

# **GENEL MİKROBİYOLOJİ UYGULAMA NOTLARI**

## **1. MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA GENEL ÇALIŞMA KURALLARI**

Laboratuvar çalışmalarında dikkatsizlik ve ihmal sonucunda kazalar meydana gelebilmektedir. Bu bakımdan iyi planlama, dikkatli çalışma ve iyi alınmış önlemler önemli ölçüde koruyucu fonksiyonlara sahiptir. Bu bağlamda, güvenli binaların, ekipmanların seçimi ve yerleşimi, yeterli bilgi ve güvenlik önlemleri yanında, sürekli olarak tedbirli ve deneyimli olmak gerekmektedir. Laboratuvarlarda çalışan kişiler; toksik kimyasallar, tutuşabilir, parlayıcı, patlayıcı, korozyif, patojen, karsinojenik ve radyoaktif maddeler ile ultraviyole, yüksek voltaj vb. riskler ile karşı karşıyadır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında ise bu tehlikelere ilave olarak hastalık etkeni olabilecek mikroorganizmalarla çalışılmasından kaynaklanabilecek riskler de (kontaminasyon tehlikesi) söz konusudur. Mikroorganizmaların hastalık etkeni olabilecekleri her zaman göz önünde bulundurulmalı, gerekli önlemler alınmalıdır.

Çalışma yerinin temiz ve düzenli tutulabilmesi için yeterli büyüklükte oda temin edilmiş olmalıdır. Laboratuvarda şu düzenlemeler yapılmalıdır (**EK-1**):

1. Genel hijyenik tedbirlere mutlaka uyulmalı, çalışırken mutlaka temiz laboratuvar önlüğü giyilmelidir. Özellikle mikrobiyoloji laboratuvarı için yandan açılan, yakası tamamen kapalı önlükler seçilmeli, laboratuvar alanını terk ederken önlük çıkarılmalı, bununla yemeğe vb.. genel yerlere gidilmemelidir. Enfeksiyon riskleri yüksek organizmalarla çalışırken lastik eldivenler giyilmeli, eldivenler, önlükler yıkanmadan önce dezenfekte edilmeli veya otoklavlanarak dekontamine edilmelidir.

2. Laboratuvarda gıda maddelerinin bulunmaması, sigara ve çay içilmemesi gereklidir.

3. Laboratuvar masası çalışmaya başlamadan önce ve çalışma bittikten sonra dezenfektan bir madde ile silinmelidir.

4. Çalışırken elleri ağza, yüze, göze veya burna sürmemeli, kullanılan malzemeler de ağza temas ettirilmemelidir.

5. Gömlek ceplerine sıvı veya katı kültür ihtiva eden tüp ya da petri konulmamalıdır.

6. Ekim yaparken pencere açılmamalı, konuşulmamalı, gereksiz el kol hareketleri yapılmamalıdır.
7. Sterilitesinden şüphelenilen malzemeler kullanılmamalıdır.
8. Özeler ekim işlemlerinde kullanılmadan önce ve sonra mutlaka özel bek alevinde kızıl kor haline gelecek şekilde yakılmalıdır.
9. Mikroskop, su banyosu gibi malzemeler her gün kullanılması sebebiyle her kullanımdan sonra temizlenmelidir.
10. Etrafa mikroorganizma yüklü kültür tüpleri kırılınca, üzeri dezenfektan bir maddeye batırılmış pamukla örtülmeli etkisi geçince toplayıp alınmalıdır.
11. Kirli tüp-pipet, lam-lamel vb. malzemeler dezenfektanlı bir kaba konulmalıdır. Özeler ateşte yakılarak yerlerine kaldırılmalıdır.
12. Petri kutuları veya kültürler kapağı açık olacak şekilde masa üzerine bırakılmamalıdır.
13. Laboratuvarda sinek, böcek vb. bulunmamalıdır. Mikroorganizma taşıyarak tehlikeli olabilirler.
14. Çalışma programı laboratuvara girmeden hazırlanmalıdır.
15. Yapılan tüm çalışmaların kayıtları zamanında ve doğru olarak tutulmalıdır.
16. İşaretlemelerde cam kalemleri veya kendiliğinden yapışabilir etiketler kullanılmalı ve kesinlikle dille ıslatılmaya çalışılmamalıdır.
17. Çalışma bittikten sonra eller sabunlu su ile yıkanmalı, dezenfektan madde ile dezenfekte edilmelidir.
18. Günlük temizlikte dezenfektanlı su kullanılarak laboratuvar zemini silinmelidir. Haftalık çalışma sonunda laboratuvardan ayrılırken % 4'lük formaldehidle fumigasyon veya silme yoluyla genel dezenfeksiyon yapılmalı, hemen laboratuvar terk edilmeli ve hafta başında cam pencere açmadan alkolle silinerek işlem tamamlanmalıdır.
19. Laboratuvarda ilk yardım için sağlık dolabı, göz tahrişlerine karşı özel yıkama şişeleri, yanık pomatları ve gerekli diğer malzeme bulundurulmalıdır.
20. Elleri ve yüzünde ciddi enfeksiyon bulunan ve kontaminasyona neden olabileceğinden şüphelenilen personele mikrobiyolojik muayene yapmamalıdır.

**21.** Duvarlar, tavan, yer ve eşyalar kolay temizlenecek ve gerektiğinde dezenfekte edilebilecek şekilde düzgün yüzeyli, duvarlarla tavan ve eşyalar kolay temizlenebilecek ve gerektiğinde dezenfekte edilecek şekilde düzgün yüzeyli olmalıdır.

**22.** Çalışma sahası direkt güneş ışığına karşı korunmuş olmalıdır. Odalar iyi aydınlatılmış olmalıdır.

**23.** Çalışılan kültürler tüplere, preparatlara ve bütün temas yüzeylerine, canlı mikroorganizmaların bulunabileceği ve her an bir kontaminasyona neden olabileceği düşüncesiyle çok dikkat göstermek ve özenle hareket etmek gerekir. Ayrıca, bu etkenlerin solunum, sindirim sistemlerine etkilerini, göz, deri ve yaralardan olabilecek enfeksiyonlarla meydana getirebildikleri lokal patolojileri de dikkate alınmalıdır. Özellikle *Brucella* spp. gibi bazı mikroorganizmaların da hasarsız deriden bile doğrudan girebileceği gözden uzak tutulmamalıdır. Buna göre laboratuvar personelinin enfeksiyon tehlikesine maruz kalmaması ve özellikle çalışılan materyalin kontamine olmaması için alınabilecek önlemler aşağıda özetlenmiştir.

**24.** Sporlanmış kültürlerle çalışırken saçılması halinde solunum sisteminde ve allerjik hasarlanmalara sebep olmamak için, derhal örtülmeli, havalandırma ile atmosfere yayılımı önlenerek, dezenfektanlarla muamele edilip derhal uzaklaştırılmalıdır.

**25.** Test tüpleri mutlaka tüp sporunda dik olarak tutulmalı, bankolara yatık şekilde bırakılmamalıdır. Bankolar çalışmaya başlamadan önce %70'lik alkollü pamukla silinerek dezenfekte edilmelidir.

**26.** Kullanılacak pipetlerin ağza gelen uçları sterilizasyondan önce pamukla tıkanmalı ve özellikle pipetlemede ağza kaçma riskleri önlenmelidir. Bu durum her ne kadar çalışma hızı biraz yavaşlarsa da güvenceyi arttırırlar.

**27.** Mikroorganizma kültürleri ile temas halinde olan homojenizatör ve blender için özel önlemler alınmalı, havayı kontamine etmemeleri için genelde ağızları kapalı çalışılmalıdır.

**28.** Çalışmanın sonunda çalışılan alan ve masalar mutlak temizlenmeli, kontamine malzeme ve kültürler otoklavlanarak sterilize edilmeli ve sonra yıkamaya alınmalıdır. Tezgahlar ve zemin temizlik sonunda dezenfekte edilmelidir.

## **2. STERİLİZASYON, DEZENFEKSİYON, ANTİSEPSİ VE UYGULAMA YÖNTEMLERİ**

### **Sterilizasyon**

Ortamdaki **tüm canlı ve spor halindeki mikroorganizmaların öldürülmesi** işlemidir. Bu işlemin uygulandığı madde veya cisimde gelişme ve çoğalma yeteneğine sahip hiçbir mikroorganizma kalmamalıdır.

#### **Sterilizasyonun amacı;**

- Hastalık etkenlerinin etrafa yayılmasına ve bulaşmasına engel olmak,
- Besiyerlerini ve diğer ortamları mikroorganizmlardan arındırmak,
- Malzeme ve aletlerin mikroorganizmlarla bulaşmasını engellemek,
- Gıdaların bozulmasını önlemektir.

#### **Sterilizasyon merkezleri genellikle 4 bölümden oluşturulur:**

1. Dekontaminasyon bölümü,
2. Hazırlık ve paketleme bölümü,
3. Sterilizasyon bölümü,
4. Depolama bölümü.

Dekontaminasyon bölümü mutlaka diğer alanlardan ayrı bir bölüm olarak inşa edilmelidir. Diğer 3 bölüm bir arada geniş bir alana yerleştirilebileceği gibi ideal olan bu alanların da ayrı ayrı odalara bölünmesidir. Dekontaminasyon, nesnelerden patojen mikroorganizmaların uzaklaştırılmasıdır. Bu da temizlik ve dezenfeksiyon ile sağlanır.

Dekontaminasyon işlemi el ve fırça yardımıyla yapılabileceği gibi ultrasonik yıkayıcılar da bu amaçla kullanılabilir. Mikroorganizmaların kuru ortamda üremesi azaldığından, her temizlikten sonra mutlaka kurulama yapılmalıdır.

### **Dezenfeksiyon**

Cansız nesneler üzerinde bulunan **potansiyel olarak patojen mikroorganizmaları elemine eden**, genellikle bakteri sporlarını etkilemeyen, sıklıkla **dezenfektan** adı verilen kimyasal maddelerle gerçekleştirilen bir yöntemdir.

### **Tindalizasyon**

Bakteriler için besleyici özelliğe sahip ve yüksek ısıda bozulabilecek sıvı maddeler, belirli ısı derecelerinde birkaç gün üst üste tutularak steril edilir. Bu amaçla benmari ismi de verilen ve belirli sıcaklık derecelerine ayarlanabilen su banyoları kullanılır. Hidrolize olabilecek çözeltiler 70°C 'de, kan, serum gibi proteinli maddeler ile aşılar 56 °C 'de tindalize edilir. İçinde steril edilecek besiyeri veya çözeltiler bulunan tüp veya şişeler ağızları dışarıda kalacak şekilde benmarideki su içine daldırılır. Isıtma süresi çoğunlukla 1 saattir. İşlem 3 gün üst üste tekrarlanır. Dirençli sporlar için daha uzun sürede tutulabilir. İşlem aralarında çözelti veya besiyeri içeren tüpler +4 °C 'de buzdolabında bekletilir.

### **Pastörizasyon**

Süt ve süt ürünlerinin, meyve sularının hastalık yapıcı mikroorganizmalardan arındırılması için kullanılan yöntemidir. Süt 63-65°C'de en az 30 dk veya 72-74 °C'de 30-40 sn tutulur ve birden soğutulur. Bu şekilde sütteki patojen bakteriler ölür. Sadece ısıya dayanıklı nonpatojen bakteriler ve sporlar canlı kalır. Bundan dolayı süt, pastörizasyondan sonra kullanılıncaya kadar 10°C'nin altında tutulmalıdır.

### **UHT (Ultra High Temperature) Sterilizasyon**

Süt ve meyve sularının aniden 135-150 °C'ye kadar ısıtılması bu ısıda 4 saniye tutulması ve aniden soğutulması işlemidir.

### **Bir Ortam veya Maddenin Mikroorganizmalardan Arındırılmasında**

#### **Kullanılan Yöntemler**

#### **Tanımlar**

**Bakteriyostatik:**Bakterilerin üremesini inhibe eden ancak öldürmeyen maddeler.

**Bakterisid:**Bakterilerin vejetatif formlarını öldüren maddeler.

**Virusid:**Virusları inaktive eden maddeler

**Germisid:**Gelişme dönemini tamamlamış olan mikroorganizmalara öldürücü etki yapma durumu

**Fungisid:**Patojenik olan ve olmayan mantarları öldüren maddeler.

**Sporisid:** Sporları öldüren ajanlara verilen genel bir isimdir.

| 1.Kimyasal Yöntemler                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 2.Fiziksel Yöntemler                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dezenfeksiyon</li> <li>• Antisepsi</li> <li>• Kemoterapi</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Isı uygulamak <ul style="list-style-type: none"> <li>-Nemli Isı <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Su buharı ile</li> <li>=100 °C (Koch kazanı)</li> <li>&gt;100 °C (otoklav)</li> <li>➤ Sıcak su ile</li> <li>Kaynatma</li> <li>Tindalizasyon</li> </ul> </li> <li>-Kuru Isı <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sıcak hava fırını</li> <li>➤ Alevden geçirme</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>• Işın uygulamak <ul style="list-style-type: none"> <li>-UV ışını</li> <li>-x ışını</li> <li>-γ ışını</li> </ul> </li> <li>• Dondurmak</li> <li>• Kurutmak</li> <li>• Elektrik akımı uygulamak</li> </ul> |
| 3.Mekanik yöntemler                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Filtrasyon <ul style="list-style-type: none"> <li>-Membran filtreler (*)</li> <li>-Seitz filtreleri</li> <li>-Berkefeld filtreleri</li> <li>-Chamberland filtreleri</li> </ul> </li> <li>• Santrifugasyon</li> <li>• Ezmek</li> <li>• Basınç uygulamak</li> <li>• Çalkalamak</li> </ul> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

**Tablo-1:** Mikroorganizmaların arındırılmasında kullanılan yöntemler

## 1. Kimyasal Yöntemler

- a) **Dezenfeksiyon:** Dezenfektan maddeleri ile sağlanmaktadır.
- b) **Kemoterapi:** Antibakteriyel kemoterapi (Antibiyotik: sulfonamidler)
- c) **Antisepsi:** Canlı ortamlardan bakteriyel kontaminasyonu kimyasal ajanlar (antiseptik maddeler) ile önlemektir.

**Sepsis:** Yunancada çürümek-pütrifiye olmak demektir. Bakteriyel kontaminasyonu tanımlar.

**Asepsis:** Belirli bir kontaminasyonun olmaması durumudur. Canlı ortamlardan bakteriyel kontaminasyonu fiziksel ve mekanik araçlarla önlemektir.

### **Dezenfektan tipleri ve Antiseptikler;**

#### ➤ **Fenoller (Karbolik asit)**

-Fenoller, bakterisid etkilidir, virus ve mantarlara etki etmez. Plasma membranlarını parçalayarak, proteinleri denatüre eder. Krezoller, genel dezenfektan olarak kullanılır. Bis-fenoller antiseptik olarak kullanılır.

-Deride irritasyon yapar ve keskin bir kokusu vardır, Örneğin; Krezol, Lizol, Klorkrezol..vb.

#### ➤ **Halojenler**

**-Iyodin-Povidon:** Bakterisid etkilidir. Viruslara etki eder ancak mantarlara karşı etkisi bulunmamaktadır. Proteinleri denatüre eder.

**-Iyodoforlar:** İyodin ile aynı etkidir ancak daha yavaş etkisini gösterir. Cerrahi operasyonlarda kullanılır. Örneğin; Betadine, Isodine

#### ➤ **Alkoller**

Proteinleri denatüre etmek suretiyle bakteri, zarfsız viruslar ve mantarları öldürür.

Ancak endosporlu bakterilere etkimez. Buharlaştır, rezidü bırakmaz. Açık yaralarda proteinleri koagule etmesi sebebiyle kullanılmamalıdır. Enjeksiyonlar öncesinde derinin üzerindeki mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında kullanılır.

**-Etanol:** 70% konsantrasyonu etkili bir dezenfektandır.

**-Isopropanol:** Etanolden daha etkili bir dezenfektandır.

#### ➤ **Kuaterner Amonyum Bileşikleri**

Katyonik deterjanlardır. Gram pozitif bakterilere etkirler. Mantar, amip ve zarflı viruslara da etki ederler. Güçlü antimikrobiyal etkili, kokusuz, stable ve nontoksiktir, dezavantajı köpük oluşturması ve organik materyalle karşılaşırse effektivitesini kaybetmesidir.

**- Setrimid (Cetrimide):** Bakterisid etkili bir antiseptiktir.

**-Zefiran (Benzalkonyum klorür):**Antiseptik ve dezenfektan özelliktedir. Bakteriler, mantar ve protozoonlar üzerinde aktivite gösterir. Çözeltiler konsantrasyonlarına göre bakterisidal veya bakteriyostatik aktivite gösterir.Bakteri sporlarına ve *Mycobacterium tuberculosis*' e karşı etkisizdir.

(*Pseudomonas* suşları bu dezenfektanlara karşı dirençlidir, hastane infeksiyonları oluşturabilirler)

#### ➤ **Aldehitler**

Etkili antimikrobialler içerirler. Çeşitli fonksiyonel grup proteinle kovalent bağ oluştururlar.

##### **-Formaldehit(Gaz formu)**

Mükemmel dezenfektandır.Formalin,%37'lik sıvı suspansiyonu şeklinde kullanılır.Virus ve bakterilere etkir.Mukoz membranları irrite eder, kokusu çok yoğundur.

##### **-Glutaraldehit**

Formaldehiden daha az iritan ve daha fazla etkilidir.Sterilizasyon yapan dezenfektanlardan biridir.10 dakikada bakterisidal, tüberkülosidal ve virüsidal etkilidir;3-10 saatte ise sporisidal etkilidir. Hastane ekipmanlarının sterilizasyonunda kullanılır.**Cidex:** %2'lik solüsyonu dezenfeksiyon amacıyla kullanılmaktadır.

#### ➤ **Peroksijenler**

**-Hidrojen Peroksit:** Cansız objelerin sterilizasyonunda kullanılır.Açık yaralarda kullanımı katalaz enzimi ile yıkımlanması sebebiyle uygun değildir.Kontakt lens dezenfeksiyonunda kullanılır.

**-Benzoil Peroksit:** Akne tedavisinde kullanılmaktadır.

**-Perasetik Asit:** Sterilizasyon ve dezenfeksiyon amacıyla çeşitli üretici firmalar tarafından sıvı, gaz ve buhar formlarında kullanılmıştır. Perasetik asit, keskin bir kokuya sahip ve berrak bir sıvıdır. Ticari olarak % 35-40 lık solüsyonlar halindebulunur. Bakteri ve mantarları 5 dakikadan az, endosporları ise 30 dakikada inaktive eder. Toksik rezidü bırakmaması sebebiyle gıda ve medikal aletlerin dezenfeksiyonunda kullanılır.

### ➤ **Gaz Sterilizatörler**

**-Etilen Oksit (EO):** Yüksek ısı ve basınçlı buhar ile steril edilemeyen hassas malzemelerin sterilizasyonunda en uygun yöntemdir. EO, güçlü bir antimikrobik ajan olup bilinen tüm virüsleri, bakterileri ve bakteri sporlarını yok eder. EO, mikroorganizmaların RNA ve DNA ları ile reaksiyona girip onların genetik yapılarını bozar. Isıya dayanıksız olan malzemelerin sterilizasyonunda ve 4-8 saat içinde tüm bakterileri ve sporları öldürür. Saf formu toksik ve patlayıcıdır.

### ➤ **Ağır Metaller**

**Gümüş:** Göz infeksiyonlarında,

**Bakır:** Balık havuzlarının dezenfeksiyonunda,

**Civa:** Deri yaralarının dezenfeksiyonunda,

**Selenyum:** Fungal infeksiyonların tedavisinde ve kepek şampuanlarında,

**Çinko:** Ağız dezenfektanı ve antifungal olarak kullanılmaktadır.

## **2. Fiziksel Yöntemler**

### **I. Isı uygulamak**

Mikroorganizmaların enzim ve diğer protein yapılarını denatüre etmek suretiyle ölmelerine neden olur. Steril edilecek malzemenin ısıya dayanıklı olması gerekir. Isı ile sterilizasyonda etkili olan bazı değişkenler vardır:

**-Isı Derecesi:** Isı derecesi arttıkça sterilizasyon işleminin süresi kısalır.

**-Etki Süresi:** Isı ile ters orantılıdır. Isının derecesi arttıkça etki süresi için gereken zaman kısalır.

**-Ortamın Nemi:** Nem oranı arttıkça sterilizasyon için gereken ısı derecesi ve etki süresi kısalır. Mikroorganizma içindeki su oranı arttıkça protein koagülasyonu çabuklaşacağından sterilizasyon kolaylaşır. Bakteri sporları içinde az su bulunduğu için sterilizasyona daha dayanıklıdırlar.

**-pH:** Nötr ortamda sterilizasyon süresi uzar. Asit ve alkali ortamlarda ise kısalır.

**-Ozmotik Basınç:** Osmotik basıncın artmasında hücre içi suyun azalmasına yol açacağından olumsuz etki yaratır.

## A)Nemli Isı

Sterilizasyon ortamında su bulunması, mikroorganizmaların koagülasyonunu kolaylaştırır. Nemli ısı ile sterilizasyonda su buharı ya da sıcak su kullanılabilir (Nemli ısı kuru ısıdan daha etkilidir).

### a)Su Buharı İle Sterilizasyon

**-Basıncsız Buhar ile Sterilizasyon:** Basıncsız buhar ile sterilizasyonda temel ilke, doymuş ve akım halindeki basıncsız su buharı ortamında 100° C ile sterilizasyondur (Örneğin; Arnold kazanı veya Koch kazanı)

**-Basıncılı Buharla Sterilizasyon:**Buharla doymuş bir ortamda, basınç altında ve 100 °C nin üzerindeki ısılarda yapılan sterilizasyon işlemidir. En önemli özelliği, hızlı, ucuz ve toksik atık oluşturmaksızın sterilizasyon sağlamasıdır. Bu işlemde otoklavlar kullanılır.Yüksek basınç, ısı ve nemle çalışan bir makinedir. 121 °C, 1.1 atmosfer basıncında(normal atmosferik basıncın iki katı), 15 dakika içinde tüm mikroorganizmalar (vejetatif ve endospor formları dahil) inaktive olurlar.



**Şekil-1:** Yatay Otoklav Cihazı

## b) Sıcak Su ile Sterilizasyon

**-Kaynatma:** 100°C 'de 5-10 dakika kaynatma ile mikroorganizmaların vejetatif şekilleri ile bazı bakteri sporları ölür. 100°C 'de 30 dakika kaynatma ile sterilizasyon sağlanabilir

**-Tindalizasyon:** Hidrolize olabilecek çözeltiler 70°C 'de, kan, serum gibi proteinli maddeler ile aşılar 56 °C 'de tindalize edilir.

## B) Kuru Isı

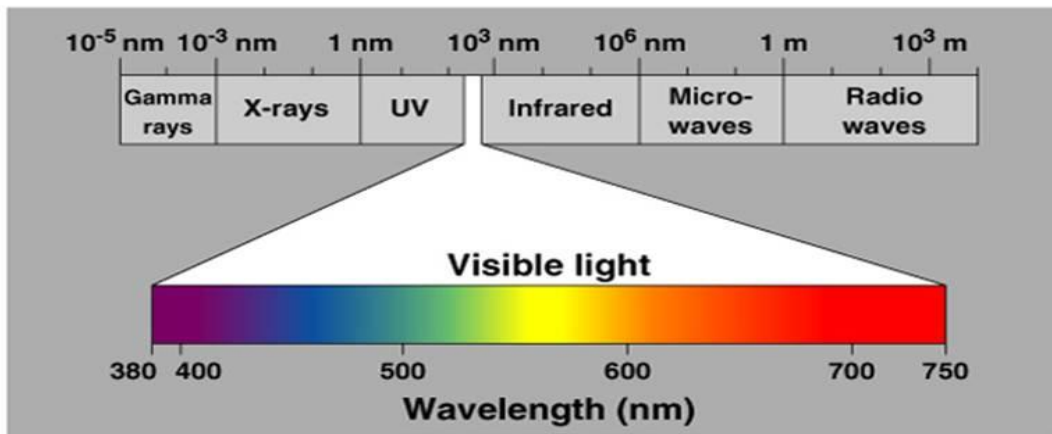
Mikroorganizmalar üzerinde oksidasyon oluşturarak etkili olmaktadır.

**a) Kuru Sıcak Hava ile Sterilizasyon:** Kuru sıcak hava ile çalışan sterilizatörlere **Pasteur fırını** adı verilir. Pasteur fırınında cam, madeni eşya, bazı toz halindeki maddeler, süzgeç kağıtları ve yağlar steril edilebilir. Ancak cam malzeme kesinlikle ıslak olmamalıdır. Pasteur fırınlarında farklı ısılarda farklı sürelerde sterilizasyon yapılır. 170-175 °C 'de 1 saat, 160-165 °C 'de en az 2 saat, 150 °C de en az 150 dakika süre gerekir. Besiyerleri ve sıvıların sterilizasyonu için bu yöntem kullanılamaz.

**b) Yakma ve Alevden Geçirme (Flambe etme):** Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sürekli kullanılan iğne, öze gibi malzemelerin sterilizasyonu için kullanılır ve alevde kızıl dereceye kadar ısıtılmaları gerekir. Cam kapların ağızları veya cam aletler alevden geçirmek suretiyle üzerlerinde bulunan mikroorganizmalardan arındırılırlar.

## II. Işın Uygulamak

Isı ve diğer yöntemlerle steril edilemeyen ortamların sterilizasyonunda ışıklardan yararlanılır. Bu ışınların çevreye de etkili olmaları nedeniyle sınırlı ve önlem alınarak uygulanmaları gerekir.



Şekil-2: Dalga boyu spektrumu

**-İyonize Radyasyon:** Gamma ışınları, X ışınları, electron bombalama veya yüksek enerjili ışınlar 1 nanometreden düşük dalga boyuna sahiptir. DNA'da mutasyon oluşturarak peroksit üretimine neden olur. Dezavantajı insan dokularına penetre olarak genetik mutasyonlara sebep olmasıdır. En büyük kullanım yeri endüstriyel alanlardır.

**-Noniyoinize Radyasyon:** Ultraviyole ışınların (UV) dalga boyları 10nm ile 380 nm arasında değişmektedir ve iyonize ışınların aksine radyasyon enerjileri ve penetrasyon güçleri azdır. Bu nedenle daha çok havayı ve yüzeyleri dezenfekte etmek için kullanılırlar. Operasyon odaları, doku kültürü yapılan odalar, antibiyotiklerin hazırlandığı odalar, mikoloji laboratuvarları ultraviyole ışınların kullanılabildiği yerlere örnek olarak gösterilebilir. Suların sterilizasyonu için de UV ışınları kullanılabilir.

Ultraviyole ışınları kullanırken bazı noktalara dikkat edilmelidir:

UV kaynağı ile dezenfekte edilecek eşya arasında bir engel olmamalı; DNA'da mutasyonlara neden olması, gözde ve deride iritasyon yapması nedeni ile gözlükle veya cam arkasından gözleme yapılmalı; ışın kaynağının kullanma süresine dikkat edilmeli, kullanılacağı ortamda insanlar dışarı çıkarılmalı, etkisi azaldığında lamba değiştirilmelidir. Uzun süreli kullanımlardan sonra ortam havalandırılmalıdır.

**-Mikrodalga Radyasyon:**1 mm'den 1 metreye kadar uzunluktaki dalgaboyunu kapsamaktadır. Isı, su molekülleri tarafından absorbe edilir. Bu radyasyon boyları ilesu içermeyen bakteriyel endosporlar ölmezler. Örneğin; *Trishinella* salgınları mikrodalgada pişirilen domuz etleri nedeniyle meydana gelmiştir.

### **III. Dondurmak**

Bakteriyostatik etki oluşturur. Mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini düşürerek, üremelerini ve toksin üretmelerini engeller.

**Buzdolabı Isısı:** 0 to 7°C.

**Dondurma:** 0°C'nin ↓

**Hızlı dondurma:**Pek çok mikroorganizmayı öldürmez.

**Yavaş dondurma:**Hücresinin yapısında bozulmaya neden olduğu için daha etkilidir.

Örneğin; Vejetatif bakterilerin %35'inden fazlası 1 yıl kadar canlı kalırken, parazitler birkaç gün içinde ölürlər.

#### IV. Kurutmak (Desikasyon)

Mikroorganizmalar suyun bulunmadığı ortamda hücresel aktivitelerini gerçekleştiremez ve üreyemezler. Ortama su verilirse tekrar canlanabilirler.

Örneğin; *Clostridium* sp. ve *Bacillus* sp. endospor oluşturur ve yıllarca yaşarlar. *Neisseria gonorrhoea* ise sadece birkaç saat yaşar.

#### V. Elektrik Akımı Uygulamak

Mikroorganizmalardan doğru veya alternatif akım geçirilirse mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etkiye sahiptir. Sıvı ortamlarda doğru akım (şiddetine ve geçme süresine bağlı olarak), ortamdaki ozon ve klorini açığa çıkartır ve bu da bakterisiid etkilidir.

### 3. Mekanik Yöntemler

#### I. Filtrasyon

##### \*Membran Filtreleri

Mikroorganizma barındıran sıvıların küçük porları olan filtre kağıdına aktarılarak mikroroganizmalardan ari hale gelmesidir. Genellikle ısıya duyarlı olan serum, aşı, enzim, antibiyotik ve şekerlerin sterilizasyonunda kullanılır.

##### **HEPA filtreleri (High Efficiency Particulate Air Filter):**

Havadaki bakterilerin yok edilmesi amacıyla operasyon odalarında kullanılır.

**Selüloz Membrane Filtreleri:** Selüloz asetat filtrelerinin porlarının çapları değişkendir, araştırmalarda ve endüstride kullanılırlar.Bunlar;

**0.22-0.45 µm Porlar:**Bakterilerin geçişini engeller. Örneğin; Spirochetes, mycoplasmalarve viruslar dahil değildir.

**0.01 µm Porlar:** Tüm viruslar ile bazı proteinlerin geçişini engeller.

#### II. Santrifügasyon

Yüksek devirli santrifüjlerle hem bakteriler hem viruslar bir sıvı içerisinde çökebilirler ancak santrifügasyon yardımıyla tüm bakteriler giderilemez.

### **III. Ezmek**

Santrifüj yardımıyla çökeltide bulunan mikroorganizmalar ezme aletine konarak ezilebilir ve parçalanabilir ancak bütün mikroorganizmalar giderilemez.

### **IV. Basınç Uygulamak**

Devamlı ve yüksek basınç altında mikroorganizmalar ölebilirler.

### **V. Çalkalamak**

Mikroorganizmaların devamlı ve sertçe çalkalanması bazılarının ölümüne neden olsa da büyük bir kısmı canlı kalabilir.

### 3. MİKROSKOP TÜRLERİ VE ÖZELLİKLERİ

#### ➤ Işık Mikroskobu

Laboratuvarda genel amaçlar için kullanılan genellikle büyütme kapasiteleri 1000-3000 arasında olan, özel bir aydınlatma sistemine gerek olmadan güneş ışığı ve elektrik ışığı ile çalıştırılan mikroskoplardır.

#### **Yapısı üç bölümde incelenir:**

1-Optik Kısım

2-Aydınlatma Kısım

3-Mekanik Kısım



**Şekil-3:** Mikroskop Bölümleri

#### ➤ Karanlık Saha Mikroskobu

Özel kondansatör yardımı ile sağlanan karanlık sahada alttan gelen ışık, kondansatörün ortasında siyah, ışık geçirmeyen bölge nedeni ile yanlardan girerek preparat üzerine gelir. Bu sistemde ışık objektif içine direkt giremez yanlardan

dağılım gösterir. Bunun sonun da bakteriler parlak saha ise karanlık görülür. Bu mikroskop özellikle spiroketleri incelemede ve hareket muayenesi yapmada kullanılır.

➤ **Stereo Mikroskop**

Stereo mikroskoplar ışık mikroskobundan farklı olarak sabit dürbün mantığı kullanarak çalışan 3 boyutlu görüntü üreten bir mikroskop türüdür. *Mycoplasma* sp. gibi bakterilerin koloni morfolojisinin incelenmesinde kullanılır.

➤ **Fluoresans Mikroskobu**

Çeşitli boyalar ve uranyum gibi bazı maddeler UV ışığına maruz bırakıldıklarında görünmeyen bazı ışık dalga boylarını görünür duruma yani ışıklı bir hale geçirirler. Eğer dokular, bakteriler ya da hücreler bu tür boyalar ile boyanıp UV ışığı altında mikroskopta incelenirse ışık saçan parlak cisimler halinde görülmektedir.

➤ **Faz-Kontrast Mikroskobu**

Canlı mikroorganizmalar ya da hücre içindeki çeşitli organizasyonlar oluşturdukları kontrastlıklardan faydalanılarak incelenebilmektedir.

➤ **Elektron Mikroskobu**

Elektron mikroskobunda ışık kaynağı yerine dalga boyu çok kısa olan elektronlar ve cam mercekler yerine de elektromanyetik kondansatörler kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların ışık mikroskobunda görülemeyecek kadar küçük yapılarını incelenmede kullanılır. Scaning Elektron Mikroskobu (SEM) ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) olmak üzere 2 çeşidi bulunmaktadır.

#### 4. MARAZİ MADDELERİN ALINMASI VE GÖNDERİLMESİ

##### Bakteriyolojik incelemeler için gönderilecek marazi maddeler:

- **Lezyonlu Organ:**El ayası büyüklüğünde lezyonlu organ parçaları %50 gliserinli serum fizyolojik içinde laboratuvara gönderilmelidir. Ancak uzun sürede ulaştırılacaksa gliserinin bakterisid etkisi bulunmaktadır.
- **Kan:**Kan örneklerinde etilen daimintetra-asetik asit (EDTA) veya heparin gibi an antikoagulanların kullanılması yaygındır. Serolojik ve biyokimyasal analizler için kan örneği mümkün olduğu kadar temiz bir şekilde venöz yoldan alınır. İdeal olarak, kan alınacak bölgedeki deri tras edilmeli(veya tüyler koparılmalı) ve % 70'lik alkolle silinmeli ve kuruması beklenmelidir. Antikoagulanile alınan örneklerin alındıktan sonra en kısa zaman içerisinde sadece nazik hareketler ile alt üstedilerek tam olarak karıştırılması gereklidir.Serum örnekleri için jelli tüpler kullanılabileceği gibi yokluğunda alınan kan oda ısısında 1-2saat süreyle pıhtı oluşmaya başlayıncaya kadar bırakılmalıdır. Daha sonra steril bir çubuk ile çevresi çizilerek ve tüpler 4 °C'deki buzdolabında birkaç saat veya bir gece bekletilir daha sonra örnek 1000 devirde yaklaşık 10-15 dakika süreyle santrifüj edilir ve serum yavaşça pipetle alınabilir.
- **Dışkı ve Barsak içeriği:** Dışkı örnekleri, mikrobiyolojik muayene için svapla alınarak uygun transport medyum içerisinde 4°C'de taşınmalıdır. Barsak içeriği, 50 cc'lik şişelere alınır.İnce barsak içeriği laboratuvara aynı gün içinde ulaştırılamayacak ise 50 ml ince barsak içeriğine 5 damla kloroform ilave edilerek gönderilmelidir.
- **Süt:** Mastitis teşhisi için hasta meme loplari içerisindeki ilk sütler ayrı bir kaba alınmalıdır. Steril şartlarda alınan 5 - 8 ml süt numunesi soğuk zincirde, en geç 24 - 48 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Laboratuvara ulaştırmada, 2 gün gecikecekse; bakteriyel aktivitenin önlenmesi için 50 cc süte % 10'luk Borik Asit'ten 5 cc konmalıdır.
- **Göz ve Nazal Akıntı:** Örnekler, konjunktivadan palpebranın ayrık tutularak nazikçe svap yardımı ile alınmasıyla toplanır. Daha sonra svaplar, transport medium içerisine konulur. Nazal akıntılar (tükürük, gözyaşı), tercihen tel saplı dakron, pamuk ve gazlı bez svaplarıyla alınmalıdır. Svabın transport medium ile

ıslatılması veya nemlendirilmesi, örneklerin alınmasında yardımcı olabilir. Swap, bir dakika kadar sekresyonlar ile temas ettirilmelidir. Daha sonra transport medium içerisine yerleştirilmeli ve gecikmeden 4°C'de laboratuvara gönderilmelidir.

➤ **Apse:** Apse örnekleri, apse duvarından kazıntı ile birlikte toplanmalıdır. Apsenin orta kısmındaki irin genellikle sterilidir. En iyi kültür sonuçları, yeni meydana gelmiş apselerden örnek toplandığında alınır.

➤ **Abort (atık):** Fetal abomasal içerik (ruminantlarda), akciğer, karaciğer ve fötüs içinde ve üzerindeki büyük lezyonlardan örnekler alınmalıdır. Sığır ve koyunlarda plasentanın infekte kısımları, 2 veya daha fazla kotiledon, uterus akıntısı, leptospiral abort olasılığında ana hayvanın 20 ml orta idrarı alınmalıdır. Serolojik testler için serum örnekleri alınmalıdır.

➤ **İdrar:** İdrar örnekleri, idrar analizi, bakteriyel mikroskopi, kültür veya klinik bir bakteriürinin bulunup bulunmadığını saptamak için gönderilebilir. Normal olarak idrarda bakteri bulunmamalıdır. İdrarın alınmasında dikkat edilecek nokta ise olabildiğince üretradan ve çevreye bulaştırmadan alınmasıdır. Bakteriyolojik prosedürler açısından tercih edilen toplama yöntemleri sistosentez, katater veya orta idrarı örnekleridir. İdrar yolu enfeksiyonlarının araştırılması için en iyisi taze sabah idrarının alınmasıdır. Örnekler en geç 4 saat içinde ekimleri yapılmalıdır.

➤ **Genital Bölge Akıntıları ve Semen:** Örnekler vajinal veya prepusyal yıkama ya da uygun swapların kullanılması yoluyla alınabilir. Semen örnekleri en iyi şekilde bir yapay vajina kullanılarak alınabilir. Sıklıkla spesifik transport medium koşullarına gereksinim duyulur.

➤ **Deri:** Mikrobiyolojik muayene için infekte deri lezyonlarından biyopsi veya kazıntı örnekleri steril kaplar içerisinde en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılır. Fungal enfeksiyonlar için ayrıca deri kazıntıları ve tırnak kullanılır. Fungal enfeksiyonların tespiti için alınan örneklerde, lezyonlarda bulunan yabancı maddeleri, kontaminant mantar sporlarını ve diğer ajanları gidermek için; lezyonlar, %70 alkole batırılmış pamukla iyice silinirler. Alkol kuruduktan sonra, pens, küret, bistüri, vs. ile lezyonların kenarlarındaki aktif bölgelerden deri kazıntısı alınarak steril kuru petri kutularına veya şişelere, yeteri miktarda toplanır ve ağzı iyice kapatılır. Kanatlı hayvanlarda Marek hastalığından şüphelenildiğinde viral antijenlerin saptanması için tüy uçlarının alınması gereklidir.

## Marazi Maddenin Kabul Kriterleri

- 1-Marazi maddeleri çok taze olmalı ve yeteri miktarda alınmalıdır.
- 2- Hastadan, ateşli dönemde materyal alınması tercih edilmelidir. Çünkü kanda fazla miktarda etkene rastlamak mümkündür. Ateşli durumda iken genellikle kan alınarak hemokültürler yapılır. Kronik devrede ise, genellikle kanda mikroorganizma yoktur. Etkenler doku ve organlara yerleşir ve burada da bozukluklar meydana getirirler. Hastalık etkenleri vücuttan çeşitli sekret (süt, sperma, tükürük, v.s.) ve ekskretlerle (idrar, gaita, kraşe, burun akıntıları, uterus akıntıları, v.s.) dışarı atılırlar.
- 3- Muayene için gönderilecek organ ve dokular: lezyonlu karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, beyin, lenf yumruları, uzun kemik, barsak, deri ile kan, süt, idrar, sperma, BOS, vücut boşluklarındaki eksudatlar, gözyaşı akıntısı, tracheal ve intrauterin svaplar ve frotilerdir. Alınan numuneler bakteriyolojik muayeneye uygun olmalı, materyal taze kadavradan alınmalıdır. En geç ölümden 2 saat sonra alınıp **soğuk zincirde** en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Kısa sürede laboratuvara ulaştırılamayacak ise % 50 steril gliserinli FTS içerisinde gönderilmelidir.
- 4- Marazi maddeler, **antibiyotik veya kemoterapötik maddelerin** uygulanmadığı hastalardan veya antibiyotik uygulamasından önce alınmalıdır. Eğer antibiyotik tatbik edilmişse, vücuttan atılma süresini bekleyip ondan sonra materyal alınmalıdır.
- 5- Marazi maddeler, aseptik koşullarda alınmalı ve **steril** kaplara konarak hemen soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Laboratuvarda aynı gün ekim yapılmayacak ise -20°C'de muhafaza edilmelidir.
- 6- Alınan kanlar, usulüne uygun olarak serumu çıkarılır ve gönderilir. Eğer isteniyorsa antikoagulanlı tüpler içerisinde de kan gönderilebilir.
- 7-Bakteriyolojik, mikolojik ve virolojik incelemeler için kullanılan kapların ve tüplerin steril olması gereklidir. Marazi maddesi almak için makas, bisturi ve penslerin de aynı şekilde kaynatılarak sterilize edilmesi ve soğuduktan sonra kullanılması uygundur.
- 8- Gönderilen numuneler ayrı ayrı alınıp, üzerlerine etiket bilgileri eksiksiz yazılmalıdır.

## 5. MİKROORGANİZMALARIN ÜRETİLMESİ VE BESİYERLERİ



### A) Canlı Ortamlar

- 1-Doku kültürleri
- 2-Embriyolu Yumurtalar
- 3-Deneme Hayvanları
  - Konvansiyonel Hayvanlar
  - SPF(Specific Pathogen Free)Hayvanlar
  - Mikropsuz (Germ Free) Hayvanlar



### B) Cansız Ortamlar

- 1-Genel Besiyerleri
  - Buyyon(sıvı)
  - Agar (katı)
- 2-Özel Besiyerleri
  - Selektif Besiyerleri
  - Diferensiyel Besiyerleri
  - Zenginleştirme Besiyerleri
  - Biyokimyasal test. Besiyerleri
  - Transport Besiyerleri
  - Özel Amaçlı Besiyerleri

### A) Canlı Ortamlar: Biyolojik Test Sistemleri

**1. Doku ve Hücre Kültürleri:** Tüp, şişe, petri kutusu vb. gibi laboratuvar kaplarında uygun besleyici sıvıların içerisinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır. Hücreler dokulardan ex vivo olarak birkaç günde saflaştırılabilir, ayrıştırılabilir. Hücreler kandan kolayca elde edilebilir; ancak sadece beyaz kan hücreleri kültürde üreme yeteneğine sahiptirler.

**2. Embriyolu Yumurtalar:** Yumurtanın hayvan orijini (tavuk, ördek, hindi), inokulasyon yolları (korio-allantoik membran, amniyon boşluğu, allantoik boşluk, sarı kesesi) ve embriyonun yaşı; üretilmesi istenen etkene göre değişir. **SPF (specific pathogen free)** yumurtalar içinde belli bakteriyel ve viral etkenlere karşı oluşmuş antikorlar bulunmamalıdır. Sonuçları diğer hayvanların yumurtalarından elde edilenlere göre daha güvenilirdir.

**3. Deney Hayvanları:** Bakteriyel ve viral etkenlerin izolasyon ve identifikasyonlarında canlı ortamların başında deney hayvanları gelmektedir. Bunlar çoğunlukla fare, kobay, tavşan, hamster, tavuk ve diğer hayvanlardır. İnokule edilen maddede bulunan etkenin özelliğine göre hayvanın türü, yaşı, cinsi ve inokulasyon yolları değişmektedir.

**-Konvansiyonel Hayvanlar:** Herhangi bir sağlık kontrolünden geçmeyen hayvanlardır ve genel amaçlar için kullanılırlar. Sadece yem ve su vermekten öte hiçbir özel beslenme ve bakım uygulanmadığı için apatojen ve patojen etkenleri sistemlerinde ve derilerinde bulundurabilirler. Bu hayvanlara uygulanan çalışmaların sonuçları güvenilir değildir.

**- SPF(Specific Pathogen Free)Hayvanlar:** Bu hayvanların sistemlerinde çeşitli mikroorganizmalar bulunabilir ancak patojenik mikroorganizmalar (Tüberküloz, Salmonellozis ve bazı viral etkenler) yönünden temizdir. Bu hayvanların yetiştirilmesi için verilecek yem ve suyun mikrobiyolojik incelemeleri yapılmış olması ve havasının filtrelenerek verilmesi gerekmektedir. Bu hayvanlarla yapılan çalışmaların sonuçları daha güvenilirdir.

**- Mikropsuz (Germ Free) Hayvanlar:** Herhangi bir apatojen yada patojen mikroorganizmaları ihtiva etmedikleri gibi kanlarında da bu etkenlere karşı antikor oluşmamalıdır. Mikropsuz hayvanlar sezeryan operasyonu ile özel hava kontrol ünitelerinde (Thord Gustafsson) yetiştirilirler. Elde edilen sonuçlar çok daha güvenilir ve doğrudur.

### **B)Cansız Ortamlar: Biyolojik Olmayan Test Sistemleri**

Besiyerleri, mikroorganizmaların (Rickettsia, Chlamydia ve bazı viruslar hariç) invitro üreme ve çoğalmalarını sağlayan steril ortamlardır. Besiyerleri (besi ortamı, ortam, vasat, kültür ortamı, kültür vasatı, kültür besiyeri) mikroorganizmaların geliştirilmesi için formülize edilmiş ortamlardır. Bunlar, mikroorganizmaların geliştirilmesi, izolasyon, identifikasyon, sayım, duyarlılık testleri, sterilite testleri, klinik örneklerin incelenmesi, gıda, su ve çevre kontrolleri, biyolojik ürünlerin elde edilmesi, antibiyotik ve vitamin analizleri, endüstriyel analizler vb. gibi çok farklı amaçlara yönelik olabilir.

**1- Genel Besiyerleri:** Genel besiyerleri laboratuvarlarda hazırlanabilmektedir. Bileşimine giren maddeleri kolay bulunur ve ucuzdur. Herhangi bir inhibitör madde içermeyen, besin maddelerince yeterli veya zengin, herhangi bir mikroorganizma grubunun gelişmesini özel olarak desteklemeyen, bazı zor gelişenlerinde dahil olduğu çok sayıda mikroorganizmanın gelişmesini sağlayan besiyerleridir.

➤ **Buyyon (broth) (sıvı besiyeri):** Fransızcada 'bouillon' kaynatmak anlamında kullanılmaktadır. Buyyon, bakterilerin üremesi için kullanılan et suyu anlamına gelmektedir.

➤ **Agar (katı besiyeri):** Çeşitli deniz yosunlarından ekstrakte edilen kuru, yapışkan karakterde bir maddedir. Toz veya lifler halinde hazırlanır. Sıvı ortamları katılaştırmak için %2-3 oranında kullanılırken, yarı-katı ortamlar için %0.3-0.5 oranında sıvı besiyerine ilave edilir. Agar, 90-98 °C'de erir ve 40-42 °C'de katılaşır.

**2- Özel Besiyerleri:** Bu tür ortamlar çalışma amacına göre hazırlanarak kullanılır ve yapıları daha komplikedir.

**-Selektif Besiyerleri:** Selektif besiyerleri, karışık bir mikrobiyal 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. **Örneğin;** Besiyerlerine katılan Kristal Viyole, Gram pozitif bakterilerin üremesini inhibe ederken; Potasyum Tellurit, Thallium Acetate, Sodyum Azid gibi maddeler Gram negatif bakterilerin üremesini inhibe etmektedir.

**-Diferansiyel 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. **Örneğin;** MacConkey Agar, EMB Agar, Hemoliz reaksiyonları için Kanlı Agar.

**-Zenginleştirme Besiyerleri:** Karışık bir mikroflora içinde hedeflenen birmikroorganizmayı geliştirmek, sayısını artırmak, hücrede olası hasarların giderilmesini sağlamak vb. amaçlarla kullanılan zenginleştirme besiyerleri, ön zenginleştirmebesiyerleri ve selektif zenginleştirme besiyerleri olarak gruplandırılır. **Örneğin;** Tetrathionate broth vb.

**-Biyokimyasal Testler için Besiyerleri:** 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.

**-Transport Besiyerleri:** Çevre koşullarına duyarlı olan bakterilerin izole edilebilmesi için özel besiyerlerinde laboratuvara ulaştırılması gereklidir. Bakterilerin bu ulaşım sırasında aktivitelerini koruyabilmesi için bu besiyerleri kullanılmaktadır. **Örneğin;** Amies, Stuart Medium

**-Özel Amaçlı Besiyerleri:** Agar disk difüzyonu ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık ve minimal inhibisyon konsantrasyon testleri, vitamin ve aminoasitlerin mikrobiyal yolla belirlenmesi, saf kültürlerin korunması (koleksiyonu), taşınması gibi özel amaçlara yönelik olarak kullanılan çeşitli besiyerleri de vardır.

### **Besiyerlerinin Hazırlanmasında Dikkat Edilecek Kurallar**

1- Besiyeri kutusunun üzerinde yazan oranlara göre toz besiyeri distile su ile süspanse edilir. Isı yardımı ile homojen bir şekilde karışması için benmari içerisinde bekletilir.

2- Dikkat edilecek diğer bir nokta ise pH'dır. Her besiyeri istenen pH derecesine göre ayarlanmalıdır. Şayet pH, istenen değer üzerinde ise asidik bir madde( HCl), altında ise bazik bir madde (NaOH) katılarak derecesi ayarlanır.

3- Besiyerlerinin bir kısmı otoklavda, bir kısmı sadece kaynatılarak sterilize edilir. Bazı besiyerlerinin formülünden hazırlanması gerektiği gibi, selektif besiyerlerinin bir kısmına sterilizasyon sonrasında çeşitli katkıları ilave edilir.

4- Çoğu besiyeri, otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 1.1 atmde ve 15 dakikadasteril hale getirilerek soğuması (50<sup>0</sup>C)için bekletilir. Steril petri kutularına (çapa bağlı olarak) steril ortamda aktarılır.Örneğin; 9 cm çapındaki petrilere 20 ml miktarda aktarılır.

5- Oda derecesinde katılaşmaya bırakılan besiyeri, inkübatörde 37 <sup>0</sup>C'de 24 saat inkübasyona bırakılır ve süre sonunda kontrolü yapılır. Eğer kontaminasyon şekillenmiş ise petriler kullanılmaz. Steril olan besiyerleri kullanılmak üzere temiz bir ortamda muhafaza edilir.

## 6. BOYALAR VE BOYAMA YÖNTEMLERİ

Bakterinin yapısı, içinde üredikleri ortamdan, çok az bir refraktif indeksle ayrıldığından, laboratuvarlarda kullanılan ışık mikroskoplarıyla iyi görülmeleri zordur. Bu semitransparent yapı, ancak boyanarak ve bulundukları yerle olan kontrastlıkları artırılarak daha belirgin hale getirilebilirler.

Mikroorganizmalar boyandıktan sonra, mikroskopta kolay görülebildikleri gibi, büyüklük, şekil, spor, kapsül, iç yapıları hakkında da gerekli bilgiler elde edilebilir (**Ek-2**). Ayrıca, boyanma özelliklerine göre de bazı mikroorganizmalar (*Mycobacterium* sp. gibi) tanımlanabilirler. Bu nedenle, bakterilerin tanımlanmasında boyama çok önemli role sahiptir. Bunun için çok özel boyama yöntemleri ortaya konulmuştur.

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. Boyalar, genellikle katran distilasyon (damıtma) ürünü olup **benzen** derivatlarıdır.

Boyaların çoğu organik bileşiklerden olup benzen halkası ile birleşmiş **kromofor** ve **okzokrom** gruplarını içerirler. Kromofor grubu ihtiva eden benzen halkasına **kromojen** halkası denir. Kromojen grubu, birleşige boya özelliği verir. Ancak, böyle birleşik renkli olmasına karşın henüz boya karakterine değildir. Çünkü, bu boyanın doku veya lifle bağlanma yeteneği yoktur. Oluşan renk mekanik yoldan kolayca giderilebilir. Gerçek boya haline geçebilmesi için kromofor grubu yanı sıra, diğer grupları da (**okzokrom**) ihtiva etmesi gereklidir. Bunlar bileşige elektrolitik dissosiasyon özelliği kazandırarak, bileşikle tuz oluşumunu sağlar ve kromofor grubunun daha etkili olmasına yardım eder.

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

### **Asit Boyalar**

İyonize oldukları zaman, molekülün porsiyonu negatif elektrikle yüklenir. Asit boyalar, sitoplazmayı boyamada kullanılır. Örneğin; Asit Fuksin, Safranin, Eosin vs.

## **Bazik Boyalar**

İyonize oldukları zaman, molekülün boya kısmı pozitif elektrikle yüklenir. Bakterilerde asit yapıda olan organizasyonları (özellikle, nükleer sistemi) ve molekülleri boyamada bazik boyalardan yararlanılır. Örneğin; Metilen mavisi, Bazik Fuksin

## **Nötr Boyalar**

Asit ve baz boyaların uygun oranda karışımlarından elde edilir. Örneğin; Giemsa, Wright vs.

## **BOYAMA AŞAMALARI**

1. Preparatın Hazırlanması
2. Preparatın Kurutulması
3. Preparatın Tespiti
4. Preparatın Boyanması

### **1. Preparat Hazırlanması**

- Nekropsi ya da biyopsi sonucu elde edilen organ parçaları kesit yüzleri lama sürülerek hazırlanır.
- Patolojik sıvılar veya sıvı bakteri kültürlerinden bir damla alınarak lam üzerinde ince bir tabaka halinde yayılır.
- Eküvyon çubuğundan (svap) preparat hazırlamak için eküvyon lama sürülür.
- Kandan hazırlanacak ise froti hazırlanır.
- Preparat, katı kültürden bir koloni alınarak 1 damla Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) içerisinde süspanse edilerek preparat hazırlanır.

**2. Preparatın Kurutulması:** Oda ya da etüv ısısında ya da bek alevi üzerinde yanmayacak kadar yükseklikte yatay ya da dairesel hareketler ile preparat kurutulur.

### **3. Preparatın Tespiti (Fiksasyon)**

Kurutulan preparat; bakterileri öldürmek, lama yapıştırmak ve yapılarını muhafaza edebilmek için tespit edilir. Tespit işlemi 2 şekilde yapılabilir:

**Fiziksel Tespit:** Preparat, bek alevinden üç kez geçirilerek yapılır.

**Kimyasal Tespit:** Kan ve doku preparatlarına kimyasal tespit uygulanır. Bunun için Metil Alkol ile 3-4 dakika ya da Etil Alkol ile 8-10 dakika muamele edilir.

#### 4. Preparatın Boyanması (Aşağıda bölümlerde anlatılacaktır.)

### BOYAMA YÖNTEMLERİ

| 1.Basit Boyama            | 2.Bileşik Boyama                     |
|---------------------------|--------------------------------------|
| -Karböl Fuksin ile Boyama | -Diferansiyel Bileşik Boyama         |
| -Negatif Boyama           | -Strüktürel (Yapısal) Bileşik Boyama |

**Tablo-2:** Boyama Yöntemleri

**1. Basit Boyama:** Preparattaki mikroorganizmanın sadece morfolojisi hakkında bilgi edinmek için bir tek boya solusyonu kullanılarak yapılan boyama yöntemidir. Preparata boya bir kez uygulanır ve bakteri, kullanılan boyanın rengine göre boyanır.Örneğin;Karböl Fuksin, Kristal Viyole ve Metilen mavisi

**-Karböl Fuksin ile Boyama;** Yöntemine uygun olarak hazırlanıp kurutulmuş ve fiziksel tespit yapılmış olan preparatın üzerine boya solüsyonu dökülerek 5-10 sn beklenir.Daha sonra preparat hafif akan su ile yıkanır, kurutulur ve sedir yağı ile x100'lükte incelenir. Bakteriler kırmızı renkte görülür. Aynı şekilde farklı bir boya solüsyonu kullanıldığında da preparat kullanılan boyanın rengini alacaktır ve mikroskopta incelendiğinde bakteriler kullanılan boyanın renginde görülecektir.

**-Negatif Boyama;** Bu yöntemde bakteriler değil bulundukları saha boyanır. Bunun için lam üzerine **çini mürekkebi** veya **nigrosin** konularak üzerine bakteri kültürü eklenir. Kurutularak incelenir. Saha koyu, etkenler açık renkte gözlenir.



**Şekil-4:** Negatif Boyama

**2. Bileşik Boyama;** Birden fazla boya solüsyonu kullanılan boyama yöntemidir. Bileşik boyamalar kendi arasında 2 gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

**-Diferansiyel Bileşik Boyama;** Bakterileri birbirinden ayırmak için kullanılır.

**Örneğin;** Gram Boyama, Ziehl-Neelsen Boyama

**-Strüktürel (Yapısal) Bileşik Boyama;** Bakterilerin iç ve dış yapıları hakkında bilgi edinmek için uygulanan boyama yöntemidir. **Örneğin;** Spor boyama, Kapsül (Giemsa) Boyama, Flagella Boyama

#### ❖ **Gram Boyama Yöntemi**

**Amacı:** Bu teknik mikrobiyolojide, bakteri ve mayaların klasifikasyonu ve identifikasyonu amacıyla kullanılmaktadır. **Gram boyama**, bakterileri hücre duvarlarının kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre iki büyük gruba ayırmak için kullanılan deneysel bir yöntemdir.

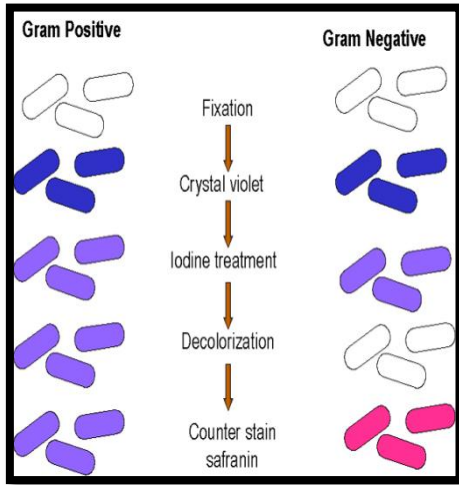
#### **Uygulanışı:**

- Preparat hazırlanır, kurutulur, fiziksel tespit edilir.
- **Kristal viyole** ile 2-3 dakika boyanır.
- Hafif akan su ile yıkanır.

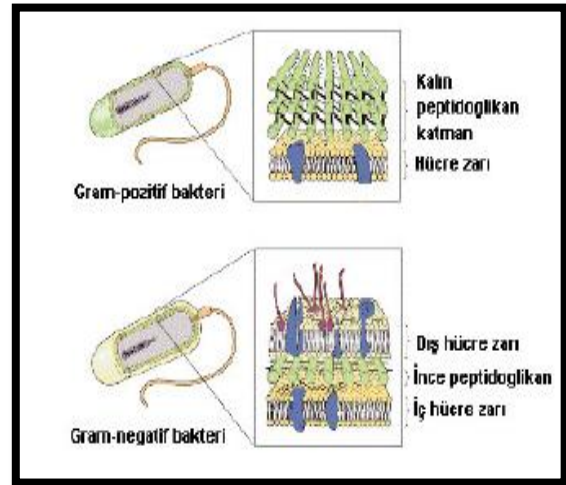
- **Lugol** solusyonu ile 1-2 dk muamele edilir.
- Hafif akan su ile yıkanır.
- **Etil Alkol** (%95) ile dekolore edilir (dekolorizasyon), bu işlem alkol renksiz akıncaya kadar devam eder.
- Hafif akan su ile yıkanır.
- **Bazik Fuksin** (sulu fuksin, safranin) ile 30-40 sn boyanır. Hafif akan su ile yıkanır, kurutulur, immersiyon objektifinde bakılır.

#### Sonuç:

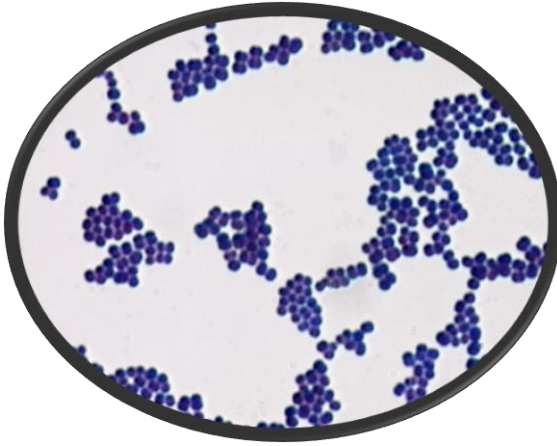
- **Gram pozitif** bakteriler **mavi-mor** renkte görülürler.
- **Gram negatif** bakteriler **kırmızı** renkte görülürler.



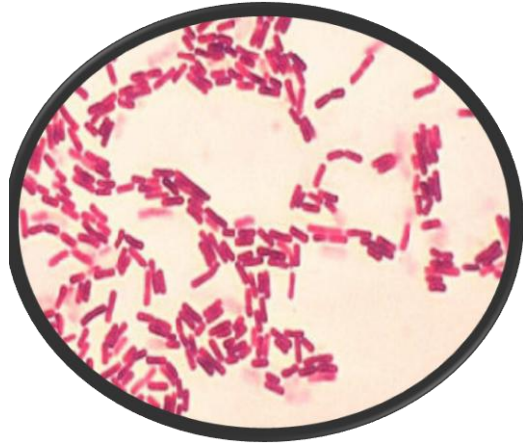
Şekil-5: Gram boyama yöntemi



Şekil-6: Gr negatif ve Gr pozitif bakterilerin yapısı



Şekil-7: Gram pozitif koklar



Şekil-8: Gram negatif çomaklar

❖ Ayrıca **LANA** (L-alanine-4-nitroanilidine) testi Gram negatif bakterileri, **KOH** (Potasyum Hidroksit) testi ile de Gram pozitif bakterileri tanımlayabiliriz.

#### ❖ Ziehl-Neelsen Boyama Yöntemi

**Amacı:** Mikobakteri türleri (Tüberküloz, Paratüberküloz) gibi asidorezistans bakterileri boyamak için kullanılan bileşik ve diferansiyel bir boyama yöntemidir. Mikobakteriler diğer mikroorganizmalardan farklı olarak etraflarında kalın bir balmumu tabakasına sahiptirler. Bu tabaka hem bakterileri asit-alkole dirençli kılar, hem de normal boyalar ile boyanmasını engeller. Bu nedenle boyanın içerisine fenol konur ve preparat alttan hafifçe ısıtılarak boyama yapılır ve balmumu benzeri lipid tabakası yumuşatılır. Böylece boyayı kolayca alan lipid tabakası asit alkolde dekolore olmaz ve boyayı bırakmaz.

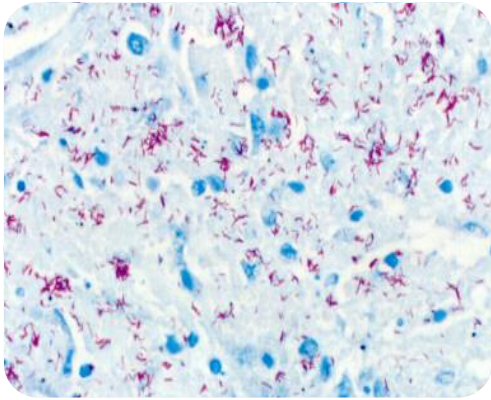
##### **Uygulanışı:**

- 1) Preparat hazırlanır, kurutulur, tespit edilir (doku için kimyasal, koloni için fiziksel tespit uygulanır).
- 2) Süzgeç kağıdından süzülen **Karbol Fuksin** ile lamaların üstü kaplanır ve daha sonra alttan ısıtılarak 4-5 dakika boyanır. Bu ısıtma sırasında boya kristallerinin çökmesine neden olan kaynatmamaya dikkat edilmelidir.
- 3) Hafif akan su ile yıkanır.
- 4) **Asit-alkol** (%95 alkol, %5 HCl) ile dekolore edilir (Dekolorizasyon).
- 5) Hafif akan su ile yıkanır.
- 6) **Metilen mavisi** ile 20-25 sn. boyanır.

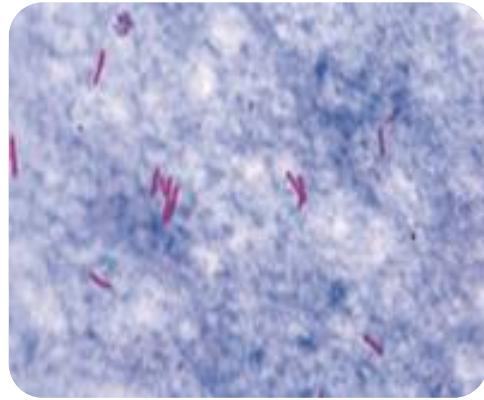
- 7) Hafif akan su ile yıkanır.
- 8) Kurutulur, immersiyon objektifi ile incelenir.

**Sonuç:**

- Asido-rezistans olan *Mycobacterium* sp., asit alkolle dekolore olmadığından **pembe-kırmızı** renkte ve dokular arasında kümelenmiş olarak görülürler.
- Asido-rezistans olmayan diğer bakteriler ve dokular asit alkolle dekolore olduğundan **mavi** renge boyanırlar.



**Şekil-9:** *M. avium* subsp. *paratuberculosis*



**Şekil-10:** *M. tuberculosis* veya *M. bovis*

❖ **Kapsül (Giemsa) Boyama Yöntemi**

**Amacı:** Bileşik ve strüktürel bir boyama yöntemidir. Anthrax etkeni *Bacillus anthracis*, vücut içerisinde (*in vivo* ortam) kapsül oluşturur ve bu kapsül Giemsa boyama ile tespit edilir. Doku veya organlardan alınan örneklerin kesit yüzleri lama sürülerek preparat hazırlanır ve Giemsa boya solüsyonu ile boyanır.

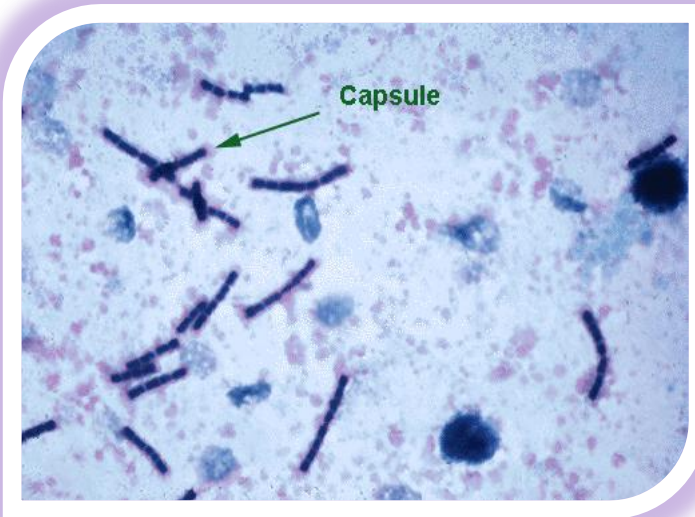
**Giemsa solüsyonu hazırlamak için;**

1 preparat için 5 cc distile su cam tüpe alınır. Distile su alev üzerinde kaynatılarak serbest oksijeni çıkartılır. Çünkü serbest O<sub>2</sub> boyayla reaksiyona girerek boyanın etkinliğini azaltır. Tüp çeşme suyunda soğutulur. Üzerine her cc için 1 damla

olacak şekilde Giemsa stok solüsyonundan eklenir. Böylece boyamada kullanılacak Giemsa solüsyonu hazırlanır.

**Uygulanışı:** Doku veya organlardan preparat hazırlanır, kurutulur, üzerine metil alkol dökülerek 3-4 dakika kimyasal tespit yapılır. Yıkanır. Hazırlanan Giemsa boya solüsyonu ile 30-45 dakika boyanır. Yıkanır, kurutulur, immersiyon yağı objektifinde incelenir.

**Sonuç:** Etkenler birbirine eklenmiş çomaklar tarzında **mavi** renkte, kapsül ise etkenin etrafında **kırmızı** renkte görülür.



**Şekil-11:** Kapsül boyama uygulanan bakterilerin görünümü

#### ❖ **Spor Boyama Yöntemi**

##### **Amacı:**

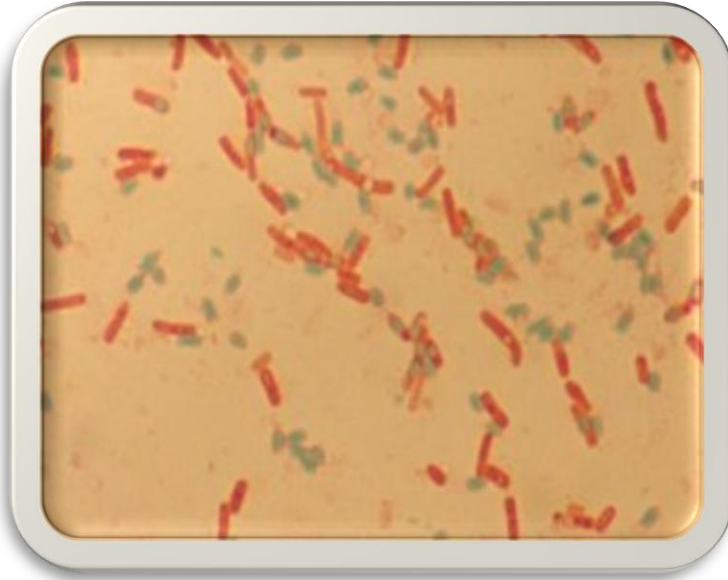
*Bacillus* ve *Clostridium* cinslerine ait türler endospor oluşturma yeteneğine sahiptirler. Bu endosporlar bakterinin vejetatif formuna oranla yüksek ısı ve dezenfektanlar gibi fiziksel ve kimyasal yöntemlere karşı daha dirençlidir. Bu direnci sağlayan sporun dışındaki koruyucu tabaka, ancak boyama sırasında preparatın alttan ısıtılması ile gevşetilir ve sporun boyayı alması sağlanır.

❖ **Uygulanışı:**

- Preparat hazırlanır, kurutulur, fiziksel tespit yapılır.
- %5'lik **Malaşit yeşili** ile alttan ısıtılarak 5 dakika boyanır.
- Hafif akan su ile yıkanır.
- **Safranin** veya **sulu fuksin** ile 30 sn boyanır.
- Hafif akan su ile yıkanır.
- Kurutulur, sedir yağı damlatılarak x100 objektifte incelenir.

❖ **Sonuç:**

Sporlar basilin ortasında **yeşil** renkte, basilin kendisi **kırmızı** renkte boyanır.



**Şekil-12:** Spor boyama uygulanan bakterilerin görünümü

❖ **Mantar Boyama Yöntemi**

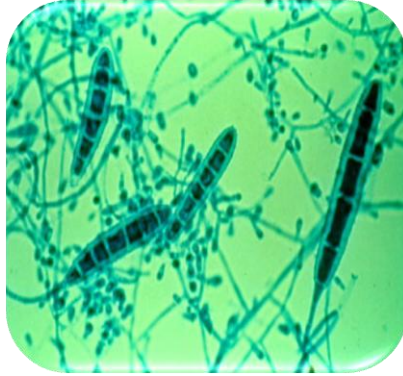
Kültür için; deri kazıntısı, kıl, tırnak, süt, yem ve iç organlar gibi örnekler **SDA (Sabouraud Dekstroza Agar)** batırılarak bir kaç bölgeye ekilir. 25 °C ya da 37 °C'de 7-15 gün inkübasyona bırakılır.

**Direk muayene (Laktofenol pamuk mavisi ile):**

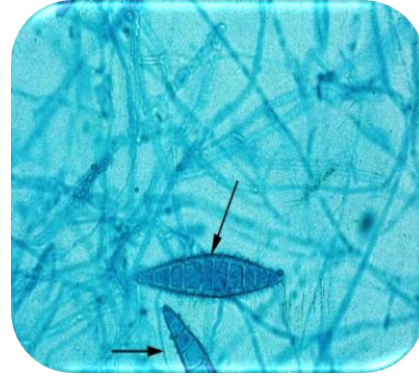
- Solüsyonda bulunan laktik asit mantar elementlerinin muhafazasında, fenol öldürmesinde ve pamuk mavisi de boyanmasında görev almaktadır.

### Uygulanışı:

- ✓ Lam üzerine bir damla alkol konur.
- ✓ Üzerine iğne ile alınmış ya da bir miktar kesiti alınmış mantar elementi konur ve yayılır.
- ✓ Alkolün uçması beklenir.
- ✓ Bir-iki damla boya solüsyonu (**Laktofenol pamuk mavisi**) konur ve öze ile hafifçe yayılır.
- ✓ Üzerine lamel kapatılır ve hafifçe bastırılır ve yayılma sağlanır.
- ✓ Boyanın etkilemesi için 10 dakika beklenir ve mikroskop altında muayene edilir.



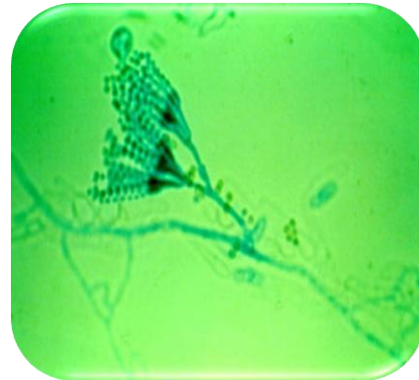
Şekil-13: *Trichophyton* sp.



Şekil-14: *Microsporum* sp.



Şekil-15: *Aspergillus* sp.



Şekil-16: *Penicillium* sp.

## 7. BAKTERİLERİN BİYOKİMYASAL AKTİVİTELERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Bakteriye özgü biyokimyasal aktivitelerin çeşitli testler ile belirlenmesi, bakterilerin izolasyon ve identifikasyon şemalarını meydana getirmektedir. Biyokimyasal testleri, manuel olarak ya da otomatize sistemler ile uygulamak mümkündür. Bu testlerin bir kısmı aşağıda anlatılmaktadır (**Ek-3**).

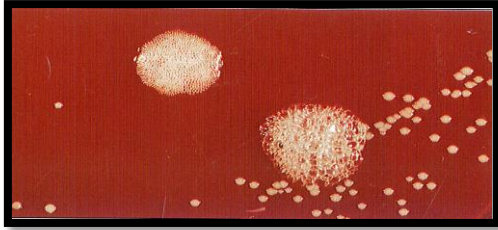
### A) **Katalaz Testi:**

Genellikle aerobik mikroorganizmaların oksidasyon ve redüksiyon olaylarının sonucunda **hidrojen peroksit** parçalanır, su ve oksijen açığa çıkar, böylece hidrojen peroksitin toksik etkisi ortadan kaldırılabilir. Oluşan O<sub>2</sub> köpürme şeklinde kendini gösterir. Köpürmenin görülmesi pozitif, görülmemesi negatif olarak değerlendirilir.

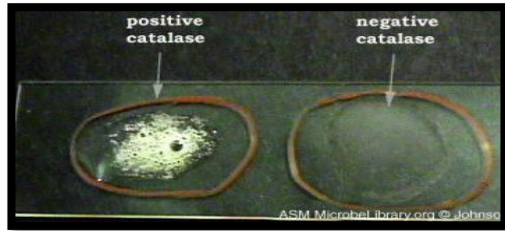
Test iki şekilde yapılabilir.

a. **Lamda Katalaz:** Lam üzerine bir damla %30'luk hidrojen peroksit damlatılır. Üzerine de öze ile alınan koloni süspanse edilir. Kabarcıklar şeklinde gaz çıkışı testin (+) olduğunu gösterir.

b. **Tüpte Katalaz:** Test edilecek organizmanın sıvı kültürü üzerine %3'lük hidrojen peroksit damlatılır. Gaz çıkışı testin (+) olduğunu gösterir.



Şekil-17: Lamda katalaz testi



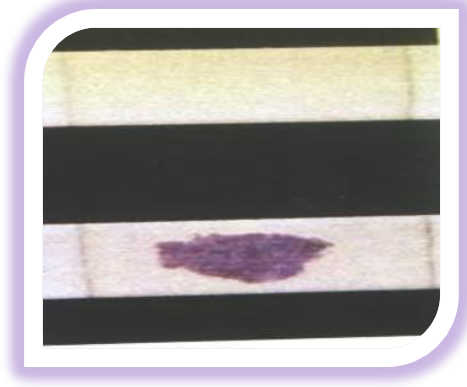
Şekil-18: Kanlı Agarda koloniden katalaz testi

### B) **Oksidaz Testi:**

Bu test, bakteriler tarafından sentezlenen ve intrasellüler olan oksidaz enziminin (sitokrom C oksidaz) varlığını ortaya koymada kullanılır. Deneyden aynı zamanda c-cinslerin ve türlerin ayırımında yararlanır. Oksidaz reaksiyonu,

bakterilerde (aerobik olanlarda ) sitokrom oksidaz sisteminin bulunduğu ifade eder. Anaerobik bakterilerde oksidaz sistemi yoktur.

Oksidaz stripine öze ile alınan koloni süspanse edilir.1-2 dakika içerisinde stripin renginde değışiklik yoksa negatif, mor veya mavi renk alması testin pozitif olduğunu gösterir.



**Şekil 19:** Oksidaz stripleri

### **C) Koagulaz Testi:**

- Koagulaz, plazmayı koagule eden pro-trombin benzeri bir enzimdir.
- Patojen stafilokokları apatojenstafilokoklardan ayırmada kullanılır.
- Testte genellikle **tavşan plazması** kullanılır.

Test iki şekilde yapılabilir:

**a. Lamda: Clumping faktör'**de denir. Bağlı koagulazların tespitinde kullanılır. Temiz bir lam üzerine bir damla tavşan plazması ile test edilecek organizmadan 1-2 koloni alınarak karıştırılır. 5-10 dk içerisinde görülen partikülleşme ve kümeleşme testin (+) olduğunu gösterir.

**b. Tüpte:** Bağlı ve serbest koagulazın varlığını tespit etmek için kullanılır. Bir tüp içersine 1/5 yada 1/10 sulandırılmış tavşan plazması konur. Üzerine 0.1 ml kültür ekilir. 37 derecelik etüve kaldırılır. 1, 3, 6, 24. saatlerde kontrol edilir. Oluşan koagulasyonun şiddetine göre +1, +2, +3, +4 olarak değerlendirilir.



Şekil-20: Tüpte koagülaz testi

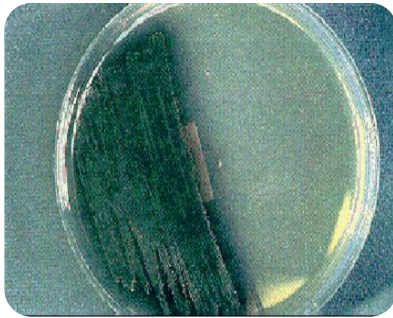


Şekil-21: Lamda koagülaz testi

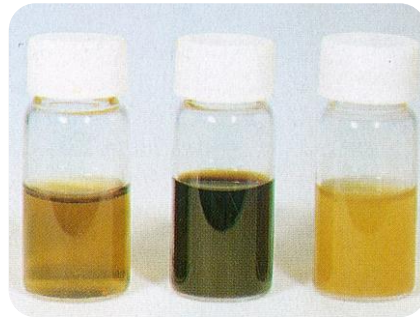
#### D) Eskülin Testi:

D grubu Streptokoklar ve Enterokoklar eskülini hidrolize ederek eskületin meydana getirirler. Bu da besiyerinin içerisindeki demir sitrat ile birleşerek **siyah-kahverengi** bir renk oluşturur.

Testte Edwards besiyeri kullanılır. Bu besiyerine %5-10 kan, demir sitrat ve glikozid gibi bir eskülin kaynağı ilave edilir. Üzerine de test edilecek mikroorganizma ekilir. 37 °C' de 18-24 saat sonunda **siyah-kahverengi** bir renk pozitif; **seffaf** renk oluşumu negatiftir.



Şekil-22: Edwards besiyerinde Eskülin hidrolizi

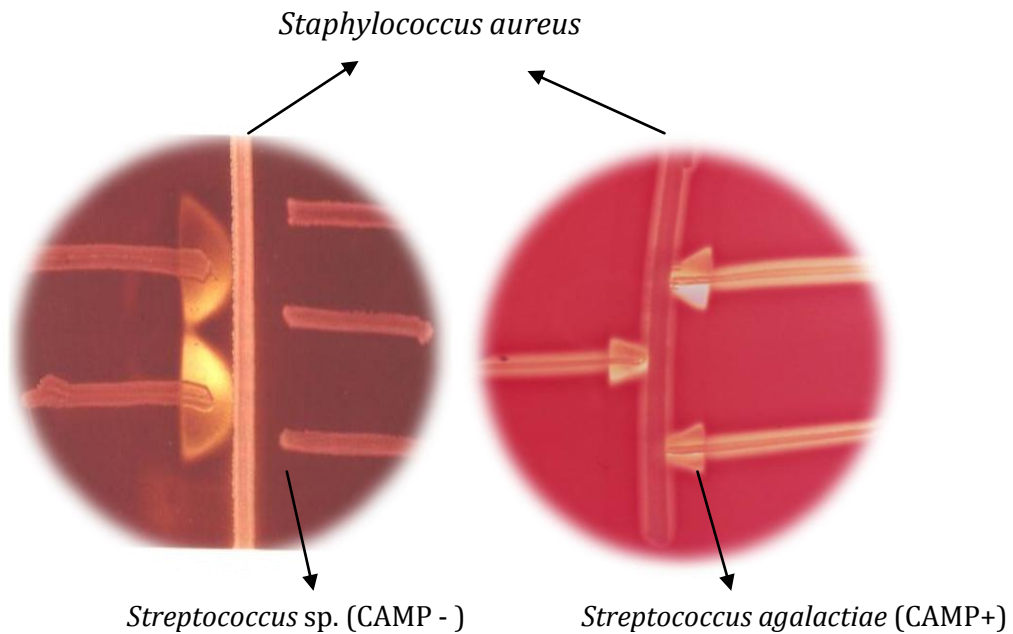


Şekil-23: Tüpte Eskülin Testi:

1.tüp ekim yapılmamış, 2.pozitif, 3.negatif

**E) CAMP Testi:**

- *Streptococcus agalactiae*, CAMP faktörü denenen bir madde sentezler.
- Bu madde tek başına hemoliz yapamamasına karşın  $\beta$ -lizin sentezleyen *Staphylococcus aureus* suşları ile karşılaşınca sinerjik etki ile **tam hemoliz** meydana getirir.
- Kanlı agar a çapı boyunca  **$\beta$ -lizin** sentezleyen *Staphylococcus aureus* suşu çizgi şeklinde ekilir.
- Buna dik olarak, hatları birbiri ile temas etmeyecek şekilde şüpheli *Streptococcus* sp. suşu ekilir.
- CAMP faktörü sentezleyen ve  $\beta$ -lizin sentezleyen suşlar değişkenlik göstermektedir (Örneğin; *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Rhodococcus equi*..).
- 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonucunda ekim hatlarının kesiştiği noktada **yarım daire ya da şemsiye tarzında tam hemoliz alanlarının oluşması pozitif** olarak değerlendirilir.



**Şekil-24: CAMP Testi**

## F) Karbonhidrat Fermentasyon Testi

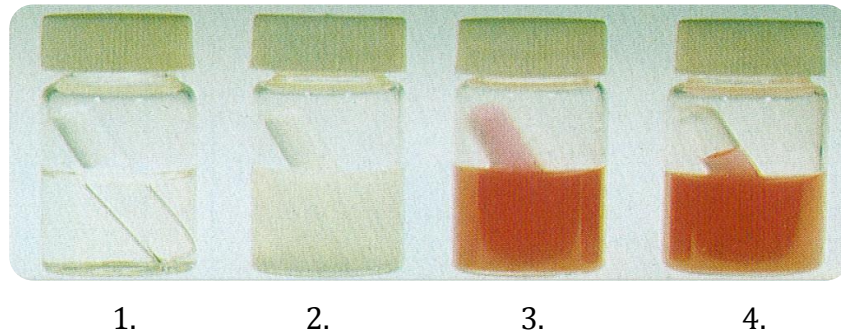
✓ Bazı bakteriler sahip oldukları enzimler ile aerobik yada anaerobik şartlarda Karbonhidratları ayrıştırma özelliğine sahiptir.

✓ Bu metabolizma sonucunda organik asitler, nötral ürünler ve gazlar oluşur. Bakteri türleri arasında oluşan bu son ürünler arasında bazı farklar vardır.

✓ Asit ürünlerin oluşması besiyerindeki indikatörlerin renk değiştirmesi ile anlaşılır. Gaz oluşumu ise tüplere ters olarak yerleştirilen Durham tüpleri ile değerlendirilir. Test iki şekilde yapılabilir:

### a. Sıvı Besiyerinde:

Glikoz, galaktoz, laktoz, maltoz, fruktoz, sukroz, mannoz, vb. şekerler testte kullanılır. Test edilecek şekeri %1 oranında ihtiva eden 5 ml'lik sıvı besiyerinin üzerine 0.1 ml'lik bakteri kültürü ve 3-4 damla indikatör madde (Ör; Andrade, Brom Thimol Mavis) damlatılır. 37C de 1-10 gün inkübasyonun sonunda şekerlerin kullanılması durumunda; asit oluşumu yönünden değerlendirilir. Gaz oluşmuş ise Durham tüpünde gaz kabarcığı birikir.



**Şekil-25:** 1.İnokule edilmemiş, 2.negatif reaksiyon, 3. pozitif reaksiyon (gaz üretimi yok), 4. pozitif reaksiyon(gaz üretimi var)

### b. Katı Besiyerinde:

✓ **Triple Sugar Iron (TSI) Agar**→ Besiyeri içerisinde üstte laktoz, ortada sukroz ve altta da glikoz bulunur. Besiyeri ayrıca **demir** ihtiva eder. İndikatörün rengi

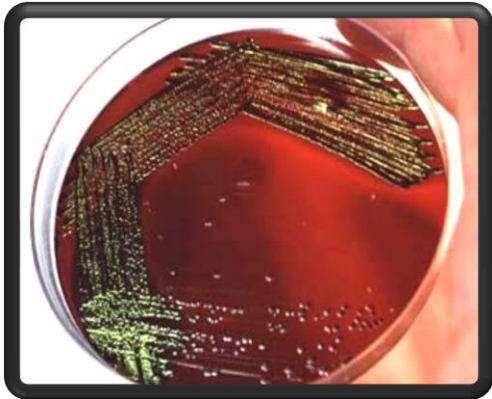
pembedir. İnkübasyon sonucu pozitif olanlar **sarıya** dönüşür. Üreme esnasında H<sub>2</sub>S açığa çıkmış ise demir ile birleşir ve **siyah** renkli demir sülfid oluşur. Besiyeri ve tüp arasında boşluk bulunması gaz çıkışının (+) olduğunu gösterir.



**Şekil-26: TSI testi** : Soldan sağa; 1.İnokule edilmemiş, 2.Laktoz, sükroz, glikoz ve gaz üretimi pozitif, 3.İnokule edilmemiş, 4.Laktoz negatif; sükroz,glikoz ve demir üretimi pozitif

✓ **MacConkey Agar (MC)** → Bu besiyerinde, laktoz ve indikatör olarak nötral red bulunur. Laktoz pozitif koloniler pembe renkli, negatifler ise renksiz koloniler oluştururlar.

✓ **Eosin Metilen Blue (EMB) Agar** → Bu besiyerinde laktoz ve indikatör madde olarak eosin metilen blue boyası bulunur. Laktoz pozitif koloniler metalik yeşil parlıltı veren koloniler oluştururlar, negatifler ise renksiz koloniler oluştururlar.



**Şekil-27: EMB Agar (Metalik Yeşil Rölfe)**



**Şekil-28: MC Agar (Laktoz pozitif koloniler)**

### G) İndol Testi:

- ✓ Bazı bakteriler sıvı besiyerinde bir aminoasit olan triptofanı parçalayarak indol halkası açığa çıkarırlar.
- ✓ Ortama **kovaks ayırıcı** ilavesi ile oluşan **kırmızı** halka testin pozitif olduğunu yani indol halkasının şekillendiğini ifade eder. **Sarı** halka oluşmuş ise negatif sonuçtur.



Şekil-29: İndol Testi

### H) H<sub>2</sub>S Testi:

- ✓ Bazı m.o lar sistin, sistein ve methionin gibi kükürtlü aminoasitleri parçalayarak H<sub>2</sub>S gazı açığa çıkarabilirler. Bu da ortamda bulunan ağır metaller ile birleşerek siyah metal tuzları oluşturur.
- ✓ Sıvı besiyerine bakteri ekilir. Yüzeyine temas etmeyecek şekilde kurşun asetat emdirilmiş kağıt şerit tüplere daldırılır. 37°C'de 2-7 gün inkübasyona kaldırılır. Kağıt şerit ucunda siyah renk oluşumu (+) olarak kabul edilir.



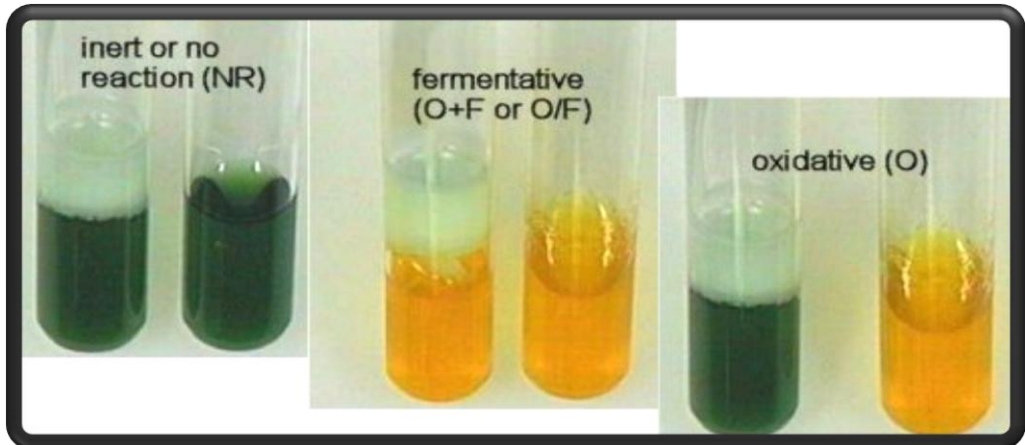
**Şekil-30:** H<sub>2</sub>S Testi (Soldaki negatif, sağdaki pozitif reaksiyon)

### İ) Oksidasyon/Fermentasyon (O/F) Testi

✓ Bir bakterinin oksidatif veya fermentatif olduğunun tespiti için yapılır. Testin yapılışında yarı katı bir besiyeri olan Hugh Leifson besiyeri kullanılır.

✓ Test için OF besiyeri içeren iki ayrı tüpe iğne uçlu öze ile ekim yapılır ve tüplerden birinin üzeri sıvı parafin ile kapatılır. Böylece O<sub>2</sub> ile teması engellenir. 37 °C'de 10 gün inkübe edilir. Besiyerinde şeker kullanılmış ise yeşil renk sarıya dönüşür.

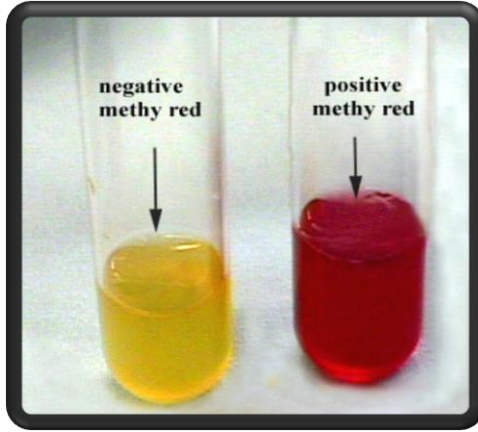
- **FERMENTATİF**→ Her iki tüpte sarı renk oluşmuş ise,
- **OKSİDATİF**→ O<sub>2</sub> li tüp sarı, diğeri yeşil ise,
- **NONREAKTİF (NONFERMENTATİF, NONSAKKAROLİTİK)**→ İki tüpün renginde de değişme yok, yani yeşil ise.



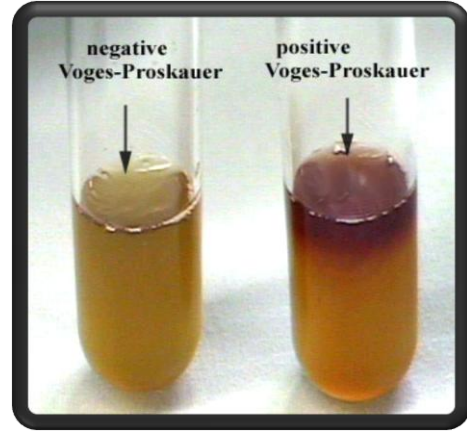
**Şekil-31:** Soldaki nonreaktif, ortadaki fermentatif ve sağdaki oksidatif reaksiyon

#### J) Metil Red-Voges Proskauer Testi:

- ✓ Glikozun ayrışması ile oluşan asit ürünlerin saptanmasında MR, nötral ürünlerin saptanmasında VP testi kullanılır.
- ✓ Ortamın pH sı 4.4 ya da daha aşağı düştüğünde ortama metil-red ayırıcı ilavesi ile **kırmızı renk** oluşumu (+) , **sarı renk** ise (-) olarak değerlendirilir.
- ✓ Bakteri kültürünün üzerine VP ayırıcı ilavesi ile oluşan **kırmızı renk** (+) olarak değerlendirilir.



Şekil-32: Metil Red Testi



Şekil-33: Voges Proskauer Testi

#### K) Üreaz Testi:

- ✓ Bazı bakteriler sahip oldukları üreaz enzimi ile üreyi, amonyak ve karbondioksit parçalarlar. Oluşan amonyak ortamın pH'sını yükseltir.
- ✓ Üreli buyyona bakterilerin kültürü ekilir ve 37°C'de inkübasyona bırakılır.
- ✓ Üre parçalanmış ise ortamın rengi **pembeye** dönüşür. Üre parçalanmamış ise ortamın rengi **sarı** olur.



**Şekil-34: Üre Testi**

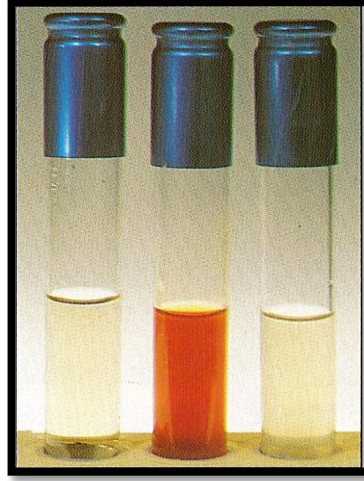
#### **L) Nitrat Redüksiyon Testi**

✓ Bazı bakteriler nitrat redüktaz enzimleri ile nitratları, nitritlere indirgerler. Bazı durumlarda reaksiyon daha da ileri gider ve amonyak ile serbest azot gazı oluşur.

✓ Nitratlı besiyerinde üretilen bakteriler ile eşit miktarda alfa naftilamin ve sülfonilik asit ilave edildiğinde **koyu kiremit kırmızısı** rengin oluşması + olarak değerlendirilir.

✓ Rengin değişmemesi ya nitratın nitrite indirgenmediğini, ya da reaksiyonun daha da ileriye giderek amonyak ve serbest azota indirgendiğini gösterir.

✓ Ortama bir miktar toz çinko ilavesi ile kırmızı renk oluşumu testin (-) olduğunu, rengin değişmemesi de testin (+) olduğunu gösterir.



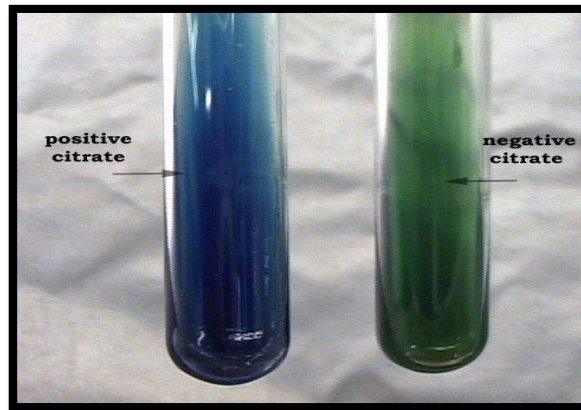
**Şekil-35:** Nitrat Redüksiyon Testi (Nitrat Broth)

Sol inoküle edilmemiş, orta pozitif ve sağ negatif reaksiyon

**M) Sitrat Testi:**

✓ Bakterilerin cins ve tür identifikasyonunda kullanılan bu test, besi yerlerine katılan sitratı karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamaktadır. Bakteriler sitratı, sitrataz enzimi ile ayrıştırmaktadır.

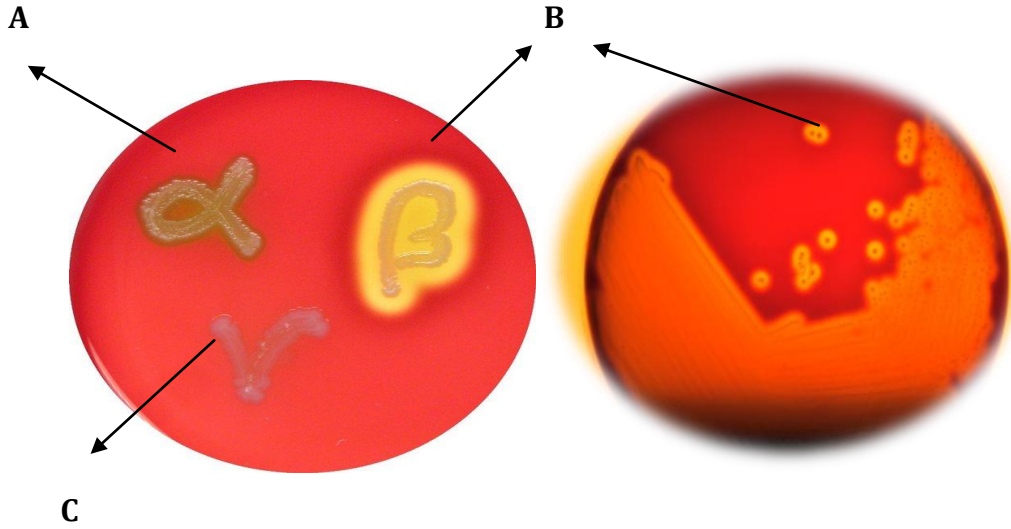
✓ Sitrat fermentasyonun için kullanılan besi yerlerinde (Örneğin; Simmons Citrate) amonyum tuzlarının bulunması nedeniyle de, bakterilerin bu tuzu nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yetenekleri de ölçülmektedir. Amonyum tuzu ayrışınca amonyak ( $\text{NH}_3$ ) meydana gelerek ortamın pH'sı yükselir.



**Şekil-36:** Sitrat Testi

#### N) Hemoliz Testi:

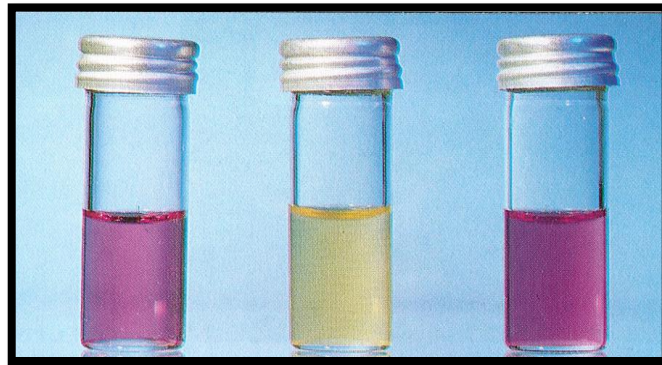
Bazı bakteriler, sentezledikleri toksik substanslarla kandaki eritrositleri parçalayabilirler. Bu test genellikle streptokokların kanlı agarda oluşturdukları hemoliz karakterini ölçmede işe yarar. Streptokoklar kanlı agarda  $\alpha$  (A),  $\beta$  (B) ve  $\gamma$  (C) hemoliz oluştururlar. Stafilokoklarda  $\alpha$ -hemolizinler koloni etrafında açık alan,  $\beta$ -hemolizinler ise yeşil-bulanık bir zon meydana getirirler.



Şekil-37: Hemoliz Testi

#### O) Lizin Dekarboksilaz Testi:

Bazı bakteriler aminoasitleri dekarboksilaz enzimi yardımı ile dekarboksilize ederek amin ve CO<sub>2</sub> meydana getirirler. Ortamda bazik karakterde olan aminlerin toplanması nedeniyle ortamın pH'sı yükselir, rengin mor menekşe rengine (**violet**) dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilir. Ph, 5,2'den aşağı olduğunda sarı renkte, 6,8'in üzerinde olduğunda mor renkte olur.



Şekil-38: Soldaki inoküle edilmemiş, ortada negatif ve sağdaki pozitif reaksiyon  
(Lysine Decarboxylase Broth)

## 8. HAREKET MUAYENESİ

Bakteriler kendilerinde bulunan flagella ile aktif olarak hareket ederler (**Örneğin; *E. coli***). Bazı bakteriler de, flagellaya sahip değildir. Bu nedenle hareket edemezler. Ancak bulundukları yerde moleküler harekete (Brownian) sahiptirler (**Örneğin; *Streptococcus* sp. ve *Staphylococcus* sp.**). Bazı bakterilerde, flagellaya sahip olmamalarına rağmen aksiyal filamentleri sayesinde bükülerek, kıvrılarak aktif olarak hareket edebilirler (**Örneğin; *Leptospira* sp.**).

Hareket muayenesinde kullanılan 5 yöntem vardır:

- Lam-Lamel Arası Yöntem
- Asılı Damla Yöntemi
- Yarı Katı Besi Yeri
- Flagella Boyama
- Elektron Mikroskop

### Lam-Lamel Arası Yöntem

- Hareket muayenesi yapılacak olan bakteri kolonisi, sıvı besi yerinde uygun koşullarda 18-24 saat üretilir. Kültür, etüvden çıkartıldıktan hemen sonra preparatın hazırlanmasına geçilir.
- Kültürden bir öze dolusu alınarak temiz bir lam üzerine konur.
- Lam üzerine temiz bir lamel kapatılır.
- Bu şekilde hazırlanan preparat ışık mikroskobunda incelenir.

### Işık mikroskobunda hareket muayenesi yaparken:

Mikroskop düz bir zeminde bulunmalı ve eğilmemelidir.

x10, x40'lık objektifler kullanılmalıdır.

Kondansatör aşağıda olmalıdır.

Diyafram kapatılmalıdır.

- ❖ **Mikroskopta bakteriler sağa sola, aşağı yukarı yer değiştiriyorlar ise hareketli kabul edilirler.**

### **Asılı Damla Yöntemi**

Bu teknikte ortası çukur olan özel lamlara ihtiyaç vardır.

Taze sıvı kültürden temiz bir lamel üzerine konur.

Lamel ters çevrilerek lamlın çukur kısmına kapatılır.

Böylece meydana gelen damla boşlukta sarkar vaziyete gelir ve lam mikroskopta incelenir.

### **Yarı Katı Besiyerinde**

Bu yöntem için tüplerde hazırlanmış yarıkatı besi yerleri kullanılır. **Örneğin;** Hugh-Leifson Besiyeri

Bakterinin tek koloniden oluşan saf ve taze sıvı kültürü hazırlanır.

Bu kültüre daldırılan steril, iğne uçlu öze dibe kadar daldırılır ve çıkartılır.

İnkubasyon süresinin sonunda ekim hattı etrafında dallanma ve yaygın bir bulanıklık gözlenirse m.o. hareketli kabul edilir.

Bu sürenin sonunda sadece ekim hattı etrafında üreme varsa, sağa sola dallanma yok ise m.o. hareketsiz kabul edilir.



**Şekil-39:** SIM besiyerinde hareket muayenesi (soldaki -, sağdaki +)

### **Flagella Boyama**

Bu amaçla leifson ve codaka yöntemleri kullanılmaktadır.

### **Elektron Mikroskop**

Ancak özel çalışmalarda flagellanın varlığını ortaya koymak amacı ile uygulanır.

## 9. ANTİBİYOGRAM TESTLERİ

- ❖ Disk Difüzyon (Kirby-Bauer),
- ❖ E-Test ve
- ❖ Dilüsyon yöntemleri ile antibiyogram duyarlılık testleri yapılabilmektedir.

### Kirby-Bauer Disk Difüzyon Tekniği

**Mikroorganizma sayısının McFarland standart tüpleri ile tayini:** Bir ortamdaki mikroorganizmaların sayısı takribi olarak, McFarland standart tüplerinin bulanıklığını yardımı ile tayin edilebilir. McFarland standart tüpleri hazırlamak için  $H_2SO_4$  ve  $BaCl_2$ 'ün molar eriyiklerinden %1'lik çözeltiler hazırlanır ve aşağıdaki çizelgede gösterilen oranlarda karıştırılır. Çizelgede tüp numaralarına göre bakteri sayıları gösterilmektedir.

| Tüp No                      | 1   | 2   | 3   | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
|-----------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| %1 $H_2SO_4$                | 9.9 | 9.8 | 9.7 | 9.6  | 9.5  | 9.4  | 9.3  | 9.2  | 9.1  | 9.0  |
| %1 $BaCl_2$                 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4  | 0.5  | 0.6  | 0.7  | 0.8  | 0.9  | 1.0  |
| Bakteri sayısı<br>Milyon/cc | 300 | 600 | 900 | 1200 | 1500 | 1800 | 2100 | 2400 | 2700 | 3000 |

**Tablo 3:** McFarland tüplerinde yoğunluk tayini



**Şekil-40:** McFarland Dansitometresi

- Test edilecek bakterinin 6-8 saatlik buyyon kültüründen (hafif bulanık) (0,5 McFarland yoğunluğuna göre) **Mueller-Hinton Agar** plaklarına 0,1-0,2 ml miktarında ekilir ve bir baget (drigalski spatülü) ile iyice yayılır (steril svapta aynı amaç için kullanılabilir).

- Agarın yüzeyi oda ısısında kuruduktan sonra (5-10 dk), agarın yüzeyine farklı konsantrasyonlarda çeşitli antibiyotikleri içeren diskler yerleştirilir ancak disklerin birbirine uzaklıkları 24 mm'den az olmayacak şekilde yerleştirilir ve 18-24 saat inkübe edilir.

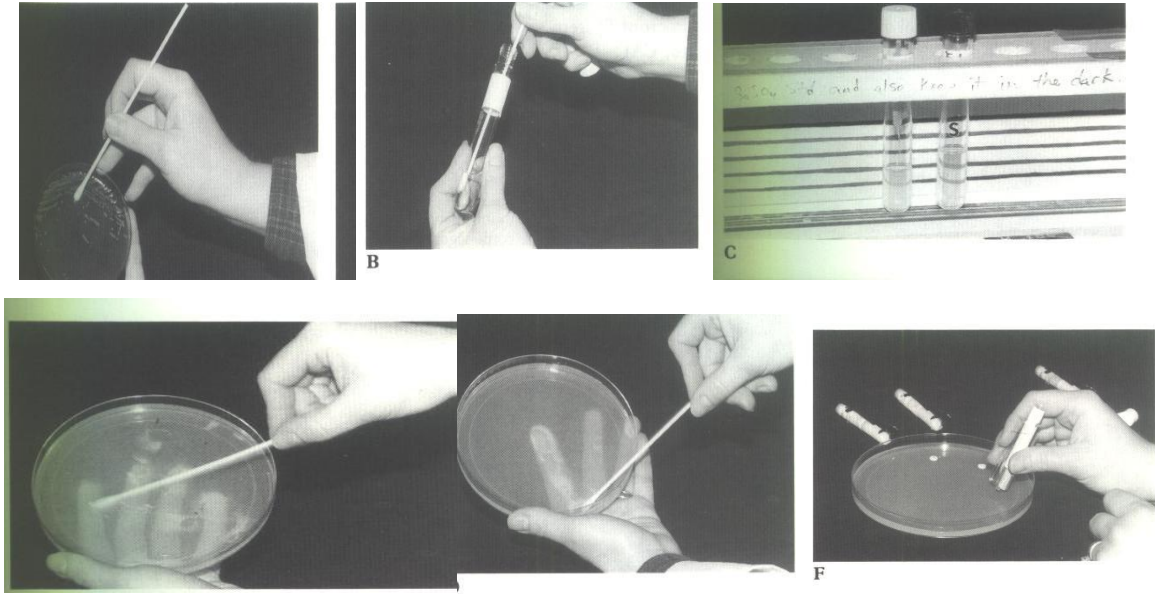
- Bu sürenin sonunda diskler etrafındaki inhibisyon zonları, kompas veya cetvelle ölçülür ve standart zon tablosu ile karşılaştırılarak **duyarlı** (Susceptible), **orta duyarlı** (Intermediate) ve **dirençli** (Resistance) olarak değerlendirme yapılır.

#### **Yorum Kategorileri:**

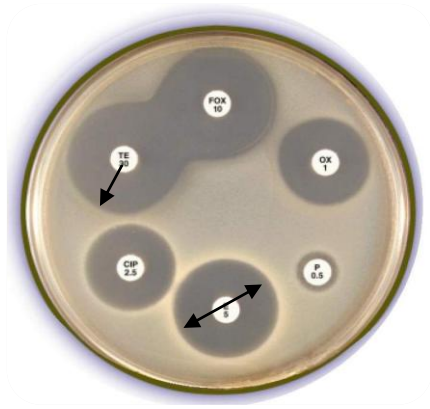
**a.Duyarlı:**"Duyarlı" kategorisi, belli bir suşa bağlı bir enfeksiyonun, o enfeksiyon ve infekte eden ajan için önerilen antimikrobiyal ajanla, eğer bir kontrendikasyon yoksa uygun şekilde tedavi edilebileceğini ifade eder.

**b.Orta duyarlı:**"Orta duyarlı" kategorisi, genellikle ulaşılabilir kan ve doku düzeylerine yakın antimikrobiyal MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyon) değerlerine sahip olan ve antimikrobiyal ajana cevap oranları duyarlı suşlardan daha düşük olabilen suşları içerir. "Orta duyarlı" kategorisi, ilaçların fizyolojik olarak konsantre olduğu vücut bölgelerinde klinik olarak uygulanabilirliğini ya da bir ilacın yüksek dozda kullanılabileceğini ifade eder.

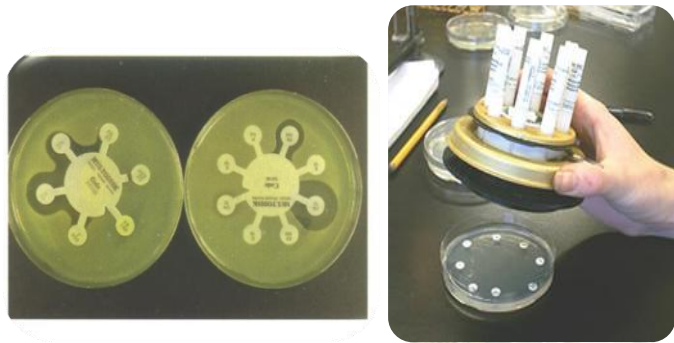
**c.Dirençli:** Dirençli suşlar, antimikrobiyal ajanın normal dozlarda kullanıldığı zaman genellikle ulaşabildiği sistemik konsantrasyonları ile inhibe olmazlar ve/veya spesifik mikrobiyal direnç mekanizmalarının söz konusu olduğu MİK değerlerine sahiptirler.



**Şekil-41:** Antibiyogram Testinin Uygulanışı



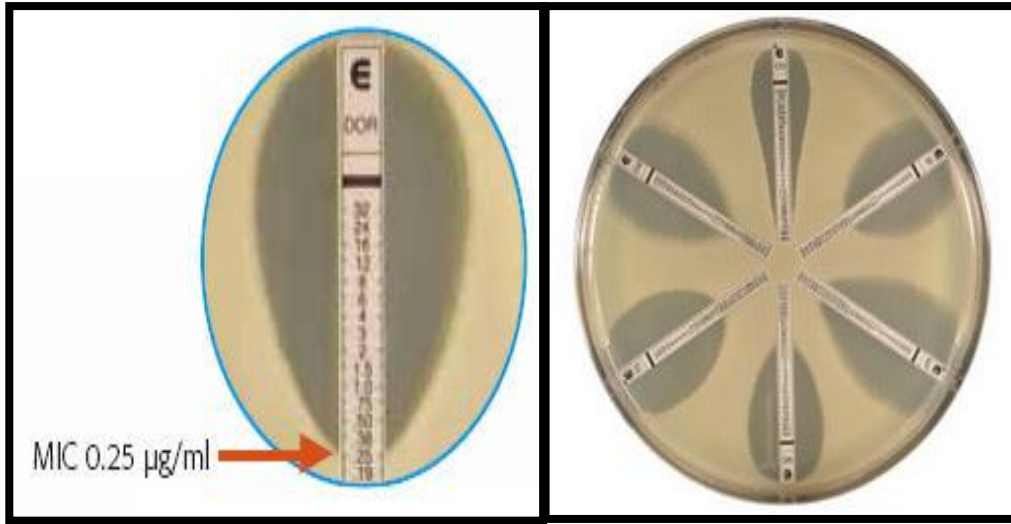
**Şekil-42:** Antibiyogram Testinin Yorumlanması



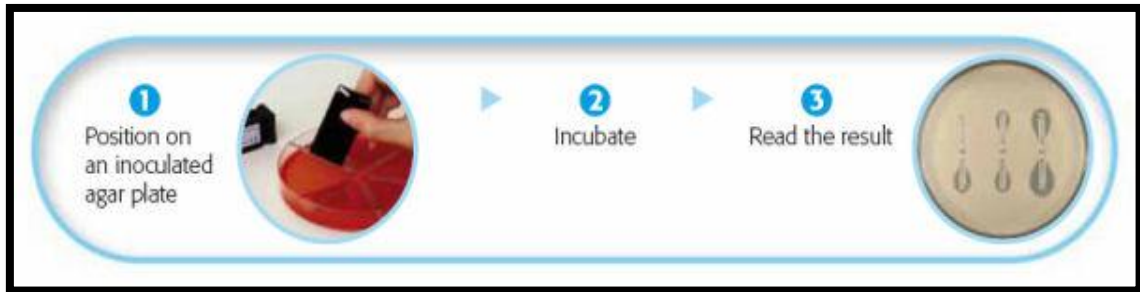
**Şekil-43:** Dispenser ile Antibiyotik Disklerinin Yerleştirilmesi

### **E-Test**

Katı besiyerinde difüzyon yoluyla MİK (minumum inhibitör konsantrasyon) değerinin saptanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. E-test yönteminde test edilecek bakteri 0,5 McFarland yoğunluğuna getirilip Mueller-Hinton agar yüzeyine steril bir eküvyonla yayılır. Daha sonra agar yüzeyine, belli bir antibiyotik gradienti içeren E-test şeritleri yerleştirilir. Plaklar 18-24 saat süreyle 35 °C'de inkübe edilip MİK değeri belirlenir. MİK değeri şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği noktadır.



**Şekil-44:** E-Test Yorumlanması



**Şekil-45:** E-test Yönteminin Uygulanışı

## **10. BAKTERİLERİN SAYIM YÖNTEMLERİ**

Klinik örneklerde ya da besinlerde bulunan bakterilerin kantitatif olarak saptanması için birçok yöntem geliştirilmiştir. Sayımı yapılacak mikroorganizmalar uygun besi yerlerinde çoğaltılır ve sonuçlar, katı besi yerlerinde gelişen kolonilerin sayılması, sıvı besi yerlerinde ise üreme gözlenen tüplerin değerlendirilmesi ile yapılır. Klinik mikrobiyoloji ve gıda mikrobiyolojisinde en çok kullanılanlar mikroskobik olarak bakteri sayımı, sıvı besi yeri kullanarak bakteri sayımı ve katı besi yeri kullanarak bakteri sayımıdır.

### **A) Direk Metotlar**

- a) Bakteri Sayımı
- b) Froti Sayımı (Breed Metodu)
- c) Karşılaştırma Usülü
- d) Elektronik Sayım

### **B) Indirekt Metotlar**

- a) Total Hacim Tayini
- b) Türbidimetrik Metot
- c) McFarland Standart Tüpleri ile Tayin
- d) Kimyasal Metot
- e) Biyokimyasal Metot
- f) Kuru Ağırlık Tayini

### **C) Kültür Yöntemi**

- a) Dilüsyonla Sayma
- b) Roller Tüp Metodu
- c) Frost'un Lam Metodu
- d) Selüloz Filtreleri ile Sayım
- e) Koloni Sayımı**

## e)KOLONİ SAYIMI

Mikrobiyolojik kontrollerde, bakterilerin hangi familyaya ait olduklarının bilinmesi yeterlidir. Bu metotta ise mikroorganizma sayısının doğru olarak sayılması için bazı kaideler bulunmaktadır. Bunlar;

1. Sayımı yapılacak örnek tüm malzemeyi temsil edecek nicelik ve nitelikte olmalıdır.
2. Mikroorganizmalar numune içinde homojen bir şekilde yayılmalıdır. Her mikroorganizmanın bir koloni oluşturacağı düşünülerek işlemler yapılmalıdır.
3. İşlemlere vakit geçirmeden en kısa sürede başlanmalıdır.
4. Sulandırma sıvısı steril ve istenilen miktarda olmalı, bakteriyostatik veya bakterisid etkiye sahip olmamalıdır.
5. Sulandırmalar genellikle 10 katlı olarak yapılmalıdır.
6. Sulandırma esnasında da mikroorganizmaların sıvıya homojen dağılması sağlanmalı ve işlem 15-20 dak içinde bitirilmelidir.
7. Örnek alma ve sulandırma esnasında pipetlerin sadece uç kısmı ile işlem yapılmalıdır.
8. Her sulandırma için ayrı bir steril pipet kullanılmalıdır.
9. Sulandırma miktarı tecrübeye dayanarak ve kültürlerdeki üreme durumuna bakılarak ayarlanmalıdır. Eğer *E.coli*' nin 24 saatlik buyyon kültüründen sayım yapılacaksa, bu sulandırma  $10^{-7}$ 'e kadar uzanabilir.
10. Ekimlerde mümkünse en son 3 sulandırma kullanılmalı ve her bir dilüsyondan en az 3 petri kutusuna ekim yapılmalıdır.
11. Petrilere genelde 0.05 veya 0.1 cc ekilir. İnokulum, drigalski spatülü veya L şeklinde bagetlerle yüzeye iyice yayılır. Uygun ısıda ve sürede etüvde inkube edilir.
12. Sayım el ile veya kontak kalemli elektrikle çalışan sayıcılarla veya elektronik sayıcılarla yapılır. Sayımı kolaylaştırmak için petriler, alt yüzeyinden 4 eşit parçaya ayrılmalıdır.
13. Üreyen 350'den fazla ve 10'dan az sayıda olan koloniler hesaba katılmamalıdır.

14. Aynı dilüsyondan ekilen 3 petri kutusundaki mikroorganizma kolonileri her dilüsyon için az çok birbirine yakın sayıda olmalı ve birbirinin iki katını aşmamalıdır.

15. *Proteus* sp. üremesi olmuş petriler dikkate alınmamalıdır.

16. 3 ayrı dilüsyona ait petrilerin birinde beklenenden fazla veya az sayıda koloni oluşumu varsa o petri hesaba katılmaz, eğer bu gibi durumlar fazla ise tüm işlem baştan tekrar edilmelidir.

17. Son 3 dilüsyondan 3'er petri kutusuna yapılan ekimlerde üreyen koloniler sayılarak her dilüsyon için ortalama bulunur ve orijinaldeki ortalama mikroorganizma sayısı hesap edilir.

18. Orijinal kültürdeki mikroorganizma sayısını hesaplamada şu formülden yararlanılır.

$$N = 1/V \cdot X \cdot D$$

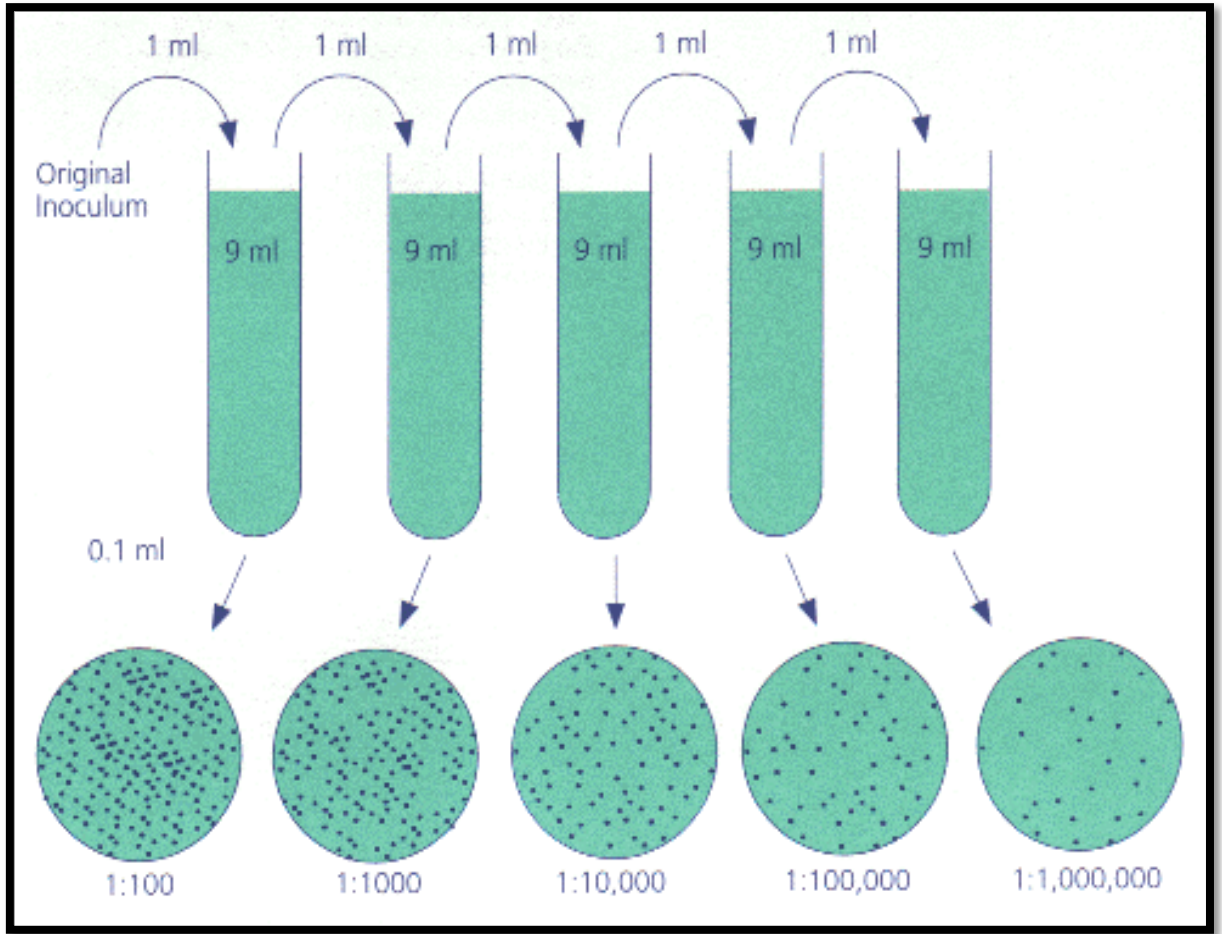
Burada;

N = Orijinal süspansiyondaki mikrop sayısı,

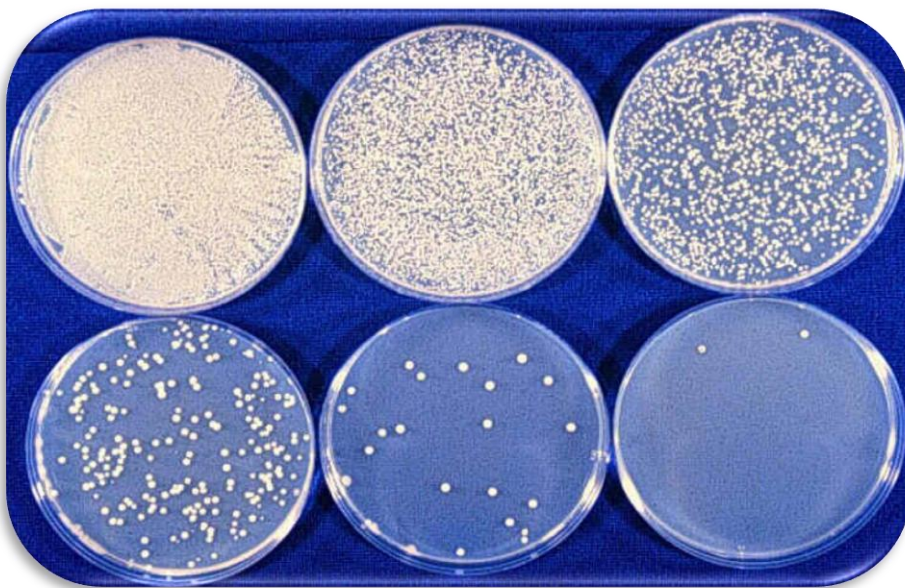
V = Petri kutularına ekilen inokulum miktarı (0.1 cc. veya 0.05 cc.)

X = Ortalama mikrop sayısı

D = Dilüsyonun ters logaritması.



**Şekil-46:** Koloni sayımı yönteminde dilüsyonlar



**Şekil-47:** Koloni Sayımı

Yukarıda yapılan açıklamalara dayanarak bir kültürdeki mikroorganizma sayısının hesaplanması kısaca şöyledir.

*E. coli*' nin 18 saatlik buyyon kültüründen  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  ve  $10^{-9}$  ' luk dilusyonlarının her birinden 3' er petri kutusuna 0.1 cc. miktarında ekimler yapılıyor ve bunlar 24 saat 37 °C 'de inkübe edildikten sonra üreyen koloniler sayılıyor ve aşağıdaki sonuçlar alınıyor:

| <u>Dilasyonlar</u> | <u>1. petri</u> | <u>2. petri</u> | <u>3. petri</u> | <u>Toplam</u><br><u>Koloni</u> | <u>Ortalama</u><br><u>Koloni</u> |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|
| $10^{-7}$          | 340             | 280             | 300             | 920                            | 307                              |
| $10^{-8}$          | 40              | 50              | 45              | 135                            | 45                               |
| $10^{-9}$          | 4               | 7               | 10              | 21                             | 7                                |

Yukarıdaki bulgulara göre;

$10^{-7}$  de 0.1 cc. de ortalama 307 bakteri kolonisi bulunursa, orijinal süspansiyonun 1 cc. sinde ortalama;

$$1/0,1 \cdot 307 \cdot 10^7 = 30,7 \cdot 10^9 \text{ bakteri/ cc. vardır.}$$

## **EK-1: LABORATUVAR KONTROL LİSTESİ**

### **ANABİLİM DALI: MİKROBİYOLOJİ**

Her madde için ilgili harfi (**E**=Evet, **H**=Hayır) **İŞARETLEYİNİZ.**

#### **1. İlk yardım**

- |                                                        |          |          |
|--------------------------------------------------------|----------|----------|
| • İlk yardım malzemeleri görünür ve ulaşılır yerde mi? | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • İlk yardım dolaplarının donanımı tamam mı?           | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Göz yıkama araç-gereci var mı, görülebiliyor mu?     | <b>E</b> | <b>H</b> |

#### **2. Yangın Söndürücüler**

- |                            |          |          |
|----------------------------|----------|----------|
| • Yangın söndürücü var mı? | <b>E</b> | <b>H</b> |
|----------------------------|----------|----------|

Son bakım tarihi

Yazınız:

#### **3. Yangın Çıkışları**

- |                                     |          |          |
|-------------------------------------|----------|----------|
| • Açık bir şekilde işaretlenmiş mi? | <b>E</b> | <b>H</b> |
| Engelsiz mi?                        | <b>E</b> | <b>H</b> |

#### **4. Dezenfeksiyon ve Sterilizasyon**

- |                                      |          |          |
|--------------------------------------|----------|----------|
| • Su ?                               | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Sabun ?                            | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Dezenfektan maddeleri mevcut mu?   | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Antiseptik maddeleri mevcut mu?    | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Temiz ve tıkanık olmayan eviyeler? | <b>E</b> | <b>H</b> |

#### **5. Ana Elektrik Donanımı**

- |                                                                                                                                |          |          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|
| • Son on iki ay içinde, (sigorta değerleri, gevşek kablolar, toprak hattı, yalıtım) yetkili biri tarafından kontrol edildi mi? | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Prizler ve düğmeler sıkıca vidalanmış mı? Kırık var mı?                                                                      | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Gevşek/açıkta kablo var mı?                                                                                                  | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Çoklu elektrik prizleri gereğinden fazla yüklü mü?                                                                           | <b>E</b> | <b>H</b> |

## 6. Gaz Tüpleri

- |                                                |          |          |
|------------------------------------------------|----------|----------|
| • Tüpler uygun şekilde depolanmış mı?          | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Depolanmış gazlardan kaçak belirtisi var mı? | <b>E</b> | <b>H</b> |

## 7. Havalandırma ve Aydınlatma

- |                                                                                        |          |          |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|
| • Oda yeterince havalandırılıyor mu? (Herhangi bir fark edilebilir duman/koku var mı?) | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Laminer hava kabinleri veya çeker ocak çalışır durumda mı?                           | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Laminer hava kabinleri veya çeker ocağın penceresi istenildiği kadar açılabilir mi?  | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Işıklar çalışıyor mu, güvenli mi?                                                    | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Işıklandırma düzeyi yeterli mi?                                                      | <b>E</b> | <b>H</b> |

## 8. Zemin

- |                             |          |          |
|-----------------------------|----------|----------|
| • Zemin güvenli durumda mı? | <b>E</b> | <b>H</b> |
|-----------------------------|----------|----------|

## 9. Çöp Kutuları

- |                                                                                    |          |          |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|
| • Yeterli sayıda/büyükte kutu var mı?                                              | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Ayrı çöp atma imkanları var mı? Biyolojik atık ve cam ayrı ayrı işaretlenmiş mi? | <b>E</b> | <b>H</b> |

## 10. Depolama

- |                                                                                                                                       |          |          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|
| • Raflar güvenli bir şekilde sabitlenmiş mi, aşınma var mı?                                                                           | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Dosya dolapları duvara sağlamca dayanmış mı, veya üzerinde uyarı notu var mı?                                                       | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Tehlikeli kimyasal maddelerin üzerinde uygun uyarılar var mı?                                                                       | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Özellikle tehlikeli kimyasal maddeler kilit altında mı?                                                                             | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Büyük kaplardaki aşındırıcı sıvılar yerde ve kimsenin çarpmayacağı şekilde depolanmış mı?                                           | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Büyük kaplar döküntüleri tutacak tablalara yerleştirilmiş mi?                                                                       | <b>E</b> | <b>H</b> |
| • Birbiriyle uyummayan kimyasal maddeler birbirlerinden uzakta depolanmış mı? (Örn. hidroklorik asit/formaldehit; sodyum /fosfor vb.) | <b>E</b> | <b>H</b> |

- Yanıcı maddeler, ısı kaynaklarından uzakta depolanmış mı? **E H**
- Kimyasal madde stoklarının üzerinde tarih damgası var mı, düzgünce etiketlenmiş mi? **E H**
- Kısa-ömürlü kimyasal maddelerin (Örn. potasyum, dietil eter) bozulup bozulmadığı zamanında kontrol edilmiş mi? **E H**
- Ağır şeyler alçakta depolanmış mı? **E H**
- Biyolojik örnekler, sızıntı tehlikesi olmaksızın şişelerde mi? **E H**

### 11. Donanım ve Mefruşat

- Cam eşyaların kenar ve ağızları çatlaksız ve kırıksız mı? **E H**
- Bunsen beki borularında kaçak var mı? **E H**
- Gerektiğinde kullanmak üzere güvenlik/patlama paravanı var mı? **E H**
- Masa, tezgah, sandalye ve tabureler güvenli durumda mı? **E H**

### 12. Göz Koruma

- Laboratuvarda göz koruyucu var mı? **E H**
- Var olan göz koruyucusu gözlük üzerinde takılabilen cinsten mi? **E H**
- Gerektiğinde kullanmak üzere yüz koruyucu var mı? **E H**
- Göz koruyucular temiz ve iyi durumda mı? **E H**

### 13. Personel

- Bütün personele güvenlik yönetmeliğinin birer kopyası verilmiş mi? **E H**
- Bütün personel laboratuvar güvenlik kurallarını biliyor mu? **E H**
- Bütün personel ilk yardım malzemelerinin yerini biliyor mu? **E H**
- Bütün personel binayı boşaltma sırasında yapılması gereken işlemleri biliyor mu? **E H**
- Bütün personel göz yıkama tatbikatını biliyor mu? **E H**
- Bütün personel döküntü temizleme sırasında yapılması gereken işlemleri biliyor mu? **E H**

## EK-2: BAKTERİNİN HÜCRE YAPISI

