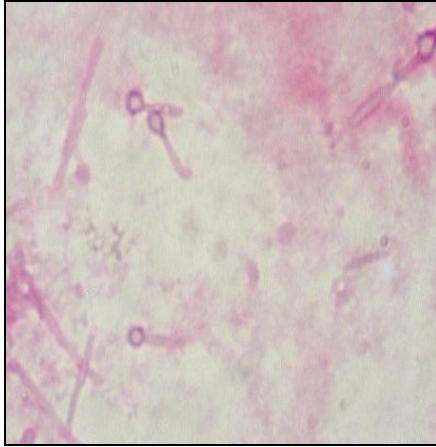
Resim 4.28: Spiril



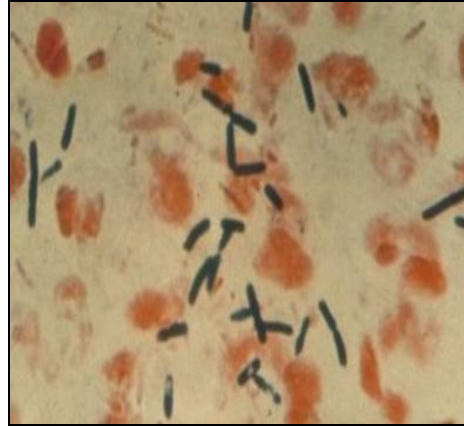
Resim 4.29: Clostridium



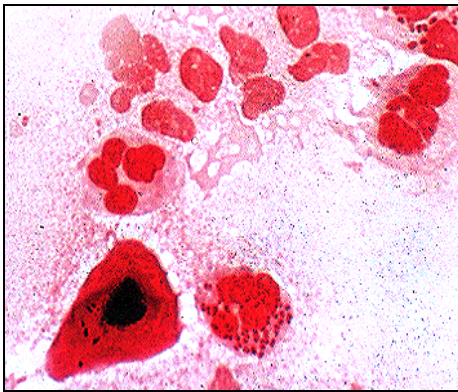
Resim 4.30: Clostridium perfringens



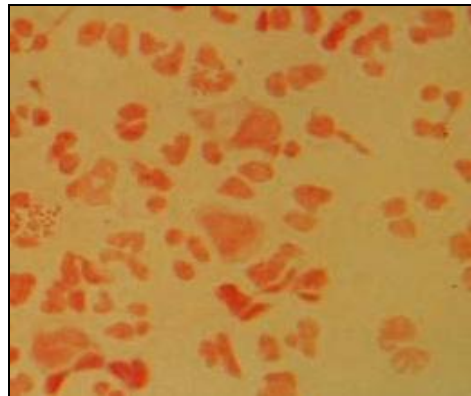
Resim 4.31: Clostridium tetani



Resim 4.32: Clostridium perfringens



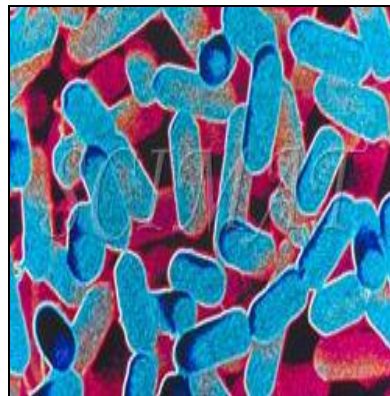
Resim 4.33: Diplokokus



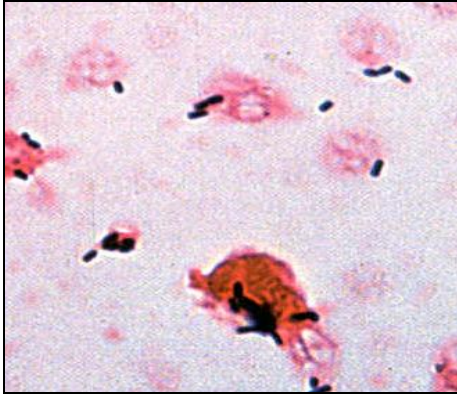
Resim 4.34: Gram negatif diplokokus



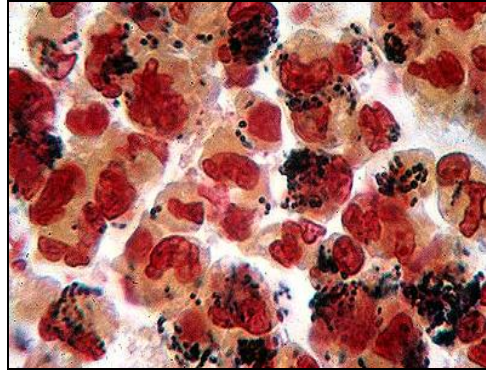
Resim 4.35: Listeria



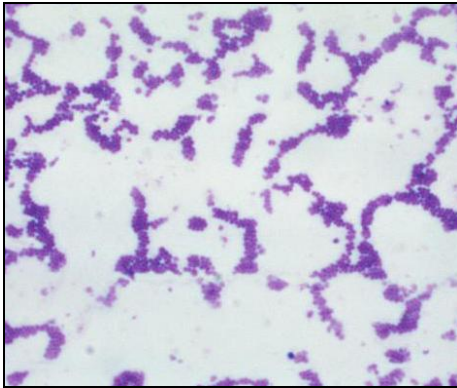
Resim 4.36: Listeria



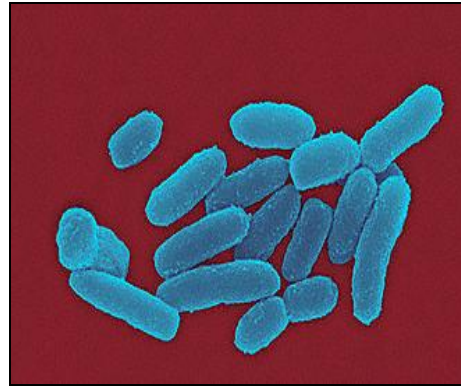
Resim 4.37: Listeria



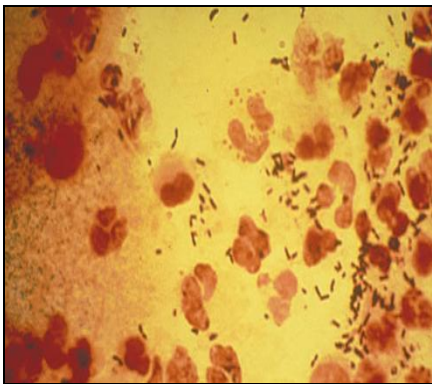
Resim 4.38: Streptobasillus



Resim 4.39: Stafilokokus (Staphylococci)



Resim 4.40: Gram negatif vibrio



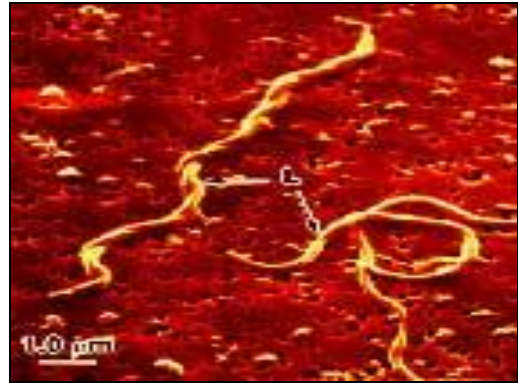
Resim 4.41: Diplokokkus



Resim 4.42: Basillus



Resim 4. 43:Streptobasillus



Resim 4.44:Spiroket

UYGULAMA FAALİYETİ

Önceden hazırlanmış preparattaki bakteri hücre morfolojilerini inceleyiniz.

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ Önceden hazırlanmış bakteri kültüründen preparatı alınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Laboratuvar kıyafetlerinizi giyiniz.➤ Ellerinizi her çalışma öncesinde yıkayınız ve dezenfekte ediniz.➤ Çalışma ortamını temizleyiniz.➤ Kullanılan araç ve gereçleri temizleyiniz. <p>seri çalışınız</p>
<ul style="list-style-type: none">➤ Boyalı preparatı mikroskop tablasına yerleştiriniz. 	<ul style="list-style-type: none">➤ 2. öğrenme faaliyetindeki bilgilerinizi hatırlayınız.
<p>Resim 4.45: Preparatın yerleştirilmesi</p> <ul style="list-style-type: none">➤ 10'luk objektifle incelenecek alanı bulup 40x'lik objektife geçiniz.➤ Gördüğünüz şekilleri çiziniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Objektifi ayarlayınız.➤ Dikkatli ve titiz olunuz.

- Preparat üzerine immersiyon yağı damlatarak immersiyon (100lük) objektifinde ileri incelemeye geçiniz.



Resim 4.46: İmmersiyon yağı damlatma



Resim 4.47: Mikroskopta inceleme

- Gördüğünüz şekilleri çiziniz.

- Gördüğünüz görüntüleri elinizdeki resimlerle karşılaştırınız.

- İmmersiyon yağını hazırlayınız.
- Tablanın kenarından bakarak makro vida yardımıyla immersiyon objektifinin yağa yavaşça dalmasını sağlayınız.
- Objektifin hiçbir şekilde yağ damlasından ayrılmasına izin vermeyiniz.
- Aksi takdirde görüntü alamazsınız.
- İnceleme sırasında diyaframı kısmayı unutmayınız.
- İnceleme sürdürülürken gözünüz okülerde olmalıdır.
- Bir eliniz daima mikro vidada, diğer eliniz ise tablanın ayar vidalarında olacak şekilde hareket ettiriniz.
- Böylece sağlıklı bir gözlem yapabilirsiniz.

DİKKATLİ OLUNUZ

- Çizdiğiniz şekillerin anlaşılabilir olmasına dikkat ediniz.
- Çizdiğiniz resimleri dosyalayınız.
- 4. öğrenme faaliyetinde bakteri morfolojisi ile ilgili resimlere bakınız.
- Laboratuvar önlüğünüzü çıkarıp asınız.
- Ellerinizi her çalışma sonrasında yıkayınız.
- Çalışma ortamını temizleyiniz.
- Kullanılan araç ve gereçleri temizleyiniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki sııklardan doğru olanını işaretleyiniz.

1. Tek bir hücrenin çoğalması ile meydana gelen milyonlarca hücrenin oluşturduğu topluluğa ne denir?
A) Preparat
B) Kültür.
C) Mikroorganizma
D) Koloni
2. Aşağıdakilerden hangisi yuvarlak biçimli bakterilerdendir?
A) Diplokokkus
B) Vibrio
C) Diplobasil
D) Spiroket
3. Kısa ve uzun ve zincirlere sahip çubuk şekilli bakterilere ne ad verilir?
A) Streptokok
B) Streptobasil
C) Sarsina
D) Diplobasil
4. Mikroskop altında üzüm salkımı hâlinde görünen bakteriler aşağıdakilerden hangisine aittir?
A) Vibrio
B) Sarsina
C) Stafilokok
D) Streptokok
5. Tek kıvrımlı virgül hâlinde görülen bakterilere ne ad verilir?
A) Spiroket
B) Spiril
C) Vibrio
D) Tetrakokkus

Aşağıdaki ifadeleri dikkatlice okuduktan sonra, baş tarafta bulunan parantezin içine doğru ise (D) harfi, yanlış ise (Y) harfi koyarak cevaplandırınız.

6. () Bakteriler genel olarak şeffaftır.
7. () Mikroorganizmaların mikroskobik morfolojilerinin incelenmesinde herhangi bir sorunla karşılaşılmaz.
8. () Yuvarlak şekilde görülen bakterilere genel olarak basil adı verilir.

9. () Sarmal biçimli olan mikroorganizmaların kendi etrafındaki kıvrımları az veya çok sayıda olabilir.
10. () Bakteriler Gram pozitif ve Gram negatif olarak ikiye ayrılır.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarı ile karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt yaşadığınız sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrar inceleyiniz.

Tüm sorulara doğru cevap verdiyseniz uygulamalı teste geçiniz.

UYGULAMALI TEST

Bakteri kültüründen preparat hazırlayarak negatif boyama yapınız ve immersiyon objektifinde inceleyiniz. Mikroskopta gördüğünüz görüntünün hangi bakteri türüne ait olduğuna karar veriniz. Yaptığınız işlemleri aşağıdaki değerlendirme tablosuna göre kontrol ediniz.

Değerlendirme Ölçütleri	Evet	Hayır
1. Laboratuvar önlüğünüzü giydiniz mi?		
2. Çalışma ortamınızı temizlediniz mi?		
3. Kullanacağınız araç gereçleri temizlediniz mi?		
4. Eldiven giydiniz mi?		
5. Preparat için kültür aldınız mı?		
6. Doğru olarak preparat hazırladınız mı?		
7. Uygun boyayı seçtiniz mi?		
8. Doğru olarak boyadınız mı?		
9. Mikroskobu incelemeye hazırladınız mı?		
10. İmmersiyon yağını hazırladınız mı?		
11. Boyalı preparat üzerine immersiyon yağını damlattınız mı?		
12. Preparatın boyalı kısmı objektife gelecek şekilde yerleştirdiniz mi?		
13. Tablanın kenarından bakarak, makro vida yardımıyla immersiyon objektifinin yağa yavaşça dalmasını sağladınız mı?		
14. Makro vidayı yavaşça çevirerek merceğin preparata temasını sağladınız mı?		
15. Okülerden bakarak makrovidayı çok yavaş bir şekilde ters yönde çevirerek görüntü almaya çalıştınız mı?		
16. Görüntü alınca mikro vida ile ince ayar yaptınız mı?		
17. İmmersiyon objektifi ile çalışırken, objektifin yağ damlası içinde kalmasını sağladınız mı?		
18. Ayarlama işleminden sonra gözlem yaparak çizim yaptınız mı?		
19. Bakteri resimlerini hazırladınız mı?		
20. Mikroskop görüntüleri ile elinizdeki resimleri karşılaştırdınız mı?		
21. İncelediğiniz preparatın hangi bakteriye ait olduğunu anlayabildiniz mi?		
22. Kullandığınız araç- gereçleri temizleyip kaldırdınız mı?		
23. Ellerinizi yıkayıp dezenfekte ettiniz mi?		
24. Laboratuvar son kontrollerinizi yaptınız mı?		
25. Önlüğünüzü çıkarıp astınız mı?		

DEĞERLENDİRME

Yapılan değerlendirme sonunda **“hayır”** şeklindeki cevaplarınızı bir daha gözden geçiriniz. Cevaplarınızda tereddütleriniz varsa öğrenme faaliyetini tekrar ediniz. Cevaplarınızın tamamı **“evet”** ise bir modül değerlendirmeye geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki şıklardan doğru olanı işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisinde fiksasyon tanımı doğru olarak verilmiştir?
A) Mikroorganizmaların lama tutunmasını sağlamak
B) Lam üzerine ince yayma yapmak
C) Preparatı sıvı örnek ile hazırlamak
D) Hiçbiri
2. Kirli lamlar deterjanlı su içinde ne kadar bekletilmelidir?
A) 12saat ve üzeri
B) 8 saat ve üzeri
C) 24 saat ve üzeri
D) 18 saat ve üzeri
3. Gram pozitif bakteriler dekolorizasyon işleminde ne renk görünürler?
A) Renksiz
B) Pembe
C) Mor
D) Mavi
4. Gram negatif bakteriler karşıt boya ile boyandığında ne renk görünürler?
A) Mor
B) Renksiz
C) Mavi
D) Pembe
5. Mikroskopta görüntünün net olabilmesi en çok aşağıdakilerden hangisine bağlıdır?
A) Objenin büyüklüğüne
B) Mikroskobun büyütme gücüne
C) Objenin cinsine
D) Işık obje arasındaki mesafeye
6. Boyanmamış canlı hücrelerin iç yapısının incelenmesinde, en çok hangi mikroskopdan yararlanılır?
A) Fluoresant mikroskobu
B) Işık mikroskobu
C) Faz-kontrast mikroskobu
D) Elektron mikroskobu
7. Tüp, kol, ayak ve tabla gibi araçlar mikroskobun hangi bölümünde bulunur?
A) Esas optik kısımdan
B) Aydınlatma kısmında
C) Optik kısımda
D) Mekanik kısımda

8. Mikroskopun objeyi büyütme gücü nasıl hesaplanır?
A) Objektif ile okülere ait değerleri birbirleri ile çarparak
B) Objektif ile okülere ait değerleri birbirleri ile toplayarak
C) Objektif değerini oküler değerine bölerek
D) Objektif değerini oküler değerinden çıkartarak
9. Mikroskopun temizliği ne kadar aralıklarla yapılmalıdır?
A) 15 günde
B) Haftada bir
C) Her kullanımdan sonra
D) Ayda bir
10. Spiroket mikroorganizmalar hangi bakteri türüne aittir?
A) Spiral
B) Çubuk
C) Yuvarlak
D) Hepsi
11. Virgül şeklinde olan mikroorganizmalara ne ad verilir?
A) Spiral
B) Vibrio
C) Spiril
D) Spiroket
12. Gram pozitif bakterilerin mikroskop altında mavi-siyah ve mor renkte görünmelerinin nedeni aşağıdakilerden hangisidir?
A) Hücre duvarlarında dış zar bulunması
B) Hücre çeperlerinde dış zar bulunması
C) Bünyelerine nigrosin boyayı emebilmeleri
D) Kristal viyoleti hücre içinde tutabilmeleri

Aşağıdaki ifadeleri dikkatlice okuduktan sonra baş tarafta bulunan parantezin içine doğru ise (D) harfi, yanlış ise (Y) harfi koyarak cevaplandırınız.

13. () Dekolorize olmuş hücreler karşıt boya ile boyanmaz.
14. () Günümüzde negatif diferansiyel boyama çok tercih edilir.
15. () Mikroskop, kullanılmadan önce ve sonra mutlaka temizlenmelidir.
16. () Oküler, bir mercek sistemidir.
17. () Koloni denildiğinde tek bir bakteri türü anlaşılır.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarı ile karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt yaşadığınız sorularla ilgili konuları öğrenme faaliyetlerine geri dönerek tekrar inceleyiniz. Tüm soruların cevapları doğru ise uygulamalı teste geçiniz.

UYGULAMALI TEST

Sütten elde edilmiş olan kültürden preparat hazırlayarak gram boyama yapınız. Boyanmış preparatınızı immersiyon objektifinde inceleyerek görüntüleri elinizdeki resimlerle karşılaştırıp bakterinin türünü ve gram özelliklerini tespit ediniz. Yaptığınız işlemleri aşağıdaki değerlendirme tablosuna göre kontrol ediniz.

Değerlendirme Ölçütleri	Evet	Hayır
1. Labaratuvar önlüğünüzü giydiniz mi?		
2. Çalışma alanınızı temizlediniz mi?		
3. Kullanacağınız araç gereçleri hazırladınız mı?		
4. Preparat için 24 saatlik kültürü hazırladınız mı?		
5. Özeyi bek alevinde yaktınız mı?		
6. Temiz, kuru ve yağsız lam üzerine bir öze dolusu saf su damlattınız mı?		
7. Özeyi yaktınız mı?		
8. Kültürden öze ile örnek aldınız mı?		
9. Örneği lam üzerindeki su damlası ile ezdiniz mi?		
10. Özenin ucunu yaktınız mı?		
11. Homojen bir şekilde karıştırdınız mı?		
12. Preparatı havada kuruttunuz mu?		
13. Bek alevinden geçirerek tesbit yaptınız mı?		
14. Preparat hazırlarken steril koşullarda çalıştınız mı?		
15. Preparatı kristal violet ile kapladınız mı?		
16. 1 dakika beklediniz mi?		
17. Boyadığınız preparatı saf su ile yıkadınız mı?		
18. Preparatın üzerini lugol ile kaplayarak 1 dakika beklediniz mi?		
19. Lugolu yıkadınız mı?		
20. Preparat üzerini % 96'lık etil alkol ile kapladınız mı?		
21. 10–15 saniye beklediniz mi?		
22. Süre sonunda preparatı saf su ile yıkadınız mı?		
23. Preparatı sulu fuksin veya safranin ile kaplayıp 10–15 saniye beklediniz mi?		
24. Bol saf su ile yıkayıp havada veya kurutma kağıdı arasında kuruttunuz mu?		
25. Mikroskobu kullanıma hazırladınız mı?		
26. Mikroskobun parçalarının tam olup olmadığını ve doğru hareket edip etmediği kontrol ettiniz mi?		
27. Mikroskobun lambasını yaktınız mı?		
28. Kondansörün en üst konumda, diyaframın tamamen açık, olup olmadığını kontrol ettiniz mi?		
29. Tablanın kenarından bakarak kondansöre yeterli düzeyde bir ışığın gelip gelmediğini kontrol ettiniz mi?		
30. Mikroskop tablasına incelenecek preparat yerleştirdiniz mi?		

31. Tablanın ayar vidaları ile oynayarak incelenecek kısım, görüş hattının hizasına gelecek şekilde preparatı hareket ettirdiniz mi?		
32. Makro vida ile oynayarak, 10x veya 40x büyütmeli objektiften görüntü almaya çalıştınız mı?		
33. Görüntü aldıktan sonra, ışık kaynağı, diyafram ve kondansör ile oynayarak tekrar bir ışık ayarlaması yaptınız mı?		
34. Mikro vidayla oynayarak ince görüntü ayarı yaptınız mı?		
35. Preparatın üzerine immersiyon yağı damlatarak immersiyon objektifine (100x) geçtiniz mi?		
36. Objektifin yağa dalmasını sağladınız mı?		
37. İnceleme için tekrar görüntü ayarı yaptınız mı?		
38. İnceleme süresince objektifin yağ içinde kalmasını sağladınız mı?		
39. İnceleme sırasında diyaframı olabildiğince kıstınız mı?		
40. Kondansör hareketli ise aşağı indirdiniz mi?		
41. Önceden negatif boyama yapılmış bakteri resimleri temin ettiniz mi?		
42. İncelemedeki görüntülerle resimleri karşılaştırdınız mı?		
43. Görüntülerdeki renk donuk, mavi-yeşil arası bir renk miydi?		
44. Kullandığınız araç gereçleri temizleyip kaldırdınız mı?		
45. Ellerinizi yıkayıp dezenfekte ettiniz mi?		
46. Laboratuvar son kontrollerinizi yaptınız mı?		
47. Önlüğünüzü çıkarıp astınız mı?		
48. Size verilen zamanı iyi değerlendirdiniz mi?		

DEĞERLENDİRME

Yapılan değerlendirme sonunda “**hayır**” cevaplarınızı bir daha gözden geçiriniz. Cevaplarınızda tereddütleriniz varsa modülü tekrar ediniz. Bütün cevaplarınız “**evet**” ise modülü tamamladınız, tebrik ederiz. Öğretmeniniz size çeşitli ölçme araçları uygulayacaktır. Öğretmeninizle iletişime geçiniz.

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ – 1 CEVAP ANAHTARI

1	D
2	C
3	B
4	A
5	D
6	Y
7	D
8	Y
9	D

ÖĞRENME FAALİYETİ –2 CEVAP ANAHTARI

1	C
2	A
3	C
4	D
5	A
6	D
7	Y
8	Y
9	D
10	Y
11	Mikroskop
12	Elektromanyetik
13	Makro
14	Esas optik
15	Binoküler

ÖĞRENME FAALİYETİ -3 CEVAP ANAHTARI

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

ÖĞRENME FAALİYETİ – 4 CEVAP ANAHTARI

1	D
2	A
3	B
4	C
5	C
6	D
7	Y
8	Y
9	D
10	D

MODÜL DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI

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

KAYNAKÇA

- AKDUR Recep, **Sıtma Laboratuvarı Teknisyeni El Kitabı**, Ankara, 1997.
- ARDA Mustafa, **Temel Mikrobiyoloji**, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, 2000.
- ÇOTUR Aysin ,**Genel Mikrobiyoloji. Laboratuvar Yöntemleri Nobel Tıp Kitabevi**,İstanbul, 2003.
- HALKMAN A., **Kadir Gıda MikrobiyolojisiUygulamaları**, Ankara, 2005.
- TEMİZ Ayhan ,**Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri**,Hatipoğlu Yayınları, Ankara, 2000.
- GÜNDOĞDU Hamiye, **Pratik Mikrobiyoloji METGE**, Ankara, 1967.
- www.mikrobiyoloji.org
- www.kimyaevi.org
- www.tr.wikipedig.org
- www.microbiology.science.oraganstate.edu
- www.biology.edcc.edu
- www.bioweb.wku.edu
- www.lib.uiowa.edu
- www.medinfo.ufl.edu
- www.bergen.edu