



**BAKTERİLERİN ÜREMESİ,  
BESİNSEL VE FİZİKSEL  
GEREKSİNİMLERİ,  
BESİYERLERİ,  
KOLONİ MORFOLOJİLERİ**





## **Bakterilerin beslenme şekillerine göre guruplara ayrılması**

### **1-Ototrof Bakteriler**

Besin maddesi olarak inorganik maddeler, (NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>) ve atmosferdeki CO<sub>2</sub> yi kullananlar

### **2-Heterotrof Bakteriler**

Besin maddesi olarak en az bir organik bileşiğe gereksinim duyanlar



### **Saprofit bakteriler:**

Heterotrof bakterilerden besinlerini cansız maddelerden temin edenlere saprofit bakteriler denir.

### **Parazit:**

Heterotrof bakterilerden besinlerini canlı organizmadan temin edenlerdir.

Patojen

Kommensal



### **Patojen mikroorganizmalar:**

Üzerinde yaşadığı organizmaya zarar veren mikroorganizmalardır

### **Kommensal mikroorganizmalar:**

Üzerinde yaşadığı organizmada herhangi bir zarar oluşturmayan mikroorganizmalardır



## BESİYERİ

Mikroorganizmaların üretilebilmesi için besin maddelerine ihtiyaç vardır. Bu besin maddelerini içeren, mikroorganizmaların invitro olarak üretilebildikleri cansız ortamlara **BESİYERİ** denir.

Sıvı bsy.

Katı bsy.



### **Katı besiyeri:**

% 1.5-3 oranında agar-agar'ın sıvı besiyerine katılmasıyla

### **Yarı katı besiyeri:**

% 0.3-0.5 oranında agar-agar'ın sıvı besiyerine katılmasıyla

### **Yarı sıvı besiyeri:**

% 0.05-0.2 oranında agar-agar'ın sıvı besiyerine katılmasıyla elde edilir



## **Kimyasal özelliklerine göre başlıca besiyeri gurupları şunlardır:**

- Kimyasal yapıları tam olarak bilinen sentetik besiyerleri
- Genel üretim besiyerleri
- Özel besiyerleri



## 1-Kimyasal yapıları tam olarak bilinen sentetik besiyerleri

Özellikle mikroorganizmaların metabolizmalarını araştırma veya biyolojik ürünleri saf olarak elde etmek için kullanılır. Distile su veya deiyonize su içinde karbon kaynağı olarak glikoz veya laktat, azot kaynağı olarak inorganik tuzları ve tamponlanmış ortamda çeşitli inorganik tuzlar içeren besiyerleri **BASİT SENTETİK BESİYERLERİ** dir.

Bu besiyerlerinde ancak ototrof bakteriler ürediği halde içine amino asitler veya gelişme faktörleri katılmasıyla hazırlanan **KOMPLEKS SENTETİK BESİYERLERİ** birçok bakterinin üremesine uygundur.





## 2-Genel üretim besiyerleri

İnsan ve hayvanlar için patojen olan mikroorganizmaların kısmen üretilebildiği ve günlük laboratuvar çalışmalarında kullanılan besiyerleridir.

Çoğunlukla et suyu ve pepton temel alınarak sıvı ve katı olarak hazırlanan besiyerleridir.

Basit yada temel besiyerleri adını alan bu besiyerlerinde yalnız pepton+tuz (peptonlu su), yada etsuyu+ pepton+tuz **BUYYON** gibi maddeler bulunur. Buyyona agar-agar ilave edilmesiyle **JELOZ** hazırlanır.

### 3-Özel besiyerleri (1)

#### a- Zenginleştirilmiş besiyerleri:

Temel besiyerlerine kan, serum, haben sıvısı, glikoz, yumurta gibi besleyici maddelerin katılmasıyla hazırlanır. Basit besiyerlerinde üreyemeyen birçok mikroorganizma bu besiyerlerinde üretilirler

#### b- Tecrit besiyeri:

İstenen mikroorganizmayı diğerlerinden ayırdettirecek maddeleri veya indikatörleri içerir. Örneğin, Endo besiyeri Eozin-metilen mavili jeloz, MacConkey jelozu laktoza etki edenleri etmeyenlerden ayırdettirir. Böylece laktoza tesir eden E.coli ile etki etmeyen Salmonella ve Shigella bakterileri birbirinden ayırılır.



### 3-Özel besiyerleri (2)

#### c- Seçtirici (selektif) besiyeri:

Üremesi istenen mikroorganizma dışındaki diğer bakterilerin üremesini inhibe eden katı besiyerleridir. Örneğin, Salmonella ve Shigellalar için dezoksikolat sitratlı besiyeri, S.aureus için Chapman besiyeri, Corynebacterium diphteriae için tellüritli kanlı jeloz seçtirici besiyerleridir.

#### d- Çoğaltma besiyeri:

Üremesi istenen dışındaki mikroorganizmaların üremesini inhibe eden, üremesi istenen bakterinin ise çoğalmasını kolaylaştırıcı maddeleri içeren besiyerleridir. Örneğin; selenitli ve tetratiyonatlı buyyonlar koliform bakterilerin üremesini inhibe ettikleri halde Salmonellaların çoğalmalarını sağlayan besiyerleridir.



## **Besiyerlerinin hazırlanması ve muhafazası:**

- Sıvı ve katı besiyerlerinin hazırlanması
- Hazırlanan besiyerlerinin sterilite testlerinin yapılması
- Besiyerlerinin saklanması ve aerop yada anaerop bakterilerin üretilecekleri besiyerlerine ait uyarılar



## Bakterilerin üremesi

Bakteriler genellikle ikiye bölünerek çoğalırlar.

Üreme esnasında bakterilerin bölünme hızı bakteri türüne ve üreme ortamı ve çevre koşullarına bağlıdır. Optimal şartlarda bölünme hızı sabittir.

Örneğin:

*Escherichia coli* → 20 dakika

*M.tuberculosis* → 14-15 saat

## Bakterilerin üreme grafiği

Uygun bir sıvı besiyerine belirli sayıda bakteri ekilecek olursa ve düzenli aralıklarla bu besiyerinden örnekler alınarak incelenecek olursa bakterilerin düzenli üremedikleri ve üremenin zamana bağlı olarak çeşitli dönemleri bulunduğu gözlenmiştir:

- Gizli dönem
- Üremenin hızlandığı dönem
- Logaritmik üreme dönemi
- Üreme hızının azalma dönemi
- Çoğalmanın durma dönemi
- Bakterilerin azalma dönemi
- Logaritmik azalma dönemi
- Yeniden düzenlenme dönemi





Bu üreme dönemleri sıvı besiyerlerinde izlenebilir.  
Bu şekilde tüpte veya Petri kutusunda mikroorganizmaların çoğalmasına **İN VİTRO** üreme,  
Deney hayvanı veya canlı dokuda çoğalmalarına ise **İN VİVO** üreme denir.



## Bakteri Kolonileri

Katı besiyerinde üreyen mikroorganizmalar koloniler oluştururlar. Petri kutularında hazırlanmış olan katı besiyerlerine uygun seyreklikte bakteri ekilirse her bakteri bulunduğu yerde üreyerek sınırlı bir bakteri topluluğu oluşturur ki buna **KOLONİ** adı verilir.

Koloniler her cins bakteri için özel karaktere sahiptirler. Genel olarak bakterilerde izlenen koloni tipleri şunlardır:

- ❖ S koloniler
- ❖ R koloniler
- ❖ M koloniler
- ❖ L koloniler





## **1-S (smooth) koloniler:**

Yuvarlak düz kenarlı, kabarık, düz yüzeyli, nemli ve homojen kolonilerdir.

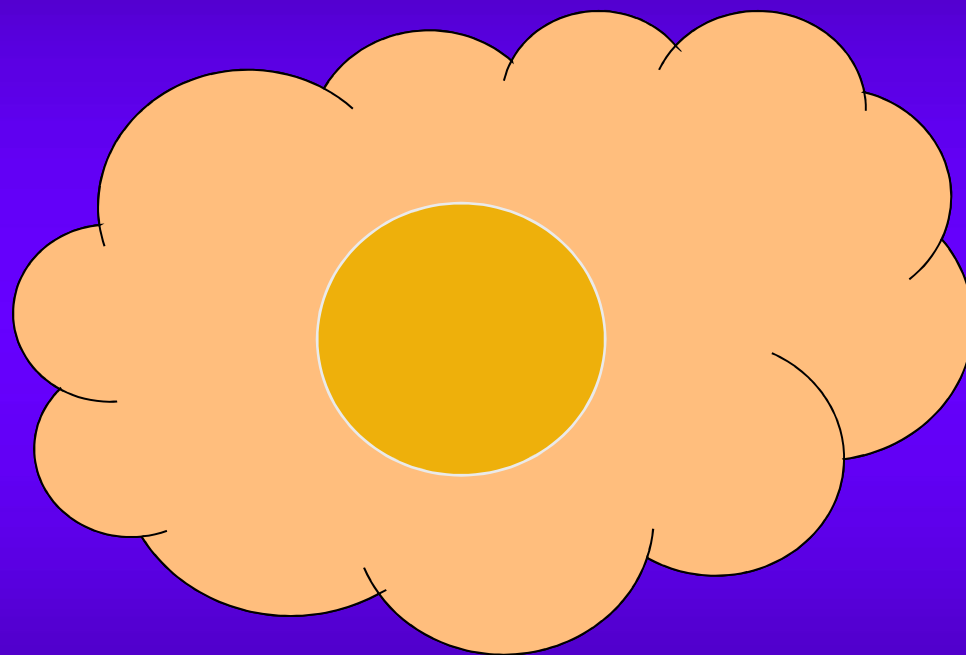
## **2-R (rough) koloniler:**

Yüzeyleri buruşuk veya tanecikli, kenarları girintili çıkıntılı, basık ve yassı görünümündedir.

S koloni yapan bakterilerin eski kültürleri ve bazı tür bakterilerin olağan kolonileri R koloni yaparlar.

Shigella sonnei' de S kolonileri yanında R tipinde koloni de meydana gelmektedir.

Patlamış bir bombaya benzediği için bunlara **BOMBA** kolonileri denir.



**Bomba Kolonisi**

## S ve R kolonileri arasındaki farklar:

- a-** S tipi koloni oluşturan bakterilerden hazırlanan süspansiyon homojen, R tipinden hazırlanan ise partiküllü olur.
- b-** S kolonileri yalnız kendi özel serumlarıyla aglütine olurlar. R koloniler hem özel hemde başka bakterilerin R şekillerine karşı hazırlanmış serumlarla aglütinasyon verir.
- c-** R şekline geçmiş kolonilerdeki bakterilerde genellikle bir virulans azalması da gözlenmektedir.





### 3- M koloniler:

Kapsüllü bakterilerin zengin besiyerlerinde üretilmeleri sırasında oluşturduğu yapışkan, mukoid kolonilerdir. Uygunsuz koşullarda kapsüllerini kaybeden bakteriler S tipi koloni oluştururlar. Fakat uygun şartlarda yine kapsüllenenerek M koloni yaparlar.

### 4- L koloniler:

Bakterilerin L şekillerinin buldukları besiyerlerinde çok küçük ve büyüteçle ayırdedilebilen, besiyerine çivi gibi uzanmış L tipi koloni oluştururlar.



## **Kültür çeşitleri:**

### **Batırma kültür:**

Tüpte yüksek tabaka halinde dik olarak katılaştırılmış jeloz besiyerine uzun bir iğne ile derin kısımlara kadar batırmak suretiyle elde edilen kültürdür. Bu şekilde bakterilerin gaz oluşturmaları kolayca incelenir.

### **Çalkalama kültür:**

Agarlı katı besiyeri eritildikten ve  $45^{\circ}$ -  $50^{\circ}$ C' a kadar soğutulduktan sonra bakterilerin karıştırılmasıyla elde edilen kültürdür.



### Sıvı kültür:

Sıvı besiyerine mikroorganizmaların ekilmesiyle elde edilir.

### Karışık kültür:

Normalde bakteri florası içeren boğaz salgısı, dışkı gibi materyalden besiyerine ekim yapıldığında birçok farklı cins bakteri bir arada ürer. Böyle birden çok cins bakterinin ürediği kültüre karışık kültür denir.

### Saf kültür:

Yalnız bir cins bakterinin üretilmesiyle elde edilen kültüre saf kültür denir.

# Saf kültürün elde edilmesi:

1- Petri kutusunda azaltma yöntemi

2- Petri kutusuna dökme yöntemi

3- Örneğin özel bir işlemden sonra ekilmesi

a- Sporlu bakteriler için:

Materyal 85<sup>0</sup> C'da 5 dakika bekletilir

Materyal 65<sup>0</sup> C'da 30 dakika ısıtılır

b- Tbc bakterilerini elde etmek için materyal %4 lük NaOH ile 30 dakika muamele edilir, aside dirençli olmayan diğer bakteriler ölür, Tbc bakterileri kalır. NaOH'ın etkisi steril distile suyla giderilir ve özel besiyerlerine (**löwenstein** bsy.) ekilerek Tbc bakterileri saf kültür olarak üretilir.





## 4-Özel besiyerlerinin kullanılması

Kanlı jeloz  
Antibiyotikli bsy.  
Chapman bsy.  
Alkaleen bsy.  
(Pilon, Aronson, Deudonne)

Hemolizli bakterilerin,  
O antibiyotiğe dirençli bakterilerin,  
Patojen Stafilokokların,  
Vibrio cholerae üretilmesinde  
kullanılırlar.

Tellüritli bsy.

Gr(-) çomaklar inhibe olur,  
Streptokoklar renksiz koloni  
yaparak,  
Corynebacterium diphteriae siyah  
koloni yaparak ürerler.

## 5-Deney hayvanlarının kullanılması

Pnömonokoklar findık faresinde ürerler. Materyal findık faresine şırınga edilir. 24-36 saatte ölen farenin kalp kanında saf kültür halinde Pnömonokoklar izole edilir.





# Anaerop Kültür Yöntemleri

- 1-Besiyeri redüksiyon Őiddeti arttırılır
- 2-Ortamdaki oksijen giderilir



## 1-Redüksiyon şiddetinin arttırılması

- Yüksek tabakalı jeloz
- Kimyasal madde ilave edilmesi
- Aktif demir kullanılması
- Canlı veya ölü dokuların kullanılması



## 2-Ortamdaki oksijenin giderilmesi

- Biyolojik yöntem
- Kimyasal yöntem
- Mekanik yöntem



## Saf kültürün tanısı

- Morfoloji
- Ortam etkisi, besin ihtiyacı
- Kültür özellikleri
- Biyokimyasal özellikleri
- Antijenik yapı
- Patojenlik



## Kültürlerin muhafazası

- Yeni besiyerlerine ekim yapmak (pasaj yapmak)
- Madeni yağ veya parafınle kültürlerin ağzının kapatılması
- Liyofilizasyon
- Soğukta muhafaza

## Endo agar besiyeri

Peptones	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 gr
Lactose	10 gr
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	3,3 gr
Fuchsin	0,3 gr
Agar	12,5 gr

1000 ml distile suda çözülür ve otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilir. 45-50 °C ye soğutulup petri kutularına 12,5 ml'şer dökülür. Besiyeri rengi berrak ve soluk pembedir.

Bu besiyerinde,

*E.coli* çok iyi gelişir, koloni rengi kırmızıdır, metalik parlaklıktadır.

*Klebsiella pneumoniae* iyi gelişir.

*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* iyi gelişir.




*Klebsiella*



*Salmonella*



## EMB agar (eosin methylene-blue lactose sucrose agar)



Peptones	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 gr
Lactose	5 gr
Sucrose	5 gr
Eosin Y yellowish	0,4 gr
Methylene blue	0,07 gr
Agar	13,5 gr

1000 ml distile suda çözülür ve otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilir. 45-50 °C soğutulup petri kutularına 12,5 ml'şer dökülür. Besiyeri rengi berrak, kırmızımsı kahve, menekşe kahve rengidir.





E.coli

Bu besiyeri, gram pozitif bakterilerin gelişimini baskılar. Yaygın olarak E.coli ayırımında kullanılır. E.coli menekşe ve metalik görünür. Enterobakter pembe ortası koyu görünür. Salmonella ve shigella ise renksiz, şeffaf görünür. Çünkü salmonella ve shigella laktoz negatiftir.



## TSI agar (Triple sugar iron agar)

Pepton from casein	15 g	
Pepton from meat	5 g	
Meat extract	3 g	
Yeast extract	3 g	
NaCl	5 g	
Lactose	10 g	
Sucrose	10 g	
D(+) glucose	1 g	
Ammonium iron III citrate	0,5 g	
Sodium thiosulphate	0,5 g	
Phenol red	0,024 g	
Agar	12 g	

1000 ml distile suda çözülür. Kaynar su banyosunda 5-10 dk bekletilir, sürekli karıştırılır ve eritilir. Besiyeri henüz sıvı ken tüplere 7'şer ml dağıtılıp 121 °C'de 15 dk sterilize edilir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken 1-1,5 cm yükseklikteki bir düzeneğe yatırılır. Katılaşması beklenir. Hazırlanmış besiyeri berrak kırmızı renktedir.



Bu besiyerinde;

E.coli

Enterobakter

Shigella

Salmonella

dip

sarı

sarı

sarı

sarı-siyah

yatık yüzey

sarı

sarı

kırmızı

kırmızı



## SS agar (salmonella Shigella agar)

Pepton	10 g
Lactose	10 g
Ox bile	8,5 g
Sodium citrate	10 g
NaS <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8,5 g
Ammonium iron III citrate	1 g
Brilliant green	0,0003 g
Neutral red	0,025 g
Agar	12 g

1000 ml distile suda çözülür. Kaynar su banyosunda eritilir ve petri kutularına 12,5 ml'şer dökülür. Bu besiyeri otoklavlanmaz. Sterilizasyon kaynar su banyosunda besiyeri erirken yapılmış olur. Aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızımsı kahve renklidir.

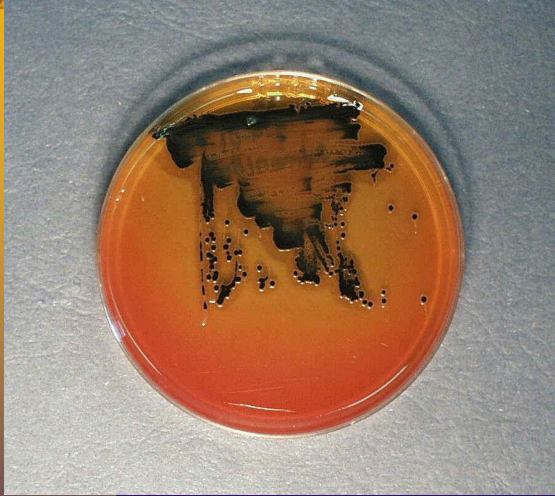




Renksiz yarı saydam koloniler shigella ve pek çok salmonella için tipiktir. Bazı salmonellalar siyah merkezli yarı saydam koloniler oluştururlar. Pembe ve kırmızı koloniler E.coli olarak tanımlanırken, pembe beyaz ya da krem renkli olanlar enterobakter kolonileridir.

Bu besiyerinde salmonellanın shigella kolonilerinden ayırımı, koloni etrafındaki renk değişimine bakılarak yapılır;

salmonellada sarı, shigellada kırmızıdır.



Salmonella  
SS agarda



Shigella on EMB



Shigella on MacConkey



Shigella on ENDO



Shigella on Hektoen



Shigella on SS agar

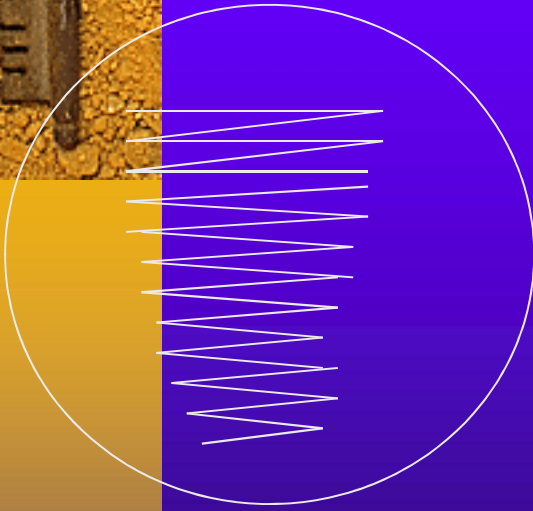
shigella



# Besiyerlerine ekim, kültür saflığının tespiti ve saf kültür elde etme



Tek tip mikroorganizmadan oluşan topluluğa saf kültür denir. Değişik ortamlarda saf veya karışık halde bulunan mikroorganizmaları katı besiyeri yüzeylerine veya sıvı besiyerine ekmede değişik yöntemler kullanılır. Genelde bu ekimler ze ile yapılır.



Çizgi ekim yöntemleri

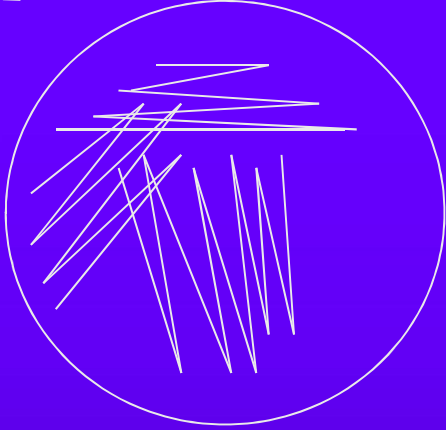


Herhangi bir kültürün saflığını test etmek için o kültürden katı besiyerine özeyle çizgi ekim yapılır. İnkübasyon sonucunda benzer görünümde koloniler oluşuyorsa kültür muhtemelen saf demektir. Fakat, farklı tipte koloniler meydana gelmişse karışık demektir. Ayrıca bu kolonilerden yapılan boyama ve mikroskopik inceleme sonucunda benzer şekilli mikroorganizmalar görülürse saflık test edilmiş olur. Aksi durumda kültür saf değildir.

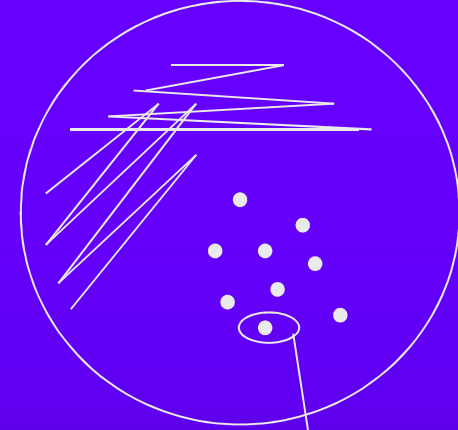
# Saf kültür hazırlama

Tel uçlu öze

örnek



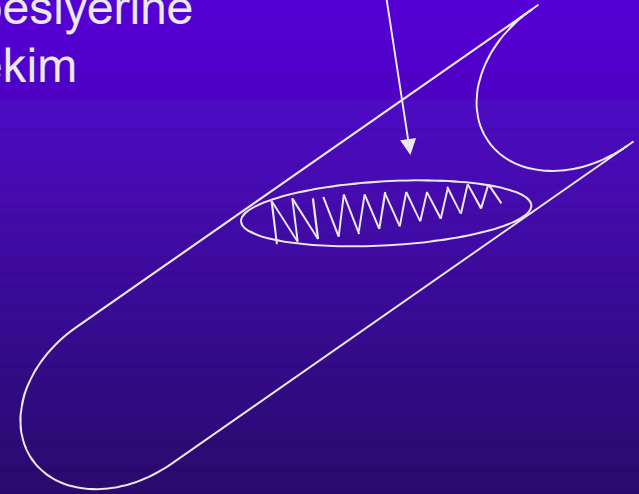
inkübasyon



Öze ile tek koloni  
Seçimi ve yatık  
besiyerine  
ekim



İnkübasyon



Saf kültür

Petrideki katı besiyeri yüzeyine  
özeye ekim



# Bakterilerin boyanması

Boyama için,

1. preparat hazırlanır. İncelenecek maddeden sıvı ve katı besiyerinden alınan örnek temiz kuru bir lam üzerine yayılır. Yayma için öze, lam veya lamel kullanılır. Daha sonra lam havada kurutulur.

2. fiksasyon yapılır. Amaç, lam üzerinde kurumuş olan bakterilerin lama yapışmasını sağlamaktır. Böylece boyama esnasında akıp girmezler.

➤ fiziksel fiksasyon (tespit): yüzey üstte kalacak şekilde 2-3 kere bek alevden geçirilir.

➤ kimyasal fiksasyon (tespit): metil alkolde 3 dk bekletilir, kurutulur.

3. boyama yapılır.








a. Bazik boyalar: Bazik boyaların kromofor grubu pozitif yüke sahiptir. Bu tür boyalara katyonik boyalar da denir.

( Örneğin; metilen mavisi bazik bir boyadır ve terkihi tetramethhyl-thionin-chlorhydrate'tır. Bu terkipte tetramethyl-thionin bazı hidroklorik asit ile nötr bir tuz meydana getirecek şekilde birleşmiştir. Tetramethyl-thionin bazı renklidir ve metilen mavisi boyasına rengini verir, anion kökü olan hidroklorik asit ise renksizdir.)

Bismarck brown y, crystal violet, methyl green , pararosanilin ( basic fuchsin, safranin), resorcin blue diğer bazik boyalara örnek verilebilir. Bir doğal boya olan hematoksilen de bazik boya tarzında davranır. Bakterilerin yüzeyi negatif olduğu için ayrıca DNA'da bulunan fosfatların da negatif yüklü olması nedeniyle katyonik özelliğe sahip olan bazik boyalarla boyanırlar.



b. Asid boyalar : Asid boyaların boyayıcı kısımları negatif elektriksel yüke sahiptir. Bu tür boyalara anyonik boyalar da denir. Asitik boyalar zemini boyamak için kullanılmaktadır.

Örneğin; sodium eozinat da eozinat negatif yüklü olup kromofor özelliğindedir. Diğer asidik boyalara acid fuchsin, anilin blue, kongo red, fast green, light green, erytrosin, orange G, acid pikrik, Phyloxine, alizarin red S, çini mürekkebi, nigrosin, malaşit yeşili gibi boyalar örnek gösterilebilir.

c. Nötr boyalar: Nötr boyalar iyonik olmayan boyalardır. Bunlar suda çözünen renkli organik bileşiklerdir. Burada nötr tuzu meydana getiren asid ve bazın her ikisinde renklidir. Hematoloji ve mikrobiyolojide sık kullanılan bu boyalara Giemsa boyası en güzel örnektir. Bu boyalar parazitlerin incelenmesinde , rikettsiya ve klamidyaların boyanmasında kullanılmaktadırlar. Wright ve Leisman boyalarında bu tip boyalara örneklerdir.





Metilen mavisi ile boyama: preparat üzerine metilen mavisi boyası dökülür. Boya konsantre ise 1 dk, 1/10 dilüe ise 10 dk beklenir. Yıkanır ve kurutulur. Boyanan hücreler mavi renkte görünür.

Gram boyama: bakterileri ve hücrenin kısımlarını ayırmak için kullanılır. 1884 yılında Danimarkalı Hans Christian Gam tarafından geliştirilmiştir.

- istenen preparat lam üzerine hazırlanır, kurutulur ve fikse edilir.
- üzerine kristal viyole boyası dökülür , 90 saniye beklenir.
- çeşme suyu ile yıkanır, lugol boyası dökülür ve 90 saniye beklenir.
- etil alkol ile 10 saniye dekolorize edilir.
- safranin dökülür ve 90 saniye beklenir.
- su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile incelenir.



Bakteri hücre yapısı:

a)- Gram pozitif bakterilerin hücre çeperinde Gram negatiflere kıyasla oldukça kalın peptidoglikan tabaka mevcuttur. Bu nedenle aldıkları boyayı alkolle dekolarizasyonda gram negatiflere nazaran daha geç bırakırlar.

b)- Gram pozitif bakterilerin hücre çeperinde karbonhidratlar, gram negatiflerde lipidler fazladır. Karbonhidratlar alkolle dekolarizasyon esnasında dehidratasyona (su molekülü açığa çıkar) uğrar. Porlar iyice büzülür , daralır ve boya dışarı çıkamaz. Lipitler için ise alkol çözücüdür ve hücre çeperinde olan porlar daha çok açılacaktır.

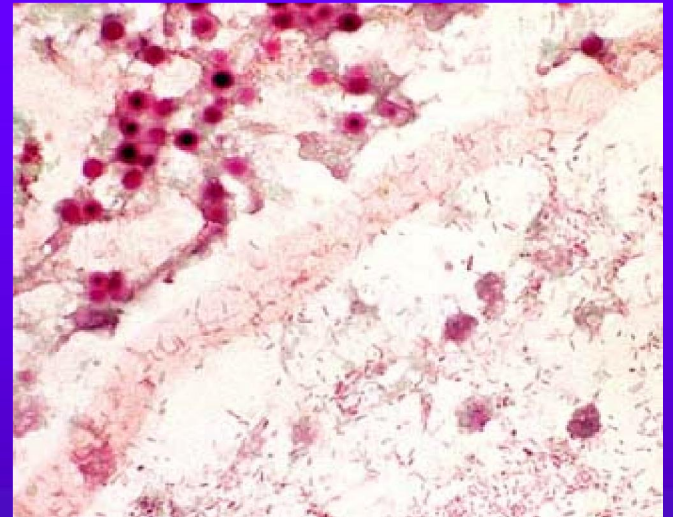
c)- Gram pozitif hücre çeperinde bulunan teikoik asit, bazik boyalarla daha kuvvetli birleşik oluşmasını sağlar.



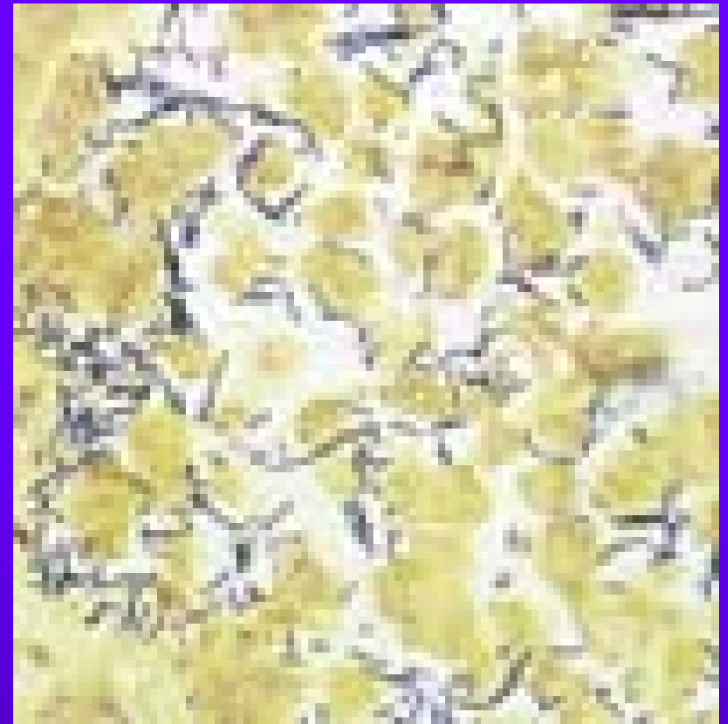
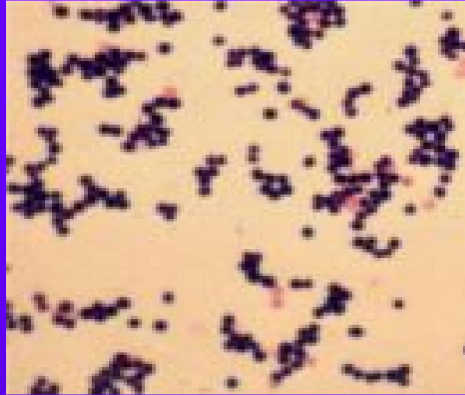
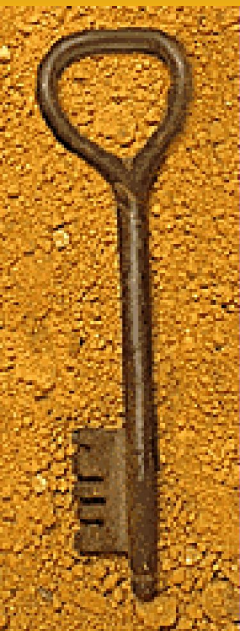
## Gram Boyama Yönteminin Yararları

- 1- Mikroorganizmaları gram pozitif ve gram negatif diye iki ana gruba ayırır.
- 2- Mikroorganizmaların morfolojisi ve dizilimi esas alınarak ön tanı konur. Buna dayanarak nisbeten uygun bir antibiyotik seçilir, izolasyon için uygun besiyeri seçimi yapılır.
- 3- Örneğin usulüne uygun olup olmadığı hakkında bilgi verir.

Gram-negative bacilli (red rods) are present.







Gram-pozitif koklar

## Giemsa Boyama Yöntemi

Giemsa daha çok parazitolojik inceleme amacıyla kullanılır. Kalın damla ve ince yayma preparatların boyanmasında kullanılır.

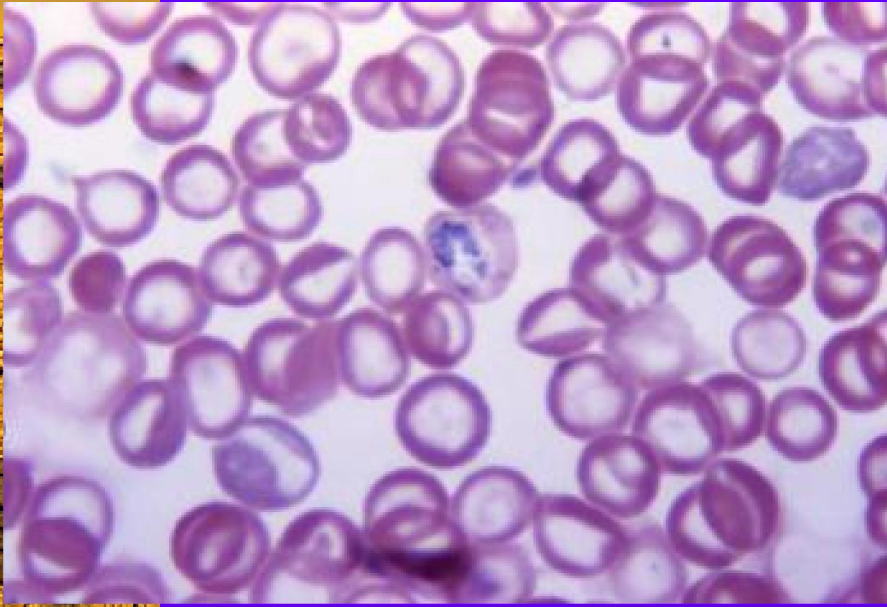
Giemsa genel olarak stok çözelti halinde bulunur. Boyama yapılırken sulandırma yapılır. 1ml sulandırıcı + 1 damla stok Giemsa ile sulandırılır.

İnce yaymada eritrositlerin içindeki parazitleri görmek için boyamaya geçilmeden metanolle tesbiti gerekir. İnce yaymada 30 dakika boyama yeterlidir.

Kalın damlada ise preparata Giemsa ile boyamadan önce distile su damlatılarak eritrositlerin parçalanması sağlanır. Ya da doğrudan Giemsa ile boyanır. Kalın damla preparatlarda amaç eritrositlerin parçalanıp hücre içindeki parazitlerin dışarı çıkmasını sağlamak olduğundan preparatlar tespit edilmez.

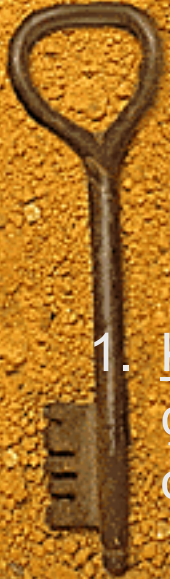


## Giemsa Boyama





# Mikroorganizmaların fizyolojik karakterleri



1. Katalaz aktivitesi: bu enzim aerobik mikroorganizmaların büyük çoğunluğunda mevcuttur. Bu enzim  $H_2O_2$  yi parçalayıp, su ve oksijen çıkışına neden olur.



Petride üremiş saf koloniden lamın üstüne alınır. Üzerine % 3 lük  $H_2O_2$  damlatılır. Gaz kabarcıkları çıkıyorsa katalaz +, çıkmıyorsa katalaz – dir.



Stafilokok katalaz + dir  
Streptokok katalaz – dir.



2. Jelatinaz aktivitesi: herhangi bir mikroorganizmanın proteaz üretip üretmediğini anlamak için yapılır.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen proteaz, proteinleri belli bölgelerden keserek peptidlere parçalar. Bu peptidler de aminoasitlere parçalanır.

Bunun için nutrient jelatin besiyeri kullanılır. Bakteri ekimi yapılır. 2-3 gün etüvde inkübe edilir. Buzdolabına kaldırılır. Buzdolabında jelatin parçalanmazsa katılık devam eder, fakat jelatin parçalanırsa sivilaşma görülür. Ör, stafilokok, streptokok, pseudomonas proteaz üretirler.

3. Amilaz aktivitesi: mikroorganizmanın amilaz üretip üretmediği, nişasta hidrolizi deneyi ile anlaşılır. Nişasta, iyot molekülleri ile mavi renk verir.

Bunun için nişasta agar besiyeri kullanılır. Bakteri ekimi yapılır. 2 saat etüvde inkübe edilir. İyot çözeltisi:lugol besiyeri yüzeyine dökülür. Parçalanmamış nişasta mavi renk verir, parçalandığı bölgede renk oluşmaz.

#### 4. Hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) üretimi: mikroorganizmaların H<sub>2</sub>S üretip üretmediği kontrol edilir.

Bunun için TSI agar kullanılır. Yatık besiyerine ekim yapılır. Önce yüzeye ekim yapılır, daha sonra öze teli dip kısma ortadan batırılmak suretiyle inokülasyon yapılır. 2 saat 30 derecede inkübe edilir. Bakteri H<sub>2</sub>S oluşturmuşsa besiyerindeki demir ile birleşir ve FeS meydana getirir ve besiyeri siyahlaşır. Aynı zamanda gaz oluşturan bakteri varsa, besiyerinin dip kısmında parçalanmalara oluşur. Aynı zamanda glukoz kullanmışsa dip kısmı, laktoz kullandıysa eğik kısmı kırmızıdan sarıya döner.



# antibiyogram

Hastalıklarla mücadelede kimyasal maddelerin kullanımını 17.yy dan beri devam etmektedir.

Antibiyotiklerin keşfi ile seçici ve etkili tedavi önem kazanmıştır. Bu ilaçlar patojeni öldürürken veya gelişmesine engel olurken, konakçıya ya hiç etkili olmaz veya çok az etkili olur.

Antimikrobiyal etkili ilaçlar mikroorganizmada etki ettikleri yapı ve fonksiyonlara göre genel olarak dörde ayrılır:

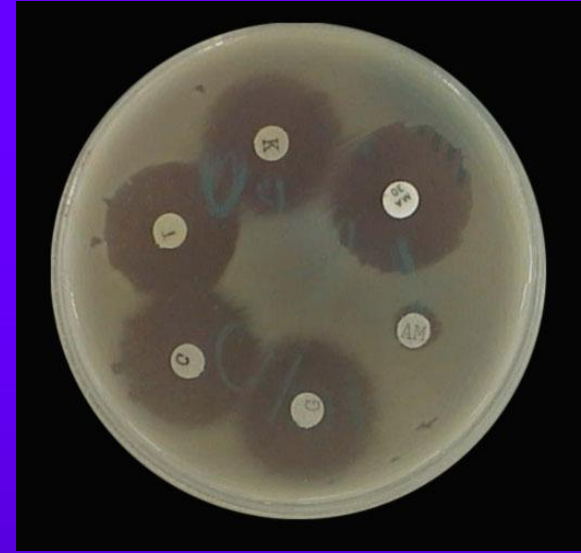
1. Hücre duvarı sentezini engelleyenler
2. Hücre zarının fonksiyonunu bozanlar
3. Protein sentezini inhibe edenler
4. Nükleik asit sentezini inhibe edenler







Antibiyogram için Mueller-Hilton agar besiyeri kullanılır. Besiyeri yüzeyine  $10^9$  hücre/ml yoğunluktaki bakteri süspansiyonu hazırlanıp dökülür, gerekirse steril eküvyonla yayılması sağlanır. Bu besiyerine antibiyotik diskleri steril bir pensle dizilir. Etüvde 1-2 gün inkübe edilir. Bu süre sonunda antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülür ve kaydedilir.



## Sonuçların değerlendirilmesi:

Elde edilen ölçüm sonuçlarından; o bakterinin dirençli, orta derecede dirençli veya duyarlı (hassas) olduğuna karar verilir. Bu yüzden antibiyogramda standart bakteri suşları da incelenmelidir.





Antimikrobiyal etken	Miktar	Dirençli	İnhibisyon zonu (mm)	
			Orta derecede dirençli	Hassas (duyarlı)
Amikacin	10 µg	<12	12-13	>13
Ampicillin	10 µg	<12	12-13	>13
Bacitracin	10 U	<9	9-12	>12
Erythromycin	15 µg	<14	14-17	>17
Gentamicin	10 µg	<13		>13
Penicillin G	10 U	<12	12-21	>21
Streptomycin	10 µg	<12	12-14	>14
Vancomycin	30 µg	<10	10-11	>11

Antibiyotik etkinlik derecesini belirlemede kullanılan değerlere başlıca örnekler



**Laboratuvar analizlerinde  
hata kaynakları**



Rutin laboratuvarlarda her zaman belli oranda hata vardır. Hataları tamamen sıfıra indirmek pek mümkün değildir. Ancak asgariye indirilebilir. Bu hata payı ne kadar düşükse sonuçlar o kadar güvenilirdir.

Hata kaynakları şu şekilde sınıflandırılabilir:

1. numune alınmadan önceki hatalar
2. numune alınırken yapılan hatalar
3. numunenin laboratuvara ulaşımında yapılan hatalar
4. lab.da analize hazırlarken yapılan hatalar
5. analiz hataları
6. sonucu rapor ederken yapılan hatalar
7. sonuçların yorumlanmasındaki hatalar
8. diyalog hataları

# 1. numune alınmadan önceki hatalar

1.1. Testlerin seçiminde hata: Rasgele ve çok sayıda test istemek gereksiz yere lab.ın iş hacmini artırır. Emek ve para israfına neden olur.

1.2. Acil işaretinin acil olmayan vakalarda kullanılması: Bu işaret sadece acil hastalarında kullanılmalıdır. Aksi halde aciliyeti olan hastanın testleri geç çıkar, hayati tehlike oluşturur.

1.3. Hastanın aldığı ilaçlar ve gıdaların oluşturduğu hatalar: Örneğin, tedavi için demir preparatı alan hastada, bu durum dikkate alınmadan demir tayini yapmak gibi.

## 2. numune alınırken yapılan hatalar

2.1. Kirli malzeme kullanılması: Tek kullanımlık malzeme kullanılmayan lab.larda, bu malzemeler çok iyi steril edilmelidir. Özellikle Na, K, Ca gibi analizler için bu çok önemlidir. Temizlik malzemesi olan deterjanın da çok iyi yıkanması gerekir.


2.2. Islak malzeme kullanılması: Hacim değişikliğine neden olduğu için konsantrasyonu etkiler, hemolize neden olabilir.

2.3. Venöz stazla kan almak: Damara girmek için genelde turnike ile staz sağlanır. Bu stazın kan alınırken devam ettirilmesi bazı analizler için sakıncalıdır. Bu sakıncayı önlemek için, turnike kullanılsa bile, kan almadan turnikeyi açıp birkaç saniye gibi bir süre beklenmelidir.

2.4. İnfüzyon yapılan ekstremiteden numune alma hatası: En çok yapılan hatadır. Bu şekilde alınan numunede başta glukoz, Na, K, Cl olmak üzere birçok yanlış sonuç çıkar. Çünkü verilen sıvı dilüe edici etki gösterir. Doğru sonucu yansıtmaz.







Örneğin, bir hastada ameliyat öncesi Na 135 mEq/L, K 4,7 mEq/L, üre 100 mg/dl, total protein 6,7 mg/dl bulunmuş.

Ameliyat sonrası Na 65 mEq/L, K 2,2 mEq/L, üre 52 mg/dl, total protein 5,2 mg/dl, glukoz 500 mg/dl elde edilmiştir. Araştırıldığında hastanın durumunun iyi olduğu, dekstroz verildiği, bu koldan kan alındığı anlaşılmıştır.

2.5. Tamkan, serum, plazma cinsinden uygun numune alamamak: Değişik testler için değişik materyal kullanılır. Antikoagulan kullanılması gerekebilir. Bunun etkisi Ca u uzaklaştırmak olduğu için heparin dışındaki plazmalarda Ca test edilemez. Bazı antikoagulanlar da Na, K, Amonyum tuzu şeklindedir. Bu yüzden bu analizler yapılamaz. Hematoloji tüpü yanlışlıkla biyokimyaya gönderilebilir. Na, K, Ca, Üre gibi sonuçlar yanlış çıkar.

2.6. Aç karnına alınması gereken numunelerin yeterli açlık sağlanmadan alınması: Bu durum AKŞ, total lipit, total kolesterol trigliserit gibi testleri etkiler. Ayrıca tokluk hiperlipidemisi, bir çok test için interfere edicidir. Aşırı açlıklarda hiperlipidemi oluşabilir, o yüzden 14 saatten fazla açlık tavsiye edilmez. 24 saatlik idrar toplamada dikkat edilmelidir. Uygun koruyucu konulmalıdır.

## 3. numunenin laboratuvara ulaşımında yapılan hatalar

3.1. Bekletilmiş numunenin gönderilmesi: Beklemiş kanda glukoz düşer. Çünkü şeker hem kan hücreleri hem de (üreme olursa) mikroorganizmalar tarafından kullanılır. Beklemiş kanda Na, K değişir. K değerleri yüksek çıkar. İdrarda ise üre amonyağa çevrilir.

3.2. İstek formlarının tam olarak doldurulmaması: İstek formlarında doldurulan her hanenin lab. ağısından bir önemi vardır. Eksik doldurulmamalıdır. Örneğin alkalen fosfataz ALP yerine AF diye yanlış yazılabilir.

3.3. Yanlış etiketleme: Çok büyük karışıklıklara neden olur. Hastalar karıştırılır ve yanlış hastanın kanı çalışılır. Yanlış sonuca göre hastaya yanlış ilaç verilebilir. Geri dönüşümü olmayan hatalara sebep olur.

## 4. laboratuvarda analize hazırlarken yapılan hatalar

4.1. Ekipman ve personelin hazır olması: Ön denemeler ve standardizasyon çalışmaları önceden yapılmış olmalıdır. Cihazların kalibrasyonları yapılmış olmalı. Kontroller okutulmuş olmalıdır. Cihazın kitlerini ve çalışan personeli sık sık değiştirmek, hatalara neden olur. Personel seçimi iyi yapılmalıdır.

4.2. Gecikme: Numuneler geciktirmeden çalışılmalıdır.

4.3. Etiketleme hataları: Serumların godeye aktarılmasında, numaralandırmada hata yapmamaya dikkat edilmelidir. Lab.da belli bir etiketleme ve numaralandırma sistemi kurmadan çalışılmamalıdır. Hasta kanları karışabilir.



4.4. Reaktiflerin bayatlaması ve eskimesi: Mümkün olduğunca taze ve doğru hazırlanmış reaktifler kullanılmalıdır. Reaktifin dibine gelindiye çıkan sonuçlara dikkat edilmelidir.

4.5. Solüsyon ve besiyeri hazırlamanın bilinmemesi: Çözelti hazırlama bilinmelidir, yoksa mutlaka sorulmalıdır. Bunları yapmak hangi lab. malzemesinin kullanılacağı bilinmelidir.

4.6. Depolama: Kullanılan kimyasallar, kitler uygun koşullarda saklanmalıdır. Son kullanma tarihi geçmiş olanlar atılmalıdır.

## 5. analiz hataları

5.1. Dürüst olmayan personel

5.2. İyi yetiştirilmemiş personel

5.3. İyi seçilmemiş kitler, iyi hazırlanmamış reaktifler

5.4. Hatalı ölçüm yapan volümetrik kaplar

5.5. Aşırı sıcak ve aşırı soğuk, havalandırılmaz, kimyasal kokan, dar, rahatsız edici lab. ortamı

5.6. Cihazların doğru olarak kullanımı

5.7. Standart grafiklerini uzun süre kullanmak





## 6. sonucu rapor ederken yapılan hatalar

6.1. Numunelerin kabulü ve rapor sekreteryasının kurulmaması: Kayıt defteri tutulmalı, protokol defteri doldurulmalı, bilgisayarlı programla çalışılıyorsa işi iyi bilen personel çalıştırılmalı.

6.2. Analiz değerlerinin ve normal değerlerin rapora kaydedilmemesi: Farklı cihazların normalleri farklıdır, bu belirtilmelidir.



## 7. sonuçların yorumlanmasındaki hatalar

7.1. Bazı fizyolojik farklılıkların göz ardı edilmesi:  
Çocukluk, yetişkinlik, yaşlılık, hamilelik gibi.

7.2. Bölgesel farklılıklar olabileceğini göz ardı etmek.

7.3. Başka lab.ların, başka bölge hatta ülkelerin normal değerleri ile mukayese etmek.



## 8. diyalog hataları

Fikir alışverişinin sağlanması, hasta için en iyi sonucu sağlar. Klinikçi şüpheli gördüğü sonuçları lab.a teyit ettirmeli, gerekirse test tekrarlanmalıdır.

