

ÇM 208 ÇEVRE MİKROBİYOLOJİSİ

LABORATUVAR KİTAPÇIĞI

Dersin Sorumluları:

Yrd. Doç. Dr. Evrim Karaçetin
Arş. Gör. Hamdi Mihçioğru
Arş. Gör. Ömür Gökkuş
Arş. Gör. Taner Azgın

ÇM 208 – ÇEVRE MİKROBİYOLOJİSİ LABORATUVARI

GENEL KURALLARI

Genel Kurallar:

- Derse devam zorunluluğu bulunmaktadır: 2 derse girmeyen **veya** 2 raporunu teslim etmeyen öğrenci dersten devamsızlıktan (NT) kalacaktır.
- Her laboratuvar sonrasında rapor yazılacak ve bu raporlar deney yapıldıktan tam bir hafta sonraki laboratuvar dersinde teslim edilecektir. Geciken rapordan her bir gün için 10 puan düşülür.
- Raporlar gruplar halinde değil, öğrencilerin kişisel çabaları sonucu hazırlanacaktır. En az iki öğrencinin cevabı aynı ise bu sorulara not verilmeyecektir.
- Her ders öncesinde kısa sınav yapılacaktır. Kısa sınavlar önceki hafta konularının tamamını ve o hafta yapılan deney konularını içerir.
- Laboratuvara önlüksüz girilmez. Önlük getirmediği ve dersin ya da başka derslerin hocalarından önlük istediği belirlenen öğrencilerin rapor notu silinecektir.
- Laboratuvar saatinde girmeyen derse alınmayacaktır.

Değerlendirme:

Vize notunun dönem sonu notuna etkisi % 40'dir. Vize notu;

- Dönem ortasına yapılacak Vize Sınavı (% 50)
- Vize sınavına kadar yapılmış olan kısa sınavlardan (%20)
- Vize sınavına kadar teslim edilmiş olan rapor notlarından (%30)
oluşur.

Final notunun dönem sonu notuna etkisi % 60'dir. Final notu;

- Dönem sonunda yapılacak Final Sınavı (% 50)
- Vize-Final arasında yapılmış olan kısa sınavlardan (%20)
- Vize-Final arasında teslim edilmiş olan rapor notlarından (%30)
oluşur.

İÇİNDEKİLER

Laboratuvarda Dikkat Edilmesi Gereken Unsurlar	4
Uygulama No:1 Katı-Sıvı Besiyerleri ve Besiyeri Hazırlama	6
Uygulama No:2 Dilüsyon Hazırlama ve Ekim Yapma	9
Uygulama No:3 Koliform Bakteri Ekimi Yapmak	14
Uygulama No:4 EMB Agar ile <i>E.coli</i> bakteri tayini	16
Uygulama No: 5 En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemiyle Koliform Tayini	18
Uygulama No: 6 Safılaştırma	22
Uygulama No: 7 Basit Boyama – Gram Boyama	27
Uygulama No: 8 Membran Filtrasyon Yöntemi ile mikroorganizmaların tayini	31
Uygulama No: 9 Sporlu Bakteri Analizi	33

LABORATUVARDA DİKKAT EDİLMESİ GEREKEN UNSURLAR

Laboratuvar ortamında dikkatli, temiz ve düzenli çalışmak, doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için birincil şarttır. En az hata içerisinde mümkün olduğunca hızlı deney yapabilmek ancak temiz ve düzenli çalışmanın sonucudur. Bu bölümde bir mikrobiyoloji laboratuvarında nasıl çalışılır kısaca anlatılmaya çalışılmıştır.

1- Laboratuvarda çalışma prensipleri

- Bir mikrobiyoloji laboratuvarının steril koşulları çok önemlidir. Bu sebeple, laboratuvara çanta, palto, hırka, mont gibi malzemeler getirilmemelidir. Laboratuvar dersi sırasında bu malzemeleriniz yan odada kilit altında tutulacaktır. Bu sebeple derse zamanından önce gelip, kişisel eşyalarınızın güvenliğini sağlamak sizin sorumluluğunuz altındadır. Derse geç gelmek ve laboratuvara kişisel malzemelerle beraber girmek kabul edilmeyecektir.
- Laboratuvara kesinlikle yiyecek, içecek gibi malzemeler getirilemez. Özellikle çevre mühendisliği laboratuvarında atık sularla çalışmalar yapıldığı için hem kendi sağlığını hem de deneyin güvenilirliğini tehlikeye sokabilirsiniz.
- Deney yapılan yüzeyler üzerine oturulmaz. Deney süresi 30 dakika ila 1 saat arasında değişecek olup, bu süre zarfında öğrencilerin ayakta durmaları ve deneye katılımları beklenmektedir. Özel bir sağlık sorununuz var ise bu durumu dersin yetkilileri ile öncesinde görüşüp sizin için bir düzenleme yapmalarını rica edebilirsiniz.
- Laboratuvarda bulunan malzemelerin düğmelerine gelişigüzel basmayınız. Bu malzemeler çalışmıyor bile olsalar ayarlı olabilirler. Bu malzemelerin bakım ve kullanımı için gereken özeni göstermeniz beklenmektedir. Dersin sorumlularının sizin için oluşturdukları düzenekler dışındaki malzeme ve kimyasallara dokunmamanız beklenmektedir.
- Uzun saçlar toplanmalı ya da topuz yapılmalı veya yanmaz bone içine alınmalıdır. Ayakkabılar laboratuvarda çalışmaya uygun olmalı, burnu açık ayakkabı ya da sandalet gibi ayakkabıların bu derslerde giyilmemesine dikkat edilmelidir.
- Laboratuvarda çalışırken eller yüze, ağza sürülmemelidir.
- Deney yapan kişiler kendi temizliklerinden sorumludur. Mutlaka deney öncesi ve sonrası eller yıkanmalı, steril eldivenler ele geçirilmeli ve deney sonrasında antibakteriyel sabun ile eller iyice yıkanmalıdır.
- Deney sonrası laboratuvarın temizliğinden öğrenciler sorumludur. Her hafta belirlenen kişiler, araştırma görevlilerinin gözetiminde laboratuvar temizliğini ve bulaşıkların yıkanmasından sorumludurlar.
- Dersin koşulları altında olmasa da, sağlık kontrolleri özellikle mikrobiyoloji laboratuvarında çalışanlar için önemlidir. Hepatit A/B ve C ve tetanoz aşılı olmanız sağlığınız açısından önemlidir.
- Kullanıldıktan sonra malzemeler ve cihazlar, yöntemine uygun bir biçimde temizlenerek kaldırılmalıdır. Örnek olarak hassas terazinin üzerine dökülen toz vs. mutlaka özenle temizlenmeli, o şekilde bırakılmamalıdır.
- Laboratuvara sadece ders saatleri içerisinde girilir. Ders dışında araştırmalar devam ettiği için işi olmayan kişiler dışında giriş engellenmelidir.
- Çalışırken laboratuvar kapı ve pencereleri kapalı tutulmalı, mikroorganizma veya sporlarını etrafa yayacak gereksiz ve ani hareketlerden sakınılmalıdır.
- Kültürlerin yere veya masaya dökülmesi veya kültür kaplarının kırılması halinde durum hemen laboratuvar yöneticisine bildirilmeli ve dökülen kültürün üzeri

anında uygun bir dezenfektan çözeltisi ile kaplanarak (örneğin %10'luk hipoklorit çözeltisi) 15 – 30 dakika bekletilmeli ve daha sonra temizlenmelidir.

- Öze uçları her kullanımdan önce ve sonra bunzen beki alevinde usulüne uygun şekilde yakılarak sterilize edilmelidir.
- Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılacak pipetler, önce ağız kısımlarına pamuk yerleştirilerek sterilize edilmeli ve bu şekilde kullanılmalıdır.
- Kültürün yutulmaması için tüm önlemler alınmalı kültür yutulursa, anında laboratuvar yöneticisine haber verilmelidir.
- Mikrobiyolojik çalışmalarda steril olduğundan kuşku duyulan malzeme kullanılmamalıdır.
- Pipetleme yapılırken kesinlikle üflenmemelidir.
- Etil alkol gibi yanıcı, tutuşucu maddeler bunzen beki alevi çevresinden uzak tutulmalıdır.
- Ellerde kesik, yara ve benzeri durumlar varsa bunların üzeri ancak su geçirmez bir bantla kapatıldıktan sonra çalışılmalı, aksi takdirde çalışılmamalı ve son durum sorumluya iletilmelidir.
- Mikroskopun objektif ve oküler kısmı her kullanımdan önce ve sonra ince mercek kâğıdı ile veya bir tülbent yardımıyla dikkatlice merceğe zarar vermeden temizlenmelidir.
- Laboratuvardan çıkmadan önce mikroskop lambaları kapatılmalıdır. Gereksiz ışıklar söndürülmelidir.
- Laboratuvar terk edilirken bulaşıklar yıkanmalı, tüm kimyasallar güvenlik altına alınmalı, gaz muslukları ana musluktan kapatılmalıdır.
- Çalışma bittikten sonra eller sabunlu su ve gerektiğinde antiseptik bir sıvı ile yıkanmalıdır.
- Kültür ve benzeri materyal laboratuvardan dışarı çıkarılmamalıdır.
- Tüm deney sonuçları için gizlilik esasına uyulmalıdır.

Uygulama No:1

Katı-Sıvı Besiyerleri ve Besiyeri Hazırlama

AMAÇ: Mikroorganizmaların üremesi için gerekli ortamın hazırlanmasıdır.

GENEL BİLGİ

Mikroorganizmaların üremesi, gelişmesi ve çoğalması için gerek duyulan organik ve inorganik maddeleri, sentetik veya doğal olarak içeren ortamlara besiyeri denir. Besiyerleri genelde sentetik, doğal ve yarı sentetik olarak hazırlanır. Besiyerinde canlının üreme ve gelişmesi için; besiyerinin elverişli olmasından başka, besiyerinin kıvamı, hidrojen iyonları yoğunluğu (pH), oksidasyon-redüksiyon potansiyeli ve kültürün yapılacağı ısının uygun olması lazımdır. Bir besiyerinde üretilmiş mikroorganizmaların tümüne kültür adı verilir.

Mikroorganizmalar, beslenme bakımından farklılık gösterdiğinden farklı bileşimde besiyerlere ihtiyaç vardır. Besiyerleri, kullanış yerleri ve amaçlarına göre katı veya sıvı halde belirli bileşimlerde hazırlanırlar. Katı besiyere Agar, sıvı besiyere Broth denir.

Her cins mikroorganizmanın kendine göre değişik besinlere ihtiyacı vardır. Patojen bakteriler, organik maddeleri sentez kabiliyetleri az olduğundan, üremeleri için kompleks besiyerlerine ihtiyaç gösterirler. Besiyerlerinde genelde azot kaynağı olarak, polipeptit, dipeptit ve amino asit ihtiva eden pepton kullanılır. Karbon kaynağı olarak, karbonhidrat gibi parçalanabilen organik bileşiklerden veya havadaki CO₂'ten yararlanırlar. Ayrıca Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, K⁺ gibi metal iyonları içermelidir. Besiyerlerinde canlıların üreyebilmeleri için diğer kompleks şartları tam olmasının yanında, fosfor, kükürt, sodyum gibi maddelere ve bazı amino asitlerin mevcudiyetine ihtiyaç gösterirler. Ticari olarak hazırlanmış sıvı besiyerleri de vardır.

Besiyeri Çeşitleri

Genelde laboratuvarında hazırlanan ve kullanılan üç tip besiyeri vardır:

1- Sıvı Besiyerleri

Bazı besiyerleri sıvıdır. Sıvı besiyerinde bulunan bir bakteri çoğalma özelliğine girer ve ortam şartlarına bağlı olarak uzunca bir zaman ölmeden kalırlar. Sıvı besiyerinde üreyen bir bakteri buradaki lüzumlu maddeleri kullanır. Ortama metabolizma ürünlerini bırakır. Besiyerinde daha önce bulunmayan bu ürünlerin gösterilmesi bakterinin teşhisine yarar (indol, H₂S teşkili, karbonhidratlardan gaz ve asit teşkili gibi). Bakteri sıvı besiyerinde homojen bir bulanıklık meydana getirerek üreyebileceği gibi dipte çöküntü veya yüzeyde zar teşkil ederek de üreyebilir. Sıvı besiyerlerine "Buyyonlu Besiyerleri" adı da verilir.

2- Katı Besiyerleri

Katı besiyerine ekilen bakteri ancak ekildiği yerde ürer ve koloni teşkil eder. Meydana gelen koloniler, bakterinin türüne göre özellik gösterirler. Katı besiyerine yaymak suretiyle bakteri hücrelerine ayırmak ve meydana getirdikleri kolonileri ayrı ayrı elde etmek (yani saf kültürlerini) mümkündür.

Katı besiyerine besin kıymetini değiştirmeyen bir madde ilavesiyle elde edilir. Bunun için en fazla jeloz (agar) kullanılır. Bundan dolayı katı besiyerlerine jelozlu besiyerleri de denir. Agar, " Agar agar " adındaki bir deniz yosunundan elde edilir. Jelatin ilavesi ile de katı besiyeri elde edilir.

3- Özel Besiyerleri

Mikrobiyoloji laboratuvar çalışmalarında kullanılan birçok besiyeri vardır. Bazen benzer deneyler için bile farklı besiyerleri kullanılmaktadır. Çoğunlukla özel amaçlar için hazırlanıp

kullanılan besiyerlerine özel besiyerleri adını veriyoruz. Mesela zenginleştirilmiş, tecrit, ettirici besiyerleri gibi.

Besi Yerinin Sahip Olması Gereken Özellikler

- Uygun miktarda su bulunmalı yani su aktivitesi yüksek olmalı.
- Mikroorganizmaların gereksinimini karşılayacak kolayca kullanılabilir besin maddeleri içermeli,
- Uygun asit-baz (pH) dengesine sahip olmalı,
- Berraklık, katılık gibi fiziksel özellikleri elverişli olmalı,
- Osmotik basıncı, oksidasyon/redüksiyon (indirgenme/yükseltgenme) potansiyeli mikroorganizmalara uygun olmalı,
- Mikrobiyolojik anlamda steril olmalı, sterilizasyon kontrolü yapılmalı.
- Ekim öncesi sterilizasyon hazırlığı ve sterilizasyon uygulaması titizlikle uygulanmalı,
- Dış ortamdan mikroorganizma kontaminasyonunun önlenmesi için özel kaplarda hazırlanmalı ve saklanmalı.

DENEY

Deneyin amacı farklı besiyerlerinin hazırlanma sürecini ve bu besiyerlerinin kullanım amaçlarını öğrenmektir. Bu deneyde PDA, VRBGA ve McConkey besiyerleri hazırlanacak olup, hem hazırlanış sürecine hem de besiyerlerinin özelliklerine dikkat edilmesi gerekmektedir.

PDA besiyeri hazırlanması:

- 1- 3,9 gram PDA tartarak 100 ml'lik kapaklı cam şişeye ekleyin.
- 2- Üzerine 100 ml saf su ekleyin.
- 3- 10 dakika bekletin ve sonrasında karıştırın.
- 4- Otoklavda 121°C'de 15 dakika sıvı sterilizasyon modunda sterilize edin.
- 5- Sterilizasyon tamamlandıktan hemen sonrasında otoklavdan çıkartarak petri kaplarına boşaltın.

VRBGA besiyeri hazırlanması:

- 1- 3,9 gram VRBGA tartarak 250 ml'lik erlene ekleyin.
- 2- Üzerine 100 ml saf su ekleyin.
- 3- 10 dakika bekletin ve sonrasında karıştırın.
- 4- Saç ayak ve bunzen beki üzerinde kaynayıncaya kadar karıştırarak ısıtın. Taşmamasına özen gösterin.
- 5- 47°C'ye soğuttuktan sonra petri kaplarına aktarın.

McConkey besiyerinin hazırlanması:

- 1- 3,5 gram MacConkey Broth tartıp 100 ml suyun içerisine ilave edin.
- 2- Karıştırdıktan sonra 10'ar ml alarak tüplere koyun ve alüminyum kapaklarla kapatın.
- 3- Otoklavda 121°C'de 15 dakika sıvı sterilizasyon modunda sterilize edin.

SORULAR

A- Araştırma Soruları:

- 1- PDA'nın açılımı nedir, hangi tür mikroorganizmalar için kullanılmaktadır?
- 2- Bazı durumlarda PDA içerisine laktik asit eklenir. Bunun amacı nedir?
- 3- VRBGA'nın açılımı nedir, pH aralığı nedir ve hangi tür mikroorganizmalar için kullanılmaktadır?
- 4- MacConkey Broth hangi amaçlarla kullanılır, içerisindeki Bromokresol moru'nun işlevi nedir?

B- Deney Soruları:

- 1- Laboratuvarda oluşturduğunuz PDA ne renktedir, neden?
- 2- VRBGA ne renktedir? Bu agarın bu renkte olmasının sebebi nedir?
- 3- MacConkey Broth ne renktedir? Bu besiyerinin bu renkte olmasının sebebi nedir?
- 4- Bu üç besiyerinin hazırlanması sürecindeki farklılıklar nelerdir, sebepleriyle kısaca açıklayın.

Uygulama No:2

Dilüsyon Hazırlama ve Ekim Yapma

AMAÇ: Sıvı ve katı örnekler ile hazırlanan bir süspansiyondaki canlı mikroorganizmaların uygun besiyerinde üretilmesi, incelenmesi ve sayılarının belirlenmesidir.

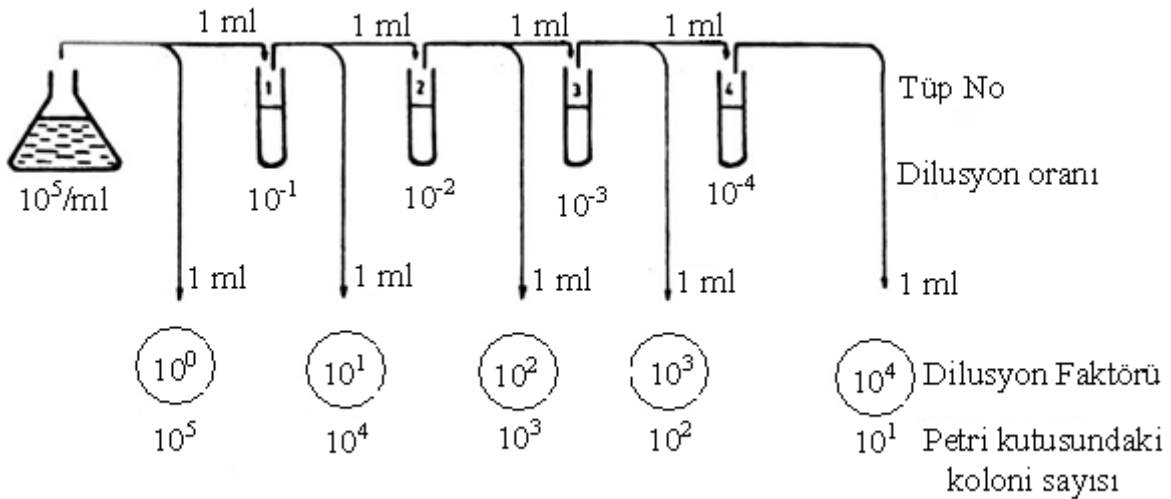
GENEL BİLGİ

Dilüsyon (Seyreltme)

Dilüsyon, seyreltme işlemidir. Mikroorganizma sayısı yüksek olan örnekte sayım yapmak için kullanılır. Toprak, su vb. örneklerde mikroorganizma yükü fazla ise koloniler seyreltilir. Seyreltmedeki amaç mikroorganizmaların aşırı üreyerek fazla sayılara ulaşmasını engellemek ve sayım işlemlerinde kolaylık sağlamaktır.

Bir gram yoğurtta 108 adet canlı bakteri olduğu varsayılırsa, 1 g yoğurdun doğrudan Petri kutusuna alınması halinde 108 tane koloni oluşacaktır. Aynı şekilde atıksular, içerdiği organik madde sebebiyle çok fazla mikroorganizma barındırır ve buradan alınan 1 ml örnek bile sayılamayacak kadar çok bakterinin besi yerinde üremesine sebep olur.

Bu kadar fazla sayıda koloninin petri kutusunda sayılması olanaksızdır. Bu gibi canlı mikroorganizma sayısı yüksek olan örneklerde sayım, dilüsyon (seyreltme) tekniği ile yapılır. Dilüsyon tekniğinin esası, materyaldeki hücre sayısını bir seri seyreltme yaparak kademeli bir şekilde azaltmaktır. Bu amaçla genellikle 1:9 (10 misli) oranında seyreltme yapılır. Şekilde yöntemin prensibi basit olarak gösterilmiştir.



Materyalin 1 ml'sinde 50.000 canlı hücre olduğunu varsayalım. İçinde 9 ml steril fizyolojik tuzlu su (FTS: % 0,85 NaCl içeren destile su) bulunan 1 nolu tüpe materyalden 1 ml aktarılır. Bu tüp içindeki FTS, steril olduğu için canlı hücre sayısı 0'dır. 1 ml materyal aktarıldığında 1 nolu tüpteki toplam hacim $9 + 1 = 10$ ml olur. Materyalin her 1 ml'inde 50.000 canlı hücre olduğuna göre bu tüp içinde 50.000 canlı hücre olacaktır.

Aktarım sonunda 1 nolu tüpteki 10 ml içinde 50.000 canlı hücre, bir diğer deyişle bu tüpteki her 1 ml içinde $50.000 / 10 = 5.000$ adet canlı hücre bulunacaktır. Görüldüğü gibi 1 nolu tüpteki

canlı hücre sayısı materyale göre 10 kez azalmıştır. 1 nolu tüpün her 1 ml' sinde 5.000 adet canlı hücre bulunduğuna göre bu tüpten içinde yine steril 9 ml FTS bulunan 2 nolu tüpe 1 ml aktarıldığında, bu kez 2 nolu tüp içinde $9 + 1 = 10$ ml; $5.000 \text{ adet} / 10 \text{ ml} = 500 \text{ adet} / \text{ml}$ canlı hücre olacaktır. 2 nolu tüpten 3 nolu tüpe yine 1 ml aktarıldığında, 3 nolu tüpte $500 \text{ adet} / 10 \text{ ml} = 50 \text{ adet} / \text{ml}$ canlı hücre bulunacaktır.

Bu şekilde 1 nolu tüp, materyale göre 10 kez; 2 nolu tüp 1 nolu tüpe göre 10 kez, materyale göre 100 kez; 3 nolu tüp ise materyale göre 1000 kez daha az sayıda canlı hücre içerecektir.

Dilüsyonda Kullanılan Çözeltiler

Dilüsyon sırasında kullanılan çözeltinin canlı mikroorganizma sayısını azaltacak ya da artıracak kimyasal maddeleri içermemesi gerekir. Bu düşünce altında, dilüsyonda kullanılması için ilk akla gelen çözelti destile sudur. Bununla beraber, destile su ozmotik basınç farklılığı nedeni ile canlı hücrelerin ölmesine yol açabilir.

Dilüsyonda en yaygın olarak kullanılan çözelti % 0,85 NaCl içeren fizyolojik tuzlu sudur (FTS). FTS 'nin ozmotik basıncı mikroorganizmaların ozmotik basıncına eşit ya da çok yakındır. % 0,85 NaCl yerine % 0,9 oranı ile de FTS hazırlanabilir.

FTS 'nin dışında % 0,1 'lik peptonlu su, % 2 'lik sodyum sitratlı su, ringer çözeltisi, tamponlanmış fosfat çözeltisi de kullanılabilir. Bunlardan peptonlu su, oda sıcaklığında uzun sürede mikroorganizmaların gelişmesine neden olabilir. Bu nedenle, dilüsyonda peptonlu su kullanıldığında ilk dilüsyon ile petri kutularına ekim arasında 20 dakikadan fazla süre geçmemesi gerekir. Dilüsyonda yaygın olarak kullanılan çözelti ise Ringer Çözeltisidir. Sodyum klorür, potasyum klorür ve kalsiyum klorür içeren izotonik fizyolojik çözelti, uzun süre örneklerin üremeden tutulabilmesi için kullanılır.

Dilüsyonların hazırlanmasının ardından örneklerin besiyerlerine ekimi yapılır. Ekim yöntemleri mikroorganizmaların çeşidi, yapısı ve ihtiyaçlarına göre değişiklik gösterir.

Ekim Yöntemleri:

1- Damla Yöntemi: Bu yöntemde ekim işlemi, petri kutusuna önceden dökülmüş, katılaştırılmış ve belirli düzeyde kurutulmuş besiyerine örneklerin damlatılması ile gerçekleştirilir. Ekim işlemleri genellikle $10-100 \mu\text{l}$ örnek hacimler ile gerçekleştirilir. Bu yöntem **aerob ve fakültatif anaerob** mikroorganizmalar için uygundur. Besiyeri önceden hazırlanıp daha sonra ekim yapılacağı zaman kullanılabilir. Düşük sayıda mikroorganizma taşıyan örneklerde doğru sonucu vermeyebilir. Ancak bir petri kabına birden fazla örneği ekebilme şansını verdiği için ekonomiktir. Bu yöntemin rutin analizlerde kullanımı yaygın değildir.

2- Yayma Yöntemi: Bu yöntemin esası, önceden petri kaplarına dökülüp katılaştırılmış ve belirli düzeyde kurutulmuş besiyerleri üzerine $100 \mu\text{l}$ örnek aktarılarak drigalski spatülü ile aktarılan örneğin besiyerine yayılmasıdır. Bu yöntem **aerob ve fakültatif anaerob** mikroorganizmalar için uygundur. Bu yöntemin dezavantajı her dilüsyon için farklı petri kabı kullanılmasıdır. Genellikle mikrobiyoloji laboratuvarlarında en yaygın olarak kullanılan yöntem yayma yöntemidir.

3- Dökme Yöntemi: Önce örnek alınır ve dilüsyon yöntemlerini kullanarak gereken seyreltili elde edilir. Seyreltilmiş örnekten 1 ml alınır ve steril petri kaplarına aktarılır. Yaklaşık 15 ml 47C 'deki besi yeri bu örneğin üzerine dökülür ve petri kabı hareket ettirilerek agarın eşit dağılması sağlanır. Petri kabının kapağı kapatılarak dinlenmeye bırakılır. Bu yöntemin diğerlerinden farkı,

Önce örneğin ardından besi yerinin eklenmesidir. Bu özellikle **fakültatif anaerob** bakteriler için kullanılan bir yöntem olup, oksijenin azlığında gelişebilen mikroorganizmaların üretilmesinde kullanılabilir. Dezavantajı besiyerinin önceden hazırlanamamasıdır.

Sayım:

İstatistiksel bir kural olarak dökme ve yayma kültürel sayım yöntemlerinde bir petri kutusundaki koloni sayısının 30 -300, damla kültür yönteminde koloni sayısının ise her damlada 10 -30 arasında bulunması gerekir.

Sayım yapılırken çoğunlukla 300'ün altındaki koloni sayısı olan örnekler sayılır. Bir petride 300'ün üzerinde koloni bulunmaktaysa, o koloninin bulunduğu petri değil dilüsyonun daha da seyrek olduğu çözeltideki mikroorganizmalar sayılır.

Hesaplama:

Hesaplama yapılırken petriye aktarılan örnek miktarı çok önemlidir.

Örnek: Yayma yöntemi kullanılarak 10^{-5} dilüsyonundan $100 \mu l$ örnek alındı ve petri üzerine yayıldı. Üç paralel halinde yapılan bu işlemde elde edilen koloni sayısı 45, 50 ve 55 idi. Bu örneğin 1 ml'sinde kaç tane mikroorganizma bulunur?

Cevap:

Dilüsyon: 10^{-5} , alınan örnek miktarı: 0.1 ml, bulunan koloni sayısı: 45,50,55

1- Önce kolonilerin ortalaması alınır: $(45+50+55)/3=50$

2- 10^{-5} 'lik dilüsyon'da 50 koloni bulunduğuna göre, hiç seyreltme olmadığında ne kadar mikroorganizma olduğu hesaplanır:

$$\text{Seyreltme yokken kaç m/o bulunuyor: } 50 \times 10^5 = 5.000.000$$

3- İlk başta alınan örnek miktarına bakılır: 0.1 ml örnek alındığı için, 0.1 ml'de 5.000.000, 1 ml örnekte ise 50.000.000 m/o olduğu bulunur.

DENEY

Deneyin amacı farklı dilüsyon çözeltilerinin hazırlanması sürecini, seyreltme işlemini ve ekim yapma yöntemlerini gözlemlemektir.

Ringer Çözeltisinin Hazırlanması:

- 1- 1 adet Ringer Tablet 500 ml suda çözülür.
- 2- Her bir test tüpüne 9 ml Ringer Çözeltisi aktarılır.
- 3- Ringer Çözeltisi içeren bu tüpler otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

Paradaki mikroorganizmaların damla ve yayma yöntemleri ile ekimi:

- 1- 1 adet para behere konularak üstüne 10 ml steril su eklenir.
- 2- 5 dk. bekledikten sonra, bu paranın bulunduğu sudan 1 ml alınarak 9ml'lik Ringer çözeltisi içeren tüplerden birine aktarılır (10^{-1}).
- 3- Bu ilk tüp vorteksle karıştırıldıktan sonra, bu tüpten alınan 1ml çözelti, 9ml'lik Ringer çözeltisi içeren başka bir tüpe aktarılır (10^{-1}). Vorteksle karıştırıldıktan sonra, bu işlem devam ettirilerek 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} çözeltileri hazırlanır.
- 4- Damla (10µl) ve yayma yöntemleri (0,1ml) kullanılarak PCA besiyerleri üzerine ekim yapılır.
- 5- Besiyerleri 37°C'de 24 saat bekletilir ve besiyerinde oluşan koloniler sayılır.
- 6- Hesaplama yöntemi kullanılarak paranın bulunduğu suyun 1 ml.'sinde kaç tane koloni bulunduğu hesaplanır.

Topraktaki mikroorganizmaların dökme yöntemi ile ekimi:

- 1- Getirilen toprak örneği tartılır, 1 gram toprak üzerine üstüne 10ml steril suyun içine eklenir. Bu çözeltiden 1 ml alınıp, dilüsyon yöntemlerini kullanarak 10^{-5} ve 10^{-6} olarak seyreltilir.
- 2- PCA besiyeri bir önceki deneyde anlatıldığı gibi hazırlanır.
- 3- Bu sırada 10^{-4} dilüsyonlarından alınan 1 ml.'lik örnek steril petri kaplarına aktarılır.
- 4- 47°C 'ye soğutulmuş besiyeri üzerlerine yavaşça dökülerek petri soğumaya bırakılır.
- 5- Besiyerleri 37°C'de 24 saat bekletilir ve besiyerinde oluşan koloniler sayılır.
- 6- Hesaplama yöntemi kullanılarak toprağın 1 gramında kaç tane koloni bulunduğu hesaplanır.

Havadaki mikroorganizmalardan aşılama:

- 1- PCA ya da NA içeren petri kutusunun kapağı açılarak 5 dk. açık bırakılır. Böylece havadaki mikroorganizmaların agar üzerine düşmeleri sağlanır.
- 2- Besiyeri 37°C'de 24 saat bekletilir ve besiyerinde oluşan koloniler sayılır.

Parmak, Elbise, Anahtar, Para vb. Materyalden aşılama:

Petri kutusunun kapağı çok az açılarak, (PCA ya da NA) agara parmakla hafifçe bastırılarak dokunulur veya elbise agar üzerine dokundurulur. Aynı şekilde agar üzerine diğer maddeler de dokundurularak üzerinde barındırdığı mikroorganizmaların agara geçmesi sağlanabilir.

SORULAR

- 1- Paranın bulunduğu suyun 1 ml.'sinde kaç tane koloni bulunmuştur. Hesaplamaları detaylı olarak gösteriniz.
- 2- Toprağın bulunduğu suyun 1 ml.'sinde kaç tane koloni bulunmuştur. Hesaplamaları detaylı olarak gösteriniz.
- 3- Havadan aşılama yapıldığında petri kabınızda kaç koloni oluştu?
- 4- Parmak,elbise vs. gibi aşılamaı hangi besiyerlerinin üzerinde yaptınız? Her birinin sonuçları nelerdir?
- 5- Yaptığınız tüm deneylerin sonuçlarını kıyaslayınız. (Aşılama yöntemleri ve aşılanan materyaller sonucunda elde edilen koloni sayısı ve mikroorganizmaların çeşitleri açısından)

Uygulama No:3

Koliform Bakteri Ekimi Yapmak

Amaç: Su kalitesinin belirlenmesinde önemli faktör olan, sıcakkanlı hayvan bağırsağında yaşayan bakterinin neden olduğu, insan sağlığı için tehlike oluşturan, varlığının ve derecesinin saptanmasıdır.

GENEL BİLGİ

Koliform grubu bakteriler, Enterobacteriaceae familyası içinde yer alan, fakültatif anaerob, gram negatif, spor oluşturmeyen, 37°C' de 24 - 48 saat içinde laktozdan gaz ve asit oluşturan, çubuk şeklindeki bakterilerdir. Bu grupta yer alan ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan mikroorganizmalar; *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'dir.

Koliform grup mikroorganizmalara pek çok gıda hammaddesinde rastlanmaktadır. Bunların başında; taze sebzeler, taze yumurta, çiğ süt, kanatlı etleri ve koliform bakımından sayıca zengin suların alınmasıdır. Gıdalarda koliform mikroorganizmaların bulunması; kötü sanitasyon koşullarının, yetersiz veya yanlış pastörizasyon uygulamalarının, pişirme ve pastörizasyon sonrası tekrar bulaşma olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Koliform grubu mikroorganizmaların hepsi dışkı kökenli değildir. Bu grupta bulunan bakterilerden normal florası insanların ve sıcakkanlı hayvanların alt sindirim sistemleri olanlar "**fekal koliform**" olarak tanımlanmakta ve bunlar fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmektedirler. Koliform grup içinde fekal koliform olarak tanımlanan bakterilerin büyük çoğunluğunun *E. coli* olduğu bilinmektedir. Grubun diğer üyeleri toprak ve bitki kökenli olabilmektedirler. Herhangi bir örnekte *E. coli*'ye ve/veya fekal koliform bakterilere rastlanması oraya doğrudan ya da dolaylı olarak dışkı bulaştığının ve yine bağırsak kökenli *Salmonella* ve *Shigella* gibi primer patojenlerin de olabileceğinin bir göstergesidir. Bu nedenle hiçbir gıda maddesinde, içme ve kullanma sularında, denizlerde ve göllerde *E.coli* ve fekal koliform bulunmasına izin verilmezken, bazı gıdalarda belirli sayıda koliform bakteri bulunmasına izin verilebilmektedir.

E. coli fekal kontaminasyonun bir göstergesi olması yanında genetik yapısı en iyi bilinen canlı olma özelliğine de sahiptir. Bu bakterinin bazı patojenik tipleri, insan ve hayvanlarda sonucu ölüme kadar giden ishaller, yara enfeksiyonlarına, menenjit, septisemi, arteriosklerosis, hemolitik üremik sendrom, çeşitli immünolojik hastalıklar vb. gibi hastalıklara sebep olabilmektedir.

Analiz Yöntemleri

Bir gıda maddesinde ya da herhangi bir materyalde *E. coli* aranma ve sayılması için kullanılan tüm standart yöntemler koliform grup aranmasına yöneliktir. Bu yöntemler; en muhtemel sayı (EMS) yöntemi, katı besiyeri kullanılan yöntemler, membran filtrasyon yöntemi ve hızlı sayım yöntemleri olarak gruplandırılmaktadır. Pek çok kuruluş tarafından koliform grup ve *E. coli* aranmasında standart yöntem olarak EMS yöntemi gösterilirken, özellikle izolasyon amaçlı sayım çalışmalarında katı besiyeri kullanılmaktadır. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan besiyeri Violet Bile Red (VRB) Agardır. Bu besiyerinde sayım yapılırken yayma, dökme ve çift tabaka dökme plak yöntemleri uygulanmaktadır.

VRB Agar besiyerine alternatif olarak Petrifilm VRB yöntemi de kullanılabilir. Bu yöntemde göre VRB Laktoz Agar besiyeri kullanılması önerilmektedir. Besiyeri bileşiminde katılaştırıcı ajan olarak agar yerine soğuk suda çözülebilen bir madde kullanılmaktadır. Bileşenler kurularak üzeri plastik film ile kaplanmış halde kullanıma hazır olarak satılmaktadır. Yönteme göre seyreltiden veya direkt örnekten 1 ml alınarak besiyeri üzerine ilave edilir. Plastik film üzerine basınç uygulanarak örneğin 20 cm² alana yayılması sağlanır. 32 ± 1°C 'da 24 ± 2

saat inkübasyondan sonra, etrafında bir veya daha fazla gaz kabarcığı görünen koloniler koliform olarak sayılır. Burada ister koliform olsun ister başka bir tür kolonilerin kırmızı renkli olacağı unutulmamalıdır.

E. coli sayımında katı besiyeri olarak Triptik Soy Agar (TSA) besiyeri de kullanılmaktadır. Dökme plak yöntemi ile hazırlanan petri kutuları 35 °C 'de 2 saat inkübasyondan sonra besiyerinin üzeri ikinci tabaka olarak VRB Agar ile kaplanmakta ve inkübasyona 44,5 °C 'de

DENEY

VRBGA besiyeri hazırlanması ve dökme yöntemi ile ekim yapılması:

- 1- 3,9 gram VRBGA tartarak 100 ml'lik erlene ekleyin.
- 2- Üzerine 100 ml saf su ekleyin.
- 3- 10 dakika bekletin ve sonrasında karıştırın.
- 4- Saç ayak ve bunzen beki üzerinde kaynayıncaya kadar karıştırarak ısıtın. Taşmamasına özen gösterin. Kaynadıktan sonra soğumaya bırakın.
- 5- Bu sırada dört farklı steril petri kabına, peynirden, sütte, topraktan ve atık sudan hazırlayacağınız dilüsyonlardan 1 ml ekleyin.
- 6- VRBA besiyeri yaklaşık 47°C'ye soğuduktan sonra, içinde örnekler bulunduğu petri kaplarına aktarın.
- 7- 37°C 24 saat inkübe ettikten sonra, kolonileri inceleyin. Sayılarını hesaplayın.

SORULAR

1. Neden koliform analizi yaparken dökme yöntemi kullandık. Bu yöntemin koliform grubunda uygulanmasının getirdiği avantaj nedir?
2. Petrileri inceleyin ve gözlemlediğiniz petrilerdeki bakteri kolonilerini çizin. Bu kolonilerden hangileri koliform bakteri grubundandır? Farkları açıklayın.
3. Her örnekte (peynir, süt, toprak, atık su) kaç tane koliform bakteri çıktı. Bu örneklerin değerlerini kıyaslayın ve sayılarını açıklayın. Peynir ve sütte koliform çıkması normal midir? Açıklayın.

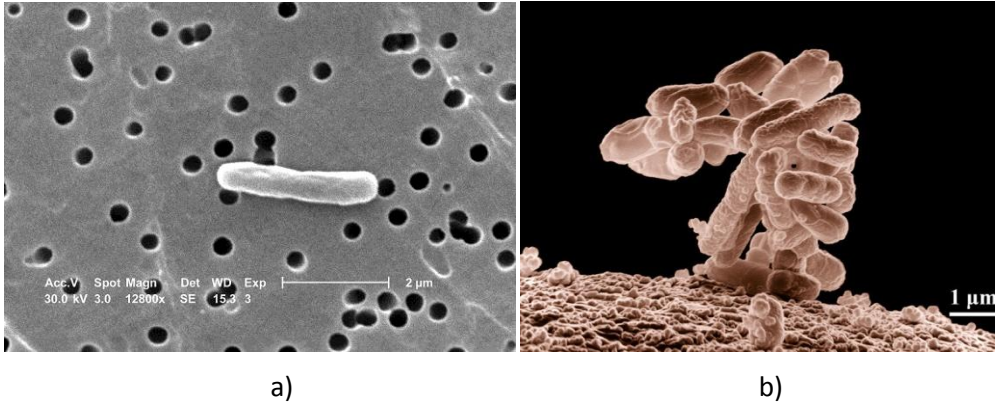
Uygulama No:4

EMB Agar ile *E.coli* bakteri tayini

Amaç: Koliform bakteri grubundan mikroorganizmaların EMB Agar yöntemi ile tayini.

GENEL BİLGİ

E. coli veya koli basili olarak bilinen *Escherichia coli* memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşayan bakteri türlerinden biridir. Normal koşullarda bağırsakta yaşadığı için *E.coli*'nin sularda varlığı dışkı kirlenmesinin belirteçidir. Biyolojik sınıflandırmada bağırsaklarda yaşayan bakterilerden oluşan enterik bakteriler ailesinde yer alır. Çubuk şeklinde olup 1-2 µm uzunluğunda ve 0,1-0,5 µm çapındadır. Rengi metalik yeşildir. *E.coli* gram (-) bir bakteri olduğundan endospor oluşturmaz ve pastörizasyon ve kaynatma ile ölür. En uygun çoğalma sıcaklığı 37 °C civarındadır. Su arıtımında *E.coli* arıtma teknolojilerinde baştan beri kirliliğin bir belirteci olarak kullanılmıştır. Su ortamında *E. coli* sayısı patojen bakterilerin sayısından çok daha fazladır, dolayısı ile *E.colin*'nin belirlenmesi daha kolaydır. Bundan dolayı patojen mikroorganizma belirteci olarak kullanılmaktadır. Su kirlenmesini belirlemek için yapılan basit testlerde *E.coli*'ye benzeyen tüm mikroorganizmalar için koliform terimi kullanılır ve pratik nedenlerden dolayı dünyanın pek çok ülkesinde su temizliği ile ilgili standartlar bu koliform sayısına dayandırılmıştır.



a: Bir *Escherichia coli* bakterisinin elektron mikroskopunda görüntüsü. b: Bir *E.coli* bakteri kümesinin elektron mikroskopunda 10.000 kere büyütülmüş görüntüsü.

DENEY

- 1- 3,75 gram EMB agar tartarak 100 ml'lik otoklavlanabilir vidali şişelere ekleyin.
- 2- Üzerine 100 ml saf su ekleyin.
- 3- 10 dakika bekletin ve sonrasında karıştırın.
- 4- Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edin.
- 5- Bu sırada farklı steril petri kaplarına, atık su, içme suyu, musluk suyu ve steril su dilüsyonlardan 1 ml ekleyin.
- 6- Steril olmuş EMB agar yaklaşık 47°C'ye soğuduktan sonra, içinde örneklerin bulunduğu petri kaplarına aktarın.
- 7- Bu sırada aynı örnekleri damla yöntemi ve yayma yöntemi kullanarak önceden hazırlanmış EMB agar içeren petri kaplarına ekleyin.
- 8- 37°C 24 saat inkübe ettikten sonra, kolonileri inceleyin. Sayılarını hesaplayın.

SORULAR

Araştırma soruları:

- 1- Şu ana kadar koliform bakteri grubunun laboratuvar ortamında tayini için hangi yöntemleri kullandınız? Bu bakteri grubu için başka hangi laboratuvar yöntemleri kullanılır, araştırınız.
- 2- *E. coli*'nin canlı vücudundaki rolü nedir? Her *E. coli* bakterisi hastalık yapar mı? *E. coli* ile zehirlenme gerçekleştiğinde ne gibi belirtiler oluşur? Araştırıp ayrıntılı olarak açıklayın.
- 3- İçme sularının arıtımı sırasında, bu tip mikroorganizmaların şehir şebekesine bulaşmaması veya bulaştı ise temizlenmesi amaçlı ne tip çalışmalar yapılır?
- 4- EMB Agar hangi amaçlarla kullanılır? VRBG Agardan farkı nedir? *E. coli* bakterilerinin her iki agarda da ne renkte ve şekilde görülmesi gerekir?
- 5- EMB Agarda bulunan hangi maddeler gram pozitif bakteriler için büyümeyi engelleyici niteliktedir?

Deney soruları:

- 1- Atık su, içme suyu, musluk suyu ve steril su içeren petri kaplarında neler gördünüz? Karşılaştırarak açıklayınız.
- 2- Dökme, yayma ve damlamayla ekim yöntemlerinin sonuçları arasında fark var mıydı? Hangisinde 1 ml başına daha çok mikroorganizma çıktı. Açıklayınız.

Uygulama No: 5

En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemiyle Koliform Tayini

Amaç: En Muhtemel Sayı (EMS) yönteminin kullanılması yoluyla koliform tayini ve sayımı.

GENEL BİLGİ

İçme suları içerisinde organik madde miktarının az olması sebebiyle, koliform grubu bakteriler bulunsa da, bu bakterilerin tespit edilmesi ve sayımı zordur. Damla ve dökme yöntemlerinde örnek içerisinden mikrolitre, mililitre gibi miktarlarda alınan örneklerde mikroorganizma yakalamak ve sayılarını tespit etmek güçtür. Bu sebeple EMS yöntemi kullanarak daha fazla miktarlarda örnek ekilerek sayım yöntemine gidilir.

İçme ve kullanma sularındaki mikrobiyolojik kirliliği belirleme amacı ile genellikle koliform grubu bakterilerden indikatör olarak yararlanır. Koliform grubu aerobik ve fakültatif anaerobik, gram negatif, spor oluşturmeyen çubuk şekilli bakterileri tanımlar. Bunlar laktozu 24-48 saatte, 37°C'de gaz çıkışı ile fermente ederler.

Çoklu tüp fermantasyon tekniğine göre yapılan koliform testi sonuçları, **En Muhtemel Sayı (EMS)** olarak ifade edilmektedir. En muhtemel sayı yöntemi, tüp dilüsyon yönteminin geliştirilmiş şeklidir. Bu yöntemde, materyalden FTS ile standart 1 : 9 oranında dilüsyon yapılır. Dilüsyonlardan uygun sıvı besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra üreme sonuçları kontrol edilerek sayı hesaplanır. Bir diğer deyiş ile tüp dilüsyon yönteminde her dilüsyon için 1 tüp kullanılırken, EMS yönteminde her dilüsyondan 1'den fazla sayıda ekim yapılır. Aynı dilüsyondan yapılan paralel ekim sayısı arttıkça, istatistiki olasılık kurallarına göre daha doğru sonuçlar alınır. Aynı dilüsyondan yapılan paralel ekim sayısı sonsuza ulaştığında ise sayım sonucu kesinleşir.

EMS yönteminde, su örneklerini hazırlanan sıvı besiyerlerine aktararak, reaksiyonun gerçekleşmesini beklemektir. Çoğunlukla besi yeri gram pozitif bakterileri inhibe eden kimyasal maddeler içerdiği gibi, gram negatif bakterilerin büyümesine olanak sağlayacak besin maddeleri içerir. EMS yönteminde en sık kullanılan besi yeri MacConkey Sıvı Besiyeridir. Bu besiyerinde gram pozitif bakterilerin büyümesini inhibe eden kimyasal "Kristal Viyole" olup, laktoz fermantasyonunun gerçekleştiğini gösteren indikatör kimyasal ise Bromokresol Moru'dur. Bromokresol Moru çok basit düzeydeki bir pH indikatörüdür. pH'ın 6,8'in üzerinde olduğu durumlarda rengi mor olup, pH 5,2'nin altına düştüğü zaman sarı renge döner. Dolayısıyla başta mor renkte olan besi yeri içerisinde eğer laktoz fermantasyonu gerçekleşiyorsa, CO₂ miktarı artacak, buna bağlı olarak pH düşecek ve renk değişimi gerçekleşecektir.

Laktoz fermantasyonunun gerçekleşmesinin diğer bir göstergesi ise gaz çıkışıdır. CO₂ gazının çıkmasının gözlenmesi bu açıdan çok önemlidir. Bu sebeple EMS yönteminde içinde besiyeri içeren test tüplerinin içerisine küçük Durham tüpleri yerleştirilir. İnkübasyon sonucunda bu tüplerin içerisinde gaz çıkışı olup olmadığı gözlemlenir.

Bakteri içeriğinin sayısal değeri; çok sayıda hazırlanmış, negatif ve pozitif sonuçlar gösteren tüpler yardımıyla hesaplanır ve belli bir kritik seyrelmede istenilen hassas sonuç elde edilebilir. Test sonuçlarının EMS olarak ifadesinde, istatistiksel olarak değerlendirmeler yapılır. İçme suyu analizlerinde her birisi 10 ml, 1 ml ve 100 ml numuneler içeren 3'er ya da 5'er fermantasyon tüpü kullanılır.

Yöntemin esası;

- Tek kuvvet ve çift kuvvet besiyerleri hazırlanır. Tek kuvvet besiyerlerinde besiyeri miktarı çift kuvvetin yarısı kadardır.
- Her numune için 3 (ya da 5) çift kuvvet, 6 (ya da 10) tek kuvvet besiyeri hazırlanır.
- Çift kuvvet besiyerlerine (3 ya da 5 tüp) 10'ar ml numune ekilir.
- Tek kuvvet besiyerlerinin 3 ya da 5 tanesine 1'er ml numune ekilir.
- Tek kuvvet besiyerlerinin 3 ya da 5 tanesine 0,1'er ml numune ekilir.
- Ekim sonrası tüpler 37°C'de 24-48 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon sonunda tüpler pozitif ya da negatif olarak kaydedilir.
- Değerlendirme sonunda elde edilecek kodun, istatistik yöntemlerle elde edilmiş çizelgeden okunmasıdır.

Yöntemin "En Muhtemel Sayı" olarak adlandırılma nedeni örnekteki mikroorganizma sayısının istatistiksel olasılık hesapları ile elde edilmiş çizelgelerden yararlanılarak hesaplanmasıdır.

Tüplerin pozitif veya negatif olmasının değerlendirilmesi, aranan mikroorganizma ve buna bağlı olarak kullanılan besiyerine göre değişir. Bu değerlendirme basit olarak besiyerinde;

- Bulanıklık olması,
- Durham tüpünde gaz oluşumu,
- Besiyerinde renk değişimi,
- Pıhtılaşma,
- Floresan oluşumu gibi çok basit olarak yapılabilir.

EMS yöntemi, yaygın olarak kullanılmasını sağlayan üstünlükler;

- Bazı mikroorganizmaların katı besiyerinde üretilme olasılığı yoktur, bu durumlarda sıvı besiyerinde sayım yöntemi olarak EMS kullanılır. Örnek: *Rhizobium* cinsine ait türlerin ayırımı ve sayımı için EMS yöntemi pratik olarak kullanılan en başarılı yöntemlerden biridir.
- Eğer sayım yapılacak örnekte agar yüzeyinde hızla gelişerek, asıl sayımı istenen hücrelerin gelişimini engelleyen mikroorganizmalar varsa ve bu durum katı besiyerinde önlenemez iken sıvı besiyerinde önlenebiliyorsa, EMS yine avantajlıdır.
- EMS Yöntemi agarlı besiyeri yöntemlerine göre daha pratiktir. Tüplerin otomatik olarak doldurulduğu sistemler geliştirilmiş ve dolayısı ile EMS 'nin kolay bir yöntem olması sağlanmıştır.
- Bir materyalin 100 ml' sinde 2 – 3 adet gibi çok düşük sayılarda canlı hücre varsa, standart katı besiyeri yöntemi kullanılamaz. Bu gibi durumlarda, ya EMS yöntemi ya da membran filtre yöntemi kullanılma zorunluluğu vardır. Materyal membran filtreden geçirilemiyorsa, kullanılacak tek pratik yöntem EMS 'dir. Ayrıca örnek, sıvı değil katı ise, membran filtre yöntemi zaten kullanılamaz.

Çizelge 1. McGrady Çizelgesi, 100 ml örnekte kuvvetle muhtemel koliform sayısı.

Pozitif Tüpler			100 ml örnekte Muhtemel Koliform Sayısı
10.0 ml	1.0 ml	0.1 ml	Her hacim için 3'er tüp
0	0	0	< 3
0	0	1	3
0	1	0	3
0	2	0	6
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
2	3	0	30
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1110
3	3	3	≥ 2400

DENEY

- 1- Bu deneyde musluk suyu, atık su ve steril su örnekleri karşılaştırılacaktır. Her numune için 3'er tane çift kuvvet, 6'şar tane tek kuvvet tüp hazırlayacak şekilde MacConkey Besiyerinden tartıp, talimatları takip ederek MacConkey besiyerlerini hazırlayın.
- 2- Her tüpe 10'ar ml tek ve çift kuvvet besiyerlerinden koyun.
- 3- Her tüp içerisinde birer tane Durham tüpünü ters şekilde yerleştirip, varsa içerisindeki gazı çıkartın.
- 4- Hazırladığınız besiyerlerini otoklavda 121°C 15 dakika steril edin.
- 5- Steril edilmiş besiyerlerinden çift kuvvet olanlara 10 ml, tek kuvvet olanlara 1 ve 0,1 ml numuneyi 3'er paralel halinde ekin.
- 6- 37°C'de 24 ile 48 saat inkübe ettikten sonra, hangilerinde renk değişimi oluştu ve gaz çıkışı gözlemlendi kaydedin.
- 7- Çizelge 1'i kullanarak, her örnekte kaç koloni bulunduğunu hesaplayın.

SORULAR

Araştırma Soruları:

- 1- İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliğe göre, içme kullanma sularında, içme sularında ve kaynak sularında kaç koloni koliform bulunabilir? Araştırınız **(15 puan)**.
- 2- Aynı yönetmelikte bahsedilen bakteriler nelerdir, bu bakteriler içme sularında ne kadar bulunabilir? **(20 puan)**
- 3- İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmeliğinde bahsedilen, *Pseudomonas aeruginos* bakterisinin özellikleri nelerdir (örnek: gram pozitif/negatif, hangi reaksiyonları gerçekleştirir gibi bazı özelliklerini araştırınız), sebep olduğu hastalıklar nelerdir? **(25 puan)**
- 4- EMS yöntemi ile *P. aeruginos* bakteri tayini yapabilir miyiz? Yani bu bakteri MacConkey besiyerinde çoğalır mı, çoğalır ise renk ve gaz çıkışı nasıl olur? Araştırın **(15 puan)**.

Deney Soruları:

- 1- Hangi örnekte daha fazla koliform bakteri çıktı? Neden? **(20 puan)**.
- 2- Her test tüpünün (10, 1 ve 0,1 ml'lik tüplerin) negatif çıkmasının anlamı nedir? **(5 puan)**.

Uygulama No: 6

Saflaştırma

Amaç: Saf kültür elde etmek.

GENEL BİLGİ

Mikroorganizmaların üremesi için gerekli olan besin maddelerini içeren besiyerleri (kültür ortamı), ekim işleminden sonra uygun fiziksel ve kimyasal koşul altında belli sürelerde bekletildiğinde mikroorganizmalar ürer. Besiyerinde üretilen mikroorganizmaları tümüne "kültür" adı verilmektedir.

Kültür Çeşitleri ve Tanımları

1. Saf Kültür

Doğada her yerde mikroorganizmalar, birçok farklı türlerin oluşturduğu topluluklar şeklinde bulunur. Buradan alınan örnekler besiyerine ekilerek birçok bakteri türü bir arada üretilir. Birden fazla bakteri türünün ürettiği kültürler karışık kültürler denir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında her bir mikroorganizmanın özelliğinin incelenmesi ve tanısının yapılabilmesi için saf kültürlerinin elde edilmesi de gerekir. Bu nedenle karışık kültürlerin saflaştırılması gerekmektedir. Bir koloniden alınan ve üretildiğinde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genel özellikleri birbirinin aynı olan bakteri kültürüne "**saf kültür**" adı verilmektedir. Kısacası, saf kültür yalnızca bir tür mikroorganizma üretilmesi ile elde edilen kültürdür. Saf kültür, önce katı besiyerinde oluşmuş her farklı koloniden steril bir başka tüp içindeki sıvı veya katı yatık agara ekim yapılarak elde edilir. Saf kültür için tek koloni elde etme gerekliliği vardır.

2. Stok Kültür

Saf kültürün laboratuvarında yapılacak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklanması işlemine "stok kültür" elde etme denir. Ölmeden saklanmaları için yeni besiyerlerine ekilmelidir. Bazı bakteriler eski kültürlerinde de uzun süre canlı kalabilmektedir. Saf kültürün yeni besiyerlerine ekilmesi veya deney hayvanlarına nakledilmesi işlemine "pasaj yapmak" denir.

Saf Kültür Elde Etme Aşamaları

Birinci aşama: İzole koloniler elde etme

Saf kültür elde etmede öncelikle izole koloniler elde edilmelidir. İzole kolonileri elde etmek için;

- Örnekten ekim yapılarak karışık kültür elde edilir.
- Bir miktar kültür öze ile alınır, mikroorganizma hücrelerinin daha rahat yayılarak ayrı ayrı koloni oluşturmaları için petri kutusuna **sürme tekniği** ile ekilir (*sürme tekniği için bkz. syf.3 sürme tekniği*). Bu sırada bir önceki sürme alanına değmemeye özen gösterilir. Petri kutusunun tercih nedeni besiyeri yüzeyinin daha geniş olmasıdır.
- Petrinin üzerine gerekli bilgiler yazılarak ters çevrilir, önerilen sıcaklık ve sürede inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrası oluşan koloniler incelenir. Tek kolonilerin gelişip gelişmediğine bakılır.
- Tek tip koloniler seçilir ve seçim yaparken tipik koloni görünümünde olmalarına ve diğer bir koloni ile temasta olmamalarına dikkat edilmelidir. Son izolasyon bölgelerinde tek düşen mikroorganizma hücresi çoğalarak saf koloniyi oluşturur.
- Eğer tek koloniler gelişmemişse, daha seyreltilmiş kültürlerden tekrar ekim yapılır. Diğer tüm işlemler tekrarlanır.

İkinci aşama: Saf kültür elde etme

- Bunun için, İzole koloni öze ile önce sıvı bir besiyerine adaptasyon ve canlandırma amacıyla aktarılır. Bu aşamada koloniler birbirine çok yakınsa iğne öze tercih edilmelidir.
- Tüp üzerine gerekli bilgiler yazılır ve önerilen sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyonu takiben elde edilecek kültürden uygun bir katı besiyerine, genellikle tüpteki yatık agarlı besiyerine tekrar ekim yapılarak inkübasyon gerçekleştirilir. İnkübasyon sonrasında saf kültür elde edilmiş olur.

Üçüncü aşama: Saflık kontrolü

Elde edilen kültürün saf olup olmadığı kontrol edilir. Bunun için;

- Elde edilen kültürden tek koloni düşürme tekniklerinden birisi kullanılarak petri kutusundaki agarlı besiyerine ekim yapılır ve inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrasında besiyeri yüzeyinde oluşan koloniler şekil, yapı, büyüklük, renk vb özellikleri yönünden incelenir. Farklı özelliklere sahip kolonilerin varlığı gözlemlendiğinde kültürün karışık olmasından şüphelenilir.

Kültürleri Muhafaza Etme

Saklama esnasında izole koloni kültür bakterilerin çoğunun canlı kalması ve mümkün olduğu kadar genetik, fizyolojik değişikliklere uğramaması gerekmektedir. Bunun için, çeşitli saklama yöntemleri geliştirilmiştir. Soğukta muhafaza, dondurma ve kurutma yöntemleri bunlardan başlıcalarıdır.

Kültürler buzdolabında 0-5°C'de muhafaza edilmektedir. Bazı fakültatif anaeroplara, tüpte yüksek jelozda üretildikten sonra buzdolabında saklanır. Aerop bakteriler, yatık agar besiyerinde buzdolabında aylarca saklanabilirse de bu yöntem uzun süreli saklamalar için uygun değildir. Ancak diğer yöntemler kullanılarak bu zorlukların üstesinden gelinir.

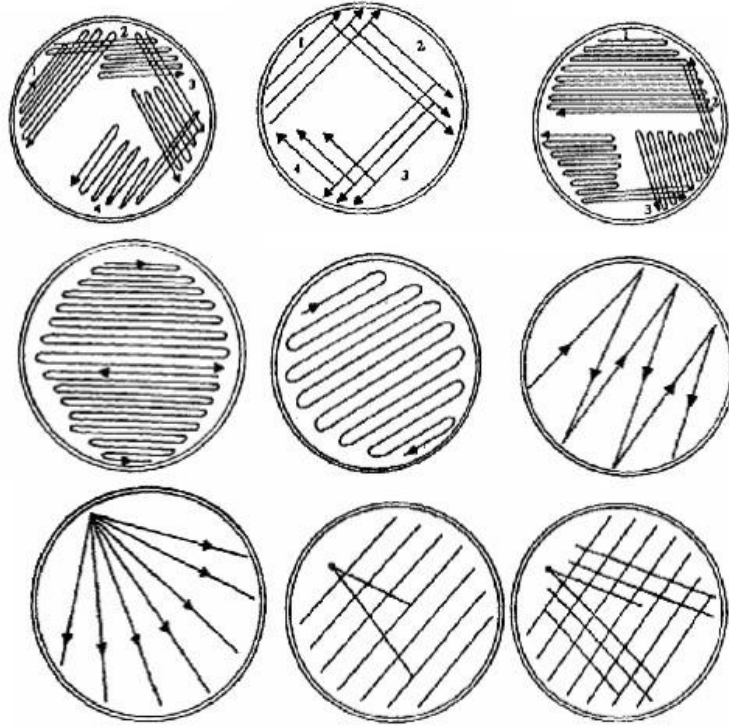
Dondurarak derin dondurucuda; -20°C'de, muhafaza edilebilir. Mikroorganizmalar stok kültürlerini hazırlayarak kuru formda canlılık ve aktivitelerini yitirmeden uzun süre saklanabilir.

Petri kutuları veya tüpteki kültürleri buzdolabında muhafaza ederken hava ile direkt teması kesmek ve yüzeysel kurumayı önlemek için, petri kutularının alt ve üst kapakları parafilm (veya sellobant) ile birbirine tutturulur, tüplerin ise ağız kısımları parafilm ile kaplanır. Tüpler için parafilm yerine erimiş vazelin, parafin veya vaspara daldırılmış pamuk tıkaçlar da kullanılabilir. Ağız vida kapaklı tüplerde bunlara gerek yoktur.

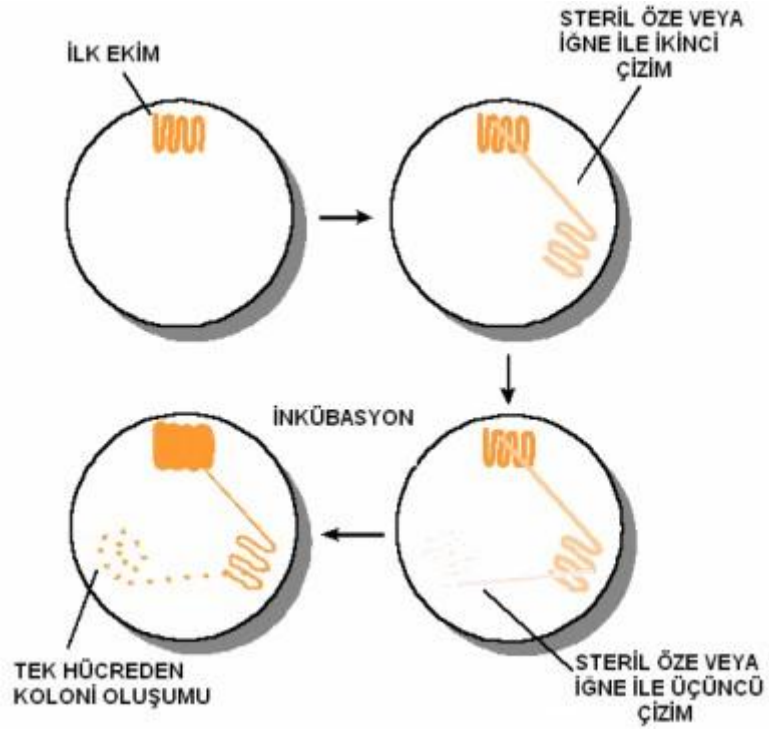
Sürme tekniği:

Sürme yöntemiyle ekim şu şekilde yapılır:

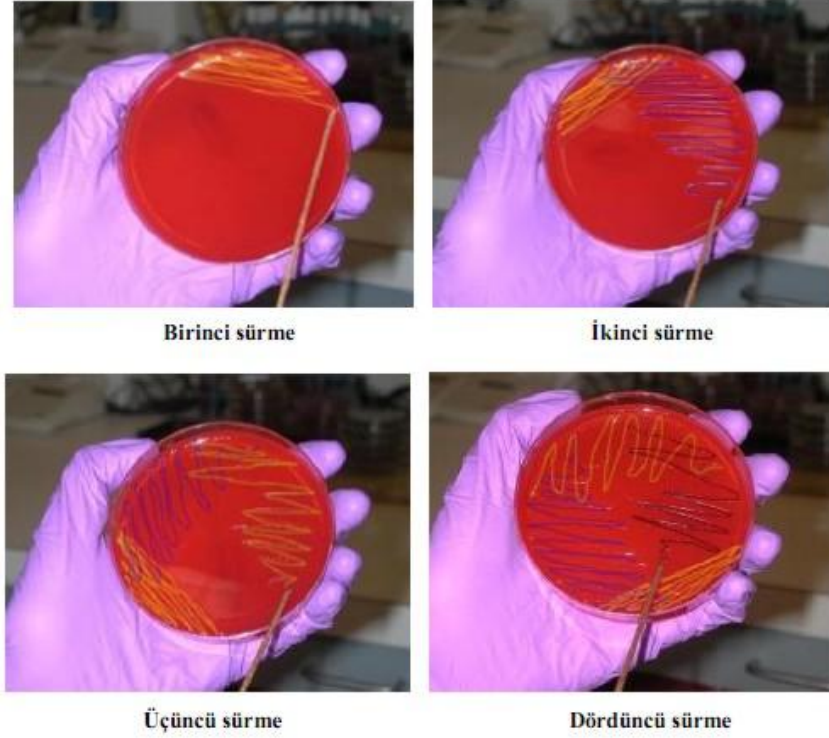
- Ekimi yapılacak örnek öze veya pipet ile sıvı besiyerine ekim işlemindeki gibi alınır.
- Agarlı besiyerini içeren petri kutusu sol elin ayasına yerleştirilir ve bu elin baş ve işaret parmağı ile kapak kısmı açılır.
- Öze bu aralıktan içeri sokularak öze ucunun örnek alınan kısmı agar yüzeyinin seçilecek bir bölgesine temas ettirilir. Örnek bu bölgede hafifçe ezilerek birkaç mm çapında yayılır.
- Daha sonra öze ile bu yayılma alanından başlayarak sürme işlemine geçilir.
- Sürme işlemi değişik şekillerde gerçekleştirilebilmektedir. Ancak ayrı ayrı koloni elde edebilmek için en ideal olanı 4 ayrı bölgenin çizilmesidir.



Şekil 1: Sürme yöntemiyle ekim şekilleri



Şekil 2: Sürme yöntemiyle koloniyi teke indirme



Şekil 3: Sürme yönteminin uygulanışı

DENEY

- 1- Bir önceki hafta hazırladığınız MacConkey Sıvı besiyerinden üreyen örneklerden birini seçiniz
- 2- Öze kullanarak, hazırlanmış EMB besiyerine sürme tekniğini kullanarak çiziniz. 37°C'de 24 saat inkübe ettikten sonra kolonilere bakınız, ayrı ve izole, tek tip mikroorganizmalardan oluşmuş olan kolonileri seçiniz.
- 3- Bu kolonilerden aldığınız örneği tekrar hazırlanmış MacConkey Sıvı besiyerine aktarınız. 37°C'de 24 saat inkübe ediniz.
- 4- Büyüme gerçekleştikten sonra, bu besiyerinden aldığınız örnekleri yatay tüplere hazırlanmış NA katı besiyerlerine aktarınız. 24 saat inkübe ettikten sonra büyümeyi gözleyiniz.
- 5- Bu besiyerlerini buzdolabında saklayınız.

SORULAR

Araştırma soruları:

1- Endüstride pek çok mikroorganizma, gıda endüstrisinden arıtıma kadar, sık ve yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Endüstriyel bir alan seçerek, bir ürünün oluşturulması için gereken mikroorganizmalara örnek veriniz. Bu aşamada doğru mikroorganizmanın seçilmesi ve kültürün saf olması neden önemlidir açıklayınız. (örn: Probiyotik yoğurt yapımında *Lactobacillus acidophilus* bakterisi kullanılır. Bunun için bu bakteriyi içeren saf *Lactobacillus acidophilus* stoklarına ihtiyaç vardır. Bu bakterinin oluştuğu stoklar saf değil ise üretilen yoğurtlar besin zehirlenmesine neden olabilir).

Deney soruları:

1- Sürme tekniği kullanarak ektiğiniz besiyerlerindeki büyümeyi çiziniz. Beklediğiniz gibi bir seyrelme gözlendi mi? Gözlenmediyse neden?

2- Yatık NA agar tüplerinde oluşan büyümeyi çiziniz.

Uygulama No:

7 Basit Boyama – Gram Boyama

Amaç: Mikroorganizmaların mikroskopta kolayca incelenmesi amacıyla boyanmasıdır.

GENEL BİLGİ

Bakterinin yapısı, içinde üredikleri ortamdan saydamlıklarının benzer olması (çok az bir refraktif indekse sahip olunması) sebebiyle, laboratuvarlarda genel amaçlar için kullanılan ışık mikroskoplarıyla tespit edilmeleri zordur. Bu yarı geçirgen yapı, ancak boyanarak ve buldukları yerle olan kontrastları artırılarak daha belirgin hale getirilebilirler. Mikroorganizmalar boyandıktan sonra, mikroskopta kolay görülebildikleri gibi büyüklük, şekil, spor, kapsül gibi özellikleri hakkında da gerekli bilgiler elde edilebilir. Ayrıca, boyanma özelliklerine göre de bazı mikroorganizmalar (mikobakteriler gibi) tespit edilebilirler. Bu nedenle, mikroorganizmaları tanımada, 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. Ancak, bunların çoğu anilinden elde edilmediği gibi, anilinle de ilişkili değildirler. Boyalar, genellikle organik maddelerden kuru damıtma yoluyla elde edilen, sıvı yağ kıvamında, kara renkte, ağır, kokulu, suda erimeyen katranlardan elde edilip benzen türevleridirler.

Mikrobiyolojide Kullanılan Boyalar

Boylar doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılır:

a. Doğal boyalar: Doğal boyalar bitkisel ve hayvansal orijinli olabilirler. Bunlardan bitkisel orijinli olanlara hematoksilen ve orcein, hayvansal orijinli olanlara ise carmen örnek gösterilebilir.

b. Sentetik boyalar: Bunların sayıları oldukça çoktur. Eosin, asit fuksin, asit pikrik, oranj gelb, eritrosin, kongo kırmızısı, light green, metilen mavisi, toluidin mavisi, bazik fuksin, jansiyon viyole, azocarmen, safranin gibi birçok boya sentetik boyalara örnek gösterilebilir.

Sentetik boyalar; Ehrlich tarafından **bazik, asit ve nötr boyalar** diye üç gruba ayrılmıştır. Serbest asit ve bazlar suda çok az eridiklerinden sentetik boyalar daima nötr tuzlar halinde kullanılırlar. Nötr tuzlar hem asit köke (anion) hem de bazik köke (kation) sahiptirler.

Asit Boyalar: Asit boyaların boyayıcı kısımları negatif elektriksel yüke sahiptir. Yani burada tuzun baz kısmı renksiz asit kısmı ise renklidir. Bu tür boyalara **anyonik boyalar** da denir. Asidik boyalar zemini boyamak için kullanılmaktadır.

Bazik Boyalar: Bazik boyaların kromofor grubu pozitif yüke sahiptir. Yani, yukarıdaki açıklamanın ışığında, bu nötr tuzu meydana getiren bazik kısım (katyon, +) renkli buna karşın asit kısım (anyon, -) ise renksizdir. Bu tür boyalara **katyonik boyalar** da denir.

Nötr Boyalar: Nötr boyalar iyonik olmayan boyalardır. Bunlar suda çözünen renkli organik bileşiklerdir. Burada nötr tuzu meydana getiren asit 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 boyaları da bu tip boyalara örnektir.

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

Mikrobiyolojide Boyama Yöntemleri

Mikroorganizmaları iyi görebilmek ve ayrıntılarını tetkik edebilmek için birçok genel ve özel boyama yöntemleri ortaya konulmuştur. Gerekliğinde, bunlardan en uygunu seçilerek kullanılır.

Mikrobiyolojide kullanılan boyama yöntemlerini başlıca 2 gruba ayırmak mümkündür.

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

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

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

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

Bileşik boyama yöntemlerinden mikrobiyolojide en çok kullanılan yöntem gram boyamadır.

Gram Boyama Tekniği

Adını bulucusu Dr. Christian Gram'dan alan Gram Boyama, mikrobiyolojide kullanılan boyama teknikleri arasında en önemli ve en sık uygulanan diferansiyel (ayırt edici) bir boyama tekniğidir. Tespit edilmiş bakteriyel filme sırasıyla: kristal violet, iyodür çözeltisi, alkol ve safranin uygulanır. Genelde bakteriler, kristal violet boyasını tutup koyu mor renkte gözükenler "gram pozitif (olumlu)" ve kristal violeyi salıp safranin ile boyanarak kırmızı renkte gözükenler "gram negatif (olumsuz)" olmak üzere iki grup altında toplanırlar. Bu işlemdeki basamaklar ve her basamaktaki sonuç aşağıdaki çizelgede özetlenmektedir.

Sırasıyla uygulanan çözeltiler	Reaksiyon ve bakterilerin görünüşü	
	Gram-pozitif	Gram-negatif
1.Kristal violet (KV)	Hücreler kristal violet ile mor renkte boyanırlar.	Hücreler kristal violet ile mor renkte boyanır.
2.İyodür çözeltisi (I)	Hücre içerisinde KV-I kompleksi oluşur, hücreler hala mordur.	Hücre içerisinde KV-I kompleksi oluşur. Hücreler hala mordur.
3.Alkol	Hücre çeperi dehidre olur (Suyunu kaybeder), gözenek büzülmesi olur, geçirgenlik azalır. KV-I kompleksi dışarı çıkamaz. Hücreler hala mor renklidir.	Hücre çeperindeki lipid ekstrakte edilir, gözenekler genişler ve dolayısıyla KV-I kompleksi hücre dışına çıkarılır.
4.Safranin	Hücreler etkilenmez, yine ilk başta olduğu gibi kristal violet yani mor renktedir.	Hücreler bu kez safranini alıp kırmızı renkte boyanırlar.

Bu işlem sonucu bazı bakteriler mor renge, diğerleri ise niçin kırmızıya boyanmaktadır? Gram-negatif bakterilerin hücre çeperi gram-pozitiflerinkinden daha fazla lipid içermektedir.

Gram pozitif bakterilerde kristal violet kompleksi alkol muamelesinden sonra hücre çeperine tutunur. Bu durum çoğunlukla peptidoglikandan oluşan çeperdeki gözenek çaplarının daralmasına neden olmaktadır. Gram-negatif bakteri çeperlerinde çok daha az miktarda içeren peptidoglikan, gram-pozitif çeperine nazaran çok daha az çapraz bağlantılı yapıdadır. Bu yüzden gram-negatif hücre çeperindeki peptidoglikan yapısı arasındaki gözenekler alkol muamelesinden sonra bile kristal violet kompleksi dışarıya salacak kadar büyüklükte kalırlar. Gram-pozitif bakteriler hücre çeperinin ortadan kaldırılmasını sağlayan bir

enzim olan lizozim ile muamele edildiğinde, protoplast olarak isimlendirilen çepersiz hücreler oluşur; bu protoplast aynı gram boyama uygulandığında çeperli durumlarının aksine kristal violet kompleksi alkol muamelesiyle saldığı görülür. Netice olarak bu deneme de, gram-pozitif bakterilerde ilk boyanın tutulmasına bu bakterilerdeki hücre çeperi yapısının sebep olduğunu kanıtlamaktadır.

Metilen Mavisi ile Basit Boyama

Mikroorganizmaların ve özellikle bakterilerin mikroskopik morfolojilerinin genel olarak en iyi olarak izlenebildiği boyama yöntemidir. Bu amaçla farklı boyalar kullanılabilirse de en yaygını Löffler'in Metilen Mavisi çözeltisidir. Bu amaçla Löffler metilen mavisi solusyonu kullanılır. Preparat üzerine boya solusyonu konarak 5-8 dakika bekletilir. Boya dökülür, yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroplar mavi renkte görülürler.

Boyama İşlemi Sırasında Yapılması Muhtemel Hatalar ve Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

- Yeterli steril koşullarda çalışmama,
- Besiyerinden kültür alınmasına dikkat etmeme,
- Preparat alınırken kültürün lam üzerindeki su ile iyice karıştırılmaması,
- Mikroorganizmaların lam üzerine iyice fiksasyon edilmemesi,
- Damlatılan boyaların gereğinden fazla veya az damlatılması,
- Bekleme sürelerinin yeteli olmaması,
- Su ile yıkamada mikroorganizmaların kayıp olması,
- Kurutma kâğıdının fazla bastırılması.

DENEY

A. Boyama yapmadan mikroskopta gözlem

- 1- Önceden ekim yaptığınız petrilere öze ile bakteri kolonisi olarak lam üzerine yerleştiriniz.
- 2- 1 damla musluk suyu damlatıp bir miktar karıştırınız.
- 3- Mikroskopta 10 X ve 40 X de gözlemeyiniz.
- 4- Gördüklerinizi çiziniz.

B. Basit Boyama – Metilen Mavisi

- 1- Önceden ekim yaptığınız petrilere öze ile bakteri kolonisi olarak lam üzerine yerleştiriniz.
- 2- Üstüne bir damla musluk suyu damlattıktan sonra bir miktar havada kurutup sonrasında alevde tespit ediniz
- 3- Üstüne bir damla metilen mavisi damlatılıp 5-8 dakika bekletiniz.
- 4- Boyayı döküp musluk suyunda hafif akışta boyayı akıtınız.
- 5- Önce 40X'te sonrasında da immersiyon yağını kullanarak 100X de mikroskopta gözlemleyerek gözlemlerinizi çiziniz.

C. Gram Boyama

- 1- Preparat basit boyamadaki gibi hazırlanır, kurutulur ve tespit ediniz.
- 2- Preparatın üstüne Kristal violet (veya metil violet) damlatılır ve 2-3 dakika bekleyiniz.

- 3- Kristal violet boyası dökülerek ve preparat üzerine lugol solusyonu konur ve 1–2 dakika bekleyiniz. Lugol solusyonu dökünüz.
- 4- Alkol preparatın üzerinde hızlıca akıntınız.
- 5- Akan musluk suyu ile hızlıca yıkayınız.
- 6- Safranin damlatın ve 5–10 saniye bekleyiniz.
- 7- Su ile yıkayarak boyayı gideriniz.
- 8- Önce 40X'te sonrasında da immersiyon yağını kullanarak 100X de mikroskopta gözlemleyerek gözlemlerinizi çiziniz.

SORULAR

Araştırma Soruları:

1. Her ne kadar gram-negatif bakteriler gram reaksiyonlarında çoğunlukla tutarlı iseler de, gram-pozitif bakteriler belirli koşullar altında değişiklik gösterebilirler, Bu koşul veya koşulların neler olduğunu açıklayınız.
2. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre yapılarındaki farklılıkları şekil çizerek açıklayınız.

Deney Soruları:

Mikroskop gözlemlerinizi çiziniz.

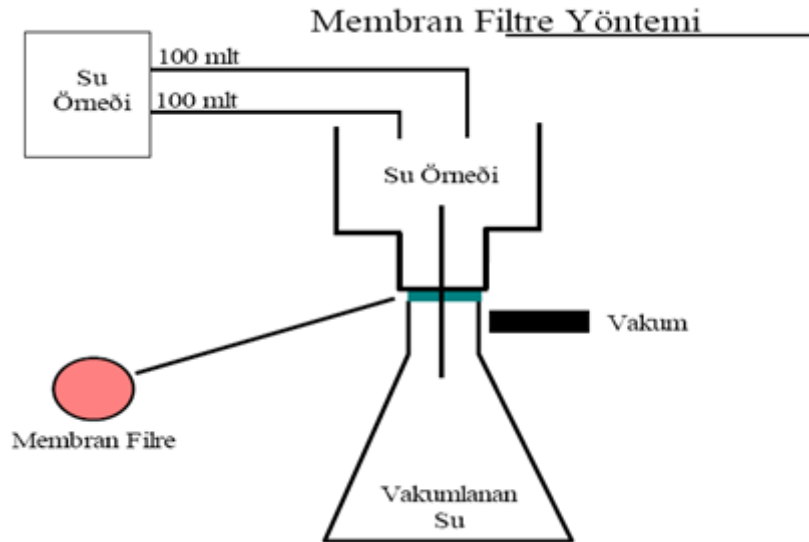
Uygulama No: 8

Membran Filtrasyon Yöntemi ile mikroorganizmaların tayini

Amaç: Az sayıda mikroorganizma içeren içme suyu ve diğer sıvı numunelerde koliform mikroorganizmaların hassas bir biçimde tayin edilmesi.

Genel Bilgiler

Membran Filtre Metodu, Çoklu Tüp Yöntemi'nden daha hızlı sonuç veren, ayrıca daha çok numune hacmi ile çalışabilme imkânı sağlayan, tekrarlanması mümkün olan bir yöntemdir. Aynı zamanda Membran Filtre yöntemi daha modern fakat ekonomik açıdan daha pahalı bir yöntemdir. Yöntemin esası koliform organizmaların kâğıt filtrelerde tutulması temeline dayanmaktadır. Membran filtreler dispoabl olarak steril edilmiş olarak kullanıma sunulmakta ve bir kez kullanılmaktadırlar. Membran filtre yönteminin şematik dizaynı aşağıdaki şekilde görülmektedir.



Şekilde görüldüğü gibi membran filtre cihazı suyun konulduğu üst bölüm, membran filtrenin yer aldığı orta kısım ve vakumlanan suyun boşaldığı alt bölüm olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. Üst bölüme konan su örneği aşağı bölüme doğru hava ile vakumlanırken arada bulunan membran filtreden süzülen sudaki koliform organizmalar filtre tarafından tutulur.

Tehlikeli durumlarda içme suyunun izlenmesinde oldukça faydalı bir metot olduğu gibi, çeşitli doğal suların incelenmesinde de oldukça yararlıdır. Fakat özellikle bulanıklığı yüksek olan sularla, yeraltı sularında ihtiyatla kullanılmalıdır. Bu gibi sulara önceden membran tekniği kullanılmamış ise, karşılaştırma ve uygulanabilirliği göstermek için Çoklu Tüp Yöntemi ile paralel olarak yürütmekte yarar vardır. Koli bakterileri, laktozlu-Endo besiyerinde $35 \pm 0,5$ °C de 24 saat içerisinde metalik parlaklıkta kırmızı koloniler şeklinde gelişen tamamı aerobik ve fakültatif anaerobik, sporsuz çomak şeklinde, gram negatif bakteriler olarak tanımlanabilir. Bunların saf kültürleri test edildiğinde sitokrom oksidaz testi negatif, β -galaktosidaz ise pozitif reaksiyon vermektedir. Genellikle tamamen kırmızı, pembe, mavi, beyaz ve renksiz koloniler ile zayıf parlaklıklı koloniler, koliform olmayan bakteriler olarak kabul edilir.

Deneyi yapılacak olan numunede alg görüntüsü veya bulanıklık yapabilecek materyalin varlığı halinde, daha küçük hacimlerde çalışmak gerekir. Toksik maddelerle, koli dışındaki bakterilerin çok sayıda olması az sayıda koli oluşumuna sebep olabilir.

Membran filtre tekniği tuzlu sularda (Deniz suyu) uygulanabilir. Atıksular, arıtma işlemleri sonrası çıkış sularında, fazla miktarda numune süzülmesi bulanıklığa yol açar. Klorlamadan gelecek riskler veya atıksularda bulunan toksik metallerle, fenol gibi toksik organiklerden dolayı da bu yöntemin uygulanması sakıncalı olabilmektedir. İçme suyu arıtma çıkışında toplam koloni tayininde ayrıca ikinci olarak klorlanmış veya ileri derecede arıtma işlemine tabi tutulmuş suların bakteriyolojik tahlillerinde kullanılması önerilen bir yöntemdir.

İçme suları için filtre edilmesi gereken standart hacim 100 ml dir. İstendiği takdirde birkaç membran filtre kullanılarak bu miktar 1 lt'ye, kadar çıkarılabilir. Bu işlem 250 ml'lik hacimler halinde 4 membran filtre kullanılarak yapılarak, raporda 1 litre üzerinden verilebilir. Özel analizler veya diğer sular için daha az veya fazla miktarda numuneler kullanılabilir.

Standart olarak analiz sonuçları, inkübasyon sonrasında (filtre üzerinde elde edilen koloni sayısı/ filtre edilen hacim) olarak verilir.

$$\text{Organizmalar/100 ml} = \frac{\text{Filtredeki Koloni Sayısı} \times 100}{\text{ml test numunesi miktarı}}$$

Su analizlerinde çoğunlukla, filtre edilen hacim 100 mL'dir ve analiz edilen mikroorganizmanın 0 olması istenir. Buna göre 0 kob/mL gibi sonuç verilmesi gerekir.

Çoklu Tüp ve Membran Filtre Yöntemi ile elde edilmiş olan deney sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması halinde membran filtre sonuçlarının daha net sonuçlar verdiği anlaşılmıştır. Her bir testten elde edilen bilgi, yaklaşık aynı su kalitesi değerlerini vermekle beraber, sayısal sonuçlar aynı değildir. Arıtılmamış su kaynakları için membran filtre test sonuçları % 80 lik bir doğruluk değerinde elde edilirken, Çoklu Tüp'ün tamamlama testinin uygulanması ile bu değer % 95 olmaktadır. Ancak Membran filtre yöntemi fermantasyon tüpleri yöntemine göre daha modern bir yöntem olmasına rağmen pahallı bir yöntem olduğundan nadir olarak kullanılmaktadır.

Çoklu Tüp test sonuçları pozitif istatistiksel bir yapıya dayandığından, Membran Filtre sonuçlarına göre daha yüksek değerlerde sonuçlar vereceği tahmin edilmektedir.

DENEY

1. Steril membran filtreyi steril şartlarda filtrasyon cihazına yerleştiriniz.
2. 100 ml su örneğini vakumlu filtreden geçirin.
3. Membran filtreyi önceden hazırlanmış NA besiyerleri üzerine altta hava kabarcığı bırakmadan yerleştiriniz (ortamları kullanım esnasında hazırlayınız).
4. Önce 37 °C'de 24-48 saat inkübe ediniz.
5. İnkübasyondan sonra filtrenin üzerindeki kolonileri sayınız.

SORULAR

Araştırma soruları:

1- Membran filtrasyon tekniğinde ne tür bir filtre malzemesi kullanılmaktadır? Bu filtrenin normal atıksu uygulamalarında kullanılan filtrelerden farkı nedir?

2- Koliform mikroorganizmaların belirlenmesinde Membran filtrasyon tekniğinin sağladığı avantajlar nelerdir? Genel Mikrobiyolojik uygulamalarda rutin olarak kullanılabilirliğini aynı amaçla kullanılmakta olan diğer yöntemlerle karşılaştırınız.

Deney soruları:

1- Membran filtrasyon deneyinde verilen numune hacmi için koloni sayısını bulunuz.

Uygulama No: 9

Sporlu Bakteri Analizi

Amaç: Sporlu bakterileri çoğaltarak analiz yapmaktır.

GENEL BİLGİ

Bazı bakteri hücreleri (*Clostridium*, *Bacillus*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina* cinsleri) içinde "endospor" meydana gelir. Bunlar bakterilerin canlı fakat uyuşuk (dormant) formlarıdır. Endosporlar bakterilerin vejetatif şekillerine (bakterilerin beslenen ve çoğalan şekli) göre fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı daha dayanıklıdır. Endosporların çok uzun yıllar (40 yıl) canlı kalabildiği tesbit edilmiştir.

Endosporda, vejetatif hücrede bulunmayan "dipikolinik asit" vardır. Dış kısmının geçirgen olmaması, yüksek miktarda dipikolinik asit ve kalsiyum ihtiva etmesi, su oranının az olması, çok az metabolizma ve enzim faaliyeti göstermesi, sporların vejetatif sekilerinden daha dirençli olmasını sağlar. Dipikolinik asit endospora özel kimyasal yapıdır vejetatif hücrede yoktur. Bu da öz bölgesinde bulunur. Ca iyonları da dipikolinik asitle birleşir ve endospor kuru ağırlığının %10'unu oluşturur. Endosporun öz bölgesinde buraya özel küçük asitlerde eriyebilen spor proteinleri (SASPs) vardır. Sporlanma esnasında oluşur. Bunun da iki görevi vardır:

1. Sporun öz bölgesindeki DNA'ya bağlanarak DNA'yı ultraviyole ışınları, kuruma ve ısı gibi zararlı etkilerden korur.
2. Endospordan vejetatif hücre oluşması esnasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılır.

Bakterilerdeki endospor, funguslarda olduğu gibi bir çoğalma şekli değildir. Bir vejetatif hücreden bir spor meydana gelir. Daha sonra uygun şartlarda bir spordan tek bir bakteri hücresi oluşur.

Endosporların şekli yuvarlak veya ovaldir. Ana hücrenin (sporangium) çeşitli yerlerinde bulunabilirler. Hücrenin tam ucunda yerleşmişse "terminal", uca yakın yerde ise "subterminal", orta kısmında bulunursa "sentral" spor olarak isimlendirilir.

Sporun çapı bakteri hücresinin eninden büyük olabilir. Bu durumda spor bakteriye limon, raket, tokmak vb. şekilleri kazandırır.

Endosporun hücre yapısı, bakterinin vejetatif şekline göre oldukça farklıdır. Tam gelişmiş bir sporda içeriden dışarıya doğru şu kısımlar yer alır. (1) Öz veya Spor protoplastı (hücre duvarı, sitoplazmik membran nukleoid bulunan yapıdır) (2) Kabuk veya korteks (gevşek olarak çarpaz bağlanmış peptidoglikan), (3) Spor örtüsü (spora özel proteinlerden yapılmış), (4) Ekzosporium (İnce proteinden yapılmış örtü). Böyle yapılar vejetatif hücrede yoktur. Endospor Oluşumu, tüm sporlanma süresi 8-15 saat arasında değişmektedir. Endospor yıllarca inaktif durumda bulunabilir. 25-40 milyon yaşında bir endospor kehribar içinde bulunmuştur. Ortam şartları uygun olduğunda tekrar vejetatif hücre haline döner. Bu işlem üç basamakta olur:

1. Aktivasyon: Yüksek ısıda (öldürücü olmayan ısı) endospor birkaç dakika ısıtılarak endospor aktive edilir.

2. Çimlenme: Aktive edilmiş spor uygun besiyerine konursa birkaç dakika içinde çimlenir. Sporum ışığı kırma özelliği, boyalarla boyanmama özelliği, ısı ve kimyasallara karşı olan direnci ortadan kalkar. Ca-dipikolinik asit/korteks yapısı SASPs ortadan kalkar.

3. Gelişme: Su alır, yeni RNA, DNA ve proteinler sentezlenir. Yeni hücre, spor örtüsü kırılmış yapıdan oluşur.

Özet

Endospor genelde Gram (+) bakterinin bazı tipleri tarafından yapılan oldukça ısıya dirençli yapıdır. Endosporlarda dehidre olmuş spor örtüsü, temel makromoleküller, kalsiyum dipikolinik asit, küçük asitte eriyebilen proteinler vardır. Bu yapılar vegetatif hücrede yoktur. Sporlar uzun yıllar inaktif durumda olabilirler. Fakat ortam koşulları düzelir düzelmez yeniden vegetatif hücre oluştururlar.

DENEY

- 1- 5 gram toprak örneğini 45 ml steril seyreltme çözeltilisine katınız, şişenin kapağını kapatınız.
- 2- Aynı işlem ikinci kez yapılarak iki paralelde çalışınız. İkinci örnek kontrol amaçlı yapılır, ağzı açıktır ve içine termometre konulur. Bu işlemin amacı asıl örneğin 85°C'ye ulaştığından emin olmaktır.
- 3- Su banyosunda iki örneği de 85°C de 10 dakika pastörize ediniz ve sonrasında su banyosundan çıkartınız.
- 4- Yayma yöntemi kullanarak 1 ml örneği daha önceden hazırlanmış NA besiyerlerine ekiniz.
- 5- 30°C de 2 gün belettikten sonra sayımlarınızı yaparak, 1 ml toprak numunesi içerisinde kaç tane sporlu bakteri bulunduğunu hesaplayınız.

SORULAR

Araştırma Soruları:

- 1-) Vejetatif Hücre ve Endosporları, Mikroskopik görünüş, kalsiyum içeriği, enzimatik aktivite, su içeriği, stoplazmik pH, boyalarla boyanabilme özelliklerine göre kıyaslayınız.
- 2-) Aerob ve anaerob apor yapıcı bakterilere birer tane örnek veriniz. Bakteriler hangi durumlarda spor oluşturur kısaca açıklayınız.

Deney Soruları:

Analizi yapılan toprak numunesinin 1 ml'sinde kaç adet koloni oluşmuştur sayınız ve hesaplayınız.