

**Bu kitaba sığmayan
daha neler var!**



Karekodu okutun, bu kitapla ilgili EBA içeriklerine ulaşın!

ÖDS

**ÖĞRENCİ/ÖĞRETMEN
DESTEK SİSTEMİ**

<https://ods.eba.gov.tr>

- Konu Anlatımlı Ders Videoları
- Soru Çözüm Videoları
- Ders Anlatım Videoları
- Çoktan Seçmeli Sorular



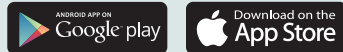
Kişiselleştirilmiş Öğrenme ve Raporlama

Animasyonlar, 3B Modeller, Simülasyon ve Oyunlar

Paylaşım ve İş birliği

Ortak / Özel Takvim

eba
www.eba.gov.tr



**BU DERS KİTABI MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞINCA
ÜCRETSİZ OLARAK VERİLMİŞTİR.
PARA İLE SATILAMAZ.**

ISBN: 978-975-11-6224-3

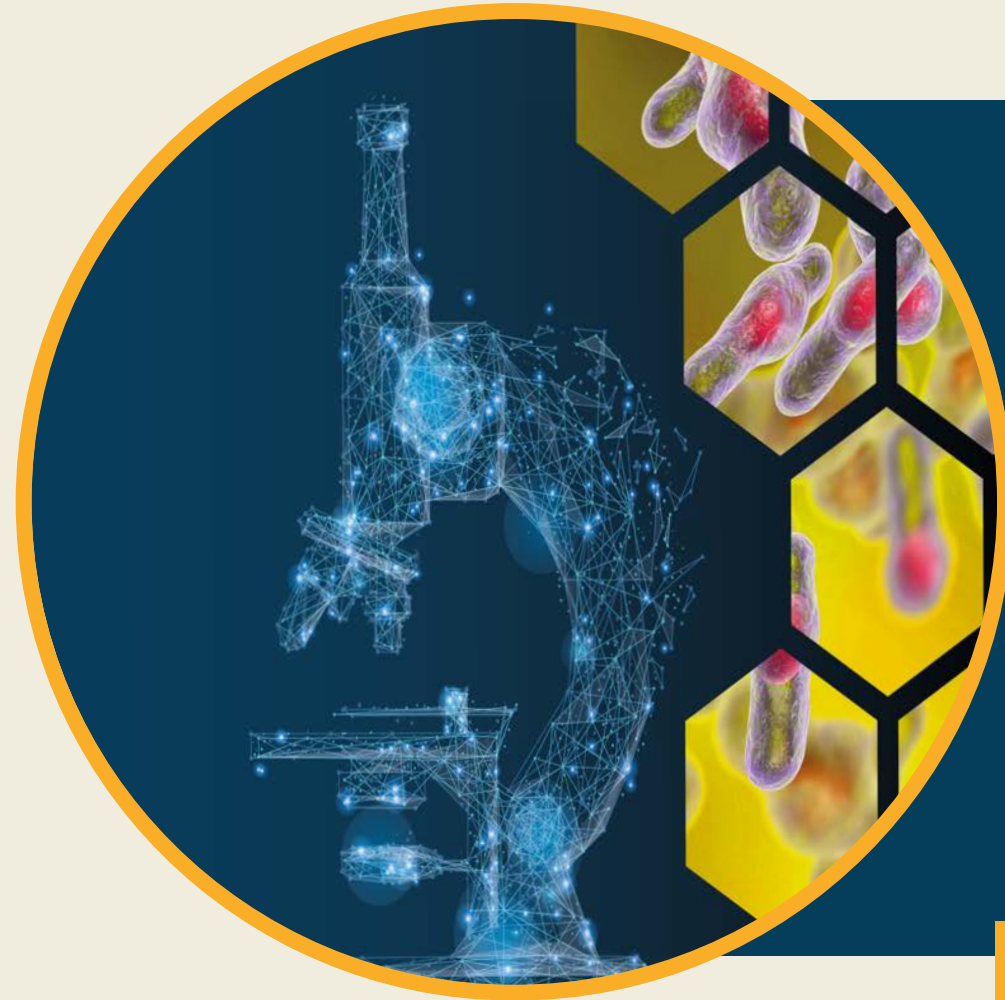
Bandrol Uygulamasına İlişkin Usul ve Esaslar Hakkında Yönetmelik'in 5'inci Maddesinin İkinci Fıkrası Çerçevesinde Bandrol Taşınması Zorunlu Değildir.

GIDA TEKNOLOJİSİ ALANI **GIDALARDA MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER** 10 DERS MATERYALI

MESLEKİ VE TEKNİK ANADOLU LİSESİ

GIDALARDA

MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER



GIDA TEKNOLOJİSİ
ALANI

10

DERS MATERYALI



MESLEKİ VE TEKNİK ANADOLU LİSESİ
GIDA TEKNOLOJİSİ ALANI

GIDALARDA MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER

10

DERS MATERYALİ

YAZARLAR

Dr. Berna ÜLKÜ

Filiz DOĞAN

Özgür KARAKUŞ

Yunus ÇILGIN



MİLLİ EĞİTİM BAKANLIĞI YAYINLARI : 7956
YARDIMCI VE KAYNAK KİTAPLAR DİZİSİ : 1884

Her hakkı saklıdır ve Milli Eğitim Bakanlığına aittir. Ders materyalinin, soru ve şekilleri kısmen de olsa hiç bir suretle alınıp yayımlanamaz.

HAZIRLAYANLAR

Dil Uzmanı	Nurdagül TÜRKAN
Program Geliştirme Uzmanı	Murat DAĞ
Ölçme Değerlendirme Uzmanı	Fatma YILMAZ
Rehberlik Uzmanı	Sümeyye Betül HALLAK
Görsel Tasarım Uzmanı	Serkan KOCABAŞ

ISBN 978-975-11-6224-3

Millî Eğitim Bakanlığınının 24.12.2020 gün ve 18433886 sayılı oluru ile Meslekî ve Teknik Eğitim Genel Müdürlüğünce ders materyali olarak hazırlanmıştır.



İSTİKLÂL MARŞI

Korkma, sönmez bu şafaklarda yüzen al sancak;
Sönmeden yurdumun üstünde tüten en son ocak.
O benim milletimin yıldızıdır, parlayacak;
O benimdir, o benim milletimindir ancak.

Çatma, kurban olayım, çehreni ey nazlı hilâl!
Kahraman ırkıma bir gül! Ne bu şiddet, bu celâl?
Sana olmaz dökülen kanlarımız sonra helâl.
Hakkıdır Hakk'a tapan milletimin istiklâl.

Ben ezelden beridir hür yaşadım, hür yaşarım.
Hangi çılgın bana zincir vuracakmış? Şaşarım!
Kükremiş sel gibiyim, bendimi çiğner, aşarım.
Yırtarım dağları, enginlere sığmam, taşarım.

Garbın âfâkını sarmışsa çelik zırhlı duvar,
Benim iman dolu göğsüm gibi serhaddim var.
Ulusun, korkma! Nasıl böyle bir imanı boğar,
Medeniyet dediğin tek dişi kalmış canavar?

Arkadaş, yurduma alçakları uğratma sakın;
Siper et gövdeni, dursun bu hayâsızca akın.
Doğacaktır sana va'dettiği günler Hakk'ın;
Kim bilir, belki yarın, belki yarından da yakın.

Bastığın yerleri toprak diyerek geçme, tanı:
Düşün altındaki binlerce kefensiz yatanı.
Sen şehit oğlusun, incitme, yazıktır, atanı:
Verme, dünyaları alsan da bu cennet vatanı.

Kim bu cennet vatanın uğruna olmaz ki feda?
Şüheda fışkıracak toprağı sıksan, şüheda!
Cânı, cânânı, bütün varımı alsın da Huda,
Etmesin tek vatanımdan beni dünyada cüda.

Ruhumun senden İlâhî, şudur ancak emeli:
Değmesin mabedimin göğsüne nâmahrem eli.
Bu ezanlar -ki şehadetleri dinin temeli-
Ebedî yurdumun üstünde benim inlemeli.

O zaman vecd ile bin secde eder -varsa- taşım,
Her cerâhamdan İlâhî, boşanıp kanlı yaşım,
Fışkırır ruh-ı mücerret gibi yerden na'sım;
O zaman yükselerek arşa değer belki başım.

Dalgalan sen de şafaklar gibi ey şanlı hilâl!
Olsun artık dökülen kanlarımın hepsi helâl.
Ebediyyen sana yok, ırkıma yok izmihlâl;
Hakkıdır hür yaşamış bayrağımın hürriyyet;
Hakkıdır Hakk'a tapan milletimin istiklâl!

Mehmet Âkif Ersoy

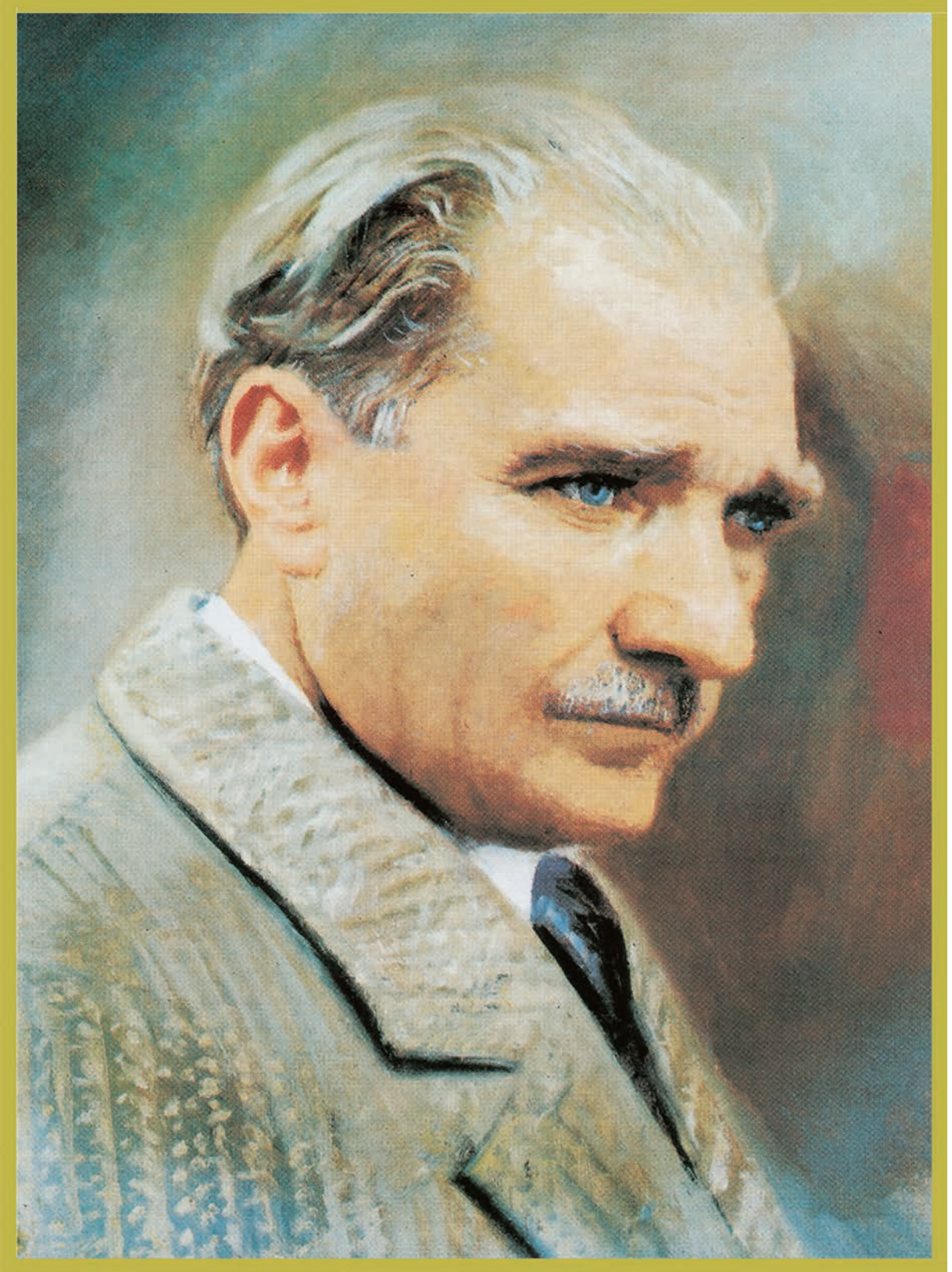
GENÇLİĞE HİTABE

Ey Türk gençliği! Birinci vazifen, Türk istiklâlini, Türk Cumhuriyetini, ilelebet muhafaza ve müdafaa etmektir.

Mevcudiyetinin ve istikbalinin yegâne temeli budur. Bu temel, senin en kıymetli hazinendir. İstikbalde dahi, seni bu hazineden mahrum etmek isteyecek dâhilî ve hâricî bedhahların olacaktır. Bir gün, istiklâl ve cumhuriyeti müdafaa mecburiyetine düşersen, vazifeye atılmak için, içinde bulunacağın vaziyetin imkân ve şeraitini düşünmeyeceksin! Bu imkân ve şerait, çok namüsaid bir mahiyette tezahür edebilir. İstiklâl ve cumhuriyetine kastedecek düşmanlar, bütün dünyada emsali görülmemiş bir galibiyetin mümessili olabilirler. Cebren ve hile ile aziz vatanın bütün kaleleri zapt edilmiş, bütün tersanelerine girilmiş, bütün orduları dağıtılmış ve memleketin her köşesi bilfiil işgal edilmiş olabilir. Bütün bu şeraitten daha elîm ve daha vahim olmak üzere, memleketin dâhilinde iktidara sahip olanlar gaflet ve dalâlet ve hattâ hıyanet içinde bulunabilirler. Hattâ bu iktidar sahipleri şahsî menfaatlerini, müstevlîlerin siyasî emelleriyle tevhit edebilirler. Millet, fakr u zaruret içinde harap ve bîtap düşmüş olabilir.

Ey Türk istikbalinin evlâdı! İşte, bu ahval ve şerait içinde dahi vazifen, Türk istiklâl ve cumhuriyetini kurtarmaktır. Muhtaç olduğun kudret, damarlarındaki asil kanda mevcuttur.

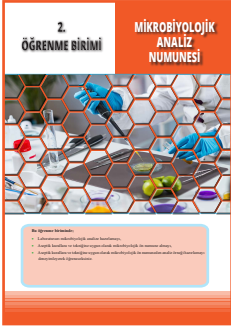
Mustafa Kemal Atatürk



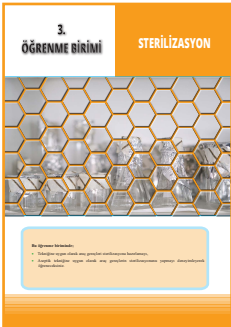
MUSTAFA KEMAL ATATÜRK



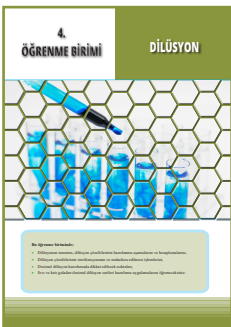
1. MİKROBİYOLOJİ MALZEMELERİ VE ARAÇLARI	14
1.1. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kişisel Hazırlıklar	14
1.1.1. Laboratuvar Kıyafetlerinin Taşınması Gereken Özellikler	14
1.1.2. Laboratuvarda Kullanılması Gereken Koruyucu Donanımlar	14
1.1.3. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Uyulması Gereken Genel Çalışma Kuralları	15
1.2. Mikrobiyoloji Laboratuvarının Düzeni	16
1.2.1. Mikrobiyolojik Kalite Kontrolünün Önemi	16
1.2.2. Mikrobiyoloji Laboratuvarının Taşınması Gereken Özellikler ve Laboratuvar Yerleşim Planı	16
1.3. Mikrobiyoloji Laboratuvarı Araç gereci	17
1.3.1. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kullanılan Cam ve Porselen Malzemeler	17
1.3.2. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kullanılan Ekim Malzemeleri	18
1.3.3. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kullanılan Malzemelerin Temizliği	18
1.3.4. Mikrobiyolojik Çalışmalarda Kullanılan Başlıca Laboratuvar Cihazları	19
1.4. Mikroskop ve Mikroskobun Kullanımı	19
1.4.1. Mikroskop Çeşitleri	20
1.4.2. Mikroskobun Büyütme Gücü	21
1.4.3. Basit Işık Mikroskobu ile Çalışma Teknikleri ve Bu Konuda Dikkat Edilecek Hususlar	21
1.4.4. Mikroskobun Temizliği ve Bakımı	21
1. Uygulama :	22
2. Uygulama :	25
3. Uygulama :	28
4. Uygulama :	31
5. Uygulama :	34
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	37



2. MİKROBİYOLOJİK ANALİZ NUMUNESİ	40
2.1. Aseptik Tekniğe Uygun Laboratuvar Hazırlığı	40
2.1.1. Dezenfeksiyonun Tanımı	40
2.1.2. Dezenfektan Maddelerin Çeşitleri ve Özellikleri	40
2.1.3. Dezenfektan Maddelerin Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kullanımı	41
2.1.4. Dezenfektanların Muhafazası	41
2.1.5. Laboratuvar Tezgâhlarının ve Masaların Dezenfeksiyonu	41
2.2. Mikrobiyolojik Analizler İçin Ön Örnek Alma	41
2.2.1. Örnek Alma Kaplarının Özellikleri	42
2.2.2. Örnek Alma Sırasında Dikkat Edilecek Hususlar	42
2.2.3. Örnek Miktarını Etkileyen Faktörler	43
2.2.4. Örnek Alma Planı	43
2.2.5. Üretim Yerlerinden Mikrobiyolojik Örnek Alma Aşamaları	45
2.2.6. Alınan Örneklerin Taşınmasında ve Muhafazasında Dikkat Edilecek Hususlar	46
2.3. Analiz Örneğini Hazırlama	46
2.3.1. Örneğin Laboratuvara Kabulü ve Laboratuvar Kayıtları	46
2.3.2. Ambalajın Açılması	47
2.3.3. Analiz Örneklerini Tartma	47
2.3.4. Homojenizasyon İşlemi ve Kullanılan Araçlar	47
1. Uygulama :	49
2. Uygulama :	51
3. Uygulama :	54
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	57



3. STERİLİZASYON	60
3.1. Araç Gereci Sterilizasyona Hazırlama	60
3.1.1. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Sterilizasyonun Önemi	60
3.1.2. Sterilizasyon Yöntemleri	61
3.1.3. Araç Gerecin Sterilizasyona Hazırlanması	63
3.2. Araç Gerecin Sterilizasyonu	63
3.2.1. Kuru Sıcak Hava ile Sterilizasyon Araçları	63
3.2.2. Buharla Sterilizasyon Araçları	64
1. Uygulama :	65
2. Uygulama :	68
3. Uygulama :	71
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	74



4. DİLÜSYON	76
4.1. Dilüsyon Çözeltisi	76
4.1.1. Dilüsyon Sıvıları ve Tampon Çözeltiler	76
4.1.2. Dilüsyon Çözeltisi Hazırlama İşlemi	78
4.1.3. Dilüsyon Çözeltileri Hazırlanırken Dikkat Edilecek Hususlar	78
4.1.4. Dilüsyon Çözeltileri Hazırlanırken Yapılan Hesaplamalar	78
4.1.5. Dilüsyon Çözeltilerinin Otoklavda Sterilize Edilmesi	79
4.1.6. Steril Edilmiş Dilüsyon Çözeltilerinin Saklanması	80
4.2. Desimal Dilüsyon Serisi Hazırlama	80
4.2.1. Desimal (Ondalık) Dilüsyon Çözeltileri	80
4.2.2. Desimal Dilüsyon Hazırlamada Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar	80
4.2.3. Desimal Dilüsyon Çözeltileri Hazırlama Aşamaları	81

1. Uygulama :	82
2. Uygulama :	85
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	88



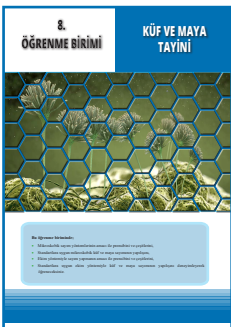
5. BESİYERİ	92
5.1. Tartım Yapma	92
5.1.1. Besiyeri ve Bileşimi	92
5.1.2. Besiyeri Çeşitleri	94
5.1.3. Hazır Besiyeri Hesaplamaları	95
5.2. Besiyeri Hazırlama ve Sterilize Etme	97
5.2.1. Besiyeri Karışımlarını ve Bileşenlerini Kaba Aktarma ve Çözündürme	97
5.2.2. Besiyeri Berraklaştırma	98
5.2.3. Besiyerinde pH Ayarlama ve pH Ayarlamasının Önemi	98
5.2.4. Besiyerinin Sterilizasyonu	98
1. Uygulama :	100
2. Uygulama :	103
3. Uygulama :	107
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	110



6. EKİM YÖNTEMLERİ	114
6.1. Sıvı Besiyerine Ekim Yapma	114
6.1.1. Sıvı Besiyerine Ekim İşleminde Kullanılan Araç Gereç	115
6.1.2. Sıvı Besiyerine Öze ile Ekim İşlemi Aşamaları	115
6.1.3. Sıvı Besiyerine Pipet ile Ekim İşlemi Aşamaları	116
6.2. Çizme Yöntemi ile Ekim Yapma	116
6.2.1. Çizme Yöntemi ile Ekim İşleminde Kullanılan Araç Gereç	117
6.2.2. Çizme Yöntemi ile Ekim İşlemi Aşamaları	117
6.3. Dökme Plak Yöntemi ile Ekim Yapma	117
6.3.1. Dökme Yöntemi ile Ekim İşleminde Kullanılan Araç Gereç	118
6.3.2. Tek Tabaka Dökme Yöntemi ile Ekim İşlemi Aşamaları	118
6.3.3. Çift Tabaka Dökme Plak Yöntemi ile Ekim İşlemi Aşamaları	118
6.4. Yayma Yöntemi ile Ekim Yapma	119
6.4.1. Yayma Yöntemi ile Ekim İşleminde Kullanılan Araç Gereç	119
6.4.2. Yayma Yöntemi ile Ekim İşlemi Aşamaları	119
6.5. İnkübasyon	119
6.5.1. İnkübasyon İşleminde Kullanılan Cihazlar	120
6.5.2. İnkübasyonda Dikkat Edilecek Hususlar	120
6.5.3. İnkübatörde İnkübasyon	121
6.5.4. Su Banyosunda İnkübasyon	121
1. Uygulama :	122
2. Uygulama :	125
3. Uygulama :	128
4. Uygulama :	131
5. Uygulama :	134
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	137



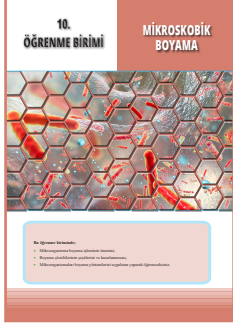
7. KÜLTÜREL SAYIM YÖNTEMLERİ	140
7.1. Kültürel Sayım ve Koloni Sayımı	140
7.1.1. Kültürel Sayımın Amacı ve Yöntemleri	141
7.1.2. Koloni Sayımı ve Koloni Sayıcısının Kullanımı	143
7.2. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi	145
7.2.1. Sularda En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi	145
7.2.2. Gıdalarda En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi	146
1. Uygulama :	148
2. Uygulama :	151
3. Uygulama :	154
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	157



8. KÜF VE MAYA TAYİNİ	160
8.1. Howard Lamı ile Küflü Saha Sayımı	160
8.2. Thoma Lamı ile Maya Sayımı	162
8.3. Ekim Yöntemiyle Maya ve Küf Tayini	163
1. Uygulama :	164
2. Uygulama :	167
3. Uygulama :	170
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	173



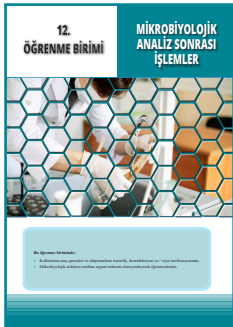
9. MİKROSKOBİK İNCELEME	176
9.1. Numuneden Preparat Hazırlama	176
9.1.1. Preparatın Tanımı ve Preparat Hazırlamanın Önemi	176
9.1.2. Lamin Temizlenmesi	176
9.2. Mikroskopta İnceleme	179
9.2.1. Bakteri Morfolojilerini İnceleme	179
1. Uygulama :	187
2. Uygulama :	190
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	193



10. MİKROSKOBİK BOYAMA	196
10.1. Boyama Yöntemine Çözelti Seçme	196
10.1.1. Mikroorganizmaları Boyamada Kullanılan Çözeltiler	196
10.1.2. Boya Çözeltisi Hazırlama	196
10.1.3. Boya Çözeltisi Kullanma ve Saklama Koşulları	197
10.1.4. Boyama İşlemine Preparat Hazırlanması	198
10.2. Basit Boyama	199
10.2.1. Kristal Viyole ile Boyama	199
10.2.2. Negatif Boyama	200
10.3. Gram Boyama	200
10.4. Spor (Endospor) Boyama	201
1. Uygulama :	202
2. Uygulama :	205
3. Uygulama :	208
4. Uygulama :	211
5. Uygulama :	214
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	217



11. İŞLETME ORTAMINDA HİJYEN VE SANİTASYON KONTROLÜ	220
11.1. Çalışanların Ellerinden Ekim Yapma	220
11.1.1. Çalışanların Ellerinden Ekim Yapma Aşamaları ve Dikkat Edilecek Noktalar	221
11.2. Kritik Kontrol Noktalarından Ekim Yapma	221
11.2.1. Kritik Kontrol Noktalarından Mikrobiyolojik Kontroller ve Önemi	222
11.2.2. Kritik Kontrol Noktaları İçin Hazırlanan Mikrobiyolojik Kontrol Programları ve Özellikleri	223
11.2.3. Saptanmış Kritik Kontrol Noktalarından Mikrobiyolojik Örnek Alma Aşamaları ve Dikkat Edilecek Noktalar	225
11.3. İşletme Ortamından (Havadan) Ekim Yapma	226
11.3.1. İşletme Ortamından (Havadan) Ekim Yapma Planı ve Özellikleri	227
11.3.2. İşletme Ortamından (Havadan) Ekim Yapma Aşamaları ve Dikkat Edilecek Noktalar	227
1. Uygulama :	228
2. Uygulama :	231
3. Uygulama :	234
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	237



12. MİKROBİYOLOJİK ANALİZ SONRASI İŞLEMLER	240
12.1. Kullanılan Araçların Temizliği ve Sterilizasyonu	240
12.1.1. Kullanılmış Araç Gereci ve Ortamı Dezenfekte Etme Aşamaları ve Dikkat Edilecek Noktalar	240
12.1.2. Günlük ve Haftalık Dezenfeksiyon İşlemleri	241
12.1.3. Kullanılmış Araç Gerecin Sterilizasyonunda Dikkat Edilecek Hususlar	242
12.2. Atıkların Kuralına Uygun Atılması	244
12.2.1. Atık Yönetimi	244
1. Uygulama :	246
2. Uygulama :	249
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	251

KAYNAKÇA	253
GENEL AĞ KAYNAKÇASI	254
GÖRSEL KAYNAKÇASI	254
TABLO KAYNAKÇASI	256
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI	255



DERS MATERYALİNİN TANITIMI

Öğrenme biriminin adını gösterir.

Öğrenme birimi numarasını gösterir.

1. ÖĞRENME BİRİMİ

MİKROBİYOLOJİ MALZEMELERİ VE ARAÇLARI

Bu öğrenme biriminde;

- Hijyen ve sanitasyon kurallarına uygun şekilde kişisel hazırlık yapmayı,
- Sağlık ve güvenliği kurallarına, ergonomi ilkelere ve aseptik kurallara uygun şekilde laboratuvar düzenlemeyi,
- Mikrobiyoloji laboratuvarı araç gereçlerini amacına uygun şekilde kullanmayı,
- Mikroskopu temizliğine uygun şekilde kullanarak verilen preparata görüntü bulmayı deneyimleyerek öğrenecektiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

1.1. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kişisel Hazırlıklar
1.2. Mikrobiyoloji Laboratuvarının Düzeni
1.3. Mikrobiyoloji Laboratuvarı Araç Gereçleri
1.4. Mikroskop ve Mikroskopun Kullanımı

TEMEL KAVRAMLAR
Laboratuvar önlük maske bone eldiven mikroskop

Öğrenme biriminde neler öğrenileceğini gösterir.

Derse başlanmadan önce yapılması gereken hazırlıkları gösterir.

Konu başlığını gösterir.

1. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

- Laboratuvar çalışmalarında iş sağlığı ve güvenliği neden önemlidir?
- Gıda analizlerinde güvenilir sonuçların elde edilmesinde laboratuvar düzeninin önemi tartışınız.
- Gadaların bulunan bakteriyel, küf ve mayaların morfolojik özelliklerinin nasıl tespit edildiğini araştırınız.

1. MİKROBİYOLOJİ MALZEMELERİ VE ARAÇLARI

1.1. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kişisel Hazırlıklar

Mikrobiyoloji laboratuvarı; gıda maddelerinin üretiminde ham maddelerin başlıyarak hazırlama, işleme, üretim, ambalajlama, depolama, taşıma ve dağıtım aşamalarının tümünde bulunan mikroorganizmaların arandığı ve sayıldığı bir laboratuvardır.

Mikrobiyoloji laboratuvarında genellikle canlı mikroorganizma ile çalışıldığından laboratuvar güvenliği tehlikeye atan bazı durumlar ortaya çıkabilir. Bu nedenle çalışan tüm mikroorganizmalar patojen kabul edilerek aseptik teknikler uygulanmalıdır. Aseptik teknik, mikroorganizmalardan uzak ve arındırılmış ortam ve koşullarda çalışmak olarak tanımlanabilir. Aseptik teknik uygulamaları; incelemek istenen kültürlere, çevreden istenmeyen mikroorganizmaların bulaşmasını engellemek ve kültürdeki mikroorganizmaların çevreye ve çalışanlara bulaşmasını önlemek bakımından önem arz etmektedir.

Ayrıca laboratuvar güvenliğinin sağlanması, sağlığı ve güvenliği sonuçları elde edilmesinde için laboratuvar çalışmalarında kişisel koruyucu donanımlara dikkatli kullanımı, kişisel hijyen ve laboratuvar kurallarına uyulması gibi ilave önlemlerin alınması gerekmektedir.

1.1.1. Laboratuvar Kıyafetlerinin Taşınması Gereken Özellikler

Laboratuvar çalışmaları için çalışma şartlarına uygun ve rahat çalışmaya sağlayabilecek özellikte kıyafetler seçilmelidir. Çok bol giysiler ile bedeni sıkı saran kıyafetler laboratuvarlarda rahat hareket etmeyi engelleyeceğinden bu tür kıyafetler tercih edilmemelidir.

Laboratuvarda çalışılan süre boyunca herhangi bir çözücü ya da kimyasal madde dökülmesine ve cam kırıklarına karşı tedbir olarak su geçirmez, kolay temizlenebilir, kaymayan ve burnu kapalı ayakta giyilmelidir. Tozlu çevre koşulları, mikrobiyolojik analiz sonuçlarını olumsuz etkilediğinden çamaşu ayakkabılarla laboratuvara girilmemelidir.

1.1.2. Laboratuvarında Kullanılması Gereken Koruyucu Donanımlar

Mikroorganizma; insan vücuduna deri yoluyla, solunum ya da ağız yoluyla alınmalıdır. Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışırken gözlüğü, cildi, vücudu ve giysileri korumak amacıyla kullanılması gereken kişisel koruyucu donanımlar; laboratuvar önlüğü, maske, göze ya da yüz koruyucu, bone ve eldiven olarak sıralanabilir. (Görsel 1.1).

Laboratuvar önlüğü; cildin ve giysilerin mikroorganizma, toz, kimyasal madde ve boyalardan korunmasını sağlar. Ayrıca bulaşmanın laboratuvar dışında yayılmasını önler. Laboratuvar önlüğü alevle dayanıklı malzemelerle üretilmelidir. Önlüğün beyaz, dikiş kapaması olmayan ve yıkanarak temizlenmelidir. Önlüğün kullanılması.

Görsel 1.1: Kişisel koruyucu donanımlar

Alt konu başlıklarını gösterir.

Konu anlatımını gösterir.

Değerlendirme formunu gösterir.

Uygulama Yapacağı **Süre: 2 Ders Saati**

1. UYGULAMA: LABORATUVAR ÇALIŞMALARINDA KİŞİSEL HAZIRLIKLAR

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- Çalışma alanında kullanılmayacağına herhangi bir malzeme bulundurmuyunuz.
- Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- Bedeni etkilerinizi uygun, rahat ve güvenli çalışmaya sağlayabilecek kişisel koruyucu donanımları kullanınız.
- Çalışmada kullanacağınız kişisel koruyucu ekipmanlarda güvenli çalışmaya engelleyecek herhangi bir fiziksel hasarın veya kontaminasyonun olup olmadığını kontrol ediniz.
- Uygulama sonunda kullandığınız bone, eldiven, maske vb. tek kullanımlık KKD'leri usulüne uygun şekilde imha ediniz.
- Çalışma bitiminde kullandığınız diğer araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

✓ Laboratuvar önlüğü	✓ Nitril eldiven	✓ Su
✓ Maske	✓ Göz ya da yüz koruyucu	✓ Sabun
✓ Bone	✓ El dezenfektanı	✓ Kağıt havlu

İşlem Basamakları

- Laboratuvara girmeden önce üzerinizde mont, hurka, cecek, şal, atkı vb. giysiler ile saat, kulaklık, çanta gibi herhangi bir takı veya aksesuar var ise bunları çıkarınız.
- Saçlarınız omuz hizasında ise saçlarınıza arkadan toplayınız.
- Ellerinizi kesik, yara ve benzeri durumlar var ise bunların izlerini su geçirmez bir bantla kapatınız.
- Ellerinizi el yıkama talimatları doğrultusunda yıkayınız ve dezenfekte ediniz (Görsel 1.12).
- Laboratuvar önlüğünüzü giyiniz ve önlüğün tüm döğmelerinin kapalı olduğundan emin olunuz.
- Sıraşıyla bone, maske ve göz ya da yüz koruyucunuzu takınız; ardından eldivenlerinizi giyiniz.
- Grup çalışması yaparak mikrobiyoloji laboratuvarındaki olası tehlikeleri ve bunlara bağlı olarak oluşabilecek riskleri belirlemek için inceleme yapınız.
- Ders öğretilen ile birlikte belirlendiğini tehlikelere ve risklere karşı kullanılması gereken KKD'ler hakkında grup tartışması yapınız.
- Çalışma bitiminde öncelikle eldivenlerinizi çıkarınız. Eldivenlerin kontamine olmuş dış yüzeylerinin cildinize temas etmesini önleyiniz.
- Ellerinizi el yıkama talimatları doğrultusunda yıkayınız ve dezenfekte ediniz (Görsel 1.12).
- Sıraşıyla göz ya da yüz koruyucunuzu, maskenizi ve benzeri güvenli bir şekilde çıkarınız.
- Laboratuvar önlüğünüzü çıkarınız, ellerinizi el yıkama talimatları doğrultusunda yıkayınız ve dezenfekte ediniz (Görsel 1.12).

Yapılacak uygulama numarasını ve adını gösterir.

Uygulamanın süresini gösterir.

Sonuç ve Yorum

"Mikrobium Kullanımı" Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlemlenmiş gözlenen beceriler "Ölçütler" sütununda listelenmiştir. Beceriyi ölçüm gözetim sonuçlarını "X" işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analize kullanılmadık araç gereci hazırladı.					
Mikrobium preparatı incelemeye hazır hale getirdi.					
Mikroskopta görüntüyü buldu.					
Preparat tüm objektiflerle incelendi.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temel ilk kurallara uygun olarak çalışma ortamı ile mikrobium temizliğini ve bakımını yaptı.					
Süreysi verimli şekilde kullandı.					

Formun Puanı: Gerçek Puan:

Değerlendirme: Form puanını 2,85 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise "BAŞARILI" sayarsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.

1. ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROBİYOLOJİ MALZEMELERİ VE ARAÇLARI



Bu öğrenme biriminde;

- Hijyen ve sanitasyon kurallarına uygun şekilde kişisel hazırlık yapmayı,
- Sağlık ve güvenlik kurallarına, ergonomi ilkelerine ve aseptik kurallara uygun şekilde laboratuvar düzenlemeyi,
- Mikrobiyoloji laboratuvarı araç gereçlerini amacına uygun şekilde kullanmayı,
- Mikroskopu tekniğine uygun şekilde kullanarak verilen preparatta görüntü bulmayı deneyimleyerek öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 1.1. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kişisel Hazırlıklar
- 1.2. Mikrobiyoloji Laboratuvarının Düzeni
- 1.3. Mikrobiyoloji Laboratuvarı Araç Gereci
- 1.4. Mikroskop ve Mikroskopun Kullanımı

TEMEL KAVRAMLAR

Laboratuvar önlük maske bone eldiven mikroskop



1. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Laboratuvar çalışmalarında iş sağlığı ve güvenliği neden önemlidir?
2. Gıda analizlerinde güvenilir sonuçların elde edilmesinde laboratuvar düzeninin önemini tartışınız.

1.1. MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARINDA KİŞİSEL HAZIRLIKLAR

Mikrobiyoloji laboratuvarı; gıda maddelerinin üretiminde ham maddeden başlayarak hazırlama, işleme, üretim, ambalajlama, depolama, taşıma ve dağıtım aşamalarının tümünde bulunabilen mikroorganizmaların arandığı ve sayıldığı bir laboratuvardır.

Mikrobiyoloji laboratuvarında genellikle canlı mikroorganizma ile çalışıldığından laboratuvar güvenliğini tehlikeye atan bazı durumlar ortaya çıkabilir. Bu nedenle çalışılan tüm mikroorganizmalar patojen kabul edilerek aseptik teknikler uygulanmalıdır. **Aseptik teknik**, mikroorganizmalardan uzak ve arındırılmış ortam ve koşullarda çalışmak olarak tanımlanabilir. Aseptik teknik uygulamaları; incelenmek istenen kültürlere, çevreden istenmeyen mikroorganizmaların bulaşmasını engellemek ve kültürdeki mikroorganizmaların çevreye ve çalışanlara bulaşmasını önlemek bakımından önem arz etmektedir.

Ayrıca laboratuvar güvenliğinin sağlanması, sağlıklı ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için laboratuvar çalışmalarında kişisel koruyucu donanımların doğru kullanımı, kişisel hijyen ve laboratuvar kurallarına uyulması gibi ilave önlemlerin alınması gerekmektedir.

1.1.1. Laboratuvar Kıyafetlerinin Taşınması Gereken Özellikler

Laboratuvar çalışmaları için çalışma şartlarına uygun ve rahat çalışmayı sağlayabilecek özellikte kıyafetler seçilmelidir. Çok bol giysiler ile bedeni sıkı saran kıyafetler laboratuvarında rahat hareket etmeyi engelleyeceğinden bu tür kıyafetler tercih edilmemelidir.

Laboratuvarında çalışılan süre boyunca herhangi bir çözeltili ya da kimyasal madde dökülmesine ve cam kırıklarına karşı tedbir olarak su geçirmez, kolay temizlenebilir, kaymayan ve burnu kapalı ayakkabılar giyilmelidir. Tozlu çevre koşulları, mikrobiyolojik analiz sonuçlarını olumsuz etkilediğinden çamurlu ayakkabılarla laboratuvara girilmemelidir.



Görsel 1.1: Kişisel koruyucu donanımlar

1.1.2. Laboratuvarında Kullanılması Gereken Koruyucu Donanımlar

Mikroorganizma; insan vücuduna deri, solunum ya da ağız yoluyla bulaşır. Mikrobiyoloji laboratuvarındaki çalışmalarda gözleri, cildi, vücudu ve giysileri korumak amacıyla kullanılması gereken kişisel koruyucu donanımlar; laboratuvar önlüğü, maske, göz ya da yüz koruyucu, bone ve eldiven olarak sıralanabilir (Görsel 1.1).

Laboratuvar önlüğü; cildin ve giysilerin mikroorganizma, toz, kimyasal madde ve boyalardan korunmasını sağlar. Ayrıca bulaşmanın laboratuvar dışında yayılmasını önler. Laboratuvar önlüğü aleve dayanıklı malzemeden üretilmiş ve diz kapağını örtecek uzunlukta olmalıdır. Önlüğün kolları uzun olmalı, önlük üzerinde cep bulunmamalıdır. Acil durumlarda hızlıca çı-



karılabilmesi için çift düğmeli önlükler tercih edilmelidir. Tüm çalışanların en az bir adet yedek önlüğü bulunmalıdır.

Maske, laboratuvar çalışanlarının mikroorganizma kültürlerinden ve kimyasallardan etkilenmelerini önlemek amacıyla kullanılır. Mikrobiyolojik çalışmalarda cilde uyumlu, kullanımı pratik ve tek kullanımlık steril maskeler tercih edilmelidir.

Göz ve yüz koruyucuları, çalışma esnasında mikroorganizmaların ve tehlikeli materyallerin sıçrama tehlikesine karşı kullanılır. Bu koruyucular, dayanıklı malzemeden üretilmiş ve dezenfekte edilebilir özellikte olmalıdır. Kolay takılabilmeli, sınırsız görüş ve hareket sağlamalıdır.

Bone, çalışma esnasında çalışanların saçlarına herhangi bir kimyasal veya mikrobiyolojik madde bulaşmaması ve alev çatısında yapılan işlemlerde saçların yanmaması için kullanılır. Yanmaz kumaştan yapılmış, cilde uyumlu ve tek kullanımlık steril boneler tercih edilmelidir.

Eldiven; çalışma esnasında fiziksel, kimyasal ve biyolojik maddelerin etkilerinden korunmak amacıyla kullanılır. Eldiven seçimi risk değerlendirmesine göre yapılmalıdır. Mikrobiyolojik çalışmalarda, kimyasal çözücülere ve küf toksinlerine karşı genel bir koruma sağladığından tek kullanımlık nitril eldivenler tercih edilmelidir.

1.1.3. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Uyulması Gereken Genel Çalışma Kuralları

- Laboratuvar çalışmalarında genel hijyen tedbirlerine mutlaka uyulmalıdır.
- Laboratuvarında rahat çalışmayı sağlayabilecek ve olası kazalardan koruyabilecek kıyafetler tercih edilmelidir. Laboratuvarında çalışma esnasında beyaz laboratuvar önlüğü giyilmeli ve önlüğün tüm düğmelerinin ilikli olmasına dikkat edilmelidir. Yapılan çalışmanın niteliğine ve maruz kalınan tehlikenin türüne göre diğer kişisel koruyucu donanımlar da (eldiven, maske, galoş, göz ya da yüz koruyucu) kullanılmalıdır.
- Laboratuvarında sakız çiğnenmemeli, hiçbir şey yenilip içilmemelidir.
- Laboratuvarında başkalarının da çalıştığı düşünülerek gürültü yapılmamalıdır. Laboratuvarında çalışan kişi, kendi güvenliğini ya da diğer çalışanların güvenliğini tehlikeye atacak gereksiz ve ani hareketlerden kaçınmalıdır.
- Çalışmaya başlamadan önce bankolar %70'lik alkolle dezenfekte edilmelidir.
- Çalışmalar sırasında hava akımından oluşacak kontaminasyonları önlemek için laboratuvarın kapısı ve pencereleri kapalı tutulmalıdır.
- Steril kabinde çalışma öncesi cihazın UV sterilizasyon ve havalandırma sistemi en az 20 dakika çalıştırılmalıdır.
- Çalışma esnasında eller, mikroorganizmalar ile kontamine olabileceğinden yüze, göze ve ağıza temas ettirilmemelidir.
- Bakteri kültürlerine ve kimyasallara ağızla pipetleme yapılmamalıdır. Bu amaçla bir puar, pipet pompası veya mikropipet kullanılmalıdır.
- İçinde mikroorganizma kültürü bulunan petri kutuları ve tüpler ağız açık şekilde tezgâh üzerine bırakılmamalıdır. Tüpler, tüp sporunda dik olarak tutulmalıdır.
- Lam, lamel, pipet, tüp, petri kutusu gibi kontamine araç gereç tezgâh üzerinde bırakılmamalı; içinde dezenfektan çözeltisi bulunan küvetin içerisinde toplanmalıdır.
- Yanıcı kimyasallarla bek alevine yaklaşılmamalıdır.
- Mikroorganizma kültürlerine ve kimyasallara elle dokunulmamalı, bunların bulunduğu kapların ağız açık bırakılmamalı, tadına bakılmamalı ve bu materyaller koklanmamalıdır.
- Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan buzdolabında, analiz numuneleri haricinde tüketim amaçlı hiçbir gıda maddesi bulundurulmamalıdır.



- Analiz numunelerinin, kültür materyallerinin ve kimyasalların bulunduğu kapların ağzı kapalı tutulmalı ve bu malzemeler doğru bir şekilde etiketlenmelidir. Kullanılan etiketler, kendinden yapışan özelliğe sahip olmalı; dil ile ıslatılmamalıdır. Etiketler tarih, çalışan kişinin adı ve soyadı, çalışılan mikroorganizma ile ilgili genel bilgiler içermelidir.
- Cihazlar kullanılırken cihaz kullanım talimatlarına uyulmalıdır. Cihazların arızalanması veya malzemelerin zarar görmesi durumunda hemen ders öğretmenine haber verilmelidir.
- Cihazlar, çalışma bitiminde uygun biçimde kapatılmalıdır. Cihazların bakımı ve temizliği talimatlara uygun olarak yapılmalıdır.
- Laboratuvarda kullanılan hiçbir araç gereç ve malzeme, sterilize edilmeden yıkanmamalı ya da çöpe atılmamalıdır.
- Çalışmanın sonunda çalışılan alan mutlaka temizlenmeli ve dezenfekte edilmelidir.
- Steril olan malzemeler ile steril olmayan malzemeler ayrı dolaplarda depolanmalıdır.
- Sterilitesinden emin olunmayan hiçbir malzeme kullanılmamalıdır.
- Ders öğretmenin izni olmadan hiçbir madde ve malzeme laboratuvar dışına çıkarılmamalıdır.
- Laboratuvar önlüğü ve diğer kişisel koruyucu donanımlarla laboratuvar dışına çıkılmamalıdır.

1.2. MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARININ DÜZENİ

Gıda laboratuvarlarının özellikleri işlevlerine göre bazı farklılıklar gösterir. Laboratuvarda materyalin çalışanlara, çalışanların materyallere zarar vermemesi bakımından fiziki yerleşim ile rahat ve düzenli bir laboratuvar ortamı son derece önemlidir.

1.2.1. Mikrobiyolojik Kalite Kontrolünün Önemi

Gıda güvenliği; gıda zincirinin herhangi bir basamağında ortaya çıkabilecek fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik risklerin önlenmesi için alınan tedbirler bütünüdür. Mikrobiyal ajanlar, gıda kaynaklı tehlikeler arasında ilk sırayı almaktadır.

Gıda maddelerinin üretiminde ham maddeden başlanarak son ürüne kadar olan aşamaların tümünde hijyenik koşullar sağlanmadığında gıda kaynaklı hastalık ve zehirlenmeler yönünde bir riskle karşılaşılması kaçınılmazdır. Ayrıca gıdaların bozulması ve çürümesi, istenmeyen mikroorganizmaların çoğalıp çevreye yayılması gibi tehlikeler ortaya çıkar. Bu amaçla temel mikrobiyolojik analizler ile gıdaların hijyenik durumlarının belirlenmesi gerekmektedir. Gıdanın mevzuatta belirlenmiş kalite sınırları içinde olup olmadığı mikrobiyoloji laboratuvarlarında yapılan çeşitli analizlerle kontrol edilir. Gıdadaki mikroorganizma sayısının fazla olması, işletmenin hijyenik şartlarının iyi olmadığını ve çalışanların hijyen kurallarına uymadığını işareti olarak kabul edilir. Gıda zinciri boyunca etkin bir kontrolün gerçekleştirilmesi, mikrobiyal bulaşmanın ortadan kaldırılması veya tolere edilebilir düzeye düşürülmesi önem arz etmektedir.



Görsel 1.2: Mikrobiyoloji laboratuvarı

1.2.2. Mikrobiyoloji Laboratuvarının Taşınması Gereken Özellikler ve Laboratuvar Yerleşim Planı

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında materyalin çalışana, çalışanın materyale zarar vermemesi ve güvenli çalışmanın sağlanabilmesi için mikrobiyoloji laboratuvarlarının sahip olması gereken özellikler ve fiziki yerleşimi planlanırken dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda sıralanmıştır (Görsel 1.2).

- Mikrobiyoloji laboratuvarında ekim odası mutlaka ayrı olmalıdır.
- Kontaminasyonun azaltılması bakımından mikrobiyoloji laboratuvarına çift kapı ile giriş sağlanmalıdır.
- Duvarlar, zemin ve tezgâhlar kolay temizlenebilir özellikte olmalı; deterjan ve dezenfektanlardan etkilenmemelidir.
- Laboratuvar gereksiz ekipman ile doldurulmamalıdır.
- Laboratuvar donatılarının yüzeyleri, toz tutmayan ve kolay temizlenebilir özellikte olmalıdır.
- Laboratuvar dolapları tavana kadar yapılmalı, tezgâhlar zeminden en az 20 cm yükseklikte olmalıdır.
- Laboratuvarda sıcaklık ve nem dengesini sağlayacak havalandırma sistemi bulunmalıdır.
- Laboratuvarda yeterli sayıda elektrik prizi, su musluğu, evye, gaz bağlantısı bulunmalıdır. Acil durumlarda rahatlıkla açılıp kapanabilen vanalar olmalıdır.
- Laboratuvar ortamında aşırı nemi önlemek için otoklavlar laboratuvar dışında olmalıdır.
- Laboratuvarda aydınlatma yeterli olmalı, laboratuvara güneş ışığının direkt girmesi engellenmelidir.



1.3. MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARI ARAÇ GEREÇİ

Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan araç gerecin iyi tanınması, kullanım amacının doğru anlaşılması ve hatasız kullanımı yapılan analizlerin güvenilir sonuçlar vermesi bakımından önemlidir. Laboratuvarda cam, porselen, metal ve plastikten yapılmış birçok malzeme bulunmaktadır.

1.3.1. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kullanılan Cam ve Porselen Malzemeler

Cam Balon: Besiyeri hazırlamada ve saklamada kullanılan, boyun kısmı uzun, alt kısmı balon şeklinde olan sterilize edilebilir cam malzemedir.

Erlen (Erlenmayer): Dilüsyon çözeltilerinin ve besiyerlerinin hazırlanmasında, aktarma işlemlerinde ve numune kabı olarak kullanılan, konik biçimli cam malzemedir.

Test Tüpleri: Farklı boy ve çaplarda bulunan cam tüplerdir. Besiyeri, çözelti ve kültürlerin konulması amacı ile kullanılmaktadır.

Fermantasyon (Durham) Tüpleri: Büyük test tüplerinin içine ters olarak yerleştirilmiş küçük tüplerdir. Gaz oluşturarak test edilen mikroorganizmaların sıvı besiyerinde oluşturdukları gazın tüp içinde toplanarak görünür hâle getirilmesinde kullanılır (Görsel 1.3).

Lam: Mikroskopta incelenecek preparatların hazırlanmasında kullanılan dikdörtgen şeklindeki cam malzemedir (Görsel 1.4). Thoma lamı (maya sayımında), Howard lamı (küf sayımında), çukur lam gibi özel amaçlı üretilmiş lamlar da bulunmaktadır.

Lamel: Lamdan daha ince yapıda olan kare veya dikdörtgen şeklindeki cam malzemedir. Lam üzerinde hazırlanan preparatın üzerini kapatmak amacıyla kullanılır.



Görsel 1.3: Tüpler



Görsel 1.4: Lam



Görsel 1.5: Otoklav şişeleri



Görsel 1.6: Petri kutuları

Otoklav Şişesi (Duran Bottle): Çözeltilerin ve katı besiyerlerin hazırlanmasında ve saklanmasında kullanılan otoklavlanabilir kapaklı şişelerdir (Görsel 1.5).

Petri Kutuları: Çeşitli çap ve büyüklüklerde cam veya polistirenden yapılmış iç içe geçmiş iki kapaktan oluşur. Mikroorganizmaların izolasyonunda ve sayımında içine “sterilize edilmiş katı besiyeri” konularak kullanılır (Görsel 1.6).

Porselen Havan ve Tokmak: Mikrobiyolojik analizi yapılacak numunelerin parçalanmasında kullanılan, iki parçadan oluşan porselen malzemedir.

1.3.2. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kullanılan Ekim Malzemeleri

Öze: Mikrobiyolojik sıvı ve katı örneklerin besiyerine aktarılmasında ve yayılmasında kullanılır. Sıcaklık iletkenliği olmayan bir sap ve sıcaklığa dirençli nikel-krom karışımından veya platinden oluşan uç olmak üzere iki kısımdan oluşur. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında tek kullanımlık steril plastik öze, yuvarlak uçlu metal öze (halka) ve iğne öze olmak üzere üç tip öze kullanılmaktadır (Görsel 1.7).

Eküvyon: Ucunda özel bir pamuk sarılı olan tahta, plastik veya metal malzemeden oluşan çubuklardır. Sterilize edildikten sonra yüzeyden örnek alma işlemlerinde kullanılır (Görsel 1.8).

Otomatik Pipet (Mikropipet): Mikrolitre düzeyinde kapasiteye sahip, hacmi ayarlanabilen özel bir pipettir. Hızlı ve hassas çalışmaya olanak sağlar, kullanımı pratiktir. Mikropipetlerin çalışma esnasında kolayca değiştirilebilen farklı hacim ölçülerinde tek kullanımlık uçları bulunmaktadır. Çalışma öncesinde çalışılacak örneğe uygun uçlar seçilir, otoklavda sterilize edilir ve kullanıma hazır hâle getirilir (Görsel 1.9).



Görsel 1.7: Halka öze ve iğne öze



Görsel 1.8: Eküvyon



Görsel 1.9: Otomatik pipet

Cam Pipetler: Sıvı mikroorganizma kültürlerinin sıvı veya katı besiyerine aktarılmasında kullanılır.

Drigalski Spatülü (Drigalski Özesi): Yayma ekim yönteminde sıvı numunenin agarlı besiyeri yüzeyinde homojen yayılmasında kullanılan, ucu üçgen şeklinde kıvrılmış cam çubuklardır.

Baget: Numuneyi agarlı besiyeri üzerinde yayma, karıştırma ve ezme işlemlerinde kullanılan cam çubuktur.

1.3.3. Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kullanılan Malzemelerin Temizliği

Cam malzemeler, mikroorganizmalarla kontamine olmuşsa öncelikle 121 °C’de 15-20 dakika otoklavda sterilize edilmelidir. Bu sayede agarlı ortamların eriyerek temizlenmesi sağlanmış olur.

Kullanılmış pipetler, lam ve lameller sterilizasyon öncesi %5’lik lizol veya 1000 ppm aktif klor içeren bir kapta biriktirilir. Ancak kanserojen bileşiklerin oluşma riski göz önünde bulundurularak klorla bileşiklerin formaldehitte teması önlenmelidir. Bir defa kullanıma mahsus olan plastik malzeme kullanımı takiben mutlaka otoklavda sterilize edildikten sonra atılmalıdır. Daha sonra cam malzeme deterjanlı



çözeltiyle fırçalanıp iyice durulandıktan sonra distile sudan geçirilerek kurutulur. Cam malzemeden, özellikle pipetlerden deterjan ile çıkmayan organik kalıntılar sülfirik kromik asit gibi kuvvetli oksitleyici asitlerle temizlenebilir (Tayar ve Hecec, 2015).

1.3.4. Mikrobiyolojik Çalışmalarda Kullanılan Başlıca Laboratuvar Cihazları

Steril Kabin (Biyogüvenlik Kabini, Ekim Kabini): Havanın filtre edilerek mikroorganizma kültürlerinin elimine edildiği kapalı ortamlardır. Kabin içinde sterilizasyon amaçlı UV lambası bulunmaktadır. Ayrıca iri ve küçük partikülleri tutmak için farklı gözenek yapılarına sahip filtreler içermektedir. Steril kabin, analiz edilecek ürüne dışarıdan mikroorganizma bulaşmasını önlemek amacıyla kullanılır (Görsel 1.10).

Tüp Karıştırıcı (Vorteks): Tüp içerisindeki sıvıların homojen hâle getirilmesinde kullanılan küçük laboratuvar aletidir.

Mikrodalga Fırın: Agarlı besiyerlerin çok kısa sürede eritilmesinde kullanılır. Mikrodalga fırın besiyerlerin eritilmesi sırasında ani ısınmalara ve kaynamalara sebep olabilir. Bu yüzden fırının dikkatli kullanılması gerekir.

Homojenizatörler: Katı gıda numunelerinin ilk çözeltilerini hazırlamak için kullanılır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında steril torbalar ile kullanılan peristaltik homojenizatör [stomacher (stomekır)] veya döner bıçaklı homojenizatör [blender (blendır)] olarak iki tip homojenizatör mevcuttur.

İnkübatörler: Besiyerine ekim yapıldıktan sonra mikroorganizmaların kuru ve sıcak ortamında geliştirilmesi ve üretilmesi amacıyla kullanılan ve sıcaklık süre ayarının yapılabildiği inkübasyon dolaplarıdır.

Membran Filtrasyon Düzeneği: Özellikle içme ve kullanma sularının, berrak meyve suları gibi sıvı gıdaların mikrobiyolojik analizlerinde kullanılmaktadır. Bu düzenekte örnekler, mikroorganizmaların boyutlarından daha küçük gözeneklere sahip filtrelerden süzdürülür. Bu sayede numunede bulunan mikroorganizmalar, filtreden geçemeyerek filtre üzerinde birikir.



Görsel 1.10: Steril kabin

1.4. MİKROSKOP VE MİKROSKOBUN KULLANIMI

Mikroorganizma boyutlarının belirlenmesinde uluslararası metrik sisteme ait ölçü birimleri kullanılmaktadır. Metrik birimler ve kıyaslamaları aşağıda gösterilmiştir:

- Mikrometre (μm) = Mikron = 10^{-3} mm
- Nanometre (nm) = Milimikron = 10^{-6} mm
- Angstrom (Å) = 10^{-7} mm

İnsan gözü 200-250 mikrondan daha fazla büyüklükteki objeleri görebilir. 0,1 milimetreden (mm) daha küçük cisimler ve varlıklar çıplak gözle görülemez. Mikroorganizma boyutları ise 0,1-10 mikron arasında değişir.

Laboratuvar çalışmalarında mikroorganizmaların görüntülenebilmeleri ve onlarda meydana gelen değişikliklerin incelenmesi için büyütülmesi gerekmektedir. Mikroorganizmaların dereceli bir şekilde mercekler yardımıyla büyütülerek detaylı olarak incelenmesini sağlayan araçlara **mikroskop** adı verilir (Görsel 1.11).



Görsel 1.11: Mikroskobun kısımları



1.4.1. Mikroskop Çeşitleri

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sık kullanılan, farklı amaçlara yönelik geliştirilen mikroskop çeşitleri ve özellikleri aşağıda verilmiştir.

Basit Işık Mikroskobu

Mikrobiyolojik çalışmalarda en sık kullanılan ve en basit yapıya sahip mikroskop çeşidi basit ışık mikroskobudur. 1.000-3.000 aralığında büyütme gücüne sahiptir. Bakterileri, küfleri, mayaları, protozoonları ve riketsiyaları basit ışık mikroskobu kullanarak görmek mümkündür.

Basit ışık mikroskobu genel olarak mekanik, optik ve aydınlatma kısımlarından oluşmaktadır.

Mekanik Kısım

Mikroskobun mekanik kısmı; mikroskop tüpü, tabla, ayak, kaba ayar ve ince ayar vidasından oluşmaktadır. Bu parçaların görevleri şu şekilde sıralanabilir:

Mikroskop Tüpü: Gövdenin üst kısmında bulunan, oküler ve objektifleri taşıyan kısımdır.

Gövde (Kol): Mikroskopta bulunan optik sistemi ve diğer mekanik kısımları taşıyan, mikroskobun dik durmasını sağlayan ana kısımdır.

Tabla: Preparatın yerleştirildiği kısımdır. Tablanın üzerinde preparatı sabitleyen klipsler veya preparatın hareketini sağlayan vidalar bulunmaktadır.

Ayak: Mikroskobun zeminde sabit durmasını sağlayan ve mikroskobu taşıyan kısımdır.

Kaba Ayar Vidası (Makro Vida): İncelenecek örneğin objektife yaklaştırılıp uzaklaştırılmasını sağlayan kısımdır.

İnce Ayar Vidası (Mikro Vida): İncelenecek örneğin netlik kazanmasını ve ince ayarın yapılmasını sağlayan kısımdır.

Optik Kısım

Mikroskopta incelenecek preparatların büyütülmesini sağlayan kısımdır. Optik kısım, oküler ve objektiflerden oluşmaktadır. Bu parçaların görevleri şöyle sıralanabilir:

Oküler: Mikroskop tüpünün üst kısmında yer alan mercek sistemidir. Üzerinde büyütme oranlarını belirten 5X, 10X, 15X gibi numaralar yazılıdır. Bir mikroskopta oküler tekli (monoküler) veya ikili (binoküler) olabilir. Okülerler genellikle 10X büyütme gücüne sahiptir.

Objektifler: Mikroskop tüpünün alt kısmında bulunan döner bir disk (revolver) üzerine yerleştirilmiş mercek sistemidir. Objektiflerin üzerinde büyütme oranları (10X, 20X, 40X, 60X, 100X) ve açıklık sayıları (0,30, 0,75, 1,00, 1,75) yazılıdır. En güçlü büyütme gücüne sahip objektif 100X, **immersiyon objektifi** olarak da adlandırılır.

Aydınlatma Kısım

Mikroskopta incelenecek preparatı aydınlatan ışık düzenidir. Aydınlatma kısmı; ışık kaynağı, ayna, kondansör ve diyafram parçalarından oluşur. Bu parçaların görevleri şöyle sıralanabilir:

Işık Kaynağı: Preparatın aydınlatılması için ayak içerisine monte edilmiş aydınlatma sistemidir.

Ayna: Işık kaynağından gelen ışığı objektif ve okülere ileten kısımdır.

Kondansör: Tablanın hemen altında yer alan, ışığı preparat üzerinde toplamaya yarayan parçadır.

Diyafram: Kondansörün alt kısmında yer alır. İncelenecek preparata göre kondansöre giden ışığın azaltılmasını veya çoğaltılmasını sağlar.

Karanlık Saha Mikroskobu

Işığa duyarlı mikroorganizmaların (spiroketler, spiral şekilli bakteriler vb.) görüntülenmesinde ve



mikroorganizmaların hareketlerinin incelenmesinde kullanılır. İncelenecek örneğin karanlık bir zemin üzerinde aydınlık bir alan olarak ortaya çıkması ile görüntü netlik kazanır.

Faz Kontrast Mikroskobu

Sıvı ortamdaki boyanmamış ve canlı mikroorganizmaların hücre iç ve dış yapılarının, DNA morfolojilerinin incelenmesinde kullanılır. Hücreler ile hücrelerin bulunduğu ortam arasındaki kontrast farklılıklarını artırarak görüntü içindeki yapıların daha net görünmesini sağlamak için geliştirilmiştir.

Floresan Mikroskobu

Çapı yaklaşık 0,1 µm olan mikroorganizmaların özel floresan boyalar yardımıyla incelenmesinde kullanılır. Bu mikroskoptan antijen-antikor tepkimelerinin belirlenmesinde de yararlanır.

Elektron Mikroskobu

Atom, virüs, organel ve viral parçacıklar gibi çok küçük boyutlu örneklerin incelenmesinde kullanılır. Elektron mikroskoplarında ışık kaynağı yerine kısa dalga boyuna sahip elektronlar kullanıldığından bu mikroskop, ışık mikroskobuna göre 1.000 kat daha fazla ayırma gücüne ve büyütme özelliğine sahiptir.

1.4.2. Mikroskobun Büyütme Gücü

Objektif, kendi odak uzaklığının altında bulunan bir cismin görüntüsünü okülere hakiki, büyük ve ters olarak aktarır. Bu görüntü, okülerde daha da büyütülerek göze iletilir (Temiz, 2016).

Bir mikroskop büyütmesi aşağıdaki eşitlikte görüldüğü gibi hesaplanır:

Mikroskop büyütmesi = Objektif büyütmesi x Oküler büyütmesi

1.4.3. Basit Işık Mikroskobu ile Çalışma Teknikleri ve Bu Konuda Dikkat Edilecek Hususlar

- Mikroskop taşınırken çarpma ve darbelerden uzak tutulmalı, taşıma esnasında bir el ile gövdeden diğer el ile mikroskobun altından tutulmalıdır.
- Mikroskobun yerleştirildiği tezgâhın sağlam ve sallantısız olmasına dikkat edilmelidir.
- Mikroskopta ilk ayarlanan görüş alanı ile yetinilmemelidir. İnceleme esnasında tablanın vidaları hareket ettirilerek uygun birkaç görüş alanı bulunmalı ve bunların her biri ayrı ayrı incelenmelidir.
- Çalışma bitiminde mikroskop en küçük objektife ayarlı bir şekilde bırakılmalıdır.

1.4.4. Mikroskobun Temizliği ve Bakımı

Bir mikroskopta iyi bir görüntü elde edilebilmesi ve mikroskobun uzun ömürlü olabilmesi için dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda sıralanmıştır:

- Mikroskoplar; nemli, tozlu ortamlarda ve yüksek sıcaklıkta bırakılmamalıdır. Aksi hâlde mikroskobun mercekleri bozulur ve mercek, özelliğini kaybeder.
- Mikroskop asla ıslak veya nemli bırakılmamalıdır.
- Objektifler temizlenirken bir damla saf su ile mercek yüzeyi ıslatıldıktan sonra kâğıt mercek temizleyici ile kurulmalıdır.
- Objektiflerde yağdan kaynaklı bir kirlilik oluşmuşsa mercekler, bir damla ksilol veya %70 eter ile %30 etil alkol karışımından oluşan bir temizleyici ile nemlendirilen kâğıt mercek temizleyici ile silinmelidir. Hemen ardından silinen mercek kurulmalı ve kimyasal temizleyici yüzeyden uzaklaştırılmalıdır.
- Her çalışma bitiminde mikroskobun ve özellikle mercek sistemlerinin temizliği dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Mikroskop, üzerine kılıf geçirilerek kutusu içinde muhafaza edilmelidir.

**1. UYGULAMA : LABORATUVAR ÇALIŞMALARINDA KİŞİSEL HAZIRLIKLAR****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmuyunuz.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Beden ölçülerinize uygun, rahat ve güvenli çalışmayı sağlayabilecek kişisel koruyucu donanımları kullanınız.
- ✓ Çalışmada kullanacağınız kişisel koruyucu ekipmanlarda güvenli çalışmayı engelleyecek herhangi bir fiziksel hasarın veya kontaminasyonun olup olmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Uygulama sonunda kullandığınız bone, eldiven, maske vb. tek kullanımlık KKD'leri usulüne uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Çalışma bitiminde kullandığınız diğer araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | |
|----------------------|--------------------------|---------------|
| ✓ Laboratuvar önlüğü | ✓ Nitril eldiven | ✓ Su |
| ✓ Maske | ✓ Göz ya da yüz koruyucu | ✓ Sabun |
| ✓ Bone | ✓ El dezenfektanı | ✓ Kâğıt havlu |

İşlem Basamakları

1. Laboratuvara girmeden önce üzerinizde mont, hırka, ceket, şal, atkı vb. giysiler ile saat, kulaklık, çanta gibi herhangi bir takı veya aksesuar var ise bunları çıkarınız.
2. Saçlarınız omuz hizasında ise saçlarınızı arkadan toplayınız.
3. Ellerinizde kesik, yara ve benzeri durumlar var ise bunların üzerini su geçirmez bir bantla kapatınız.
4. Ellerinizi el yıkama talimatları doğrultusunda yıkayınız ve dezenfekte ediniz (Görsel 1.12).
5. Laboratuvar önlüğünüzü giyiniz ve önlüğün tüm düğmelerinin kapalı olduğundan emin olunuz.
6. Sırasıyla bone, maske ve göz ya da yüz koruyucusunu takınız; ardından eldivenlerinizi giyiniz.
7. Grup çalışması yaparak mikrobiyoloji laboratuvarındaki olası tehlikeleri ve bunlara bağlı olarak oluşabilecek riskleri belirlemek için inceleme yapınız.
8. Ders öğretmeni ile birlikte belirlediğiniz tehlikelere ve risklere karşı kullanılması gereken KKD'ler hakkında grup tartışması yapınız.
9. Çalışma bitiminde öncelikle eldivenlerinizi çıkarınız. Eldivenlerin kontamine olmuş dış yüzeylerinin cildinize temas etmesini önleyiniz.
10. Ellerinizi el yıkama talimatları doğrultusunda yıkayınız ve dezenfekte ediniz (Görsel 1.12).
11. Sırasıyla göz ya da yüz koruyucunuzu, maskenizi ve bonenizi güvenli bir şekilde çıkarınız.
12. Laboratuvar önlüğünüzü çıkarınız, ellerinizi el yıkama talimatları doğrultusunda yıkayınız ve dezenfekte ediniz (Görsel 1.12).

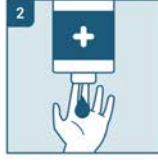


Ellerinizi Nasıl Yıkamalısınız?

KENDİNİZİ VE BAŞKALARINI ENFEKSİYONLARA KARŞI KORUYUN



1 Elinizi su ile ıslatın.



2 Avucunuzun içine yeterli kadar sabun alın.



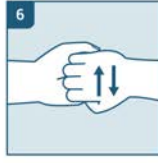
3 Avuç içlerinizi ovun.



4 Sağ elinizle sol elinizin, sol eliniz ile de sağ elinizin üst kısmını ovun.



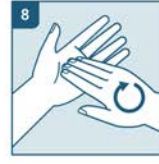
5 Parmaklarınızın aralarını ovun.



6 Ellerinizi şekildeki gibi kenetleyerek tırnaklarınızı temizleyin.



7 Her iki elin başparmağını diğer elinizle temizleyin.



8 Parmak uçlarınızı avuç içinde ters daireler çizecek şekilde temizleyin.



9 Ellerinizi su ile iyice durulayın.



10 Ellerinizi tek kullanımlık kağıt havlu ile kurulayın.

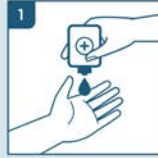


11 Musluğu kapatmak için kağıt havlu kullanın.



12 Bu işlemle elleriniz temizlenmiş olur.

EL DEZENFEKTANI UYGULAMASI



1 Ellerinize yeterli miktarda el dezenfektanı alın.



2 El dezenfektanını ellerinize sürün.



3 Dezenfektan kuruyana kadar ellerinizin tüm yüzeylerini iyice ovun. (20 saniye)

Görsel 1.12: El yıkama ve dezenfeksiyonu talimatı

İşlem basamaklarına göre gerçekleştirilen iş ve işlemlerle ilgili olarak Tablo 1.1'i doldurunuz.

Tablo 1.1: KKD Kullanımı

Mikrobiyoloji Laboratuvarındaki Olası Tehlikeler	Kullanılacak KKD





2. UYGULAMA : LABORATUVARIN DÜZENLENMESİ



İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | |
|---|-------------------------|
| ✓ Laboratuvar sarf malzemeleri ve kimyasallar | ✓ Kalem |
| ✓ Laboratuvar donatım malzemeleri | ✓ A4 boyutunda kâğıtlar |
| ✓ Etiket | ✓ Bant |

İşlem Basamakları

1. Laboratuvarda bulunan tüm cihazların temiz ve elektrik bağlantılarının kapalı olup olmadığını kontrol ediniz.
2. Laboratuvardaki cihazların kullanım talimatlarının olup olmadığını kontrol ediniz.
3. Mikroskop, hassas ve analitik terazi gibi hassas ekipmanların örtülerinin örtülü olup olmadığını kontrol ediniz.
4. Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan besiyerlerinin ve kimyasalların listesini çıkarınız.
5. Besiyerlerini, sıvı ve katı besiyerleri olarak gruplandırınız ve işlem uygulama şemasındaki tabloyu doldurunuz.
6. Laboratuvarda bulunan besiyerlerinin ve kimyasalların ürün etiketlerini kontrol ediniz.
7. Laboratuvarda daha önceden hazırlanmış ve etiket bilgisi bulunmayan veya son kullanma tarihi geçmiş kimyasal, çözelti ve besiyerleri var ise bunları usulüne uygun şekilde imha ediniz.
8. Hazırlanmış çözelti ve besiyerlerini son kullanma tarihi en eski olanlar en önce kullanılacak şekilde yerleştiriniz.
9. Çözelti ve besiyerlerinin yerleştirileceği dolapları etiketleyiniz ve dolaba yerleştirilen malzemelerin listesini dışarıdan görünecek şekilde dolabın kapağına asınız.
10. Laboratuvar malzemelerini cam, metal, plastik, porselen ve ekim malzemeleri şeklinde gruplandırınız ve işlem uygulama şemasındaki tabloyu doldurunuz.



Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Çalışma bitiminde çalışma alanınızı temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan ekipmanları temizleyip dezenfekte ederek yerlerine kaldırmınız.
- ✓ Atıkları uygun atık kutusuna atınız.
- ✓ Laboratuvarın elektrik, gaz ve su bağlantılarının kapalı olup olmadığını kontrol ediniz.

Sonuç ve Yorum

“Laboratuvarın Düzenlenmesi” Uygulaması					
DEĞERLENDİRME FORMU					
Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.					
ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Mikrobiyoloji laboratuvarındaki cihazları düzenler.					
Mikrobiyoloji laboratuvarındaki araç gereci uygun şekilde dolaplara yerleştirdi.					
Laboratuvar sarf malzemelerinin listesini hazırladı.					
Malzeme dolaplarının etiketlemesini yaptı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını ve malzemeleri temizledi.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:			Gerçek Puanı:		
Değerlendirme: Form puanını 2,5 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız					



3. UYGULAMA : CAM MALZEMELERİN KULLANIMI

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel hazırlıklarınızı yapınız ve kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

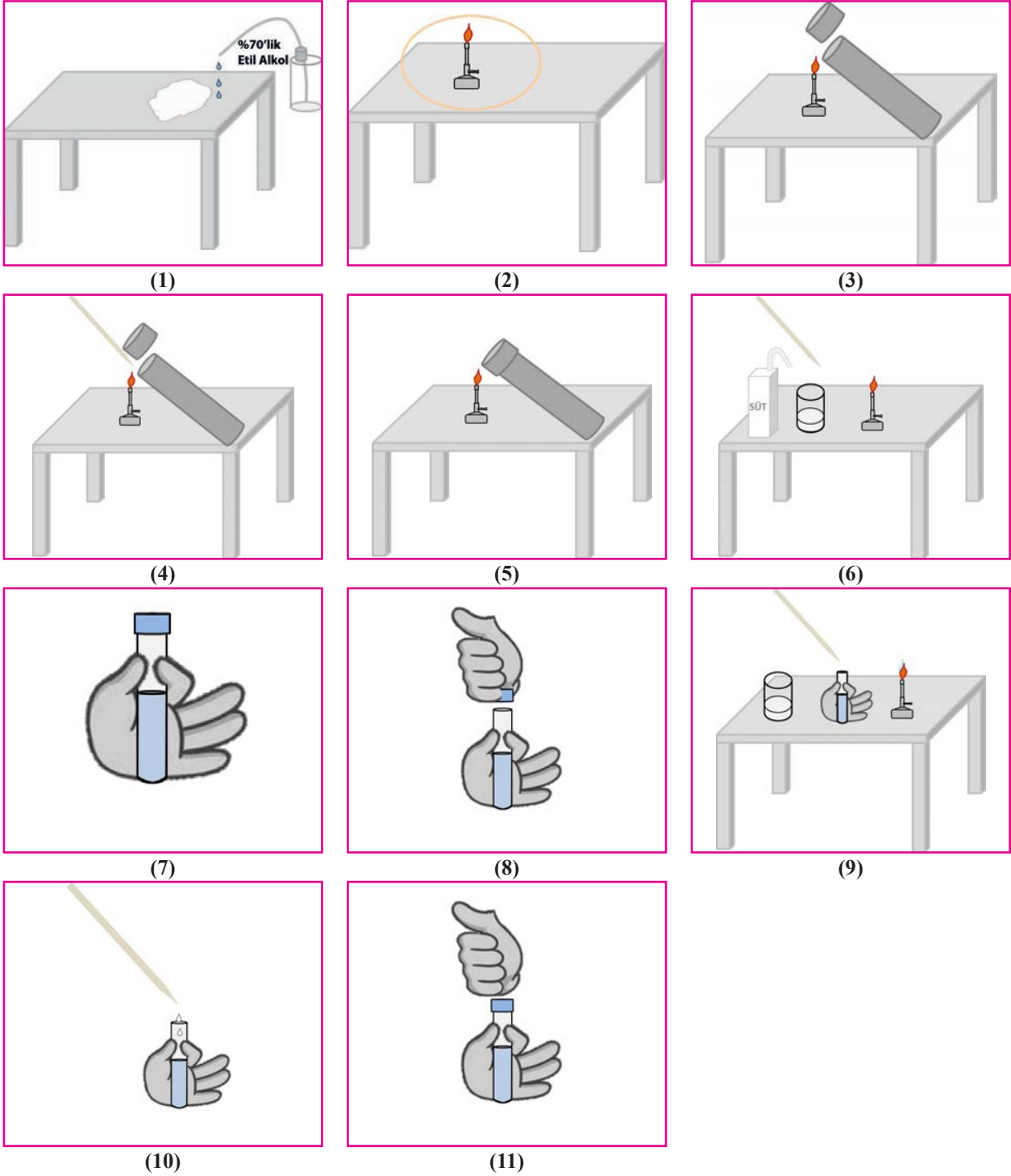
- ✓ Bunsen beki
- ✓ Pipet pompası veya puar
- ✓ Süt numunesi
- ✓ 1 ml'lik steril cam pipet
- ✓ %70'lik etil alkol
- ✓ Steril dilüsyon çözeltisi
- ✓ Kâğıt havlu

İşlem Basamakları

1. Çalışma tezgâhını %70'lik etil alkol ile dezenfekte ediniz (Görsel 1.13).
2. Bunsen bekini yakarak alev çatısı oluşturunuz.
3. Steril pipet kutusunun kapağını açarak kutunun ağzını alevden geçiriniz.
4. Kutuyu yatay tutarak hafifçe sallayınız ve sağ elinizle bir adet pipet alınız.
5. Pipet kutusunun ağzını alevden geçirerek kapatınız.
6. Pipetle süt numunesinden 1 ml alınız.
7. Dilüsyon sıvısının bulunduğu tüpü, tüpün alt kısmına yakın yerden sol elinizin baş ve işaret parmakları arasına alınız.
8. Sol elinizde bulunan tüpün ağzını sağ elinizin serçe parmağı ile avuç ayasına sıkıştırarak açınız.
9. Dilüsyon çözeltisinin ağzını alevden geçirerek pipetteki süt numunesini tüpe aktarınız.
10. Pipetle aktarma yaparken pipeti tüpün kenarlarına değdirmemeye dikkat ediniz.
11. Tüpün ağzını alevden geçirerek avuç ayanızda tuttuğunuz kapağı ile kapatınız.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 1.13: Cam malzemelerin tekniğine uygun şekilde kullanımı

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Çalışma bitiminde çalışma alanınızı temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan ekipmanları temizleyip dezenfekte ederek yerlerine kaldırmınız.
- ✓ Cihazların temiz ve kapalı konumda bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Atıkları uygun atık kutusuna atınız.
- ✓ Laboratuvarın elektrik, gaz ve su bağlantılarının kapalı olup olmadığını kontrol ediniz.



4. UYGULAMA : EKİM ARAÇLARININ KULLANIMI



İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- ✓ Bunsen beki
- ✓ Öze
- ✓ Katı besiyeri dökülmüş petri kapları
- ✓ %70'lik etil alkol
- ✓ Dezenfektan içeren küvet
- ✓ Kâğıt havlu
- ✓ 1/10 oranında seyreltilmiş süt numunesi

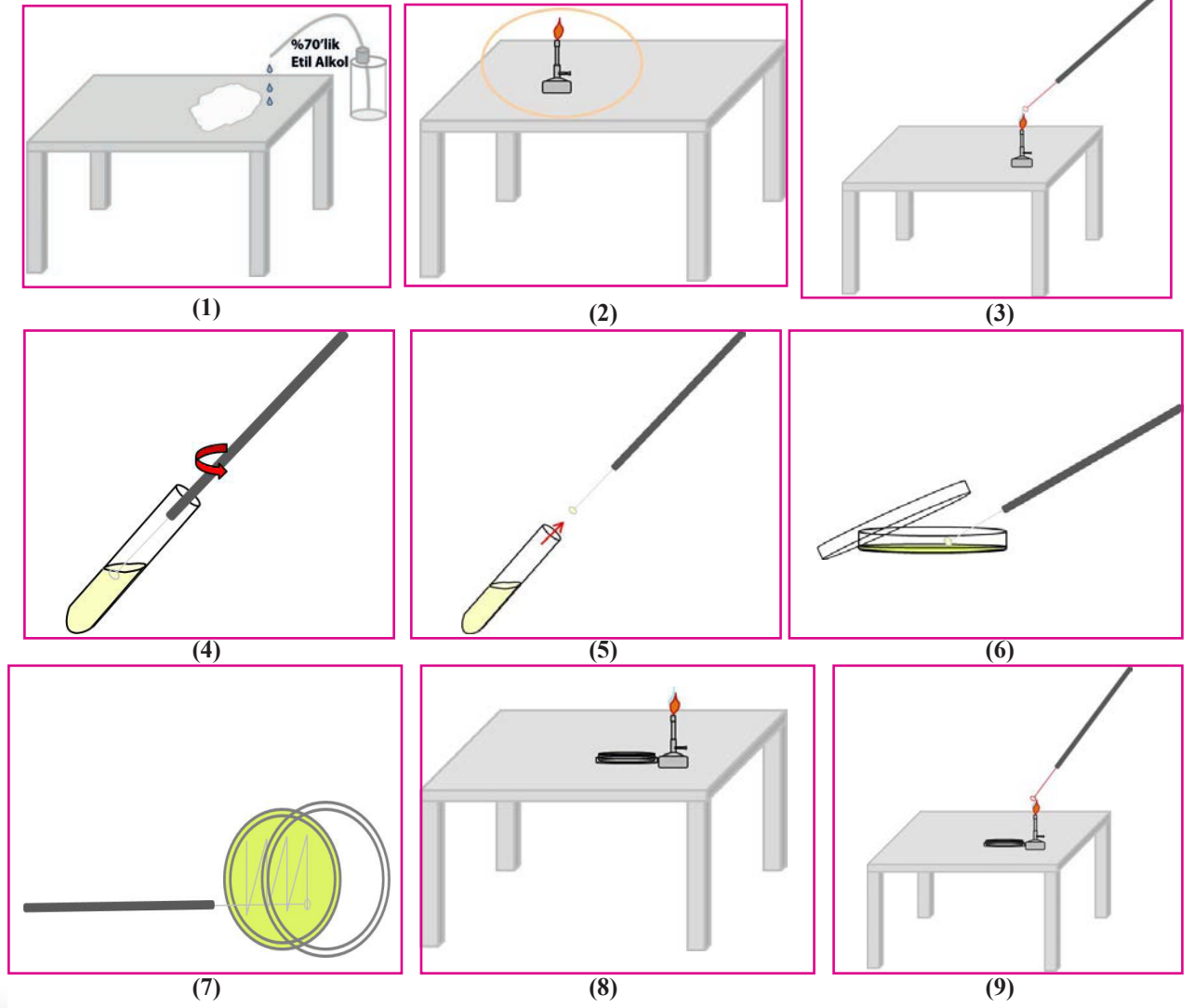
İşlem Basamakları

1. Çalışma tezgâhını %70'lik etil alkol ile dezenfekte ediniz (Görsel 1.14).
2. Bunsen bekini yakarak alev çatısı oluşturunuz.
3. Özeyi bunsen bekinin dış alevinde (mavi alev) dike yakın konumda tutarak akkor hâline gelinceye kadar sterilize ediniz.
4. Süt numunesinin bulunduğu dilüsyon tüpünü hafif eğerek öze ucunu sıvı örneğe daldırınız, öze ucuyla sıvı içinde hafif karıştırma işlemi yapınız.
5. Özeyi, tüpün çeperlerine değdirmeden dışarı çıkarınız.
6. Agarlı besiyerini içeren petri kutusunu sol elinizin ayasına yerleştiriniz ve bu elin baş ve işaret parmağı ile kapak kısmını açınız.
7. Özeyi, bu aralıktan içeri daldırarak öze ucunun örnek alınan kısmını, agar yüzeyinin bir bölgesine temas ettiriniz.



8. Daha sonra bu yayılma alanından başlayarak öze ile sürme işlemi yapınız. Sürme işlemi yaparken öze, agar yüzeyinde uygun açı ile tutmaya ve agar yüzeyini parçalamadan temas ettirmeye dikkat ediniz.
9. Ekim sonunda petri kutularını, agarlı yüzeyi yukarıda kalacak şekilde tezgâhın üzerine koyunuz.
10. İşlem bittikten sonra öze, bek alevinde akkor hâline getirerek sterilize ediniz.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 1.14: Ekim malzemelerinin tekniğine uygun şekilde kullanımı

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Çalışma bitiminde çalışma alanınızı temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan ekipmanları temizleyip dezenfekte ederek yerlerine kaldırınız.
- ✓ Cihazların temiz ve kapalı konumda bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Atıkları uygun atık kutusuna atınız.
- ✓ Laboratuvarın elektrik, gaz ve su bağlantılarının kapalı olup olmadığını kontrol ediniz.

Sonuç ve Yorum



“Ekim Araçlarının Kullanımı” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Ekim malzemelerini amacına uygun şekilde kullandı.					
Ekim malzemelerini uygun şekilde temizledi.					
Aseptik çalışma yaptı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını ve malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:	Gerçek Puanı:				

Değerlendirme: Form puanını 2,5 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.

**5. UYGULAMA : MİKROSKOBUN KULLANIMI****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- ✓ Basit ışık mikroskobu
- ✓ Hazır preparat
- ✓ Mercek temizleyici (ksilol ya da % 70 eter ve %30 etil alkol karışımı)
- ✓ İmmersiyon yağı (sedir yağı)
- ✓ Kâğıt lens temizleyici veya yumuşak dokulu tülbent

İşlem Basamakları

1. Mikroskobun temizliğini kontrol ediniz, herhangi bir kirlilik olması hâlinde mikroskobu, usulüne uygun şekilde temizleyiniz.
2. Preparatı tablaya, örnek konulan yüzü objektife bakacak şekilde yerleştiriniz.
3. Diyaframı sonuna kadar açınız ve kondansörü yukarı kaldırınız.
4. Öncelikle 40X büyütme gücüne sahip objektif altında kaba ayar düğmesi ile görüntü bulunuz.
5. Revolveri çevirerek 60X büyütme gücüne sahip objektif altında ince ayar düğmesi ile görüntüyü netleştiriniz.
6. Revolveri tekrar 40X'te ayarlayınız ve 45°lik açıyla sağa çevirerek preparat üzerine bir damla immersiyon yağı damlatınız.
7. Ardından revolveri çevirerek 100X büyütme gücüne sahip objektif altında ışık miktarını azaltınız ve ince ayar düğmesi ile görüntüyü netleştiriniz.





İşlem Uygulama Şeması

İşlem basamaklarına göre gerçekleştirilen iş ve işlemlerle ilgili olarak Tablo 1.4'ü ve 1.5'i doldurunuz.

Tablo 1.4: Objektiflere Göre Mikroskop Büyütmeleri

Oküler Büyütmesi	Objektif Büyütmesi	Mikroskop Büyütmesi	Objektif Büyütme Gücü Düşük/Orta/Yüksek

Tablo 1.5: Mikroskop Kullanımı

Mikroskopla İnceleme Esnasında Yaşanan Aksaklıklar	Alınan Tedbirler

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Çalışma bitiminde immersiyon yağı kurumadan tüm merceklere mercek temizleyici ile iyice temizleyiniz.
- ✓ Mikroskobu talimatlara uygun olarak temizleyiniz.
- ✓ Temizlik sonrası mikroskobu en düşük objektifte bırakınız ve mikroskobun örtüsünü örterek muhafaza ediniz.
- ✓ Çalışma alanınızı temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan ekipmanları temizleyip dezenfekte ederek yerlerine kaldırınız.
- ✓ Atıkları uygun atık kutusuna atınız.
- ✓ Laboratuvarın elektrik, gaz ve su bağlantılarının kapalı olup olmadığını kontrol ediniz.



Sonuç ve Yorum

Blank space for writing the result and conclusion.

“Mikroskopun Kullanımı” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Mikroskopu preparat incelemeye hazır hâle getirdi.					
Mikroskopta görüntüyü buldu.					
Preparatı tüm objektiflerle inceledi.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamı ile mikroskopun temizliğini ve bakımını yaptı.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:	Gerçek Puanı:				

Değerlendirme: Form puanını 2,5 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE “D” YANLIŞ İSE “Y” YAZINIZ.

1. () Laboratuvar çalışmaları sırasında, laboratuvar güvenliğini sağlamak amacıyla kişisel koruyucu donanımlar kullanılmalıdır.
2. () Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan ekim araçları; eküvyon pipet, öze, drigalski spatülü olarak sıralanır.
3. () Gıdalarda mikroorganizma yükünün limitlerin üstünde olması, işletmelerin hijyen şartlarını yerine getirdiğinin göstergesidir.
4. () Basit ışık mikroskobunun optik kısımlarını ayna, diyafram ve tabla oluşturur.

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

5. Mikroorganizmalarda gaz oluşumunu gözlemek için test tüpünün içine yerleştirilir.
6. Ekimi yapılan mikroorganizmaların geliştirilip çoğaltılabilmesi için gerekli sıcaklık ve sürenin sağlandığı dolaplara adı verilir.
7. Gözle görülemeyen organizmaların mercekler yardımıyla büyütülerek incelenmesini sağlayan araçlara adı verilir.
8. Virüslerin ve viral parçacıkların incelenmesinde mikroskobundan yararlanır.

AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

9. Aşağıdakilerden hangisi laboratuvar önlüğünün taşınması gereken özelliklerden biri değildir?
A) Önlüğün boyu diz kapağını örtecek uzunlukta olmalıdır.
B) Önlüğün kolları uzun olmalıdır.
C) Önlük üzerinde bol cep bulunmalıdır.
D) Önlük aleve dayanıklı malzemedен yapılmış olmalıdır.
E) Önlük hızlıca çıkarılabilir özellikte olmalıdır.
10. Aşağıdakilerden hangisi laboratuvar çalışma kuralları arasında yer almaz?
A) Steril olan ve olmayan malzemeler gruplandırılmalı ve ayrı yerlerde depolanmalıdır.
B) Laboratuvarda çalışanların dikkatini dağıtacak davranışlardan kaçınılmalıdır.
C) Çalışmaya başlamadan önce çalışma tezgâhları %70’lik alkolle dezenfekte edilmelidir.
D) Laboratuvar çalışmaları esnasında kapı ve camlar açık tutulmalıdır.
E) Çalışma öncesinde, sırasında ve sonrasında iş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uyulmalıdır.





11. Aşağıdakilerden hangisi basit ışık mikroskobunun mekanik kısımlarındandır?
- A) Diyafram
B) Işık kaynağı
C) Kondansör
D) Oküler
E) Tabla
12. Aşağıdakilerden hangisi mikrobiyoloji laboratuvarının taşınması gereken özelliklerden değildir?
- A) Laboratuvarında nem ve sıcaklık kontrolü sağlanmalıdır.
B) Laboratuvar yüzeyleri kolay temizlenebilir özellikte olmalıdır.
C) Laboratuvar, güneş ışığını direkt alabilen bir bölgede olmalıdır.
D) Laboratuvarında yeterli sayıda su musluğu ve evye bulunmalıdır.
E) Laboratuvar zemini kolay temizlenebilir özellikte olmalıdır.
13. I. Mikroskopta incelenecek örneğin objektife yaklaştırılıp uzaklaştırılmasını sağlayan kısımdır.
II. Mikroskop tablasının alt kısmında yer alan, ışığı preparat üzerinde toplamaya yarayan kısımdır.
III. Mikroskobun ışık kaynağından gelen ışığın objektif ve okülere iletilmesini sağlayan kısımdır.
Numaralandırılarak verilen tanımların karşılığı aşağıdakilerden hangisinde doğru olarak verilmiştir?
- A) Diyafram - Işık Kaynağı - Tabla
B) İnce Ayar Vidası - Oküler - Kondansör
C) İnce Ayar Vidası - Kondansör - Tabla
D) Kaba Ayar Vidası - Kondansör - Ayna
E) Kaba Ayar Vidası - Işık Kaynağı - Ayna
14. Aşağıdakilerden hangisi mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan ekim malzemelerindendir?
- A) Drigalski spatülü
B) Durham tüpleri
C) Erlen
D) Lam
E) Otoklav şişesi
15. Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan malzeme ve araçların temizliği ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?
- A) Kontamine olmuş cam malzemeler, temizlenmeden önce 80 °C'de 20 dakika etüvde sterilize edilmelidir.
B) Cam malzemelerden deterjan ile çıkmayan organik kalıntılar kuvvetli asitlerle temizlenmelidir.
C) Lam, lamel, tüp, petri kutusu gibi kontamine araç gereç %5'lik lizol veya 1.000 ppm aktif klor içeren kapta biriktirilmelidir.
D) Steril malzemelerin, sterilizasyon tarihi en eski olanlar en önce kullanılacak şekilde dolapların ön tarafına yerleştirilmesi gerekir.
E) Tek kullanımlık plastik malzemeler kullanıldıktan sonra sterilize edilmeli ve atılmalıdır.

2. ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROBİYOLOJİK ANALİZ NUMUNESİ



Bu öğrenme biriminde;

- Laboratuvarı mikrobiyolojik analize hazırlamayı,
- Aseptik kurallara ve tekniğine uygun olarak mikrobiyolojik ön numune almayı,
- Aseptik kurallara ve tekniğine uygun olarak mikrobiyolojik ön numuneden analiz örneği hazırlamayı deneyimleyerek öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 2.1. Aseptik Tekniğe Uygun Laboratuvar Hazırlığı
- 2.2. Mikrobiyolojik Analizler için Ön Örnek Alma
- 2.3. Analiz Örneğini Hazırlama

TEMEL KAVRAMLAR

Dezenfeksiyon örnek homojenizasyon
karıştırıcı tartım



2. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Mikrobiyolojik analizlerde aseptik şartlarda çalışmak neden önemlidir?
2. Mikrobiyolojik analizlerde hataların kaynakları neler olabilir?
3. Gıda güvenliğinde *Salmonella* ve *Listeria* cinsi bakterilerin önemini araştırınız.



2.1. ASEPTİK TEKNİĞE UYGUN LABORATUVAR HAZIRLIĞI

Çalışma alanındaki mikroorganizmalar, yapılan analizin güvenilirliği açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Çalışma ortamındaki patojen mikroorganizmaların etkili bir şekilde yok edilmesi ve toplam mikroorganizma yükünün azaltılması için laboratuvar ortamı, temizlik sonrası uygun yöntemlerle mikroorganizmalardan arındırılmalıdır.

2.1.1. Dezenfeksiyonun Tanımı

Cansız ortamda bulunan patojen mikroorganizmaların ve çok dirençli olmayan diğer mikroorganizmaların fiziksel veya kimyasal ajanlarla yok edilmesi veya üremelerinin durdurulması işlemlerinin tümüne **dezenfeksiyon** adı verilir. Dezenfeksiyon amacıyla kullanılan maddelere **dezenfektan** veya **sanitizer** denir.

Etkili bir dezenfeksiyon işlemi; mikrobiyoloji laboratuvarında kontaminasyonun önlenmesi, laboratuvar güvenliğinin sağlanması ve güvenilir analiz sonuçlarının elde edilebilmesi bakımından önemlidir.

2.1.2. Dezenfektan Maddelerin Çeşitleri ve Özellikleri



Görsel 2.1: Çeşitli dezenfektanlar

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan dezenfektanlar ve özellikleri aşağıda verilmiştir (Görsel 2.1):

Alkoller: Yüze sterilizasyonunda %70'lik etil alkol veya izo propil alkol yaygın olarak kullanılır. Drigalski spatülünün, ambalajların ve çalışma tezgâhlarının dezenfeksiyonunda etil alkol tercih edilir. Saf alkol, hücreye nüfuz edemediği için %70-80'lik alkolden daha az etkilidir. Bu nedenle saf alkol, mutlaka saf su ile seyreltilerek kullanılmalıdır.

Formaldehit: Formaldehitin %5-10 konsantrasyonu; kapalı hâldeki oda, duvar, döşeme gibi yüzeylerin sterilizasyonunda etkili olur. Uygulama sonrası 24 saat beklenilmeli, ardından nötralize edilmelidir.

İşlem bittikten sonra ortam havalandırılmalıdır. Formaldehitin buharı zehirli olduğundan dikkatli çalışılmalıdır.

Klor: Tüm bakteri ve sporlarına karşı etkili ve yaygın kullanılan bir dezenfektandır. Genellikle sıvı formunda kullanılır. Yüksek konsantrasyonda korozif etkiye sahiptir. Klor çözeltileri zamanla etkisini kaybettiğinden her zaman taze hazırlanmalıdır. 525 ppm klor çözeltisine %7 iyonik olmayan deterjan ilave edildiğinde çözelti çok etkili bir dezenfektan hâline gelir.

İyot Bileşikleri: Hızlı etki eden, korozif olmayan bir yapıya sahiptir. Laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılır. Sporlar dâhil tüm mikroorganizmalarda etkilidir. 75-150 ppm iyot konsantrasyonu, temiz yüzeylerin ya da temiz suyun dezenfeksiyonunda oldukça etkilidir.



Peroksitler: Hidrojen peroksitin %3'lük konsantrasyonu genel dezenfeksiyonda ve yara temizliğinde etkilidir. %30-50'lik konsantrasyonu ekipmanların ve kapların yüzeylerinin sterilizasyonunda etkilidir. Ancak ortamda organik maddelerin varlığı, hidrojen peroksitin antiseptik etkisini önemli ölçüde azaltır.

2.1.3. Dezenfektan Maddelerin Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kullanımı

Etkili bir dezenfeksiyon işleminin sağlanabilmesi şunlara bağlıdır:

- Laboratuvarın temizliği
- Uygulanacak materyalin temizliği
- Uygun dezenfektan seçimi
- Dezenfektan etki sürelerinin iyi bilinmesi
- Dezenfektanların önerilen temas sürelerine uyulması
- Dezenfektan çözeltilerinin doğru konsantrasyonda hazırlanması
- Ticari dezenfektanların talimatlarına uyulması
- Sağlık Bakanlığınca izin verilmiş ürünlerin kullanılması

2.1.4. Dezenfektanların Muhafazası

Dezenfektanların muhafazasında dikkat edilecek hususlar şu şekilde sıralanabilir:

- Dezenfektanlar güneş ışığına maruz bırakılmamalı, hava ile uzun süre temas etmemelidir.
- Dezenfektan çözeltisi hazırlandıktan sonra hemen etiketlenmelidir. Etiket üzerinde solüsyonun konsantrasyonu, hazırlandığı tarih ve solüsyonu hazırlayan kişinin bilgileri bulunmalıdır.
- Dezenfektanların saklandığı kaplar, dezenfektanlarla tepkimeye girmeyecek özellikte olmalıdır.
- Dezenfektanlar laboratuvarında kapalı ve kilitli, uygun bir yerde muhafaza edilmelidir.

2.1.5. Laboratuvar Tezgâhlarının ve Masaların Dezenfeksiyonu

Laboratuvar çalışmalarına başlamadan önce laboratuvar tezgâhları ve masalar temizlenmeli, daha sonra uygun bir dezenfektan (%70'lik etil alkol) ile dezenfekte edilmelidir (Görsel 2.2).

Laboratuvarlarda ortam atmosferinin ve yüzeylerin sterilizasyonu, UV lambası ile de sağlanabilir. UV lambası sadece çalışma saatleri dışında açık bırakılmalıdır. UV ışığı, körlük ve kanser gibi risklere sebep olabileceğinden lamba çalışırken laboratuvara girilmemelidir.



Görsel 2.2: Tezgâhların dezenfeksiyonu

2.2. MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER İÇİN ÖN ÖRNEK ALMA

Gıdaların, üretiminden tüketimine kadar olan aşamalarda hijyen kurallarına uyulmaması ve uygun koşullarda muhafaza edilmemesi durumunda gıdalara istenmeyen mikroorganizmalar ve bunların toksinleri bulaşır. Mikroorganizma ile kontamine olmuş gıdalar; hastalıklara, zehirlenmelere hatta ölümlere yol açabilir. Gıda güvenliği zincirinde son halkayı oluşturan tüketicilerin güvenilir ve kaliteli gıdalara ulaşabilmeleri bakımından mikrobiyolojik kontrolün önemi büyüktür.

Örnek alma, mikrobiyolojik kalitenin kontrolünde en temel aşamadır. Çünkü analizler gıdalardan alınan örnekler üzerinden uygulanır. Örnek almanın (numune alma, örnekleme) temel prensibi yığının (ana kütle) bütünü temsil eden örneği elde etmek ve bunu, alındığı andaki koşullarında hiçbir değişime uğratmadan analize almaktır.

Örnek alma aşamaları şu şekilde sıralanabilir:

- Örnek miktarının belirlenmesi
- Örnek alma planının yapılması
- Örneğin usulüne uygun şekilde alınması



- Örneğin uygun koşullarda laboratuvara gönderilmesi
- Örneğin analize hazırlanması

2.2.1. Örnek Alma Kaplarının Özellikleri

Mikrobiyolojik numune almak için makas, bıçak, konserve açacağı, sonda, spatül, kaşık, metal tüp, pamuklu çubuk, pipet, metal termometre, örnek taşıma kabı, terazi, polietilen poşet, şişe, kavanoz, blender veya stomacher (stomekır) poşetleri ve filtre cihazları kullanılır. Örneklemede kullanılacak ekipmanlar örneğin özelliğine göre çeşitlilik göstermektedir (Görsel 2.3).



Görsel 2.3: Bazı steril numune kapları

Örnek alma kaplarının taşınması gereken özellikler şu şekilde sıralanabilir:

- Örnek almada kullanılacak tüm materyaller mutlaka temiz, kuru ve steril olmalıdır.
- Kabın şekli ve kapasitesi örneği alınacak ürüne uygun olmalıdır.
- Kaplarda herhangi bir kırık veya çatlak bulunmamalıdır.
- Nem geçirmeyen özellikte olmalıdır.
- Sterilizasyona dayanıklı olmalıdır.
- Kullanılan kapaklar yağ geçirgenliği ve emiciliği olmayan; örneğin kokusuna, aromasına ve yapısına etki etmeyecek özellikte olmalıdır.
- Kapakların iç kısımları koku geçirmeyen materyal ile kaplanmış olmalıdır.
- Kabın içine dışarıdan mikroorganizma girmesini önlemek için kaplar hermetik kapaklı olmalıdır.
- Kapağı olmayan kapları kapamada kullanılan tıkaçlar, önceden alüminyum folyo veya şerit ile sarılmış olmalıdır.
- Tek kullanımlık steril torbalar, örnek alma sonrasında usulüne uygun şekilde kapatılmalıdır. Örneğin daha iyi korunabilmesi için bu torbalar ikinci bir plastik poşete konulmalıdır.

2.2.2. Örnek Alma Sırasında Dikkat Edilecek Hususlar

- Örnekler; laboratuvar çalışanları, laboratuvar sorumluları veya mikrobiyoloji üzerine eğitim almış kişiler tarafından alınmalıdır.
- Örneği alacak kişi, gıdayı direkt etkileyecek gribal enfeksiyon, öksürme veya bulaşıcı hastalık etkeni taşımamalıdır.
- Ürün ambalajlı ise ambalajı açılmamış ve zarar görmemiş paketlerden örnek alınmalıdır.
- Ürün, büyük ambalajlar içinde ise ambalajın dış yüzeyi %70'lik alkol ile dezenfekte edilmelidir. Daha sonra aseptik tekniğe uygun olarak ürünü temsil edecek şekilde ürünün farklı bölgelerinden örnek alınması gerekir.
- Sıvı ya da yarı sıvı ürünlerden örnek alma işleminde önce steril bir araçla ürün iyice karıştırılarak homojen hâle getirilmeli daha sonra aseptik tekniğe uygun olarak örnek alınmalıdır.
- Örnek alma aşamasında havadan mikroorganizma bulaşmasını engellemek için hava akımının bulunmamasına dikkat edilmelidir.
- Ürün yığın hâlinde ise yığının birçok bölgesinden gelişigüzel örnek alınması uygundur.
- Musluk suyundan örnek alınacağı zaman, musluğun ağzı alkolle yıkanıp alevden geçirilmelidir.



- Örnek, suyun musluktan bir süre akıtılmasından sonra belli zaman aralıkları ile akıştan alınmalıdır.
- Ürün küçük paketler hâlinde ise tesadüfi örnek alma yöntemine göre örnek alınmalıdır.
- Örnek alma aşamasında örnek kaplarının ağzı 45° eğimle açılmalı ve örnek konulduktan sonra hemen kapatılmalıdır.
- Alınan örnek laboratuvara taşınırken ürünün etiket bilgilerinde yazan muhafaza koşullarına uygun önlemler alınmalıdır.

2.2.3. Örnek Miktarını Etkileyen Faktörler

Ulusal ve uluslararası birçok standartta, sayıma dayalı analizlerde kullanılacak örnek miktarı onar g (ml) olarak belirtilmiştir. Patojenlerin var / yok testlerinde bu miktar 25 g'dır.

Gıdalarda toplam bakteri, koliform grubu bakteriler, stafilokok türleri, maya ve küf analizleri için onar g, *Salmonella* ve *Listeria* analizleri için yirmi beşer g olmak üzere en az 60 g analiz numunesine ihtiyaç duyulmaktadır. Analizin tekrar edilebileceği düşünülerek laboratuvara en az 200-250 g veya ml örnek getirilmesi gerekir. Bunun yanı sıra ürünün özelliği ve fiziksel formu (katı, sıvı, toz), yapılacak analizin çeşidi ve sayısı, ürünün ambalaj şekli, ana kütleinin büyüklüğü, kontrolün yapılma nedeni gibi faktörler ürün miktarını etkilemektedir.

Örnek miktarı ile ilgili genel kurallar şu şekilde özetlenebilir:

- Ambalaj boyutu küçüldükçe alınan örnek sayısı artırılır.
- Çocuklara, yaşlılara, hastalara ve hamilelere yönelik hazırlanan ürünlerden daha fazla örnek alınmalıdır.
- Büyük ambalajlı ürünler ile dökme ve yığın hâlinde olan ürünlerin birçok noktasından örnek alınması gerekir.
- Çabuk bozulan gıdalardan daha fazla örnek alınmalıdır.
- Analiz esnasında fındık, fıstık ezmesi gibi homojenizasyonu zor olan ürünlerden daha fazla miktarda örnek alınmalıdır.
- Pazar payı yüksek ürünlerden daha fazla örnek alınması gerekir.
- Salgın durumlarında alınan örnek miktarı, rutin kontrollerde alınan örnek miktarından fazla olmalıdır.
- Basit teknoloji ile üretim yapan işletmelerden modern üretim yapan işletmelere göre daha fazla numune alınmalıdır.

2.2.4. Örnek Alma Planı

Gıdalar için Mikrobiyolojik Spesifikasyonlar Uluslararası Komisyonu ICMSF [International Commission on Microbiological Specifications For Foods (İntinışmıl Kimişın an Maykrobaylacıkıl Spesifikeyşıns For Fuudz)] tarafından mikrobiyolojik kalite kontrolünde iki ve üç sınıflı örnekleme planları önerilmektedir. Örnekleme planlarının seçiminde gıdanın yapısı, bozulma potansiyeli, gıdaya uygulanan işlemler ve tüketici profili (bebek, yaşlı, hasta, hamile vb.) dikkate alınmalıdır.

Örnekleme planı, partideki ürünlerin tamamının kabul edilmesi veya reddedilmesi için partiyi temsil eden örneklerin kaçında kabul edilebilir kaçında kabul edilemez düzeyde mikroorganizma bulunması gerektiğini tespit etmek bakımından önem arz eder.

İki ve üç sınıflı planlar **n**, **c**, **m** ve **M** değerleri esas alınarak yapılır. Bu değerlerin açıklamaları Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1: Örnek Alma Planında Esas Alınan Değerler

n	Analiz edilecek örnek sayısı
c	Örnek grubu içinde kabul edilebilir düzeyde maksimum örnek sayısı
m	c sayıdaki örnekte bulunmasına izin verilen (kabul edilebilir) mikroorganizma sayısı
M	Analiz edilecek örnekte kabul edilebilir limitleri aşan mikroorganizma sayısı



İki Sınıflı Örneklem Planları

Partinin tamamen kabul edilmesi veya reddedilmesi şeklinde yapılan örneklem planlarıdır. Bu planlamada bir defa analiz yapılır ve sadece **n**, **c**, **m** değerleri dikkate alınır. Gıdalarda bulunmasına izin verilmeyen *Salmonella*, *Escherichia coli* (Eşerihya koli) gibi patojenler var veya yok şeklinde belirtilir. Toplam bakteri, maya ve küf gibi mikroorganizmaların ise sayımı yapılır ve örnekte belirli limitlerde bulunmasına izin verilir. Var / yok testinin sonucuna veya mikroorganizmaların izin verilen limitleri aşımaması durumuna göre parti tamamen kabul edilir veya reddedilir.

Bu konu ile ilgili örnekler aşağıda verilmiştir:

Örnek 1: *Escherichia coli* analizi için **n=5** ve **c=0** ibaresi analiz edilen 5 örnekten hiçbirinde *Escherichia coli* bulunmamalıdır anlamına gelmektedir. Analiz sonucunda örneklerden en az birinde *Escherichia coli* tespit edilmesi durumunda parti reddedilir. Partinin kabul edilebilmesi için analiz edilen 5 örnekte de negatif sonuç alınmalıdır.

Örnek 2: Maya ve küf analizi için **n=10**, **c=2** ve **m=10³ kob/ml** ibaresi analiz edilen 10 örnekten en fazla 2 (c) tanesinde istenmeyen mikroorganizma sayısı en fazla 10³ kob/ml (m) olabilir anlamına gelmektedir. Eğer analiz sonucunda bu limitlerdeki örnek sayısı en fazla 2 ise parti kabul edilir, 2'den fazla ise parti reddedilir.

Üç Sınıflı Örneklem Planları

Bu planlamada **n**, **c**, **m** ve **M** değerleri dikkate alınır. Üç sınıflı örneklem planlarında analize alınan örneklerin hiçbirinde mikroorganizma sayısının **M** değerinden yüksek olmaması gerekir.

Mikrobiyolojik kalite açısından üç sınıflı örneklem planlarında gıda örnekleri üç sınıfta toplanır (Erkmen, 2017).

- Örnek ünitelerinden herhangi biri **m** değerinden az sayıda mikroorganizma içerir ise tamamıyla kabul edilebilir sınırdadır.
- Örnek ünitelerinden herhangi biri **m** ve **M** değerleri arasında mikroorganizma içerir ise sınırlı kabul edilebilir durumdadır.
- Örnek ünitelerinden herhangi biri **M** değerinden çok sayıda mikroorganizma içerir ise tamamıyla kabul edilmeyecek durumdadır.

Bu konu ile ilgili örnekler aşağıda verilmiştir:

Örnek 1: Küf analizi için **n=5**, **c=2**, **m=10² kob/g** ve **M=10³ kob/g** şeklinde yapılan örneklem planına göre partinin kabul edilebilmesi için;

- Analize alınan 5 (n) örnekten sadece 2 (c) tanesinde küf sayısı en fazla 10³ kob/g (M) olmalıdır.
- Geriye kalan 3 (n-c) örnekte küf sayısı en fazla 10² kob/g (m) olmalıdır.

Bu durumda;

- Örneklerden biri 10³ kob/g (M) değerini geçerse parti reddedilir.
- 5 (n) örneğin içinde 3 (n-c) veya daha fazla sayıda 10² kob/g (m) değeri geçilirse parti yine reddedilir.

Örnek 2: Koliform analizi için **n=5**, **c=2**, **m=9 kob/ml** ve **M=95 kob/ml** şeklinde yapılan örneklem planına göre partinin kabul edilebilmesi için;

- Analize alınan 5 (n) örnekten sadece 2 (c) tanesinde koliform grubu bakteri sayısı en fazla 95 kob/ml (M) olabilir.

Bu durumda;

- Analize alınan 5 örnekten herhangi birinde veya daha fazlasında koliform grubu bakteri 95 kob/ml değerini geçerse parti reddedilir.
- 2'den fazla örnekte koliform grubu bakteri 1-94 kob/ml olduğunda parti yine reddedilir.

Örnek 3: *Salmonella* spp analizi için **n=10**, **c=0**, **m=0 kob/g** ve **M=0 kob/g** şeklinde yapılan örneklem planına göre partinin kabul edilebilmesi için analiz edilen 10 (n) örnekten hiçbirinde *Salmonella* spp



olmamalıdır. 10 örnekten herhangi birinde *Salmonella* spp tespit edilmesi durumunda parti reddedilir.

2.2.5. Üretim Yerlerinden Mikrobiyolojik Örnek Alma Aşamaları

Örnek alma esnasında; ürünün cinsine, özelliklerine, parti büyüklüğüne ve bulunduğu materyalin niteliğine göre farklı örnek alma teknikleri uygulanır. Örnek alma aşamasında kullanılan araç gerecin ve kapların tekrar sterilize edilmesi gerekebilir. Kullanılan ekipmanın çeşidine göre aşağıdaki sterilizasyon yöntemlerinden biri uygulanır:

- Otoklavda 121 °C'de 15-20 dakika süreyle buharlı sterilizasyon yapmak
- Etüvde 170-175 °C'de en az 60 dakika süreyle kuru sterilizasyon yapmak
- Ekipmanı en az %70'lik alkole daldırdıktan sonra alkolü yakmak
- Ekipmanın bütün yüzeyini doğrudan alevden geçirmek
- Bakterisit etkisi 100 ppm klor eş değerinde olan bir dezenfektan içinde 30 saniye beklettikten sonra steril saf su ile silmek ve steril havlu ile kurulamak suretiyle sterilizasyon işlemi yapmak

Bir işletmede çeşitli gıdalardan, gıda bileşenlerinden ve ekipmanlardan örnek alma işleminde kullanılan teknikler aşağıda verilmiştir:

Sıvı Gıdalardan Örnek Alınması: Gıda öncelikle steril bir araçla karıştırılarak, alt üst edilerek veya mekanik karıştırıcılar yardımıyla homojen hâle getirilir. Ardından uygun bir steril araç yardımıyla (genellikle pipet) mümkün olduğunca hızlı örnek alınır.

Katı Gıdalardan Örnek Alınması: Gıda maddesinin boyutları uygunsa (beyaz peynir, ekmek, vb.) gıdanın tamamı örnek olarak alınır. Gıda maddesinin büyük ambalajlarda, yığın hâlinde veya büyük parçalar hâlinde olması durumunda (parça et, tulum peyniri, bazı şekerlemeler, salça vb.) gıdanın bir parçasının örnek alınması gerekir. Bunun için steril bir kaşık, sonda, bıçak veya spatül kullanılabilir. Eğer gıda maddesi küçük paket içinde ve taşınabilir özellikte ise ambalajın tamamı uygun koşullarda örnek olarak alınır.

Kuru Gıdalardan Örnek Alınması: Bu tip gıdalar (süt tozu, un, tahıl, hububat gibi) toz veya granül hâlinde bulunur ve değişik boyutlarda olabilir. Bu gıdalardan tek örnek alınacaksa örnek mümkün olduğunca ambalajın ortasına yakın bir yerden alınır. Bunun için ambalajdaki üst kısımlar steril bir kaşıkla uzaklaştırılır ve steril koşullarda örnek alınır. Eğer birden fazla örnek alınacaksa yaklaşık 75 cm uzunluğunda steril sondalar kullanılarak farklı katmanlardan örnek alınır.

Soğutulmuş Gıdalardan Örnek Alınması: Kırmızı et, kanatlı hayvan etleri ve balık gibi gıdalardan bıçakla veya yüzeyden sürme (swab) ve kazıma yöntemleri ile örnek alınır.

Dondurulmuş Gıdalardan Örnek Alınması: Dondurulmuş gıda bir kutu içinde ve büyük boyutlu ise örnekler steril bir keski, testere veya matkap yardımıyla alınır. Eğer gıda maddesinin buzu kısmen çözülmüş ise steril bir bıçakla örnek alma işlemi gerçekleştirilir.

Konserve Gıdalardan Örnek Alınması: Örnek alınacak konserve kutusu incelenir. Kutuda herhangi bir şişme, şekil bozukluğu vb. durumlar yoksa kutunun örnek alınacak kısmı ve çevresi %70'lik alkol ile dezenfekte edilir. Kutunun kapağı alevden geçirilir. Eğer konserve kutusu bombajlı ise alev ile sterilize edilmez. 100 ppm (100 mg/kg) klor ile silinir ve 30 saniye bekletildikten sonra steril su ile silinir. Bu işlemlerden sonra kutu steril bir açacak yardımıyla açılarak usulüne uygun şekilde örnek alınır.

Musluklardan Su Örneği Alınması: Musluğa takılı plastik boru varsa çıkarılır, musluğun iç ve dış kısmı temizlenir. Musluk çevresi %70'lik alkolle dezenfekte edilir, ardından alevle yakılarak sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra musluk sonuna kadar açılır, suyun bir süre akması sağlanır. Örnek kabının ağız kısmına el değdirmeden aseptik koşullarda örnek alınır (Görsel 2.4).

Ekipmanlardan Örnek Alınması: Steril bir eküvyon kullanılarak sürme yöntemi ile örnek alınır.



Görsel 2.4: Musluktan su örneği alınması



2.2.6. Alınan Örneklerin Taşınmasında ve Muhafazasında Dikkat Edilecek Hususlar

- Alınan örnekler, mikroorganizma sayılarında artma veya azalma olmayacak şekilde laboratuvara getirilmelidir. Bu örnekler analize alınmaya kadar ürünün özellikleri değişmeyecek şekilde uygun sıcaklık ve koşullarda muhafaza edilmelidir.
- Çabuk bozulabilen dondurulmamış ürünler (süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri, taze meyve ve sebzeler vb.) 0-5 °C'ye soğutulmalı ve bu şartlarda laboratuvara ulaştırılmalıdır. Bu örnekler 24 saat içerisinde analize alınmayacaksa 50 g'lık porsiyonlar hâline getirilerek -20 °C'de muhafaza edilmelidir. Yapılan işlem, analiz raporunda mutlaka belirtilmelidir.
- Dondurulmuş gıdalar, -18 °C'de laboratuvara getirilmeli ve analiz edilinceye kadar donmuş durumda (-18 °C'de) muhafaza edilmelidir.
- Kurutulmuş ve konserve gıdalar oda sıcaklığında muhafaza edilmeli ve son kullanım tarihinden önce analize alınmalıdır.
- Bombajlı veya bombaj riski bulunan konserve kutularının patlama tehlikesine karşı kutular ikinci bir ambalaja alınmalı, ürünler bu şekilde laboratuvara getirilmelidir.
- Örneklerin alınması ve laboratuvara getirilmesi esnasında doğrudan güneş ışığına maruz kalmaları engellenmelidir.
- Alınan tüm örnekler için numune alma tutanağı ve etiketi titizlikle doldurulmalı, örnekler bu tutanakla beraber laboratuvara getirilmelidir.

2.3. ANALİZ ÖRNEĞİNİ HAZIRLAMA



Görsel 2.5: Örneğin analize hazırlanması

Analize alınacak örneğin ambalajı genel mikrobiyoloji kurallarına göre açılmalı ve ambalajın açılması sırasında örneklerin mikrobiyal yükünde değişime sebep olabilecek hatalardan kaçınılmalıdır. Yapılan analizlerde doğru ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için örneklerin analize hazırlanması esnasında dikkat edilmesi gereken hususlar şöyle sıralanabilir (Görsel 2.5):

- Örneğin bulunduğu ambalaj açılmadan önce ambalajın dış kısımları %70'lik alkolle temizlenir. Bu işlem yapılırken alkolün gıdaya temas ettirilmemesine dikkat edilmelidir.
- Örneğin bulunduğu ambalaj açılırken kullanılan tüm araç gereç (makas, pens, konserve açacağı vb.) steril olmalıdır.
- Dondurulmuş gıdaların, analiz edilmeden önce orijinal ambalajında 2-5 °C'de 18 saat içinde veya 45 °C'nin altında 15 dakika içinde çözdürüldükten sonra bekletilmeden analize alınması gerekir.
- Bombajlı ürünlerin açılması sırasında laboratuvar çalışanlarının zarar görmemesi ve laboratuvarın kontamine olmaması için gerekli tedbirler alınmalıdır.
- Sıvı veya yarı sıvı örneklerin bulunduğu kaplar açılmadan önce iyice karıştırılmalıdır.

2.3.1. Örneğin Laboratuvara Kabulü ve Laboratuvar Kayıtları



Görsel 2.6: Laboratuvar kayıtlarının tutulması

- Örneğin laboratuvara gereken koşullarda getirilip getirilmediği kontrol edilir. Örneğin uygun koşullarda getirilmediği tespit edildiğinde ya örnek laboratuvara kabul edilmemeli ya da numune kabul formuna bununla ilgili tüm olumsuzluklar yazılmalıdır (Görsel 2.6).
- Örneklerin bulunduğu ambalajlarda herhangi bir delik, yırtık, kırık, çatlak olmamasına dikkat edilmelidir.
- Alınan örneğe ait tüm evrakların, imzaların ve mühürlerin (resmî numunelerde) tam olup olmadığı kontrol edilmelidir.
- Laboratuvara gelen ve kabul edilen örnek için gerekli



bilgilerin kayda alınması gerekir.

- Aynı örnekte kimyasal test de yapılacaksa öncelikle mikrobiyolojik analizler için analiz ve şahit numuneler ayrılmalıdır.

2.3.2. Ambalajın Açılması

- Alevden geçirilemeyecek (kâğıt, plastik vb.) ambalajlar önce %70'lik alkol, ardından steril saf su ile silinir.
- Konserve kutuları açılırken eğer kutuda bombaj, şekil bozukluğu vb. durumlar yoksa kutunun ağız kısmı ve çevresi %70'lik alkol ile dezenfekte edilir. Ardından kutunun kapağı alevden geçirilir. Konserve kutusu bombajlı ise kutu önce 100 ppm (100 mg/kg) klor ile silinir. 30 saniye bekletildikten sonra steril su ile silinir. Bombajlı kutular alevden geçirilmemelidir. Bu işlemlerden sonra kutu steril bir açacak yardımıyla açılır ve usulüne uygun şekilde analiz numunesi hazırlanır.
- Örneğin bulunduğu ambalaj cam, metal vb. maddeden yapılmış ise bu ambalajların ağız kısmı ve çevresi %70'lik alkolle silinir, ardından alevden geçirilir.

2.3.3. Analiz Örneklerini Tartma

Analiz örneklerinin, mikrobiyolojik özelliklerinde herhangi bir değişime uğratılmadan tartılabilmesi için dikkat edilmesi gereken hususlar şöyle sıralanabilir:

- Sıvı örnekler doğrudan analize alınabilir. Katı gıdalar ise tartım, homojenizasyon gibi ön işlemlerden geçirildikten sonra analize alınmalıdır.
- Katı örneklerin tartımı aseptik şartlarda yapılmalıdır. Tartım işlemleri için 0,1 g duyarlılıkta hassas teraziler kullanılmalıdır.
- Tartım işlemi, daha önce sterilize edilmiş saat camı, petri kutusu ve alüminyum folyo gibi materyallerin içinde yapılır.
- Katı gıda maddesi, tartım esnasında problem yaratacak boyutta ve nitelikte ise tartım öncesi aseptik koşullara uygun şekilde ürün boyutunun küçültülmesi gerekir.
- Tartım sırasında örneğin hedeflenen ağırlığa getirilmesi için kontaminasyon tehlikesini artıracak düzeyde uğraşılmalıdır. Böyle durumlarda tartım hatası, seyreltme sıvısının miktarının değiştirilmesi ile giderilir. Bu konu ile ilgili örnek aşağıda verilmiştir:

Örnek: Standart bir analizde 10 g gıda örneği üzerine 90 ml seyreltme sıvısının konulması gerekir. Analize alınacak örnek 10,4 g olarak tartıldı ise fazla tartım $10,4-10=0,4$ g'dır. Bu durumda;

10 g örnek için
0,4 g örnek için

90 ml seyreltme sıvısı gerekiyorsa
Y ml seyreltme sıvısı gerekir.

Y=3,6 ml seyreltme sıvısı gerekir.

Sonuç olarak 10,4 g örnek için gerekli seyreltme sıvısı miktarı $90+3,6=93,6$ ml olur. Bu işlemle standart 1/10 seyreltme oranı korunmuş ve tartım sırasındaki kontaminasyon tehlikesi azalmış olur.

2.3.4. Homojenizasyon İşlemi ve Kullanılan Araçlar

Analize alınacak katı veya yarı katı gıda örneklerinin bir seyreltme sıvısı içinde homojen hâle getirilmesi işlemi **homojenizasyon** olarak adlandırılır. Bu işlemle; oluşturulan çözelti içindeki ürün dağılımının ve özelliklerinin çözeltinin her yerinde aynı olması, mikroorganizmanın aseptik koşullarda kısa sürede ve en yüksek oranda seyreltme sıvısına geçirilmesi hedeflenir.



Homojenizasyon işleminde kullanılan araçlar ve bunların özellikleri aşağıda verilmiştir:

Manyetik Karıştırıcı

Manyetik karıştırıcı; yoğurt, ketçap, şeker, dondurma, süt tozu gibi seyreltme sıvısında kolayca eriyebilen katı ve yarı katı gıdaların homojenizasyonunda kullanılır (Görsel 2.7).

Tüp Karıştırıcı (Vorteks)

Tüp karıştırıcı; süt, ayran, meyve suyu gibi tüp içerisinde bulunan sıvı gıdaların karıştırılmasında kullanılır (Görsel 2.8).



Görsel 2.7: Manyetik karıştırıcı



Görsel 2.8: Tüp karıştırıcı

Döner Bıçaklı Karıştırıcı (Blender)

Blender, katı gıdaların kesilerek, parçalanarak ve ezilerek homojenize edilmesinde kullanılır (Görsel 2.9). Döner bıçakları vasıtasıyla yüksek dönme hızında gıdanın etkin bir şekilde parçalanmasını sağlar. Kuru yemiş, makarna, bisküvi gibi sert ve kuru gıdalar dışında salam, sosis gibi ürünler de blenderde homojenize edilebilir.

Peristaltik Tip Karıştırıcı (Stomacher)

Stomacher, genellikle et ürünlerinin parçalanmadan homojenize edilmesinde kullanılır (Görsel 2.10). Örnekler ve seyreltme sıvısı, özel steril bir torba içerisinde cihazın pedallı ayakları sayesinde ezilerek homojenize olur. Sert ve kuru gıdalar stomacherda homojenize edilmemelidir. Aksi hâlde stomacherın steril torbaları yırtılabilir.



Görsel 2.9: Blender



Görsel 2.10: Stomacher

Pulsifier (Pulsifayer)

Pulsifier, stomachera benzeyen çalışma mekanizmasına sahiptir. Analize alınacak gıda örneğinin steril bir torba içinde yüksek frekansla titreştirilip şok dalgaları yaratılarak mikroorganizmaların sıvı ortama geçirilmesi prensibine dayanır. Örnek, bu cihazla tamamen parçalanmadığı için seyreltme sıvısına az miktarda gıda geçişi olmaktadır.



1. UYGULAMA : ASEPTİK TEKNİĞE UYGUN LABORATUVAR HAZIRLIĞI

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- ✓ Dezenfektan küvetleri
- ✓ Temizlik bezleri
- ✓ Kâğıt havlu
- ✓ Uygun dezenfektan çözeltileri
- ✓ %70'lik etil alkol

İşlem Basamakları

1. Laboratuvarın temizlik kontrolünü yapınız. Zeminde çöp olmamasına ve tezgâhların üzerinde herhangi bir araç gereç bulunmamasına dikkat ediniz.
2. Laboratuvar ortamında herhangi bir kirlilik mevcut ise uygun temizlik çözeltileri ile temizleyiniz.
3. Usulüne uygun şekilde dezenfektan çözeltilerini hazırlayınız.
4. Kapların üzerine dezenfektan çözeltilisinin adını, çözeltilinin hazırlanma tarihini ve konsantrasyonu, çözeltiliyi hazırlayanın adını ve soyadını yazınız.
5. Laboratuvar yüzeylerini (zemin, tezgâh, masalar, dolaplar vb.) uygun dezenfektan çözeltileri ile dezenfekte ediniz.

İşlem Uygulama Şeması

İşlem basamaklarına göre gerçekleştirilen iş ve işlemlerle ilgili olarak Tablo 2.2'yi doldurunuz.

Tablo 2.2: Dezenfektan Çözeltisi Hazırlama

Hazırlanan Dezenfektan Çözeltisi	Çözeltilinin Konsantrasyonu	Çözeltilinin Kullanılacağı Yüzeyler





2. UYGULAMA : ÖN ÖRNEK (ALAN ÖRNEĞİ) ALMA



İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Uygulamaya başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- ✓ Steril numune şişeleri
- ✓ %70'lik etil alkol
- ✓ Bunsen beki
- ✓ Pamuk

İşlem Basamakları

1. Örneği alacağınız musluğun ağzında hortum vb. eklentiler varsa bunları çıkarınız.
2. Musluğun ağız kısmını iyice temizleyiniz.
3. Musluğu sonuna kadar açarak suyun birkaç dakika akmasını sağlayınız. Ardından musluğu kapatınız.
4. Musluğu, %70'lik alkol dökülmüş ve yakılmış bir pamuk tamponla 1 dakika boyunca sterilize ediniz.
5. Musluğu tekrar dikkatle açarak birkaç dakika suyun akmasını sağlayınız.
6. Steril numune şişesini dipten tutarak ağız kısmına el değdirmeden şişenin kapağını dikkatlice açınız. Şişenin kapağını, iç kısmı aşığı bakacak şekilde tutmaya dikkat ediniz.
7. Şişenin ağzını alevden geçiriniz ve numuneyi aldıktan hemen sonra kapağı sıkıca kapatınız.
8. Şişenin tepesinde bir miktar boşluk kalmasına dikkat ediniz.
9. Aldığınız örneği uygun şartlarda laboratuvara getiriniz ve örneği analize alıncaya kadar muhafaza şartlarına uygun olarak saklayınız.
10. Numune alma tutanağını ve etiketini usulüne uygun şekilde doldurunuz.



İşlem Uygulama Şeması

İşlem basamaklarına göre gerçekleştirilen iş ve işlemlerle ilgili olarak Tablo 2.3'ü doldurunuz.

Tablo 2.3: Numune Alma Tutanağı ve Etiketi (EK-1)

EK - 1

NUMUNE ALMA TUTANAĞI ve ETİKETİ

Tutanak No :
İşyerinin Adı :
Adresi :

Tarih:

Saat:

Yasal Dayanak : 5996 Sayılı Kanun

Numune Alınış Esası : Türk Gıda Mevzuatı

İşyeri Açma ve Çalışma Ruhsatı No:

İşyeri Kayıt/Onay Numarası:

ALINAN NUMUNENİN	
Ürün Cinsi ve Adı	
Üretim Yeri ve Adresi	
Numunenin Alındığı Ünite	
Son Tüketim Tarihi	
Numune Miktarı	
Parti no / Seri no ve Parti Büyüklüğü	
Numune Alınış Sebebi	
Numunenin Alınış Koşulları	
Numunenin Laboratuvara Gönderiliş Koşulları	
Plastik Güvenlik Mührünün Numarası	
Güvenlik Etiketi Numarası	
Numune Sıcaklık Değeri	

Yukarıda belirtilen gıda işletmesinin sahibi veya sorumlusunin huzurundaadet numune alınarak mührü ile mühürlenmiş ve işbu tutanak tarafımızca imza edilmiştir.

Resmi Kontrol Ekibinin

Adı Soyadı :
Unvanı :
İmza :

İşyeri yetkilisi veya Sorumlusunun

Adı Soyadı :
Görevi :
İmza :

Not : Özel mevzuatına bağlı numune alma tutanakları için bu tutanak düzenlenemez.



Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Çalışma bitiminde çalışma alanınızı temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan ekipmanları temizleyip dezenfekte ederek yerlerine kaldırmınız.
- ✓ Cihazların temiz ve kapalı konumda bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Atıkları uygun atık kutusuna atınız.
- ✓ Laboratuvarın elektrik, gaz ve su bağlantılarının kapalı olup olmadığını kontrol ediniz.

Sonuç ve Yorum

“Ön Örnek (Alan Örneği) Alma” Uygulaması

DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Örnekleme planına göre alınacak örnek miktarını belirledi.					
Aseptik şartlarda örnek aldı.					
Alınan örneği uygun şartlarda laboratuvara getirdi.					
Analiz evraklarını doğru şekilde doldurdu.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını ve ekipmanları temizledi.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:	Gerçek Puanı:				

Değerlendirme: Form puanını 2,5 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “**BAŞARILI**” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.

**3. UYGULAMA : ANALİZ ÖRNEĞİ (ÖRNEK ÜNİTESİ) HAZIRLAMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel hazırlıklarınızı yapınız ve kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmuyunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- ✓ Usulüne uygun şekilde alınan katı ve sıvı gıda örnekleri
- ✓ Steril seyreltme sıvısı (serum fizyolojik, peptonlu su, Ringer çözeltisi vb.)
- ✓ Homojenizasyon için gerekli ekipmanlar (blender, stomacher, vorteks, manyetik karıştırıcı vb.)
- ✓ Steril kesici (makas, bıçak vb.)
- ✓ Steril kaşık, spatül vb.
- ✓ Steril tartım kapları (50 ml'lik beher, petri kutuları, alüminyum folyo vb.)
- ✓ Hassas veya analitik terazi
- ✓ Steril metal termometre
- ✓ Bunsen beki
- ✓ Steril pipet
- ✓ %70'lik etil alkol
- ✓ Steril saf su

İşlem Basamakları

1. Grup çalışması yapınız ve her grupta bir katı ve bir sıvı örnek olacak şekilde örneklerinizi seçiniz.
2. Örneklerin bulunduğu materyalleri açmadan önce usulüne uygun şekilde temizleyiniz.
3. Analize alınacak gıda örneklerinin sıcaklığını ve pH değerini ölçerek Tablo 2.4'ü doldurunuz.
4. Usulüne uygun olarak alınan katı gıda örneklerinden aseptik koşullarda 10 g tartınız.
5. Sıvı gıda örneklerinden steril pipetle aseptik koşullarda 10 ml alınız.
6. Hedeflenen örnek miktarı ile tartılan örnek miktarı arasında fark var ise örnek ve seyreltme sıvısı arasında 1/10 oranını sağlayacak şekilde seyreltme sıvısının miktarını ayarlayınız (Tablo 2.5).
7. Tartımını yaptığınız örneği seyreltme sıvısının bulunduğu materyale yerleştiriniz.



8. Analize alınacak örneği, özelliğine uygun bir şekilde ve uygun teknikte seyreltme sıvısı ile homojenize ediniz.
9. İşlem sonunda uygulanan yöntemin işlevselliğini tartışınız.

İşlem Uygulama Şeması

İşlem basamaklarına göre gerçekleştirilen iş ve işlemlerle ilgili olarak Tablo 2.4' ü ve 2.5' i doldurunuz.

Tablo 2.4: Laboratuvara Kabul Edilen Örneklerin Etiket Bilgileri

Gıda Örneğinin Laboratuvara Geldiği Tarih ve Saat	
Örnek	
Ambalaj Özellikleri	
Miktar	
pH	
Sıcaklık	
Açıklama	

Tablo 2.5: Örneğin Analize Hazırlanması

Analiz Örneği	Hedeflenen Ağırlık	Tartılan Örnek Miktarı	Hesaplama	Seyreltme Sıvısı Miktarı	Homojenizasyon Yöntemi

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Çalışma bitiminde çalışma alanınızı temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan ekipmanları temizleyip dezenfekte ederek yerlerine kaldırınız.
- ✓ Cihazların temiz ve kapalı konumda bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Atıkları uygun atık kutusuna atınız.
- ✓ Laboratuvarın elektrik, gaz ve su bağlantılarının kapalı olup olmadığını kontrol ediniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE "D" YANLIŞ İSE "Y" YAZINIZ.

1. () Dezenfeksiyon amacıyla kullanılan maddelere dezenfektan adı verilir.
2. () Dezenfektanlar güneş ışığını iyi alabilen alanlarda depolanmalıdır.
3. () İki sınıflı örnekleme planında $n=7$ ve $c=0$ ise partinin kabul edilebilmesi için analiz edilen 7 örnekte de negatif sonuç alınması gerekir.
4. () Örnekleme işleminde ambalaj boyutu büyüdükçe daha fazla sayıda örnek alınır.
5. () Sert ve kuru gıdaların homojenizasyonunda stomacher kullanılır.
6. () Örnek alma esnasında ürün cinsine ve parti büyüklüğüne göre farklı örnek alma teknikleri uygulanır.

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

7. Örnek alınacak konserve kutusu bombajlı ise kutu önce %70'lik..... ile ardından steril saf su ile silinmelidir.
8. Dondurulmuş örnekler laboratuvara sıcaklık koşullarında getirilmelidir.
9. Tüp içerisinde bulunan sıvı örneklerin karıştırılmasında kullanılır.
10. Bir yüzeydeki patojen mikroorganizmaların fiziksel veya kimyasal ajanlarla yok edilmesi işlemine adı verilir.

AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

11. I. Alkol
II. Formaldehit
III. İyot bileşikleri
IV. Peroksitler

Yukarıdaki maddelerden hangileri mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın kullanılan dezenfektanlar arasındadır?

- A) I ve IV
- B) I, II ve III
- C) I, II ve IV
- D) II, III ve IV
- E) I, II, III ve IV



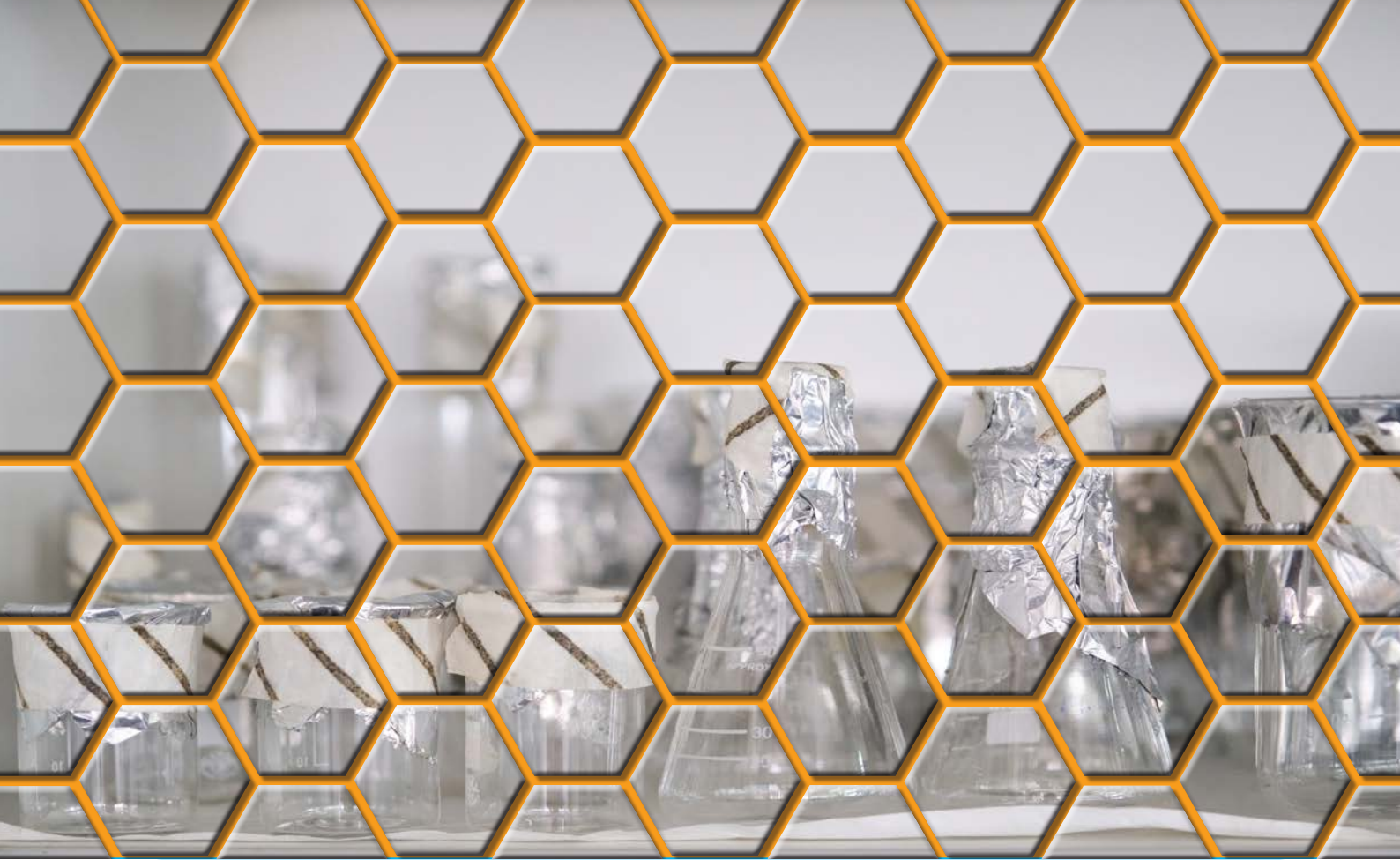


12. Aşağıdakilerden hangisi analize alınacak örneğin homojenizasyonunda kullanılan araçlardan biridir?
- A) Eküvyon
B) Etüv
C) İnkübatör
D) Manyetik karıştırıcı
E) Otoklav
13. I. Örneğin analize hazırlanması
II. Örnek miktarının belirlenmesi
III. Örneğin uygun koşullarda laboratuvara gönderilmesi
IV. Örnek alma planının yapılması
V. Örneğin usulüne uygun şekilde alınması
- Verilen bu örnek alma aşamalarının doğru sıralanışı aşağıdakilerden hangisidir?
- A) I-II-V-IV-III
B) II-IV-V-III-I
C) III-V-II-I-IV
D) IV-II-III-V-I
E) V-IV-II-III-I
14. 25 g gıda örneğinin homojenizasyonu için 225 ml seyreltme çözeltisi hazırlanmış fakat tartım 25,7 g yapılmıştır.
- Buna göre seyreltme oranının 1/10 olması için steril torbaya kaç ml daha seyreltme sıvısı eklenmelidir?**
- A) 5,9
B) 6,1
C) 6,3
D) 7,4
E) 7,6
15. Aşağıda verilen örnek alma işlemleri ile ilgili ifadelerden hangisi yanlıştır?
- A) Örnekler laboratuvara getirilirken güneş ışığını iyi alabilen kaplarda muhafaza edilmesi gerekir.
B) Örnek alma sırasında alevden geçirilemeyen ambalajlar önce %70'lik alkol ardından steril saf su ile silinir.
C) Çabuk bozulabilen dondurulmamış ürünlerin analize alınincaya kadar 0-5 °C sıcaklıkta muhafaza edilmesi gerekir.
D) Et ve balık gibi gıdalardan yüzeyden sürme ve kazıma yöntemleri ile örnek alınır.
E) Ekipmanlardan steril bir eküvyon kullanılarak sürme yöntemi ile örnek alınır.
16. Aşağıdakilerden hangisi örnek miktarını etkileyen faktörlerden biri sayılmaz?
- A) Kontrolün yapılma nedeni
B) Örnekleme planının yapıldığı yer
C) Ürünün ambalaj şekli
D) Ürünün fiziksel formu
E) Ürünün pazar payı

3. ÖĞRENME BİRİMİ



STERİLİZASYON



Bu öğrenme biriminde;

- Tekniğine uygun olarak araç gereçleri sterilizasyona hazırlamayı,
- Aseptik tekniğine uygun olarak araç gereçlerin sterilizasyonunu yapmayı deneyimleyerek öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 3.1. Araç Gereci Sterilizasyona Hazırlama
- 3.2. Araç Gerecin Sterilizasyonu

TEMEL KAVRAMLAR

Sterilizasyon buhar alev filtre ısı radyasyon



3. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Gıdaların mikrobiyolojik analizlerinde kullanılan materyallerin taşınması gereken özellikler nelerdir?
2. İndikatör mikroorganizmaların önemini ve kamu kontrol kuruluşları tarafından belirlenen indikatör mikroorganizmaları araştırınız.

3.1. ARAÇ GEREÇİ STERİLİZASYONA HAZIRLAMA

Bir ortamdaki veya bir materyaldeki mikroorganizmaların tamamının yok edilmesi ya da ortamdaki uzaklaştırılması işlemine **sterilizasyon** denir. Sterilizasyon işlemi uygulanmış ortam veya materyal sterildir ve bu sterilitenin işlem sonrası korunması gerekir.

Mikrobiyoloji laboratuvarında sterilizasyon işlemi ile laboratuvardaki çeşitli araç gereçlerin, ekipmanların, besiyerlerinin, çözeltilerin ve çalışılmış mikroorganizma kültürlerinin üzerinde veya iç kısımlarında bulunan mikroorganizmalar uzaklaştırılır (Görsel 3.1). Bu sayede bu ortamlarda bulunan mikroorganizmaların vejetatif formları ve dirençli sporları ortamdaki arındırılmış olur.

3.1.1 Mikrobiyoloji Laboratuvarında Sterilizasyonun Önemi

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında, çalışmaların güvenilir ve doğru sonuç vermesi açısından laboratuvar kurallarına eksiksiz uyulması ve kullanılan malzemelerin steril olması gerekir. Ayrıca insan sağlığını tehdit eden patojen mikroorganizmadan korunmada, dış ortamdaki istenmeyen mikroorganizmanın bulaşmasının önlenmesinde ve kontamine materyallerin yeniden kullanılabilir hâle getirilmesinde sterilizasyon işlemi çok önemlidir.

Besiyerleri, çözeltiler, laboratuvar araç gereci ve ekipmanları steril olmazsa bunlardan gelebilecek mikroorganizmalar, analizi yapılan gıdadan gelmiş gibi değerlendirilir ve yanlış yorumlara yol açar.

Örneğin, analizde kullanılacak herhangi bir malzemede bir önceki analizden kalma bir kontaminasyon durumu varsa yeni yapılan analizde gıda numunesi hijyenik koşullarda üretilmiş olsa dahi numunede mikrobiyal üreme görülecektir. Bu da numunenin hatalı değerlendirilmesine sebep olacaktır.

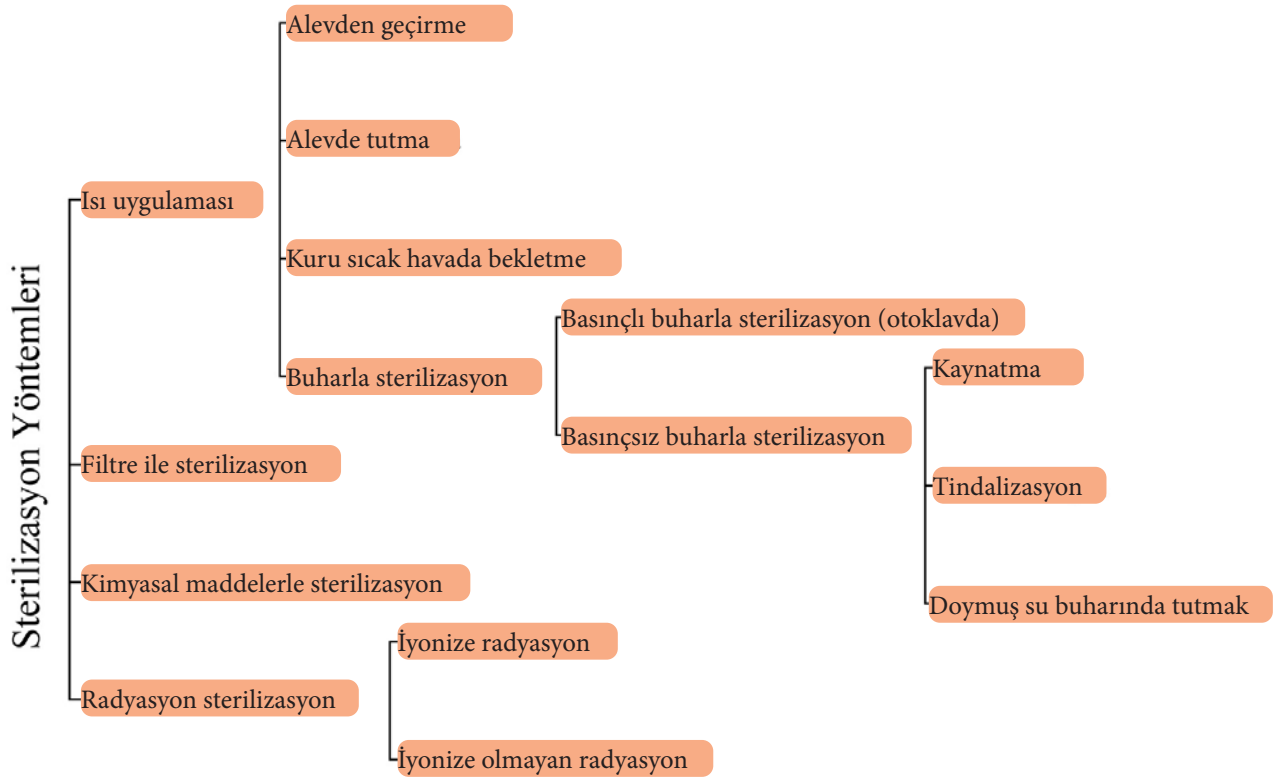


Görsel 3.1: Sterilizasyon odası



3.1.2. Sterilizasyon Yöntemleri

Sterilize edilecek materyalin özelliğine göre farklı sterilizasyon yöntemleri uygulanabilir (Görsel 3.2).



Görsel 3.2: Sterilizasyon yöntemleri

Laboratuvarda besiyerlerinin, çözümlerin ve diğer materyallerin sterilizasyonunda kullanılacak ısı uygulamaları sterilize edilecek materyalin özelliğine, hacmine ve içeriğine göre farklılık göstermektedir.

Alevden Geçirme

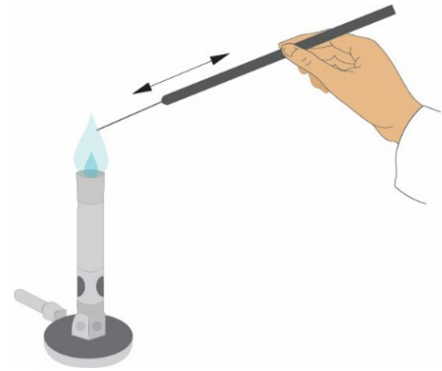
Analiz sırasında steril tüp, erlen, balon, pipet gibi cam malzemeler ile steril pens, bıçak gibi araçların kontaminasyonunun önlenmesi için uygulanan işlemdir. Bu işlem, malzemelerin ağız kısımlarının açılıp kapatılması sırasında kısa süreli olarak art arda üç kez bunsen beki alevinden geçirilmesi ile gerçekleştirilir.

Alevde Tutma

Ekim öncesinde ve sonrasında özenin ucunun akkor hâline gelinceye kadar bunsen beki alevinde tutularak sterilize edilmesi işlemidir (Görsel 3.3).

Steril olmayan bıçak, pens, drigalski özesi gibi araçların yüzeylerindeki mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında da bu yöntemden yararlanır.

Bu materyallerin uçları, en az %70 yoğunlukta olan alkole daldırıldıktan sonra aleve tutulur ve materyaller alev çatısı altına indirilerek yüzeydeki alevin sönmesi beklenir. Bu işlemle bu materyallerin yüzey sterilizasyonu sağlanmış olur.



Görsel 3.3: Özeyi alevde tutma işlemi



Kuru Sıcak Havada Bekletme

Boş, temiz ve sterilizasyon hazırlığı yapılmış cam malzemeler ile metal malzemelerin kuru sterilizatörde (pastör fırını) veya etüvde belli sıcaklıkta ve belli sürede tutularak sterilize edilmesi işlemidir.

Buharla Sterilizasyon

Buharla yapılan sterilizasyonda sterilize edilecek materyalin özelliğine göre basınçlı buhar ve basınçsız buhar yöntemlerinden uygun olanı seçilmelidir.

- **Basınçlı Buharla Sterilizasyon:** Besiyerlerinin, çeşitli çözeltilerin, eküvyonların, membran filtrelerin, bazı laboratuvar araç gereçlerinin, kullanılmış malzemelerin ve mikroorganizma kültürlerinin 1,5-2 atmosfer basınç altında, su buharı ortamında sterilize edilmesi işlemidir. Bu işlem için otoklav adı verilen ekipmanlar kullanılır.
- **Basınçsız Buharla Sterilizasyon:** Buharla doymuş bir ortamda basınç uygulanmadan yapılan sterilizasyon işlemidir. Bu işlem tindalizasyon, kaynatma ve doymuş su buharında tutmak şeklinde üç farklı yolla yapılabilmektedir.
 - * **Tindalizasyon:** Yüksek ısıda bozulabilen besiyerlerine (karbonhidrat, yumurta, serum vb. içeren) ve bazı çözeltilere uygulanan kademeli sterilizasyon işlemidir. Bu işlem, su banyosu veya Koch kazanı kullanılarak yapılır. Sterilize edilecek madde, su banyosunda 80 °C'de 1 dakika tutulur ve oda sıcaklığında ya da 37 °C'de bir saat bekletilir. Ardından kaynar su banyosunda 95-98 °C'de 30 dakika tutulduktan sonra hızla soğutulur ve oda sıcaklığında ya da 37 °C'de 8 saat bekletilir. Bu işlem arka arkaya üç kez tekrarlanır.
 - * **Kaynatma:** Yüksek sıcaklıkta bozulan bazı çözeltilere, jelatin veya şeker içeren bazı besiyerlerine, bazı metal ve cam malzemelere uygulanan sterilizasyon işlemidir. Sterilize edilecek materyal, su banyosunda 100 °C'de 30 dakika tutularak kaynatma işlemi gerçekleştirilir.
 - * **Doymuş Su Buharında Tutmak:** Sterilize edilecek malzemelerin doymuş su buharı elde edilen özel kazanlarda [Koch (Koh) kazanı] 100 °C'de 90 dakika tutulması işlemidir.

Filtreyle Sterilizasyon

Sıvı ortamda (içme suyu, süt, meyve suyu vb. çözelti özelliği gösteren materyal) bulunan mikroorganizmaların belli gözenek çaplarına sahip filtrelerden geçirilerek uzaklaştırılması işlemidir. Bu yöntem daha çok vitamin, amino asit, enzim ve şeker gibi ısıya dayanıksız çözeltileri sterilize etmek için kullanılır. Filtrasyon amacıyla membran filtreler, diatom toprağı filtreleri, asbest süzgeçli filtreler, porselen filtreleri ve cam tozlu filtreler kullanılır. Filtre ile sterilizasyon yönteminde hava da sterilize edilebilir. Bu amaçla geliştirilen, yüksek etkinlikte partikül yakalayıcı anlamına gelen HEPA [High Efficiency Particulate Arresting (Hay İfşinsi Pirtikylıt İresting)] adlı filtreler mevcuttur.

Kimyasal Maddelerle Sterilizasyon

Tek kullanımlık steril ürünler ile ısıya duyarlı bazı malzemelerin sterilizasyonunda ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında tezgâhların dezenfeksiyonunda bu yöntemden yararlanılır. Kimyasal maddelerle sterilizasyon işlemi mikroorganizmaların protein, enzim denatürasyonu gerçekleşir ve nükleik asit yapıları zedelenir. Bunun sonucunda mikroorganizmaların üremeleri olumsuz etkilenir veya mikroorganizmalar ölür. Bu amaçla kullanılan kimyasal maddelere dezenfektanlar, antibiyotikler ve boyalar örnek olarak verilebilir.

Radyasyonla Sterilizasyon

İyonize olan ve olmayan radyasyon olmak üzere iki farklı şekilde uygulama vardır. Sterilize edilecek materyalde sıcaklık artışı olmadığından bu işlem **soğuk sterilizasyon** olarak da adlandırılır.



- **İyonize Radyasyon:** Isı enerjisine ihtiyaç duyulmadan ambalaj içindeki materyallerin sterilizasyonunda kullanılan yöntemdir. Bu yöntem kullanılırken özel güvenlik tedbirlerinin alınması gerekir.
- **İyonize Olmayan Radyasyon:** Gıda işletmelerinde araç gereç, tezgâh ve ambalaj kâğıtları gibi düzgün yüzeylerin yanı sıra havanın, suyun ve odanın sterilizasyonu için uygulanan bir yöntemdir. Ultraviyole (UV) ışınları ile yapılır. Bu yöntemde UV ışınları yüzeysel etkili olduğundan mikroorganizma yükünde azalma meydana gelse bile tam sterilizasyon sağlanamamaktadır.

3.1.3. Araç Gerecin Sterilizasyona Hazırlanması

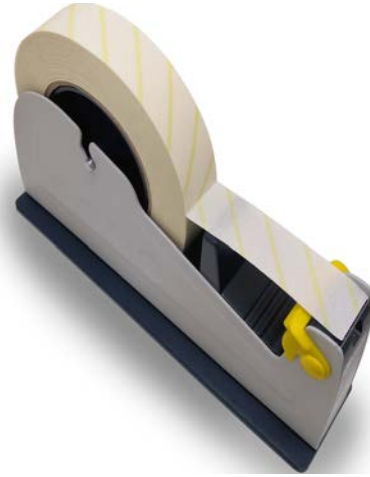
Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılacak cam veya metal malzemeler, usulüne uygun biçimde temizlenip kurutulduktan sonra sterilizasyon hazırlığından geçirilmelidir.

Tüp, pipet, balon, erlen ve mezürlerin ağız kısımları için sıvıları emmeyen, yağlı ve uzun lifli pamukla (kalaycı pamuğu) tıkaç hazırlanmalıdır. Geniş ağızlı kapların ağız kısımları, pamukla ya da gazlı bezle sarılmış pamuk tıkaçla kapatılmalıdır. Pamuk tıkaçlar, kapların iç kısmına mikroorganizma girişini engeller.

Tıkaçlar, uygun bir kâğıt parçası veya alüminyum folyo gibi yanmaya ve tutuşmaya karşı dayanıklı materyal ile sarılarak sterilizasyon için paketlenir. Vidalı kapaklı şişeler için pamuk tıkaç gerek duyulmamaktadır.

Petri kutuları, drigalski spatülü, cam baget, makas, spatül vb. cam veya metal malzemeler uygun bir kâğıt parçası ile usulüne uygun sarılarak sterilizasyona hazırlanır.

Sterilizasyon işleminin etkinliğinin kontrol edilmesi ve olası sterilizasyon hatalarının belirlenmesi için biyolojik veya kimyasal indikatörler kullanılır. Biyolojik indikatör olarak dirençli bakteri sporlarını içeren test materyali, kimyasal indikatör olarak karakteristik değişiklik gösteren (renk değişikliği vb.) kimyasal maddeler içeren kâğıt şerit (sterilizasyon indikatör bandı) veya diğer test materyalleri kullanılır (Görsel 3.4).



Görsel 3.4: Sterilizasyon indikatör bandı

3.2. ARAÇ GEREĞİN STERİLİZASYONU

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında en sık kullanılan sterilizasyon yöntemleri kuru sıcak hava ve buhar ile sterilizasyondur.

3.2.1. Kuru Sıcak Hava ile Sterilizasyon Araçları

Bu işlem için pastör fırını (sterilizatör) ya da etüv kullanılır. Pipet, petri kutusu, erlen, balon gibi boş cam malzemeler ile porselen ve metal malzemelerin sterilizasyonu için en uygun yöntemdir. Besiyerlerinin ve çözeltilerin sterilizasyonunda bu yöntem kullanılmaz.

Sterilize edilecek malzemelerin tamamen kuru olması gerekir. Bu nedenle ıslak malzemeler öncelikle 60-70 °C'de kurutulmalı daha sonra sterilizasyon işlemi uygulanmalıdır.

Cam ve metal malzemelerin sterilizasyonunda Tablo 3.1'deki sıcaklık-süre normlarından biri uygulanır.



Tablo 3.1: Kuru Hava ile Sterilizasyonda Sıcaklık Süre Normları

Sıcaklık	Uygulama Süresi
170-175 °C'de	1 saat
160-165 °C'de	2-2.5 saat
150 °C'de	3-3.5 saat

3.2.2. Buharla Sterilizasyon Araçları

Buhar ile sterilizasyon; besiyerlerinin, çözeltilerin ve kuru sıcaklıkta bozulabilen materyallerin sterilizasyonunda kullanılan yöntemdir. Kuru sıcaklığa göre nemli sıcaklığın öldürücü etkisi daha fazladır.

Basınçsız buhar ile sterilizasyon yönteminde Koch kazanından ve su banyosundan yararlanır. Koch kazanında akım hâlindeki su buharından faydalanılarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilir. Su banyosu, içinde saf su bulunan ve bu suyu istenilen sıcaklıkta sabit tutmaya yarayan termostatlı ve çift cidarlı bir ekipmandır.

Basınçlı buharla sterilizasyonda otoklav adı verilen cihazlardan yararlanır (Görsel 3.5). Otoklavlar, uygun sıcaklıkta doymuş su buharının elde edilmesini ve bunun kontrollü basınç altında belli bir süre tutulmasını sağlar. Kullanım amacına ve kapasitesine göre farklı boyutlarda ve hacimlerde üretilmiş yatay ve dikey tip otoklavlar mevcuttur. Besiyerlerinin ve dilüsyon çözeltilerinin sterilizasyonunda, sıcaklığa dayanıklı araç gerecin sterilizasyonunda, kullanılmış ve işi bitmiş mikroorganizma kültürlerinin imhasında otoklav kullanılır. Otoklavla sterilizasyonda sıcaklık derecesi ve uygulama süresi; sterilize edilecek materyalin özelliğine, bulunduğu kabın tipine ve hacmine bağlı olarak değişiklik gösterir. Özel bir uyarı bulunmadığı takdirde otoklavla sterilizasyonda, 121 °C sıcaklık ve 15-20 dakika uygulama süresi yeterli olmaktadır.



Görsel 3.5: Otoklav



1. UYGULAMA : ARAÇ GERECİN STERİLİZASYONA HAZIRLANMASI

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | |
|----------------------|----------------------|---------------------------------------|
| ✓ Test tüpleri | ✓ Beher | ✓ Gazlı bez |
| ✓ Erlen | ✓ Spatül | ✓ Makas |
| ✓ Balon | ✓ Pens | ✓ Parşömen kâğıdı ya da samanlı kâğıt |
| ✓ Cam petri kutuları | ✓ Deterjan çözeltisi | ✓ Bunsen beki |
| ✓ Cam pipetler | ✓ Saf su | ✓ Alüminyum folyo |
| ✓ Metal pipet kutusu | ✓ Kalaycı pamuğu | |

İşlem Basamakları

1. Grup çalışması yaparak mikrobiyoloji laboratuvarında sterilize edilebilecek malzemeleri listeleyiniz. Malzemeler ile sterilizasyon yöntemleri arasında uygun eşleştirmeleri yapınız.
2. Sterilize edilecek malzemelerin temizliğini kontrol ediniz.
3. Malzemelerde herhangi bir kirlilik varsa malzemeyi deterjan çözeltisi ile fırçalayıp durulayınız. Deterjanla çıkmayan kirlilikler için uygun temizleme çözeltisi olarak sülfirik kromik asit çözeltisi kullanınız.
4. Yıkanmış malzemeleri saf sudan geçirerek kurumaya bırakınız. (Kurutma işlemi için kurutma askısı veya etüv kullanabilirsiniz.)
5. Test tüplerinin ağız kısımlarına yağlı pamuktan hazırlanan tıkaçı, tüp içerisine 1-2 cm girecek şekilde yerleştiriniz. Hazırlığı tamamlanan tüpleri, gruplar hâlinde alüminyum folyoya sarınız ve metal tüp sporuna yerleştiriniz.
6. Metal pipet kutusunun dibine alüminyum folyo yerleştiriniz ve pipetleri, sivri uçları kabın dibine gelecek şekilde metal pipet kutusuna yerleştiriniz. Pipet kutusunun kapağını sıkıca kapatınız. Pipet kutusunun bulunmadığı durumlarda pipetlerin ağız kısımlarına küçük pamuk parçası koyunuz. Pipetin uçlarını bunsen beki alevinden geçirerek pipet dışında kalan pamuk liflerini uzaklaştırınız ve pipetleri usulüne uygun şekilde teker teker kâğıtlara sarınız.
7. Petri kutularını, tek tek veya gruplar hâlinde uygun bir biçimde kâğıda sarınız.



**2. UYGULAMA : ARAÇ GEREİN KURU HAVA İLE STERİLİZASYONU****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Uygulamaya başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

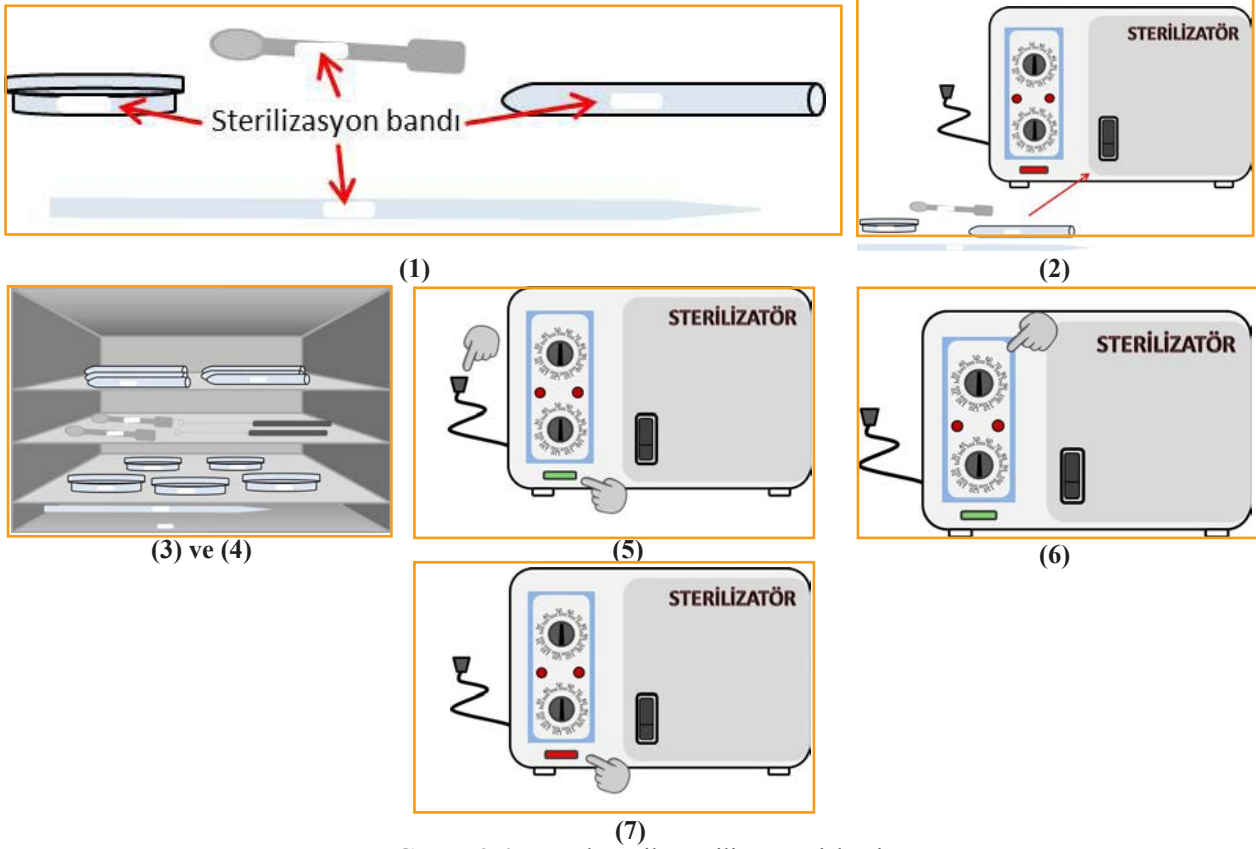
Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- ✓ Sterilizasyon hazırlığı yapılmış cam malzemeler (petri kutuları, pipetler, boş test tüpleri)
- ✓ Sterilizasyon hazırlığı yapılmış metal malzemeler (spatül, pens, pipet kutusu, metal tüp sporu)
- ✓ Sterilizasyon kontrol bandı
- ✓ Etüv ya da sterilizatör

İşlem Basamakları

1. 1. uygulamada sterilizasyon hazırlığı yapılmış materyallerin yüzeyine sterilizasyon kontrol bandı yapıştırınız.
2. Malzemeleri etüve ya da sterilizatöre uygun şekilde yerleştiriniz (Görsel 3.6).
3. Malzemeleri yerleştirirken etüv / sterilizatör duvarlarına temas etmemesine dikkat ediniz.
4. Hava dolaşımının sağlanması için malzemelerin arasında yeterli boşluk bırakmaya dikkat ediniz.
5. Etüv / sterilizatörün fişini prize takınız ve açma tuşuna basarak cihaza elektrik gelmesini sağlayınız.
6. Etüv / sterilizatörün sıcaklığını 170-175 °C, süresini 1 saat olarak ayarlayınız.
7. Süre sonunda etüv / sterilizatörü kapatınız. Ani ısı değişiminden dolayı cam malzemelerin çatlamalarını önlemek için cihazın sıcaklığı düşmeden kapağını açmayınız.
8. İşlem sonunda sterilize edilmiş malzemeleri, steril malzemelerin bulunduğu depolama alanına malzeme koduna göre yerleştiriniz.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 3.6: Kuru hava ile sterilizasyon işlemi

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Çalışma bitiminde çalışma alanınızı temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan ekipmanları temizleyip dezenfekte ederek yerlerine kaldırınız.
- ✓ Cihazların temiz ve kapalı konumda bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Atıkları uygun atık kutusuna atınız.
- ✓ Laboratuvarın elektrik, gaz ve su bağlantılarının kapalı olup olmadığını kontrol ediniz.





3. UYGULAMA : ARAÇ GEREÇİN BUHAR İLE STERİLİZASYONU



İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- √ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel hazırlıklarınızı yapınız ve kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- √ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- √ çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- √ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- √ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlemler basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- √ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- √ Sterilizasyon ön hazırlığı yapılmış cam balon
- √ Sterilizasyon ön hazırlığı yapılmış ve içinde saf su bulunan erlen
- √ Saf su
- √ Otoklav
- √ Otoklav poşeti
- √ Seyreltme özeltisi içeren vidalı kapaklı otoklav şişeleri (duran bottle)
- √ Otoklav bandı

İşlem Basamakları

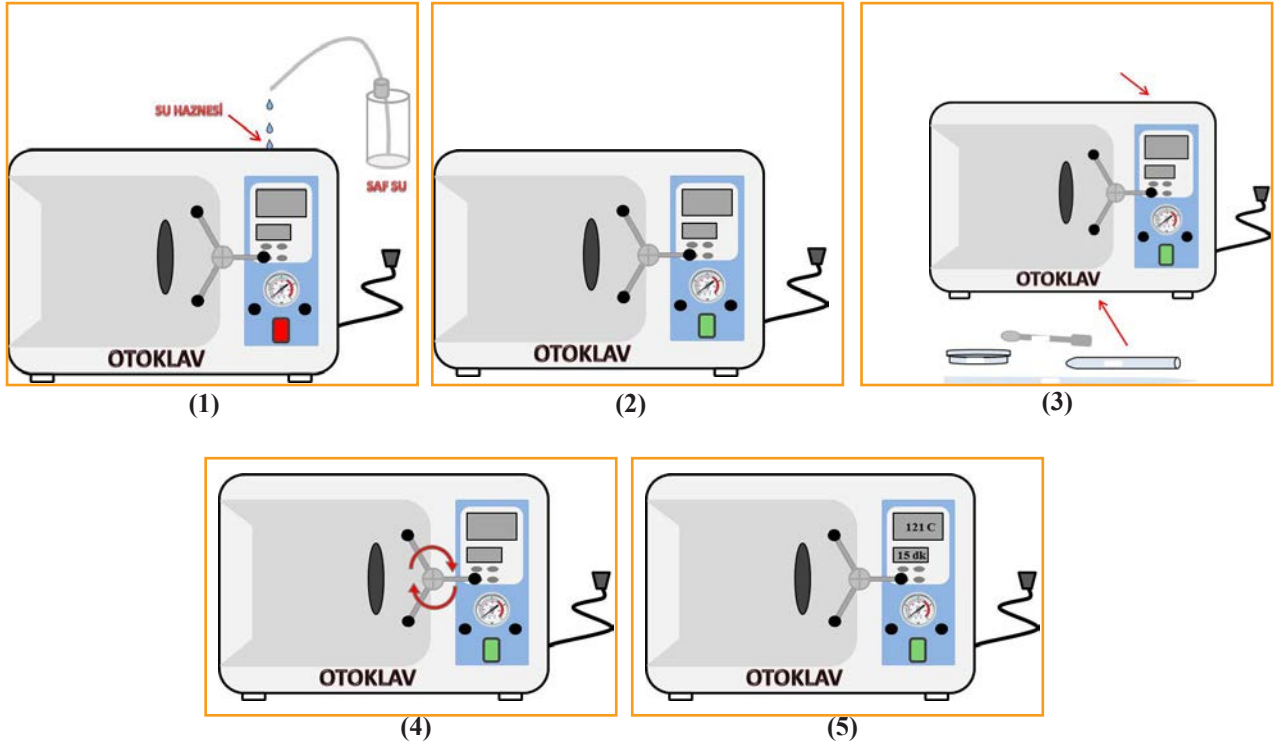
1. Otoklavın su seviyesini kontrol ediniz. Otoklavın su haznesini su seviye göstergesine kadar saf su ile tamamlayınız (Görsel 3.7).
2. Otoklavın fişini prize takınız ve cihaza elektrik gelmesini sağlayınız.
3. 1. uygulamada sterilizasyon hazırlığı yapılmış materyallerin üzerine otoklav bandı yapıştırınız ve bunları otoklava yerleştiriniz. Malzemeleri yerleştirme şeklinin otoklavda buharın dolaşımına engel olmamasına dikkat ediniz.
4. Otoklavın kapağını dikkatli bir şekilde kapatınız ve vidaları iyice sıkıştırınız.
5. Otoklavın sıcaklığını 121 °C'ye, süreyi 15 dakikaya ayarlayınız ve otoklavı çalıştırınız.
6. Klasik tip otoklavla çalışıyorsanız otoklavda sıcaklığı ve süreyi ayarlamadan önce buhar çıkış vanasını sonuna kadar açarak otoklavın havasını alınız. Daha sonra otoklavı 121 °C'ye ayarlayınız. Termometre sıcaklığı 90 °C'yi gösterdiğinde buhar çıkış vanasını kapatınız. Otoklav otomat



yaptığında ayarlanan sıcaklık derecesine ulaşmış olduğundan 15 dakika süreye ayarlayınız.

7. Sterilizasyon işlemi sonunda manometre göstergesinin 0'a inmesini bekleyiniz. Otoklavın içindeki malzemelerin ani olarak kaynamasına, şişelerden taşmasına veya kapaklarının patlamasına neden olmamak için basınç sıfıra düşmediği sürece cihazın kapağını kesinlikle açmayınız.
8. Manometre göstergesi sıfıra indikten sonra otoklavın kapağını açarak kısa bir süre bekleyiniz, sterilize edilmiş malzemeleri otoklavdan çıkarınız.
9. İşlem bitiminde otoklavın saf su tankını (hazneyi) kullanım talimatlarına uygun olarak boşaltınız.
10. Otoklavı, kapatma tuşuna basarak kapatınız ve cihazın fişini çekiniz.
11. Otoklavın raflarını talimatlara uygun olarak temizleyiniz.
12. Sterilizasyon sonrası boş cam malzemeleri, steril malzeme dolabına malzeme koduna göre yerleştiriniz. Saf su ve seyreltme çözeltisinin bulunduğu cam malzemelerin üzerine cam kalemi ile etiket bilgilerini yazınız. Malzemeleri buzdolabına uygun şekilde yerleştiriniz.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 3.7: Araç gerecin otoklavda sterilizasyonu

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Çalışma bitiminde çalışma alanınızı temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan ekipmanları temizleyip dezenfekte ederek yerlerine kaldırınız.
- ✓ Cihazların temiz ve kapalı konumda bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Atıkları uygun atık kutusuna atınız.
- ✓ Laboratuvarın elektrik, gaz ve su bağlantılarının kapalı olup olmadığını kontrol ediniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE "D" YANLIŞ İSE "Y" YAZINIZ.

- () Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan ekipmanların steril olması, yapılan analizlerin doğru sonuç vermesi bakımından önemlidir.
- () Tindalizasyon işlemi uygulanan matelyalde sıcaklık artışı olmadığından bu işlem soğuk sterilizasyon olarak da adlandırılır.
- () Radyasyon ile sterilizasyonda iyonize radyasyon ve iyonize olmayan radyasyon olmak üzere iki farklı uygulama mevcuttur.
- () Besiyerlerinin ve çözeltilerin sterilizasyonunda pastör fırını veya etüv kullanılır.

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

5. Bir maddenin yüzeyinde veya içerisinde bulunan mikroorganizmaların tamamının öldürülmesi veya uzaklaştırılması işlemi olarak adlandırılır.
6. Yüksek ısıda bozulabilen bazı besiyerlerine ve çözeltilere uygulanan kademeli sterilizasyon işlemi olarak adlandırılır.
7. Sterilizasyon işleminin etkinliğinin kontrol edilebilmesi için kimyasal indikatör olarak kullanılır.
8. Kullanılmış ve işi bitmiş mikroorganizma kültürlerinin imhası ile yapılır.

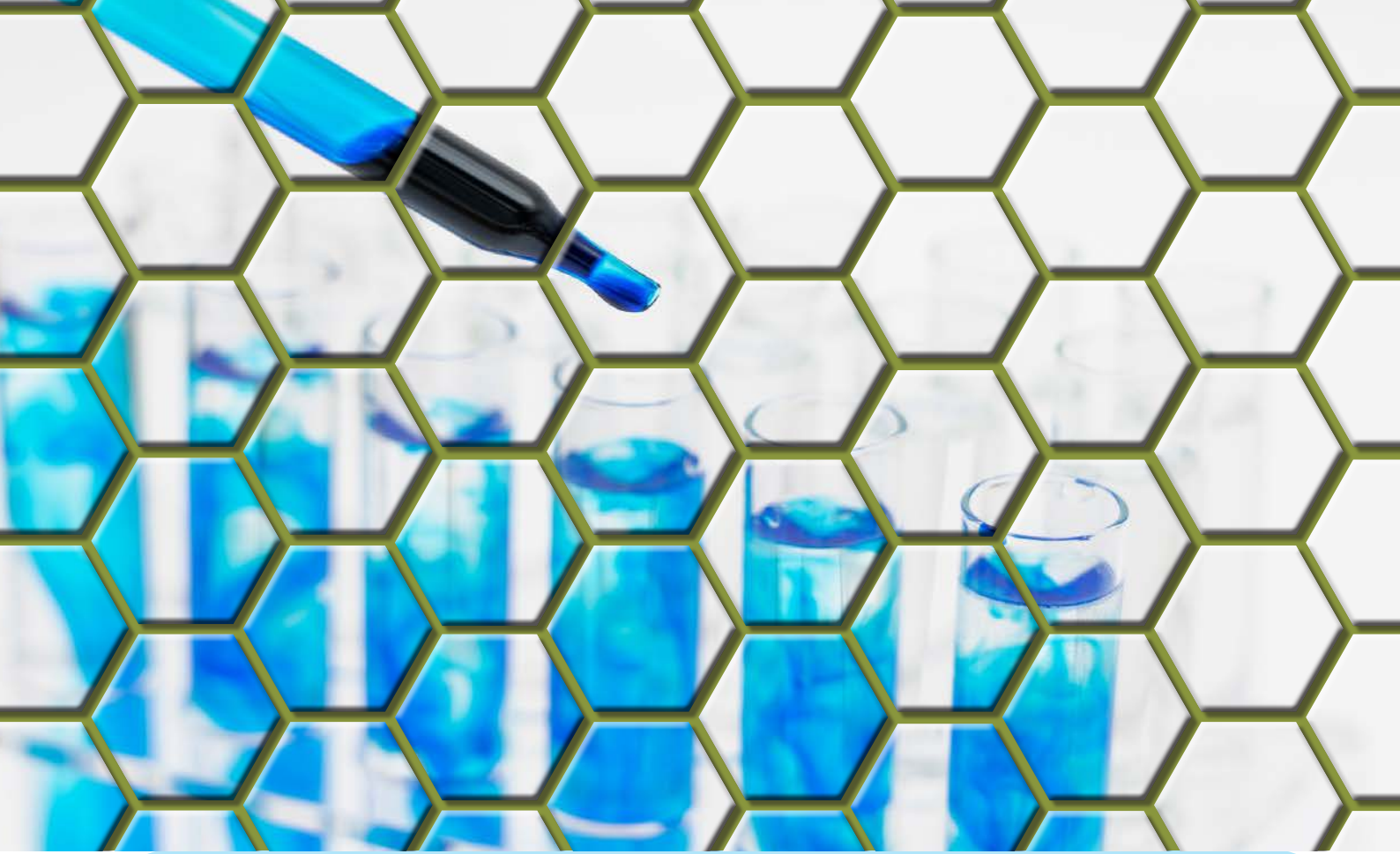
AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

9. **I. Antibiyotik**
II. Boya
III. Dezenfektan
Yukarıdaki maddelerden hangisi veya hangileri kimyasal sterilizasyonda kullanılmaktadır?
A) Yalnız I B) Yalnız II C) I ve III D) II ve III E) I, II ve III
10. **Aşağıdakilerden hangisi basınçsız buharla sterilizasyon yöntemlerinden biridir?**
A) Alevde tutma
B) Filtre ile sterilizasyon
C) Kaynatma
D) Kimyasal maddelerde bekletme
E) Otoklavda sterilizasyon
11. **Havanın sterilizasyonunda aşağıdaki filtrelerden hangisi kullanılır?**
A) Asbest süzgeçli
B) Diatom toprağı
C) HEPA
D) Membran
E) Porselen
12. **Basınçlı buharla sterilizasyon yönteminde aşağıdaki ekipmanlardan hangisi kullanılır?**
A) Etüv
B) Koch kazanı
C) Otoklav
D) Pastör fırını
E) Su banyosu

4. ÖĞRENME BİRİMİ



DİLÜSYON



Bu öğrenme biriminde;

- Dilüsyonun tanımını, dilüsyon çözeltilerinin hazırlanma aşamalarını ve hesaplamalarını,
- Dilüsyon çözeltilerinin sterilizasyonunu ve muhafaza edilmesi işlemlerini,
- Desimal dilüsyon hazırlamada dikkat edilecek noktaları,
- Sıvı ve katı gıdadan desimal dilüsyon serileri hazırlama uygulamalarını öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 4.1. Dilüsyon Çözeltisi
- 4.2. Desimal Dilüsyon Serisi Hazırlama

TEMEL KAVRAMLAR

Dilüsyon tampon çözelti desimal çözelti pH



4. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Çevrenizde bulunan gıda işletmelerinin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan dilüsyon çözeltilerini araştırınız.
2. Meyva suyunu sulandırarak tadındaki ve görünüşündeki farklılıkları sınıfta tartışınız.

4.1. DİLÜSYON ÇÖZELTİSİ

Dilüsyon, canlı mikroorganizma sayısı yüksek olan örneklerde sayma işleminin kolaylıkla yapılabilmesi için hücre sayısının belirli oranlarda seyreltilerek (dilüe edilerek) en aza indirilmesini sağlayan bir tekniktir.

İstatistiksel bir kural olarak dökme ve yayma kültürel sayım yöntemlerinde bir petri kutusundaki koloni sayısının 30-300, damla kültür yönteminde ise her damlada 10-30 arasında olması gerekir. 1 g yoğurttan 108 adet canlı bakteri olduğu varsayılırsa 1 g yoğurdun doğrudan petri kutusuna alınması hâlinde 108 sayıda koloni oluşacaktır. Bu kadar fazla sayıda koloninin petri kutusunda sayılması olanaksızdır. Bunun gibi canlı mikroorganizma sayısı yüksek olan örneklerde sayım, dilüsyon (seyreltme) tekniği ile yapılır.

Sıvı ürünler, yoğurt, şeker, dondurma, tuz, süt tozu gibi suda kolay çözünen gıdalar; ön hazırlık uygulanmadan dilüsyon sıvısı içinde karıştırılarak homojenize edilebilir ve bu şekilde analize alınabilir. Ancak bazı gıdalarda ön işlemler önem taşımaktadır.

Dilüsyon tekniğinde seyreltme için kullanılan sıvılara, **dilüsyon sıvısı** (seyreltme sıvısı) denir.

Dilüsyon işlemi uygulanırken seyreltme sıvısının seçimi ve seyreltme oranının belirlenmesi, dikkat edilmesi gereken iki önemli husustur.

4.1.1. Dilüsyon Sıvıları ve Tampon Çözeltiler

Mikrobiyolojik analizlerde seyreltme sıvısı olarak ISO 6887'ye göre genellikle serum fizyolojik (%0,85 NaCl) veya serum fizyolojik (%0,85 NaCl)+pepton (%0,1) kullanılmaktadır (Tayar ve Hecer, 2015). Dilüsyon sıvısı olarak kullanılan bu sıvılar; izotonik özellikte, yani mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürebileceği özelliktedir. Seyreltme sıvısı olarak distile su tek başına kullanılmaz; distile su canlı hücreler için izotonik değildir. Seyreltme için distile su kullanılarak yapılan analizlerde gerçek mikroorganizma sayısına ulaşılamaz. Aşağıda seyreltme için kullanılan bazı dilüsyon çözeltilerinin ve tampon çözeltilerin hazırlanmaları anlatılmıştır (Temiz, 2016) (Tablo 4.1).

Sıvıların pH değerleri sterilizasyondan sonra sodyum hidroksit veya hidroklorik asit çözeltileriyle ayarlanır. Dilüsyon sıvısı, ana dilüsyon için beher ve erlenlere, ondalık dilüsyonlar için uygun hacimdeki deney tüplerine dağıtılarak sterilize edilir. Süt ürünlerinin mikrobiyolojik analizinde dilüsyon sıvısı olarak ¼ kuvvetinde Ringer çözeltisi kullanılır. Bu çözelti, süt ürünleri harici diğer örneklerde kullanılmaz. Peynirde %2 sodyum sitrat çözeltisi; reçel, meyve suyu gibi yüksek şeker içerikli gıdalarda ozmofilik; ozmotolerant maya sayımında %20'lik glikoz çözeltisi seyreltmelerde kullanılır.



Tablo 4.1: Dilüsyon Sıvıları ve Tampon Çözeltiler

Dilüsyon Sıvıları ve Tampon Çözeltiler	Hazırlanışı															
Serum fizyolojik	8,5 g sodyum klorür (NaCl), 1.000 ml distile su içinde çözündürülerek test tüpü, erlen, balon gibi cam kaplara dağıtılır (9 ml, 90 ml vb.), otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize edilir.															
Tamponlanmış peptonlu su	10 g pepton, 5 g sodyum klorür, 9 g disodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ve 1,5 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) 1.000 ml distile suda çözündürülür. pH $7.0 \pm 0,1$ ’e ayarlanır. Tüp veya erlenlere aktarılarak otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize edilir.															
$\frac{1}{4}$ kuvvetinde Ringer çözeltisi	2,25 g sodyum klorür (NaCl), 0,105 g potasyum klorür (KCl), 0,12 g kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve 0,05 g sodyum hidrojen karbonat (NaHCO_3) 1.000 ml distile suda çözündürülür. pH $7,0 \pm 0,1$ ’e ayarlanır. Tüp veya erlenlere aktarılarak otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize edilir.															
%0,1’lik peptonlu su	1 g pepton, 1.000 ml distile suda çözündürülür. pH 7.0 ± 0.1 ’e ayarlanır. Tüp veya erlenlere aktarılarak otoklavda 121 °C’de 20 dk. sterilize edilir.															
%15’lik sodyum klorür çözeltisi (halofilik mikrororganizmaların teşhisinde)	150 g sodyum klorür (NaCl) üzerine distile su azar azar eklenerek çözündürülür ve 1.000 ml’ye tamamlanır. Çözelti, tüp veya erlenlere aktarılarak otoklavda 121 °C’de 20 dk. sterilize edilir.															
%20’lik sukroz çözeltisi (osmofilik veya osmotolerant mikroorganizmaların teşhisinde)	200 g sukroz üzerine distile suda azar azar eklenerek çözündürülür ve 1.000 ml’ye tamamlanır. Erlenlere gerekli miktarda dağıtılarak otoklavda 121 °C’de 20 dk. sterilize edilir.															
0,1 M Fosfat tamponu	<p>A ve B çözeltileri hazırlanır.</p> <p>A çözeltisi: 13,6 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), 1.000 ml distile su içinde çözündürülür.</p> <p>B çözeltisi: 26,8 g disodyum hidrojen fosfat heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1.000 ml distile su içinde çözündürülür.</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">pH</th> <th>Çözelti hacmi (ml)</th> </tr> <tr> <th>A B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6,70</td> <td>52,48</td> </tr> <tr> <td>6,81</td> <td>48,52</td> </tr> <tr> <td>7,00</td> <td>34,66</td> </tr> <tr> <td>7,10</td> <td>28,72</td> </tr> <tr> <td>7,30</td> <td>20,80</td> </tr> <tr> <td>7,42</td> <td>16,84</td> </tr> </tbody> </table>	pH	Çözelti hacmi (ml)	A B	6,70	52,48	6,81	48,52	7,00	34,66	7,10	28,72	7,30	20,80	7,42	16,84
pH	Çözelti hacmi (ml)															
	A B															
6,70	52,48															
6,81	48,52															
7,00	34,66															
7,10	28,72															
7,30	20,80															
7,42	16,84															



4.1.2. Dilüsyon Çözeltisi Hazırlama İşlemi



Görsel 4.1: Dilüsyon çözeltisi hazırlama

Dilüsyon çözeltisi hazırlama işlemi orijinal örneğin dilüsyon sıvılarıyla belirli oranlarda karıştırılmasıyla gerçekleştirilir (Görsel 4.1). Ana dilüsyon hazırlanırken süt tozu, kakao gibi ürünlerde örneklerin süspansiyonu için ısıtma işlemi uygulanır. Kurutulmuş gıdaların çözündürülme işlemi sırasında bazı mikroorganizmaların tekrar aktifleşeceği unutulmamalıdır. Dilüsyon çözeltilerinin oda sıcaklığında kullanılması gerekmektedir.

Dilüsyon çözeltisi hazırlanmadan önce yapılacak analize bağlı olarak kullanılacak dilüsyon çözeltisi seçimi yapılır. Çözeltiler için gerekli madde miktarları hesaplanarak çözeltiler hazırlanır. Sterilize edilen dilüsyon çözeltileri seyreltme işlemi için hazır hâle getirilir.

4.1.3. Dilüsyon Çözeltileri Hazırlanırken Dikkat Edilecek Hususlar

Dilüsyon çözeltileri hazırlanırken mikrobiyolojik analizin doğru ve güvenilir olabilmesi için aşağıdaki maddelere uygun hareket edilmelidir:

- Dilüsyon çözeltilerinin oda sıcaklığına getirilmesi sağlanmalıdır.
- Bazı örnekler için özel tedbirler alınmalıdır.
- pH ayarlamaları yapılmalıdır.
- Dilüsyon işlemi, analize başlanmadan hemen önce yapılmalı ve 30 dk. içerisinde ekim gerçekleştirilmelidir.
- Dilüsyon işlemi, gıda maddesinde bulunan olası mikroorganizma sayısına göre yapılmalıdır.
- Dilüsyon sıvısı, gıdanın ve mikroorganizmanın özelliğine uygun seçilmelidir.
- Dilüsyon sıvısı, gıdanın mikroorganizma içeriğinde değişiklik oluşturmamalı, mikroorganizmaların canlılığını etkilememelidir.
- Dilüsyon işleminde kullanılan çözeltinin osmotik basıncı, gıdanın osmotik basıncına yakın veya dengeli olmalıdır.
- Kullanılan malzemelerin ve cihazların kalibrasyonu önceden yapılmalıdır.
- Kapların ağzı, uygun bir şekilde kapatılarak sterilize edilmeli, sterilize edilen çözeltiler uygun koşullarda saklanmalıdır.

4.1.4. Dilüsyon Çözeltileri Hazırlanırken Yapılan Hesaplamalar

Dilüsyon sırasında kullanılan çözeltilerin istenilen miktarda ve doğru konsantrasyonda hazırlanması esastır. Bunun için önceden bazı hesaplamaların yapılması gerekmektedir. Tablo 4.1'de verilen hazırlama prosedürlerine göre hesaplamalar, gereken hacimde dilüsyon sıvısı için yapılabilir.

Örneğin, 500 ml %0,85'lik serum fizyolojik hazırlamak gerektiğinde şöyle bir hesaplama yapılmalıdır:

8,5 g sodyum klorür (NaCl)

1.000 ml distile su içinde çözündürülüyorsa

X g sodyum klorür

500 ml distile suda çözündürülür.



Buradan $X=4,25$ g sodyum klorürün 500 ml distile suda çözündürülmesi gerektiği bulunur. Bu çözeltinin 500 ml'lik balon joje içerisinde yapılması uygundur. 4,25 g sodyum klorür tartılarak bir miktar distile suda çözündürülür ve daha sonra 500 ml'lik balon jopenin hacim ölçüm çizgisine kadar distile suyla tamamlanır. Çözelti hazırlama işleminde kullanılan hassas hacim ölçüm aracı balon joje Görsel 4.2'de görülmektedir.

Örneğin, 500 ml $\frac{1}{4}$ kuvvetinde Ringer çözeltisi hazırlamak gerektiğinde şöyle bir hesaplama yapılmalıdır:

2,25 g sodyum klorür (NaCl)	1.000 ml distile su içinde çözündürülüyorsa
X g sodyum klorür	500 ml distile suda çözündürülür.



Görsel 4.2: Balon joje

Buradan $X=1,125$ g sodyum klorürün 500 ml distile suda çözündürülmesi gerektiği bulunur.

0,105 g potasyum klorür (KCl)	1.000 ml distile su içinde çözündürülüyorsa
X g potasyum klorür	500 ml distile suda çözündürülür.

Buradan $X=0,0525$ g potasyum klorürün 500 ml distile suda çözündürülmesi gerektiği bulunur.

0,12 g kalsiyum klorür	1.000 ml distile su içinde çözündürülüyorsa
X g kalsiyum klorür	500 ml distile suda çözündürülür.

Buradan $X=0,06$ g kalsiyum klorürün 500 ml distile suda çözündürülmesi gerektiği bulunur.

0,05 g sodyum hidrojen karbonat	1.000 ml distile su içinde çözündürülüyorsa
X g sodyum bikarbonat	500 ml distile suda çözündürülür.

Buradan $X=0,025$ g sodyum bikarbonatın 500 ml distile suda çözündürülmesi gerektiği bulunur.

Hesaplanan kimyasallar analitik terazide hassas bir şekilde tartılarak balon jojeye aktarılır. Çözündürme işlemi yapılır ve 500 ml'lik balon jopenin hacim ölçüm çizgisine kadar distile suyla tamamlanır.

Tablo 4.1'de yazılan diğer dilüsyon çözeltilerinin hazırlanması gerektiğinde de bu örneklere benzer şekilde orantı kurularak hesaplamalar yapılır. İstenen dilüsyon çözeltisi hacmi için gereken katı madde miktarları hesaplanır. Bulunan miktarlarda tartımlar alınarak distile suyla çözeltiler hazırlanır.

4.1.5. Dilüsyon Çözeltilerinin Otoklavda Sterilize Edilmesi

Dilüsyon çözeltileri, hazırlandıktan sonra ana dilüsyon için uygun hacimdeki balon veya erlenlere; ondalık dilüsyonlar için ise deney tüplerine aktarılır. Deney tüpündeki miktar sterilizasyondan sonra 9 ml veya bunun katları hacminde olmalıdır. Erlendeki miktarı ise 90 ml veya katları miktarında olmalıdır. Hazırlanan tüp ve erlenlerin ağızları pamuk, alüminyum folyo veya kapakla kapatılarak 121 °C'de 15-20 dk. kadar otoklavda sterilize edilir (Görsel 4.3, Görsel 4.4).



Görsel 4.3: Sterilize edilen dilüsyon çözeltileri



Görsel 4.4: Otoklav



4.1.6. Steril Edilmiş Dilüsyon Çözeltilerinin Saklanması



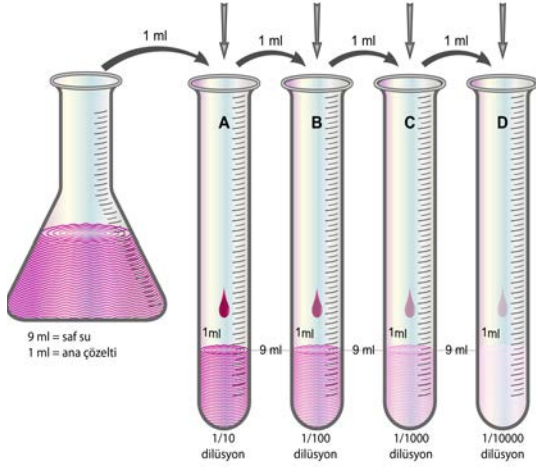
Görsel 4.5: Mikrobiyoloji laboratuvarında soğutucu

kullanılmamalıdır. Çözeltilerin kapakları, kullanılacakları zamana kadar asla açılmamalıdır. Çözeltiler kullanılmadan önce kapakların sterilizasyon kontrolü yapılmalıdır.

Steril edilerek otoklavdan çıkarılmış dilüsyon çözeltileri hemen kullanılmayacak ise 0 ile +5 °C sıcaklıkta, 1 aydan fazla olmamak şartıyla muhafaza edilebilir (Tayar ve Hecer, 2015). Steril çözeltiler, gıda kalite kontrol laboratuvarlarında bulunan soğutucularda saklanır (Görsel 4.5). Soğutucu olarak kullanılan buzdolaplarında, çözeltiler herhangi bir kontaminasyona sebebiyet vermeyecek şekilde diğer malzemelere teması olmadan saklanmalıdır. Buzdolabının sıcaklığının 0 ile +5 °C aralığında olup olmadığı kontrol edilmeli, gerekiyorsa ayarlamalar yapılmalıdır. Uzun süreli elektrik kesintisinin olduğu durumlarda soğutucu sıcaklığı değişeceğinden soğutucudaki çözeltiler

4.2. DESİMAL DİLÜSYON SERİSİ HAZIRLAMA

Gıda örneklerinde yapılan mikrobiyolojik analizlerde mikroorganizma yoğunluğunu azaltarak mikroorganizmaları sayılabilir hâle getirmek için dilüsyon işlemi uygulanmaktadır. Bu dilüsyon yani seyreltme işlemi, aşamalı olarak yapılmaktadır. Dilüsyonlar yapılırken numune önceden hazırlanmış dilüsyon çözeltisiyle belirli oranlarda seyreltilerek dilüsyon serileri oluşturulmaktadır.



4.2.1. Desimal (Ondaklı) Dilüsyon Çözeltileri

Mikroorganizma yoğunluğunun onar kat azaltılmasıyla (1/10, 1/100, 1/1.000 gibi) yapılan dilüsyon serilerine **desimal dilüsyon serileri** denilmektedir (Görsel 4.6). Bunun dışında iki katlı ve dört katlı dilüsyon serileri de yapılabilir.

Dilüsyondaki mikroorganizma sayısının orijinal gıdaya göre kaç defa seyrelmiş olduğunu gösteren orana **dilüsyon oranı** denir. Ekim sonunda petri kutusunda sayılan koloni miktarına bakarak 1 ml örnekte bulunan mikroorganizma miktarının belirlenmesini sağlayan faktöre ise **dilüsyon faktörü** denilmektedir.

Görsel 4.6: Desimal dilüsyon serileri

4.2.2. Desimal Dilüsyon Hazırlamada Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

- Desimal dilüsyon hazırlanırken çalışma boyunca aseptik koşulların sağlanıp sağlanmadığına dikkat edilmelidir.
- Dilüsyon işleminden önce numunenin çok iyi bir şekilde homojenize edilmesi son derece önemlidir.
- Karıştırma işlemi için manyetik karıştırıcı yeterli olmuyorsa bazı numunelerde stomacher veya blender kullanılmalıdır.
- Tüplere yapılan seyreltmeler sırasında her seyreltme için farklı pipet kullanılmasına ve pipetlerin steril olmasına dikkat edilmelidir.
- Analiz edilecek gıda maddesi, baharat örneği gibi suda tam olarak çözünmeyen bir madde ise ilk seyreltinin yapıldığı erlen, oda sıcaklığında bir süre bekletilir. Bu şekilde üst taraftan pipetleme



- yapılarak pipetin tıkanması önlenmiş olur.
- Anaerob bakteri sayımı yapılacak ise homojenizasyon sırasında gıdanın aşırı oksijenle teması önlenmelidir. Bu sebeple karıştırıcı kullanılmamalıdır. Gıda örneği, içinde kum olan havanda ezilmelidir.
- Seyreltme yapıldıktan sonra 15 dakika içinde ekim yapılmış olmalıdır. Homojenizasyon aşamasından itibaren bu süre 30 dakikayı geçmemelidir.

4.2.3. Desimal Dilüsyon Çözeltileri Hazırlama Aşamaları

Desimal dilüsyon çözeltilerini hazırlamada homojenizasyon (ilk seyreltme) ve sonraki seyreltmeler standart 1:9 oranında yapılmaktadır. Başlangıçta 10 g (ml) gıda örneği 90 ml dilüsyon çözeltisi ile homojenizasyon işlemine tabi tutulur. Seyreltmenin 1:9 oranında yapılmasının asıl nedeni hesaplama kolaylığı düşünüldüğü içindir.

Sıvı Gıdadan Desimal Dilüsyon Serileri Hazırlama Aşamaları

Sıvı gıdadan desimal dilüsyon serisi hazırlama işlemi herhangi bir ön işleme ihtiyaç duyulmadan doğrudan yapılabilir. İyice karıştırılmış sıvı örnekten pipetle sıvı alınarak dilüsyon işlemi gerçekleştirilir. Çalışma sırasında steril koşulların sağlanması ve devam etmesi önemlidir.

1 ml sıvı gıda örneği 1. tüpe konur, üzerine 9 ml dilüsyon sıvısı eklenir. Başlangıçta her bir tüpte 9 ml dilüsyon sıvısı bulunmaktadır. İşlem, 1. tüpten alınan 1 ml sıvının ikinci tüpe aktarılması; 2. tüpten alınan 1 ml sıvının 3. tüpe aktarılması şeklinde devam eder.

Katı Gıdadan Desimal Dilüsyon Serileri Hazırlama Aşamaları

Katı gıdadan hazırlanan serilerde en önemli fark, homojenizasyon aşamasının olmasıdır. Katı örneklerin en uygun şekilde ve kısa sürede homojenize edilmesi gerekmektedir. Homojenizasyon sırasında steril koşullar devam ettirilmelidir. Dondurulmuş numunelerin çözündürme işlemi özenle yapılmalı ve numuneler en uzun 18 saatte çözündürülmelidir. Yağ oranı yüksek gıdalarda Tween 80, dilüsyon için kullanılabilir. Katı numunelerin homojenizasyonu; blender, stomacher gibi cihazlarla daha kolay yapılabilir. Homojenizasyon sırasında kullanılan beher, erlen gibi cam malzemelerin steril olması gerekmektedir. 10 g kadar katı gıda maddesi 90 ml dilüsyon sıvısı bulunan ortamda homojenize edilerek 1:10 oranında ilk seyreltme yapılmış olur.

Homojenizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra elde edilen sıvıdan 1. tüpe 1 ml aktarılır, 9 ml dilüsyon sıvısı ile karıştırıldığında 1. tüpteki seyreltme oranı 1:100 olur. Bu şekilde aynı sıvı numunede olduğu gibi her tüpte önceden bulunan 9 ml dilüsyon sıvısı üzerine 1 ml bir önceki tüpten aktarılarak 1:100, 1:1.000, 1:10.000... şeklinde devam eden seyreltmeler yapılmış olur.

Dilüsyon işlemleri sırasında biyogüvenlik kabini ve bek alevi yanında çalışma yapmak gereklidir.

**1. UYGULAMA : DİLÜSYON ÇÖZELTİSİ HAZIRLAMA VE STERİLİZE ETME****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Çalışacağınız alanı steril hâle getiriniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

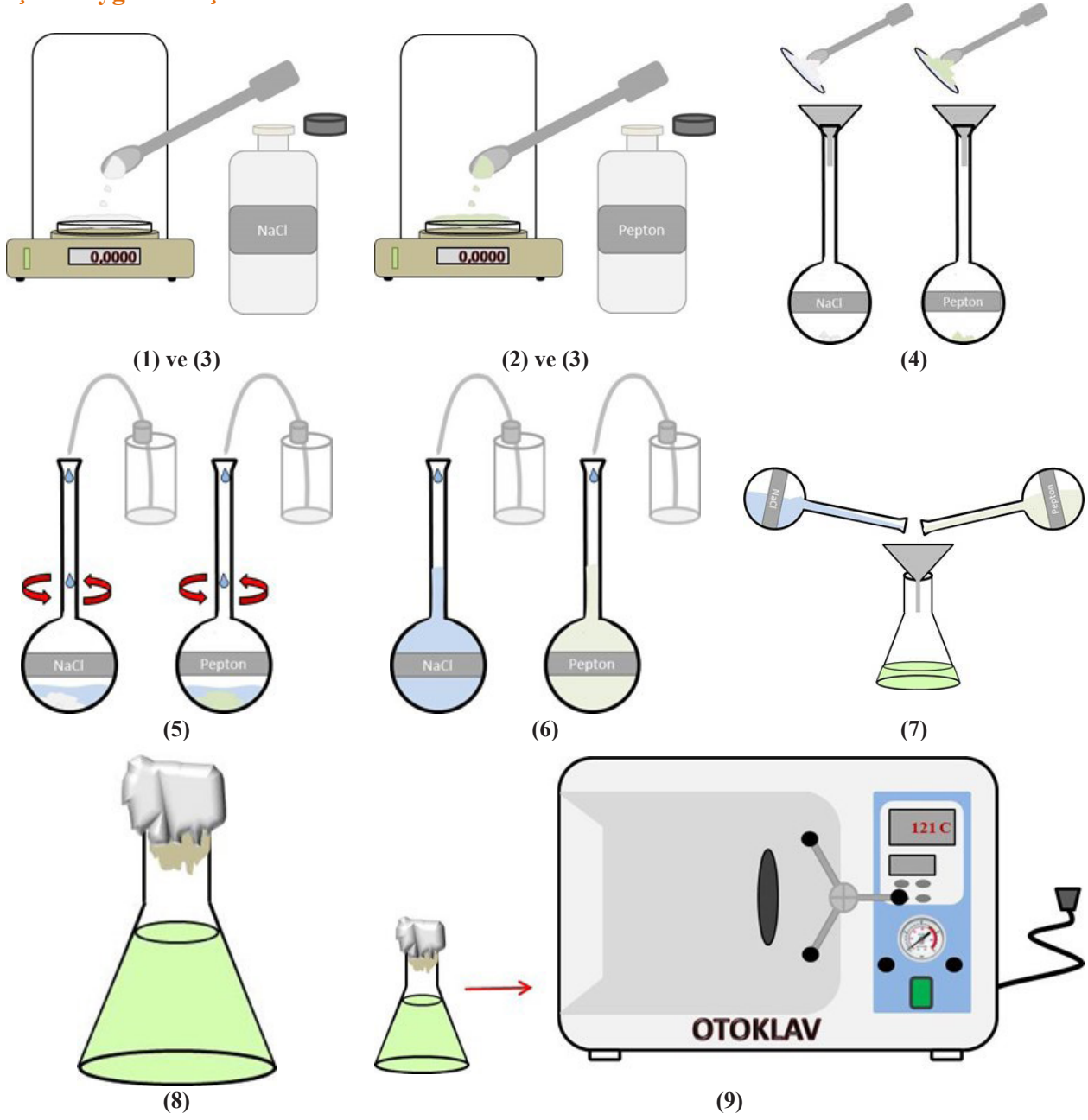
- | | | |
|-------------------|---------------------------|-------------------|
| ✓ Pepton | ✓ Spatül | ✓ Pamuk |
| ✓ Analitik terazi | ✓ 2 adet 100 ml'lik balon | ✓ Alüminyum folyo |
| ✓ Sodyum klorür | joje | ✓ Erlen (500 ml) |
| ✓ Saf su | ✓ Manyetik karıştırıcı | |

İşlem Basamakları

1. 100 ml %0,85'lik sodyum klorür için hesaplama yaparak tartılacak sodyum klorür miktarını bulunuz.
2. 100 ml %0,1'lik pepton için hesaplama yaparak tartılacak pepton miktarını bulunuz.
3. Tartım işlemlerini gerçekleştiriniz.
4. Balon jojelerde etiketleme işlemlerini yaparak katı malzemeleri aktarınız.
5. Çözündürme işlemlerini gerçekleştiriniz.
6. Saf suyla tamamlama işlemlerini gerçekleştirerek çözeltileri hazır hâle getiriniz.
7. Çözeltileri erlende karıştırarak istenen çözeltiliyi hazırlayınız.
8. Erlendeki çözeltilinin ağzını pamuk ve alüminyum folyo ile kapatınız.
9. Erlendeki hazırlanmış dilüsyon çözeltilisini otoklavda 121 °C'de 20 dakika sterilize ediniz.
10. Sterilize edilmiş çözeltiliyi buzdolabında uygun koşullarda muhafaza ediniz.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 4.7: Dilüsyon çözeltisi hazırlama ve sterilize etme

Hesaplama

1. %0,85'lik sodyum klorür çözeltisi hazırlama:

$$\text{Sodyum klorür(g)} = \frac{8,5 \text{ g NaCl} \times V \text{ (ml)}}{1000}$$

2. %0,1'lik pepton çözeltisi hazırlama:

$$\text{Pepton (g)} = \frac{1 \text{ g pepton} \times V \text{ (ml)}}{1000 \text{ ml}}$$

V (ml)=Hazırlanmak istenen dilüsyon çözeltisinin hacmi (Balon joje hacmi)



Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Kullanılacak alanı ve malzemeleri sterilize ediniz.
- ✓ İşlem tamamlandıktan sonra cam malzemeleri temizleyiniz ve sterilize ediniz.
- ✓ Cihazların temiz bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kullanılan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

Sonuç ve Yorum

“Dilüsyon Çözeltisi Hazırlama Ve Sterilize Etme” Uygulaması

DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Dilüsyon çözeltilerini hazırladı.					
Dilüsyon çözeltilerini sterilize etti.					
Dilüsyon çözeltilerini uygun şekilde muhafaza etti.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
	Form Puanı:		Gerçek Puanı:		

Değerlendirme: Form puanını 2,5 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “**BAŞARILI**” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.



2. UYGULAMA : DESİMAL DİLÜSYON SERİSİ HAZIRLAMA

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Biyogüvenlik kabiniinde çalışınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı steril hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | |
|--------------------------|--|
| ✓ Katı ve sıvı örnek | ✓ Dilüsyon sıvısı |
| ✓ Deney tüpleri | ✓ Manyetik karıştırıcı |
| ✓ Erlen | ✓ Isıtıcı bek |
| ✓ Stomacher veya blender | ✓ Analitik terazi |
| ✓ Pipetler | ✓ 1. uygulamada hazırlanan dilüsyon sıvısı |

İşlem Basamakları

Örnek Hazırlama

Katı Gıdadan Örnek Hazırlama

1. 10 g katı gıda örneği tartınız ve stomacher poşetine veya blender içine alınız.
2. Üzerine 90 ml dilüsyon sıvısı ekleyiniz ve uygun teknikle (blender veya stomacher kullanarak) homojenize hâle getiriniz.
3. Bu örneği erlene aktarınız ve erleni 10^{-1} olarak etiketleyiniz.

Sıvı Gıdadan Örnek Hazırlama

1. 10 ml sıvı gıda örneğini pipetle alınız, içinde 90 ml dilüsyon sıvısı olan erlene ekleyiniz.
2. Hazırlanan karışımı, uygun bir teknikle (manyetik karıştırıcı kullanarak) homojenize hâle getiriniz.
3. Erlenin 10^{-1} olarak etiketleyiniz.

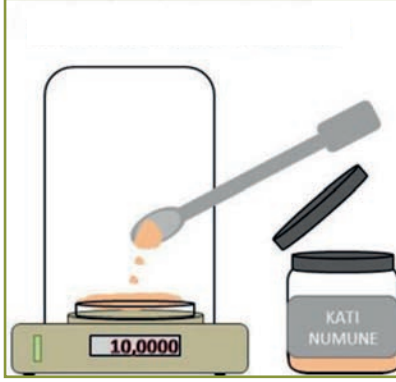


Dilüsyon Serilerini Hazırlama

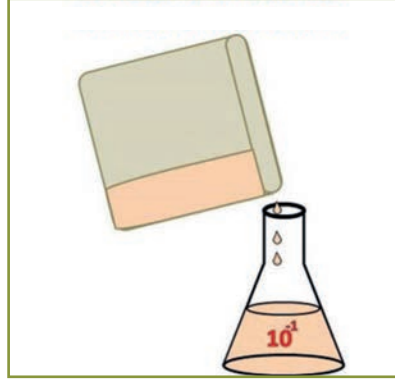
Aşağıda bir numunenin 10^{-6} dilüsyon oranına on kat seyreltilmesi prosedürü verilmiştir:

1. Her biri 9 ml steril dilüsyon sıvısı içeren beş adet test tüpü hazırlayınız.
2. Tüpleri 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} dilüsyonları olarak etiketleyiniz.
3. Steril bir pipet alınız. Pipete hassas bir şekilde 1 ml örnek veya kültür olarak toplam hacim 10 ml olacak şekilde, 1. tüpe (10^{-2}) aktarınız (Otomatik pipet kullanıyorsanız çözeltiyi pipete birkaç kez çekip boşaltarak karıştırınız. Pipet ucunu çıkartınız, yeni bir pipet ucu takınız.).
4. 10^{-2} dilüsyon içeren tüpten 1 ml alınız ve 2. tüpe (10^{-3}) boşaltarak karıştırınız.
5. Aynı prosedürü, diğer tüpler için de tekrar ediniz. 1 ml örneği karıştırıp hazırladığınız tüpten alarak bir sonraki tüpe, yani içinde 9 ml dilüsyon sıvısı bulunan tüpe ekleyiniz.
6. İşlemi tüm tüpler için bitirdiğinizde 6. tüp, 10^{-6} dilüsyon oranına sahip olduğundan emin olunuz. Bu durumda 1.000.000'da 1 seyreltme yapılmış olacaktır.

İşlem Uygulama Şeması



(1)



(2)



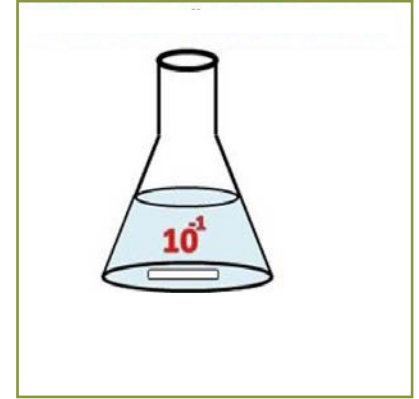
(3)



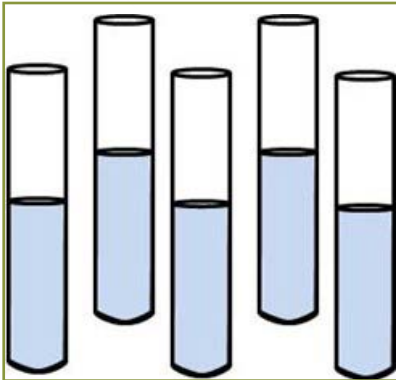
(1)



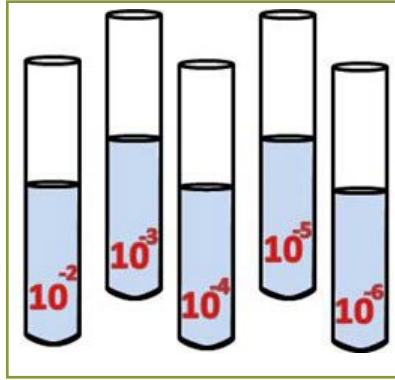
(2)



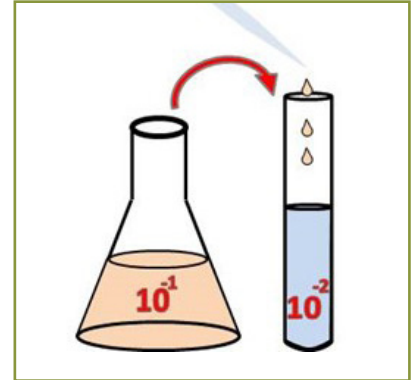
(3)



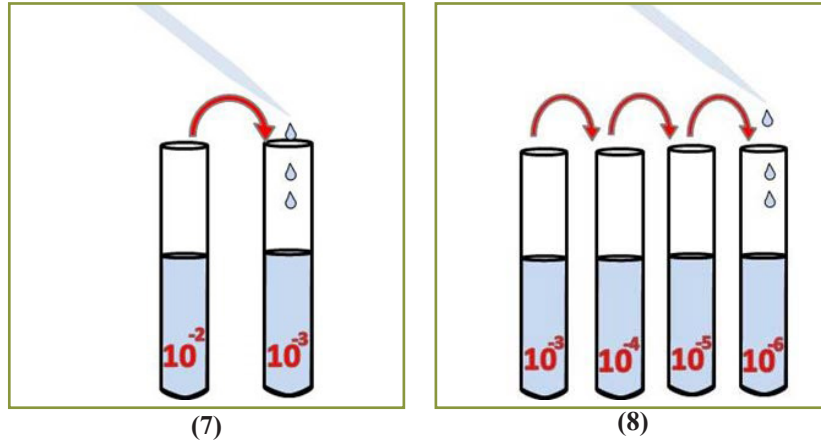
(4)



(5)



(6)



Görsel 4.8: Desimal dilüsyon serisi hazırlama

Sonuç ve Yorum

“Desimal Dilüsyon Serisi Hazırlama” Uygulaması

DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Desimal dilüsyon hazırlama ilkelerine göre malzemeleri hazırladı.					
Sıvı gıdadan desimal dilüsyon serileri hazırladı.					
Katı gıdadan desimal dilüsyon serileri hazırladı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
	Form Puanı:		Gerçek Puanı:		

Değerlendirme: Form puanını 2,5 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.



ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE “D” YANLIŞ İSE “Y” YAZINIZ.

2. () Seyreltme sıvısının içeriği ve yapılacak analiz, dilüsyon işlemlerinde önemlidir.
3. () Süt ürünlerini seyreltmek için Ringer çözeltisi kullanılır.
4. () 100 ml %0,85’lik sodyum klorür çözeltisi hazırlamak için 8,5 gram sodyum klorür tartılır.
5. () Desimal dilüsyon serisi hazırlamak için mikroorganizma yoğunluğunun her bir erlende 100 kat azaltılması gerekir.
6. () Sıvı gıdadan numune hazırlanırken stomacher kullanılır.
7. () Dilüsyon çözeltilerinin otoklavda 121 °C’de 15-20 dk. sterilize edilmesi uygundur.

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

8. Dilüsyonlar işlemi uygulanırken n numune önceden hazırlanmış dilüsyon çözeltisiyle belirli oranlarda seyreltilmeli ve oluşturulmalıdır.
9. Anaerobik mikroorganizmalar belirlenecek ise homojenizasyon sırasında gıdanın aşırı teması önlenmelidir.
10. Dilüsyondaki mikroorganizma sayısının orijinal gıdaya göre kaç defa seyrelmiş olduğunu gösteren orana denir.
11. Karıştırma işlemi için manyetik karıştırıcı yeterli olmuyorsa bazı numunelerde veya kullanılmalıdır.
12. Homojenizasyon aşamasının olması, gıdalarda dilüsyon hazırlanırken gereklidir.
13. Dilüsyon hazırlama sırasında koşulların sağlanması ve devam etmesi önemlidir.
14. Desimal dilüsyon çözeltilerini hazırlamada homojenizasyon ve sonraki seyreltmeler oranında yapılır.
15. Seyreltme yapıldıktan sonra içinde ekim yapılmış olmalıdır.



16. Aşağıdakilerden hangisi mikrobiyolojik analizlerde uygulanan dilüsyon işleminin amaçlarından biri değildir?
- A) Mikroorganizma sayısının belirli bir oranda azaltılmasını sağlamak
B) Çözeltileri doğru konsantrasyonda hazırlamak
C) Mikroorganizmaları sayılabilir hâle getirmek
D) Hücre yoğunluğunu azaltmak
E) Kolonileri azaltarak sayım işlemini kolaylaştırmak
17. Bir et numunesini seyreltmek için 250 ml %0,85'lik serum fizyolojik hazırlanması gerekmektedir. Verilen bu işlem için tartılacak NaCl miktarı kaç gramdır?
- A) 0,125
B) 1,125
C) 2,125
D) 4,250
E) 8,500
18. Aşağıdakilerden hangisi desimal dilüsyon hazırlanırken dikkat edilecek durumlardan biri değildir?
- A) Analiz boyunca aseptik koşulların sağlanması
B) Analizde kullanılacak pipetlerin steril olması
C) Seçilen dilüsyon sıvısının analize uygun olması
D) Dilüsyon çözeltisinin osmotik basıncının örnekle dengeli olması
E) Dilüsyon işlemi ardından 1 saat içerisinde ekimin gerçekleştirilmesi
19. Desimal dilüsyon serisi hazırlanırken aşağıdakilerden hangisi uygun bir seyreltme olmaz?
- A) 1/10
B) 1/100
C) 1/250
D) 1/1.000
E) 1/10.000

A spiral-bound notebook page with a red cover and a yellowish cream-colored page. The page is ruled with horizontal blue lines. The spiral binding is visible at the top edge.

5. ÖĞRENME BİRİMİ



BESİYERİ



Bu öğrenme biriminde;

- Besiyeri bileşimini ve mikroorganizmalar açısından önemini,
- Besiyeri çeşitlerini,
- Besiyeri hazırlama aşamalarını ve hesaplamalarını uygulama yaparak öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 5.1. Tartım Yapma
- 5.2. Hazırlama ve Sterilize Etme

TEMEL KAVRAMLAR

Besiyeri agar brooth selektif maya ekstraktı jelatin



HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Mikroorganizmalar için besiyerinin, insanlar için besinlerin önemi arasında nasıl bir ilişki vardır? Grup çalışması yaparak tartışınız.
2. Mikrobiyolojik analizlerde besiyeri sterilizasyonunun önemini araştırınız.

5.1. TARTIM YAPMA

Besiyeri hazırlama işlemi, mikrobiyolojik analizlerde en temel ve önemli adımlardan biridir. Mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu uygun besin maddeleri ile özelliklerini taşıyan besiyerini hazırlamak için besiyeri bileşenlerini, özelliklerini ve çeşitlerini doğru kavramak ve hesaplanan besiyeri kompozisyonlarına uygun tartım almak gerekmektedir.

5.1.1. Besiyeri ve Bileşimi

Mikroorganizmaların ortamları dışında bir yerde çoğaltılması için kullanılan ve ihtiyaç duydukları besin maddelerini ve özelliklerini içeren ortamlara **besiyeri** (ortam veya vasat) denir. Besiyerleri; mikroorganizmaların üretilmesi, canlılıklarının devam ettirilmesi, saf kültürlerinin elde edilmesi, morfolojilerinin ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi için besleyici ortam olarak kullanılır (Ökmen, 2020).

Besiyerlerinin aşağıdaki özelliklere sahip olmaları gerekmektedir:

- Analizi yapılacak mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu besin öğelerini ve kimyasalları içermelidir.
- Besiyerinde mikroorganizmanın optimum yaşam koşullarını (uygun pH, nem, osmotik basınç, oksidasyon-reduksiyon potansiyeli) sağlamak üzere uygun şartlar oluşturulmalıdır.
- Dışarıdan gelebilecek kontaminasyonların engellenebilmesi için besiyerleri uygun kaplarda hazırlanmalıdır.
- Besiyerinin hacmi, kabın hacmiyle orantılı tutulmalı; kap hacminin yaklaşık 2/3 veya 3/4'ünden fazla besiyeri hazırlanmamalıdır.
- Sterilizasyon işlemine çok önem verilmeli, besiyeri sterilite kontrolünden geçirilmiş olmalıdır.

Besiyerinde bulunması gereken mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu maddeler şöyledir:

Karbon ve Enerji Kaynağı Maddeler: Mikroorganizmalar; çeşitli karbonhidratlar (özellikle glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritler), karbonhidratların yokluğu ve yetersizliği durumunda protein, amino asit, yağ, yağ asidi, alkol vb. organik maddeleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanır. Ayrıca enerji kaynağı olarak CO₂ deki karbonu kullanan mikroorganizmalar bulunduğu gibi, güneş ışığını kullananlar da bulunmaktadır.

1. **Azot Kaynağı Maddeler:** Protein, pepton, amino asit vb. organik maddeler ile KNO₃ ve (NH₄)₂PO₄ gibi azotlu inorganik tuzlar, mikroorganizmalar tarafından azot kaynağı olarak kullanılır. Peptonlar, kısa zincirli ve suda eriyen bazı amino asit ve peptitleri içerdiğinden daha çok tercih edilir.
2. **İnorganik Maddeler:** Mikroorganizmaların gelişimi açısından elzem olan, ayrıca ozmotik basıncın



ayarlanmasında rol oynayan ve bazı enzimlerin kofaktörü olarak görev yapabilen Na, K, Cl, P, S, Ca, Mg, Fe gibi makro elementler ile Zn, Mn, Br, B, Cu, Co, Mo, V, Sr gibi iz elementler kullanılır. Mikroorganizmaların ihtiyacı için gerekli olan bu maddeler; maya ekstraktı, et ekstraktı, tampon, agar ve peptondan temin edilebilir, bunları ayrıca eklemeye gerek yoktur.

3. **Üreme Faktörleri:** Mikroorganizmaların sentezleyemediği fakat gelişimleri için gerekli olan çeşitli vitamin, amino asit, pürin ve pirimidin gibi maddeler besiyeri ortamına eklenir.
4. **Su:** Mikrobiyolojik çalışmalarda canlılık açısından gerekli olan su, saf su olarak ortama katılmaktadır. İçeriğinde yoğun miktarda Ca, Mg gibi sertlik iyonları içeren sular, mikroorganizmalar için uygun değildir.
5. **Antibiyotikler:** Selektif besiyeri hazırlamak amacıyla besiyerine ilave edilebilen maddelerdir.
6. **Katılaştırıcı Ajan:** Mikroorganizmalar açısından inert olan, deniz yosunlarından elde edilen agar, besiyeri ortamına eklenerek katılaştırıcı olarak kullanılır. Besiyeri ortamına %1-2 oranında karıştırılan agar, uzun zincirli bir polisakkarittir. Katılaştırıcı ajan olarak jelatin katıldığında proteolitik enzim aktivitesi de belirlenebilir.

Besiyerinde bulunması gereken mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu maddeler aşağıdaki kaynaklardan sağlanabilir:

Agar: Besiyerlerinde katılaştırıcı ajan olarak kullanılan, bazı deniz yosunlarından elde edilen uzun zincirli polisakkaritlerdir.

Pepton: Proteinlerin hidrolizi sonucu elde edilen kimyasal maddelerdir. Çoğu mikroorganizma, hidrolize edecek enzim sistemleri bulunmadığı için proteinleri azot kaynağı olarak kullanamaz. Bu yüzden kısa zincirli ve suda çözünen peptonlar, besiyerine azot kaynağı olarak eklenir.

Yeast (Yist) Ekstrakt (Maya Ekstraktı): Ekmek mayası [*Saccharomyces cerevisiae* (Sakromaysis servisiey)] hücrelerinden hidroliz ya da otoliz yoluyla elde edilen bir besiyeri bileşenidir. Maya ekstraktı, besiyerlerine %1 oranında katılır.

Beef (Bif) Ekstrakt (Et Ekstraktı): Yağsız sığır etinden elde edilen, hazırlama aşamasında içindeki şekerleri fermentasyon yoluyla uzaklaştırılan, süyün bir kısmı uçurularak vitamin, mineral ve üreme faktörleri açısından zenginleştirilen bir kaynaktır. Pek çok besiyeri bileşiminde bulunur. Et ekstraktı, besiyerlerine %1 oranında katılır.

Karbonhidratlar: Mikroorganizmalar için enerji kaynağı olarak kullanılan glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritlerdir. Disakkaritler ve polisakkaritler de eklenebilmektedir. Karbonhidratlar besiyerlerine genellikle %0,1-1 oranında eklenmektedir.

Tampon Maddeler [Buffer (Bafır)]: Ani pH değişimlerini kontrol altına almak için kullanılan zayıf asitlerin veya bazların tuzlarıdır. Fosfat, karbonat, asetat ve sitratlar besiyerlerinde en sık kullanılan tampon maddelerdir. Pepton, peptit ve amino asit gibi maddeler de belirli ölçüde tamponlama yeteneğine sahip maddelerdir. Bir besiyerinde bu maddeler bulunuyorsa ayrıca tampon eklemeye gerek olmayabilir.

Tuz (NaCl): Mikroorganizmaların sodyum ihtiyacını sağlamak ve izotonik ortam yaratmak için kullanılır.

Jelatin: Süt emmekte olan hayvanların kemiklerinden elde edilen kolajenin, ısı işlem uygulanarak hidrolize edilmesiyle elde edilen protein yapıdaki maddelerdir. Besiyerlerine katılaştırıcı ajan olarak %12-15 oranında eklenir.

Kan: Kanlı agar gibi bazı besiyerlerinin bileşimini zenginleştirmek veya bakterilerde hemoliz durumunu belirlemek amacıyla eklenir. Sağlıklı hayvan (koyun, tavşan gibi) veya insandan elde edilen kan, sterilize edilmiş ve 45-50 °C'ye soğutulmuş olarak %5-7 oranında aseptik koşullarda besiyerine katılır.



5.1.2. Besiyeri Çeşitleri

Besiyerlerinin sınıflandırılması genel ve fiziksel özelliklerine, kaynaklarına ve kullanım alanlarına göre yapılabilir. Tabloda 5.1’de besiyeri sınıflandırmaları görülmektedir.

Tablo 5.1: Besiyeri Sınıflandırmaları

Sınıflandırma	Çeşit	İçerik / Özellik
Genel özelliklerine göre	Canlı besiyerleri	Virüs ve riketsiyaları üretmek için kullanılan doku kültürleri, deney hayvanları ve embriyolu tavuk yumurtası
	Doğal besiyerleri	Üzüm şırası, melas, malt suyu, peynir altı suyu gibi doğal ürünler
	Sentetik besiyerleri	Mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu besin öğelerini ve diğer bileşenleri belirli oranda ihtiva eden ürünler
Fiziksel özelliklerine göre	Katı besiyerleri	%1,5-2 oranında katılaştırma ajanı (agar, jelatin, pıhtılaştırılmış serum, yumurta, silika jel, alginatlar, karragenanlar ve poliakrilamidler) içeren ürünler (Örnek: nutrient agar, EMB agar)
	Sıvı besiyerleri	Katılaştırma ajanı içermeyen ürünler (Örnek: nutrient broth, pepton water)
	Yarı sıvı besiyerleri	%0,75 oranında katılaştırma ajanı içeren ürünler
Kaynaklarına göre	Hayvansal kaynaklı	Et suyu, balık unu, yumurta sarısı, karaciğer, süt gibi hayvansal ürünler içeren besiyerleri
	Bitkisel kaynaklı	Üzüm suyu, malt suyu, portakal serumu gibi bitkisel ürünler içeren besiyerleri
Kullanım alanlarına göre	Genel besiyerleri	Birçok mikroorganizmanın üremesine olanak sağlayan besiyerleri (Örnek: nutrient broth, nutrient agar)
	Özel besiyerleri	Belirli bir amaç veya belirli bir mikroorganizma için kullanılan besiyerleri (Örnek: tryptone soya broth, üre broth, Nessler ayırıcı, kanlı agarda hemolitik ve hemolitik olmayan Salmonella türlerinin ayırt edilmesi vb.)

Özel besiyerleri aşağıdaki başlıklar altında sınıflandırılmaktadır:

Canlandırma Besiyeri: Canlılık oranı çok düşük olan mikroorganizmaların adaptasyonu için kullanılan sıvı besiyerleridir. Bu mikroorganizmalar öncelikle canlandırma besiyerine alınarak geliştirilir, daha sonra uygun bir besiyerine aktarılır ve mikrobiyolojik analizi yapılır. **Tryptone soya broth**, bu gruba verilecek en iyi örnektir.

Seçici (Selektif) Besiyeri: Sadece istenen mikroorganizmanın gelişimini sağlayacak şekilde formüle edilmiş besiyerleridir. Selektif besiyerlerinde istenmeyen mikroorganizma gelişimi tamamen veya belirli ölçüde inhibe edilir. Besin öğeleri, inhibitörler ve indikatörler olmak üzere üç grupta bileşen yer alır. Bileşimde mikroorganizmaların gelişebilmesi için gereken temel besin öğelerine yer verilirken istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini engelleyecek inhibitörler eklenerek besiyerine seçicilik kazandırılır. Besiyerine özgü mikroorganizmaların gelişip gelişmediğini gözlemlemek amacıyla da bileşime belirli bazı indikatörler eklenir.

EMB agar; koliformların,

SS agar; *Salmonella* ve *Shigella* bakterilerinin,



Baird-Parker agar; *Staphylococcus aureus*'un,

Violet Red Bile Agar (VRBA); koliform grubu bakterilerin,

Brilliant Green Bile Broth (BGBB); koliform grubu bakterilerin,

MacConkey broth (Purple); koliform grubu bakterilerin,

Glucose azide broth; enterokokların (fokal streptokokların),

Talyum asetat içeren herhangi bir glukoz agar; laktik streptokokların teşhis ve izolasyonunda kullanılan selektif besiyerleridir.

Seçimli (Elektif) Besiyeri: Belli bir mikroorganizmanın gelişimini minimum seviyede sağlayabilen besiyerleridir. Lizin agar içinde karışık bir kültür içindeki mayaların minimum ihtiyaçlarını sağlayarak gelişmesi veya yeast extract lactate broth besiyerinin propiyonik bakteriler için seçimli olması örnek olarak verilebilir.

Differansiyel (Farklara Dönük) Besiyeri: Belli mikroorganizma türlerinin karakteristik koloniler oluşturması ile kolayca tanımlanmasını sağlayan besiyerleridir. Kanlı agar besiyeri, hemolitik ve non-hemolitik bakteri türlerinin ayırt edilebildiği differansiyel besiyerine örnektir.

Zenginleştirme Besiyeri: İstenen bir mikroorganizmanın bolca üremesini sağlamak amacıyla o mikroorganizmanın ihtiyaç duyduğu gereksinimleri (pH, besin ögesi vb.) sağlayan, inkübasyon koşulları da buna göre düzenlenmiş özel sıvı besiyerleridir. İstenmeyen mikroorganizmalar, seçilen koşullarda engellenmiş olur. GC broth stafilokoklar, EE broth enterik bakteriler, selenite broth veya tetrathionate broth ise Salmonella cinsi bakterilerin izolasyonu amacıyla başvurulmuş zenginleştirme besiyerleridir.

Biyokimyasal Test Besiyerleri: İçerisinde indikatör ve test yapılacak kimyasal maddeler (karbonhidratlar, arjinin, üre, nitrat, sitrat vb.) bulunan sıvı veya katı besiyerleridir. Mikroorganizmaların test edilen maddeyi herhangi bir biyokimyasal değişime uğrattığına uğratmadığını belirlemek suretiyle gerçekleştirilir. Üre broth ve karbonhidrat fermantasyon test besiyerleri bu gruba örnek olarak verilebilir.

Doğrulama Besiyerleri: Mikroorganizmaların metabolizma ürünlerini belirleyerek teşhis edilmesine olanak veren besiyerleridir. Oluşan metabolizma ürünlerinin varlığı, inkübasyondan sonra ortama eklenen indikatörlerle belirlenir. Tryptone water ve glukoz fosfat broth doğrulama besiyeri olarak kullanılabilir.

İndirgenmiş Besiyerleri: Ortama indirgen maddeler eklenerek anaerobik mikroorganizma gelişiminin sağlandığı besiyerleridir. Sistein ve tiyoglikolat indirgen maddelere örnek olarak verilebilir.

5.1.3. Hazır Besiyeri Hesaplamaları

Besiyeri hazırlanırken bileşime giren maddeler belli bir oranda olmalı ve kullanılacak hacimde besiyeri hazırlanmalıdır. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan besiyerlerinin içinde bulunan maddeler ayrı ayrı tartılarak verilen ölçüde besiyeri hazırlanabilir. Ticari olarak satılan hazır besiyerleri de bu amaçla kullanılabilir. Hazır besiyeri kullanılacaksa besiyeri etiket bilgilerine bakılarak toplam katı madde üzerinden bir hesaplama yapılması gerekmektedir. Aşağıda bazı besiyerlerinin bileşimleri ve hazırlanışları verilmiştir:

Nutrient Agar / Broth Besiyeri

Maya ekstraktı → 3,0 g

Pepton → 5,0 g

NaCl → 8,0 g

Agar...20,0 g (Nutrient broth hazırlanırken agar kullanılmaz.)

Distile su...1.000 ml

Bileşenler, 1 l distile suda ısıtılarak çözündürülür. pH 7,0'ye ayarlanır, agar eklenir, kaynatılır ve agar çözünene kadar ısıtılma işlemi devam edilir. 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir.



Plate Count Agar / Broth Besiyeri

Maya ekstraktı	→	2,5 g
Tripton	→	5,0 g
Glukoz	→	1,0 g
Agar	→	15,0 g (Plate count broth hazırlanırken agar kullanılmaz).
Distile su	→	1.000 ml

Bileşenler, 1 l distile suda ısıtılarak çözündürülür. pH 7,0'ye ayarlanır, agar eklenir, kaynatılır ve agar çözünene kadar ısıl işleme devam edilir. 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir. 45°C'ye soğutulur ve steril petri kaplarına doldurulur.

Lactose Broth Besiyeri

Pepton	→	5,0 g
Yeast extract	→	3,0 g
Laktoz	→	5,0 g
Fenol kırmızısı	→	0,05 g
Distile su	→	1.000 ml

Bileşenler, 1 l distile suda ısıtılarak çözündürülür. pH 6,9'a ayarlanır. Durham tüpü içeren tüplere istenen miktarda paylaştırılır. 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir. Otoklavı açmadan önce sıcaklığın 75 °C'nin altına düşmesi beklenir.

Lauryl Sulfate Tryptose Broth Besiyeri

Tripton	→	20,0 g
Laktoz	→	5,0 g
K ₂ HPO ₄	→	2,75 g
KH ₂ PO ₄	→	2,75 g
NaCl	→	5,0 g
Sodyum lauryl sülfat	→	0,1 g
Distile su	→	1.000 ml

Bileşenler, 1 lt distile suda ısıtılarak çözündürülür. pH 7,2'ye ayarlanır. Durham tüpü içeren tüplere istenen miktarda paylaştırılır. 121 °C'de 12 dakika sterilize edilir, sürenin 15 dakikayı geçmemesi gerekir. Sterilizasyondan sonra hemen soğutulur.

Örnek Hesaplama: 100 ml nutrient agar hazırlamak için gereken besin elementlerinin hesaplanması aşağıda verilmiştir.

- Besiyeri Hazırlanacaksa**

1.000 ml'de bulunması gereken miktarlar;

Maya ekstraktı, 3,0 g; pepton, 5,0 g; NaCl, 8,0 g; agar, 20,0 g olarak belirtilmiştir. O hâlde;

1.000 ml saf su içerisinde	3 g maya ekstraktı varsa
100 ml saf su için	X g maya ekstraktı kullanılmalıdır.

X=0,3 g maya ekstraktı

1.000 ml saf su içerisinde	5 g pepton varsa
100 ml saf su için	X g pepton kullanılmalıdır.

X=0,5 g pepton



1.000 ml saf su içerisinde	8 g NaCl varsa
100 ml saf su için	X NaCl kullanılmalıdır.

X=0,8 g NaCl

1.000 ml saf su içerisinde	20 g agar varsa
100 ml saf su için	X agar kullanılmalıdır.

X=2 g agar

Hazırlanışı: 0,3 g maya ekstraktı, 0,5 g pepton, 0,8 g NaCl ve 2 g agar tartılarak 100 ml saf suda çözündürülür.

- **Hazır Besiyeri Kullanılacaksa**

1.000 ml içerisinde bulunan katı madde miktarı $3,0+5,0+8,0+20,0=36$ g ise 100 ml'de 3,6 g katı madde bulunur.

Hazırlanışı: 3,6 g hazır besiyeri tartılarak 100 ml saf suda çözündürülür.

Besiyeri hazırlama işlemi, aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

- Bileşime giren maddelerin istenen hacme göre hesaplanması
- Hesaplanan maddelerin tartılması
- Besiyeri karışımlarının ve bileşenlerinin bir kaba aktarılması
- İçeriği oluşturan maddelerin saf suda çözündürülmesi
- Kontrollü ısıtma işlemi
- Eksilen hacimde saf su ilavesi, gerekiyorsa süzme işlemi
- pH ayarlama ve sterilizasyon işlemi

5.2. BESİYERİ HAZIRLAMA VE STERİLİZE ETME

Tartımı alınan hazır besiyeri karışımlarının veya besiyeri bileşenlerinin kaba aktarma, çözündürme, berraklaştırma, pH ayarlama gibi hazırlama işlemlerinden geçirilmesi gerekmektedir. Hazırlama işlemlerinden geçirilen besiyerleri, sterilizasyona hazırlanır. Otoklavda belirlenen süre ve basınçta sterilize edilir.

5.2.1. Besiyeri Karışımlarını ve Bileşenlerini Kaba Aktarma ve Çözündürme

Hazır besiyeri karışımları veya besiyeri bileşenleri hassas bir şekilde tartıldıktan sonra uygun bir kaba aktarılır ve çözündürme işlemi gerçekleştirilir.

Hesaplama ve Tartım

Ticari besiyeri hazırlamalarında ambalaj üzerinde belirtilen içerik oranları dikkate alınarak istenilen miktarda tartım yapılır. Besiyeri hazır karışım hâlinde değilse bileşime giren maddeler, hazırlanacak hacme göre tek tek hesaplanır ve tartılır.

Kaba Aktarma

Hesaplanan besiyeri bileşenleri, erlen veya balon gibi uygun bir cam kaba aktarılır. Kabın temiz ve kuru olması gerekmektedir. Kaba aktarma işlemi yapılırken maddelerin kabın ağız kısmına yapışmaması için gereken önlemler alınmalıdır.

Çözündürme

Bu işlem için çalışılacak hacimde saf su kullanılmalıdır. Saf suyun belirli bir miktarı, oda sıcaklığında



toz karışım üzerine eklenir ve karıştırılır. Saf suyun diğer kısmı ise yavaş yavaş karışım üzerine eklenerek sürekli karıştırılır. Oda sıcaklığında yapılan çözündürme işleminin tam olması için 15 dakika kadar bekletilir. Bu işlem, besiyerinde bulunan sıcaklığa duyarlı bileşenlerin dekompozisyonunun, tam çözündürme için yapılacak ısı işlem sırasında önlenmesi açısından önemlidir. Kaba, cam boncuk konularak daha iyi bir karıştırma ve homojenizasyon sağlanabilir. Sıvı seviyesinin kontrolü için sıvı seviyesi, cama yazar kalemle kap üzerine işaretlenir.

Isıtma

Besiyerinde agar olması durumunda agarın tamamen erimesi, homojen ve berrak bir görüntü oluşuncaya kadar su banyosu içerisinde kontrollü bir şekilde ısıtılması ile sağlanmaktadır. Bu işlem, mikrodalga fırın içerisinde de yapılabilir. Sık sık karıştırmak ve karışımın tamamen çözünmesini sağlamak gerekmektedir. Buharlaştırma ile kaynayan su, önceden çizilen hattan kontrol edilerek saf su ile tamamlanır.

5.2.2. Besiyeri Berraklaştırma

Besiyerinde bulunan doğal çökelti maddelerinin veya zor çözünen maddelerin besiyerinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlem, genellikle adi süzme kâğıdı veya gazlı bez üzerine pamuk konularak hazırlanan filtrelerle yapılır. Santrifüjleme veya sedimentasyon yoluyla da yapılabilir.

5.2.3. Besiyerinde pH Ayarlama ve pH Ayarlamının Önemi

Besiyerinin pH değeri 1 N veya 0,1 N NaOH ve HCl ile ayarlanmalıdır. pH belirleme işlemi pH metre, pH kâğıdı veya indikatörlerle yapılabilir. Genellikle tercih edilen yöntem pH metre kullanımudur. Ayarlama işleminden önce pH metre kalibrasyonu yapılır. Geniş bir behere aktarılan ve manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilen besiyerine elektrot daldırılarak ölçüm gerçekleştirilir. Ayarlama işleminde asit veya baz, behere damla damla eklenir ve pH metre ölçüm sonucu sürekli kontrol edilir. Kısa süreli beklemelemlerle ölçüm sonucunun dengeye gelmesi sağlanır. pH ayarlama, besiyerinde optimum koşulların sağlanması açısından önemlidir.

5.2.4. Besiyerinin Sterilizasyonu

Besiyerleri, amacına uygun kaplara aktarıldıktan sonra sterilize edilmelidir. Önce kapların sterilizasyonu, daha sonra aseptik koşullarda kaplara aktarım ve bu kap içinde sterilizasyon gerçekleştirilmelidir. Sterilizasyon işlemi genellikle otoklavda 121 °C'de 15 dakika ısı işlem uygulanarak yapılmaktadır. Görsel 5.2'de mikrobiyolojik analiz için hazırlanmış ve sterilize edilmiş besiyerleri gösterilmektedir.



Görsel 5.2: Hazırlanmış besiyerleri



Besiyeri sterilizasyonu, besiyerinin konulacağı kapların sterilizasyonu ve besiyerinin sterilizasyonu olarak değerlendirilmelidir. Besiyerleri iki şekilde sterilize edilebilir:

1. Hazırlandığı balon veya erlen gibi cam kap içinde sterilize edilir.
2. Hazırlandığı kaptan daha küçük kaplara (tüp, şişe, balon veya erlen) belirli hacimlerde dağıtılır ve bunların içinde sterilize edilir. Durham tüpü kullanılacaksa dağıtımdan önce test tüplerine ters olarak yerleştirilir.

Besiyeri içeren kapların sterilizasyonu için kapların ağızlarına uygun bir pamuk parçası tıkaçlanır. Balon ve erlen gibi kapların ağzı uygun bir kâğıtla sarılır. Tüpler beher veya teneke kutuya yerleştirilir ve ağız kısımları sarılır. Besiyeri sterilizasyonu için otoklav kullanılır ve hazırlanan erlenler üstleri kapatılmış şekilde otoklav sepetine yerleştirilir (Görsel 5.3). Genellikle 121 °C'de 15-20 dakika sterilizasyon gerçekleştirilir. Sıcaklığa duyarlı maddeler içeren besiyerlerinde sterilizasyon süresi 15 dakikayı geçmez. Tindalizasyon yönteminden de faydalanmak mümkündür.

Sterilizasyondan sonra kabında hazırlanan besiyerleri yaklaşık 50 °C'ye kadar soğutularak aseptik koşullarda petrilere doldurulur. Küçük kaplarda sterilize edilen besiyerleri, dik veya yatık bir şekilde soğumaya bırakılır (dik ve yatık agarlı besiyerleri). Durham tüpüyle sterilize edilenler ise musluk suyu altında hemen soğutulur ve Durham tüplerinin tamamen besiyeriyle dolup dolmadığı kontrol edilir. Ayrıca sterilite kontrolü yapılması gerekir. Bu amaçla besiyerlerinin uygun sıcaklıklarda inkübasyonu yapılır. İnkübasyon süresi sonunda mikroorganizma üremesi gözlenirse yeterli sterilizasyon yapılmadığı düşünülerek bu besiyerleri kullanılmaz. Sterilite kontrolü için ayrılan boş besiyerleri, ekim yapılanlarla birlikte inkübasyona alınır ve sonuç birlikte değerlendirilir.



Görsel 5.3: Otoklavda sterilize edilecek besiyerleri

**1. UYGULAMA : HAZIR BESİYERİ HESAPLAMA, TARTIM VE HAZIRLAMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlemler basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ çalışacağınız alanı steril hâle getiriniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

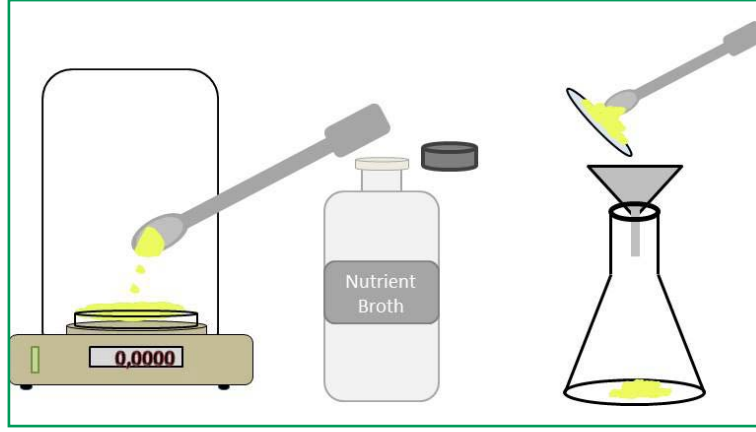
Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | |
|-------------------|----------------------------------|----------------|
| ✓ Nutrient agar | ✓ Manyetik karıştırıcı / ısıtıcı | ✓ 2 adet baget |
| ✓ Analitik terazi | ✓ pH metre | ✓ 0,1 N NaOH |
| ✓ Nutrient broth | ✓ 2 adet 250 ml'lik beher | ✓ 0,1 N HCl |
| ✓ Spatül | ✓ 2 adet 250 ml'lik erlen | |

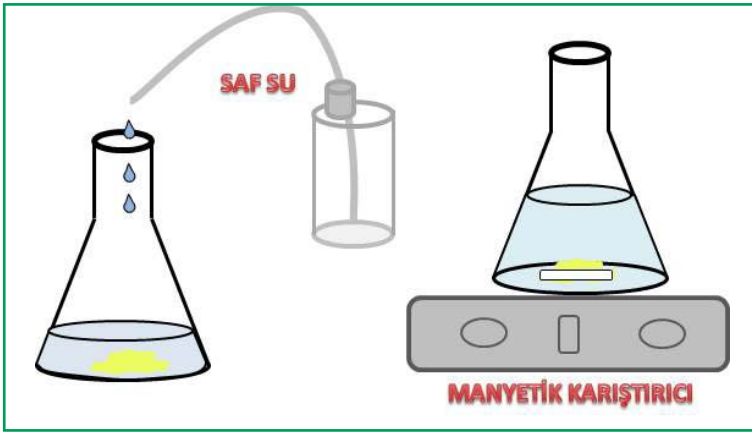
İşlemler Basamakları

1. Hazır besiyeri ürün etiketlerini dikkatlice inceleyiniz.
2. Etiket üzerindeki besin içeriklerini defterinize not ediniz.
3. Nutrient agar ve nutrient broth arasındaki farkı etiket bilgilerinden teyit ediniz.
4. 250 ml nutrient agar için tartılacak hazır nutrient agar besiyeri miktarını hesaplayınız.
5. 250 ml nutrient broth için tartılacak hazır nutrient broth besiyeri miktarını hesaplayınız.
6. Tartım işlemlerini gerçekleştiriniz.
7. Etiketleme işlemlerini yaparak katı malzemeleri aktarınız.
8. Katı malzemeleri aktarırken erlenin ağız kısmına tanecik yapışmamasına dikkat ediniz.
9. İçerisinde nutrient broth ve nutrient agar hazır besiyeri bulunan erlenlere 250 ml saf su ilave ederek çözündürme işlemini gerçekleştiriniz.
10. Çözündürme işlemleri sırasında manyetik karıştııcıda kontrollü bir şekilde ısıtma yapabilirsiniz.
11. Karıştırma esnasında 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl kullanarak pH=6,8'e ayarlayınız.

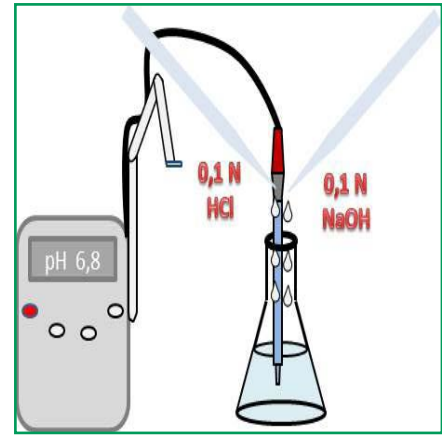
İşlem Uygulama Şeması



(6)



(7)



(8)

Görsel 5.4: Hazır besiyerinden tartım alma ve kaba aktarma

Hesaplama

- **Nutrient Agar İçin**

Etikette yazan hazırlama miktarına göre 250 ml besiyeri hazırlamak için gerekli miktarı hesaplayınız.

- **Nutrient Broth İçin**

Etikette yazan hazırlama miktarına göre 250 ml besiyeri hazırlamak için gerekli miktarı hesaplayınız.





Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Kullanılacak alanı ve malzemeleri sterilize ediniz.
- ✓ İşlem tamamlandıktan sonra cam malzemeleri temizleyiniz ve sterilize ediniz.
- ✓ Cihazların temiz bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kullanılan cam malzemeleri yerine kaldırınız.

Sonuç ve Yorum

Empty rounded rectangular box for notes or conclusions.

“Hazır Besiyeri Hesaplama, Tartım ve Hazırlama” Uygulaması

DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Besiyeri bileşenlerini hesapladı.					
Teraziye tartıma hazırladı ve tartım aldı.					
Besiyerini çözdürdü ve pH ayarlaması yaptı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:					
Gerçek Puanı:					

Değerlendirme: Form puanını 2,5 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.

**2. UYGULAMA : BESİYERİ BİLEŞENLERİNİ HESAPLAMA, TARTIM VE HAZIRLAMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Biyogüvenlik kabininde çalışınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı steril hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmuyunuz.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | |
|------------------------|-------------------|--------------------|
| ✓ Maya ekstraktı | ✓ Agar | ✓ Su banyosu |
| ✓ 0,1 N NaOH | ✓ Pepton | ✓ 250 ml'lik beher |
| ✓ 0,1 N HCl | ✓ Analitik terazi | ✓ 250 ml'lik erlen |
| ✓ Manyetik karıştırıcı | ✓ pH metre | ✓ Spatül |
| ✓ NaCl | ✓ Saf su | ✓ Pipet |

5.2.3. İşlem Basamakları**a) Nutrient Broth Hazırlama**

1. Hesaplama işleminde bulduğunuz bileşen miktarlarını analitik terazide temiz bir spatül yardımıyla tartınız.
2. Tartılan bileşenleri 250 ml'lik behere aktarınız.
3. 200 ml saf su ekleyiniz ve beherdeki karışımı manyetik karıştırıcıda karıştırınız.
4. Ortamın pH değerini 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl ile 6,8'e ayarlayınız.
5. Çözeltiyi 250 ml'lik erlene aktarınız. Erlenin ağzını pamuk ve alüminyum folyo ile kapatınız.

b) Nutrient Agar Hazırlama

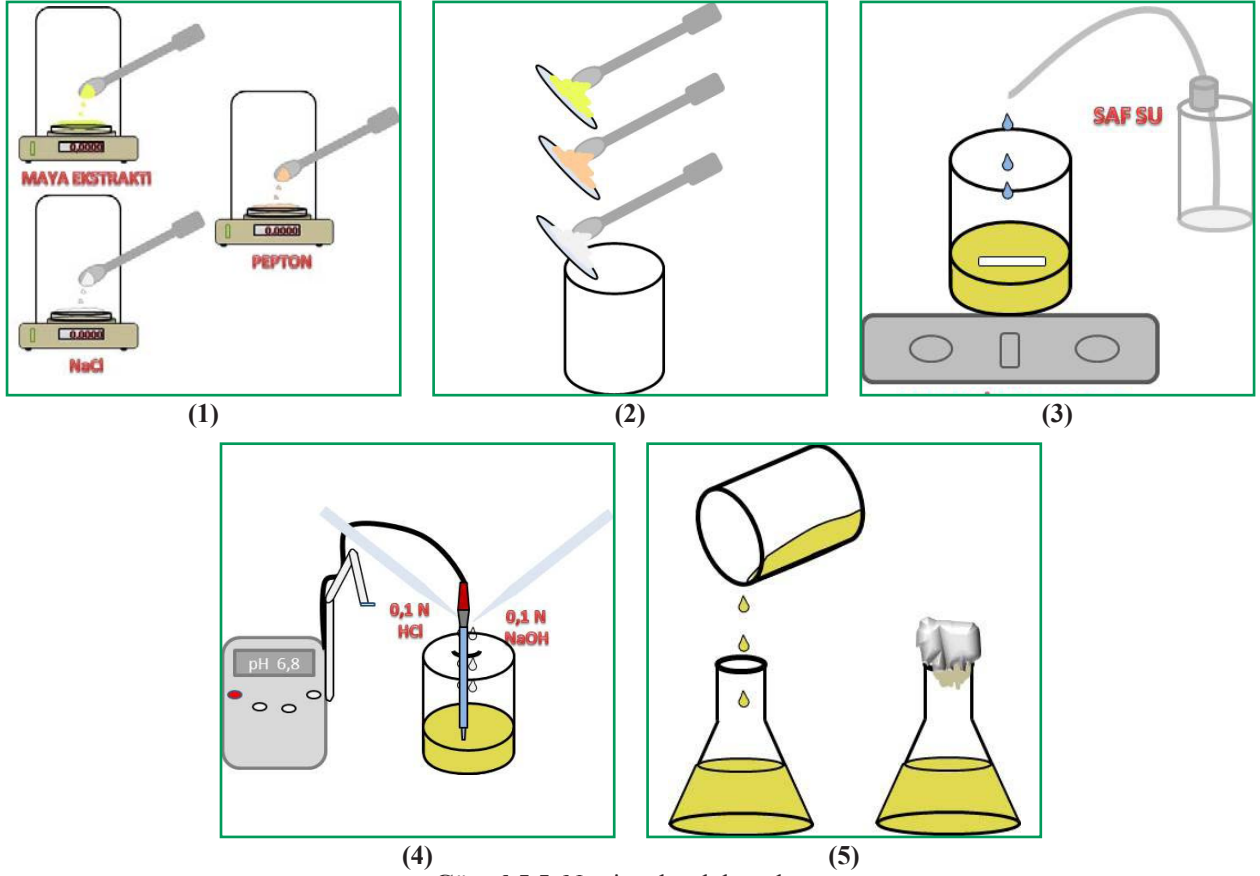
1. Hesaplama işleminde bulduğunuz bileşen miktarlarını analitik terazide temiz bir spatül yardımıyla tartınız.
2. Tartılan bileşenleri 250 ml'lik behere aktarınız.



- 200 ml saf su ekleyiniz ve manyetik karıştırıcıda karıştırınız.
- Ortamın pH değerini steril edilmiş 0,1 N NaOH ve 0,1 N HCl ile 6,8'e ayarlayınız.
- Çözeltiyi 250 ml'lik erlene koyunuz ve üzerine agar ilave ediniz (%1,5 w/v).
- Çözeltinin ağızını pamuk ve alüminyum folyo ile kapatınız. İçindeki agarın erimesi için erleni, subanyosunda kaynama sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta ısıtınız.

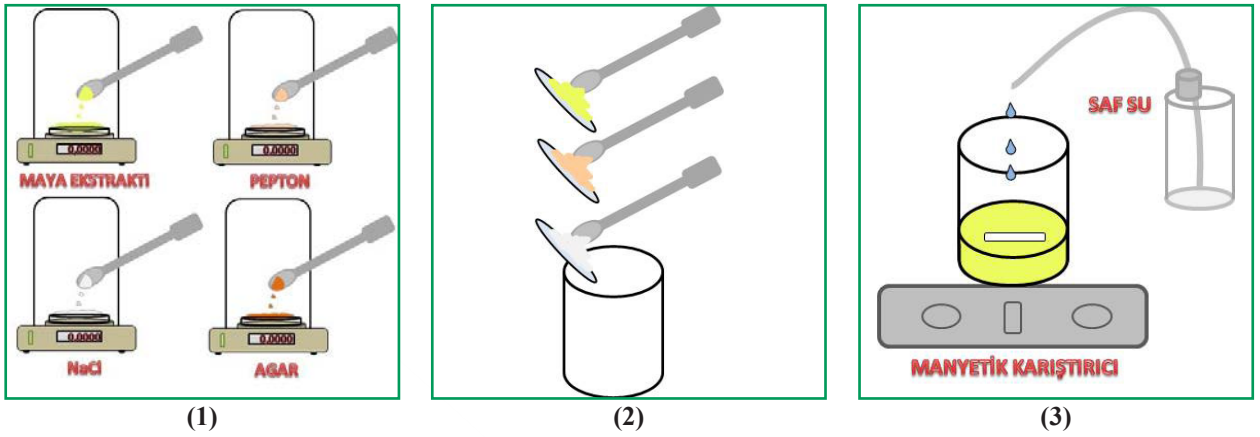
İşlem Uygulama Şeması

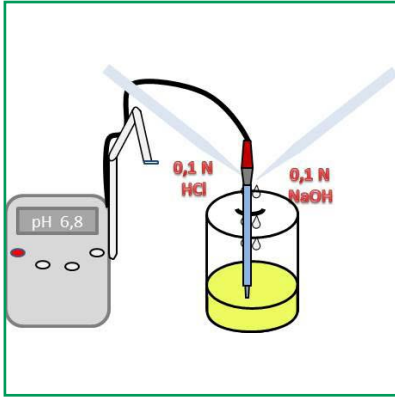
a) Nutrient Broth Hazırlama



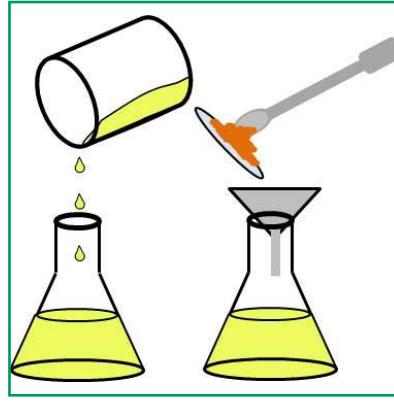
Görsel 5.5: Nutrient broth hazırlama

b) Nutrient Agar Hazırlama

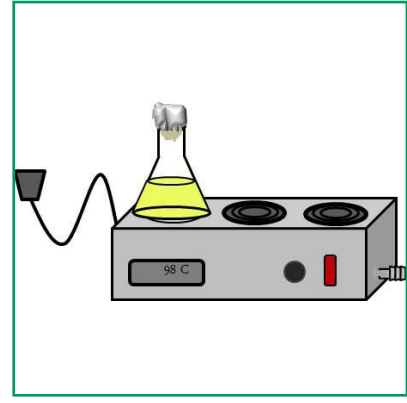




(4)



(5)



(6)

Görsel 5.6: Nutrient agar hazırlama

Hesaplama

a) 200 ml Nutrient Broth İçin

Maya ekstraktı (%0,3)

Pepton (%0,5)

NaCl (%0,8)

b) 200 ml Nutrient Agar İçin

Maya ekstraktı (%0,3)

Pepton (%0,5)

NaCl (%0,8)

Agar (%2)

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Kullanılacak alanı ve malzemeleri sterilize ediniz.
- ✓ İşlem tamamlandıktan sonra cam malzemeleri temizleyiniz ve sterilize ediniz.
- ✓ Cihazların temiz bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kullanılan cam malzemeleri yerine kaldırınız.



Sonuç ve Yorum

Empty rounded rectangular box with horizontal dashed lines for writing.

“Besiyeri Bileşenlerini Hesaplama, Tartım ve Hazırlama” Uygulaması

DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Besiyeri bileşenlerini hesapladı.					
Teraziye tartıma hazırladı ve tartım aldı.					
Besiyerini çözündürüp pH ayarlaması yaptı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:	Gerçek Puanı:				

Değerlendirme: Form puanını 2,5 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.



3. UYGULAMA : BESİYERİ STERİLİZASYONU



İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- √ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- √ Biyogüvenlik kabininde çalışınız.
- √ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- √ çalışacağınız alanı steril hâle getiriniz.
- √ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- √ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlemler basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- √ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- √ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- √ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- √ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

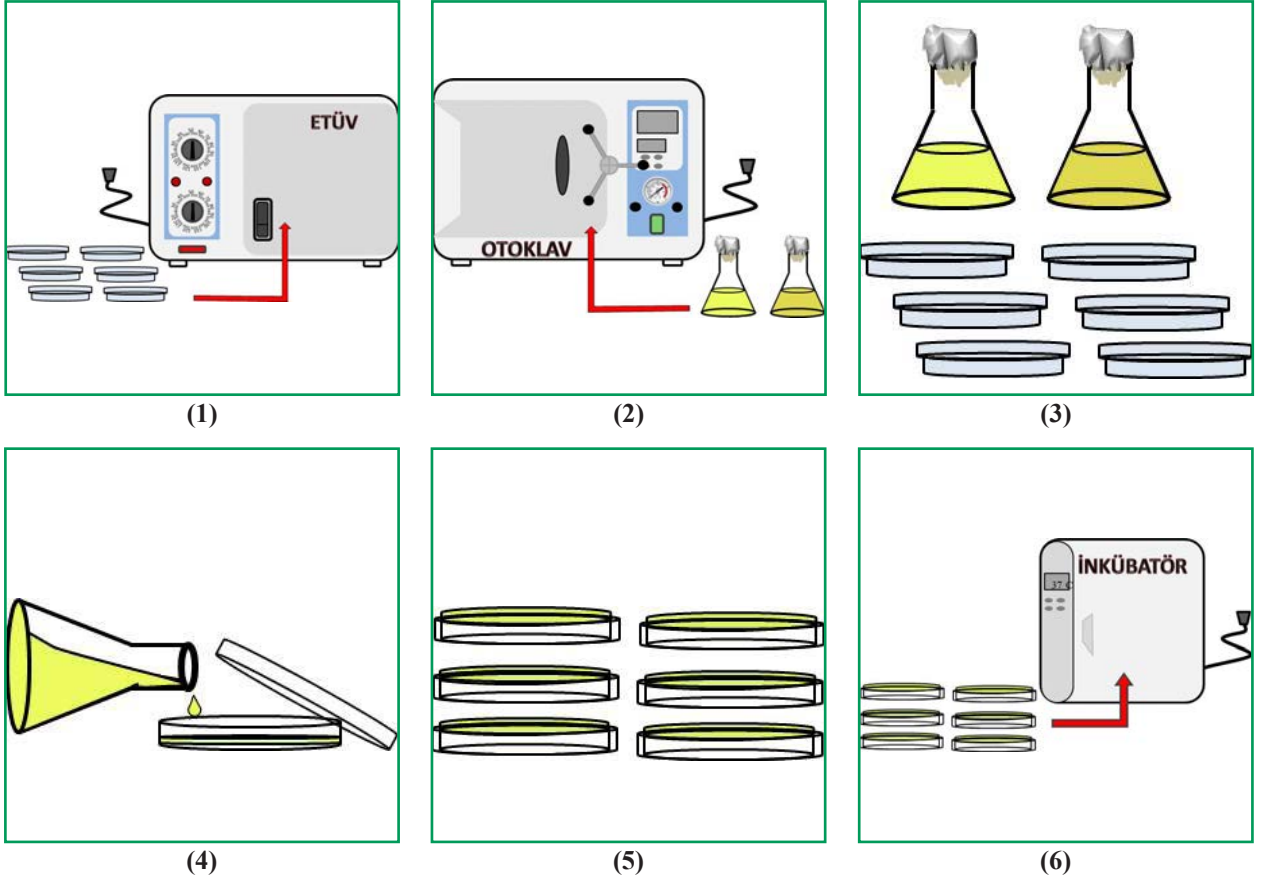
- √ Etüv
- √ İnkübatör
- √ Otoklav
- √ Petri kapları
- √ Besiyeri özeltileri

İşlem Basamakları

1. Kullanılacak petri kaplarını 180 °C’de etüvde 2 saat sterilize ediniz.
2. Bu öğrenme biriminin 2. uygulamasında hazırlanan besiyerleri otoklavda 121 °C’de 15-20 dakika sterilize ediniz.
3. Etüv ve otoklavdan çıkan malzemeleri oda sıcaklığında soğumaya bırakınız.
4. 48 °C’ye soğuyan nutrient agarın 20 ml’sini, aseptik koşullarda erlenden petrilere dökünüz.
5. Agarın katılaşmasını bekleyiniz ve buharlaşmayı önlemek için petrilere ters çeviriniz.
6. Agarlar katılaştıktan sonra petrilere kontrol için 35 °C’de inkübatörde 1 gece bekletiniz.
7. Hazırlanan petrilere buzdolabında muhafaza ediniz.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 5.7: Besiyerinde sterilizasyon

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Kullanılacak alanı ve malzemeleri sterilize ediniz.
- ✓ İşlem tamamlandıktan sonra cam malzemeleri temizleyiniz ve sterilize ediniz.
- ✓ Cihazların temiz bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kullanılan cam malzemeleri yerine kaldırınız.



ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE “D” YANLIŞ İSE “Y” YAZINIZ.

1. () Besiyerine ortam veya vasat da denilmektedir.
2. () Besiyeri hazırlanırken ortam koşulları önemsizdir.
3. () Besiyerinde pH ayarı yapılırken 0,1 N NaOH veya HCl çözeltileri kullanılır.
4. () Üre broth, fermantasyon test besiyerine örnektir.
5. () Besiyerini katılaştırmak için agar ve jelatin birlikte kullanılır.
6. () Sterilizasyon işlemi sırasında Durham tüpleri, besiyeri tüplerinin içine düz konur.
7. () Besiyeri çözeltilerinin otoklavda 121 °C’de 15-20 dk. sterilize edilmesi uygundur.

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

8. Besiyeri hazırlanırken ısıtma işlemi gibi katılaştırıcı ajanların iyice çözünmesi açısından önemlidir.
9. Besiyerlerin önlemek için uygun kaplarda muhafaza edilmesi gerekir.
10. İstenen bir mikroorganizmanın bolca üretimini sağlamak amacıyla hazırlanmış özel besiyerlerine denir.
11. Fiziksel özelliklerine göre katı, ve besiyerleri mevcuttur.
12. Besiyeri hazırlama işlemi sırasında ilk aşamadır.
13. Sterilizasyon işlemi, besiyeri hazırlanırken çok önemli olduğundan her şey kontrolünden geçmiş olmalıdır.
14. pH ayarlamada pH metre dışında kullanılabilir.
15. Kanlı agar, bakterilerde durumunu belirlemek amacıyla besiyerine eklenir.



AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

16. Aşağıdakilerden hangisi özel besiyeri çeşitlerinden değildir?
- A) Canlandırma
 - B) Elektif
 - C) Selektif
 - D) Sentetik
 - E) Zenginleştirme
17. Plate Count Agar (PCA) hazırlanırken pH kaç ayarlanır?
- A) 6,8
 - B) 6,9
 - C) 7,0
 - D) 7,1
 - E) 7,2
18. Aşağıdakilerden hangisi besiyeri sterilizasyonunda dikkat edilecek durumlardan biri değildir?
- A) Analiz boyunca aseptik koşulların sağlanması
 - B) Analizde kullanılacak cam malzemelerin steril olması
 - C) Seçilen besiyeri çeşidinin analize uygun olması
 - D) Uygun sıcaklıkta inkübasyonun gerçekleştirilmesi
 - E) Çalışılacak alanın steril hâle getirilmesi
19. Aşağıdakilerden hangisi nutrient broth besiyeri içinde bulunmaz?
- A) Agar
 - B) Maya ekstraktı
 - C) NaCl
 - D) Pepton
 - E) Saf su
20. Aşağıdakilerden hangisi doğrulama besiyeri özelliklerindedir?
- A) Metabolizma ürünlerini belirleyerek bunların teşhis edilmesine olanak verir.
 - B) Canlılık oranı çok düşük olan mikroorganizmaların adaptasyonu için kullanılır.
 - C) Test edilen maddeyi herhangi bir biyokimyasal değişime uğratması amacıyla kullanılır.
 - D) Karakteristik mikroorganizma kolonileri oluşması ile kolayca tanımlanmasını sağlar.
 - E) İstenen bir mikroorganizmanın bolca üremesini sağlamak amacıyla besin sağlar.

A spiral-bound notebook page with a red cover and a yellowish cream-colored interior. The page is ruled with horizontal blue lines. The spiral binding is visible at the top edge.

6. ÖĞRENME BİRİMİ



EKİM YÖNTEMLERİ



Bu öğrenme biriminde;

- Mikrobiyolojik analizlerde ekim işlemi ve ekim ile ilgili kavramları,
- Ekim yöntemlerini, ekim yöntemlerinin amaçlarını ve ekim işleminin basamaklarını,
- İnkübasyonun amacını ve önemini,
- Ekim yöntemlerinin uygulamalarını öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 6.1. Sıvı Besiyerine Ekim Yapma
- 6.2. Çizme Yöntemi ile Ekim Yapma
- 6.3. Dökme Plak Yöntemi ile Ekim Yapma
- 6.4. Yayma Yöntemi ile Ekim Yapma
- 6.5. İnkübasyon

TEMEL KAVRAMLAR

Kültür inokülasyon koloni çizim yayma
dökme inkübasyon



6. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Mikroorganizmalara neden ekim işlemi uygulanır? Araştırınız.
2. Ekim işlemi öncesi yapılması gereken hazırlıkları grup çalışması yaparak arkadaşlarınızla gözden geçiriniz.
3. Mikrobiyolojik çalışmalarda mikroorganizmaların kendilerine özel şartlarda tutularak çoğaltılması ne amaçla gereklidir? Tartışınız.

6.1. SIVI BESİYERİNE EKİM YAPMA

Ekim yapmak üzere örnek alma ve kültür üretme işlemleri, mikrobiyolojik analizlerin en önemli aşamalarındandır. Üzerinde veya içerisinde mikroorganizma üretilmiş veya üremiş besiyerine **kültür** denilmektedir. Besiyerinde yalnızca bir mikroorganizma üretilmiş kültürler **saf kültür**, iki veya daha fazla türde mikroorganizma türü üretilmiş kültürler **karışık kültür** denir.

Kültür yapma işleminde besiyerinin sıvı veya katı olmasına göre yapılan uygulamalar farklılık göstermektedir. Sıvı besiyerinde oluşturulmuş kültürler **sıvı kültür**, katı besiyerinde oluşturulmuş kültürler **katı kültür** denir. Katı besiyerlerinde genellikle katılaştırma ajanı olarak agar kullanılır.

Mikroorganizmaların buldukları ortamdan belirli tekniklerle alınarak uygun besiyerine aktarılması ve burada geliştirilmelerinin sağlanması aşamalarını içeren işlemlere **kültür yapma (kültivasyon)** denir. Kültür yapma;

- Mikrobiyolojik örnek alma ve örneğin inokülasyona (ekime) hazırlanması,
- Besiyerine inokülasyon,
- İnkübasyon aşamalarından oluşmaktadır.

Kültür yapma işleminden önce birçok ön hazırlık gerekmektedir. Bunlardan ilki steril besiyerinin hazırlanmasıdır. Uygun besiyeri seçimi, besiyerinin usulüne uygun olarak hazırlanması ve sterilizasyonu aşamalarından sonra kültüre ait bilgiler; besiyerinin hazırlandığı petri kutusu, erlen, tüp veya balon üzerine cam kalemiyle yazılır. Besiyeri kabının üzerine yazılması gereken bilgiler; örneğin adı, varsa kodu, dilüsyon oranı, besiyeri adı, inkübasyon sıcaklığı ve süresidir.

Mikrobiyolojik analizlerden kültür hazırlanması için istenen örnek; katı, sıvı veya gaz bir madde olabildiği gibi yüzey örneği veya kültür örneği de olabilir. Tablo 6.1; mikrobiyolojik örnekler, örnek alma tekniklerini ve inokülasyona hazırlık işlemlerini gösteren açıklamalar içermektedir (Temiz, 2016).

Tablo 6.1: Mikrobiyolojik Örnek Çeşitleri ve Yöntemleri

Örnek	Örnek Alma Tekniği	İnokülasyona Hazırlık
Sıvı Örnekler: Su, süt, meyve suyu gibi gıda maddeleri	Steril bir örnek kabına orijinal ambalajından direkt olarak aktarılır. Aktarma için steril pipetler kullanılır.	Direkt inokülasyon Sulandırma Seri dilüsyonlarını hazırlama
Katı Örnekler: Un, et, peynir, bitki ile hayvan doku ve organları vs.	Steril bir örnek kabına orijinal ambalajından direkt olarak aktarılır. Aktarma için steril spatül, kaşık, bıçak, pens gibi araçlardan yararlanır.	Direkt inokülasyon Sulandırma Seri dilüsyonlarını hazırlama



Gaz Örnekler: Ortam havası, laboratuvar havası vs.	Özel hava örnekleme cihazından geçirilerek direkt olarak alınır.	Direkt inokülasyon
Canlı Yüzeyler: El, yüz, tırnak, saç gibi vücut yüzeyleri	Steril eküvyon gibi bir araçtan yararlanır.	Direkt inokülasyon Sulandırma Seri dilüsyonlarını hazırlama
Cansız Yüzeyler: Odalarda taban, tavan, masa, tezgâh; işletmelerde kazan, tank gibi ekipman ve ambalaj yüzeyleri	Steril eküvyon gibi bir araçtan yararlanır. Yüzey yıkama, kazıma veya sıyırma şeklinde örnek alınabilir.	Direkt inokülasyon Sulandırma Seri dilüsyonlarını hazırlama
Sıvı Kültürler	Geliştiği kabın içerisinde tutulur.	Direkt inokülasyon Sulandırma Seri dilüsyonlarını hazırlama
Katı Kültürler	Geliştiği kabın içerisinde tutulur.	Steril bir öze ucu ile koloni alımı

Numunenin steril besiyerine aseptik koşullarda aktarılması işlemine **ekim, aşılama** veya **inokülasyon** denilmektedir. Ekim işlemi sırasında kullanılacak malzemelerin mutlaka steril olması gerekmektedir. Steril olmayan hiçbir malzeme steril besiyerine daldırılmamalıdır. Pipet kutusu içinde steril edilmiş pipetler, bek alevi altında kutudan çıkarılarak alevden geçirilir ve ekim işleminde kullanılır. İşlem tamamlandığında pipetler, içinde dezenfektan bulunan bir kaba konulur. İşlem öze ile gerçekleştiriliyorsa özenin ucu bek alevinden geçirilerek kontaminasyon riski önlenmiş olur. Ekim işlemi yapılırken aktarılabilecek örneği ve steril besiyerini içeren kapların ağız kısımları, işlemler öncesi ve sonrası bek alevinden geçirilmelidir. Bu şekilde kapların ağız kısımlarında yaratılan konveksiyon akımıyla kaplara havayla girebilecek mikroorganizmalar engellenmekte ve varsa kontaminasyon yaratacak mikroorganizmaların yok edilmesi de sağlanmaktadır.

Su, süt, meyve suyu gibi oda sıcaklığında sıvı hâlde bulunan gıda maddeleri ile katı gıda maddelerinin uygun bir steril çözücü içinde homojenize edilmesiyle veya dilüsyon serileri yapılarak hazırlanmış sıvı ekstrakt çözeltileri sıvı örneklerdir. Sıvı örnekler, farklı özellikler taşıyan besiyerlerine değişik metotlarla aktarılabilir. Örnek katı ise direkt inokülasyon yapılabileceği gibi sıvı hâle getirilerek ve dilüsyonları hazırlanarak da analize alınabilir.

Sıvı besiyerine ekim işlemi, mikrobiyoloji laboratuvarında sık olarak uygulanan inokülasyonlardandır. Bu işlem, usulüne uygun hazırlandığında hem sıvı hem de katı örnekler için mümkün olabilmektedir.

6.1.1. Sıvı Besiyerine Ekim İşleminde Kullanılan Araç Gereç

Sıvı besiyerine ekim işleminde pipet, öze gibi aktarma ekipmanları kullanılır. Sıvı besiyerleri; erlen, beher veya balon gibi kaplarda muhafaza edilir. Bek alevi, ekim işlemi sırasında sterilizasyon amaçlı olarak kullanılır. Tüplerdeki besiyerini karıştırmak için vorteks cihazından yararlanılabilir. Ekim işlemi, biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmelidir.

6.1.2. Sıvı Besiyerine Öze ile Ekim İşlemi Aşamaları

Sıvı besiyerine aktarma işleminin ilk aşaması, aktarılabilecek örneğin (sıvı ise) iyice çalkalanmasıdır. Bunun amacı, örneğin içerisinde bulunan mikroorganizmaların sıvı içerisinde homojen olarak dağılımını sağlamaktır. Tüp elle karıştırılacaksa sol elde tutularak sağ işaret parmağıyla tüpün alt kısmına birkaç kez vurulur veya tüp iki el ayasının arasına yerleştirilerek ileri geri sürtme hareketi yapılır. Laboratuvarda



Görsel 6.1: Sıvı besiyerine ekim

kullanılan, **vorteks** adı verilen tüp karıştırıcı aletler de bu amaca yönelik olarak üretilmiş yardımcılarıdır.

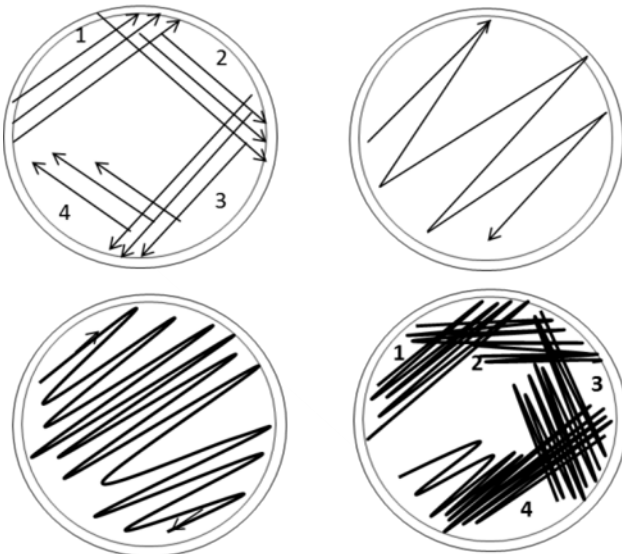
Sıvı besiyerine ekim işlemi özeyle veya pipetle gerçekleştirilebilir. İşlem özeyle yapılacaksa tüp iyice karıştırıldıktan sonra öze bek alevinde akkor hâle getirilerek sterilize edilir (Görsel 6.1). Öze, alev çatısı altında soğutulduktan sonra sol elde bulunan tüpün kapağı, öze bulunan sağ el parmaklarıyla açılarak tüpün ağzı alevden geçirilir. Tüpün içinden bir öze örnek alınır ve öze dışarı çıkarılır. Alevden geçirilerek sterilize edilir. Tüpün ağzı, sağ elde bulunan tıpa ile kapatılarak yerine konulur.

Steril sıvı besiyerini içeren tüp alınır, aseptik koşullarda açılır. Öze ucu sıvının içerisine daldırılmadan sıvı yüzeyinin üst kısmındaki kuru bölgeye sürülerek örnek bu bölgeye yayılır. Daha sonra öze ucu sıvı besiyerine daldırılarak karıştırılır, besiyeri içerisinden çıkarılır ve örneğin daha önceden yayılmış olduğu bölgeye değdirilerek sürme hareketi yapılır. Bu şekilde inokülasyon yapılmış olur. Son olarak besiyerinin bulunduğu tüpün ağzı ve öze sterilize edilir. Tüpler karıştırılarak işlem tamamlanır.

6.1.3. Sıvı Besiyerine Pipet ile Ekim İşlemi Aşamaları

Sıvı besiyerine pipet ile inokülasyon yapılacaksa öze ile çalışıldığında uygulanan tüm işlemler pipet ile ekim işlemi de aynen uygulanır. Karıştırılarak homojenize edilen tüp, sol ele alınır. Sterilize edilen pipet; aseptik koşullarda, açılan tüpün içine daldırılır. Pipetle istenen hacimde sıvı çekilerek steril sıvı besiyeri içeren tüpe daldırılır. Tüpün ağzı alevden geçirildikten sonra kapatılır ve steril besiyeri içeren tüpün kapağı veya pamuk tıkacı çıkarılarak pipet ucu tüpün içerisindeki besiyerine daldırılmadan besiyeri seviyesinin üst kısmındaki kuru bölgeye değdirilir ve pipetteki sıvı boşaltılır. Bu şekilde inokülasyon işlemi tamamlanmış olur. Besiyeri kapatılır ve pipet alevden geçirilerek temizleme kuvetine konur. Son olarak, örnek ve besiyeri tüpleri iki el ayası arasında yuvarlanarak homojen bir şekilde karıştırılır.

6.2. ÇİZME YÖNTEMİ İLE EKİM YAPMA



Görsel 6.2: Petri kutusundaki agarlı besiyeri yüzeyine inokülasyon şekilleri

Çizme yöntemiyle ekim işlemi; örnek ile temas ettirilen özenin, petri kutusundaki katı besiyerinin farklı bölgelerine sırayla sürülmesiyle numunenin miktarının ve içerdiği mikroorganizma sayısının giderek azaltılması esasına dayanır. Bu şekilde her sürme alanına bir önceki alandan daha az sayıda mikroorganizma düşer. En son alandaki sayı ise teke iner. Bakterilerin teke düştükleri bölgelerde çoğalmasıyla bir tek koloni oluşur. Bu yüzden bu yönteme **tek koloni düşürme yöntemi** de denir.

Koloni, her bir bakteri hücresinin ya da sporunun katı bir besiyerinde düştüğü herhangi bir noktada, inkübasyon süresince çok sayıda bölünmeler geçirerek oluşturduğu ve çıplak gözle görülebilen hücre topluluğu şeklinde bir yapıdır (Temiz, 2016). Tek koloni düşürme tekniği, agarlı



besiyeri yüzeyine Görsel 6.2’de gösterildiği gibi farklı şekillerde uygulanabilir.

6.2.1. Çizme Yöntemi ile Ekim İşleminde Kullanılan Araç Gereç

Çizme yöntemiyle ekim işleminde aktarma işlemi öze ile yapılır. Agarlı besiyeri, petri kabı içerisinde muhafaza edilir. Bek alevi, ekim işlemi sırasında sterilizasyon amaçlı olarak kullanılır. Ekim işlemi, biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmelidir.

6.2.2. Çizme Yöntemi ile Ekim İşlemi Aşamaları

Çizme yöntemiyle koloni oluşturmada amaç, agarlı besiyerinde her canlı hücrenin belirli bir inkübasyon süresi sonunda 1 adet koloni oluşturmasıdır. Görsel 6.3’te bu yöntemle oluşturulmuş izole koloniler görülmektedir.

Çizme yöntemiyle ekim işleminde mikrobiyolojik analizi yapılan inoküle edilecek örnek, öze veya pipet ile sıvı besiyerine ekim işlemi uygulamasındaki gibi alınır. Ekim yapılacak petri kutusunda, önceden istenen özelliklerde hazırlanmış agarlı besiyeri vardır. Petri kutusu, sol elin avuç içine yerleştirilir. Petri kutusunun kapağı bu elin baş ve işaret parmağı ile açılır. Öze, bu aralıktan içeri sokulur ve içinde örnek bulunan öze ucu, agar yüzeyinde bir bölgeye temas ettirilir. Örnek, temas ettirilen bölgede hafifçe ezilir ve birkaç mm çapında yayılır. Bu yayılma alanından başlanarak öze ile sürme işlemi uygulanır. Sürme işlemi ayrı koloniler elde etme amacıyla 4 farklı bölgenin çizilmesi şeklinde uygulanır. Besiyerini yırtmadan öze ile yüzeye çizgiler çizilir. Birbirine dik üçlü paralel çizgiler hâlinde sürme yapılırken üç çizgi bitiminde öze yakılır ve yeniden üç çizginin bittiği yerden ve her seferinde bir çizgiden başlayarak ilk çizgilere dik çizgiler şeklinde sürme yapılır. Öze yakma işlemi her köşede tekrarlanır ve bu şekilde seyreltme yapılarak tek koloniye düşürmek hedeflenir. Öze ile bir defada zikzak ekim ile tek koloniye düşürme de sık uygulanan bir yöntemdir.

6.3. DÖKME PLAK YÖNTEMİ İLE EKİM YAPMA



Görsel 6.3: Çizme yöntemiyle elde edilen izole koloniler

Bu yöntem, içi boş steril petri kutuları ve sıvılaştırılmış agarlı besiyeri kullanılarak çoğunlukla örnekte bulunan canlı mikroorganizmaların veya mikroorganizma sporlarının kültürel sayımlarını gerçekleştirmek amacıyla uygulanır. Bu ekim yönteminde inkübasyon, aerobik koşullarda yapılırsa canlı aerobik mikroorganizma sayısı; anaerobik koşullarda yapılırsa canlı anaerobik mikroorganizma sayısı tespit edilir.

Dökme plak yöntemi ile ekim yapma, bakteri, küf ve mayaların saf kolonilerinin elde edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Hazırlanan numunedan alınan 1 ml örneğin steril boş bir petri kutusunun tam ortasına aktarılması ve üzerine 45 °C’de tutulan, katılaşmamış besiyeri dökülmesi suretiyle uygulanan bir yöntemdir.



6.3.1. Dökme Yöntemi ile Ekim İşleminde Kullanılan Araç Gereç

Dökme yöntemiyle ekim işleminde pipetler aktarma aracı olarak kullanılır. Sıvı besiyerleri; erlen, beher veya balon gibi kaplarda muhafaza edilir. Bek alevi, ekim işlemi sırasında aseptik koşulları sağlamak ve korumak amacıyla kullanılır. Ekim işlemi, petri kaplarında ve biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmelidir. Dökme yönteminde su banyosu, agarlı besiyerinin eritilmesi ve istenen sıcaklıkta güvenli bir şekilde tutulması açısından gereklidir. Mikrodalga fırınlar da besiyeri eritme işlemi için kullanılır. (Görsel 6.4).



Görsel 6.4: Agarlı besiyerini istenen sıcaklığa getirmek için kullanılan ekipmanlar

6.3.2. Tek Tabaka Dökme Yöntemi ile Ekim İşlemi Aşamaları

Tek tabaka dökme yöntemiyle ekim yönteminde, steril bir pipetle sıvı kültürden veya sıvı örnekten 1 ml alınır ve steril boş bir petri kutusuna aktarılır (Görsel 6.5). Önceden 44-48 °C'ye ayarlanarak hazırlanmış su banyosunda tutulan uygun bir agarlı besiyeri, içine 1 ml örnek konulmuş olan petri kutusuna yaklaşık 15-20 ml kadar dökülür (Görsel 6.5). Besiyeri önceden katılaşmış ise kaynar su banyosunda veya mikrodalga fırında eritilir. Daha sonra 44 ile 48 °C arası bir sıcaklığa soğutulmuş hazır hâle getirilir. Petri kutusu, bulunduğu düzlem üzerinde sekiz çizdirme hareketi ile veya üç defa saat yönünde, üç defa aksi yönde çevrilerek homojen bir şekilde karıştırılır. Besiyerinin katılaşması için bir süre beklenir.



Görsel 6.5: Dökme plak tekniğinde örneğin konulması ve besiyerinin dökülmesi

6.3.3. Çift Tabaka Dökme Plak Yöntemi ile Ekim İşlemi Aşamaları

Çift tabaka dökme plak yöntemi, birinci ekim işlemi gerçekleştirilmiş agar plaklarının üzerine, önceden uygun bir şekilde hazırlanmış ve 45 ile 50 °C arası bir sıcaklığa soğutulmuş steril ve agarlı besiyerinden 5 ml olacak şekilde ikinci bir tabaka hâlinde dökülerek uygulanır. Bu yöntemin amacı, kolonilerin yayılmasını engellemek ve hafif anaerob bir ortam oluşturarak fakültatif anaerob mikroorganizmaların gelişebileceği ortamı oluşturmaktır. Çift tabaka dökme plak yönteminde her iki tabaka için genellikle aynı agarlı besiyeri kullanılır. Farklı besiyerinin kullanıldığı nadir durumlar da vardır. Dökülen miktarın 5 ml olarak ayarlanması ve tüm yüzeye yayılması, bu yöntemde en önemli hususlardır. Katılma tam olarak sağlandıktan sonra inkübasyon işlemi başlatılabilir.



6.4. YAYMA YÖNTEMİ İLE EKİM YAPMA

Bu yöntem, daha önce petri kaplarına dökülerek katılaştırılmış besiyerlerinin yüzeyine, ucu kıvrımlı özel bir cam çubuk olan drigalski spatülü (drigalski özesi) ile örneğin yayılması ve uygun koşullarda inkübe edilerek kolonilerin sayılması esasına dayanır.

6.4.1. Yayma Yöntemi ile Ekim İşleminde Kullanılan Araç Gereç

Yayma yöntemiyle ekim işleminde drigalski adı verilen özel bir cam çubuk, aktarma aracı olarak kullanılır (Görsel 6.6). Sıvı besiyerleri; erlen, beher veya balon gibi kaplarda muhafaza edilir. Bek alevi, ekim işlemi sırasında sterilizasyon amaçlı olarak kullanılır. Ekim işlemi, petri kaplarında ve biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilir.



Görsel 6.6: Drigalski spatülü

6.4.2. Yayma Yöntemi ile Ekim İşlemi Aşamaları

Yayma yöntemiyle ekim işlemi, petri kutusunda bulunan agarlı besiyeri yüzeyinde gerçekleştirilir. Bu yöntemde öncelikle petri kutusundaki katı besiyeri yüzeyinde bir nokta seçilir ve buraya 0,1 ml örnek aktarılır. Örnek aktarılan bu nokta, petrinin dörtte birine karşılık gelen bir nokta olabilir. Katı besiyeri yüzeyinin kuru olması gerekir. Aktarılan bu sıvı örnek, drigalski spatülüyle besiyeri yüzeyine yayılır (Görsel 6.7). Yayma işlemi öncesinde steril drigalski spatülü etil alkol çözeltisine daldırılır ve uç kısmı bunsen beki alevine değdirilerek tekrar sterilize edilir. Alev alan drigalski spatülü alev çatısı altına indirilir ve alevin sönmesi beklenir. Ekim öncesinde besiyerinin boş kısmına değdirilerek drigalski spatülünün soğuması beklenir. Yayma işlemi sırasında petri kutusunun alt kapağı sol elle hafifçe sallama hareketi yapılarak döndürülürken drigalski spatülü sağ ele alınarak besiyeri üzerine sürme hareketi yaptırılır. Bu hareket, özenin sürme başlangıç noktasına gelene kadar sürdürülür. Petri kutusu 15 dakika ters çevrilmeden bekletilir ve besiyerinin aktarılan örneği absorbe etmesi yani emerek içine alması sağlanır.



Görsel 6.7: Drigalski spatülü kullanılarak yayma yöntemi ile ekim yapılması

6.5. İNKÜBASYON

Kültür elde etme sürecindeki son aşama inkübasyondur. Ekim işlemi gerçekleştirilmiş besiyerini içeren kabın, istenen mikroorganizma gelişimini sağlamak için uygun bir inkübatörde, belirli bir sıcaklıkta ve sürede tutulması gerekmektedir. Uygun besiyerine ekimi yapılmış mikroorganizmanın, optimum sıcaklık ve sürede optimum yaşam şartlarını ve gelişimini en iyi şekilde sağlaması gerçekleşmektedir. Agarlı besiyeri bulunan petri kapları, inokülasyondan sonra bir süre bekletilip ters çevrilerek inkübatörde veya etüvde inkübe edilir. Petri kutularının ters çevrilmesi işlemi, petri kutusu içinde oluşabilecek su damlalarının kapakta yoğunlaşarak tekrar besiyeri üzerine damlamasına engel olmak için yapılır.



6.5.1. İnkübasyon İşleminde Kullanılan Cihazlar

Bu işlem için genellikle etüv veya su banyosu gibi cihazlardan yararlanılmaktadır (Görsel 6.8). Mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu amaçla kullanılan özel inkübatörler de bulunmaktadır. Laboratuvar ortamında, tezgâh üzerinde gerçekleşen inkübasyon işlemi de uygulanmaktadır. Ancak bu işlem, kontrollü bir inkübasyon değildir. Değişen ortam sıcaklığına göre yani oda sıcaklığı olarak kabul edilen 22-25 °C aralığında sapmalar gösterebilir. Küflerin üretimi için bu yöntem önerilebilir.

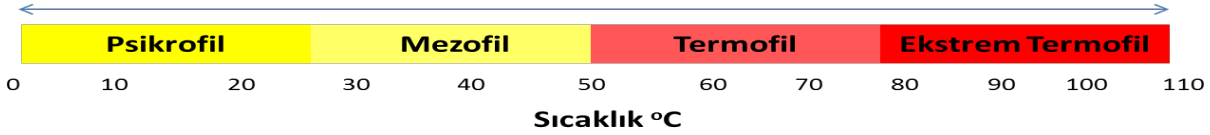
Petri kutusuna yapılan ekim işlemleri için özel inkübatörlerden veya etüvden yararlanır. Su banyosu, tüplerde uygulanan inkübasyon işlemleri için önerilir. Bu işlemde tüpler, bir tüplük içine yerleştirilir ve su banyosu içerisindeki suyun tüpleri yan yatırma ihtimaline karşı önlemler alınır.



Görsel 6.8: İnkübasyonda kullanılan cihazlar (etüv ve su banyosu)

6.5.2. İnkübasyonda Dikkat Edilecek Hususlar

- İnkübasyon süresi ve sıcaklığı belirlenirken yöntemde belirlenen değerlere uyulmalı, çalışmanın amacına ve duruma göre uzman deneyiminden yararlanılmalıdır.
- İnkübatör içerisinde istenen sıcaklık değerinin olup olmadığı termometre ile kontrol edilmeli, cihazların düzenli kontrolleri yapılmalıdır.
- İnkübatörde sıcaklık değişimi olmaması için cihazın kapağı sık sık açılıp kapanmamalıdır.
- Petri kapları tek sıra hâlinde etüve yerleştirilmeli, ancak zorunlu durumlarda birden fazla sayıda petri kabının üst üste konulmasına izin verilmelidir.
- Etüve kaplar yerleştirilirken aynı anda çok sayıda tüp, petri kabı vs. konulmamasına ve kaplar arasında boşluk bırakılmamasına dikkat edilmelidir. Bu durum, sıcaklığın etüv içerisinde homojen bir şekilde dağılımı açısından önemlidir.
- Anaerob mikroorganizmalar ile çalışıldığında inkübatör içerisindeki gaz durumuna dikkat edilmelidir.
- 37 °C üzerindeki sıcaklıklarda inkübatör içerisindeki nem durumu ve petri kutularındaki yüzey kuruması kontrol edilmelidir. Gerekirse petriler, streç filmle sarılarak inkübasyona bırakılmalıdır.
- Petri kapları inokülasyon işlemi takiben bir süre beklendikten sonra genelde ters bir şekilde inkübatöre yerleştirilir. Bu şekilde, petri kabı içerisinde oluşabilecek su baharının kapakta kondense olup besiyerine damlama riski önlenmiş ve böylece kültürün kontaminasyonu ile daha fazla sayıda koloni oluşumu engellenmiş olur.
- Küf kültürlerinin elde edilmesi işleminde petri kapları etüve düz konumda konur. Bunun amacı, küf sporlarının kapağa düşüp çalışma sırasında çevreye yayılmasını engellemektir.
- İnkübasyon sıcaklığı; mikroorganizmanın psikrofil (soğuğu seven), mezofil (ılığı seven), termofil (sıcağı seven), ekstrem termofil (çok sıcağı seven) karakterde olmasına göre optimum koşullar için belirlenmektedir. Görsel 6.9, mikroorganizmaların sıcaklık isteklerine göre çoğalabilme sıcaklıklarını göstermektedir.



Görsel 6.9: Mikroorganizmaların çoğalabilme sıcaklıkları

6.5.3. İnkübatörde İnkübasyon

Mikrobiyolojik analizlerde mikroorganizmaları üretmek için uygun sıcaklık ve sürede çalışma imkânı sağlayan cihazlara **inkübatör** denir (Görsel 6.10). Laboratuvarında inkübasyon işlemi için özel olarak üretilmiş ve 0-90 °C sıcaklıkta çalışabilen inkübatörler kullanılır. Bunun dışında genel amaçlı etüvler de inkübasyon amacıyla kullanılabilir. İnkübatörlerin bu sıcaklık aralığında üretilmesinin sebebi, mikroorganizmaların daha yüksek sıcaklıklarda yaşamalarının mümkün olmamasıdır. Ancak ekstrem termofiller (Görsel 6.9’da gösterildiği gibi) çok yüksek sıcaklıklarda yaşayabilir. Bu mikroorganizmalar da gıdalarda genellikle bulunmaz.



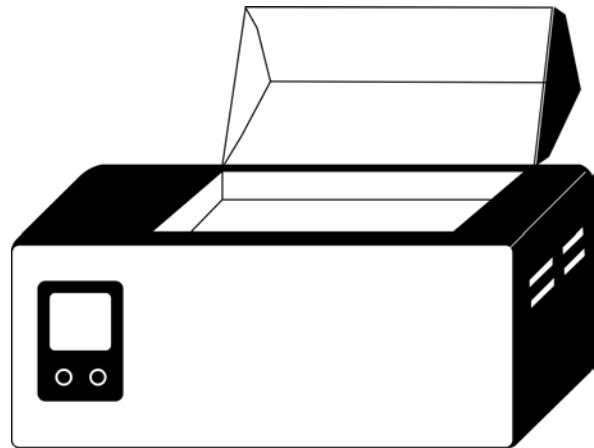
Görsel 6.10: Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan inkübatör

Etüvler; daha geniş sıcaklık aralığında ayarlanabilen, inkübasyon amacıyla da kullanılabilen cihazlardır. Laboratuvarında inkübasyon işlemi için kullanılan etüvün genel amaçlar için kullanılmaması, yalnızca mikrobiyolojik işlemler için ayrılması oluşabilecek kontaminasyon risklerini önlemek açısından önemlidir.

İnkübatörde ya da etüvde inkübasyon işlemi daha çok petrilerin inkübasyonu için uygulanmaktadır. Petri kapları cihaz içerisine aralıklı olarak yerleştirilmeli, üst üste yerleştirmelerden kaçınılmalıdır. Etüv veya inkübatörlerin sıcaklık kontrolleri düzenli olarak yapılmalı, etüv ve inkübatörler her analiz öncesi ve sonrası sterilize edilmelidir.

6.5.4. Su Banyosunda İnkübasyon

Ekim işleminin ardından istenen mikrobiyal büyümeyi sağlamak için uygun sıcaklık ve süre koşullarını sağlamada kullanılan bir diğer metot da su banyosunda inkübasyon işlemidir (Görsel 6.11). Su banyosunda inkübasyon işlemi, homojen bir ısı dağılımı sağladığı için oldukça sık kullanılan ve önerilen bir yöntemdir. Su banyosu özellikle erlen, tüp, balon gibi cam malzemeler için kullanılır. Bu malzemelerin su banyosunda yan yatmaması için gerekli önlemler alınmalıdır. Tüpler, tüplük içerisinde su banyosuna konulurken diğer cam malzemeler, kapların boyun kısımlarına ağırlık halkaları geçirilerek veya su banyosuna ait özel boşluklara yerleştirilerek inkübasyona alınabilir. Petri kapları, su banyosunda sterilize edilemez.



Görsel 6.11: Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan su banyosu

**1. UYGULAMA : SIVI BESİYERİNE EKİM YAPMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Biyogüvenlik kabini içinde çalışınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı steril hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmuyunuz.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | |
|------------------|---------------|------------------------|
| ✓ Nutrient broth | ✓ Bunsen beki | ✓ Steril deney tüpleri |
| ✓ Sıvı kültür | ✓ Özeler | ✓ Vorteks |
| ✓ Saf su | ✓ Pipetler | |

İşlem Basamakları

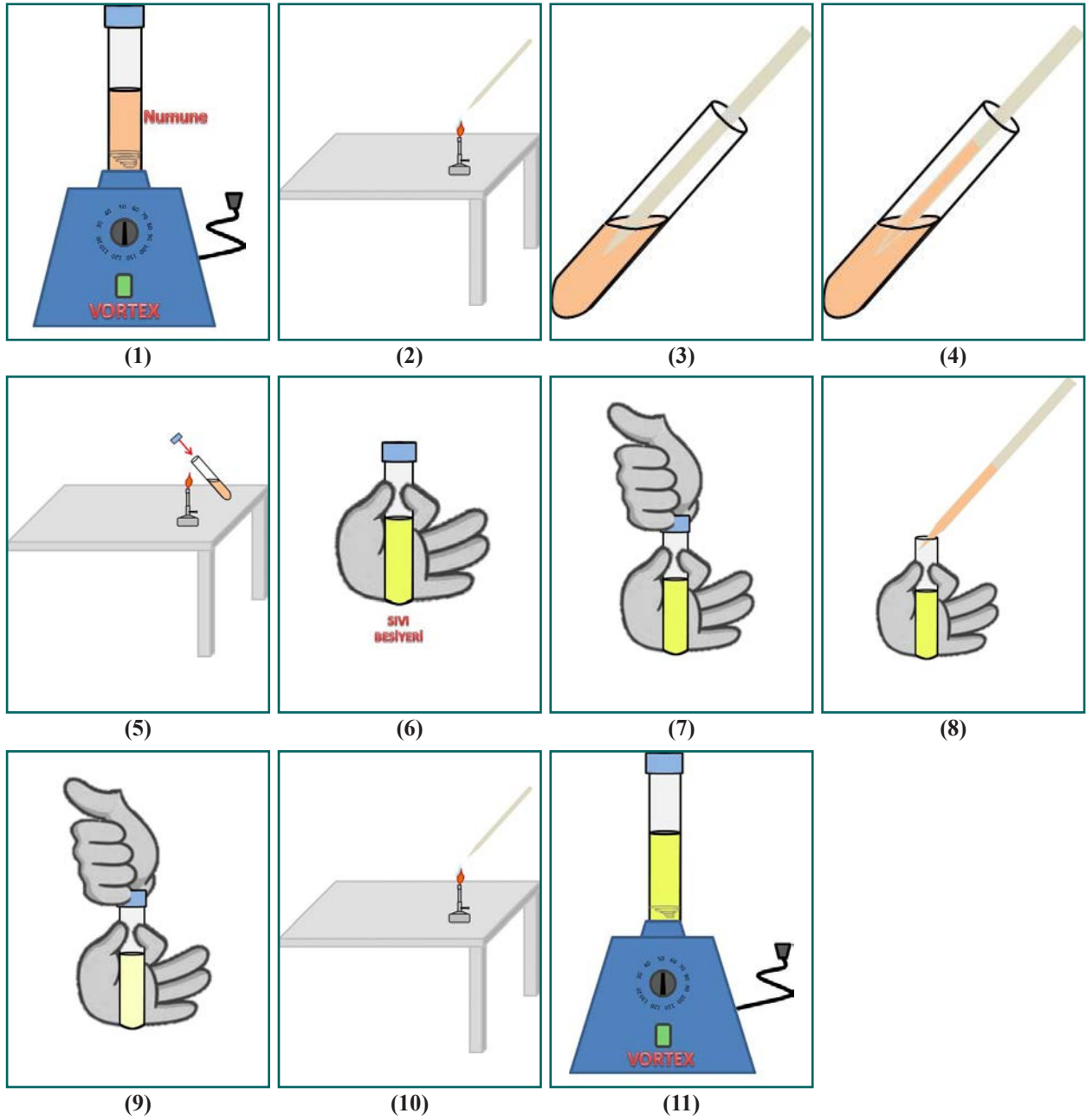
1. Sıvı besiyerini; tüpün alt kısmına doğru vurma, tüpü iki el ayası arasına yerleştirerek el ayaclarına sürme veya vorteks cihazında karıştırma yöntemlerinden birini tercih ederek homojenlik sağlayacak şekilde karıştırınız.
2. Pipeti birkaç kez alevden geçiriniz.
3. Tüpü hafifçe eğerek pipet ucunu sıvı örneğe daldırınız.
4. Pipetle bir miktar sıvıyı çekiniz ve pipetin ucu tüpe değmeyecek şekilde tüpten çıkarınız.
5. Tüpün ağzını alevden geçirip kapatınız ve tüpü, tüplüğe koyunuz.
6. Sol elinizle sıvı besiyerini içeren tüpü alınız.
7. Tüpü dip tarafından tutup kapağını ya da tıkaçını alev çatısı altında tutarak pipet tutan sağ elin küçük ve yüzük parmaklarıyla avuç içinde sıkıştırarak açınız.
8. Pipeti, tüpün içerisindeki besiyeri seviyesinin hemen üzerinde kuru bir tüp bölgesine değdiriniz. Pipetin kendi kendine boşalmasını sağlayınız.
9. Aktarma (inokülasyon) işlemini bitirip besiyerinin ağzını kapatınız.
10. Pipeti birkaç kez alevden geçirip temizleme küvetine koyunuz.
11. Tekniğine uygun karıştırınız.



Temizlik ve Dezenfeksiyon.

- ✓ Cihazların temiz bırakılıp bırakılmadığını kontrol ediniz.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Ortamı ve malzemeleri sterilize ediniz.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kullanılan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 6.12: Sıvı besiyerine pipetle ekim işlemi uygulama şeması



2. UYGULAMA : ÇİZME YÖNTEMİ İLE EKİM YAPMA



İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Biyogüvenlik kabiniinde çalışınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı steril hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

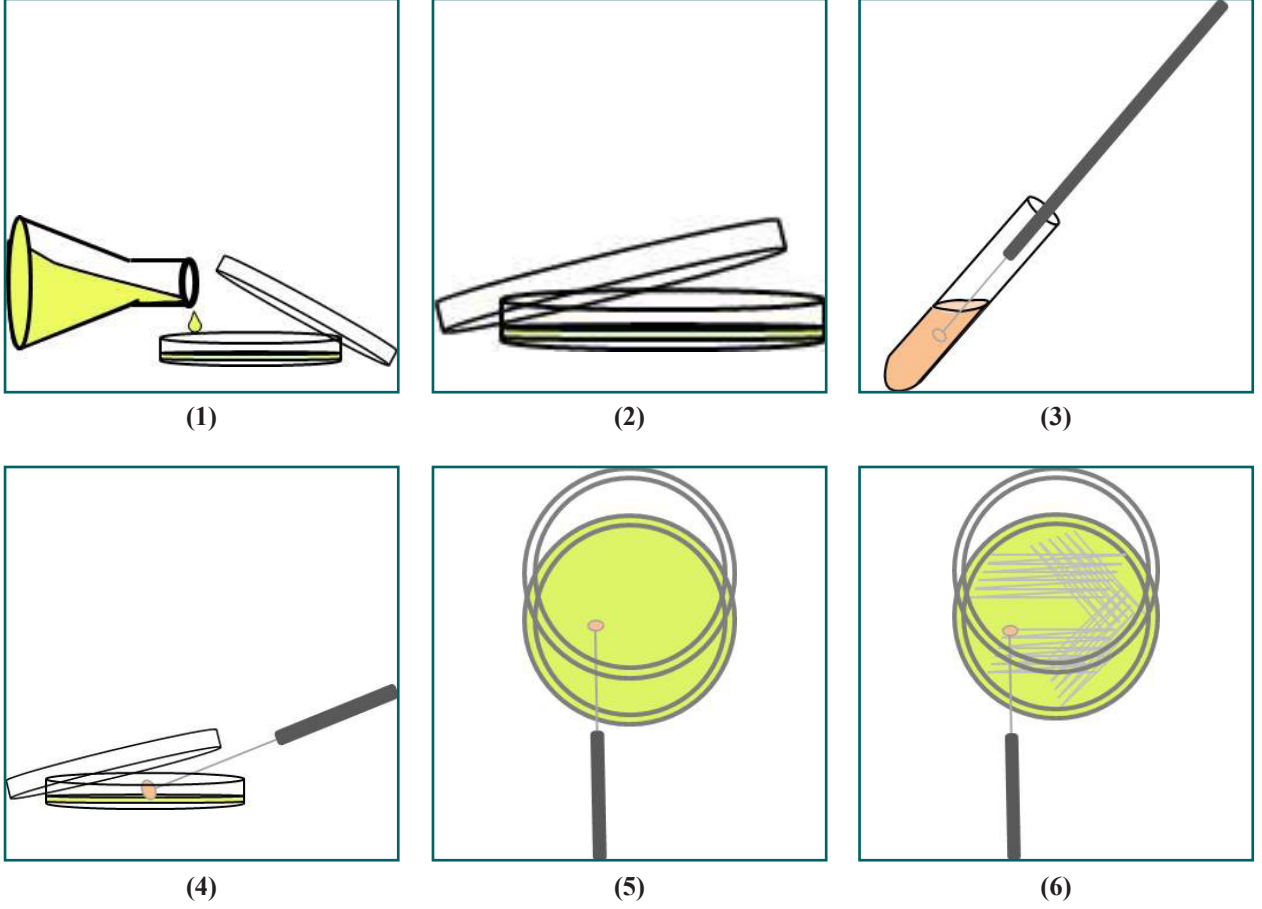
- ✓ Nutrient agar
- ✓ Özeler
- ✓ Bunsen beki
- ✓ Sıvı kültür
- ✓ Steril petri kapları

İşlem Basamakları

1. Katı besiyeri (agarlı) hazırlayınız ve besiyerinin soğuyarak katılaşmasını bekleyiniz.
2. İçerisinde katı besiyeri bulunan petri kutusunu özenin gireceği şekilde çok az açınız. (Petri kutusunu sol elin ayasına yerleştiriniz ve kapağı sağ elin baş ve işaret parmağı ile açınız.)
3. Ekimi yapılacak örneği, öze ile steril bir şekilde alınız.
4. Özeyi açılan aralıktan içeriye sokarak agar yüzeyinin bir bölgesine temas ettiriniz.
5. Bu bölgede öze ucundaki kültürü besiyeri üzerinde hafifçe ezerek bir miktar yayma işlemi gerçekleştiriniz.
6. Bu bölgeden başlayarak sürme işlemi gerçekleştiriniz. (Sürme işlemi konusunda anlatıldığı şekilde birkaç şekilde yapabilirsiniz. En ideal olan, 4 ayrı bölgenin çizilmesidir.)
7. Ekim işleminde çizme yapıyorsanız iğne uçlu öze, sürme yapıyorsanız yuvarlak uçlu öze kullanmanın daha uygun olduğunu unutmamaya dikkat ediniz.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 6.13: Katı besiyerine çizme ekim işlemi uygulama şeması

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği özeleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözültisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

**3. UYGULAMA : DÖKME PLAK YÖNTEMİ İLE EKİM YAPMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Biyogüvenlik kabininde çalışınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı steril hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

5.3.2. Kullanılacak Madde ve Malzemeler

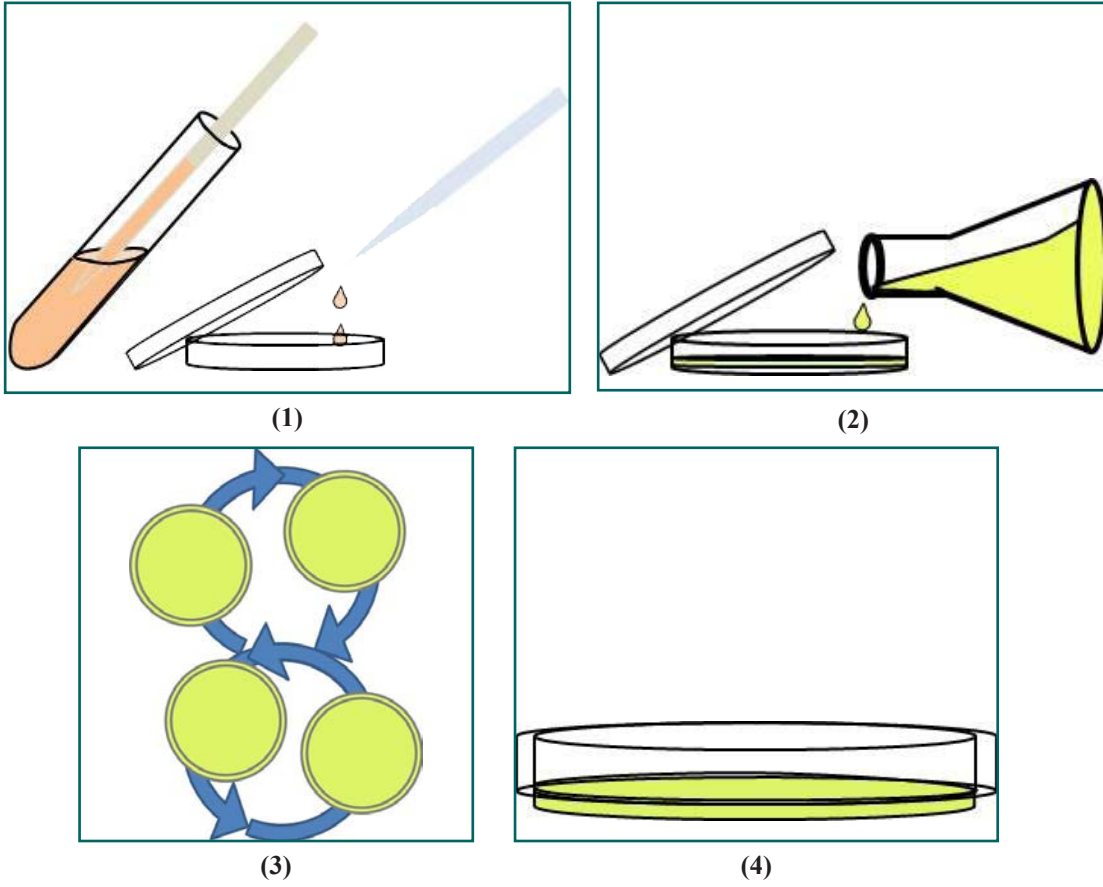
- ✓ Nutrient agar
- ✓ Sıvı kültür
- ✓ Özeler
- ✓ Steril petri kapları
- ✓ Bunsen beki

İşlem Basamakları

1. Steril bir pipetle sıvı kültürden veya sıvı örnekten 1 ml alınız ve steril boş bir petri kutusuna aktarınız.
2. Önceden 44-48 °C'ye ayarlanarak hazırlanmış su banyosunda tutulan uygun bir agarlı besiyerinden yaklaşık 15-20 ml kadarını, içine 1 ml örnek konulmuş olan petri kutusuna dökünüz (Besiyeri önceden katılaşmış ise kaynar su banyosunda veya mikrodalga fırında eritiniz. Daha sonra besiyerini 44-48 °C'ye soğutarak hazır hâle getiriniz.).
3. Petri kutusunu, bulunduğu düzlem üzerinde sekiz çizdirme hareketi ile veya üç defa saat yönünde, üç defa aksi yönde çevirerek kutunun homojen bir şekilde karışmasını sağlayınız.
4. Besiyerinin katılaşması için bir süre bekleyiniz.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 6.14: Dökme plak yöntemi ile ekim işlemi uygulama şeması

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C’de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskopun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.



4. UYGULAMA : YAYMA YÖNTEMİ İLE EKİM YAPMA



İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Biyogüvenlik kabiniinde çalışınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı steril hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmuyunuz.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

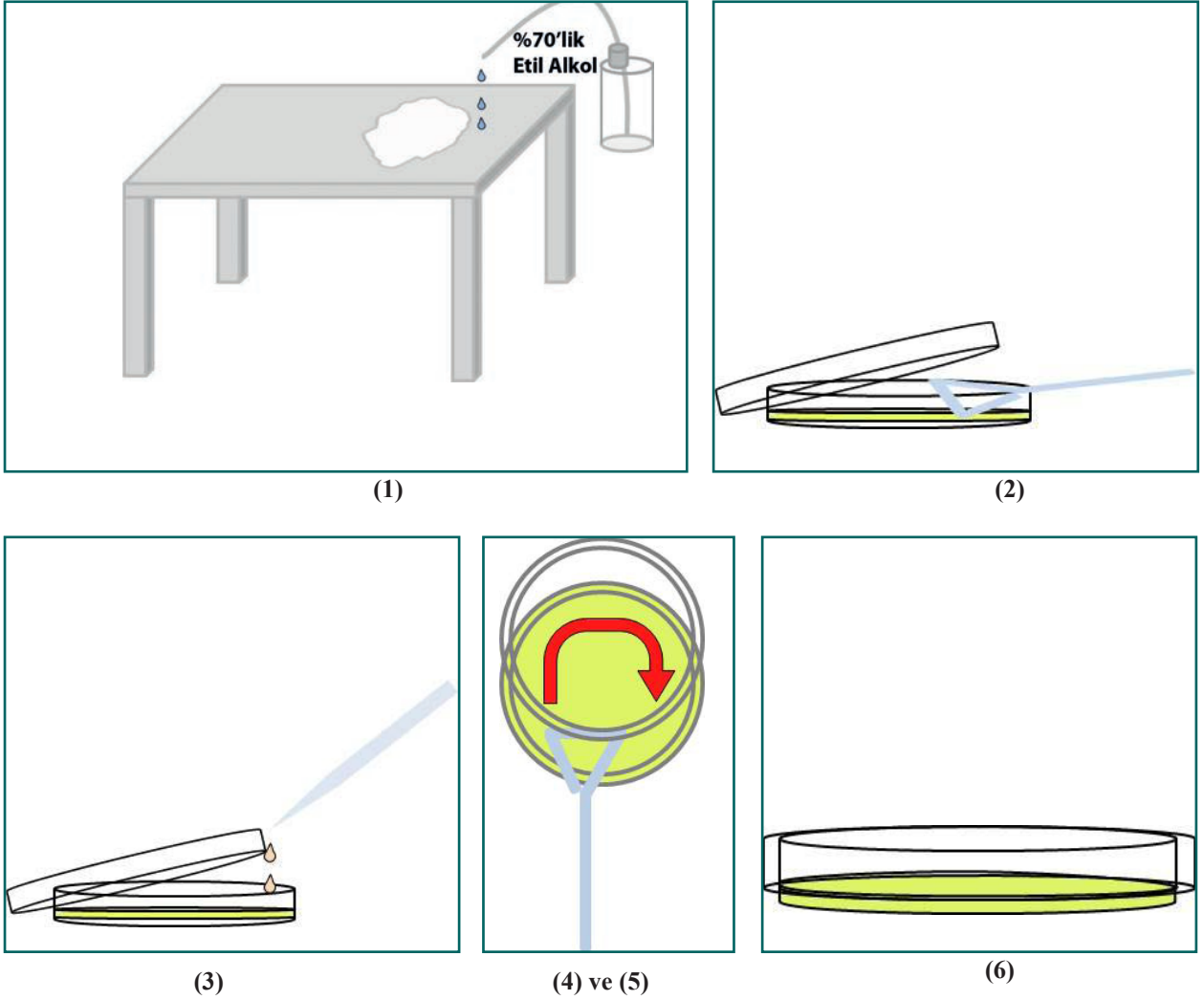
- | | | |
|-----------------|------------------------|---------------|
| ✓ Nutrient agar | ✓ Drigalski spatülü | ✓ Etil alkol |
| ✓ Sıvı kültür | ✓ Steril petri kapları | ✓ Bunsen beki |

İşlem Basamakları

1. Drigalski spatülünü, etil alkol çözeltisine daldırınız ve uç kısmını bunsen beki alevine değdirerek sterilize ediniz (Alev alan drigalski spatülünü alev çatısı altına indiriniz ve alevin sönmesini bekleyiniz.).
2. Katı besiyerini alınız ve ekim öncesinde drigalski spatülünü besiyerinin boş kısmına değdiriniz, spatülün soğumasını bekleyiniz (Katı besiyerinin yüzeyinin kuru olmasına dikkat ediniz.).
3. Petri kutusundaki katı besiyeri yüzeyinde bir nokta seçiniz ve pipetle 0,1 ml örnek aktarınız.
4. Aktarılan bu sıvı örneği, önceden steril edilmiş drigalski spatülüyle besiyeri yüzeyine yayınız (Yayma işlemi sırasında petri kutusunun alt kapağına sol elle hafifçe sallama hareketi yaptırınız ve döndürülürken drigalski spatülünü sağ ele alarak besiyeri üzerine sürtme hareketi yaptırınız.).
5. Yayma işlemini, pipetle örneğin aktarıldığı yere (başlangıç noktasına) gelene kadar sürdürünüz.
6. Petri kutusunu 15 dakika ters çevirmeden bekletiniz.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 6.15: Yayma plak yöntemi ile ekim işlemi uygulama şeması

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

**5. UYGULAMA : İNKÜBASYON İŞLEMİ****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Biyogüvenlik kabini içinde çalışınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı steril hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmuyunuz.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- ✓ 1, 2, 3 ve 4. uygulamada hazırlanan kültürler
- ✓ Su banyosu
- ✓ Etüv ya da inkübatör

İşlem Basamakları

- ✓ 1, 2, 3 ve 4. uygulamada hazırlanan ekimi yapılmış numunelerde üremesini istediğiniz mikroorganizmalar için uygun sıcaklık ve süreleri belirleyiniz.
- ✓ 1. uygulamada hazırlanan tüpteki kültürleri su banyosunda inkübe ediniz.
- ✓ 2, 3 ve 4. uygulamada hazırlanan petrilerdeki kültürleri inkübatör veya etüvde inkübe ediniz.
- ✓ Küfler için inkübasyon gerçekleştirilecekse işlemi, oda sıcaklığında gerçekleştiriniz.
- ✓ İnkübasyon sıcaklıklarını önceden ayarlayınız.
- ✓ Yeterli inkübasyon sağlanmamışsa bir süre daha işleme devam ediniz.

Deney Tüplerinin Su Banyosunda İnkübasyonu

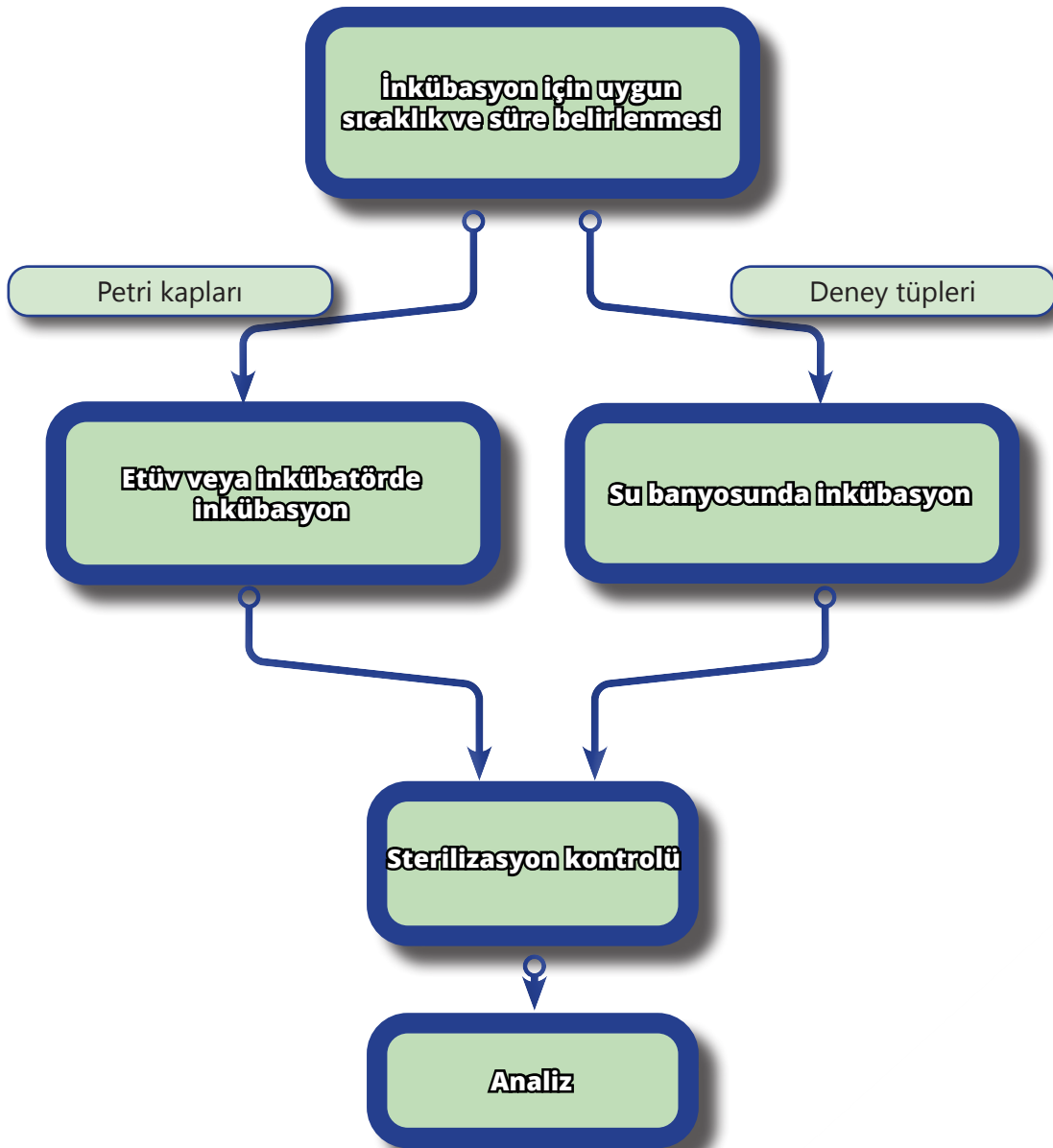
1. Su banyosunun sıcaklığını ve içerisindeki su miktarını düzenli olarak kontrol ediniz.
2. Tüpleri su banyosuna uygun bir tüplük içerisinde yerleştiriniz.
3. Belirlenen süre boyunca tüpleri su banyosunda tutunuz.
4. Süre sonunda tüpleri su banyosundan çıkararak üremeleri kontrol ediniz.



Petri Kaplarının Etüv veya İnkübatörde İnkübasyonu

1. Ekimi yapılmış petri kaplarını inkübatöre yerleştiriniz.
2. Petrileri üst üste koymamaya dikkat ediniz.
3. Eğer üst üste yerleşim yapılacaksa cam petrilerde 6'dan, plastik petrilerde 8'den fazla petri kabını üst üste koymamaya dikkat ediniz.
4. İnkübatör sıcaklığını kontrol ediniz.
5. Süre sonunda petri kaplarını çıkararak üremeleri kontrol ediniz.
6. Yeterli inkübasyon sağlanmamışsa bir süre daha işleme devam ediniz.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 6.16: Kültürlerin inkübasyon işlemi uygulama şeması

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE “D” YANLIŞ İSE “Y” YAZINIZ.

1. () Mikrobiyolojik analizlerde besiyerinde tek bir mikroorganizmanın üretimi gerçekleştiriliyorsa bunlara saf kültür denir.
2. () Katı örneklerde besiyerinin katılaştırılması için NaCl kullanılır.
3. () Drigalski spatülü, çizme plaka yönteminde kullanılan özel bir araçtır.
4. () Çift tabaka dökme yöntemi, anaerobik mikroorganizma gelişiminin istendiği durumlarda yapılan bir uygulamadır.
5. () İnokülasyon işlemi sırasında öze ucunun sterilizasyonu, bunsen bekiyle alev uygulaması yapılarak sağlanır.
6. () Alev çatısı altında ekim yapmak, mikrobiyolojik analizlerde uygulanan sterilizasyon işlemlerinden biridir.
7. () İnkübasyon işlemi, ekim yöntemlerinde ilk aşamadır.
8. () Çizerek ekim işleminde iğne uçlu öze kullanılır.
9. () Petri kapları, etüve genellikle ters şekilde yerleştirilir.
10. () Yayma plaka yönteminde sıvı besiyeri, kültür üzerine 44-48 °C’de dökülür.

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

11. Mikroorganizmaların buldukları ortamdan steril tekniklerle alınarak uygun besiyerine aktarılması ve burada geliştirilmesi işlemine denir.
12. Etüve üzeri sıcaklıklarda nem kaybının önlenmesi için gerekli önlemler alınmalıdır.
13. Yayma plaka tekniğinde, ekim işlemi tamamlandıktan sonra süresince bekletilerek petri kabı ters çevrilir.
14. Katı ekim tekniklerinde besiyeri içerisinde gibi katılaştırıcı bir ajan bulunması gerekir.
15. Petri kapları inkübatör içerisine sıra hâlinde yerleştirilmelidir.





AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

16. Aşağıdakilerden hangisi ekim yapılan petri kabı üzerine yazılan bilgilerden biri değildir?
- A) İnkübasyon sıcaklığı
 - B) Tarih ve saat
 - C) Dilüsyon oranı
 - D) Besiyeri adı
 - E) İnkübasyon amacı
17. Çizme yöntemiyle ekim yapılırken aşağıdakilerden hangisi kullanılır?
- A) Deney tüpü
 - B) Erlen
 - C) Öze
 - D) Pipet
 - E) Vorteks
18. Aşağıdakilerden hangisi sıvı besiyerine ekim işleminde dikkat edilecek durumlardan biridir?
- A) Analizi yapılacak örneğin çözündürülmesi
 - B) Drigalski spatülünün steril edilmesi
 - C) Dört ayrı bölgeye sürme işlemi uygulanması
 - D) Besiyerinin iyice katılmış olması
 - E) Pipetlerin steril olması
19. Aşağıdakilerden hangisi inkübasyon için uygun ortam değildir?
- A) Etüv
 - B) Oda sıcaklığı
 - C) Su banyosu
 - D) İnkübatör
 - E) Derin dondurucu

7. ÖĞRENME BİRİMİ



KÜLTÜREL SAYIM YÖNTEMLERİ



Bu öğrenme biriminde;

- Kültürel sayımın amacını,
- Dökme plak yöntemiyle kültürel sayımı,
- Koloni sayımını ve koloni sayıcının kullanımını,
- En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemini,
- Gıdalarda EMS analizi yapma ve analiz sonucunu değerlendirme işlemi öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 7.1. Kültürel Sayım ve Koloni Sayımı
- 7.2. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi

TEMEL KAVRAMLAR

Dökme plak thoma howard lam pozitif negatif koloni sayıcı



7. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Kültürel sayım size ne çağrıştırıyor?
2. Mikroskopik sayım yöntemini araştırınız ve notlarınızı arkadaşlarınızın notlarıyla karşılaştırınız.
3. EMS yöntemi ile incelenen örnekte hangi canlı mikroorganizmaların sayımı yapılır?



7.1. KÜLTÜREL SAYIM VE KOLONİ SAYIMI

Gıdalarda bulunan belirli bir mikroorganizma türünün veya grubunun miktarının belirlenmesi amacıyla mikrobiyolojik sayım yöntemleri kullanılır. Mikrobiyolojik sayımlar; kültürel, doğrudan ve dolaylı yöntemler olarak üç ana grupta toplanabilir (Görsel 7.1). Bu sayım yöntemlerinden en sık kullanılanı kültürel sayım yöntemleridir.



Görsel 7.1: Mikrobiyolojik sayım yöntemleri

Kültürel sayım yöntemlerinde sadece canlı hücreler sayılır, ölü hücreler sayıma dâhil olmaz. Kültürel sayım yöntemleri ile amaca göre farklı besiyeri ve inkübasyon koşulları kullanılarak farklı mikroorganizma grupları sayılır. Mikroskopik (direkt) sayım yöntemlerinde örnek, doğrudan mikroskop altında incelenerek toplam mikroorganizma sayımı yapılır.

Dolaylı (indirekt) sayım metodunda mikroorganizma sayılarının belirli hüresel nitelikleri, biyolojik canlılık ve mikroorganizmaların besiyerlerinde meydana getirdikleri değişimler dolaylı olarak tespit edilir. Dolaylı sayım yöntemleri çok çeşitlidir. Bunların birçoğunda kısa sürede sonuçlar alınabilmektedir. Bu yöntemler; duyarlılıklarının düşük olması, maliyetin yüksekliği ve belirli düzeyde gerece ihtiyaç duyulması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu sayım metodunda hücreler üremeleri sırasında bulanıklığa ve gaz oluşumuna neden olur. Bu da sayımı zorlaştırdığı için mikroorganizma sayılarının tahmin edilmesi gereken durumlar meydana getirir. Bu tahmin etme yöntemi ile yapılan sayıma EMS metodu örnek olarak verilebilir.



7.1.1. Kültürel Sayımın Amacı ve Yöntemleri

Kültürel sayımın amacı; her türlü gıda maddesindeki ve gıdanın bulunduğu hava, toprak ve su içerisindeki mikroorganizma sayısını belirlemektir.

Kültürel sayım yöntemleri, biyolojik canlıların koloni meydana getirmesi ve bu kolonilerin “Her biyolojik canlı bir koloni meydana getirir.” prensibi ile gıdadaki canlı hücre sayısının hesaplanması esasına dayanır. Bu yöntemde sayım yapılacak örnekten belirli bir miktar alınır ve besiyerine ekim yapılır. Belirlenen inkübasyon süresi sonunda petri kaplarındaki koloniler sayılarak gıda maddesindeki veya analizi yapılan malzemedeki canlı hücre sayısı hesaplanır. Bu metotta ölü hücreler sayılmadığı için sadece canlı hücreler sayılmış olur. Sonuçlar da sadece koloni oluşturabilenlerin sayıldığını belirtmek için **koloni oluşturan birim** kob (colony forming unit; cfu) olarak verilir. Sayım raporunda; incelenen numunenin sıvı, katı veya yüzey olmasına göre kob/ml, kob/g veya kob/cm² şeklinde yazılır.

Mikroskobik sayım yöntemleri; kültürel sayım yöntemleri ile kıyaslandığında sayımın sadece dakika ile ifade edilen sürelerde tamamlanması ve sadece boya, lam, lamel kullanılarak çok ucuza mal edilmesi gibi iki büyük avantaja sahiptir. Bu yöntemin; ölü ve canlı hücrelerin beraberce sayılması gibi kayda değer bir dezavantajı da vardır. Bununla beraber canlı ve ölü hücrelerin beraber sayılması özellikle gıda endüstrisinde ham maddenin mikrobiyal kalitesi hakkında yeterli bilgi vermektedir.

İncelenen örneğin mikrobiyolojik kalitesine ve yapılan sayım sonuçlarının mevcut yönetmelik, tüzük ve standart ile izin verilen sınırlarda olup olmadığına bakılarak karar verilir. Güvenilir gıda tespit etmede kullanılan en kolay yöntem kültürel sayımdır. Kültürel sayım yapabilmek için sıra ile aşağıdaki işlemler yapılır.

- Sayımı yapılacak numune, ekime hazırlanır.
- Numuneye uygun seri dilüsyonlar hazırlanır.
- Uygun agarlı besiyerine ekimi yapılmış petri kapları belirlenen süre kadar inkübasyona bırakılır.
- Bu süre sonunda oluşan koloniler sayılır.
- Dilüsyon faktörü ile sayılan toplam koloni çarpılarak numunedeki canlı hücre tespit edilir.
- Sayım raporu incelenen numunenin özelliğine göre kob/ml, kob/g veya kob/cm² şeklinde yazılır.
- Her besiyeri ve inkübasyon süresi tüm mikroorganizmaların gelişmesi için istenen ortamı oluşturmaz. Genellikle toplam bakteri sayısı, toplam canlı sayısını gösterir. Analiz adları; inkübasyon derece ve sürelerine göre psikrofilik, mezofilik ve termofilik bakteri sayımı olarak ifade edilir.

Yapılacak analizde herhangi bir mikroorganizma çeşidi aranacaksa seçici (selektif) besiyerleri kullanılır. Seçici besiyerleri ile sayım yapılırken sayımı yapılmak istenen mikroorganizma grubunun çoğalmasına uygun fakat diğer mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyen inhibitör kullanılır. Plate Count Agar (PCA) besiyeri toplam bakteri sayımlarında, Violet Red Bile Agar (VRBA) besiyeri ise dökme plak yöntemi ile koliform bakteri sayımında kullanılır.

Dökme Plak Yöntemiyle Kültürel Sayım

Maya, küfler ve bakteri ile bunların sporlarının sayımı dökme plak yöntemi ile yapılır. Bu yöntemde yapılan kültürün aerobik koşullarda inkübasyonu yapılıyorsa canlı aerobik mikroorganizma sayısından; anaerobik koşullarda inkübasyonu yapılıyorsa canlı anaerobik mikroorganizma sayısından bahsediliyor demektir. Yapılan analiz, numunedeki sporları veya canlı mikroorganizmaları saymayı amaçlar.

Hazırlanan örnekten veya seyretilmiş örneklerden birer ml alınır ve steril petri kaplarına eklenir. Petri kaplarının üzerine, hazırlanan agarlı besiyerlerinden on beşer ml eklenir ve karıştırılır. Katılaştıran besiyerleri, belirlenen süre kadar inkübatörde inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda oluşan koloniler sayılarak canlı mikroorganizma sayısı tespit edilmiş olur. Bu işlemler yapılırken besiyeri, numune bulunan petri kabına çok sıcak eklenmemelidir. Sayımı yapılacak mikroorganizmalara zarar verilebilir. Bu nedenle besiyeri ekleme sıcaklığına dikkat edilmelidir. Ayrıca petri kabına besiyerini ekleme sırasında agarlı besiyerinin 45 °C'nin altında katılaştığı unutulmamalıdır.

Petri kaplarındaki besiyeri ve kültürün homojen şekilde karışması için kaplar düz bir zemin üzerinde üç kez sekiz rakamı çizecek şekilde hareket ettirilir. 45-50 °C'de dökülen besiyeri hızlı bir şekilde donacağı için homojenizasyon işlemi seri bir şekilde yapılmalıdır.



Bu metodun dezavantajları şunlardır:

- Petri kabına eklenen besiyerinin sıcak olması mikroorganizmaya zarar verebilir.
- Petri kaplarındaki besiyerinin donmasını önlemek için 50 °C'deki su banyosunda bekletilerek yapılan ekimler sırasında besiyerleri sıcaktan dolayı zarar görebilir.
- Yaşanabilecek ekim yanlışlıklarında yedek besiyeri kullanımı sıkıntıya sebep olabilir.
- Ekimi yapılan mikroorganizmaların petri kaplarının tabanına veya besiyeri yüzeyine yakın olmaları oksijen farklılıklarına sebep olur. Bu da farklı düzeyde mikroorganizma gelişimine sebep olabilir.

Örnekten 1 ml ekim yapıldığı için yayma yöntemine göre 10 kat daha az mikroorganizma içeren örneklerde sayım yapılması yöntemin avantajıdır.

Çift Tabakalı Dökme Plak Yöntemiyle Kültürel Sayım

Çift tabakalı dökme plak yöntemiyle kültürel sayım metodunda besiyeri bulunan petri kabına ekimi yapılır. Ekimi yapılan katmanın üstüne, 45-50 °C'ye soğutulan steril agarlı besiyerinden 5 ml, ikinci bir besiyeri katmanı olarak plağın bütün yüzeyini örtecek biçimde eklenir ve anaerob ortam oluşturulur.

Bazı analizlerde aranacak mikroorganizma grubuna göre ikinci tabaka besiyeri olarak farklı besiyeri çeşidi kullanılabilir. Ancak genellikle ikinci kat olarak aynı besiyeri kullanılır. Buna örnek olarak her iki katta da Violet Red Bile Agar'ın (VRBA) kullanıldığı çift tabakalı dökme plak yöntemiyle koliform grubu bakterilerin aranması verilebilir. Bu analizde dikkat edilmesi gereken ikinci tabaka besiyerinin 5 ml olarak eklenmesi ve bunun tüm petri yüzeyini örtmesidir. Bu şekilde ekim yapılan birinci kat besiyerinin üstü, ikinci kat besiyeri ile kaplanarak anaerob koşullar oluşturulur ve fakültatif anaerob mikroorganizmaların gelişmesi sağlanır.

Dökme yönteminde birinci tabaka olan agarlı besiyeri tam olarak donduktan sonra ikinci besiyeri katmanı eklenir ve bu katman tam katlaştıktan sonra inkübasyona alınır. Yüze yayma yönteminde ise hazırlanan numune besiyerine eklendikten sonra besiyerinin numuneyi yeteri kadar emmesi için yaklaşık 10 dakika bekletilir. Numune besiyeri tarafından emildikten sonra su banyosunda 45- 50 °C'de bekletilen besiyerinden 5 ml kadarı ikinci kat olarak eklenir ve inkübasyona bırakılır. Hem yüze yayma hem de dökme plak yöntemlerinde çift tabakalı dökme plak yöntemi kullanılır.

Yüze Yayma Yöntemiyle Kültürel Sayım

Yayma yönteminde önceden hazırlanmış belirli seviyede yüzeyi kurumuş besiyeri üzerine 0,1 ml örnek veya seyreltilmiş örnek eklenerek drigalski spatülüyle tüm yüzeye Görsel 7.2'deki gibi yayılır. Daha sonra inkübatörde uygun sıcaklıkta ve sürede inkübasyona bırakılır. Bu işlem sonrasında oluşan koloniler sayılır. Bu yöntemde önceden petri kutularına dökülüp katlaştırılmış şekilde saklanmış besiyeri setlerinin kullanılması, analizlerin kolay ve seri bir şekilde yapılmasını sağlar.



Görsel 7.2: Yüze yayma yöntemleri

Yayma yöntemiyle yapılan analiz sırasında kullanılan drigalski spatülü steril olmalıdır. Bu nedenle kullanılan drigalski spatülü tek kullanımlık olmalı ve tek kullanımlık ise paketinin yırtılmamış olmasına önem verilmelidir. Eğer tek kullanımlık olmayan metal veya plastik drigalski spatülü kullanılacaksa statül kullanılmadan önce alkol çözeltisiyle (%70 v/v) sterilize edilmelidir. Kullanılan alkol çözeltisi düzenli olarak yenilenmelidir. Bu işlem sırasında drigalski spatülü 5-10 dakikadan az olacak şekilde alkol ile temas ettirilmelidir. Analiz sırasında önceden hazırlanmış yeterli miktarda spatül hazır bulundurulmalıdır. Alkolden çıkarılan spatül, beki alevinden geçirilmeli ve spatül üzerindeki alkol hızlı bir şekilde uzaklaştırılmalıdır. Bu işlemin amacı, sterilizasyon değil alkolü uzaklaştırmaktır.

Yayma yönteminde numuneden 0,1 ml eklenmesinin nedeni,



besiyerinin daha fazla hacmi emmemesi değil yapılacak hesaplama işlemlerini kolaylaştırmaktır. Numune 0,1 ml eklendiği için oluşan koloni sayısı 10 ile çarpılarak seyreltme dilüsyonunun 1 ml'sindeki koloni sayısı kolayca bulunur. Bulunan sayı ile seyreltme faktörü çarpılarak orijinal numunedeki sayı bulunur. Lüzum görüldüğü zamanlarda 0,25-0,5 ml'lik numune ve dilüsyon serilerinden de ekimler yapılabilir.

Yüze yayma yönteminin dökme plak yöntemine göre avantajları şunlardır:

- Her şeyden önce yüze yayma metodunun uygulanışı dökme plak yöntemine göre hızlı ve basittir.
- Örnekteki mikroorganizma sayısı fazla ise bu yöntemi kullanmak dökme yöntemini kullanmaya göre daha kolaydır. Bu nedenle yayma yöntemini kullanmak laboratuvar çalışanlarına fayda sağlar.

Yüze yayma yönteminin dökme plak yöntemine göre dezavantajları şunlardır:

- Dökme plak metodunda sıcaklığa hassas mikroorganizmalar çalışırken besiyeri sıcaklığı zorunlu aerobik mikroorganizmalar agar için gelişme olanağı vermez bu da analiz hataları oluşmasına neden olur.
- Yayma metodunda kullanılan drigalski özesine bir miktar mikroorganizma bulaşması nedeniyle düşük sayım sonuçları elde edilebilir.
- Yüze yayma metodunda zorunlu aerobik bazı bakteriler agar yüzeyinde çok çabuk gelişir ve yanındaki bakteri kolonilerine karışabilir. Bu da sayımları zorlaştıracığından hatalı sonuçlara neden olur.

7.1.2. Koloni Sayımı ve Koloni Sayıcısının Kullanımı

İnkübatörde yapılan inkübasyon sonunda petri kutularında oluşan koloni sayımı seri bir şekilde yapılır. İnkübasyon süresi bittikten sonra sayım yapılamayacaksa petri kutuları +4 °C' de en fazla 24 saat saklanmalı, sonrasında hızlı bir şekilde sayım işlemi yapılmalıdır. İnkübasyon sonucunda 30 ile 300 arasında koloni oluşan petri kablarında sayım işlemi yapılır. Oluşan bu koloniler bir tek mikroorganizmadan oluşmuştur. Aynı dilüsyon serisinden ekim yapılan 2-3 plakta sayım yapılır ve bunların ortalaması alınır.

Petri plaklarında gelişmiş bütün koloniler sayılır. Bulunan ortalama canlı sayısı, kullanılan dilüsyonun 1cm³'ündeki canlı hücre sayısını verir.

Koloni sayıcısı; büyüteci olan, alttan aydınlatmalı, karelere bölünmüş tablası bulunan laboratuvarlarda kullanılan bir donanımdır (Görsel 7.3). Koloni sayıcı aşağıdaki yönergelere uyularak kullanılır:

- Sayımı yapılacak petri kutusu karelere bölünmüş tablaya koyulur.
- Koloni sayıcısının tablaya ışık veren lambası açılır.
- İncelenecek tüm koloniler büyüteç yardımıyla sayılır.
- Sayılan koloni adetleri analiz defterine veya bir kâğıda yazılır.



Görsel 7.3: Koloni sayıcı



Koloni sayıcısındaki işaretli kareler toplam kareler, alanının 1/5'ine eşittir. Bu nedenle işaretli karelerde sayılan koloni adedi 5 ile çarpılır.

Örnek: Bir mikrobiyolojik analiz sonunda koloni sayıcıda yapılan sayımda toplam işaretli karelerdeki bakteri sayısı 60 bulunmuştur. Toplam sayılan koloni adedini bulunuz.

Koloni sayıcıda sayılan bakteri adedi 5 ile çarpılır.

$60 \times 5 = 300$ adet koloni bulunur.

Bir petri kutusunun ve koloni sayıcısının panosunun daire çapı 9 cm'dir. Alanı ise 64 cm²'dir. Bu durumda koloni sayıcısı pano alanında 64 kare vardır.

Koloni sayımı sırasında aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir.

- Koloni sayımı yapılırken laboratuvarında bulunan koloni sayıcısının aydınlatma düğmesi çalışmazsa veya koloni sayıcı yoksa petri kaplarının alt yüzü cama yazar kalem ile 4 veya 8 eşit kısma ayrıldıktan sonra oluşan koloniler sayılır. Bulunan sayılar 4 veya 8 ile çarpılarak toplam koloni sayısı bulunur.
- Petri kaplarında 10'dan az ve 350'den fazla sayıda koloni üreyen petri kapları hesaba katılmamalıdır.
- Aynı dilüsyon serisinden paralel olarak ekim yapılan petri kaplarındaki mikrop kolonileri, her dilüsyon için birbirine yakın sayıda olmalı ve birbirinin iki katını aşmamalıdır.
- Petri kaplarına ekim yapılmadan önce dilüsyon serileri homojenize edilmelidir.
- Koloni sayımına katılan 3 ayrı dilüsyona ait petri kutularında birbirlerinden çok farklı adetler sayıldığında o petri kutuları hesaba katılmaz. Bu gibi durumlarda ekimde veya sayımda hata ihtimali olduğu için işlem tekrar edilmelidir.
- Orijinalindeki ortalama mikrop sayısı, son üç dilüsyondan üçer petri kutusuna yapılan ekimlerde üreyen koloniler sayılarak ve her dilüsyon için ortalama alınarak bulunur.

Koloni Sayısını Hesaplama

Katı besiyerinde yapılan sayım sonuçlarının bulunmasında koloni oluşturan birim dikkate alınır. Koloni sayısı hesaplandıktan sonra sonuç, katı gıdalarda kob/g (Örnek: $2,5 \times 10^2$ veya 250 kob/g), sıvı gıdalarda ise kob/ml (Örnek: $5,8 \times 10^1$ veya 58 kob/ml) olarak verilir. Gıdalarda aranan mikroorganizma sayıları aşağıda verilen örneklerdeki gibi iki şekilde hesaplanabilir.

1 ml numuneden ekim yapıldıysa formül şu şekildedir:

$\text{kob/g (ml)} = \text{İki paralel plağın ortalaması} \times \text{Dilüsyon faktörü}$

0,1-0,25 ml vb. numuneden ekim yapıldıysa formül,

$\text{Sayı/ml} = (\text{Koloni sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü}) / \text{Dilüsyon tüpünden petri kutusuna aktarılan hacim (ml)}$ olur.

Örnek 1: Sıvı bir gıda örneğinde aerobik bakteri sayısı belirlenmek isteniyor. $10^{-1}, 10^{-5}$ dilüsyonlarında koloni sayısı >300 olarak bulunuyor ve aşağıdaki tablo hazırlanıyor (Tablo 7.1).

Tablo 7.1: Sıvı Gıda Örneğinde Toplam ve Ortalama Koloni Sayıları

Dilüsyon	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Birinci Paralel	300	220	36	16
İkinci Paralel	240	206	48	20
Toplam	540	426	84	36
Ortalama	270	213	60	18

Yukarıdaki tabloya göre koloni sayısı yaklaşık 30-300 arasında olan bütün dilüsyonların ortalaması alınarak hesaplamalar yapılır.



$$kob / g(ml) = \frac{(10^{-2} \text{ dilüsyon serisinin iki paralel plağın ortalaması} \times \text{Dilüsyon faktörü}) + (10^{-3} \text{ dilüsyon serisinin iki paralel plağın ortalaması} \times \text{Dilüsyon faktörü}) + (10^{-4} \text{ dilüsyon serisinin iki paralel plağın ortalaması} \times \text{Dilüsyon faktörü})}{3}$$

$$kob / g(ml) = [(270 \times 10^2) + (213 \times 10^3) + (60 \times 10^4)] / 3$$

$$kob / g(ml) = [(270 \times 10^2) + (2.130 \times 10^2) + (6.000 \times 10^2)] / 3$$

$$kob / g(ml) = 8.400 \times 10^2 / 3$$

$$kob / g(ml) = 2.800 \times 10^2 \text{ kob/g(ml)} = 280.000 \text{ kob/g(ml)}$$

Örnek 2: Koloni sayıcısıyla işaretli karelerde 40 adet koloni sayılmıştır. Dilüsyon faktörü ise 10^{-2} dir. Buna göre gıdada aranan mikroorganizma sayısı:

$$kob / g(ml) = \text{Koloni sayıcısında işaretli karelerdeki sayım sonucu} \times 5 \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

$$kob / g(ml) = 40 \times 5 \times 10^2$$

$$kob / g(ml) = 20.000$$

(Not: Dilüsyon faktörü = 1/ dilüsyon oranıdır. Örneğin $1/10^{-5} = 10^5$ gibi)

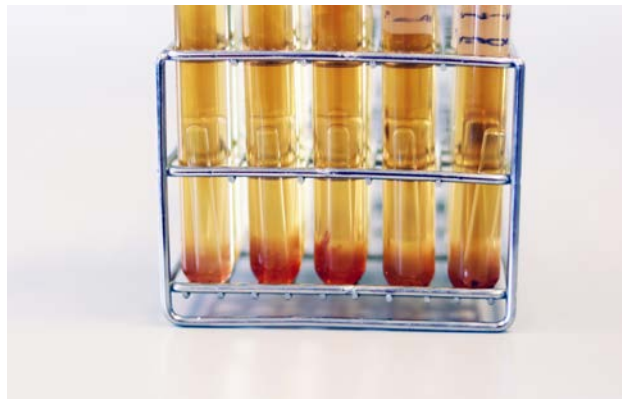
7.2. EN MUHTEMEL SAYI (EMS) YÖNTEMİ

Yönteme En Muhtemel Sayı [Most Probable Number (MPN)] isminin verilmesinin sebebi, numunedeki mikroorganizma sayısının istatistiki şekilde elde edilmiş tablolarla kıyaslanarak hesaplanmasıdır. Tüp dilüsyon yönteminin değişime uğramış hâline EMS Yöntemi denir. Bu yöntem istatistiksel olarak hazırlanmış EMS tablolarına dayalı bir metottur. Yöntem, çoklu tüp veya kuvvetle muhtemel sayı yöntemi olarak da adlandırılır.

EMS yönteminde ardışık olarak hazırlanan 3 seyreltik sıvı besiyerine ekim yapıldıktan sonra inkübatörde belirlenen sıcaklıkta ve sürede inkübasyon yapılır. İnkübasyon sonunda gaz oluşumları pozitif olarak kabul eden istatistiksel yöntemlerle elde edilmiş tablolardan faydalanılarak numunedeki koloni oluşturan birim sayısı hesaplanır.

7.2.1. Sularda En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi

Mikrobiyolojik su tahlillerinde En Muhtemel Sayı (EMS) yöntemi ile toplam koliform ve E. coli aranır ve sayılır. Bu analiz, uygun bir pipetle tüp besiyerlerine eklenen su örneğinin inkübasyonu sonunda görülen gaz oluşumu, renk değişikliği ve bulanıklık yönünden incelenmesine dayanır. Su numunesinden 3 ardışık dilüsyon serisi hazırlanır. Her dilüsyon serisine Görsel 7.4'teki gibi 3 veya 5 adet tüpe inoküle edilir ve inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda tüplerde gaz oluşumu ve bulanıklık gözlenirse E. coli varlığı kabul edilir. Bu analiz sonunda çoklu tüplerde görülen gaz oluşumu, renk değişikliği ve yoğunluk farkı sonucunda bakteri varlığı bakımından tahmini bir sayı da verir.



Görsel 7.4: Sularda EMS yöntemi



Çoklu tüplerdeki yaklaşık sayı değeri Tablo 7.2 kullanılarak elde edilir.

Örnek:

1. tüpte gaz var (+).
2. tüpte gaz yok (-).
3. tüpte gaz yok (-).

EMS Tablo 7.2'den kontrol edildiğinde 100 cc'deki koliform bakteri sayısı 23'tür.

Tablo 7.2: İçme ve Kullanma Sularında EMS Tablosu

1. Tüp (10 cc)	2. Tüp (1 cc)	3. Tüp (0,1 cc)	100 cc'deki Koliform Bakteri Sayısı
+	+	+	240'tan fazla
+	+	-	240
+	-	+	95
+	-	-	23
-	+	+	19
-	+	-	9
-	-	+	9
-	-	-	0

7.2.2. Gıdalarda En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi

Yöntemde, hazırlanan numuneden ardışık üç dilüsyon serisinin sıvı besiyerlerine ekim yapılır ve inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresince tüpler gözlemlenir, gaz oluşturan tüpler pozitif olarak kabul edilir. İstatistik yöntemlerle elde edilmiş tablolardan yararlanılarak örneğin mikroorganizma yükü bulunur. Bu yöntem canlı mikroorganizmalara yönelik kültürel sayım yöntemidir.

Tüm bakteri ve maya sayımlarında, uygun besiyeri kullanmak koşuluyla EMS yöntemi kullanılabilir. Küfler, sıvı besiyerlerinde rahat gelişemedikleri için EMS yöntemiyle sayılamaz. Nutrient broth besiyeri kullanılarak toplam mezofil aerob bakteri sayılabilir. Bu metot ile salmonella da sayılabilir.

İnkübasyonu takiben, her bir dilüsyondaki pozitif tüp sayısı (mikroorganizma üremesi veya gelişimi gözlenen tüp sayısı) belirlenir. Daha sonra mevcut EMS tablosunda bu pozitif tüp sayısına, karşılık gelen mikroorganizma sayısı bulunur. Bu sayı, çalışılan dilüsyonlar da dikkate alınarak sonuç olarak kaydedilir. Sonuçlar, kullanılan EMS tablosuna göre sayı/ml veya sayı/100 ml şeklinde verilebilir. Tablo 7.3'te 3'lü tüp yöntemine göre EMS tablosu (Güven ve Zorba, 2020) verilmiştir.

Örnek:

Birinci sırada	1. tüp = (+)	İkinci sırada	1. tüp = (+)	Üçüncü sırada	1. tüp = (-)
	2. tüp = (+)		2. tüp = (+)		2. tüp = (-)
	3. tüp = (+)		3. tüp = (-)		3. tüp = (-)

Birinci sıra toplamı = 3 pozitif

İkinci sıra toplamı = 2 pozitif

Üçüncü sıra toplamı = 0 pozitif

Bunlar kodlanırsa: $3 + 2 + 0 = 320$ kodunu oluşturur.

EMS tablosundan (Tablo 7.3) bakılırsa $320 = 9,5$ EMS/ml veya EMS/g olur.



Tablo 7.3: Üçlü Tüp Yöntemine Göre Ems Tablosu (Ems %95 Güven Aralığında)

Pozitif Tüpler			Mikroorganizma Sayısı EMS/ml	Kategori
1 ml	0,1 ml	0,01 ml		
0	0	0	0	-
0	0	1	0,3	3
0	1	0	0,3	2
0	1	1	0,6	4
0	2	0	0,6	4
1	0	0	0,4	1
1	0	1	0,7	3
1	0	2	1,1	4
1	1	0	0,7	2
1	1	1	1,1	4
1	2	0	1,1	3
1	2	1	1,5	4
1	3	0	1,6	4
2	0	0	0,9	1
2	0	1	1,4	3
2	0	2	2	4
2	1	0	1,5	2
2	1	1	2	4
2	1	2	3	4
2	2	0	2	3
2	2	1	3	4
2	2	2	3,5	4
2	2	3	4	4
2	3	0	3	4
2	3	1	3,5	4
2	3	2	4	4
3	0	0	2,5	1
3	0	1	4	2
3	0	2	6,5	4
3	1	0	4,5	1
3	1	1	7,5	2
3	1	2	11,5	3
3	1	3	16	4
3	2	0	9,5	1
3	2	1	15	2
3	2	2	20	3
3	2	3	30	4
3	3	0	25	1
3	3	1	45	1
3	3	2	110	1
3	3	3	>140	-

**1. UYGULAMA : KOLONİ SAYIMI İLE KÜLTÜREL SAYIM YAPMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

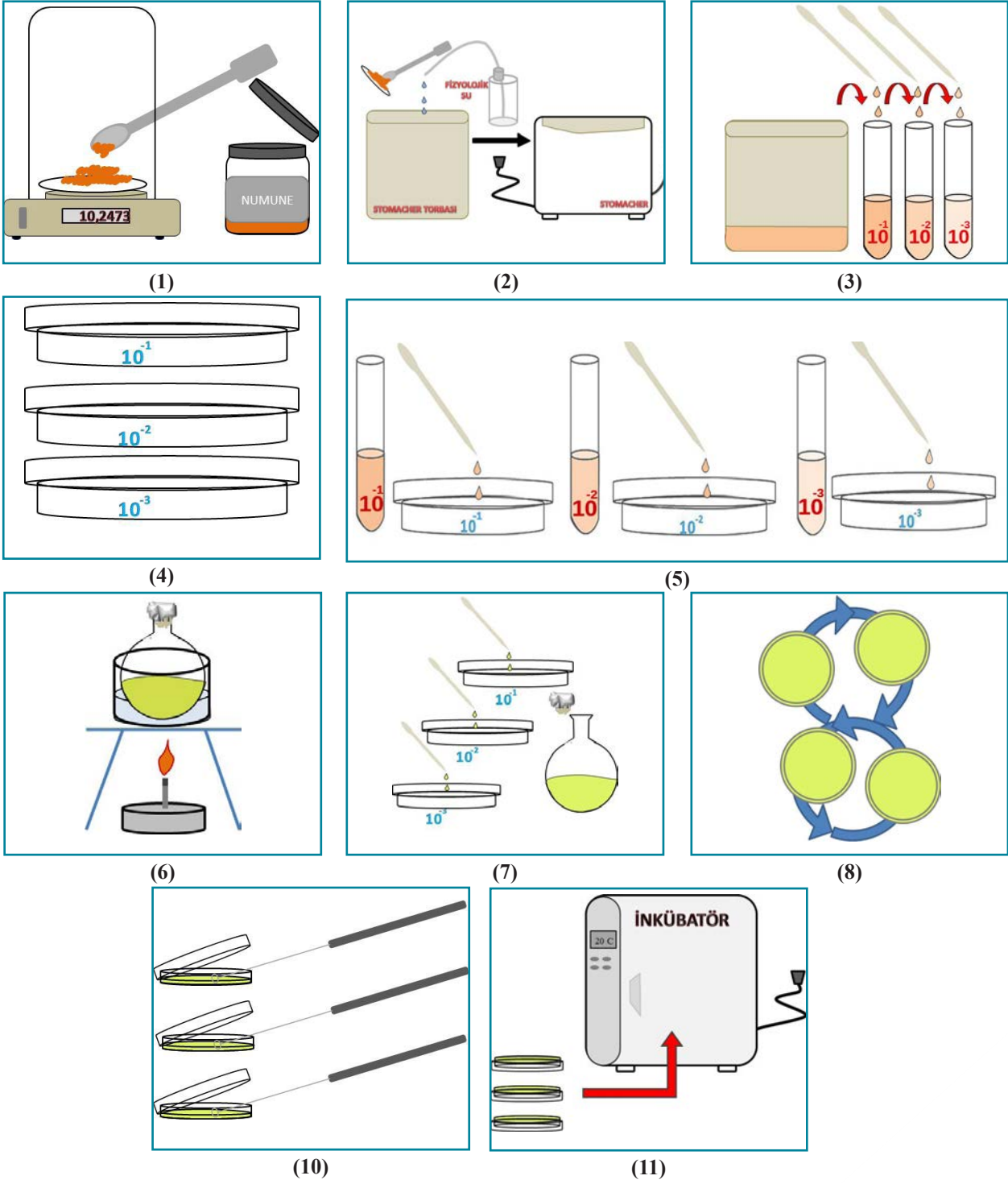
Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | | |
|-----------------|---------------------------|--------------|-------------------|
| ✓ Stomacher | ✓ Fizyolojik su | ✓ Etüv | ✓ Gıda örneği |
| ✓ Katı besiyeri | ✓ Deney tüpleri ve tüplük | ✓ Termometre | ✓ Koloni sayıcısı |
| ✓ İğne öze | ✓ Steril petri kutuları | ✓ Pipet | ✓ Su banyosu |

İşlem Basamakları

1. Sayımı yapılacak örneğin aseptik olarak tartımını yapınız.
2. Örneği fizyolojik suyla stomacherda homojen hâle getiriniz.
3. Sulandırılmış örnekten dilüsyon serileri hazırlayınız.
4. Seyreltim değerlerini, petri kutularına önceden yazınız.
5. Steril pipetlerle petrilere, her dilüsyondan 1 ml aktarınız.
6. Katı besiyerini sıcak su banyosunda eritip 45 °C'ye soğutunuz.
7. Her petriye 10-15 ml besiyeri dökünüz.
8. Agar katılaşmadan petrilere düz bir yüzey üzerinde üç kez sekiz hareketi yapınız ve örnek ile besiyerinin homojen karışmasını sağlayınız.
9. Kapağı kapatılan petri kutularını, besiyeri katılaşmaya kadar bekletiniz.
10. Uygun agarlı besiyerine ekim yapınız.
11. Ekim yapılmış petri kutularını ters çevirerek 20 °C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakınız.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 7.4: Koloni sayımı ile kültürel sayım uygulama aşamaları

Hesaplama

1. İnkübasyon bitiminde 30 ile 300 arasında koloni içeren seyreltimlerin petrilerini seçerek sayınız. Saydığınız petrileri hemen not ediniz.
2. Koloni sayısı yaklaşık 30-300 arasında olan bütün dilüsyonların ortalamasını alarak hesaplamayı yapınız.





Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C’de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

Sonuç ve Yorum

“Koloni Sayımı İle Kültürel Sayım Yapma” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Örneğin uygun dilüsyonlarını hazırladı.					
Agarlı besiyerine ekim yaptı.					
Uygun şekilde inkübasyon işlemini yaptı.					
Koloni sayıcısında ya da göz ile kolonilerin sayımını yaptı.					
Sayım sonucunun hesaplamasını yaptı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
	Form Puanı:			Gerçek Puanı:	

Değerlendirme: Form puanını 2 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.



2. UYGULAMA : SULARDA EN MUHTEMEL SAYI YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM YAPMA

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmuyunuz.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | | |
|-----------------|-------------------|----------------|----------------------|
| ✓ Deney tüpü | ✓ Durham tüpü | ✓ Tüplük | ✓ Erlen |
| ✓ Besiyerleri | ✓ Gıda örneği | ✓ Pipet | ✓ Etüv |
| ✓ Blender | ✓ Dilüsyon sıvısı | ✓ Mikser | ✓ Tartım kapları |
| ✓ Spatül | ✓ Stomacher | ✓ Saf su | ✓ Bek / steril kabin |
| ✓ Hassas terazi | ✓ Su banyosu | ✓ Petri kutusu | ✓ Cama yazar kalem |

İşlem Basamakları

Tahmin Deneyi

1. Üç adet deney tüpünün içerisine Durham tüpleri ve 10 ml steril LSTB besiyeri koyunuz.
2. Orijinal su örneğinden 10, 1 ve 0,1 ml olarak üç tüpe inokülasyon yapınız (Bu ekim yöntemi uygulandığında 10 ml su örneğinin inoküle edildiği tüplerdeki LSTB besiyerleri çift güçlü hazırlayınız.).
3. Sonra hafif çalkalayarak örneğin besiyerine karışmasını sağlayınız.
4. Çalkalama işleminden sonra tüpleri 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakınız.
5. İnkübasyon süresi sonunda pozitif gaz tüplerini belirleyiniz ve EMS tablosunu kullanarak suyun mililitresindeki olası toplam koliform sayısını hesaplayınız.

Doğrulama Deneyi

1. Gaz oluşmuş tüp sayısı kadar deney tüpü alınız ve içerisine Durham tüplü Brilliant Green Bile (%2) Broth besiyeri hazırlayınız.

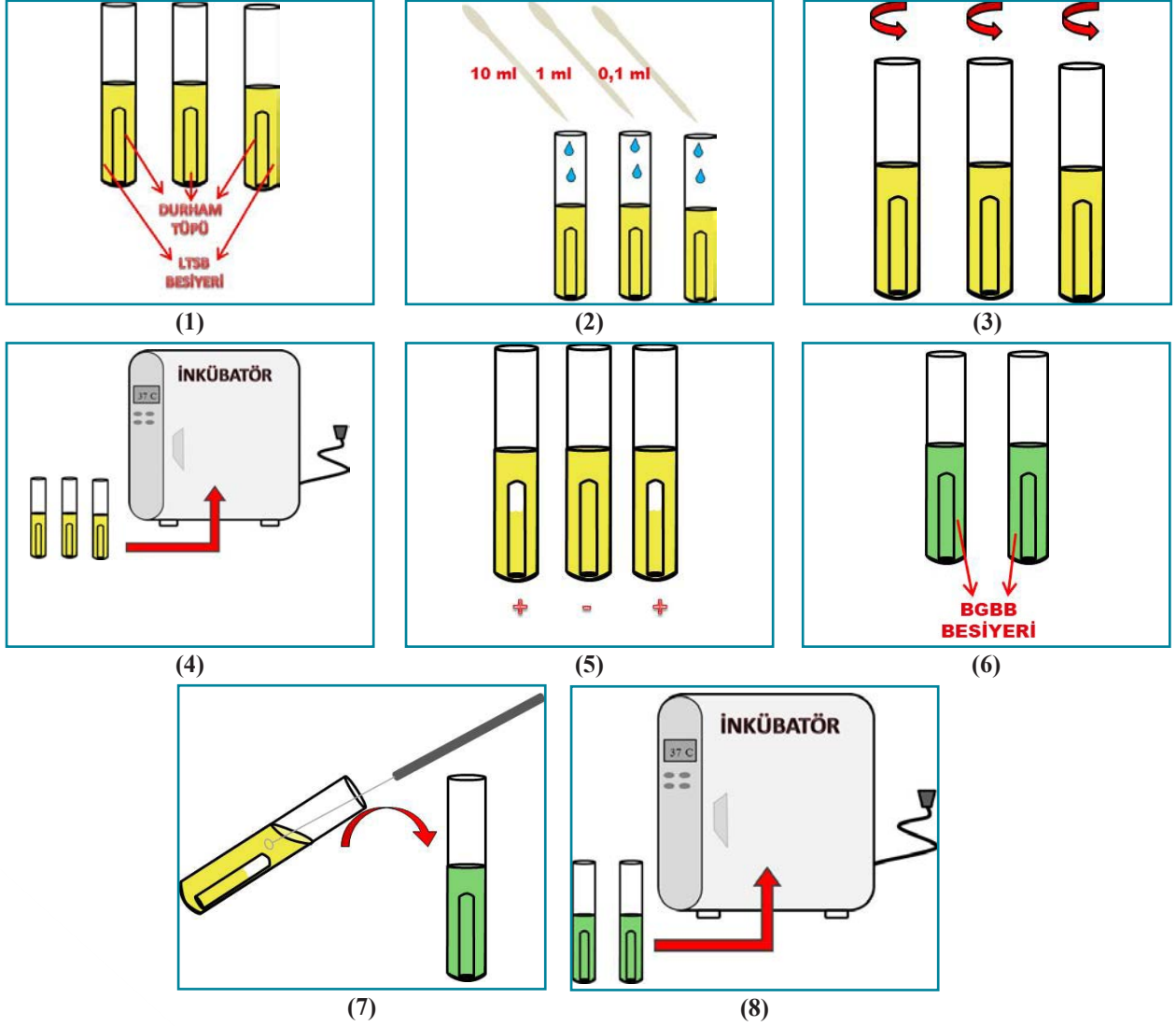


2. Gaz oluşmuş tüpleri hafifçe eğerek özenin içini bir zar gibi kaplayacak şekilde örnek alınız ve Durham tüplü Brilliant Gren Bile (%2) Broth besiyerine inokülasyon yapınız.
3. 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakınız.

Hesaplama

1. Süre sonunda içinde gaz oluşan pozitif tüpleri ayırınız.
2. EMS tablosunu kullanarak suyun mililitresindeki toplam koliform sayısını saptayınız.
3. EMS yönteminin uygulanmasının sonucunda çıkan değerleri, Tablo 7.2’den kontrol ediniz.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 7.5: Sularda EMS yöntemi ile kültürel sayımın uygulama aşamaları

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C’de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı



su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.

- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

Sonuç ve Yorum

“Sularda En Muhtemel Sayı Yöntemi ile Kültürel Sayım Yapma” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Analizde kullanılacak besiyerlerini hazırladı.					
Örnekten besiyerine ekim yaptı.					
Uygun şekilde inkübasyon işlemini yaptı.					
Pozitif ve negatif tüpleri belirledi.					
Sayım sonucunun hesaplamasını yaptı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:			Gerçek Puanı:		

Değerlendirme: Form puanını 2 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.



3. UYGULAMA : SULARDA EN MUHTEMEL SAYI YÖNTEMİ İLE KÜLTÜREL SAYIM YAPMA

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | | |
|-----------------|-------------------|----------------|----------------------|
| ✓ Deney tüpü | ✓ Durham tüpü | ✓ Tüplük | ✓ Erlen |
| ✓ Besiyerleri | ✓ Gıda örneği | ✓ Pipet | ✓ Etüv |
| ✓ Blender | ✓ Dilüsyon sıvısı | ✓ Mikser | ✓ Tartım kapları |
| ✓ Spatül | ✓ Stomacher | ✓ Saf su | ✓ Bek / steril kabin |
| ✓ Hassas terazi | ✓ Su banyosu | ✓ Petri kutusu | ✓ Cama yazar kalem |

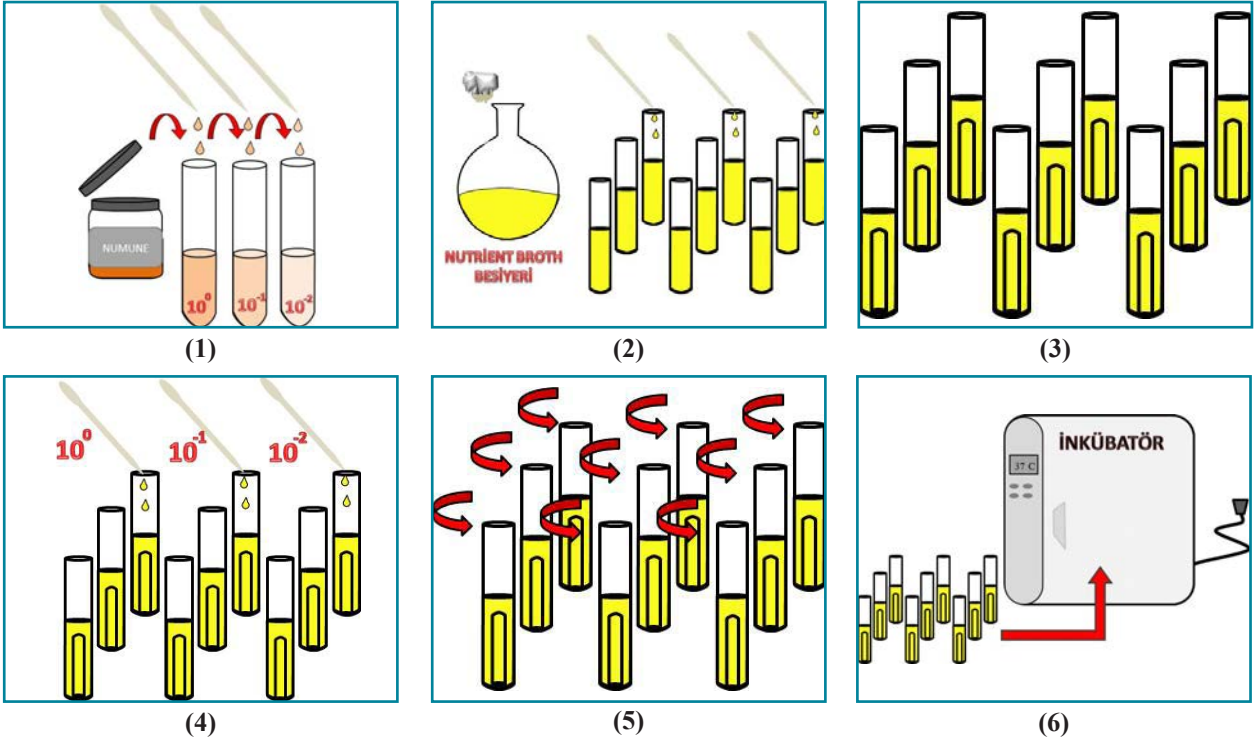
İşlem Basamakları

1. Gıda numunesinden 3 ardışık dilüsyon (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}) hazırlayınız.
2. Nutrient broth besiyeri hazırlayınız ve 9 adet deney tüpüne 10 ml koyunuz.
3. 9 adet deney tüpünü üçer sıralı şekilde tüplüğe diziniz ve içine Durham tüpü koyunuz.
4. Her dilüsyondan art arda sıralı 3 tüpe 1 ml aktarım yapınız.
5. Besiyeri ve numunenin karışması için tüpleri hafifçe çalkalayınız.
6. Çalkalama işlemi sonunda tüpleri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakınız.

Hesaplama

1. İnkübasyon sonunda Durham tüpleri içinde gaz oluşan veya bulanıklık görülen (pozitif) tüpleri ayırınız.
2. EMS tablosunu kullanarak gıdanın mililitresindeki mikroorganizma sayısını saptayınız.
3. EMS yönteminin uygulanmasının sonucunda çıkan değerleri, Tablo 7.3'ten kontrol ediniz.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 7.6: Gıdalarda EMS yöntemi ile kültürel sayımın uygulama aşamaları

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözültisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.



ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE "D" YANLIŞ İSE "Y" YAZINIZ.

- () Kapakta yoğunlaşan su damlacıklarının besiyeri üzerine damlamasını önlemek için petripler ters çevrilmeden inkübe edilir.
- () Koloni sayıcısındaki işaretli kareler, toplam kareler alanının $1/5$ 'ine eşit olduğu için sayılan koloni adedi 5 ile çarpılır.
- () Küfler, sıvı besiyerlerinde rahat gelişemedikleri için EMS yöntemi ile sayılır.
- () EMS yöntemi, tüp dilüsyon yönteminin bir modifikasyonudur. İstatistiksel olarak hazırlanmış EMS tablolarına dayalı bir sayım yöntemidir.
- () Kültürel sayım yöntemlerinde, canlı hücrelerin koloni oluşturması ve bu kolonilerin sayılması prensibi ile sayım yapılır..

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

- Örnek ve agarlı besiyeri, petrilere konulduktan sonra üç kez sekiz hareketi çizdirilerek karışması sağlanır.
- EMS yönteminde inkübasyonu takiben, her bir dilüsyondaki tüp sayısı belirlenir.
- Kültürel sayım yöntemlerinde, sadece..... hücreler sayılmakta ve ölü hücreler sayıma dâhil olmamaktadır.
- sayımlarında genel amaçlı besiyerleri Plate Count Agar kullanılır.
- Sularda EMS yönteminde tüplerin 37°C 'de saat inkübasyonu yapılır.

AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

- Dökme plak yöntemiyle kültürel sayımda aşağıdaki mikroorganizmalardan hangisi sayılamaz?**
A) Bakteriler B) Küfler ve sporları C) Mantarlar D) Mayalar E) Virüsler
- İnkübasyon bitiminde hangi petripler dikkate alınarak sayım yapılmalıdır?**
A) 5 ile 10 arasında koloni oluşturanlar
B) 10 ile 100 arasında koloni oluşturanlar
C) 25 ile 250 arasında koloni oluşturanlar
D) 30 ile 300 arasında koloni oluşturanlar
E) 50 ile 500 arasında koloni oluşturanlar





13. Gıdalarda EMS yönteminin uygulanması sonrasında şu veriler elde ediliyor:

Birinci sırada	1. tüp = (+)	İkinci sırada	1. tüp = (-)	Üçüncü sırada	1. tüp = (-)
	2. tüp = (+)		2. tüp = (+)		2. tüp = (-)
	3. tüp = (-)		3. tüp = (-)		3. tüp = (-)

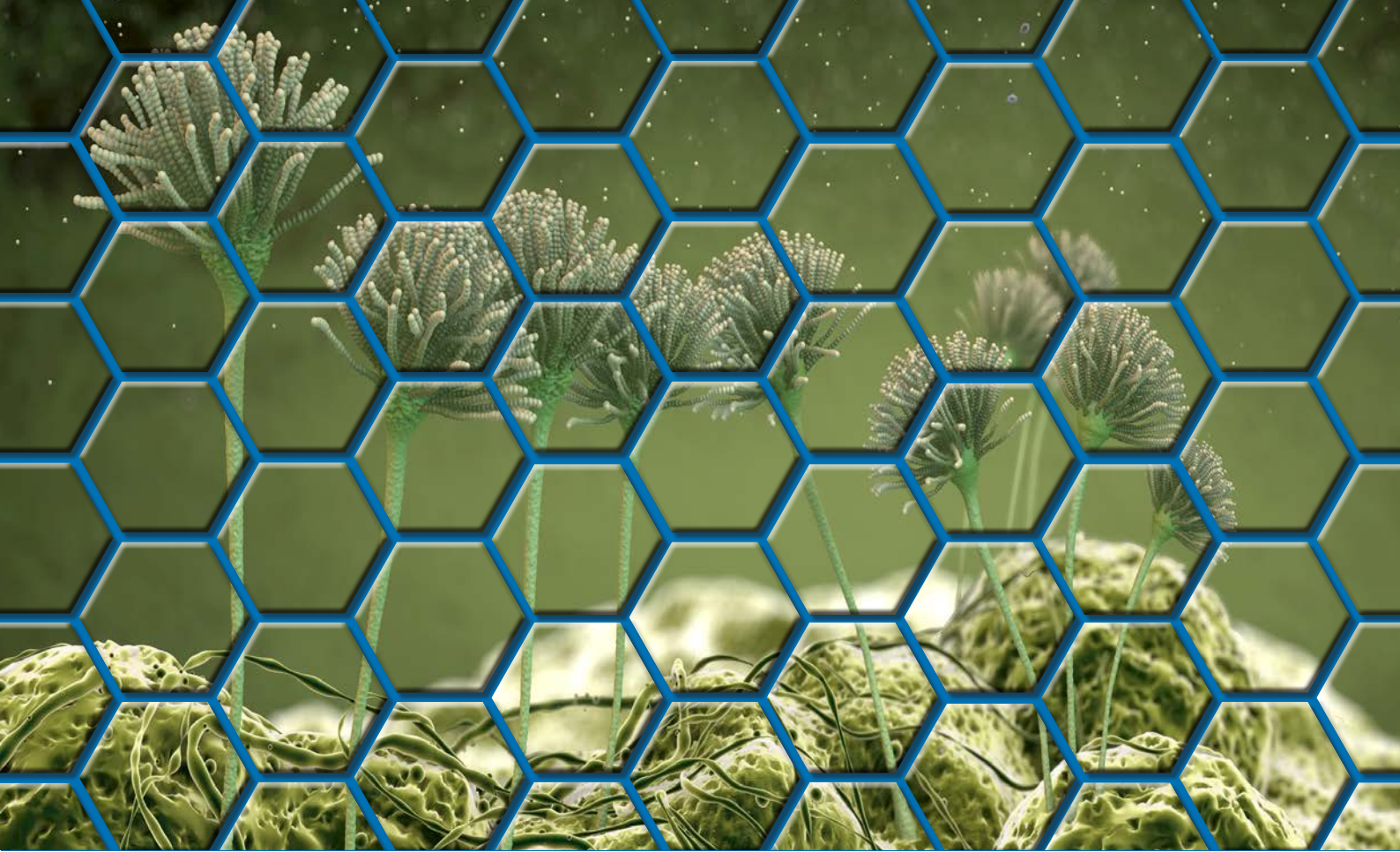
Bu sonuçların kodlanması aşağıdakilerden hangisidir?

- A) 1-2-3
B) 2-2-3
C) 2-2-0
D) 1-1-0
E) 2-1-0
14. EMS yöntemi ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi **yanlıştır**?
- A) Numune sıvı ise ekimde ilk seyrelti olarak kullanılabilir.
B) Ekim miktarı fazla ise besiyeri, çift güçlü besiyeri şeklinde hazırlanabilir.
C) Kullanılacak besiyeri mutlaka sıvı besiyeri olmalıdır.
D) EMS yöntemiyle maya sayımı yapılamaz.
E) EMS yönteminde ardışık 3 seyreltiden sıvı besiyerlerine ekim yapılır.
15. Aynı dilüsyondan ekim yapılan kaç plağın sayımı yapılır ve ortalaması alınır?
- A) 1-2 plakta
B) 2-3 plakta
C) 3-4 plakta
D) 4-5 plakta
E) 5-6 plakta
16. Katı besiyeri sıcak su banyosunda eritilip kaç 0C'ye kadar soğutulmalıdır?
- A) 43 °C
B) 44 °C
C) 45 °C
D) 46 °C
E) 47 °C
17. Aşağıdakilerden hangisi EMS yönteminde pozitif sonucun göstergesi **olamaz**?
- A) Bulanıklık oluşması
B) Durham tüpünde gaz birikmesi
C) Kolonilerin oluşması
D) Renk değişimi olması
E) Yoğunluk farkı oluşması

8. ÖĞRENME BİRİMİ



KÜF VE MAYA TAYİNİ



Bu öğrenme biriminde;

- Mikroskopik sayım yöntemlerinin amacı ile prensibini ve çeşitlerini,
- Standartlara uygun mikroskopik küf ve maya sayımının yapılışını,
- Ekim yöntemiyle sayım yapmanın amacı ile prensibini ve çeşitlerini,
- Standartlara uygun ekim yöntemiyle küf ve maya sayımının yapılışını deneyimleyerek öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 8.1. Howard Lamı ile Küflü Saha Sayımı
- 8.2. Thoma Lamı ile Maya Sayımı
- 8.3. Ekim Yöntemiyle Maya ve Küf Tayini

TEMEL KAVRAMLAR

küf maya pozitif alan sayım alanı
preperat



8. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Küf ve mayaları diğer mikroorganizmalardan ayıran özellikler nelerdir?
2. Küf ve mayaların şekillerini internetten araştırınız ve notlarınızı sınıfta karşılaştırınız.
3. Günlük hayatta küf ve mayalar birbirinden nasıl ayırt edilir? Tartışınız.

8.1. HOWARD LAMI İLE KÜFLÜ SAHA SAYIMI



Görsel 8.1: Mikroskobik sayım

Direkt mikroskobik sayım yöntemlerinde amaç, kültürel sayım yöntemlerindeki gelişim süresini beklemeden numuneden direkt örnek olarak mikroskop altında incelemektir. Çoğunlukla bu amaca yönelik Thoma lamı, Howard lamı gibi özel lamlar ve normal lamlar ile membran filtreler kullanılmaktadır.

Bu sayım yöntemlerinde 2 prensip vardır:

1. Sayımı yapılacak sıvı veya dilüsyon örneği, lamların veya filtrelerin üzerine uygun bir şekilde yayılır.
2. Lam veya filtre üzerine yayılan örnek, boyama yapılarak ya da direkt mikroskop altında sayılır (Görsel 8.1).

Sayım sonuçları, alınan örneğin özelliğine göre (sıvı örnek, katı örnekten dilüsyon hazırlanarak) sayı/ml veya sayı/g şeklinde ifade edilir. Bu sayım yöntemlerinin avantajları olduğu kadar dezavantajları da bulunmaktadır.

Mikroskobik sayım yöntemlerinin avantajları

- Maliyet düşüktür.
- Hızlı sonuç alınır.
- Hazırlanması basittir.
- Sayım yapılırken mikroorganizmaların morfolojik yapıları da gözlemlenebilir.

Mikroskobik sayım yöntemlerinin dezavantajları

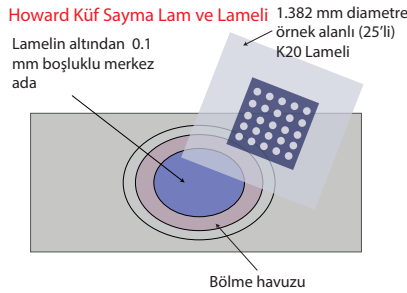
- İşlem uzun süre aldığı için analizi yapan kişinin gözünü zorlar ve yorar.
- Sayım sırasında canlı ve ölü hücreler birbirine karıştırılabilir.
- Numune, özellikle lifli bir yapıda ise yapıdan kaynaklı lifler mikroorganizma gibi algılanabilir. Bu da sonucun yanlış çıkmasına sebep olur.
- Numune, preparat üzerine homojen dağılmayabilir, hücreler kümeleşebilir ve sayım yanlış olabilir.
- Boyama işlemi yapıldıktan sonra mikroskobik incelemede preparat üzerinde boyanmamış alan veya mikroorganizma kalabilir ve sayım yanlış çıkabilir.

Howard yöntemi ile küf sayımında Howard lamı adı verilen özel lamlar kullanılmaktadır (Görsel 8.2). Bu metot; başta salça ve domates ürünleri olmak üzere meyve suyu, pulp, marmelat ve benzeri birçok gıdaya uygulanmaktadır.

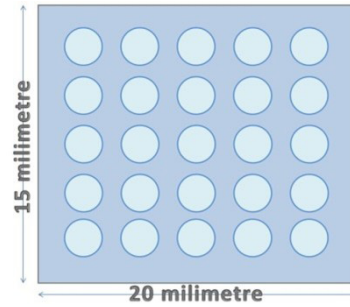
Bozulma ve çürüme etmeni olan bazı küfler, kullanılan meyve veya sebzedden üretilmiş ürünlere



geçebilmektedir. Bu durum ürünün kalitesinin düşmesine sebep olur. Howard metodu ile küf sayımı yapılarak ham maddenin yeterli kalitede olup olmadığı, yıkama ve ayıklama işleminin yeterince yapıp yapılmadığı, hijyenik koşulların sağlanıp sağlanmadığı hakkında bir kanıya ulaşılır.



Görsel 8.2: Howard lam ve lameli



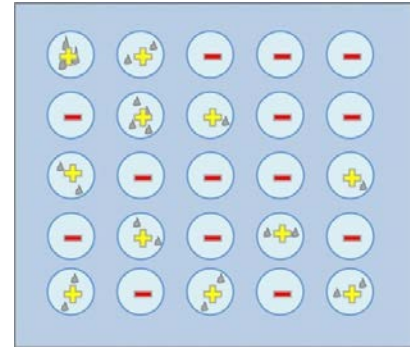
Görsel 8.3: Howard lameli

Özel üretilen Howard lamı ve lameli; sayım alanı olarak içerisinde 19 mm çapında 25 adet daire şeklinde görüş sahası bulunan ve 20 x 15 mm boyutlarında dikdörtgen bir alan bulunduran lamel ve iki tarafında 0,1 mm yükseklikte çıkıntılar bulunan lamdan oluşur (Görsel 8.3). Lamel bu çıkıntıya oturunca numunenin yerleşeceği 0,1 mm derinlik oluşur ve böylece her seferinde belli ve eşit hacimdeki numuneler bu hücreye alınmış olur.

Görüş sahası içerisindeki 25 dairede küf miselleri aranır. Küf misellerinin bulunduğu daireler (dairenin 1/6'sından daha büyük küf miselleri) pozitif, bulunmayan daireler negatif olarak değerlendirilir. Bu yöntemin uygulamasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, mikroskop altında sayımı yapacak kişinin bu konuda tecrübeli olması ve küf miselleri ile meyve veya sebzenin içeriğinden gelebilecek lifleri karıştırmamasıdır.

Yöntemin uygulamasında, öncelikle numunenin brix değeri (kuru madde miktarı) ayarlanır. Numune, damıtık su ilavesiyle seyreltilir ve reaktif indeksi 20 °C'de 1,3448-1,3460 arasında olana kadar seyreltme işlemi devam ettirilir. Bu değerın suda çözünür kuru madde olarak karşılığı yüzde 8,2-8,4 arasında gelmektedir. Seyreltme işlemi sonunda numuneden yaklaşık bir iki damla alınarak Howard lamı üzerinde bulunan 0,1 mm derinliğindeki alana damlatılır ve lamel, lam üzerindeki çıkıntılara denk gelecek şekilde yerleştirilir.

Hazırlanan preparat, mikroskopta 10X oküler ve 10X objektifi ile incelenir. Görüş sahası içerisindeki 25 dairede küf miseli aranır. Küf misellerinin bulunduğu daireler pozitif, bulunmayan daireler negatif olarak değerlendirilir ve yüzde pozitif alan hesaplanarak numune hakkında yorumlama yapılır (Görsel 8.4).



Görsel 8.4: Howard lameli ile sayım

$$\text{Pozitif alan (\%)} = \frac{\text{Sayılan pozitif alan sayısı}}{\text{Sayımı yapılan toplam alan sayısı}} \times 100$$

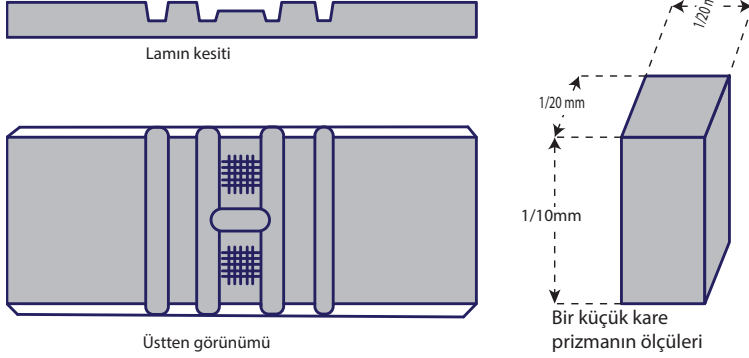
Yapılan hesaplama sonunda elde edilen değer doğrudan küf sayısını veya miktarını değil, dolaylı olarak küf yükünü (küf yoğunluğunu) belirtir.

Bu kontroller genel olarak üretim sırasında, her hattan 24 saatlik çalışma süresinde, belirli aralıklarla 10 örnek alınıp her örneğe 2 kere sayım yapılarak uygulanır.



8.2. THOMA LAMI İLE MAYA SAYIMI

Thoma lamı ile sayım yöntemi, gıda numunelerinde toplam canlı ve ölü maya sayısının veya küf sporu sayısının belirlenmesi amacı ile kullanılır. Özellikle küf sporlarının sayımı ancak bu yolla mümkün olmaktadır. Bu yöntemde Thoma lamı adı verilen özel lamalar kullanılır.

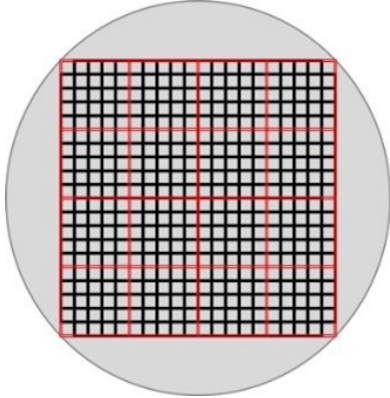


Görsel 8.5: Thoma lamı

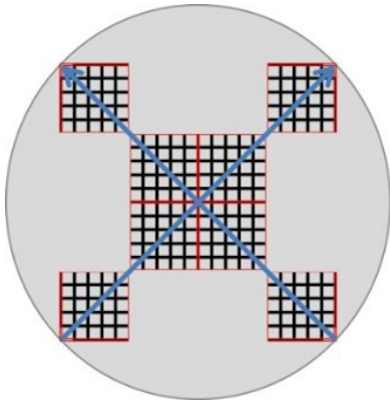
Thoma Lamının Özellikleri

- Şekilde görüldüğü gibi üzerinde dik yönde iki çukur kanal ve bu kanalları tam ortadan kesen yatay yönde bir kanal bulunmaktadır (Görsel 8.5).

Yataydaki kanal, ortada bulunan alanı alt ve üst bölme olarak iki sayım alanına böler. Sayımlar bu alanlarda yapılır ve sayım sonunda her iki alanın mikroorganizma sayılarının ortalaması alınır.



Görsel 8.6: Thoma lamı mikroskop görüntüsü



Görsel 8.7: Thoma lamı sayımı

- Bir sayım alanında 16 büyük kare ve her büyük karede 25 küçük kare bulunmaktadır (Görsel 8.6).
- Toplamda 1 sayım alanında 400 küçük kare bulunmaktadır. Bir küçük karenin hacmi $1/4.000 \text{ mm}^3$ ve bir sayım alanının hacmi ise $0,1 \text{ mm}^3$ 'tür. Buna göre sonuçlar cm^3 (ml) olarak hesaplanacağından sayım sahasında bulunan değer 10.000 ile çarpılır.
- Bir sayım alanında bulunan 16 büyük karenin hepsinde sayım yapılmaz. Çaprazlama olarak 8 büyük karede sayım yapılır ve bulunan değer 2 ile çarpılır (Görsel 8.7).

Büyük kare üzerinde sayım yapılırken dikkat edilmesi gereken hususlar şunlardır:

- Sayıma alınan küçük kareler içindeki hücreler ile karenin üst ve sağ tarafındaki çizgilere teğet veya çizgileri kesen hücreler sayıma alınır.
- Küçük karelerin alt ve sol tarafındaki çizgilere teğet veya çizgileri kesen hücreler sayıma alınmaz.

Yöntemin uygulamasında ilk olarak incelenecek sıvı numuneden doğrudan örnek alınır veya dilüsyon hazırlanır. Katı numuneye dilüsyon hazırlanır ya da küf spor süspansiyondan birkaç öze dolusu numune alınır. Thoma lamının ortasında bulunan iki sahaya aktarım yapılır. Aktarım sonunda lamın üzerine bu lama özgü lamel yerleştirilir ve homojen bir dağılım sağlanması için lamelin üzerine yavaşça bastırılır. Hazırlanan preparat mikroskopta önce 20X objektifi ardından da 40X objektifi ile görüntü netleştirilmesi yapılır. Netleştirme sonunda en sol

ve üstteki büyük kare ortalanır ve bu büyük karede yer alan küçük karelerdeki hücrelerin sayımına başlanır. Sayım sonunda aşağıdaki formül kullanılarak toplam küf, maya, küf sporu sayısı **toplam sayı/ml** olarak hesaplanır.

$$\text{Toplam mikroorganizma (küf, maya)} = 16 \text{ Büyük kare sayım ortalaması} \times 10.000 \times \text{Dilüsyon faktörü}$$



8.3. EKİM YÖNTEMİYLE MAYA VE KÜF TAYİNİ

Maya ve küfler, işlenmiş veya işlenmemiş birçok gıdada bozulma etkenidir. Özellikle küfler, kendisinin yanı sıra ürettikleri mikotoksinler ile de insan sağlığı açısından önemli risk teşkil eder. Maya hücreleri birbiriyle temas hâlinde olmayan tekli hücreler şeklinde görülür. Küfler ise art arda dizilen çoklu hücrelerden oluşur. Bu hücreler mikroskopta ipliksi şekilde gözlemlenir. Genel olarak maya ve küfler geniş pH aralığında (pH 2-10) gelişebildikleri için sayım sırasında bakteriler ile karıştırılabilmektedir. Bunun engellenebilmesi için maya ve küf gelişiminde kullanılan besiyerlerine bakteri gelişimini engellemek amacıyla asit veya antibiyotik eklenerek besiyeri, maya ve küf için seçici besiyeri hâline getirilir.

Asitlendirilmiş Besiyerleri: Bakterilerin düşük pH değerinde gelişmemesi ilkesine dayanarak yüksek asitli ortam yani düşük pH değerine sahip besiyerleri oluşturulur. Besiyerlerini asitlendirmek amacıyla (pH 3,5-4,5 aralığında) besiyerine organik asit çözeltileri eklenir. Bu asitlere örnek olarak tartarik, laktik veya sitrik asit çözeltileri verilebilir.

Asitlendirilmiş besiyeri hazırlanırken önceden sterilize edilip 45 °C'ye kadar soğutulmuş besiyeri manyetik çubuk ile orta hızda karıştırılırken seçilecek organik asit çözeltisi belli oranda eklenir. Besiyeri daha sonra petri kutularına dökülür ve besiyerinin katılaşması beklenir. Asit ilave edilmiş besiyeri katılaştırıldıktan sonra tekrar eritilmez. En yaygın kullanılan besiyerleri, Potato Dextrose Agar (PDA) ve Malt Extract Agar (MEA) besiyerleridir (Görsel 8.8).

Sayım işlemi standart yayma veya dökme yöntemi ile yapılır. Dökme yöntemi ile çalışılırken termal şokları engellemek için besiyeri sıcaklığının 45 °C'yi geçmemesine dikkat edilmelidir. Besiyeri yüzeyinde maya ve küflerin daha hızlı üremesi, düzgün ve standart koloni oluşumu vb. kolaylıkları nedeniyle yayma yönteminin kullanılması daha avantajlıdır. EMS yöntemi, küflerin sayımında pratik olmasa da maya sayımında genellikle kullanılmaktadır.

Antibiyotik Katkılı Besiyerleri: Kullanılan antibiyotik ile besiyerlerinde bakterilerin gelişiminin engellenmesi, küf ve maya gelişiminin etkilenmemesi istenmektedir. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan antibiyotikler, chloramphenicol (kloramfenikol) ve gentamisindir. Antibiyotik katkı besiyerleri, temel besiyerlerine bu antibiyotikler ilave edilerek hazırlanabileceği gibi hazır olarak da temin edilebilir. Ticari olarak geçen başlıca antibiyotik ilaveli besiyerlerine örnek olarak YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) agar ve OGY (Oxytetracycline Glucose Yeast) agar verilebilir (Görsel 8.9).

Toplam maya ve küf sayımı için petri kapları inkübatörde genel olarak 20-28 °C'de yaklaşık 5 gün inkübasyona bırakılır. Aşırı küf miseli gelişmesi sonucunda sayım zorluğu yaşanacağından sayım 3. günün sonundan itibaren alınmalıdır. Bu süre sonunda maya ve küf gelişimi gözlemlenmemişse 2 gün daha inkübasyon devam ettirilir. Maya kolonileri, her zaman önce sayılmalı ve petri kutusunda işaretlenmelidir. Aksi halde küf kolonileri hızla gelişir ve maya kolonilerini örterek sayımını güçleştirir.



Görsel 8.8: PDA besiyeri



Görsel 8.9: YGC agar besiyeri

**1. UYGULAMA : HOWARD LAMI İLE KÜFLÜ SAHA SAYIMI****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

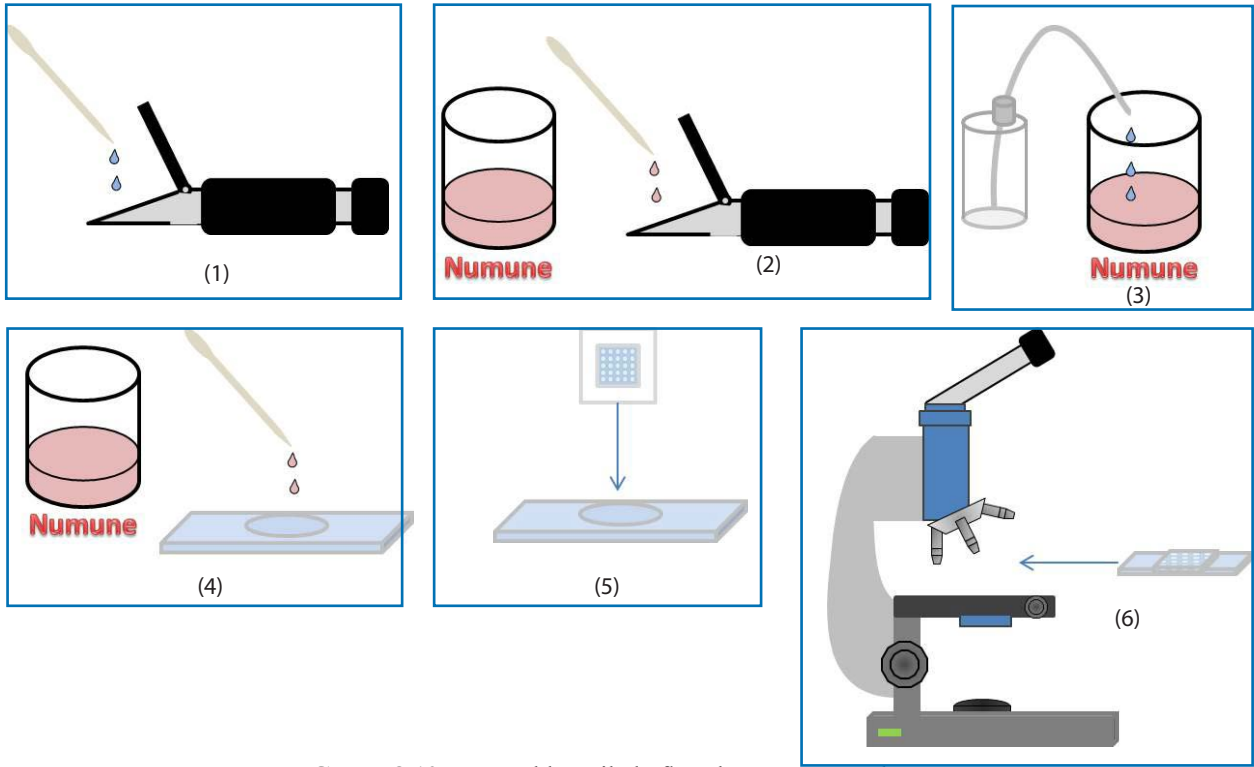
- | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| ✓ Howard lamı | ✓ Mikroskop | ✓ Piset |
| ✓ Howard lameli | ✓ Pastör pipeti | ✓ Otoklav |
| ✓ Refraktometre | ✓ Saf su | ✓ Gıda numunesi |

İşlem Basamakları

1. Numunenin kuru madde miktarını ölçmek için refraktometre alınız ve haznesine pastör pipeti ile saf su damlatarak sıfır ayarı yapınız.
2. Hazneyi pamuk ya da yumuşak peçete ile temizleyiniz. Hazneye bu sefer pastör pipeti ile numuneden 1-2 damla alınız ve % brix değerini okuyunuz.
3. Kuru madde oranı %8 olana kadar numuneye saf su ile seyreltme işlemi yapınız. (Refraktometrede reaktif indeks 20 °C'de 1,3447-1,3460 olana kadar)
4. Seyreltme işlemi sonunda pastör pipeti ile numuneden 1 damla alınız ve Howard lamı üzerine koyunuz.
5. Howard lamının üzerine Howard lamelini kapatınız ve hazırlanan preparatı mikroskobun tablasına yerleştiriniz.
6. Mikroskopta görüntü araması yaparak sırasıyla 4X, 10X, 40X ve en son 100X objektife geçiniz.
7. 100X objektifte 25 sahanın tümünde ayrı ayrı sayım yapınız ve pozitif sahaların sayısını not ediniz.
8. Buraya kadarki işlemleri 2 ayrı preparat daha hazırlayarak ve bunların sayımını yaparak 3 paralelli çalışınız.
9. Hesaplama işlemine geçiniz.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 8.10: Howard lamı ile küflü saha sayımı uygulaması

Hesaplama

1. Not edilen 3 ayrı preparatın pozitif saha sayısının ortalamasını alınız.
2. Elde edilen pozitif saha sayısını formülde yerine yazarak % pozitif alan değerini hesaplayınız.

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve malzemeleri çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan Howard lamı ve lamelini önce 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Mikroskobu örtüsü ile kapatınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kullanılan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.



Sonuç ve Yorum

“Howard Lamı İle Küflü Saha Sayımı” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “**Ölçütler**” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “**X**” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Refraktometreyi uygulama için doğru şekilde hazırladı.					
Numunenin % brix ayarını doğru şekilde yaptı.					
Kurallara uygun olarak preparat hazırladı.					
Mikroskopta pozitif sahaların sayımını doğru şekilde yaptı.					
Howard lamı ile sayım sonucu hesaplamaları yaptı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:	Gerçek Puanı:				

Değerlendirme: Form puanını 2,22 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.



2. UYGULAMA : THOMA LAMI İLE MAYA SAYIMI

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmuyunuz.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

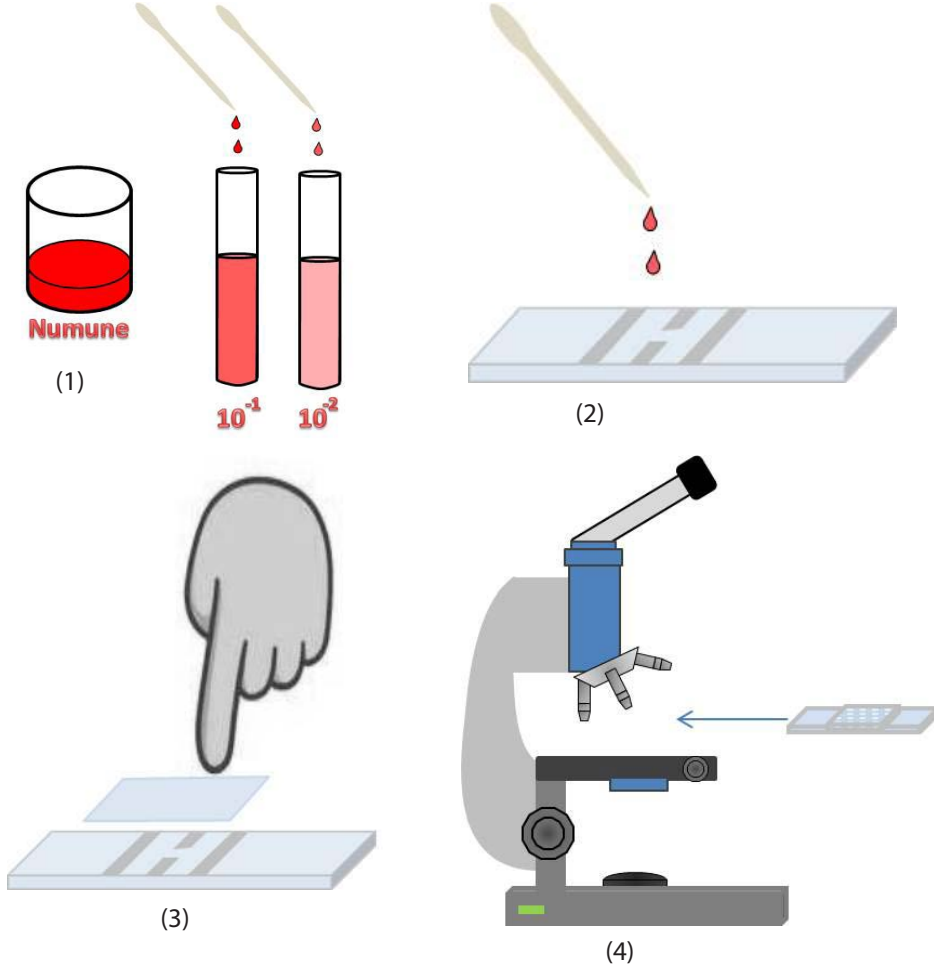
- | | | |
|--------------|-----------------|-----------------|
| ✓ Thoma lamı | ✓ Pastör pipeti | ✓ Saf su |
| ✓ Lamel | ✓ Mikroskop | ✓ Gıda numunesi |
| ✓ Otoklav | ✓ Piset | |

1.1.3. İşlem Basamakları

1. Sayımı yapılacak numuneye dilüsyon hazırlama işlemi yapınız.
2. Hazırlanan dilüsyondan pastör pipeti ile Thoma lamı üzerine (sıvının lamel üzerinden taşmamasına dikkat ederek) 1-2 damla alınız.
3. Lameli üzerine dikkatlice yerleştiriniz ve lamelin üzerine hafifçe bastırarak numunenin homojen dağılımını sağlayınız.
4. Hazırlanan preparatı mikroskobun tablasına yerleştiriniz.
5. Sırasıyla 10X ve 20X objektiflerde görüntüler alıp 40X objektifte küçük karelerde sayım işlemine geçiniz.
6. Çapraz olarak 8 büyük karede sayım yapınız ve bu sayıları 2 ile çarparak not ediniz.
7. Buraya kadarki işlemleri 2 ayrı preparat daha hazırlayıp bunları sayarak 3 paralelli olarak yapınız.
8. Hesaplama işlemine geçiniz.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 8.11: Thoma lamı ile maya sayımı uygulaması

Hesaplama

1. Not edilen 3 ayrı preparatın sayımlarının ortalamasını alınız.
2. Elde edilen sayım ortalamasını formülde yerine yazarak numunedeki toplam maya değerini hesaplayınız.

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz, 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve malzemeleri çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâh ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan Thoma lamı ve lameli önce 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Mikroskobu örtüsü ile kapatınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kullanılan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

**3. UYGULAMA : EKİM YÖNTEMİYLE KÜF VE MAYA TAYİNİ****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

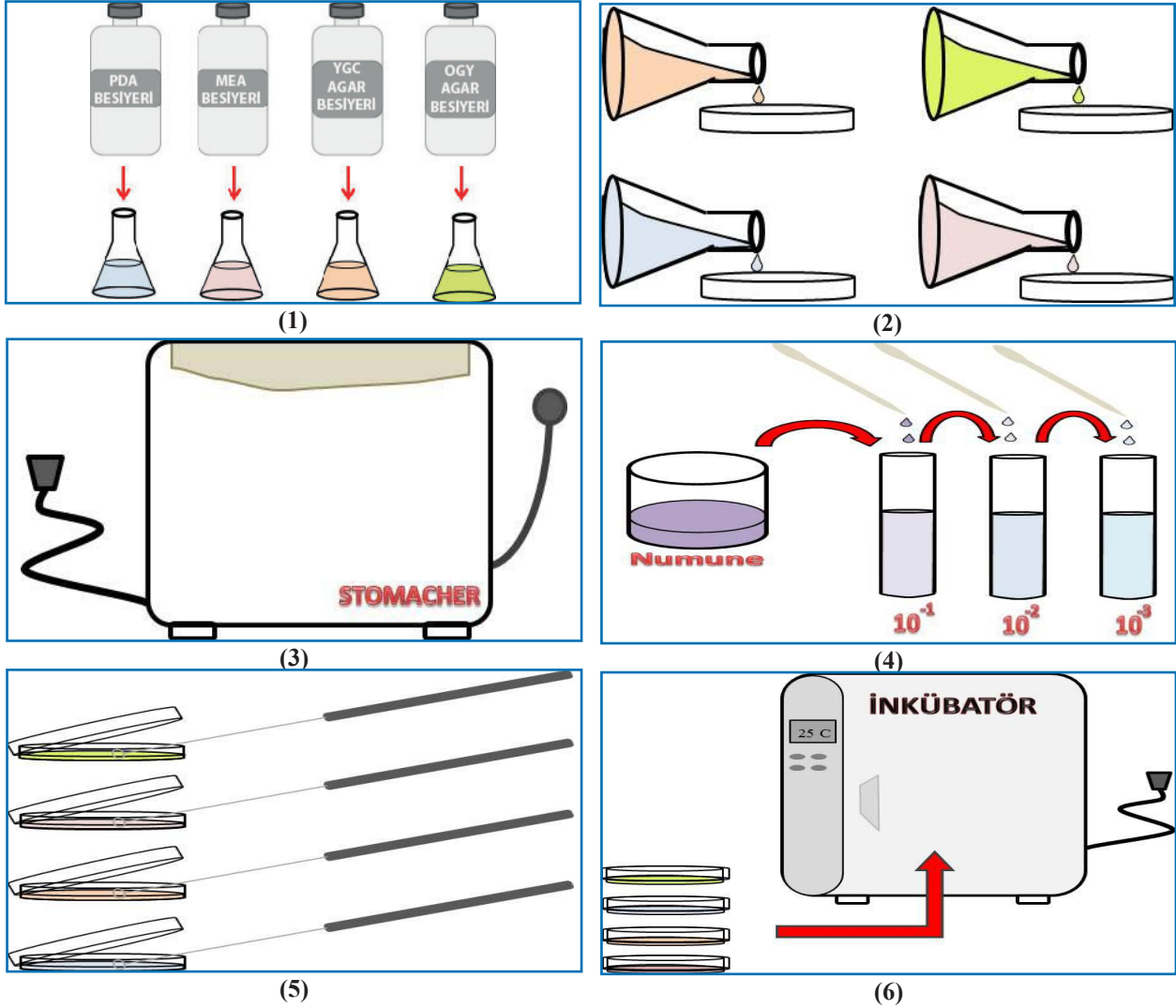
- | | | | |
|-------------------------------|-------------|------------------------|--------------|
| ✓ Erlen | ✓ Tüp | ✓ Manyetik karıştırıcı | ✓ Balık |
| ✓ Pamuk | ✓ İnkübatör | ✓ Otoklav | ✓ Petri kabı |
| ✓ Öze | ✓ Stomacher | ✓ Drigalski spatülü | ✓ Vorteks |
| ✓ PDA | ✓ MEA | ✓ YGC agar | ✓ OGY agar |
| ✓ %1'lik FTP veya peptonlu su | | ✓ Gıda Numunesi | |

İşlem Basamakları

1. Besiyerlerini, besiyeri kutularında yazdığı oranda 250 ml'lik erlende hazırlayınız ve otoklavda sterilize ediniz.
2. Sıvı hâldeki besiyerini petri kaplarına dökünüz ve besiyerinin katılaşmasını bekleyiniz.
3. Numuneyi, stomacher kullanarak homojen hâle getiriniz.
4. Tüplere %1'lik FTP veya peptonlu su koyarak 10^{-3} e kadar dilüsyon işlemi yapınız.
5. İsteddiğiniz ekim yöntemini seçerek o yönteme uygun bir şekilde hazırlanan besiyerlerine ekim işlemini yapınız.
6. Ekim sonunda küf veya maya gelişimi için besiyerlerini inkübatöre koyarak 25-27 °C'de 5-7 gün inkübasyona bırakınız.
7. İnkübasyon işlemi tamamlanınca sayım ve hesaplama işlemini yapınız.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 8.12: Ekim yöntemi ile küf veya maya tayini uygulaması

Hesaplama

1. İnkübasyon sonunda 10-150 koloni içeren petri kaplarını sayım işlemine alınız.
2. Sayım sonunda bulduğunuz değeri, numunenin durumuna göre kob/g veya kob/ml cinsinden yazınız.

Temizlik ve Dezenfeksiyon

1. Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve malzemeleri atık kutusuna atınız.
2. Çalışılan tezgâhı alkol ile dezenfekte ediniz.
3. Kullanılan cam malzemeleri önce 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözültisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
4. Çöpleri atık kutusuna atınız.
5. Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
6. Kullanılan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.
7. Kalan besiyerlerini buzdolabında muhafaza edebilirsiniz. Muhafaza etmeyecekseniz kimyasal atık kutusuna atabilirsiniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE “D” YANLIŞ İSE “Y” YAZINIZ.

1. () Mikroskopik sayım yöntemlerinde uygulama zordur ve sonuç geç alınır.
2. () Direkt mikroskopik sayım yöntemlerinde numunedeki mikroorganizmaların gelişim süresi beklenmeden preparat hazırlanarak mikroskop altında incelenir.
3. () Ham maddede yıkama ve ayıklama işleminin yeterince yapıp yapılmadığı Howard metodu ile küf sayımı yapılarak belirlenir.
4. () Howard lamında görüş sahası içerisinde 16 adet çalışma alanı bulunur.
5. () Küf sporlarının sayımında kullanılan özel lam Thoma lamıdır.
6. () Maya ve küf tayininde kullanılan besiyerlerinde bakteri gelişimini engellemek amacıyla besiyerlerine bir baz çözeltisi eklenir.
7. () Antibiyotik katkı besiyerlerinde antibiyotik bakterilerin gelişimini engeller;

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

8. Howard lamında yapılan mikroskopik sayımda, küf misellerinin bulunduğu daireler, olarak değerlendirilir.
9. Thoma lamında sayım sonunda toplam küf, maya, küf sporu sayısı toplam olarak ifade edilir.
10. Tartarik, laktik veya sitrik asit çözeltileri besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan asitlere örnek olarak verilebilir.

AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

11. Aşağıdakilerden hangisi direkt mikroskopik yöntemlerin avantajlarından **değildir**?
 - A) Direkt mikroskopik yöntemlerin maliyeti düşüktür.
 - B) Direkt mikroskopik yöntemleri ile hızlı sonuç alınır.
 - C) Sayım sırasında canlı ve ölü hücreler birbirine karıştırılabilir.
 - D) Direkt mikroskopik yöntemlerin hazırlanması basittir.
 - E) Mikroorganizmaların morfolojik yapıları da gözlemlenebilir.





12. Howard lamında görüş sahası sayısı aşağıdakilerden hangisinde doğru olarak verilmiştir?
- A) 16
 - B) 20
 - C) 25
 - D) 32
 - E) 35
13. Thoma lamında toplamda 1 sayım alanında bulunan küçük karelerin sayısı aşağıdakilerden hangisinde doğru olarak verilmiştir?
- A) 16
 - B) 25
 - C) 100
 - D) 250
 - E) 400
14. Aşağıdakilerden hangisi en yaygın kullanılan asitlendirilmiş besiyerlerinden biridir?
- A) EMB
 - B) MEA
 - C) OGY Agar
 - D) VRB Agar
 - E) YGC Agar
15. Aşağıdakilerden hangisi en yaygın kullanılan antibiyotik ilaveli besiyerlerinden biridir?
- A) EMB
 - B) MEA
 - C) OGY Agar
 - D) PDA
 - E) VRB Agar



9. ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROSKOBİK İNCELEME



Bu öğrenme biriminde;

- Preparatın tanımını, preparat hazırlamanın önemini ve hazırlama aşamalarını,
- Kullanılmamış ve kullanılmış lamaların temizlenmesini,
- Bakteri hücre morfolojisini ve hücre dizilişlerini,
- Bakteri morfolojisi ile ilgili çeşitli resimleri inceleme ve değerlendirme işlemini öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 9.1. Numuneden Preparat Hazırlama
- 9.2. Mikroskopta İnceleme

TEMEL KAVRAMLAR

Lam lamel preparat fiksasyon morfoloji
kok basil sarmal spiroket



HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Mikroskopun kullanım alanlarını sınıfta tartışınız.
2. Bakteri morfolojisi ile ilgili çeşitli resimleri inceleyiniz.

9.1. NUMUNEDEN PREPARAT HAZIRLAMA

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroskopta incelemek için lam ve lamel yardımıyla hazırlanan numuneye **preparat** denir. Hazırlanan preparat özel boyalar ile boyandığı zaman boyanan bu preparata **boyalı preparat** denir. Gıda fabrikalarının mikrobiyoloji laboratuvarlarında, bozuk olduğu düşünülen gıda numunesinden ve işletmeye kabul edilen süttten kültürel sayım sırasında şüphelenilen kolonilerin cinsini belirlemek için preparatlar hazırlanır. Preparat; lamın üzerine analizi yapılacak örnek konup lamın üstü lamel ile kapatıldıktan sonra yayma, kurutma, fiske etme gibi işlemler yapılarak hazırlanır.

Mikroskopta görüntünün net olarak görülebilmesi için kullanılan lam ve lamellerin temiz olmasına, çizik olmamasına ve kalitesinin iyi olmasına dikkat edilmelidir.

9.1.1. Preparatın Tanımı ve Preparat Hazırlamanın Önemi

Mikroskopik inceleme için preparat hazırlığı çok önemlidir. Çeşitli biçimlerde bakteriler ile ilgili preparatlar hazırlanmaktadır. Canlı bakterilerin mikroskopik açıdan incelenmesi preparat yardımı ile yapılır ancak canlı hâldeki mikroorganizmaların incelenmesi, ebatlarının çok küçük ve görünüşlerinin renksiz olması nedeniyle çok kolay değildir. Fakat bölünme özelliklerini ve hücre hareketlerini gözlemek için mikroorganizmaların canlı olarak incelenmesi gerekir.

Preparat hazırlamada şunlara dikkat edilmelidir:

- Çiziksiz, çok temiz ve yağsız lamlar kullanılmalıdır.
- Kullanılan iğne, öze ve pastör pipetleri de temiz ve steril olmalıdır.
- Lam tutulurken uçlardan tutulmalı, çok dikkatli çalışılmalıdır.
- Hazırlanan preparatta lam ve lamel arasında hava kabarcığı bulunmamasına özen gösterilmelidir. Bu amaçla lam ile lamel arasında 45° açı olacak şekilde lamel, örnek üzerine yerleştirilmeli ve kapatılmalıdır.
- Mikroskopta inceleme işlemi bitince kullanılan preparatlar %5'lik fenol, %4'lük formol, veya %3'lük hipokloritli suya bırakılarak dezenfekte edilmelidir.

9.1.2. Lamın Temizlenmesi

Preparat hazırlamada kullanılan yaklaşık 25 mm eninde ve 75 mm boyundaki dikdörtgen cama lam denir. Kaliteli bir lamın kalınlığı 1-1,5 mm olmalıdır. Bu kalınlık lama dayanıklılık kazandırır.

Hiç kullanılmamış yeni lamlar kullanılmadan önce temizlenir ve yıkanır. Bunun sebebi yeni lamların parlak görünmesi için sürülen kimyasalları uzaklaştırmak içindir. Bu kimyasallar uzaklaştırılmaz ise numune lamın üzerine yeterince yapışmaz.

Lamların kullanılmasına ilişkin dikkat edilecek bazı önemli noktalar şunlardır:

- Lamların kaliteli olması



- Kullanılmamış lamların uygun koşullarda depolanması
- Yeni veya eski lamların iyi temizlendikten sonra kullanılması
- Yeniden kullanılan lamların, temizleme sırasında kalitesinin bozulmamasına dikkat edilmesi

Lamlar, piyasadan satın alınırken iyi seçilmeli, iyi saklanmalı ve depolanmalıdır. Temizlik için her kullanımında temizlik için gereken özen gösterilmelidir.

Kullanılmamış Lamların Temizlenmesi

Hiç kullanılmamış lamlar, bikromatlı sülfirik asit çözeltisi içinde 12 saat tutulmak suretiyle temizlenir. Bir diğer yöntem ise bir kısım %96'lık etil alkol ve bir kısım eter karışımının kullanılmasıdır. Yeni lamlar bu karışımlar ile temizlendikten sonra kullanılır ise yaymalar daha iyi olur. Böylece yeni lamlar sağlıklı sonuçlar verir.

Hiç kullanılmamış (yeni) lamların temizliğinde aşağıdaki işlem basamakları takip edilir:

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

Paketleme ve kullanıma hazırlama işlemleri sırasında lamlar, kenarlarından tutulmalıdır. Lamların yüzeyine asla el ve parmaklar ile dokunulmamalıdır. Aksi takdirde lam kirlenir ve tüm emekler boşa gider. Yapılan çalışmadan sağlıklı sonuç alınmaz

Kullanılmış Lamların Temizlenmesi

Mikroskopta elde edilecek görüntünün kaliteli olması için kullanılan lam, temiz ve kaliteli olmalıdır. Laboratuvarlarda tasarruf etmek için sık sık aynı lamlar kullanılır. Günümüzde hem ihtiyaç hem de ekonomik ve teknik prosedür nedeniyle bu tekrar tekrar kullanımlar azalmıştır. Yine de kullanılmak istenen kirli lamlar, bir daha ki sefere kullanılmak için kullanım sonrasında mutlaka dezenfektan içerisinde temizlenerek saklanmalıdır.

Kirli lamların temizliği aşağıdaki şekilde yapılır:

- Yıkama kabında sıcak su ile deterjanlı su hazırlanır.
- Deterjanlı suyun içerisine konulan lamlar 1-2 gün bekletilir.
- Kirlerin tamamen uzaklaştırılması için lam yumuşak bir bezle ovulur.
- Yıkama kabındaki kirli su döküldükten sonra lamlar az deterjanlı su ile bir kez daha yıkanır.
- Lamlar çeşme altında durulanır.
- Son olarak saf su ile durulanır.
- Durulanan lamlar yumuşak bir bezle veya kâğıtla silinir.
- Kuruyan lamlar, onluk ya da yirmilik paketler hâlinde paketlenir.

Silme, paketleme ve kullanıma hazırlama işlemleri sırasında lamlar kenarlarından tutulmalıdır. Lamların yüzeyine asla dokunulmamalıdır. Yıpranmış, çizilmiş ve yeterince temiz görünmeyen lamlar kullanılmadan atılmalıdır.



9.1.3. Preparat Hazırlama Aşamaları

Mikroskopta incelemek için hazırlanan preparatta kullanılan lam; etil alkolle ıslatılır, temiz bir bezle silinir ve alevden geçirilir. Preparat, aşağıdaki yönergeler izlenerek hazırlanır.

Preparatların Tespit Edilmesi (Fiksasyon)

Mikroskopta gözlemlenecek bakterilerin lamdan akıp gitmesini önlemek, yapıştırmak ve sabitlemek için yapılan işleme tespit (**fiksasyon**) denir. Bu işlem ısı uygulaması ve kimyasal maddeler kullanılarak yapılır.

Isıl Uygulama (Alevle) ile Tespit: Kurutulan preparat, özel pens yardımı ile 3-4 defa alevden geçirilerek tespit işlemi yapılır. Alevden geçirme seri bir şekilde yapılmalıdır. Hızlı olunmazsa preparat zarar görebilir. Yapılan bu işlem sonrası lamın soğuması beklenir.

Kimyasal Maddelerle Tespit: Etil alkol, metil alkol ve aseton yardımı ile kimyasal tespit işlemi yapılır.

- Etil alkolle tespitte preparat düz bir yere konur. Üzerine saf alkol dökülür. 8-10 dakika sonra saf su ile yıkanır.
- Saf metil alkolle tespitte preparat düz bir yere konur. Üzerine metil alkol dökülür ve 3 dakika tutulur. Preparat çok hafif akan suda yıkanıp kurutulur.
- Aseton ile tespitte preparat asetonda 5 dakika tutulur. Aseton ile tespit, özellikle floresans mikroskopisi için hazırlanan preparatlara uygulanır.

Boyasız İnceleme İçin Preparat Hazırlama

- Sıvı kültür, öze yardımıyla 2-3 damla lamın ortasına damlatılır.
- Lam ile lamel arasında hava kabarcığı kalmayacak şekilde 45° eğimle lamel lamın üzerine kapatılır (Görsel 9.1).

Direkt Boyama Yöntemleri İçin Preparat Hazırlama

- FTS (fizyolojik tuzlu su) veya saf su damlalık yardımı ile bir damla lamın üzerine damlatılır.
- İğne öze ile alınan örnek, su damlası yanında ezilerek su damlası ile karıştırılır.
- Örnek, ince bir tabaka olacak şekilde lamın üzerine yayılır.
- Lam sallanarak havada kurutulur. Kurutma işleminde lam üzerinde bulunan mikroorganizmalar lama yapışır. Bu mikroorganizmalar, lam su ile yıkanmadıkça akıp gitmez.
- Böylece lam üzerine mikroorganizmaların tespiti yapılmış olur.



Görsel 9.1: Lam, lamel ve kurutma kağıdı



9.2. MİKROSKOPTA İNCELEME

Mikrobiyoloji dalının gelişmesi mikroskopun icadı ile başlamıştır. İlk zamanlarda kullanılan ışık mikroskobu, gelişen teknoloji ile yerini elektronik mikroskoba bırakmıştır. Bu mikroskop, mikroorganizmaların görünüşlerini ve yapılarını daha iyi inceleme olanağı sunmuştur. (Görsel 9.2).

9.2.1. Bakteri Morfolojilerini İnceleme

Gelişen teknoloji bakterilerin büyüklüklerini, şekillerini, dizilişlerini ve hücre yapılarını daha iyi inceleme olanağı sağlamıştır. Bakteri morfolojisi, mikroskopik morfoloji ve makroskopik morfoloji olmak üzere ikiye ayrılır.

Mikroskopik Morfoloji: Genel olarak şeffaf olan bakterilerdir. Boyanan bakteriler mikroskopik olarak incelenir.

Makroskopik Morfoloji: Bakterilerin katı ve sıvı besiyerlerinde oluşturduğu yapılar, üreme şekilleri ve sebep oldukları değişimler makroskopik morfoloji içinde incelenir. Bu inceleme koloni morfolojisi olarak bilinir.



Görsel 9.2: Mikroskop

Mikroskopta Bakteri Morfolojilerinin İncelenmesi Sırasında Dikkat Edilecek Hususlar

Mikroskopta mikroskopik incelemede iyi bir gözlem için şunlara dikkat edilmelidir:

- İncelemenin çok ince tabaka hâlinde yayılmış olan preparatta yapılması faydalı olur.
- Görüntü netleşince preparat oynatılmadan lamın üzerine immersiyon yağı damlatılır.
- İmmersiyon objektifiyle daha ileri incelemeler yapılır.
- Mikroskopta mikroorganizmaların mikroskopik morfolojilerinin araştırılmasında aşağıda verilen bazı sorunlarla karşılaşılabilir. Örneğin eni boyu birbirine çok yakın kokobasil olarak isimlendirilen morfolojiye sahip basiller, mikroskopta çok titiz bir şekilde incelenmelidir. Bunların gerçekte kok mu yoksa basil mi olduğuna karar vermek çoğu zaman zordur. Bir de saf kültürden preparat hazırlanmış ise incelenen mikroskop sahasında, çok az sayıda da olsa eni boyu ayırt edilemeyecek boyutlarda basillere rastlanabilir. Bu konuda çok dikkatli çalışılmalıdır.
- Farklı besiyerlerinde geliştirilmiş bakteriler farklı şekil ve boyuta sahip olabilir.
- Kurutma ve tespit işlemleri sırasında hücrelerde büzüşmeler meydana geldiği için incelenen bakterinin gerçek boyutlarının belirlenmesin de sorunlarla karşılaşılabilir.



Bakteri Hücre Morfolojisi ve Hücre Dizilişleri

Geçmişte yapılan araştırmalar hastalıklardan bazılarının bulaşıcı olduğunun eskiden beri bilindiğini gösterse de hastalığa sebep olan canlıların gözle görülmeyen mikroorganizmalar olacağı o dönemde düşünülmemişti. Bilim adamları senelerce bu konu üzerine birçok deney, gözlem ve araştırmalar yapmışlardır.

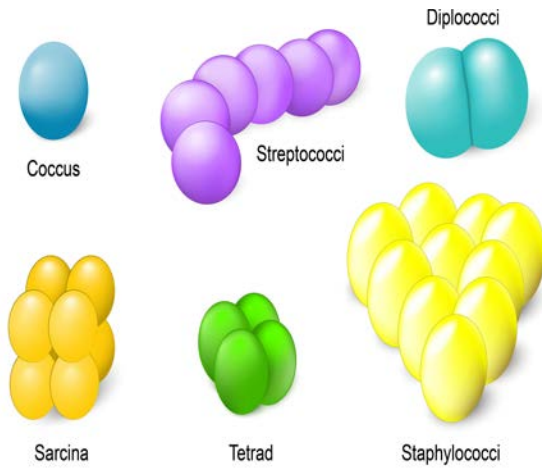
Bakterilerin Mikroskopik Morfolojileri

Mikroskopun icadı ile insanoğlu için yeni muhteşem kapılar aralanmış ve bu sayede gözle görülemeyen canlılar hakkında yeni bilgilere ulaşmanın yolu açılmış oldu. Mikroskop sayesinde bu küçük canlıların görünüşleri ve birçok özellikleri saptanır hâle geldi. Günümüze kadar yapılan bu araştırmalar sayesinde mikroskopik canlılardan bazılarının insan ve hayvanlarda hastalıklara yol açtığı belirlenmeye başlandı. Bu sayede mikroskop ve mikroorganizma incelemesinin önemi artmış oldu.

Antonie van Leeuwenhoek, (Antony Ven Leunayk) kendi yaptığı basit bir büyütme aleti ile görebildiği bazı mikroorganizmaları incelemiş, onların hareketlerini izlemiş ve resimlerini çizmiştir. Çizdiği bu resimler sayesinde üç morfolojik özellik net olarak görülmektedir. Günümüzde de bakteriler için bu üç temel morfolojik karaktere göre bir ayrımı yapılmaktadır.

Bakteriler; yuvarlak (kok), çubuk (basil), sarmal (spirial) ve değişik biçimli (pleomorfik) olmak üzere dörde ayrılır.

a) Yuvarlak Biçimdeki Bakteriler



Görsel 9.3: Kok

Genellikle **Coccus (kokkus)** adı verilen bakteriler yuvarlak şekilde görülür. Bunlar, çubuk veya spiral formda olanlara oranla morfolojik olarak cins veya tür içinde daha fazla homojen dağılım gösterirler. Çapları, ortalama 0,8-1,0 mikrometre (μm) arasında değişmektedir. Hastalık oluşturan türlerin çapları 0,8-1,5 μm arasında yer almaktadır. Koklarda bölünme sırasında, çaplarında bir yönde uzamalar göze çarpmakta ve kokobasil görünümüne rastlanmaktadır.

S. uberis yumurta, *N. gonorrhoeae* ve *N. meningitidis* fasulye veya kahve çekirdeği ve *S. pneumoniae* lanset veya mum alevi benzeri formlar gösteren koklar bulunmaktadır.

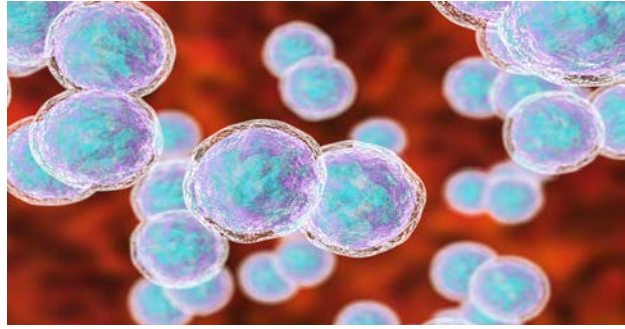
Bakterilerin formları, genelde bir genetik karakter taşımasına rağmen besiyerinin bileşimi, üreme dönemi ve koşulları ile diğer çevresel faktörlere de az çok bağımlı bulunmaktadır. Ancak koklarda bölünme sırasında, çaplarında bir yönde uzamalar göze çarpmakta ve kokobasil görünümüne rastlanmaktadır.

Bireysel koklar, üremede ortadan bölünme şekillerine göre yan yana dizilerek veya gruplar oluşturularak değişik morfolojik formlar meydana getirir. Bunlar, kokların tespit edilmesinde ve isimlendirilmesinde de kolaylık sağlar. Kok çeşitleri şunlardır:



Monokok [*Monococcus* (*Monokokkus*)]:

Bölünmeden sonra birbirinden ayrılarak bağımsız, yani mikroskopta tek olarak görünen bakterilerdir (Görsel 9.4).



Görsel 9.4: *Monococcus*

Diplokok [*Diplococcus* (*Diplokokkus*)]:

Tek yönde bölündükten sonra oluşan iki kardeş hücre, ikişer ikişer birbirlerine yapışık olarak kalırsa mikroskop altında çift çift görülen diplokokları meydana getirir. İnsan ve hayvanlarda pnömonilere ayrıca hayvanlarda mastitislere neden olan *Streptococcus pneumoniae* örnek olarak verilebilir (Görsel 9.5).



Görsel 9.5: *Diplococcus*

Streptokok [*Streptococcus* (*Streptokokkus*)]:

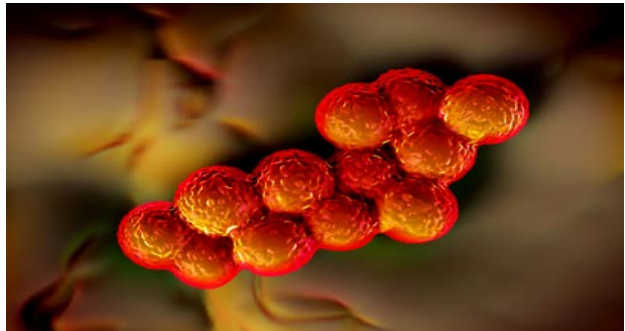
Eğer bireysel koklar birbirlerine paralel düzlemler üzerinde bölünüyor ve bölünme sonunda birbirlerine bir protoplasmik köprü ile bağlı kalıyorsa mikroskop altında az (10-20 kok) veya çok sayıda (100'den fazla) koktan oluşmuş kısa veya uzun zincirlere (tespih tanesi gibi dizilmiş) rastlanır. Böyle görünüme sahip mikroorganizmalara **Streptokok** adı verilir. Mastitisli süten yapılan preparatta uzun zincirli *S. agalactiae* örnek olarak verilebilir (Görsel 9.6).



Görsel 9.6: *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus*)

Stafilokok [*Staphylococcus* (*Stafilokokkus*)]:

Eğer bireysel koklar çeşitli yönlerde bölünüyor ve bölünen koklar birbirlerine bağlı olarak kalıyorsa mikroskop altında az veya çok sayıda koktan oluşmuş kümeler görülür, bunlara **Stafilokok** adı verilir. *Staphylococcus aureus* (Supuratif bozukluklar yapar.) ve *S. epidermidis* (Genellikle deride supuratif lezyonlar oluşturur.) *S. aureus* kültüründen froti örnek olarak verilebilir (Görsel 9.7).



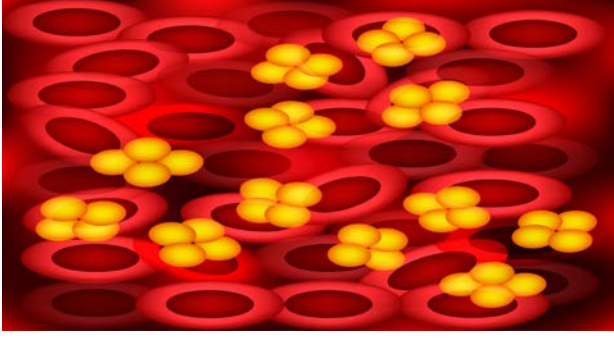
Görsel 9.7: *Staphylococcus* (*Staphylococcus aureus*)

Sarsina (*Sarcina*):

Kokların bölünmesi birbirlerine dikey 3 yönde meydana geliyorsa o zaman, 8-12 veya 16 koktan oluşan paket veya balya görünümünde gruplar meydana gelir. *Sarcina maxima* ve *S. ventriculi* örnek olarak verilebilir (Görsel 9.8).



Görsel 9.8: *Sarcina*

Görsel 9.9: *Tetracoccus*

Tetrakok [*Tetracoccus (Tetrakokkus)*]: Kokların bölünmesi, birbirlerine dikey iki yönde ve bir yüzey üzerinde meydana geliyorsa dörtlü koklardan yapılmış gruplar meydana gelir ki bunlara **Tetrakok** (tetrad) adı verilir. *Gaffkya homari* örnek olarak verilebilir (Görsel 9.9).

b) Çubuk Biçimindeki Bakteriler

Basiller mikroskopta çubuk şeklinde görülen bakterilerdir. Yapılan incelemeler göstermiştir ki silindirik veya buna yakın bir görünüme sahip basillerin enleri, boylarından daha kısadır ancak bu durum bakterinin cins ve türlere göre değişiklik göstermektedir.

Çubuk bakteriler mikroskopta incelendiğinde tek, çift ya da uzun veya kısa zincirler oluşturmuş şekilde görülür. Tek halde görülenlere basil, zincir oluşturmuş halde görülenlere streptobasil, oval ve kok benzeri görülenlere de kokobasil denir.

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

Birçoğunun eni 0.5-1.0 μm , boyu 1.0-4.0 μm kadardır. Spor oluşturan çubuk biçimindeki bakteriler spor yapmayanlara göre daha büyüktür. Büyük bir kısmı hareketlidir. Silindirik şekilli hücrelerin uçları yuvarlak ya da düz olabilir. Bazılarında ise kenarlardan bir veya iki uca doğru daralarak sivri bir hâl alır.

Görsel 9.10: *Negatif salmonella*

Diplobasil: İkiye bölündükten sonra birbirinden ayrılmayıp mikroskopta ikişerli şekilde görülür (Görsel 9.10).

Görsel 9.11: *Streptobasillus*

Streptobasil: Bölünmeden sonra birbirinden ayrılmayıp mikroskopta zincir şeklinde görülür (Görsel 9.11).

c) Sarmal Biçimli Bakteriler

Bu bakteriler mikroskopta hücrenin eksenine etrafında spiral biçimde sarılmış şekilde görülür. Sarmal biçimde olan mikroorganizmaların kendi etrafındaki kıvrımları az veya çok sayıda olabilir. Spiral şeklinde olan mikroorganizmaların boyları 4-20 μm arasında değişir. Cinsler, uzunluk ve kıvrımların sıklığı bakımından farklıdır. Spiral bakteriler; vibrio, spiroket ve spirillum olmak üzere üç grup incelenir.



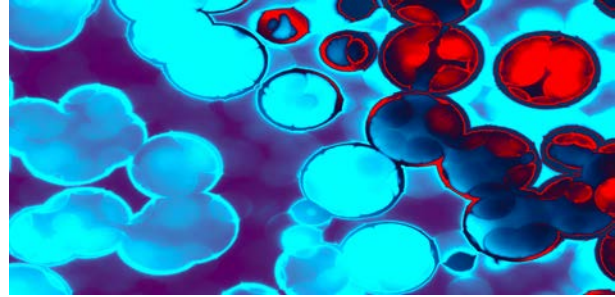
Büyüklikleri 1-100 µm arasında değişim gösterir. Kamçıları (flagellaları) yoktur fakat uzun eksenleri etrafında dönerek hareket edebilir.

Vibrio: Mikroskoptaki görünüşleri genellikle virgül şeklinde olup iki tanesi yan yana geldiğinde (S) şeklindedir. Virgül şeklinde polar flagellaya sahip Gram negatif ve aktif hareketli mikroorganizmalardır (Görsel 9.12).



Görsel 9.12: *Vibrio*

Spiril (Spirillum): İnce, bükülebilir sarmal şeklinde olan, birden fazla kıvrıma sahip, sert vücutlu ve flagella yardımı ile aktif hareket eden mikroorganizmalardır. Gram negatiftir (Görsel 9.13).



Görsel 9.13: *Spirillum* bakterisi

Spiroket (Spirochaeta): Kalın, esnek olmayan sarmal şeklinde olan, birçok sık kıvrıma sahip ve vücutları bükülebilen bakterilerdir. Flagellaları yoktur. Ekseni etrafında dönerek aktif hareket eder (Görsel 9.14).



Görsel 9.14: *Spirochaeta*

d) Pleomorfik (Değişik Morfolojik Özellikler Gösteren) Bakteriler

Mikroskopta yapılan incelemelerde bazı koşullar altında, değişik morfolojik özellikler gösteren bakteriler görülür. Bu bakteriler üç grupta incelenir. Bunlar;

PPLO yani pleuro pneumonia like organism (plora pnomanya layk organizm) formu bakteriler, L formu bakteriler ve involüsyon formlarıdır (atipik veya düzensiz hücre formları).

PPLO (Pleuro Pneumonia Like Organism) Formu Bakteriler

Bunların sıvı ortamdaki kültürlerinden yapılan preparatlarda oval, yuvarlak, yıldız, halka ve yüzük şeklinde görünüşe sahip bireysel mikroorganizmalar olduğu görülür. İnsan ve hayvanlarda birçok hastalığa neden olan mikoplazmalar (PPLO, Pleuro pneumonia like organism) hücre duvarından yoksundur. Örnek olarak *Mycoplasma pneumonia* verilebilir.

L Formu Bakteriler

Bakteriler, hücre duvarı sentezini engelleyen penisilin gibi maddelerin bulunduğu ortamlarda üretilirse hücre duvarına sahip olmayan formlar meydana gelir. Bunlara **L-formları** adı verilir. Her türlü fizyolojik aktiviteye sahip olan bu şekildeki mikroplar izotonik ortamlarda uzun süre kalabilir. Bunlar oval, yuvarlak veya değişik formlar gösterir. Ortamdan antibiyotikler uzaklaştırıldığında bakteriler tekrar eski şeklini alır ve hücre duvarını sentezler. Değişken olmayan L-formundaki bakteriler ise bu anormal yapıda üremelerini sürdürür.



İnvölüsyon Formları (Atipik veya Düzensiz Hücre Formları)

Mikroorganizmaların üretildiği ortamın karakterinin değiştiği durumlarda gıda, pH, osmotik basınç, oksijen azalması, yüzey geriliminin değişmesi, metabolitlerin birikmesi vb. şekillerinde birçok varyasyonlar meydana gelir. Bunlara **invölüsyon formları** adı verilir. Böyle değişiklikler arasında uzun, oval, filamentöz, branşlaşma, şişme, köşelenme, bölünmenin gecikmesi vb. anormal formlar gözlenebilir. Kültürlerde optimal koşullar sağlanırsa bakteriler, eski normal formuna kavuşur.

Bakterilerin Makroskopik Morfolojileri

Bir bakteri uygun bir katı besiyerinde ve uygun sıcaklık, süre, rutubet, oksijen üretirse bir süre sonra gözle görülebilen küme oluşturur. Oluşan bu kümeye koloni denir. Bir koloni, milyonlarca veya milyarlarca mikroorganizmadan oluşabilir. Koloni morfolojisi bakterilerin sınıflandırılmasında önemli bir kriterdir.

Katı besiyerinde meydana gelen koloniler morfolojilerine göre dört grupta incelenir. Bunlar, S (Smooth) koloni, R (Rough) koloni, L koloni ve M (mukoid) kolonidir.

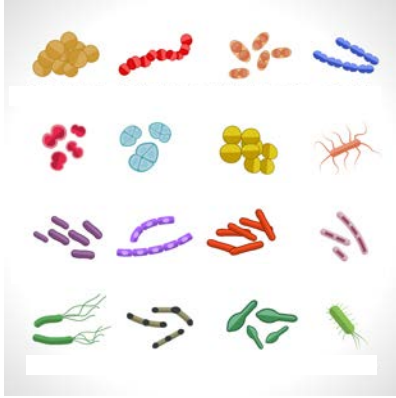
S [Smooth (Smudh)] Koloni: Hastalık vakalarından yeni izole olan genç bakteriler bu tipte koloniler meydana getirir. Hastalık olgularından yeni izole edilen suşlara ait koloniler küçük, yuvarlak ve üzeri düzgün bir görünümündedir. Katı besiyerinde küçük, yuvarlak, kenarları ve üzeri düzgün, kabarık, parlak ve homojen bir biçimde görünen kolonilerdir. Koloninin büyüklüğü ve şekli; besiyerinin bileşimine, oksijen durumuna ve sıcaklığa göre değişir. Streptokok, korinebakteri, pastörella, brusella gibi mikroorganizmaların oluşturduğu koloniler küçük olup 0.5-1.0 mm çapındadır. Buna karşın E. coli, B anthracis, B. subtilis oluşturduğu kolonileri daha büyüktür.

R [Rough (Raf)] Koloni: Eskimiş veya birçok pasaja maruz kalmış suşların bazı kolonilerinin kenarları çentikli, üzeri pürüzlü ve mat bir görünümündedir. Katı besiyerinde kenarları ve üzeri pürüzlü, mat ve granüllü bir yapıda görünen kolonilerdir. Bacillaceae familyasına ait aerobik B. anthracis, B. cereus, B. subtilis ve anaerobik klostridium cinslerde kolonilerin kenarları filamentlidir. Proteus vulgaris kanlı agar üzerinde, dalgalar hâlinde yayılan bir üreme tarzı gösterir. B. anthracis'in R tipli kolonilere örnek olarak verilebilir.

L Koloni: Bunlarda hücre duvarı olmadığı için şekilleri de düzgün değildir. Sıvı ortamlarda genellikle kümeler tarzında ürer. Hayvanlarda ve insanlarda hastalık yapan PPLO'lar da katı besiyerlerinde L koloni morfolojisine benzer karakter gösterir. Katı besiyerlerinde üstü ve kenarları düzensiz, ortası düğmeli ve granüllü biçimde görünen kolonilerdir. Bu tarz oluşuma penisilin, kimyasal maddeler ve yüksek osmotik basıncın etkisi fazladır. L koloni formları, laboratuvar koşullarında oluşturulan abnormal formlu bakteri kolonileridir.

M [Mukoid (Mukoyd)] Koloni: Öze değdirilince iplik gibi uzama gösteren, yapışkan kolonilerdir. Kapsül veya mukoid salgı üreten bakteriler tarafından oluşturulur. M (mukoid) koloni tipi kapsül veya mukoid salgı oluşturan *D. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leuconostoc mesenteroides* mikroorganizmalarda bu tarz koloni formasyonuna rastlanır.

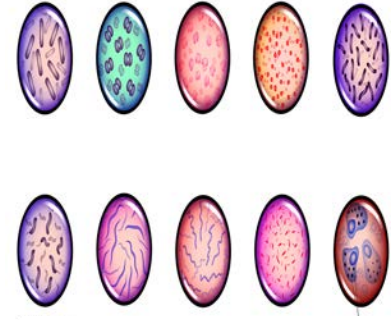
Bakteri Morfolojisi ile İlgili Çeşitli Görseller



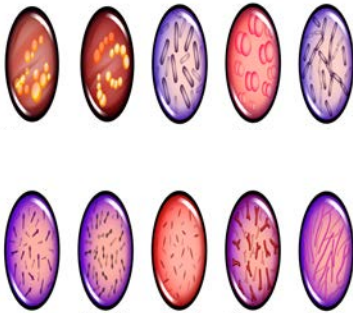
Görsel 9.15: Bakteri kolonisi



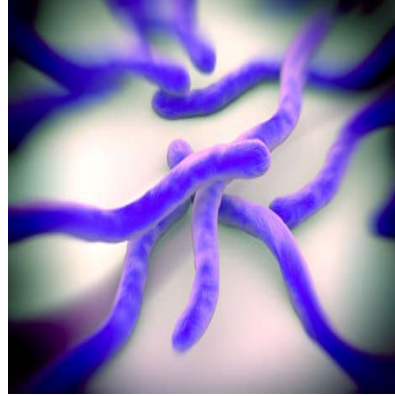
Görsel 9.16: *Basil*



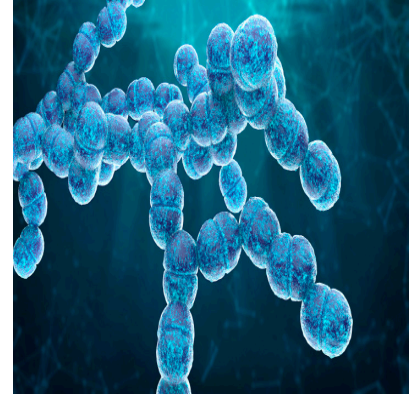
Görsel 9.17: Gram negatif bakteri



Görsel 9.18: Gram pozitif bakteri



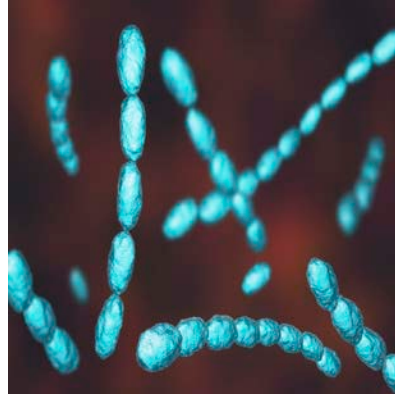
Görsel 9.19: *Spirochaeta*



Görsel 9.20: *Diplococcus*



Görsel 9.21: *Vibrio*



Görsel 9.22: *Streptobasillus*



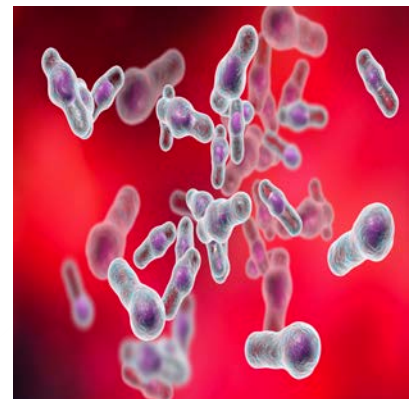
Görsel 9.23: *Escherichia coli*



Görsel 9.24: *Salmonella*

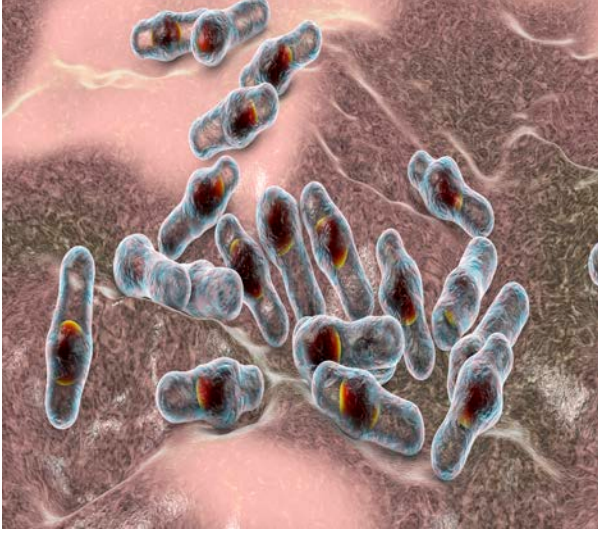


Görsel 9.25: *Clostridium perfringens*

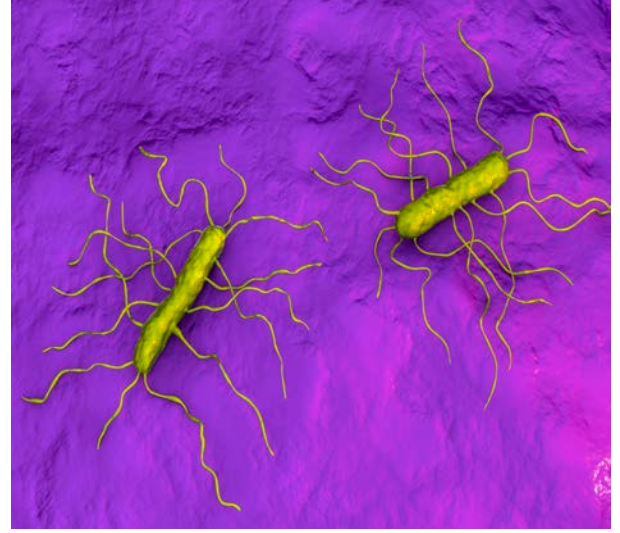


Görsel 9.26: *Clostridium difficile*





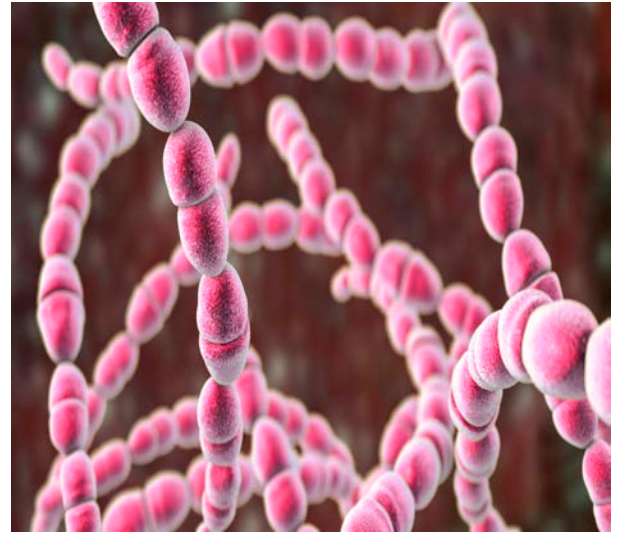
Görsel 9.27: *Clostridium tetani*



Görsel 9.28: *Listeria*



Görsel 9.29: *Lactobacillus bulgaricus*



Görsel 9.30: *Streptococcus*



Görsel 9.31: *Staphylococcus aureus*



Görsel 9.32: *Streptococcus thermophilus*



1. UYGULAMA : KATI KÜLTÜRDEN PREPARAT HAZIRLAMA

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Bikromatlı sülfirik asit çözeltisi kullanırken vücudunuzun herhangi bir yerine değdirmeyiniz.
- ✓ Yanıcı sıvılarla ateş yanında çalışmayınız.
- ✓ Lamları temizledikten sonra mutlaka kurutunuz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

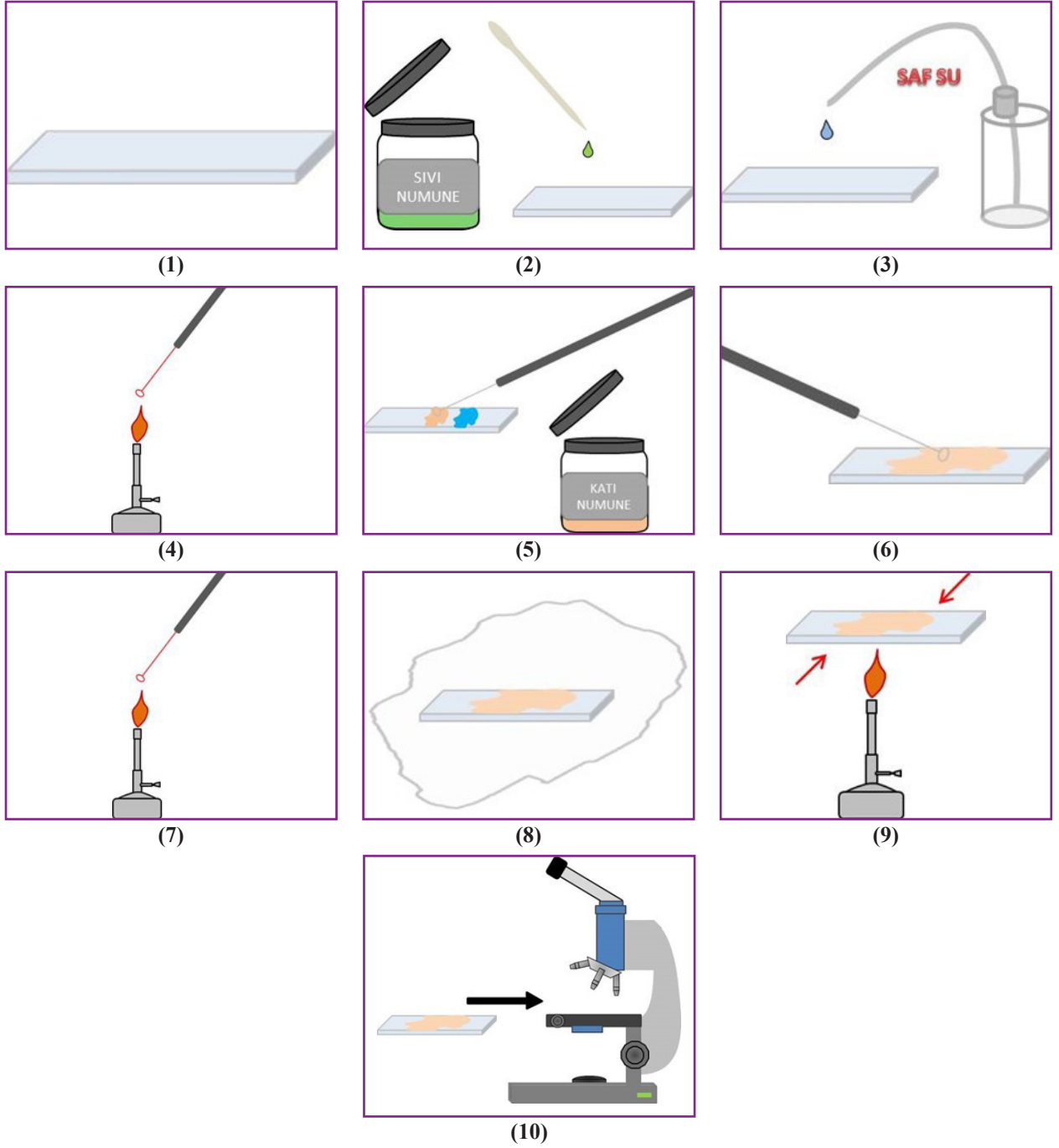
- | | | |
|-------------|-----------------|--------------------------------------|
| ✓ Lam | ✓ Pastör pipeti | ✓ Pens |
| ✓ Bek alevi | ✓ Beher | ✓ Bikromatlı sülfirik asit çözeltisi |
| ✓ Lamel | ✓ İğne öze | |
| ✓ Piset | ✓ Gıda numunesi | |

İşlem Basamakları

1. Temiz bir lam alınız.
2. İncelenecek örnek sıvı ise lama damlatmadan önce iyice çalkalayınız. Steril bir pipet yardımıyla bir damla damlatınız.
3. Örnek katı ise lama bir damla saf su koyunuz.
4. Özeyi yakıp soğutunuz.
5. Örnek alıp damlanın kenarında eziniz.
6. Sonra su damlası ile azar azar karıştırarak lamın üzerine ince bir tabaka hâlinde yayıp smear yapınız.
7. Özeyi tekrar yakıp soğutunuz.
8. Lamın havada kurumasını bekleyiniz.
9. Lamın alt yüzünü üç defa bek alevinden geçirerek mikroorganizmaların lam üzerinde tespitini (fiksasyon) yapınız.
10. Hazırlanan preparatı ışık mikroskopunda inceleyiniz.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 9.33: Preparat hazırlamanın uygulama aşamaları

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskopun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.



- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

Sonuç ve Yorum

“Kıatı Kıültürden Preparat Hazırlama” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Temiz bir lam aldı ve lamın ortasına bir damla saf su koydu.					
Özeyi yaktıktan sonra kıültürden örnek alır ve aldığı örneği su damlası ile ezdi.					
Lamın havada kurummasını bekledi.					
Lamın alt yüzünü üç defa bek alevinden geçirdi.					
Tekniğine uygun şekilde preparat hazırladı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını ve malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
	Form Puanı:			Gerçek Puanı:	

Değerlendirme: Form puanını 2 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.

**2. UYGULAMA : MİKROSKOP KULLANARAK DAHA ÖNCEDEN HAZIRLANMIŞ BİR PREPARATI İNCELEME****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Mikroskopun optik kısmına asla alkol değdirmeyiniz.
- ✓ Mikroskobu ıslak bırakmayınız.
- ✓ Mikroskopun optik kısımlarının temizliğinde mercek kâğıdı veya yumuşak dokulu bir tülbent kullanınız.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

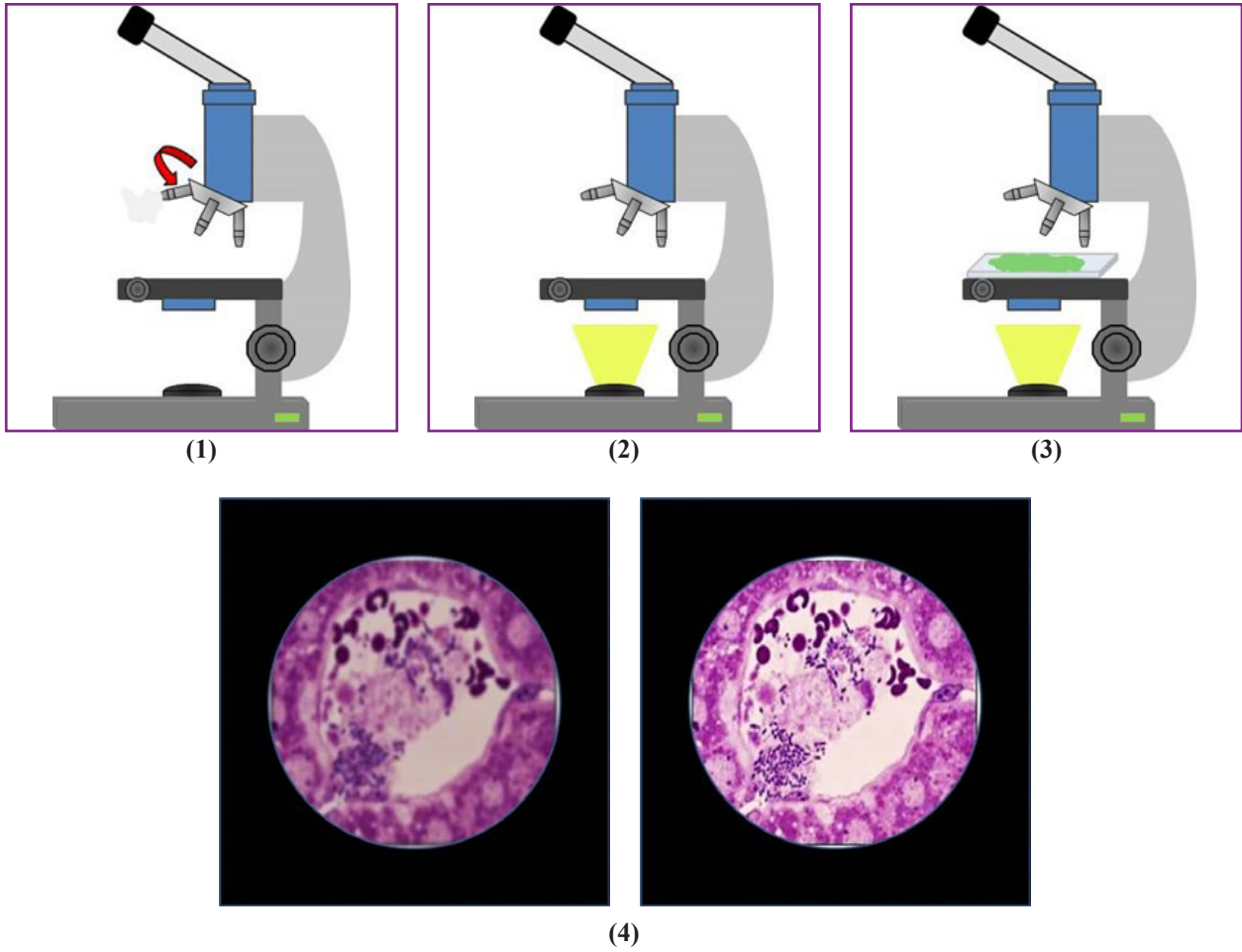
- ✓ Mikroskop
- ✓ Preparat
- ✓ Pens
- ✓ İmmersiyon yağı

İşlem Basamakları

1. Mikroskopun optik kısımlarını mercek kâğıdı veya yumuşak dokulu bir tülbent kullanarak temizleyiniz.
2. Mikroskopun lambasını yakınız ya da aynayı ışık kaynağına çeviriniz.
3. İncelenecek preparatı yerleştiriniz.
4. Objektifi ayarlayınız. Görüntüyü netleştirmeyi unutmamaya dikkat ediniz.
5. Görülen şekilleri çiziniz.
6. Görülen şekilleri değerlendiriniz.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 9.34: Mikroskop kullanarak preparatı inceleme aşamaları

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE "D" YANLIŞ İSE "Y" YAZINIZ.

1. () Bakteriler genel olarak saydamdır.
2. () Kullanılmamış lamaların kötü koşullarda saklanması incelemeyi olumsuz etkiler.
3. () Mikroorganizmalar, preparat hazırlama aşamasında şekil değişikliğine uğrar.
4. () Preparatlar, bek alevinin mavi kısmından geçirilir.
5. () Temizlenmiş lamalar, yumuşak dokulu bir tülbentle kurulanmalıdır.
6. () Yuvarlak şekilde görülen bakterilere genel olarak basil adı verilir.
7. () Mikroorganizmaların mikroskopik morfolojilerinin incelenmesinde herhangi bir sorunla karşılaşılmaz.
8. () Sarmal biçimli olan mikroorganizmaların kendi etrafındaki kıvrımları az veya çok sayıda olabilir.

AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

9. **Aşağıdakilerden hangisi preparatın tanımıdır?**
 - A) Temizleme çözeltilisidir.
 - B) Mikroorganizmaları tespit etme işlemidir.
 - C) Bir sterilizasyon yöntemidir.
 - D) Mikroskopta incelenmek üzere hazırlanmış numuneli lamdır.
 - E) Mikroorganizmaları smear işlemidir.
10. **Aşağıdakilerden hangisi preparat hazırlanırken dikkat edilecek noktalardan biridir?**
 - A) Preparat hazırlamada kullanılan araçlar temiz olmalıdır.
 - B) Preparat, üzerinden elle tutulmalıdır.
 - C) Lamaların yüzeyi çizik olmalıdır.
 - D) Hiç kullanılmamış lamaların temizlenmesine gerek yoktur.
 - E) Lamalar çok temiz, yağsız ve çiziksiz olmalıdır.
11. **Hiç kullanılmamış lamalar aşağıdakilerden hangisi ile temizlenmelidir?**
 - A) Hipokloritli su
 - B) Bikromatlı sülfirik asit çözeltisi
 - C) Fenol
 - D) Formol
 - E) Metanol



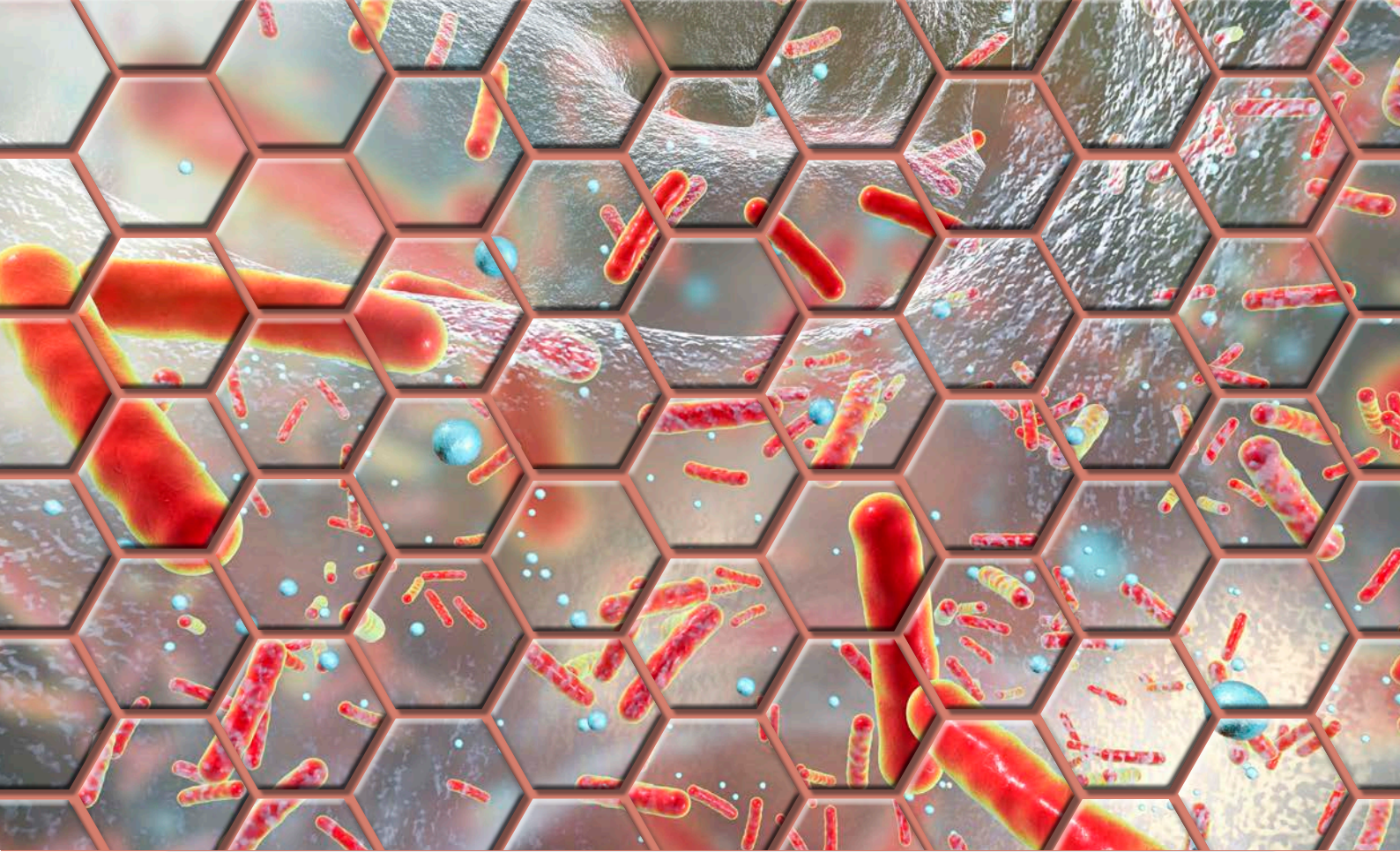


12. Aşağıdakilerden hangisi smear yapma olarak tanımlanır?
A) İncelenecek örneğin lam üzerine ince bir şekilde yayılması
B) Örneğin, lam üzerine kalın bir şekilde yayılması
C) Katı örneğin lam üzerinde incelenmesi
D) Sıvı örneğin lam üzerinde incelenmesi
E) Bakterilerin lama yapışmalarını sağlanması
13. Aşağıdakilerden hangisi yuvarlak biçimli bakterilerdendir?
A) Diplobasil
B) Diplokok
C) Sarsina
D) Spiroket
E) Vibrio
14. Kısa ve uzun zincirlere sahip çubuk şekilli bakterilere verilen ad aşağıdakilerden hangisidir?
A) Diplobasil
B) Sarsina
C) Stafilokok
D) Streptobasil
E) Streptokok
15. Mikroskop altında üzüm salkımı hâlinde görünen bakteriler aşağıdakilerden hangisine aittir?
A) Sarsina
B) Stafilokok
C) Spiroket
D) Streptokok
E) Vibrio
16. Tek kıvrımlı virgül hâlinde görülen bakterilere verilen ad aşağıdakilerden hangisidir?
A) Pleomorfik
B) Spiril
C) Spiroket
D) Tetrakok
E) Vibrio

10. ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROSKOBİK BOYAMA



Bu öğrenme biriminde;

- Mikroorganizma boyama işleminin önemini,
- Boyama çözeltilerinin çeşitlerini ve hazırlanmasını,
- Mikroorganizmaları boyama yöntemlerini uygulama yaparak öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 10.1. Boyama Yöntemine Çözelti Seçme
- 10.2. Basit Boyama
- 10.3. Gram Boyama
- 10.4. Spor Boyama

TEMEL KAVRAMLAR

kristal viyole primer boya negatif boyama smear



10. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Mikroorganizmaları boyama işlemi sizce neden yapılır? Sınıfta tartışınız.
2. Hangi mikroorganizmalar boyanabilir? Araştırınız.

10.1. BOYAMA YÖNTEMİNE ÇÖZELTİ SEÇME

Mikroorganizmaların canlı hâldeyken mikroskopta incelenmeleri zordur. Özellikle canlı hâlde hareketli olduklarından inceleme yapılacak mikroorganizmalar görüntü alanından kayabilmekte ve başka mikroorganizmalarla karışabilmektedir. Smear (yayma) işlemi, tespit (fiksasyon) işlemi ve boyama işlemi ile mikroorganizmalar buldukları zemine sabitlenir. Zemine sabitlenen mikroorganizmalar zeminden farklı renkte olacakları için kolayca ayırt edilir. Ayrıca boyama işlemi ile mikroorganizmaların hücresel içyapıları ve morfolojik tipleri daha rahat gözlemlenebilmektedir.

10.1.1. Mikroorganizmaları Boyamada Kullanılan Çözeltiler

Mikroorganizmalar, boya çözeltileri ile farklı reaksiyon verdiklerinden tüm mikroorganizmaları tek bir boya çözeltisi ile boyamak mümkün değildir. Buna bağlı olarak mikroorganizmaları tanımada mikroorganizmanın özelliğine göre farklı boya çözeltisi seçilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Mikrobiyoloji alanında elde edilmiş şekline göre boya çözeltileri ikiye ayrılır:

1. **Doğal Boyalar:** Genellikle bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilir ve gıda mikrobiyolojisi alanında pek kullanılmaz. Bunlara örnek olarak indigo, kınakına ve orsein verilebilir.
2. **Yapay (Sentetik) Boyalar:** Laboratuvar koşullarında üretilen boyalardır ve gıda mikrobiyolojisi alanında en fazla bu tip boyalar kullanılır. Sayıları oldukça fazladır. Bunlara örnek olarak asit fuksin, metilen mavisi, safranin ve eosin verilebilir.

Mikrobiyolojide kullanılan boyalar için bir diğer sınıflandırma çeşidi ise kimyasal özelliklerine göre sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmaya göre üç tip boya vardır:

1. **Bazik Boyalar:** Kimyasal yapısı pozitif yüklü olduğu için negatif yüklü hücreleri boyar. Boyamada en sık kullanılan boya çeşididir.
2. **Asidik Boyalar:** Kimyasal yapısı negatif yüklü olduğu için pozitif yüklü hücreleri boyar.
3. **Nötral Boyalar:** Kimyasal yapılarında hem asidik hem bazik özellik gösterdikleri için hücre boyamasında hem pozitif hem negatif yüklü hücreleri boyayabilir. Bu boyalar genellikle kan hücresi boyamasında kullanılır.

10.1.2. Boya Çözeltisi Hazırlama

Boya çözeltisi genel bir isim olsa da her boya çözeltisi aynı şekilde hazırlanmaz. Bazılarının hazırlanmasında etil alkol kullanılırken bazılarının hazırlanmasında damıtık (saf) su kullanılır. Tablo 10.1'de en sık kullanılan boya çözeltileri ve bu boya çözeltilerinin hazırlanışları verilmiştir.

Tablo 10.1: Boya Çözeltileri ve Hazırlanışları



BOYA ÇÖZELTİSİ	KULLANILAN MİKTAR	HAZIRLANIŞI	KULLANIM AMACI
SAFRANİN	0,5 g	Tartılan boya 10 ml etanol (%95'lik) içerisinde çözündürülür. 100 ml damıtık su ilave edilerek iyice karıştırılır ve süzülür.	Basit ve spor boyama
METİLEN MAVİSİ	0,3 g	Tartılan boya 30 ml etanol (%95'lik) içerisinde çözündürülür. 70 ml damıtık su ilave edilerek iyice karıştırılır ve süzülür.	Basit ve aside dirençli boyama
KRİSTAL VİYOLE	2 g	Tartılan boya 20 ml etanol (%95'lik) içerisinde çözündürülür. 0,8 g amonyum okzalat tartılır ve 80 ml damıtık su içerisinde çözündürülür. İki çözelti iyice karıştırılır ve süzülür.	Basit ve Gram boyama
NİGROSİN	10 g	Tartılan boya 100 ml damıtık su içerisine aktarılır ve kaynar su banyosunda yarım saat tutulur. Üzerine 0,5 ml formalin koruyucu olarak eklenir. Çift katlı filtre kâğıdından süzülür.	Negatif boyama
MALAŞİT YEŞİLİ	5 g	Tartılan boya 100 ml damıtık su içerisinde çözündürülür.	Spor boyama
BAZİK FUKSİN	0,1 g	Tartılan boya 100 ml damıtık su içerisinde çözündürülür.	Basit ve Gram boyama
KARBOL FUKSİN	0,3 g	Tartılan boya 10 ml etanol (%95'lik) içerisinde çözündürülür. 90 ml %5'lik fenol çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırılır. 1 gün dinlendirildikten sonra kullanılır.	Aside dirençli boyama
SULU KARBOL FUKSİN		Karbollu fuksin boya çözeltisi 10 kat sulandırılarak hazırlanır.	Basit ve Gram boyama
LUGOL	İyot 1 g KI 2 g	İyot ile KI havanda iyice ezilir. Sonra 100 ml damıtık su yavaş yavaş katılır ve iyice karıştırılır.	Gram boyama

10.1.3. Boya Çözeltisi Kullanma ve Saklama Koşulları

Boya çözeltileri, içeriğinde bulunan kimyasalların etkilerine göre farklı kullanım ve saklanma koşulları gerektirir. Genel olarak içerisinde etil alkol bulunanlar, parlayıcı etkide olduğu için çalışma sırasında ateş ile temastan kaçınılmalıdır. İyot içerikli olanlar ışıktan etkilendikleri için koyu renkli şişelerde saklanmalıdır. Tablo 10.2'de en sık kullanılan boya çözeltilerinin kullanım ve saklama koşulları verilmiştir.



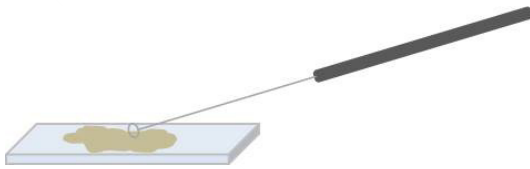
Tablo 10.2: Boya Çözeltilerinin Kullanım ve Saklama Koşulları

BOYA ÇÖZELTİSİ	KULLANIM VE SAKLAMA KOŞULLARI
SAFRANİN	Kabı sıkıca kapalı olarak kuru ve iyi havalandırılmış yerlerde saklayınız. Isıdan ve tutuşmaya yol açabilecek her şeyden uzak tutunuz.
METİLEN MAVİSİ	Hazırlandıktan sonra 28 günden fazla kullanılmamalıdır. Serin ve karanlık bir yerde muhafaza ediniz. Hazırlanma ve son kullanma tarihini yazınız.
KRİSTAL VİYOLE	Ağzı sıkıca kapalı olarak kuru ve iyi havalandırılmış yerlerde saklayınız. Isıdan ve tutuşmaya yol açabilecek her şeyden uzak tutunuz.
NİGROSİN	İçeriğinde önem arz edecek tehlikeli bir madde bulunmamaktadır. Kabı sıkıca kapalı olarak kuru ve iyi havalandırılmış yerlerde saklayınız.
MALAŞİT YEŞİLİ	Aşındırıcı etkilidir. Kabı sıkıca kapalı olarak kuru ve iyi havalandırılmış yerlerde saklayınız.
BAZİK FUKSİN	Aşındırıcı özelliğinden dolayı önem arz etmektedir. Kabı sıkıca kapalı olarak kuru ve iyi havalandırılmış yerlerde saklayınız. Isıdan ve tutuşmaya yol açabilecek her şeyden uzak tutunuz.
KARBOL FUKSİN	Aşındırıcı ve patlayıcı özelliğinden dolayı önem arz etmektedir. Kabı sıkıca kapalı olarak kuru ve iyi havalandırılmış yerlerde saklayınız. Isıdan ve tutuşmaya yol açabilecek her şeyden uzak tutunuz.
SULU KARBOL FUKSİN	Aşındırıcı ve patlayıcı özelliğinden dolayı önem arz etmektedir. Kabı sıkıca kapalı olarak kuru ve iyi havalandırılmış yerlerde saklayınız. Isıdan ve tutuşmaya yol açabilecek her şeyden uzak tutunuz.
LUGOL	İşıktan uzak tutunuz. Kapağı sıkıca kapalı olarak kuru ve iyi havalandırılmış yerlerde saklayınız.

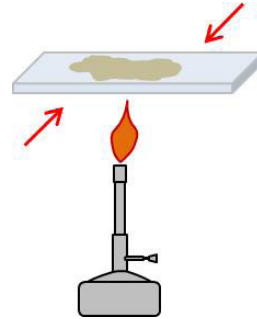
10.1.4. Boyama İşlemine Preparat Hazırlanması

Mikroorganizmaların boyanarak incelenmeleri için preparatların hazırlanmasında boyama haricinde 2 aşama bulunmaktadır:

- 1. Smear İşlemi:** Mikroorganizma içeren numunenin lam üzerine bir öze yardımıyla yayılması işlemidir (Görsel 10.1).
- 2. Fiksasyon (Tespit):** Isıl işlem uygulanarak (alevde fiksasyon) veya kimyasal maddeler kullanılarak (kimyasal maddelerle fiksasyon) lam üzerine yayılan mikroorganizmaların canlılığını kaybedip lama yapışmasını sağlama işlemidir (Görsel 10.2).



Görsel 10.1: Smear işlemi



Görsel 10.2: Fiksasyon işlemi

Preparatı hazırlanacak numune katı ise temiz bir lamın ortasına bir damla damıtık su alınır. Bu suyun yanına kültürden bir öze dolusu numune alınarak su damlası ile azar azar karıştırılır ve lamın yüzeyine ince bir film hâlinde yayılır (smear işlemi). Numunenin sıvı ve kültür yoğunluğu az ise damıtık su kullanılmadan

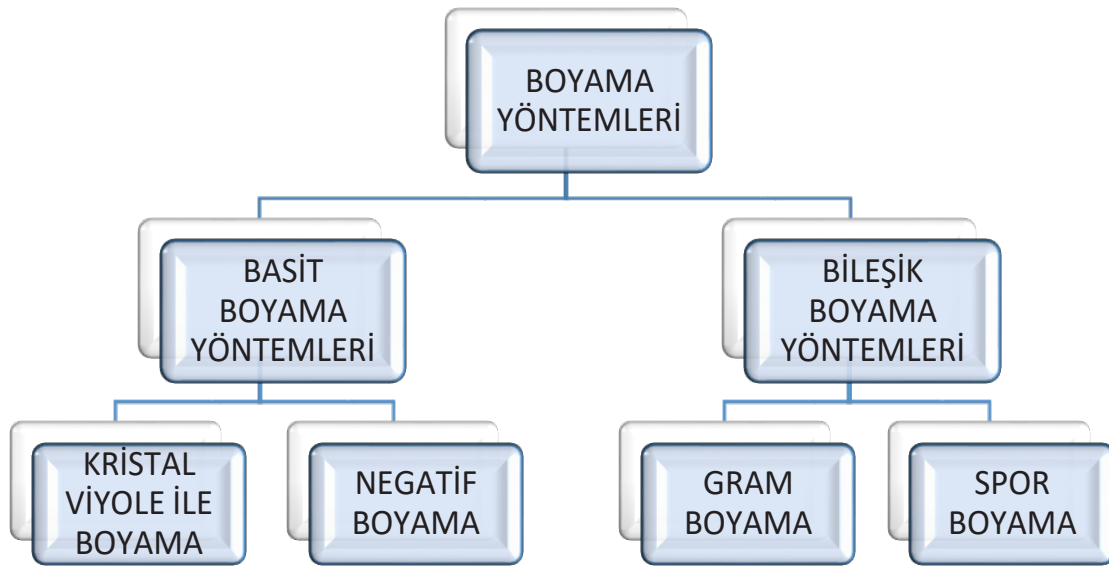


direkt lam üzerine bir damla numune alınarak da yüzeye yayma işlemi yapılabilir.

Smear işleminden sonra preparatın havada kuruması beklenir. Kuruma işlemi bittikten sonra mikroorganizmaların canlılığını yitirmesi ve lama yapışması için lam, bek alevi üzerinden 3 defa geçirilir (alevle fiksasyon işlemi). Bu işlem seri olarak yapılmalıdır. Aksi hâlde mikroorganizmalar aşırı sıcaklıktan deforme olabilir ve boyanmaları güçleşir. Kimyasal maddelerle fiksasyon işlemi yapılacak ise etil alkol, metil alkol veya formalin gibi kimyasal maddelerden bir damla, lam üzerine damlatılır ve maddenin kuruması beklenir. Bu aşamada kimyasal maddeden lama fazla damlatılması, lam üzerinden numunenin akmasına sebep olabileceği için dikkatli olmak gereklidir.

10.2. BASİT BOYAMA

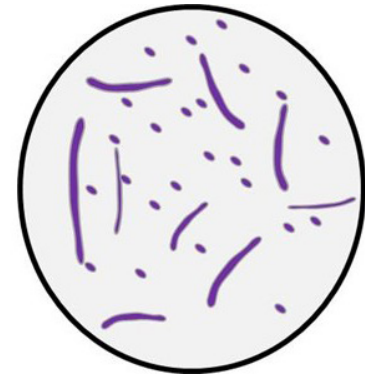
Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan boyama yöntemleri iki ana başlıkta toplanır: Basit boyama yöntemi ve bileşik boyama yöntemi.



Hızlı bir şekilde mikroorganizma hakkında bilgi edinilebilen ve tek bir boya çözeltisi kullanılan yöntemdir. Hazırlanan preparata boyama işlemi bir kere yapılır ve mikroskop altında inceleme işlemine geçilir. Özellikle bakterilerin hücre duvarları negatif yüklü olduğu için pozitif yüklü yani bazik boyalar kullanılarak bakteriler boyanır. Bu boyama yöntemlerinden en sık kullanılanları, kristal viyole ile boyama ve negatif boyamadır.

10.2.1. Kristal Viyole ile Boyama

Bu yöntemde, hazırlanmış preparat boyama düzeneğinin üzerine konur. Numunenin üzeri kristal viyole çözeltisi ile kaplanır ve 20-30 saniye kadar bekletilir. Süre dolunca boya, preparatın üzerinden akıtılır ve preparat saf su ile yıkanır. Yıkama işleminden sonra preparat kurutulur, üzerine bir iki damla immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta immersiyon objektifi (100X) ile incelenir. Mikroorganizmalar mikroskopta mor renkli olarak görünür (Görsel 10.3).

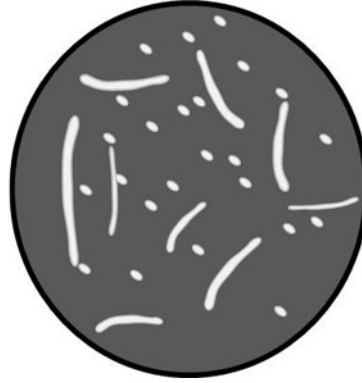


Görsel 10.3: Kristal viyole ile boyamada mikroskop görüntüsü



10.2.2. Negatif Boyama

Bu yöntemin en önemli özelliği, kullanılan boya çözeltisi asidik özellikte olduğu ve mikroorganizmanın hücre duvarından geçemediği için mikroorganizmanın boyanmayıp zeminin boyanarak mikroorganizmanın büyüklüğü ve yapısı hakkında bilgi edinilmesidir. Bu yöntemde hazır preparat kullanılmaz. Temiz bir lamın ucuna bir öze ile örnek alınır. Üzerine bir iki damla nigrosin veya çini mürekkebi çözeltisi damlatılır. Örnek ile boya çözeltisi birbirine karıştırılır ve lamın üzerine yayma işlemi yapılır. Hazırlanan preparat kurutulur, üzerine bir iki damla immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta immersiyon objektifi (100 X) ile incelenir. Mikroorganizmalar, mikroskopta şeffaf renkli, zemin ise koyu renkli görünür (Görsel 10.4)



Görsel 10.4: Negatif boyamada mikroskop görüntüsü

10.3. GRAM BOYAMA

En az üç kimyasal madde ile iki veya daha fazla boya çözeltisi kullanılarak yapılan boyama yöntemidir. Bu üç kimyasalın birincisine **primer boya** adı verilir. Primer boyanın görevi, rengini tüm hücreye vermektir. İkinci kimyasal, **renk giderici** (dekolorizasyon) olarak adlandırılır. Renk gidericinin görevi, primer boyanın hücreden veya hücrenin belli bir yapısından çıkmasına yardımcı olmaktır. Üçüncü kimyasala **zıt boya** adı verilir. Zıt boya, primer boyaya karşıttır. Renk giderici uygulandıktan sonra primer boya hücreden çıktı ise zıt boyamayla hücre, zıt boya rengini alacaktır. Eğer renk giderici uygulandıktan sonra primer boya hücreden çıkmadıysa zıt boya hücreyi boyayamayacaktır. Bu şekilde de hücre tipleri ve ayrımları yapılmış olacaktır. Bileşik boyama yöntemlerinden en sık kullanılanları Gram boyama ve spor boyamadır.

Bakteriyoloji ve bakteri boyamada çok önemli olan bu yöntem, 1884 yılında yönteme ismini veren Christian Gram tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemle bakteriler hücre yapılarına göre iki büyük gruba ayrılmıştır. Bir gruba Gram pozitif bakteriler, bir gruba da Gram negatif bakteriler adı verilmiştir.

Gram boyama yöntemindeki kimyasalların çeşidi ve kullanım amacı aşağıda verilmiştir:

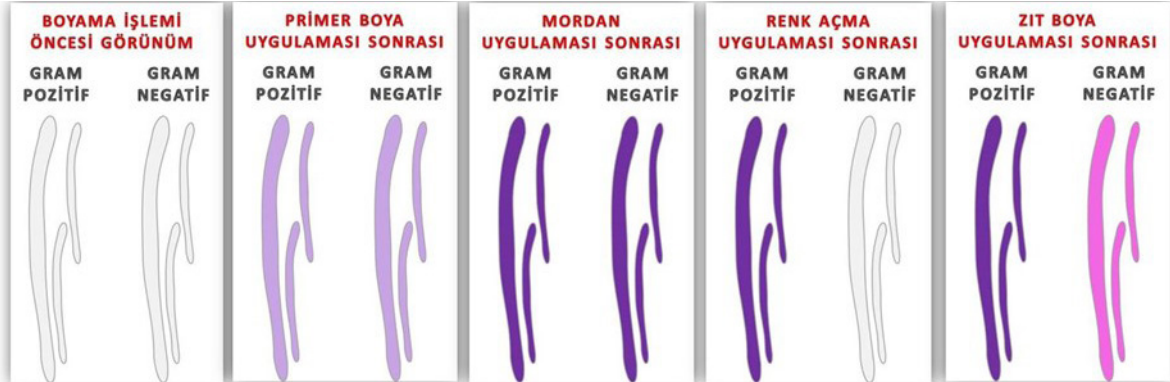
Primer (Birincil) Boya: Primer boya, hazırlanan preparata uygulanan ilk boyadır. Bu işlem için kristal viyole çözeltisi kullanılır ve ortamdaki tüm mikroorganizmalar mor kristal renge boyanır.

Mordan (Gram İyot Çözeltisi): Bu çözelti, primer boyanın hücre içerisinde bağlanma özelliğini artırır. Bu işleme **renk sabitleştirme** (mordan) denir. Hücre içinde bulunan mor rengi yoğunlaştırdığından tüm bakteriler koyu mor renkte görünür.

Renk Açıcı (Renk Giderici): Bu işlem için %95'lik etil alkol çözeltisi kullanılır. Kullanılan etil alkol, Gram negatif bakterilerin hücre duvarını parçalayarak bu bakterilerin tuttuğu renk çözeltisini dışarıya bırakmasına ve bakterilerin renksizleşmesine neden olur. Gram pozitif bakterilerde de sadece hücre duvarında küçülme olur fakat tutulan renk çözeltisi dışarıya bırakılmaz.



Zıt Boya: Kullanılan boya çözeltisi genellikle sulu fuksin veya safranindir. Bu işlem uygulanırken renk açma işlemi ile mevcut rengini dışarıya bırakmış olan Gram negatif bakteriler pembe renge boyanırken Gram pozitif bakteriler ortamda mor renkli olarak kalır (Görsel 10.5).



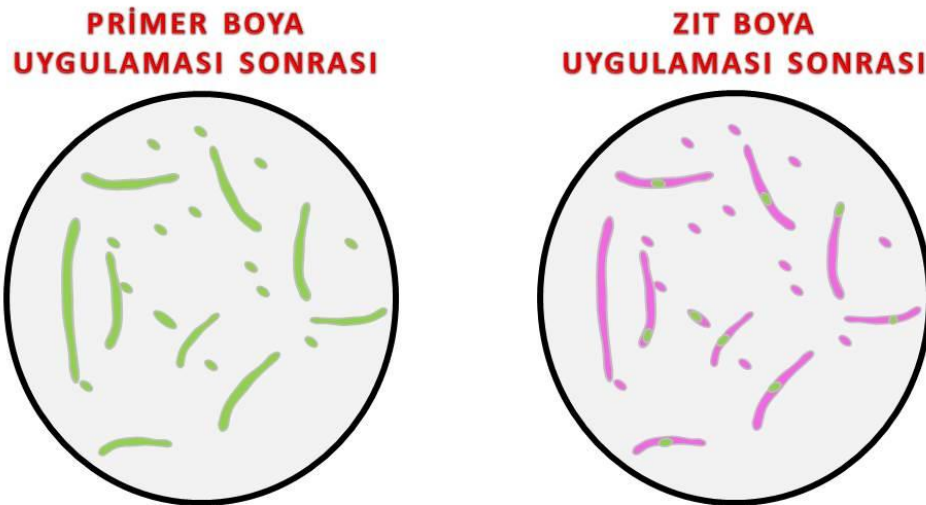
Görsel 10.5: Gram boyama işlemi basamaklarında bakterilerin örnek mikroskop görüntüleri

Gram boyamada dikkat edilmesi gereken en önemli noktalar; kullanılacak boya çözeltilerinin taze olması, kullanılacak bakteri kültürünün 24 saatlik olması ve preparat hazırlanırken uygulanan işlemlere dikkat edilmesidir. Bu noktalara dikkat edilmemesi durumunda yanlış sonuçlar alınabilir.

10.4. SPOR (ENDOSPOR) BOYAMA

Bakteriler çevre koşulları uygun olmadığında, kuvvetli kimyasallar ve radyasyon muamelesine karşı oldukça dirençli, ısıya çok dayanıklı, kalın çeperli ve oval bir yapı oluşturur. Bu yapıya **endospor** adı verilir. *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerinin türleri endospora sahiptir. Bu bakteriler, endosporlarını hücrenin çeşitli yerlerinde oluşturarak farklılık yaratmaktadır. Endosporların hücredeki yerlerini ve özelliklerini belirlemek için boyama yapılması gerekir. Ancak endosporlar fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı yüksek dirence sahip olduklarından boya çözeltilerini bünyelerine almaz. Bu yüzden boyama işlemi yapılırken endosporun direncini kırabilmek için ısı işlemi uygulanması ile boyama yapılması gerekmektedir.

Spor boyamada primer boya olarak malaşit yeşili çözeltisi kullanılır. Çözeltinin endospora etki edebilmesi için boyama işlemi kaynar su banyosu üzerinde yapılır. Primer boya işlemi tamamlandıktan sonra preparat soğutulup saf su ile yıkanır ve sonrasında safranin ile zıt boyama işlemi yapılır. Primer boya işlemi yapıldığında ortamdaki tüm hücreler yeşil hâlde iken zıt boyama işlemi sonunda vejetatif hücreler pembe, endosporlar yeşil renkte görünür (Görsel 10.6).



Görsel 10.6: Spor boyama işlemi basamaklarında bakterilerin örnek mikroskop görüntüleri

**1. UYGULAMA : BOYA ÇÖZELTİSİ HAZIRLAMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

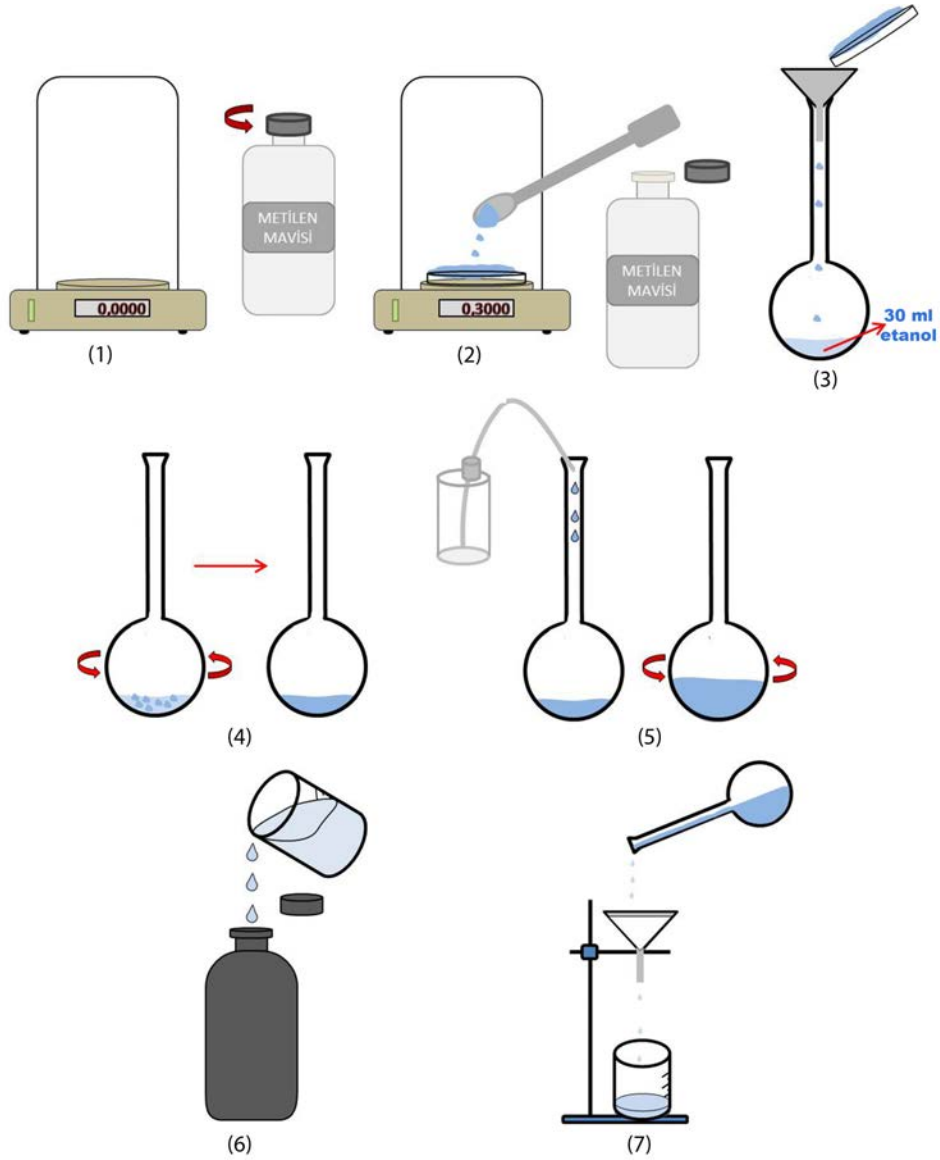
Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | |
|-------------------------|---------------------------------|----------|
| ✓ Saat camı | ✓ 250 ml'lik beher | ✓ Spatül |
| ✓ Analitik terazi | ✓ Süzgeç kâğıdı | ✓ Huni |
| ✓ 250 ml'lik balon joje | ✓ 1.000 ml'lik koyu renkli şişe | ✓ Mezür |
| ✓ Metilen mavisi | ✓ Etanol | |

İşlem Basamakları

1. Toz hâldeki metilen mavisini analitik terazinin yanına alarak kapağı dikkatlice açınız.
2. Analitik terazinin içine saat camı yerleştirilerek spatül ile 0,3 g toz metilen mavisi tartınız.
3. Metilen mavisi bulunan saat camını, içinde 30 ml etanol bulunan 250 ml'lik balon jogenin içerisine huni yardımıyla boşaltınız.
4. Balon jodayı hafif çalkalayarak toz metilen mavisinin çözünmesini sağlayınız.
5. Mezür ile ölçülüp pisete konmuş 70 ml saf suyu balon jodaye ilave ediniz ve çalkalamaya devam ediniz.
6. Çalkalama işleminden sonra 250 ml'lik behere basit süzme düzeneği kurarak süzme işlemini yapınız.
7. Süzme işlemi sonunda hazırlanan çözeltiliyi 100 ml'lik koyu renkli cam şişeye alınız, etiketini hazırlayınız ve ağzı sıkıca kapalı olarak kuru ve iyi havalandırılmış yerlerde depolayınız.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 10.7: Boya çözeltisi hazırlama uygulaması

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.





Sonuç ve Yorum

“Boya Çözeltisi Hazırlama” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Mikroorganizmaları boyamada kullanılan çözeltileri hazırladı.					
Tekniğine uygun olarak çözeltilere etiket hazırladı.					
Çözeltileri uygun şartlarda muhafaza etti.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					

Form Puanı:

Gerçek Puanı:

Değerlendirme: Form puanını 2,5 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.



2. UYGULAMA : BOYAMA İŞLEMİ İÇİN PREPARAT HAZIRLAMA



İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

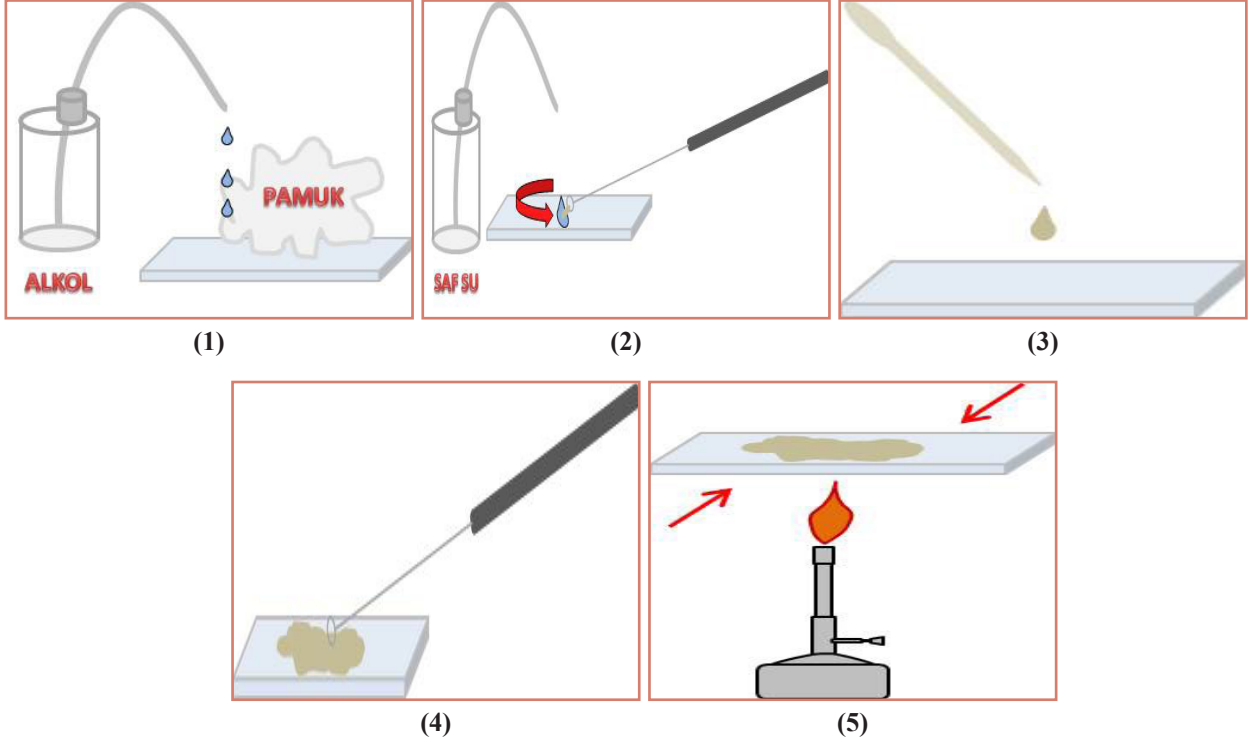
- | | | |
|-------------------|---------------------|-------------|
| ✓ Lam | ✓ Saf su | ✓ Bek alevi |
| ✓ Alkol çözeltisi | ✓ Yuvarlak uçlu öze | ✓ Piset |

İşlem Basamakları

1. Temiz ve çiziksiz bir lam alınız, alkol ile dezenfekte ediniz.
2. Numune katı ise lamın üzerine bir damla saf su koyunuz ve yuvarlak uçlu öze ile numuneden bir miktar alıp bu su ile karıştırınız.
3. Numune sıvı ise lamın üzerine numuneden 1 damla alınız.
4. Numuneyi lamın üzerine yayınız ve kurummasını bekleyiniz (smear).
5. Kuruma işlemi tamamlanınca lamı 20-30 sn. süreyle bek alevinden geçirin ve bu işlemi 3 defa tekrarlayınız (fiksasyon).



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 10.8: Preparat hazırlama uygulaması

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhı alkol ile dezenfekte ediniz. Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözültisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Bek alevini kapatınız ve gaz çıkışını kontrol ediniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.



“Boyama İşlemi İçin Preparat Hazırlama” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU					
Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.					
ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Numuneyi uygun şekilde lam üzerinde hazırladı.					
Smear işlemi yaptı.					
Fiksasyon işlemi yaptı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:	Gerçek Puanı:				
Değerlendirme: Form puanını 2,5 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.					

**3. UYGULAMA : KRİSTAL VİYOLE İLE BASİT BOYAMA YAPMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

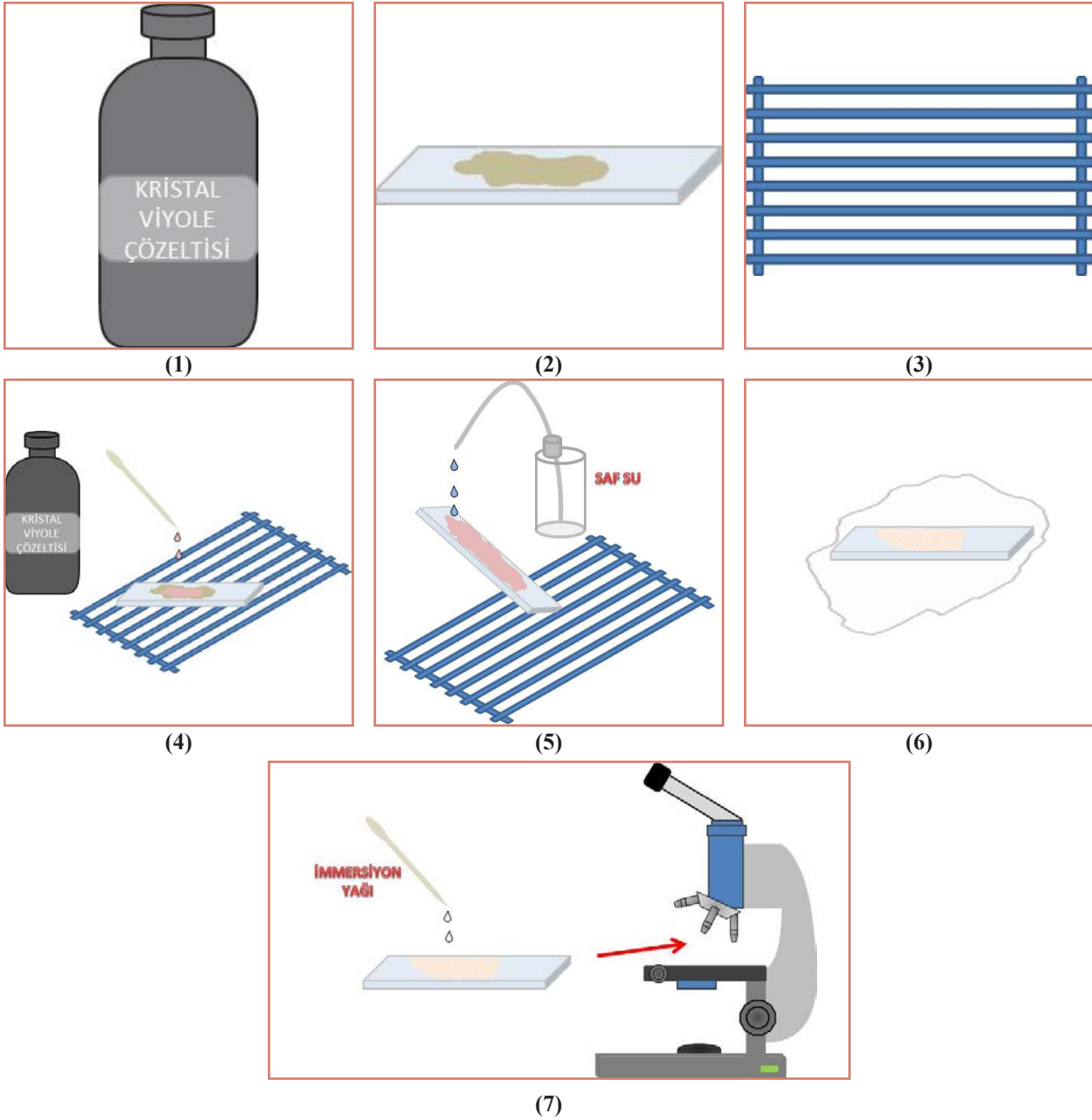
- | | | |
|---------------------------------|-------------|-----------------|
| ✓ Lam | ✓ Saf su | ✓ Boyama standı |
| ✓ Kristal viyole boya çözeltisi | ✓ Mikroskop | ✓ Pastör pipet |

İşlem Basamakları

1. 1. uygulama yaprağındaki işlem basamaklarını uygulayarak boya çözeltisini hazırlayınız veya hazır boya çözeltinizi tezgâha alınız.
2. 2. uygulama yaprağındaki işlem basamaklarını uygulayarak preparat hazırlayınız.
3. Boyama sistemini kurunuz.
4. Pastör pipet ile kristal viyole boya çözeltisinden alınız ve preparattaki numunenin üzerini kaplayarak 1 dk. bekleyiniz.
5. Süre sonunda fazla boyayı akıtınız ve preparatı saf su ile yıkayınız.
6. Yıkama işlemi sonunda preparatı kâğıt bir bezin üzerinde kurumaya alınız.
7. Kuruma işlemi tamamlandınca preparatın üzerine 1-2 damla immersiyon yağı damlatarak mikroskopta 100X objektifte inceleyiniz.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 10.9: Kristal viyole ile basit boyama uygulaması

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhı alkol ile dezenfekte ediniz. Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Mikroskobu, örtüsü ile kapatınız.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.



Sonuç ve Yorum

“Kristal Viyole ile Basit Boyama Yapma” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Boyama sistemini hazırladı.					
Kristal viyole ile boyama işlemini yaptı.					
Yıkama işlemini yaptı.					
Kurutma işlemini yaptı.					
Mikroskopta inceleme yaptı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
	Form Puanı:			Gerçek Puanı:	

Değerlendirme: Form puanını 2 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.



4. UYGULAMA : GRAM BOYAMA İLE BİLEŞİK BOYAMA YAPMA



İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | |
|---------------------------|-------------------|---------------------------------|
| ✓ Lam | ✓ Pastör pipet | ✓ Alkol çözeltisi |
| ✓ Saf su | ✓ Piset | ✓ Kristal viyole boya çözeltisi |
| ✓ Mikroskop | ✓ Lugol çözeltisi | |
| ✓ Safranin boya çözeltisi | ✓ Boyama standı | |

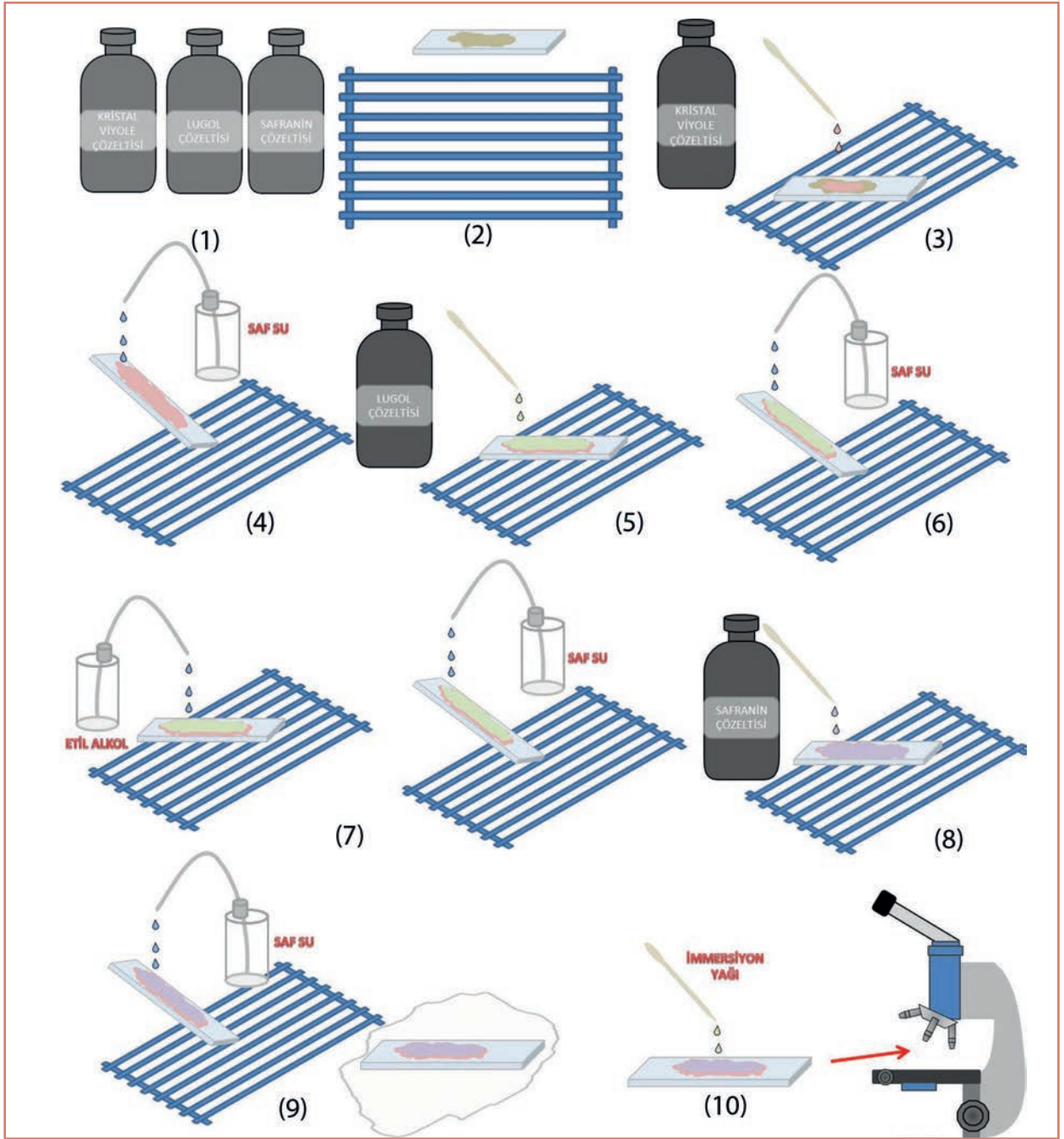
İşlem Basamakları

1. 1. uygulama yaprağındaki işlem basamaklarını uygulayarak kristal viyole, lugol ve safranin boya çözeltilerini hazırlayınız veya hazır boya çözeltilerini tezgâha alınız.
2. 2. uygulama yaprağındaki işlem basamaklarını uygulayarak preparat hazırlayınız ve boyama sistemini kurunuz.
3. Hazırlanan preparatı kristal viyole çözeltisi ile kaplayınız ve 1 dakika bekleyiniz.
4. Fazla boyayı dökünüz ve preparatı bol saf su ile yıkayınız.
5. Preparatın üzerini lugol çözeltisi (gram iyot çözeltisi) ile kaplayınız ve 1 dakika bekleyiniz.
6. Lugol çözeltisinin fazlasını dökünüz ve preparatı bol saf su ile yıkayınız.
7. Yıkama işleminden sonra dekolorizasyon işlemi için preparatın üzerine %95'lik etil alkol yayınız ve 10-15 saniye bekleyiniz. Süre sonunda preparatı saf su ile yıkayınız.
8. Yıkama işleminden sonra preparatın üzerine karşıt boya olarak safranin ekleyiniz ve 20-30 saniye bekleyiniz.
9. Fazla boyayı dökerek preparatı bol saf su ile yıkayınız ve havada ya da kurutma kâğıdı üzerinde kurutunuz.



10. Preparatı mikroskop tablasına koyarak üzerine bir iki damla immersiyon yağı damlatıp 100X objektifi ile incelemeye geçiniz.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 10.10: Gram boyama ile bileşik boyama uygulaması

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhı alkol ile dezenfekte ediniz. Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak



malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.

- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Mikroskobu, örtüsü ile kapatınız.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

Sonuç ve Yorum

“Gram Boyama ile Bileşik Boyama Yapma” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Kristal viyole ile boyama işlemini yaptı.					
Mordan işlemini yaptı.					
Dekolorizasyon işlemini yaptı.					
Safranin ile boyama işlemini yaptı.					
Mikroskopta inceleme yaptı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:			Gerçek Puanı:		

Değerlendirme: Form puanını 2 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.



5. UYGULAMA : SPOR BOYAMA İLE BİLEŞİK BOYAMA YAPMA

İŞ Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- √ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (nlk, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- √ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- √ çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- √ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- √ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- √ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- √ Analizde kullanılacak zltelerin kapağını dikkatli açınız ve zltelerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- √ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun Şekilde imha ediniz.
- √ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- √ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

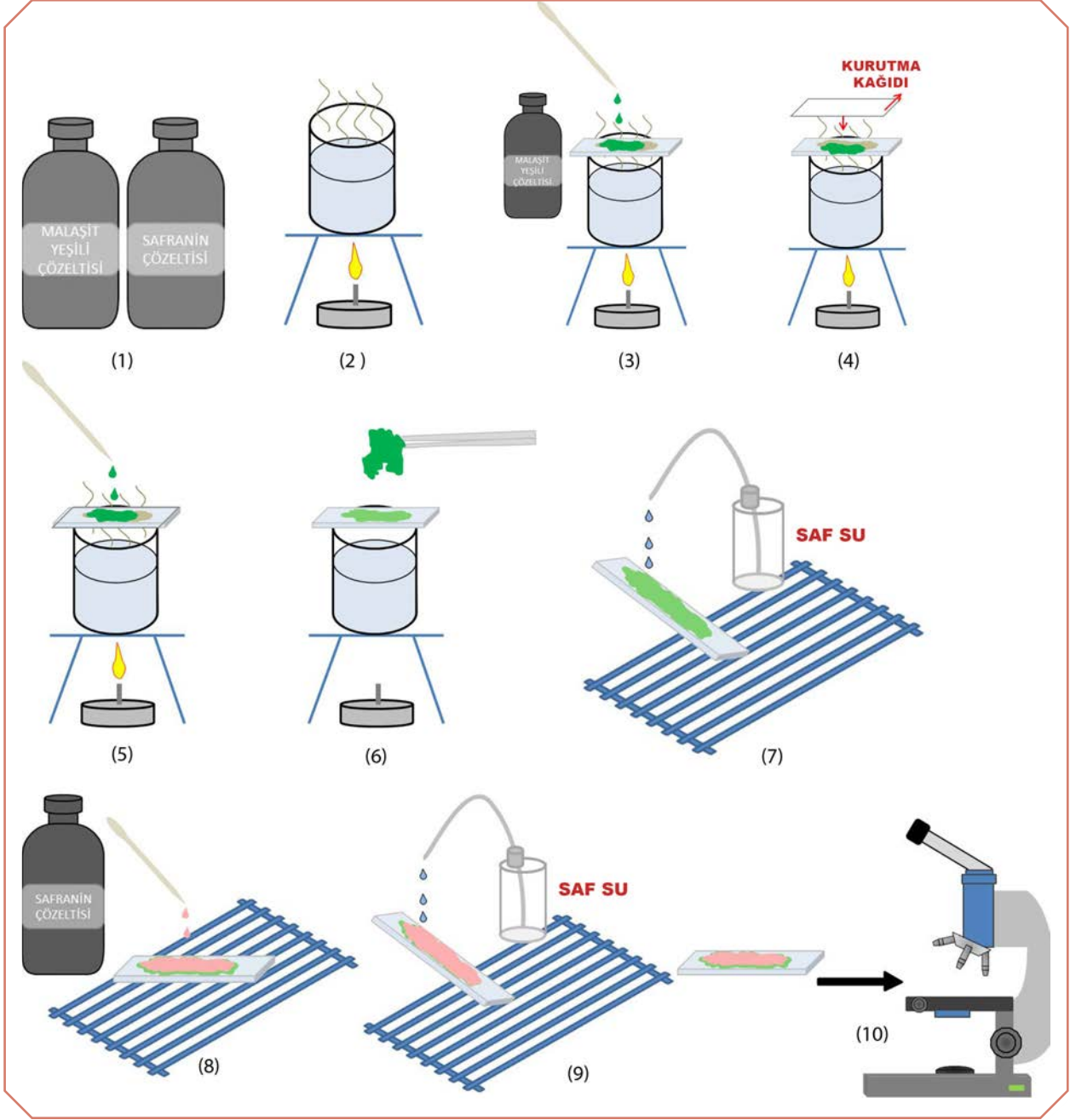
Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | | |
|----------|---------------------------------|-------------|----------------|
| √ Lam | √ Malaşit yeşili boya çözültisi | √ Bek alevi | √ Beher, pens |
| √ Saf su | √ Safranin boya çözültisi | √ Piset | √ Kurutma kğı |

İŞlem Basamakları

1. 1. uygulama yapağındaki işlem basamaklarını uygulayarak malaşit yeşili ve safranin boya zltelerini hazırlayınız veya hazır boya zltelerini tezgâha alınız.
2. 2. uygulama yapağındaki işlem basamaklarını uygulayarak preparat hazırlayınız ve beherin içerisine su koyarak kaynar su banyosu düzeneği hazırlayınız.
3. Preparatı beherin içine düŐmeyecek Şekilde st kısma koyunuz ve preparatın üzerini malaşit yeşili boya çözültisi ile kaplayınız.
4. Preparatta boya çözültisi varken üzerine preparat boyutunda kesilmiŐ kurutma kğı koyunuz.
5. Boya zltisini çeken kurutma kğı ıslanacaktır. Bu ıslaklığı devamlı kontrol ederek kurutma kğının kurummasına izin vermeden malaşit yeşili eklemeye devam ediniz.
6. 5-6 dk. süre sonunda pens ile preparatın üzerindeki kurutma kğını alınız.
7. Preparatı saf su ile yıkayarak fazla boyanın akmasını sağlayınız.
8. Yıkama işlemi sonunda preparatın üzerine safranin boya zltisini dökünüz ve 20-30 sn. bekleyiniz.
9. Süre sonunda preparatı saf su ile yıkayınız ve oda koşullarında kurumaya bırakınız.
10. Preparatı mikroskop tablasına koyarak üzerine bir iki damla immersiyon yağı damlatıp 100X objektifi ile incelemeye geçiniz.

İşlem Uygulama Şeması



Görsel 10.11: Spor boyama ile bileşik boyama uygulaması

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhı alkol ile dezenfekte ediniz. Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Mikroskobu, örtüsü ile kapatınız.





- ✓ Bek alevini kapatınız ve gaz çıkışını kontrol ediniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

Sonuç ve Yorum

“Spor Boyama ile Bileşik Boyama Yapma” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Malaşit yeşili ile boyama işlemini yaptı.					
Yıkama işlemini yaptı.					
Safranin ile boyama işlemini yaptı.					
Kurutma işlemini yaptı.					
Mikroskopta inceleme yaptı.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını, malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:					Gerçek Puanı:

Değerlendirme: Form puanını 2 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE “D” YANLIŞ İSE “Y” YAZINIZ.

- () Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen boyalara yapay boyalar denir.
- () Alevde fiksasyon işleminde preparat, alev üzerinde uzunca tutularak mikroorganizmanın lama iyice yapışması sağlanır.
- () Basit boyama yönteminde genellikle bazik boyaların kullanılmasının sebebi, bakterilerin hücre duvarlarının pozitif olmasıdır.
- () Kristal viyole ile basit boyama sonrasında mikroorganizma şeffaf görünür.

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

- Mikroorganizma içeren numunenin bir öze yardımıyla lam üzerine yayılmasına denir.
- Mikroorganizmanın canlılığını yitirerek ısı işlem veya kimyasal yollarla lama yapışmasını sağlamak için yapılan işleme denir.
- Metilen mavisi, safranin gibi boya çözeltileri elde edilmiş şekline göre boyalardır.
- Bileşik boyama yöntemlerinde, primer boyanın hücreden veya hücrenin belli bir yapısından çıkmasına yardımcı olan kimyasallara denir.
- Gram boyamada kullanılacak boya çözeltilerinin taze olması ve kullanılacak bakteri kültürünün olması önemlidir.
- Spor boyama yönteminde, çözeltilerin endospora etki edebilmesi için boyama işlemi üzerinde yapılır.

AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

11. Aşağıdakilerden hangisi yapay boyalardan değildir?

- Asit fuksin
- Eosin
- İndigo
- Metilen mavisi
- Safranin



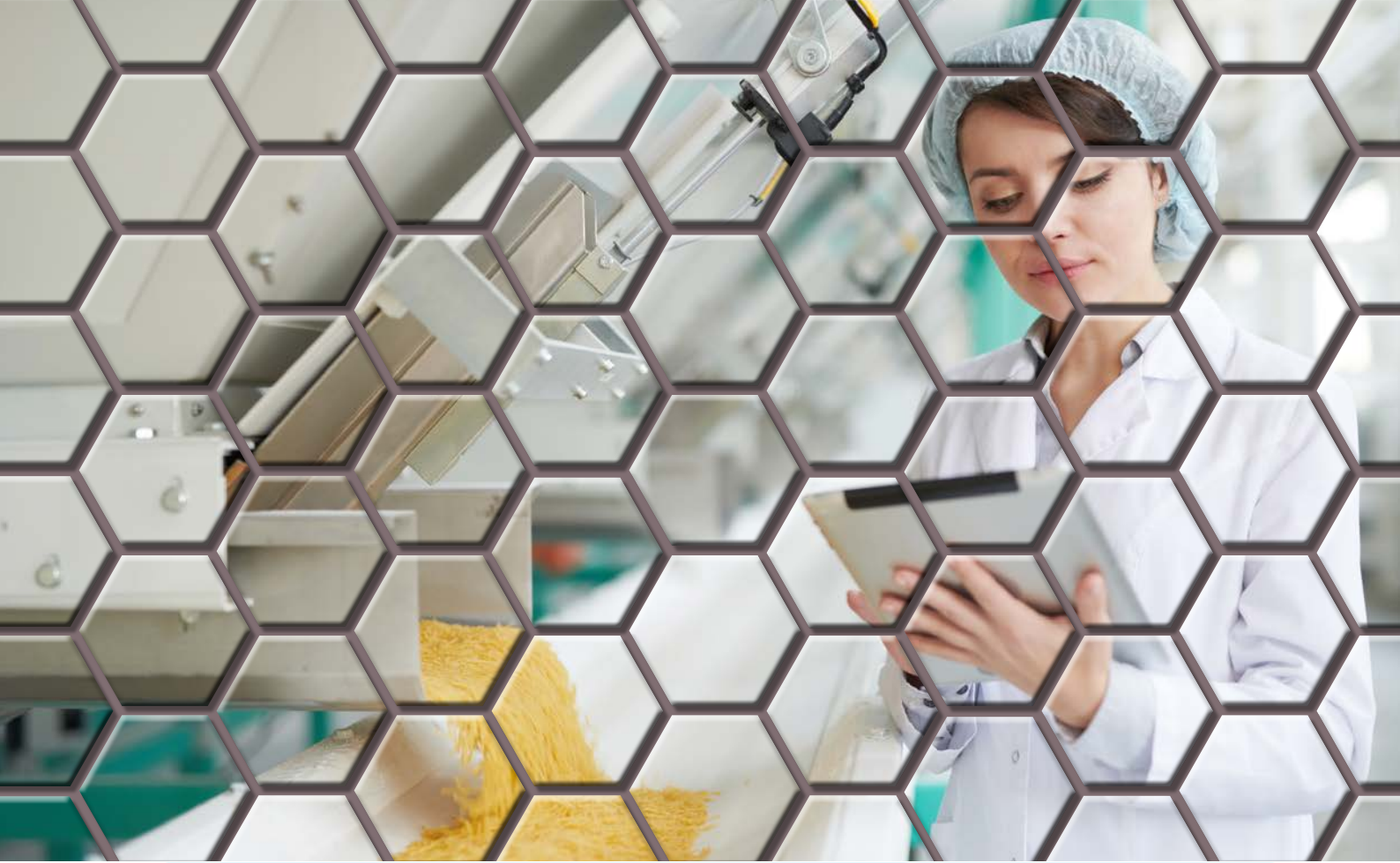


12. “Kimyasal yapısı negatif yüklü olduğu için pozitif yüklü hücreleri boyayan boyalardır.” tanımı aşağıdaki boyalardan hangisine aittir?
- A) Asidik
B) Bazik
C) Doğal
D) Nötral
E) Yapay
13. Kristal viyole ile yapılan basit boyamada mikroorganizmalar aşağıda verilen hangi renkte görülür?
- A) Kırmızı
B) Mor
C) Pembe
D) Şeffaf
E) Yeşil
14. Gram boyama ile yapılan bileşik boyamada Gram negatif-pozitif bakterilerin mikroskop altındaki rengi aşağıdakilerden hangisinde doğru olarak verilmiştir?
- A) Kırmızı-yeşil
B) Mor-kırmızı
C) Pembe-mor
D) Pembe-yeşil
E) Yeşil-mor
15. Spor boyama yönteminde zıt boyama işlemi sonunda endosporlar mikroskop altında hangi renkte görünür?
- A) Kırmızı
B) Mor
C) Pembe
D) Şeffaf
E) Yeşil

11. ÖĞRENME BİRİMİ



İŞLETME ORTAMINDA HİJYEN VE SANİTASYON KONTROLÜ



Bu öğrenme biriminde;

- İşletmelerde hijyen ve sanitasyon kontrolünün amacını,
- Çalışanların ellerinden ekim yapma aşamalarını ve dikkat edilecek noktaları,
- Kritik kontrol noktalarında mikrobiyolojik kontrollerin önemini, programlarını ve özelliklerini,
- Saptanmış kritik kontrol noktalarından mikrobiyolojik örnek alma aşamalarını öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 11.1. Çalışanların Elllerinden Ekim Yapma
- 11.2. Kritik Kontrol Noktalarından Ekim Yapma
- 11.3. İşletme Ortamından Ekim Yapma

TEMEL KAVRAMLAR

Hijyen aseptik düzeltici faaliyet mikrobiyolojik tehlike kritik kontrol noktası HACCP



11. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. İşletmelerde hijyen ve sanitasyon kontrolünün faydaları nelerdir?
2. Tehlike analizleri ve kritik kontrol noktası sistemini araştırınız ve notlarınızı karşılaştırınız.
3. İşletme ortamından (havadan) ekim yapmanın amacı nedir?

11.1. ÇALIŞANLARIN ELLERİNDEN EKİM YAPMA

Gıda fabrikalarında yapılacak hijyen ve sanitasyon kontrolleri ile ilgili çalışma planları hazırlanır ve çalışmaların denetlemeleri periyodik olarak yapılır. Planlar her gıda fabrikasının özelliğine göre değişiklikler gösterir. Planlama dâhilinde gıda fabrikalarında çalışan elemanların kullandıkları araç gerecin, donanım yüzeylerinin, çalışma bankalarının ve ortamın mikrobiyolojik denetlemeleri yapılır. Toplam bakteri miktarı, patojen bakteriler, toksijen bakteriler açısından yapılan kontroller ile hijyenik kaliteyi olumsuz etkileyen durumlar tespit edilir ve gerekli önlemler alınır.



Görsel 11.1: Steril swap

İşletmelerin ortam denetlemeleri yapılırken çalışma ortamlarından çalışma planlarında belirtilen periyotlarda numune alınır ve ekimi yapılır. Çalışan elemanların ellerinden numune alınır, numunenin ekimi ve hijyen kontrolü yapılır. Çalışma yüzeylerinden ise nemli steril swap (Görsel 11.1) yardımı ile numune alınır ve ekimi yapılır.

Hijyen ve sanitasyon denetlemelerinin gıda

fabrikalarına sağlayacağı yararlar şunlardır:

- Güvenilir ve sağlıklı ürünler üretimini sağlar.
- Ürün kalitesini geliştirir.
- Üretimdeki verimi artırır.
- Üretim miktarını artırır.
- Ürünler insan sağlığı için güvenilir olarak üretilir.
- Rekabet edilebilir ürünler üretilir.
- Kanuni yükümlülüklerin yapılmasını sağlar.
- Tüketicinin aldatılmasını engeller.
- Gıda sanayisinin ilerlemesini sağlar.
- Üretilen ürünlerin dış pazarlarda tercih edilmesini sağlar.
- Üretilen ürünlerin pazar payının artmasını sağlar.

İşletmelerde hijyen ve sanitasyon denetimlerinin amacı, yapılan hijyen ve sanitasyon planlarının etkinliğini ölçmektir. Yapılan planlamaların ölçümü sırasında uygulanan mikrobiyolojik denetimler



çok önemlidir. Üretilen gıdanın ham maddesinin aktarılması, işlenmesi, paketlenmesi, depolanması ve pazarlanması sırasında oluşacak bulaşmalar hijyen ortamının sağlanması ile en aza indirilir. Bunun sağlanabilmesi için çalışanların hijyen kurallarına uymasına dikkat edilmesi, çevrenin kontrolünün ve donanımların periyodik bakımlarının yapılması gıda fabrikaları için önemlidir.

11.1.1. Çalışanların Elllerinden Ekim Yapma Aşamaları ve Dikkat Edilecek Noktalar

İşletmelerde çalışan elemanların ellerinden düzenli olarak haftalık, aylık olarak ve lüzum görülen her şartta numune alındıktan sonra ekim yapılır. Ekim işlemi için alınan bu numuneler personelin çalışma ortamında alınır.

Çalışanların ellerinden numune alma işlemi, çoğunlukla beş parmağın ve tırnak uçlarının steril agarlı petri kutularına bastırılması ile yapılır. Günümüzde gelişen teknolojiyle üretilen hızlı hijyen kitleri ile numune alınır. Bu kitlerde kalem ucuyla ellerden numune alınır ve uçta oluşan renk değişimleriyle sonuç elde edilir.



Görsel 11.2: PCA besiyeri

Toplam bakteri için (Görsel 11.2) PCA (plate count agar) ve koliform grubu için VRBA (violet red bile agar) besiyerleri kullanılarak personelin ellerinden ekim yapılır. Toplam bakteri sonucunun, personelin çalışma ortamı özelliğine göre kabul edilebilirliği farklılık görülebilir. Ancak koliform grubu bakterilerin çıkması fekal bulaşma göstergesi olduğundan kesinlikle istenmez.

Personelin ellerinden ekim yapılırken aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir:

- Aseptik koşullarda ekim yapılmalıdır.
- Personel bilgileri ekim öncesinde petri kutularının üzerine yazılmalıdır.
- Petri kutusunun tabanına numune alınan kişinin adı soyadı, çalışma ortamı ve besiyeri cinsi cam yazar kalem ile yazılmalıdır.
- Numune alımında petri kutusuna parmak uçları ve tırnaklar tam basılmalı ancak parmak bastırılırken agar fazla dağıtılmamalıdır.
- Çevreden bulaşmaları önlemek için ekim sırasında aseptik koşullarda işlemler yapılmalıdır.
- Numune alma işlemi seri ve hızlı yapılmalıdır.
- Ekim süresinde inkübasyon sıcaklığı düzenli olarak kontrol edilmelidir.
- 6'dan fazla petri kutusu üst üste inkübatöre yerleştirilmemelidir.
- Petri kutuları ile inkübatör duvarı ile arasında ısı dağılımını kolay olacak şekilde boşluk bırakılmalıdır.
- Sonuçlar doğru ve eksiz olarak mutlaka çizelgeye işlenmeli ve sorumlu birime tebliğ edilmelidir

Sonuçlar çizelgeye yazıldıktan sonra bölüm sorumlusuna bildirilir ve gerekli tedbirler alınır. Sorumlular tarafından personele gerekli uyarılar yapılır ve dikkat etmeleri gereken kurallar hatırlatılır. Çalışan personelde hastalık tespit edilmesi durumunda gerekli önlemler alınır, gerek görülürse çalışan eleman bir süre çalıştırılmaz.

11.2. KRİTİK KONTROL NOKTALARINDAN EKİM YAPMA

Gıda fabrikalarında, gıda üretimi sırasında gerekli olan temizlik koşullarının tespit edilmesi ve bu koşulların sağlanması olanağı sunan uygulamalara HACCP **Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları sistemi** denir. HACCP, sayesinde gıda imalatında ve dağıtım aşamalarında tüketici için sağlık riski olabilecek sorunlar tespit edilir ve bu sorunlar ortadan kaldırılır. HACCP, gıda güvenliğinin oluşması için



uygulanan bir sistemdir (Görsel 11.3).

Gıda sanayisinde üretim yapan işletmeler güvenilir gıdalar üretmek için (HACCP) **Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları sistemini** çalışma hayatında uygulamak zorundadır. Günümüzde tüketiciler daha bilinçli olduğundan dolayı gıda üretiminin güvenli bir şekilde yapılıp yapılmadığına dikkat etmektedir.

Tehlike Analizi Kritik ve Kontrol Noktaları İngilizce **Hazard Analysis and Critical Control Points** (Hazard Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları) sözcüklerin baş harflerinden HACCP meydana gelmiştir.



Görsel 11.3: HACCP sistemi

Ülkemizde gıda güvenliği konusunda 1998 yılında gıdaların üretimi, tüketimi ve denetlenmesine dair bir yönetmelik çıkarılmıştır. Bu yönetmelik, HACCP standartlarının uygulanmasında gerekli olmuştur. 2002 yılından itibaren de başta et, süt ve su ürünlerini işleyen firmalar olmak üzere gıda üretimi konusunda faaliyet gösteren bütün firmaların kademeli olarak HACCP Gıda Güvenliği Kalite Yönetim Sistemi standartlarına uymaları zorunlu tutulmuştur.

HACCP programı; Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü ile Gıda ve Tarım Örgütü tarafından ticaretin adil olmasını sağlamak amacıyla uluslararası gıda standartları, yönetmelikleri ve uygulama esaslarını bir araya getirmek için oluşturulan Kodeks Alimentarius Komisyonunun (CAC) gerekliliklerini karşılamaktadır. Bu program ayrıca ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetimi gibi yönetim standartlarının gerekliliklerini desteklemek için de kullanılabilir.

11.2.1. Kritik Kontrol Noktalarında Mikrobiyolojik Kontroller ve Önemi

HACCP uygulamaları, üretim sırasında tedarik zincirinin tamamında tehlikelerin saptanmasına ve bunların düzeltilmesini sağlayacak kontrollerin uygulamaya konulmasına olanak sağlar. Gıda güvenliği ile ilgili sorunları düzeltmek için Tehlike Analizi Kritik Kontrol Noktaları uygulamaları kullanılır.

HACCP ekibi tarafından gıda fabrikalarında kritik kontrol noktaları belirlenir. Gıda fabrikalarında tüketiciye en iyi ürünü vermek ve ürünlerindeki kaliteyi artırmak için kullanılan HACCP uygulamalarındaki en önemli basamak, kritik kontrol noktalarını tespit etmektir.

Kritik kontrol noktası tespit edilmediği zaman kabul edilemez sağlık sorunları ortaya çıkar. Gıda üretiminde kontrolü sağlayan gıda güvenliğine yönelik sorunları önleyen, yok eden veya kabul edilebilir seviyeye düşüren noktaya **kritik kontrol noktası (CCP)** denir.

HACCP uygulamalarının düzenli bir şekilde yapılması amacıyla bir program hazırlanır, planın denetimi ve kalite güvenliği sağlanır. Hazırlanan planlarda kritik kontrol noktaları ve alınacak önlemler belirlenir.



Bu noktaların mikrobiyolojik denetimi, belirlenen sürelerde alınan numuneler ile yapılır. Yapılan ekimler ile tehlikeler kontrol altına alınır ve riskler en az seviyede tutulur. Bu sayede hijyen ve sanitasyon kontrol planlarına uygun gıda üretimi gerçekleştirilir. Kritik kontrol noktaları, gıda fabrikalarında sürekli kontrol altında tutulur.

Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktalarının Avantajları

- Yapılan kontrollere imalatçıların, tüketicilerin ve toptancıların güvenmesini sağlamak
- Üretilen gıdanın dağıtımını sırasında gıda güvenlik risklerini etkili bir şekilde yönetmek
- Uygulamanın gelişmesi için sistemi sürekli gözden geçirmek ve iyileştirmek
- Gıda güvenliği ile ilgili uluslararası kuralları kapsayan tehlike kontrolleri uygulamak
- HACCP'yi ISO 22000 ile uyumlu hâle getirerek gıda güvenliği uygulamalarını iyileştirmek

Uygun hijyen şartları meydana getirmek amacıyla kimyasal ve fiziksel risklerin yanında mikrobiyolojik riskler için de denetimler yapılmalıdır. Gıda mikrobiyolojik bakımdan güvenilir ise sağlık açısından da güvenilirdir.

Gıda fabrikalarında ortaya çıkabilecek mikrobiyolojik risk şunlardır:

- Gıda fabrikalarında ortaya çıkabilecek mikrobiyolojik risk şunlardır:
- Gıda imalatı, üretim prosesi, saklama ve pazarlama anında çevreden mikroorganizma bulaşması
- Gıda imalatı sırasında kullanılan ham madde ve yardımcı madde içinde bozulmalara sebep olacak mikroorganizmaların, toksinlerin ve patojenlerin bulunması
- Bu mikroorganizmaların üretim sırasında yok edilmesinde yeterli teknolojinin kullanılmaması
- Gıda imalatı, üretim prosesi, saklanma ve pazarlama anında hatalı ve yanlış tekniklerin kullanılması

Kritik kontrol noktalarında denetimler, numune alınacak yere ucu pamuklu swap sürtülmesi veya numune alınacak yerden bir parça alınması ve ekim işlemi yapılması suretiyle yapılır.

Seçici besiyeri ile kontrolü istenen yerden direkt yapılan ekimde mikrobiyolojik kontrolü yapmak ve mikrobiyolojik yönden üstün ürün elde etmek için aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir.

- Gıda üretiminde kullanılacak ham maddeyi işletmeye nakletme ve saklama uygun şekilde yapılmalıdır.
- Kaliteli bir ürün elde etmek için bakteri yükü olabildiğince az, nitelikli ham madde temin edilmelidir.
- Üretim sürecinde her türlü bulaşma önlenmelidir.
- İşleme yöntemlerinden etkin ve uygun olanı kullanılmalıdır.
- Üretilen gıdanın özelliklerine uygun ambalaj malzemesi kullanılmalıdır.
- Üretilen ürünün uygun koşullarda tüketiciye ulaştırılmasına ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir.

11.2.2. Kritik Kontrol Noktaları İçin Hazırlanan Mikrobiyolojik Kontrol Programları ve Özellikleri

Planların başarıya ulaşabilmesi için kritik kontrol noktalarında mikrobiyolojik kontrollerin düzenli bir şekilde yapılması önemlidir. Her bir kritik kontrol noktası ve alınacak tedbirler ile ilgili planların hazırlanması HACCP birimi tarafından yapılır. Hazırlanan çizelgelerde yapılacak mikrobiyolojik kontrol sıklığı, kontrolün nasıl ve kim tarafından yapılacağı yazılmalıdır (Tablo 11.1).



Tablo 11.1: Kritik Kontrol Noktaları İçin Hazırlanmış Örnek Program

Doğrulama	Kalite güvence sorumlusu	ONAYLAYAN: HACCP ekip lideri	
Kayıt	Kontrol formu		
Düzeltilici Faaliyet	Ürün merkez sıcaklığı 72 °C altına düşünce fırın sıcaklığı kontrol edilerek gerekli düzeltme yapılır.		
izleme	Kim		Kalite güvence sorumlusu
	Sıklık		Her partide
	Nasıl		Derece ile
	Ne		Merkez sıcaklık
Her Bir Önleyici Tedbir İçin Kritik Limit	Ürün merkez sıcaklığı 72 °C üzerinde olmalıdır.		HAZIRLAYAN: Kalite güvence sorumlusu
Mikrobiyolojik Tehlike	Yetersiz pastörizasyon		
Kritik Kontrol Noktası (CCP)	15		
Üretim Aşaması	Pişirme		

Denetim, gözlem, değerlendirme ve hazırlanan planlar uzun vadeli olarak yapılır. Mikrobiyoloji laboratuvarı sorumluları, gerekli tedbirleri almak için düzenli olarak kritik kontrol noktalarından kontrol örnekleri alarak denetim yapar ve gerekli önlemleri alır. Bu amaçla fabrikalarda diğer birimlerden ayrı yerlere mikrobiyoloji laboratuvarları kurulur. Kaliteli, güvenli ve sağlıklı bir üretim için kritik kontrol noktalarında mikrobiyolojik kontrol planları çok önemlidir.

Gıda üretimi yapan işletmelerde sanitasyon kontrollerinin basamakları şunlardır:

- Ham madde ve yardımcı maddelerin fabrikaya girişi
- Proses basamakları ve kritik kontrol noktaları
- Ambalajlama ve paketleme
- Saklama ve depolama



- İadesi yapılan ürünler

Kalite güvenliğini sağlamak için yapılması gereken planlamalar şunlardır:

- Üretilecek ürünün kalite standartları tespit edilir.
- Ürünün mikrobiyal seviyesi belirlenir.
- Kontrol tekniklerinden uygun olan yöntem için karar verilir.
- Numune alınacak yerlere, günlük, haftalık ve aylık dilime karar verilir.
- Yapılacak analiz teknikleri belirlenir.

Mikrobiyolojik kontrol planlarının görevleri şunlardır:

- Çalışan elemanların hijyen kontrolünü yapmak
- Test planları hazırlamak, numune almak ve uygulamak
- Kritik kontrol noktalarının denetimlerini yapmak
- Düzenli olarak günlük araç gereç, donanım ve ekipman kontrollerini yapmak
- Hijyen çalışmalarını için standartlar oluşturarak Ar-Ge yapmak
- Mikrobiyolojik kontrol sonuçlarının sorumlu bölüme rapor edilmesini sağlamak
- Yapılan kontrol sonuçlarının kayıtlarını saklamak
- Mikrobiyolojik kontrol planlarından sorumlu bir müdürün belirlenmesi ve müdürün yönetime karşı sorumlu olmasını sağlamak

Mikrobiyolojik kontrol planlarına göre aşağıdaki işlemler yapılmalıdır.

- Yapılacak çalışmalar ile ilgili tarif ve akım şemaları hazırlanmalıdır.
- Çalışan elemanlar için eğitimler düzenlenmelidir.
- Düzenli olarak sanitasyon denetimler yapılmalıdır.
- Planlar yanlışlara açık olmadığı için çalışan personel tecrübeli olmalıdır.
- Bulaşma riski olan kritik kontrol noktaları düzenli denetlenmelidir.
- Yapılan çalışmalar, plan sorumlusu tarafından yönetime düzenli olarak rapor edilmelidir.
- Yapılan çalışmalar ile ilgili kayıt ve raporların arşivi yapılmalıdır.
- Bu planlar her zaman yenilenmeye açık olmalıdır.

11.2.3. Saptanmış Kritik Kontrol Noktalarından Mikrobiyolojik Örnek Alma Aşamaları ve Dikkat Edilecek Noktalar

Mikrobiyolojik kontrolün en önemli basamağı numune almada hazırlanan plana uygun çalışmaktır. Gıda fabrikalarında üretilen ürünün parti büyüklüğü, ürün cinsi, ambalajı ve aranacak mikroorganizma gibi faktörler kritik kontrol noktalarından mikrobiyolojik numune alma basamaklarının oluşmasını etkiler.

Kritik kontrol noktalarından alınan numuneler, mikroorganizma sayısında artış ya da azalış olmaması için uygun koşullarda hızlı bir şekilde analizin yapılacağı laboratuvara getirilir. Numuneler alınırken olası hataları önlemek için petri kutularının, deney tüplerinin ve kapların üzerlerine cam yazar kalem ile gerekli bilgiler yazılmalıdır. Numune almada hedef, gıdayı temsil eden numune elde etmek ve numune alma koşullarını değiştirmeden almaktır.



Tablo 11.2: Örnek Ürün Mikrobiyoloji Analiz Formu

İŞLETME ADI:							
ÖRNEK ÜRÜN MİKROBİYOLOJİ ANALİZ FORMU							
ÖRNEĞİN ADI	ÖRNEK ALIŞ TARİHİ	ÖRNEK ALIŞ SAATİ	ÇALIŞAN HAT	ANALİZ SONUÇLARI (adet/ml)			ANALİZİ YAPAN LABORANT
				TOPLAM BAKTERİ	TOPLAM MAYA	TOPLAM KÜF	

Belirlenmiş kritik kontrol noktalarından mikrobiyolojik numune alma basamakları şunlardır:

- Numune almada başarılı olmak için numune alma planı hazırlanır. Hazırlanan tablolarda numune ile ilgili tüm bilgiler ve aranan özellikler yer almalıdır. (Tablo 11.2).
- Aseptik şartlarda alınan numuneler, hızlı bir şekilde laboratuvara getirilir. Bunun amacı mikroorganizma sayısındaki değişimi önlemektir. Hazırlanan plan dâhilinde önceden saptanan noktalardan bütün partiyi temsil edecek şekilde ve steril koşullarda numune alınır. İstenirse laboratuvar ortamında da numune alınabilir.
- Çalışma ortamı gerekli temizlik ve analiz öncesi hazırlıklar yapılır, besiyerleri hazırlanır.
- Aseptik şartlarda alınan, hazırlanan örnekler ile ekim ve inkübasyon işlemi yapılır.
- İnkübasyon sonunda koloni sayımı yapılır.
- Analiz sonuçlarına göre ilgili formlar doldurulur.

11.3. İŞLETME ORTAMINDAN (HAVADAN) EKİM YAPMA

Gıda fabrikalarında üretim ortamının havasının hijyeni konusunda fikir sahibi olmak için ortam havasından ekim yapmak tartışılan konu olmasına rağmen güvenilir gıda üretimi için önemli bir konudur.

Üretim sahasında kritik kontrol noktalarına yerleştirilen steril filtreler ile havanın mikrobiyolojik kontrolü sağlanır. Bu filtreler, hijyenik havanın sürekliliğini sağlayarak ortam hijyenine katkıda bulunur. Havanın mikrobiyolojik kontrolü genellikle ortamdaki ekim yapılarak sağlanır.

Gıda fabrikalarında ürünlerin işlenmesi sırasında ve diğer etkilerle ortam havası sürekli kirlenir. Ortam havasının kontrol edilebilmesi için havanın kirlenme sebepleri ve bu sebeplere karşı alınacak önlemler belirlenmelidir. Üretim ortamından ekim yapmanın amacı, hijyen ve sanitasyon kontrol planlarının yeterliliğini ölçmektir.

Mikrobiyolojik açıdan kirlenen ortamda üretilen ürünün saklanması zordur, ürünün bozulması hızlanır. Bozulan ürünler, bu ürünleri tüketen insanlarda gıda zehirlenmesine sebep olur. Tüm bu etkiler göz önüne alındığında ortam havasından yapılan ekim ve kontroller çok önemlidir. Ayrıca bu ortamlarda çalışan elemanların sağlığı ve üretilen ürünün kalitesi de bozulur.

Üretim ortamından yapılan ekimler, havanın kirlenmesine sebep olan mikroorganizmalar ve havanın mikrobiyolojik temizliği hakkında bilgi verir. Elde edilen bu bilgiler gerekli tedbirlerin alınmasını sağlar.



11.3.1. İşletme Ortamından (Havadan) Ekim Yapma Planı ve Özellikleri

Gıda fabrikalarında üretim ortamının havasından ekim yapmak için aşağıda verilen özellikler dikkate alınarak bir plan hazırlanır.

Ortam havası ekimi yapma planının özellikleri şunlardır:

- Gıda fabrikalarında üretim yapılan her bir ortam için hangi sıklıkta hava ekimi yapılacağı tespit edilir.
- Ekim yapılacak steril agarlı besiyerlerinin ortamda kalış süresi belirlenir.
- Hava ekimini yapacak olan laboratuvar personeli tespit edilir.
- Havadan yapılacak numunelerin, ortamı tam temsil etmesine dikkat edilir.
- Numune alınacak ortamda steril agarlı petri kutuları 15-30 dakika arasında bekletilir.
- Ortam havasında koliform grubu aranmaz.
- Toplam bakteri, küf ve maya için hava örneği alınır.
- Tablo 11.3'teki gerekli bilgiler, ekime başlanırken ve ekim sonunda doldurulur.
- Gıda fabrikalarında standart veri sağlamada örnek alma cihazları kullanılabilir. Bu cihazlarla ortam havasından belirli bir miktarda ve belirli bir sürede örnek alınır. Hava, örnek alma cihazları kullanılarak hava vakum pompası ile çekilir ve açık bırakılan besiyerine çarpar.
- Yapılan ekim sonuçları sorumlu kişi tarafından yönetime rapor edilir.
- Yapılan analiz sonuçları ile ilgili tüm veriler saklanır.

Tablo 11.3: İşletme Ortamı (Hava) Mikrobiyolojik Kalite Kontrol Formu

İŞLETME ADI:							
İŞLETME ORTAMI (HAVA) MİKROBİYOLOJİK KALİTE KONTROL FORMU							
ÖRNEK ALMA TARİHİ	KONTROLÜ YAPILAN ORTAM	BESİYERİNİN ORTAMDA KALIŞ SÜRESİ		ANALİZ SONUÇLARI (adet/ml)			ANALİZİ YAPAN LABORANT
		BAŞLAMA	BİTİŞ	TOPLAM BAKTERİ	TOPLAM MAYA	TOPLAM KÜF	
ANALİZİ YAPAN:				KONTROL EDEN:			

11.3.2. İşletme Ortamından (Havadan) Ekim Yapma Aşamaları ve Dikkat Edilecek Noktalar

Gıda fabrikalarında üretim ortamından ekim yapılırken aşağıdaki hususlara dikkat edilir.

- Hava ekimi toplam bakteri ile küf ve maya için yapılır.
- Mikroorganizmalar havada spor formunda bulunduğu için yapılan uygulamalarda koliform grubu bakterilere bakılmaz.
- Alınan hava numunesi, ortam havasını tam yansıtmalıdır.
- Ortamdan ekim işlemi yapılırken hızlı çalışılmalıdır.
- Numune alınacak petri kutularının üzeri önceden yazılmalıdır.
- Hava örnekleme cihazları doğru numune almayı sağlar.
- İnkübasyon sırasında minimum ve maksimum sıcaklıklar termometre ile düzenli bir şekilde kontrol edilmelidir.
- İnkübasyon sırasında inkübatör kapağını açılması sıcaklık değişimlerine neden olduğundan gerek görülmedikçe kapak açılmamalıdır.

**1. UYGULAMA : ÇALIŞANLARIN ELLERİNDEN EKİM YAPMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

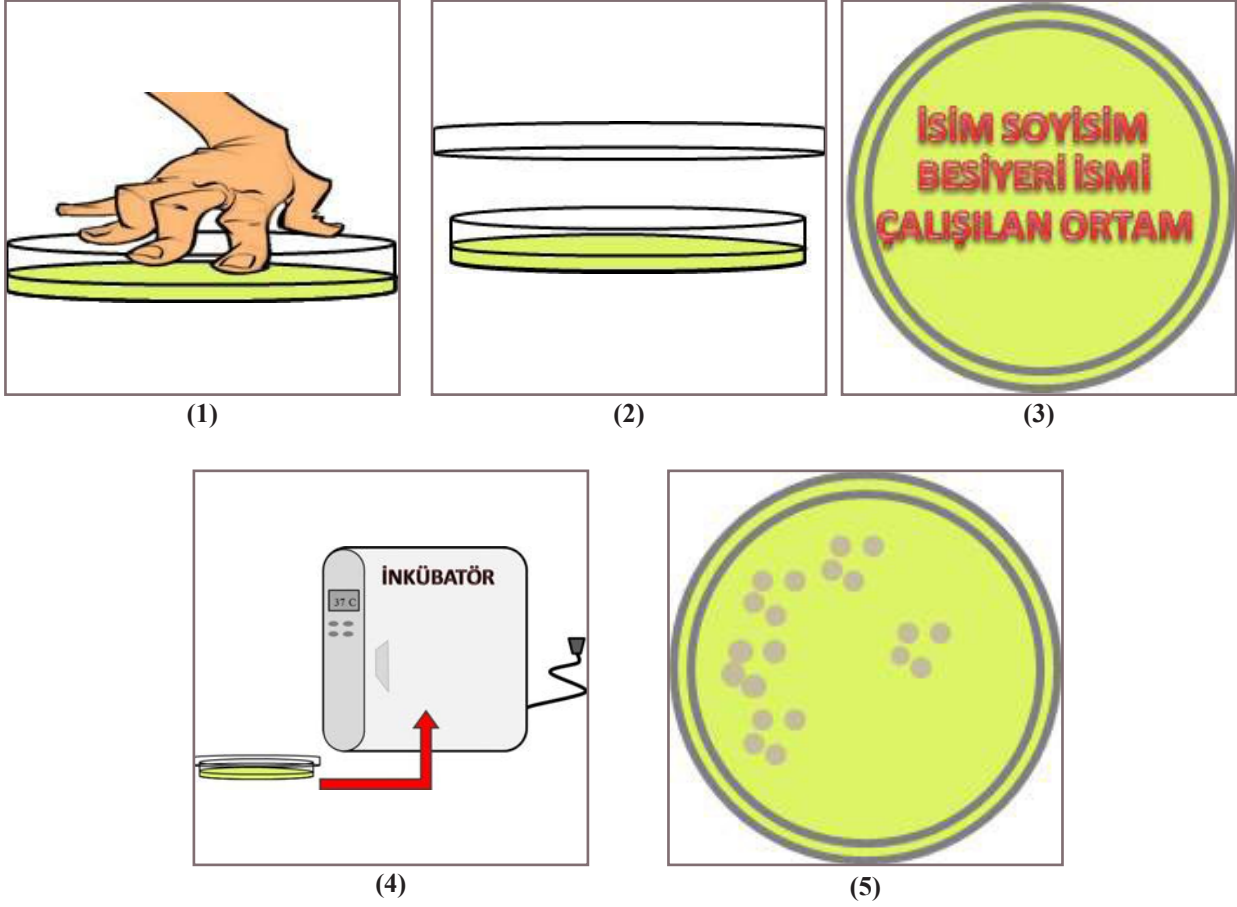
- | | | |
|--------------|-------------------------|--------------------|
| ✓ Etüv | ✓ Koloni sayıcısı | ✓ Katı besiyeri |
| ✓ Termometre | ✓ Steril petri kutuları | ✓ Cama yazar kalem |

İşlem Basamakları

1. Aseptik koşullarda hazırlanan agarlı petri kutularına, çalışanların beş parmağının ve tırnak uçlarının agarı dağıtmayacak şekilde tam bastırılmasını sağlayınız.
2. Numune aldıktan sonra petri kutusunun kapağını kapatınız.
3. Kapağını kapattığınız petri kutusunun üzerine besiyeri adını, numuneyi alan kişinin adını soyadını ve çalışma ortamını cama yazar kalem ile yazınız.
4. Aseptik koşullarda örnek alınan petri kutusunu 2 gün 37°C'de inkübatörde bekletip inoküle ediniz.
5. İnkübasyon sonunda petri kutularında sayım yapınız.
6. Sayım sonuçlarını ilgili forma işleyip personele bildirin.
7. Sonuçları ilgili birime bildirerek gerekli önlemlerin alınmasını sağlayınız.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 11.4: Çalışanların ellerinden aseptik kurallara ve tekniğine uygun şekilde numune alıp ekimini uygulama aşamaları

Tablo 11.4: Mikroorganizmaların Sayımında Kullanılan Uygun Agar ve İnkübasyon Koşulları

Hedef Mikroorganizma	Agar	İnkübasyon Koşulları
Küf ve maya	Malt Extract Agar	Aerobik ortam 25 °C / 5 gün
Koliform grubu bakteriler	Violet Red Bile Agar (VRBA) (Çift katlı besiyeri)	Mikroaerobik ortam 37 °C / 24±2 saat
Toplam aerobik Mezofilik bakteri	Plate Count Agar (PCA)	Aerobik ortam 30 °C ya da 37 °C 72±3 saat

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C'de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C'de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya

bırakınız.

- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

Sonuç ve Yorum



“Çalışanların Ellерinden Ekim Yapma” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Aseptik koşullarda hazırlanan agarlı petri kutularına, çalışanların beş parmağının ve tırnak uçlarının agarı dağıtmayacak şekilde tam bastırılmasını sağladı.					
Kapağını kapattığı petri kutusunun üzerine besiyeri adını, numuneyi alan kişinin adını soyadını ve çalışma ortamını cama yazar kalem ile yazdı.					
Uygun şekilde inkübasyon işlemi yaptı.					
İnkübasyon sonunda petri kutularında sayım yaptı.					
Sayım sonuçlarını ilgili forma işlerdi					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını ve malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:	Gerçek Puanı:				

Değerlendirme: Form puanını 2 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.



2. UYGULAMA : KRİTİK KONTROL NOKTALARINDAN EKİM YAPMA

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmuyunuz.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak çözeltilerin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | |
|---------------|----------------------|--------------------|
| ✓ Erlen | ✓ Etüv | ✓ Hassas terazisi |
| ✓ Besiyerleri | ✓ Tartım kapları | ✓ Su banyosu |
| ✓ Gıda örneği | ✓ Saf su | ✓ Petri kutusu |
| ✓ Pipet | ✓ Bek / steril kabin | ✓ Cama yazar kalem |

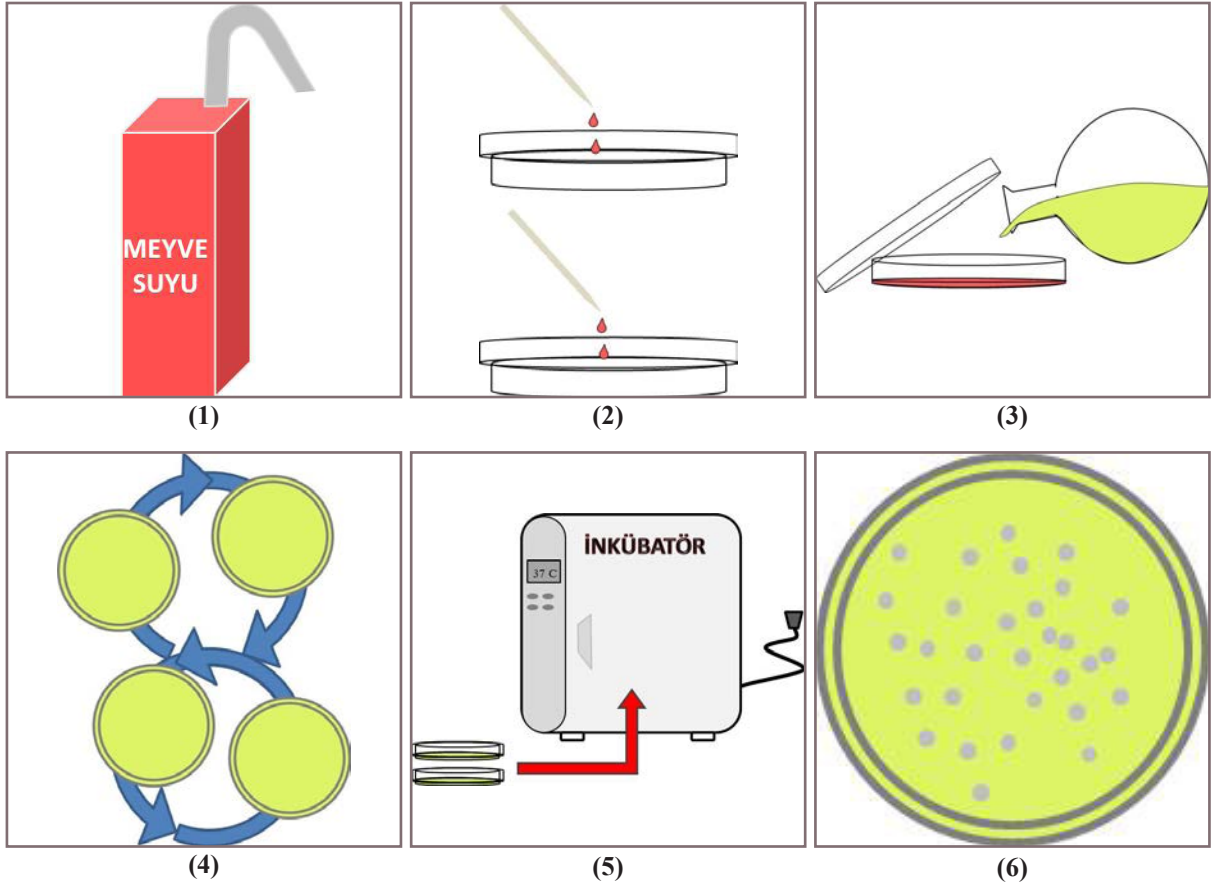
İşlem Basamakları

1. Üretim bandından sonra ambalajlanmış son ürün olan meyve suyunu alıp homojenize ediniz.
2. Steril pipet yardımıyla meyve suyu numunesinden birer ml çekerek iki adet steril petri kutusuna aktarınız.
3. Daha önceden hazırlanan besiyerlerini petri kutularına hızla ilave ediniz.
4. Ekim kabininde “8” şekli çizerek besiyerinin homojen karışmasını sağlayınız.
5. Besiyeri katılaştıktan sonra kapağını kapatınız. Uygun sıcaklıktaki inkübatöre koyunuz. (Genellikle VRBA ve PCA 37 °C’de 2 gün, MEA 28 °C’de 3 gün)
6. İnkübasyon sonunda petri kutularında sayım yapınız.
7. Sayım sonuçlarını ilgili forma işleyip personele bildirin.
8. Sonuçları ilgili birime bildirerek gerekli önlemlerin alınmasını sağlayınız.





İşlem Uygulama Şeması



Görsel 11.5: Kritik kontrol noktalarından ekim yapma uygulama aşamaları

Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C’de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize ediniz sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

**3. UYGULAMA : İŞLETME ORTAMINDAN (HAVA) EKİM YAPMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizde açık alev kullanılıyorsa yanmalara karşı dikkatli olunuz.
- ✓ Analizde kullanılacak besiyeri çözeltilerinin kapağını dikkatli açınız ve çözeltilerin etrafa bulaşmamasına dikkat ediniz. Bu maddeleri kesinlikle koklamayınız.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

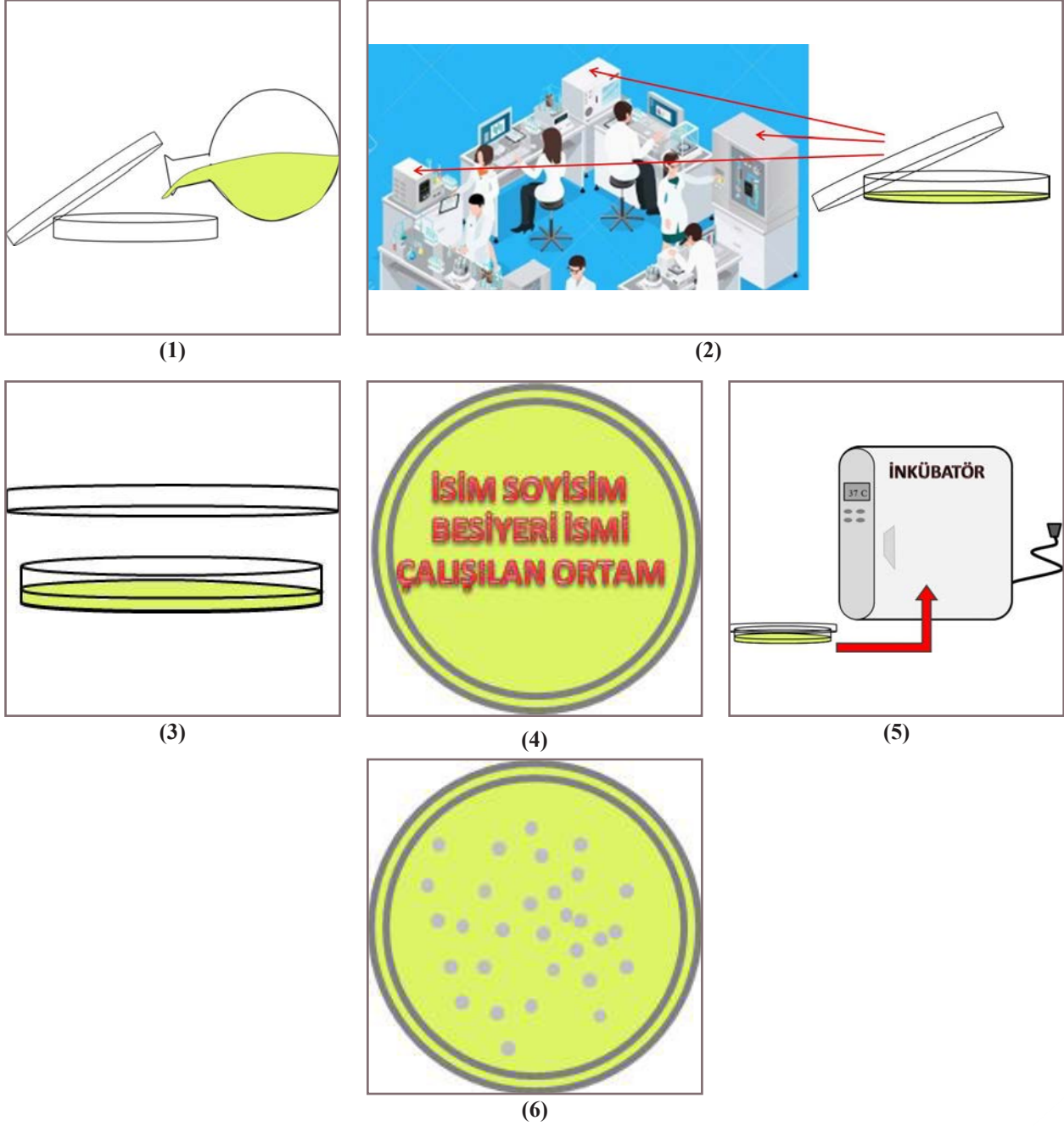
- | | | |
|---------------|----------------------|--------------------|
| ✓ Besiyerleri | ✓ Petri kutusu | ✓ Saf su |
| ✓ Gıda örneği | ✓ Bek / steril kabin | ✓ Cama yazar kalem |
| ✓ Etüv | ✓ Su banyosu | |

İşlem Basamakları

1. Steril agarlı besiyerlerini petri kutularına hazırlayınız.
2. Petri kutularını programda belirlenen yerlerde kapağı açık durumda 15-30 dakika bekletiniz.
3. Bekleme süresi dolan bu besiyerlerini, kapağını kapatarak toplayınız. İlgili formları doldurunuz.
4. Petri kutuları üzerine gerekli bilgileri cama yazar kalem ile yazınız.
5. Toplanan petri kutularını etüvde inkübe ediniz. İnkübasyonda PCA'yı 37 °C'de 2 gün, MEA'yı ise 28 °C'de 3 gün bekletiniz.
6. İnkübasyon sonunda petri kutularında sayım yapınız.
7. Uygun formülü kullanarak mikroorganizma sayısını hesaplayınız.
8. Sayım sonuçlarını ilgili forma işleyip personele bildirin.
9. Sonuçları ilgili birime bildirerek gerekli önlemlerin alınmasını sağlayınız.



İşlem Uygulama Şeması



Görsel 11.6: İşletme ortamından (hava) ekim yapma uygulama aşamaları

Petri kutularında sayım yapınız. Havadaki mikroorganizma sayısını Tablo 11.5'e göre değerlendiriniz.

Tablo 11.5: Havadaki Mikroorganizma Sayısı Kontaminasyon Değerleri

Havadaki Mikroorganizma Sayısı (cfu/m ³)	Kontaminasyon Durumu
500	Düşük kontaminasyon vardır.
500-1500	Kontaminasyon vardır.
1500 ve yukarısı	Yüksek kontaminasyon vardır.



Temizlik ve Dezenfeksiyon

- ✓ Analiz tamamlandığında kalan numuneyi, numunenin temas ettiği pastör pipetleri ve diğer tek kullanımlık malzemeleri otoklava koyunuz. 121 °C’de 15 dk. sterilizasyon işlemi yapınız ve tüm malzemeyi çöpe atınız.
- ✓ Çalışılan tezgâhın ve mikroskobun tabla kısmını alkol ile dezenfekte ediniz.
- ✓ Kullanılan cam ve metal malzemeleri otoklavda 121 °C’de 15 dk. sterilize ediniz. Sonra deterjanlı su veya yıkama çözeltisi ile temizleyiniz. Son olarak malzemeleri saf sudan geçirip kurumaya bırakınız.
- ✓ Çöpleri atık kutusuna atınız.
- ✓ Elektrikli cihazların elektrik bağlantılarını kesiniz.
- ✓ Kuruyan cam malzemeleri yerlerine kaldırınız.

Sonuç ve Yorum

“İşletme Ortamından (Hava) Ekim Yapma” Uygulaması DEĞERLENDİRME FORMU

Yönerge: Bu uygulama ile ilgili gözlenmesi gereken beceriler “Ölçütler” sütununda listelenmiştir. Beceriye ilişkin gözlem sonucunuzu “X” işareti koyarak işaretleyiniz.

ÖLÇÜTLER	DERECE				
	1	2	3	4	5
İş sağlığı ve güvenliği tedbirlerine uydu.					
Analizde kullanılacak araç gereci hazırladı.					
Steril agarlı besiyerlerini (petri kutuları) hazırladı.					
Petri kutularını programda belirlenen yerlerde kapağı açık durumda 15-30 dakika bekletti.					
Uygun şekilde inkübasyon işlemini yaptı.					
Uygun formülü kullanarak mikroorganizma sayısını hesapladı.					
Sayım sonuçlarını ilgili forma işledi.					
Uygulama raporunu hazırladı.					
Temizlik kurallarına uygun olarak çalışma ortamını ve malzemeleri temizleyip sterilize etti.					
Süreyi verimli şekilde kullandı.					
Form Puanı:					Gerçek Puanı:

Değerlendirme: Form puanını 2 ile çarparak 100 üzerinden gerçek puanı hesaplayınız. Gerçek puanınız 50 - 100 aralığında ise “BAŞARILI” sayılırsınız. 0 - 49 puan aralığında ise uygulamayı tekrarlayınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE "D" YANLIŞ İSE "Y" YAZINIZ.

1. () Gıda fabrikalarında fiziksel ve kimyasal kontroller yapılarak hijyen ve sanitasyon ortamı sağlanır.
2. () Gıda işletmelerinde personellerin ellerinden ekim yapılırken MEA besiyeri kullanılır.
3. () Yapılan analiz sonucunda hasta olan personel görevden uzaklaştırılır.
4. () Yapılacak ekim öncesi kabin sabunlu bez ile silinerek steril edilir.
5. () Gıda fabrikalarında üretim ortamlarında havadan yapılacak ekimlerde VRBA ve MEA besiyerleri kullanılır.
6. () Üretim ortamında ekim yapmanın amacı havanın fiziksel kontrolünü yapmaktır.
7. () Yapılan ekim sonuçları rapor edilip bölüm sorumlusu bilgilendirilir.
8. () Koliform grubu bakterileri tespit etmek için ortam havasından ekim yapılır.

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

9. Ekim yapma aşamaları koşullarda gerçekleştirilmelidir.
10. Çalışanların ellerinden yapılan ekim sonuçlarında grubu bakterilerin çıkması kabul edilemez.
11. Ham madde içeriğinde bozulmaya neden olan mikroorganizmaların ve patojenlerin bulunması bozulmaya yol açar.
12. İşletmelerde havanın mikrobiyolojik kontrolü yapılarak sağlanır.
13. İşletmelerde diğer departmanlardan edilmiş, yeterli büyüklük ve donanımda mikrobiyoloji laboratuvarlarının kurulması gereklidir.
14. Havadan numune almada kullanımı doğru numune almayı kolaylaştırır.
15. Gıda işletmelerinde sanitasyonun oluşturulması ve devamı yasal olarak sorumluluğundadır.





AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

16. Aşağıdakilerden hangisi kritik kontrol noktaları ile ilgili hazırlanan planlarda yer almaz?
- A) Üretim sırasında
 - B) Mikrobiyolojik tehditler
 - C) Üretimde kalış süresi
 - D) Düzeltici işlemler
 - E) Kritik kontrol noktası
17. Aşağıdakilerden hangisi gıda fabrikalarında sanitasyon kontrolünün sağladığı yararlardan değildir?
- A) Üretim artış olur
 - B) Tüketici memnun olur
 - C) Ürün kalitesinde artar
 - D) Güvenilir gıda üretilir
 - E) Depolama kolaylaşır
18. Aşağıdaki ifadelerden hangisi mikrobiyolojik kontrol planları için kullanılmaz?
- A) Çalışanlar düzenli olarak eğitime alınmalıdır
 - B) Planlar yenilenmeye açık değildir
 - C) Çizelgeler ve akım şemaları hazırlanmalıdır
 - D) Yanlışlara sebep olmamak için eğitimli çalışanlar kullanılmalıdır
 - E) Yapılan işlemler ile ilgili arşivler tutulmalıdır
19. Aşağıdakilerden hangisi ortam havasının ekiminde kullanılmaz?
- A) Besiyerleri
 - B) Cama yazar kalem
 - C) İnkübatör
 - D) Petri kutusu
 - E) Steril swap
20. Aşağıdakilerden hangisi havadan ekim yapma ile ilgili yanlış bir ifadedir?
- A) Havanın mikrobiyolojik kontrolü ekim yapılarak sağlanır.
 - B) Hava ekimi genellikle toplam bakterilere bakmak için yapılır.
 - C) Hava ekimi koliform grubu bakterilere bakmak için yapılır.
 - D) Havanın kontrolünü sağlamada steril filtreler de kullanılır.
 - E) Hava ekimi genellikle maya ve küf grubu bakterilere bakmak için yapılır.

12. ÖĞRENME BİRİMİ



MİKROBİYOLOJİK ANALİZ SONRASI İŞLEMLER



Bu öğrenme biriminde;

- Kullanılmış araç gereçleri ve ekipmanların temizlik, dezenfeksiyon ve / veya sterilizasyonunu,
- Mikrobiyolojik atıkların usulüne uygun imhasını deneyimleyerek öğreneceksiniz.

ÖĞRENME BİRİMİ BÖLÜMLERİ

- 12.1. Kullanılan Araçların Temizliği ve Sterilizasyonu
- 12.2. Atıkların Kuralına Uygun Atılması

TEMEL KAVRAMLAR

Temizlik dezenfeksiyon laboratuvar atıkları atık yönetimi



12. Öğrenme Birimi

HAZIRLIK ÇALIŞMALARI

1. Mikrobiyoloji laboratuvarında kontaminasyon kaynakları neler olabilir?
2. Laboratuvar ortamında mikrobiyolojik atık olarak sayılabilecek materyalleri listeleyiniz ve sınıfta tartışınız.
3. Mikrobiyolojik atıkların imhasının insan ve çevre sağlığı açısından önemini araştırınız.

12.1. KULLANILAN ARAÇLARIN TEMİZLİĞİ VE STERİLİZASYONU

Temizlik, malzeme ve yüzeylerin deterjan ve enzimatik ürünlerle silinerek veya yıkanarak kirlilerden (organik ve inorganik maddeler) arındırılması işlemidir. **Dezenfeksiyon** işlemi, kimyasal maddeler kullanılarak cansız bir nesne üzerindeki bakteri endosporları dışında kalan tüm patojen mikroorganizmaların öldürülmesi, üremelerinin durdurulması veya mikroorganizma yükünün azaltılmasıdır (Görsel 12.1). **Sterilizasyon** ise basit olarak bir materyaldeki her türlü mikroorganizmanın uzaklaştırılması, materyalin tümüyle mikroorganizmalardan arınmış hâle getirilmesidir.

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan materyallerin temizliği, sterilizasyonu ve atıkların imhası, insan ve çevre sağlığı bakımından önem arz eder.

Analizde kullanılacak besiyerleri, besiyeri katkıları ve dilüsyon sıvıları gibi materyallerin ihtiyaca uygun olarak hazırlanması, israfın ve çevre kirliliğinin önlenmesi açısından gereklidir. Ancak herhangi bir sebeple gereğinden fazla hazırlanan veya analizde kullanılmayan bu maddelerden hazırlandığı gün kullanılma zorunluluğu olanlar (rambach agar vb.) gün içerisinde imha edilmelidir.



Görsel 12.1: Yüzeysel dezenfeksiyonu

Antibiyotik içerenler besiyeri katkıları sulandırıldıktan sonra uygun miktarlar hâlinde dondurularak saklanabilir. Bu şekilde depolanmış olan katkıları eritildikten sonra tekrar dondurulmamalıdır, imha edilmelidir. Özelliğini kaybetmemiş dilüsyon çözeltileri son kullanım tarihine kadar uygun bir ortamda depolanabilir.

Analizde kullanılan tüm malzemelerin analiz sonunda sterilize edilmesi gerekir. Aksi hâlde kullanılacak materyalden gelen mikroorganizmalar, analiz edilen örnekten gelmiş gibi sahte (false) pozitif sonuçlara neden olabilir. Tek kullanımlık malzemeler sterilizasyon sonrası yıkanıp uygun atık kutularına atılarak imha edilmelidir. Tekrar kullanılabilen malzemeler (cam, metal vb.) sterilizasyon sonrası uygun şekilde temizlenmelidir. Bu işlemlerle patojenlerin çevreye yayılması önenebilir ve kanalizasyona verilen canlı mikroorganizmaların doğal dengelerinin korunması sağlanabilir.

12.1.1. Kullanılmış Araç Gereci ve Ortamı Dezenfekte Etme Aşamaları ve Dikkat Edilecek Noktalar

Dezenfektan, dezenfeksiyon amaçlı kullanılan kimyasal maddelerdir. Dezenfektanlar mikroorganizmaların hücre zarı işlevini bozar. Hücre proteinlerini denatüre eder. Enzimlerin aktivitesini bozar ve nükleik



asitlerini etkiler. Böylece mikroorganizmaları öldürür ya da onların üremesini durdurur.

Dezenfeksiyon işleminin yararları şu şekilde özetlenebilir:

- Besiyerlerini ve diğer ortamları mikroplardan arınmış hâle getirmek
- Saf kültürlerin elde edilmesini sağlamak ve bunların kontaminasyonlarına engel olmak
- Malzeme ve aletlerin, mikroorganizmalara bulaşmasını önlemek
- Hastalık etkenlerinin etrafa yayılmasına ve bulaşmasına engel olmak

Laboratuvarda etkili bir temizlik ve dezenfeksiyon uygulanabilmesi için dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıda sıralanmıştır:

- Ortamın nemli ve kirli olması dezenfektan maddenin etkinliğini azaltır. Bu nedenle günlük dezenfeksiyon işlemlerinde en son zemin dezenfeksiyonu yapılması gerekir.
- Zemin temizliğinde kovalar, fırçalar (çıkmayan kirler için) ve paspaslar kullanılır.
- Laboratuvar zeminindeki kaba kirler çekpas ile temizlenir.
- Biri pis (kirli paspasın yıkandığı) diğeri temiz su koymak için kullanılan iki kova tekniği uygulanır.
- Çalışma tezgâhlarının temizliği için 1/100 oranında çamaşır suyu, %4'lük formaldehit veya %0,5'lik virkonlu bez kullanılabilir.
- Yüzeysel dezenfeksiyonu amacıyla üretilen, kullanımı pratik, sprey şeklinde dezenfektanlar kullanılabilir.
- Temizlik maddeleri ve dezenfektanlar birbiri ile karıştırılmamalıdır.
- Temizlik araçları kullanıldıktan sonra iyice çalkalanır, deterjanla yıkanır. Gerekirse dezenfektanlar ve mutlaka kurutulur. Kurutulduktan sonra ters çevrilerek muhafaza edilir. Çok kirlenmiş temizlik araçları %1 sodyum hipoklorit çözeltisinde bekletilir, durulanır, kurutulur ve kuru olarak muhafaza edilir.
- Temizlik malzemeleri kova içinde ve ıslak bırakılmaz.
- Laboratuvarda kullanılan temizlik araçları başka hiçbir yerde kullanılmaz.
- Çalışma alanları, kullanılan malzeme ve ekipman her analizin ve her günün sonunda temizlenir, bir sonraki çalışmaya hazır hâle getirilir.

Dezenfektanların etkisini azaltan faktörler şunlardır:

- Organik madde bulunması
- Yoğun sayıda mikroorganizmaların bulunması
- Yanlış konsantrasyon olması
- Nemli ya da ıslak enstrümanların bulunması
- Kullanım süresi geçmiş dezenfektanların kullanılması
- Temas süresinin yetersiz olması
- Yanlış pH, ısı ve su sertliğinin olması

12.1.2. Günlük ve Haftalık Dezenfeksiyon İşlemleri

Mikrobiyolojik analizlerde çalışanlara, çevreye kontaminasyon kaynaklı zarar gelmemesi ve güvenilir analiz sonuçlarının elde edilebilmesi bakımından temizlik ile dezenfeksiyon işlemlerinin planlı bir şekilde yapılması gerekir.

Analizlerde kullanılan cihazlar, ekipmanlar ve laboratuvar ortamı (tezgâhlar, masalar, zemin vb.) her çalışma sonrasında dezenfekte edilmelidir. Çöp kovalarının, cihazların altta kalan kısımlarının, malzeme



Görsel 12.2: Sterilizasyon ile yüzey temizliği

dolaplarının, kapıların ve kapı kollarının ise haftada bir temizlenmesi ve dezenfeksiyonu yeterlidir. Günlük ve haftalık dezenfeksiyonda takip edilen yol; görünür kirlerin temizlenmesi, temizlenen yerlerin kurulanması ve dezenfeksiyonudur.

Temizlik ve dezenfeksiyon işlemleri için materyalin veya ortamın özelliğine göre uygun konsantrasyonda dezenfektan çözeltileri kullanılır. Bu çözeltiler oldukça reaktiftir ve canlı dokulara zarar verir. Bu yüzden bunların kullanımlarında çok dikkatli olunmalıdır. Sadece uygun alet ve yetişmiş personel bulunan kuruluşlar dezenfeksiyon işlemini yapabilir (Görsel 12.2).

12.1.3. Kullanılmış Araç Gerecin Sterilizasyonunda Dikkat Edilecek Hususlar

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılmış araç gerecin ve ekipmanların sterilizasyonunda otoklavdan yararlanır. Herhangi bir bulaşmaya neden olmamak için analizlerde kullanılacak malzemelerin sterilizasyonu kontamine materyallerin sterilizasyonu ile aynı otoklavda yapılmamalıdır.

Patojen bakteri olduğundan endişe edilen ve patojen tehlikesi olmasa bile bozulmuş gıdaların analizinde kullanılan tüm malzemeler, sterilize edildikten sonra yıkanır.

İçinde mikroorganizma gelişmesi olmuş tüm test tüpleri ve petri kutuları mikroorganizmanın patojen, saprofit ya da yararlı olup olmadığına bakılmaksızın otoklavlandıktan sonra yıkanır.

Plastik petripler, pipetler ve damlalık gibi bir kullanımlık malzemeler atılmadan önce plastik torbalara konularak otoklavlanır.

Sterilizasyon Sonrası Yapılan İşlemler

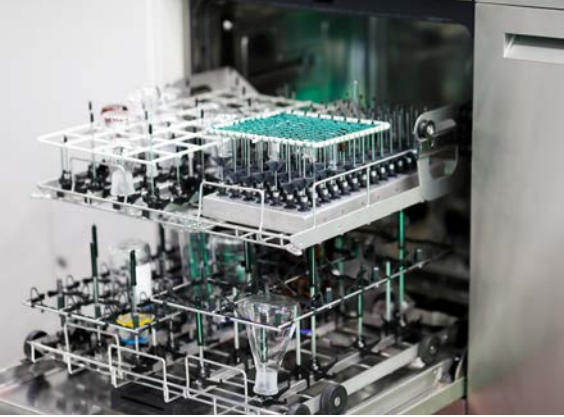
Sterilizasyon sonrası malzeme ve ekipmanların bir sonraki analize hazır hâle getirilmesi için yapılan hazırlık aşamaları aşağıda açıklanmıştır.

Kaplardaki Atıkların Boşaltılması

Sterilizasyon sonrası içinde atık olmayan kaplar direkt yıkanmaya gönderilir. İçinde atık bulunan kapların (petri kabı, numune kabı vb.) içleri sağlam bir torbaya boşaltılır. Torbaların ağzı sıkı bir şekilde bağlanır.

Kapların Yıkaması

Otoklavda sterilize edilen ve içindeki maddelerden arındırılan araçlar bu aşamadan sonra yıkanmaya alınır. Yıkama elde yapılabileceği gibi makinelerde de yapılabilir. Temizleme işlemi; mekanik temizleme, ultrasonik temizleme ve manuel (elde) temizleme olmak üzere 3 yöntemle yapılabilir.



Görsel 12.3: Mekanik temizleme

Mekanik temizlemede laboratuvarlar için yapılmış yıkama makinelerinden yararlanır (Görsel 12.3). Bu makineler ihtiyaca göre farklı ebatlarda ve modellerde tercih edilebilir. Makinelerin içinde kullanılan özel raflar sayesinde laboratuvar araçları kolaylıkla makineye yerleştirilir. Küçük laboratuvarlarda ev tipi bulaşık makineleri de kullanılmaktadır.

Ultrasonik temizlemede temizlenecek olan araçlar delikli küvet, tel sepet gibi uygun kaplar içerisine



yerleştirilir. Cihaza, üretici firmanın önerdiği solüsyon ilave edilir ve 3 dakika boyunca en az 35 KHz sıklıktaki ultrasonik dalgalar gönderilerek materyallerin temizliği sağlanır.

Elde yıkama işlemi, otoklavdan çıkarılan laboratuvar araçlarının yıkanmasında makinenin kullanılmadığı durumlarda yapılır. (Görsel 12.4). Elle yıkamada su, yeterince büyük ve derin en az iki yıkama teknesi, ısıya dayanıklı küçük fırçalar, aşındırıcı olmayan temizlik bezleri (hafif dereceli naylon) ve uygun nitelikteki deterjanlar gerekmektedir.



Görsel 12.4: Elde temizleme

Kapların Durulanması

Yıkamadan sonra iyi bir durulama son derece önemlidir. Durulama, saf suyla ya da yumuşak suyla yapılmalı bu mümkün değilse son durulama saf suyla olmalıdır. Cam malzemede kalabilecek deterjan kalıntıları yapılacak analizlerde mikroorganizma gelişmesini engelleyebilir. Cam malzemeler henüz ıslak iken üzerlerine %0,04 bromtimol mavisi damlatılarak test edilir. Eğer koyu yeşilden açık maviye renk oluşmaz ise deterjan kalmamış demektir. Renk oluşması deterjan kaldığını gösterir. Bu durumda laboratuvar araçları tekrar sudan geçirilip test edilmelidir.

Kapların Saf Sudan Geçirilmesi

Durulama sonrası cam malzemelerin iç ve dış kısımlarından damıtık ya da deiyonize (minerallerinden arınmış) su birkaç kez geçirilir. Bu işlem araçlar üzerindeki su lekelerini önlemede önemlidir. Bu lekeler analiz sonuçlarının yanlış çıkmasına sebep olabilir.

Kurutma

Kurutma işlemi tekrar kontaminasyon riskini azaltır. Aletlerin nemli kalması sterilizasyon seyrini olumsuz etkiler. Yıkamış araçların üstünde ve dibinde kalan suya havadan mikroorganizma bulaşabilir. Kurutma işlemi yapılırken aşağıdaki noktalara dikkat edilmelidir:

- Kurutma işlemi için mümkünse 65- 75 °C ısı sağlayan kurutma kabinleri kullanılabilir.
- Kurutma kabini yoksa ve yıkamış kabı süratle kurutmak gerekiyorsa iyice temizlenip damıtık su ile çalkalandıktan sonra biraz saf ispiroto ile çalkalanıp kurumaya bırakılabilir. İspiroto uçucu bir madde olduğundan kuruma işlemi kısa sürer.
- Kurutma için acil durumlarda etüvden yararlanılabilir.
- Elle kurulama yapılabilir. Bu şekilde yapılacak kurulama işleminde tüysüz materyal kullanılır.
- Durulama suyunun dipte toplanıp kurummasına izin vermemek için durulanan cam malzemeler ters durumda süzölmeye bırakılır (Görsel 12.5).

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan özeler, bunsen alevinde kor hâle gelinceye kadar yakılarak sterilize edilir. Spatül vb. malzeme etanolden geçirildikten sonra alevde yakılır.



Görsel 12.5: Cam malzemelerin kurutulması

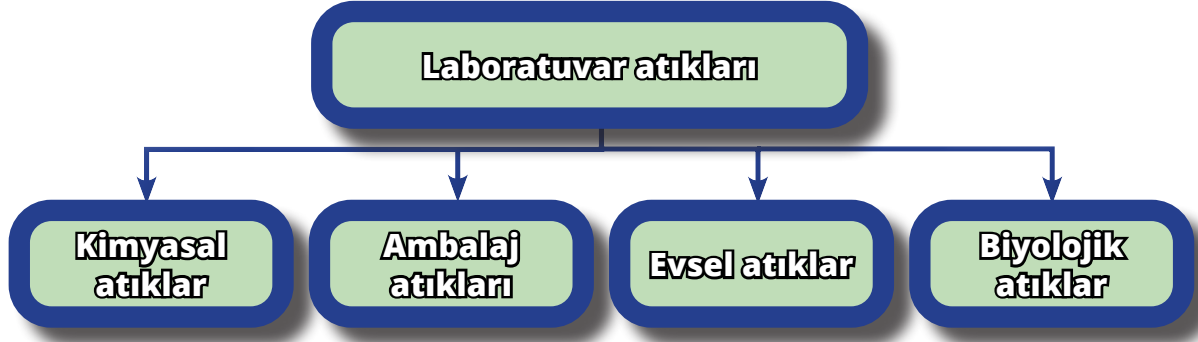


12.2. ATIKLARIN KURALINA UYGUN ATILMASI

Laboratuvar atıkları; belirli kurallar çerçevesinde laboratuvarından uzaklaştırılması gereken, uygun bir şekilde laboratuvarından uzaklaştırılmadığında insan sağlığına ve çevreye zarar verme riski olan maddelerdir.

Gıda laboratuvarlarında analizler sırasında farklı atık grupları oluşmaktadır. Bunların sınıflandırılmaları Tablo 12.1’de verilmiştir (Şahin ve Göçmen, 2019).

Tablo 12.1: Laboratuvar Atıklarının Sınıflandırılması



12.2.1. Atık Yönetimi

Atığın oluşumunun önlenmesi, kaynağında azaltılması, yeniden kullanılması, özelliğine ve türüne göre ayrılması, biriktirilmesi, toplanması, geçici depolanması, taşınması, ara depolanması, geri dönüşümü, enerji geri kazanımı dâhil geri kazanılması, bertarafı, bertaraf işlemleri sonrası izlenmesi, kontrolü ve denetimi faaliyetlerinin tümüne **atık yönetimi** adı verilir (Atık Yönetimi Yönetmeliği).

Gıda laboratuvarlarında gerek kimyasal gerekse biyolojik atık oldukça yoğun olarak bulunmaktadır. Bu atıkların laboratuvarından uzaklaştırılması atık yönetim planına göre yapılmalıdır. Atık yönetim planında, atıkların nasıl toplanacağı, depolanacağı ve uzaklaştırılacağı detaylı bir şekilde yer almalıdır. Laboratuvar atık yönetim sorumlusu belirlenmeli ve diğer görev dağılımları da yapılmalıdır. Laboratuvar atık yönetiminin iyi planlanması ve doğru uygulanması, atıkların insan sağlığına ve çevreye zararlı etkisinin en aza indirilmesi bakımından büyük önem arz eder.

Kimyasal Atıkların Bertaraf Edilmesi

Tehlikeli olmayan sıvı kimyasal atıklar, seyreltilip lavaboya dökülerek bertaraf edilir. Tehlikeli olmayan katı kimyasallar ise atığın türüne göre evsel atık ya da atık yağ kabına atılmalıdır. Geri kazanımının veya bertarafının laboratuvarında yapılması mümkün olmayan kimyasal atıklar için lisanslı bir atık geri kazanım veya bertaraf tesisi ile anlaşma yapılmalıdır.

Biyolojik Atıkların Bertaraf Edilmesi



Görsel 12.6: Çeşitli boyutlardaki atık kapları

Ekim yapılmış besiyerleri, dilüsyon sıvılarının bulunduğu tüpler ve diğer kontamine cam malzemeler, içinde %70 etil alkol bulunan atık küvetlerinde biriktirilir. Bu materyaller daha sonra otoklavda sterilize edilir. Sterilize edilen materyallerden bertaraf edilmesi gerekenler atık yönetim planında belirtilen atık kutusuna atılır. Tek kullanımlık kontamine materyaller (petri kutusu, pipet ucu vb.), otoklav poşetli tehlikeli atık kabında biriktirilir (Görsel 12.6). Daha sonra otoklavda sterilize edilerek tıbbi atık kutusuna atılır. Sterilizasyon etkinliği sterilizasyon indikatör bandı (otoklav bandı) ile kontrol edilir.

Atıkların Bertaraf Edilmesinde Dikkat Edilecek Hususlar

- Atıklar mümkün olduğunca geri kazanılmaya çalışılmalıdır. Geri kazanımı mümkün olmayan atıklar ise daha zararsız atık hâline dönüştürüldükten sonra atık yönetim planına uygun olarak bertaraf edilmelidir.
- Atık poşetleri $\frac{3}{4}$ oranından fazla doldurulmamalıdır. İçinde atık bulunan poşetlerin ağzı sıkıca kapatılmalı sonra poşetler bertaraf edilmelidir.
- Kimyasal atıkların bertaraf edilmesi sırasında sağlığa zararlı gazların açığa çıkma tehlikesi bulunan işlemler çeker ocak içerisinde yapılmalıdır.
- Tehlikeli atıklar kırmızı renkli konteynerlerde toplanmalıdır (Görsel 12.7).
- Atık kutuları atık yönetim planına uygun olarak sınıflandırılmalı ve etiketlenmelidir.



Görsel 12.7: Tehlikeli atık konteynerleri



**1. UYGULAMA : ANALİZ SONRASI TEMİZLİK VE DEZENFEKSİYON İŞLEMLERİNİ YAPMA****İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri**

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmuyunuz.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Analizde kullanılan araç gereç ve donanımları sterilize ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | | |
|----------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| ✓ Laboratuvar ortamı | ✓ Yıkama ve durulama küvetleri | ✓ Temizlik fırçaları |
| ✓ Mop | ✓ Paspas | ✓ Uygun temizleme çözeltileri |
| ✓ Dezenfektan | ✓ Atık kutuları | ✓ Temizlik bezleri |
| ✓ Temizlik kovaları | | |

İşlem Basamakları

1. Yıkama ve durulama işlemleri için yaklaşık 45 °C sıcaklıkta saf su ile doldurulmuş iki küvet hazırlayınız.
2. Yıkama küvetine temizleme çözeltilerini uygun miktarda ilave ediniz.
3. Dezenfeksiyon işlemi için kullanılacak maddeleri uygun konsantrasyonda hazırlayınız.
4. Malzeme dolaplarını uygun şekilde temizleyiniz ve dezenfekte ediniz. Malzemeleri kuralına uygun olarak dolaplara yerleştiriniz.
5. Atık kutularını fırça yardımıyla uygun şekilde temizleyiniz ve kutuları ters çevirerek kurumaya bırakınız. Temizlenmiş atık kutularını uygun bir dezenfektan ile doldurunuz ve 10 dakika bekleterek dezenfekte ediniz.
6. Çalışma tezgâhlarını, cihazların altında kalan kısımları ve masaları uygun temizleme çözeltileri ile temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
7. Fayans ve yüzeyleri uygun şekilde temizleyiniz ve dezenfekte ediniz. Kuru süpürme yapmayınız. Temizliği, temiz alandan kirli alana doğru yapınız.
8. Kapı, kapı kolları vb. alanları uygun şekilde temizleyiniz ve dezenfekte ediniz.
9. Yıkamada kullanılan (fırça, küvet, temizlik bezleri vb.) araçları yıkayarak bol suyla durulayınız ve kurumaya bırakınız.



2. UYGULAMA : ATIKLARIN KURALINA UYGUN ATILMASINI SAĞLAMA

İş Sağlığı ve Güvenliği Tedbirleri

- ✓ Laboratuvar çalışmasının gerektirdiği kişisel koruyucu donanımları (önlük, eldiven, maske, koruyucu gözlük, bone vb.) kullanınız.
- ✓ Arkadaşlarınızın da koruyucu donanımlarını kullanıp kullanmadıklarını kontrol ediniz.
- ✓ Çalışacağınız alanı aseptik hâle getiriniz.
- ✓ Kullanmayacağınız herhangi bir malzemeyi çalışma alanınızda bulundurmayınız.
- ✓ Analize başlamadan önce analiz defterinizi ve işlem basamaklarının yazılı olduğu belgeyi yanınızda bulundurunuz.
- ✓ Analizler tamamlandıktan sonra kullanılmış besiyeri ve numuneleri tekniğine uygun şekilde imha ediniz.
- ✓ Laboratuvar çalışmalarından önce ve çalışma bitiminde ellerinizi yıkayıp dezenfekte ediniz.

Kullanılacak Madde ve Malzemeler

- | | |
|---|--------------------------------|
| ✓ Sterilizasyon hazırlığı yapılmış laboratuvar araçları | ✓ Temizleme çözeltileri |
| ✓ Atık kutuları | ✓ Etiket |
| ✓ Farklı renklerde atık torbaları | ✓ Yıkama ve durulama küvetleri |
| ✓ Piset | ✓ Fırçalar |
| ✓ Laboratuvar atıkları | ✓ %0,04'lük bromtimol mavisi |
| ✓ Otoklav poşeti | ✓ Saf su |
| | ✓ Otoklav |

İşlem Basamakları

1. Atık kutularını atık türlerine göre sınıflandırarak etiketleyiniz ve atık türlerine göre farklı renkte çöp poşetleri kullanınız.
2. Kullanılmış araç gereci sterilizasyona hazır hâle getiriniz.
3. Sterilizasyona hazır hâle getirilen malzemeleri uygun bir biçimde otoklava yerleştiriniz.
4. Otoklavın sıcaklık ve süre ayarını yaparak çalıştırınız.
5. Sterilize edilen kullanılmış petri kutuları ve test tüplerindeki besiyerlerini uygun atık kutusuna boşaltınız.
6. Tek kullanımlık damlalık, petri kutusu gibi araçları sterilize edildiği torbayla birlikte uygun atık kutusuna atınız.
7. Cam araçları uygun bir fırçayla kalıntılar temizleninceye kadar fırçalayınız.
8. Çıkmayan lekeleri temizleme çözeltilerinden biriyle yıkayınız.
9. Yıkanan malzemeleri durulama küvetinde durulayınız.
10. Cam malzemeler üzerinde deterjan kalıntısı kalıp kalmadığını %0,04'lük bromtimol mavisi ile test ediniz.
11. Durulanmış bütün araçları içten ve dıştan saf sudan geçiriniz ve uygun bir şekilde kurutunuz.



ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERİN BAŞINDA BOŞ BIRAKILAN YERE, CÜMLELERDE VERİLEN BİLGİLER DOĞRU İSE "D" YANLIŞ İSE "Y" YAZINIZ.

1. () Sterilize edilmemiş kontamine atıklar biyolojik atık grubuna dâhildir.
2. () Pipetlerden deterjan ile çıkmayan organik kalıntılar ovucu tozlarla temizlenmelidir.
3. () Yıkanmış araçların üstünde ve dibinde kalan suya, havadan mikroorganizma bulaşır.
4. () Yıkanmış araçlara bromtimol mavisi damlatıldığında renk oluşmaması, deterjan kaldığının göstergesidir.
5. () Dezenfeksiyon seçimi için maliyet analizi önemli bir konudur.
6. () Dezenfeksiyonun amacı hastalık etkenlerinin etrafa bulaşmasına engel olmaktır.

AŞAĞIDAKİ CÜMLELERDE BOŞ BIRAKILAN YERLERE DOĞRU SÖZCÜKLERİ YAZINIZ.

7. Malzeme ve yüzeylerin deterjan ve enzimatik ürünlerle silinerek veya yıkanarak kirlere arındırılmasına denir.
8. Cam malzemelerin üzerinde deterjan kalıntısı olup olmadığı, cam malzemeler henüz ıslakken üzerlerine %0,04'lük damlatılarak tespit edilir.
9. Sadece cansız yüzeylerin dezenfeksiyonu amacıyla kullanılan kimyasal maddelere denir.

AŞAĞIDAKİ SORULARIN DOĞRU CEVABINI İŞARETLEYİNİZ.

10. **Otoklavda sterilizasyonla ilgili olarak aşağıdakilerden hangisi yanlıştır?**
 - A) Isı ve süre, otoklav içine konan malzemelerin büyüklüğüne bağlı olarak değişir.
 - B) Mikrobiyolojik analiz sonrası uygulanan sterilizasyonda ısı ve süre daha fazladır.
 - C) Isı ne kadar yüksekse sürenin de aynı oranda uzatılması gerekir.
 - D) Bu yöntemle ısıya dayanıklı kontamine materyaller steril edilir.
 - E) Isı ne kadar yüksekse sürenin de aynı oranda kısılması gerekir.





11. Laboratuvar araçlarının yıkanması ile ilgili olarak yanlış olan ifade aşağıdakilerden hangisidir?
- A) Yıkama işleminin tüm aşamalarında saf su veya demineralize su kullanılmalıdır.
B) Yıkama elde yapılabileceği gibi makinelerde de yapılabilir.
C) Deterjan kalıntısı, analizlerde mikroorganizma üremesini engelleyebilir.
D) Sudaki mineral kalıntıları analiz sonucunu olumsuz etkileyebilir.
E) Yıkamada kullanılan saf su veya demineralize su deterjanın etkinliğini azaltır.
12. Aşağıdakilerden hangisi dezenfektanların etkisini azaltan faktörlerden değildir?
- A) Organik madde varlığı
B) Yüzeyin yeterince nemli olmaması
C) Fazla mikroorganizmanın bulunması
D) Yanlış konsantrasyon
E) Yetersiz temas süresi

A spiral-bound notebook with a red cover and a silver spiral binding. The pages are yellow with blue horizontal lines. A yellow pencil is positioned at the bottom right corner of the notebook.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI



1. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. D		5. fermantasyon (Durham) tüpü		9. C	13. D
2. D		6. inkübatör		10. D	14. A
3. Y		7. mikroskop		11. E	15. A
4. Y		8. elektron mikroskobu		12. C	

2. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. D	4. Y	7. alkol	10. dezenfeksiyon	11. E	14. C
2. Y	5. Y	8. -18 °C		12. D	15. A
3. D	6. Y	9. tüp karıştırıcı (vorteks)		13. B	16. B

3. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. D		5. sterilizasyon		9. E	
2. Y		6. tinalizasyon		10. C	
3. D		7. sterilizasyon indikatör bandı (otoklav bandı)		11. C	
4. Y		8. otoklav		12. C	

4. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. D	5. Y	8. dilüsyon serisi	12. katı	16. B	
2. D	6. Y	9. oksijenle	13. aseptik (steril)	17. C	
3. D	7. D	10. dilüsyon oranı	14. 1/110	18. E	
4. Y		11. stomacker-blender	15. biyogüvenlik kabini	19. C	

5. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. D	5. Y	8. agar	12. hesaplama ve tartım	16. D	20. A
2. Y	6. Y	9. kontaminasyonunu	13. sterilite	17. C	
3. D	7. D	10. zenginleştirme	14. pH kağıdı-indikatör	18. C	
4. Y		11. sıvı-yarı sıvı	15. hemolitik olma	19. A	

6. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. D	6. D	11. kültür yapma (kültivasyon)		16. E	
2. Y	7. Y	12. 37 °C		17. C	
3. Y	8. D	13. 15 dk.		18. E	
4. D	9. D	14. agar		19. E	
5. D	10. D	15. tek			

7. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. Y	5. D	6. homojen	10. 48	11. B	15. B
2. D		7. pozitif		12. D	16. C
3. Y		8. canlı		13. E	17. C
4. D		9. toplam bakteri		14. D	



8. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. Y	4. Y	8. pozitif-negatif		11. C	15. C
2. D	5. D	9. sayı / ml		12. C	
3. D	6. Y	10. asitlendirilmiş		13. B	
7. D				14. B	

9. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. D	5. Y			9. D	13. B
2. D	6. Y			10. E	14. D
3. Y	7. Y			11. B	15. B
4. D	8. D			12. A	16. E

10. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. Y	4. Y	5. smear işlemi	8. renk giderici	11. C	14. C
2. Y		6. fiksasyon (tespit)	9. 24 saatlik	12. A	15. E
3. Y		7. yapay (sentetik)	10. kaynar su banyosu	13. B	

11. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. Y	5. Y	9. aseptik	13. izole	16. C	20. C
2. Y	6. Y	10. koliform	14. hava örnekleme cihazı	17. E	
3. D	7. D	11. mikrobiyolojik	15. işverenin	18. B	
4. Y	8. Y	12. ekim		19. E	

12. ÖĞRENME BİRİMİ SONU ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

DOĞRU /YANLIŞ		BOŞLUK DOLDURMA		TEST	
1. D	4. Y	7. dezenfeksiyon		10. C	
2. Y	5. D	8. bromtimol mavisi		11. E	
3. D	6. D	9. dezenfektan maddeler		12. B	



- Acar, J. (1987). **Genel Mikrobiyoloji Ders Notları**. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü.
- Akgün, A., Hüner, İ., Yılmaz, E., ve Çınar, K. (2017). **Gıda Analiz Uygulamaları**. İzmir: Sidas Medya Yayıncılık.
- Akın, M. B., ve Atlı, A. (2017). **Mikrobiyolojik Analizler İçin Örnek Alımı ve Hazırlanması**. O. Erkmen içinde, Gıda Mikrobiyolojisi (s. 463-471). Ankara: Efil Yayınevi.
- Altındış, M. (2013). **Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Kitabı**. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Arda, M. (2000). **Temel Mikrobiyoloji**. Ankara: Medisan Yayınevi.
- Bakırcı, G. T., ve Kayaardı, S. (2017). **Mikrobiyoloji Analiz Metotları**. İzmir: Sidas Medya Yayıncılık.
- Bulduk, S., ve Bulduk, Ö. (2018). **Gıda ve Personel Hijyeni**. Ankara: Detay Yayıncılık.
- Cemeroğlu, B. S. (2018). **Gıda Analizleri**. Ankara: Bizim Grup Basımevi.
- Çotuk, A., ve İlhan-Sungur, E. (2014). **Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri**. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Erkmen, O. (2015), **Basic Methods for the Microbiological Analysis of Foods**. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.
- Erkmen, O. (2016), **Laboratory Techniques in Microbiology**. Ankara: Atlas Akademik Yayıncılık.
- Ertürk, Ö., Başkan, C., Karaman, Ü., ve Kolören, Z. (2019). **Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu**. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.
- Güven, S., Zorba, N.N. (2020), **Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu**. Ankara: Atlas Akademik Yayıncılık.
- Güven, S., ve Zorba, N. N. (2020). **Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu**. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.
- Halkman, A. K. (2000). **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları**. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
- Halkman, A. K. (2005). **Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları**. Ankara: MERCK Yayınları.
- Hecer, C., ve Ulusoy, B. (2015). **Gıda Analizleri**. Bursa: Dora Yayıncılık.
- Kayaardı, S., Söbeli, C. ve Akkara, M. (2014). **Et Teknolojisi Laboratuvar El Kitabı**. Manisa: Sidas Medya Yayıncılık.
- Kırdar, S. S. (2019). **Genel Laboratuvar Uygulamaları**. S. S. Kırdar içinde, Süt ve Süt Ürünlerinde Laboratuvar Uygulamaları Analiz Yöntemleri (s. 3-51). İzmir: Sidas Medya Yayıncılık.
- Kırdar, S. S. (2019). **Numune Alma**. S. S. Kırdar içinde, Süt ve Süt Ürünlerinde Laboratuvar Uygulamaları Analiz Yöntemleri (s. 81-105). İzmir: Sidas Medya Yayıncılık.
- Mercanoğlu Taban, B. (2019). **Mikroskopik İnceleme**. S. S. Kırdar içinde, Süt ve Süt Ürünlerinde Laboratuvar Uygulamaları Analiz Yöntemleri (s. 109-139). İzmir: Sidas Medya Yayıncılık.
- Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi Gıda Teknolojisi alanı Gıdalarda Mikrobiyolojik Analizler Dersi Çerçeve Öğretim Programı. (2020). Ankara: Millî Eğitim Bakanlığı Yayınları.
- Ökmen, G. (2020). **Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu**. Ankara: Gece Kitaplığı Yayıncılık.
- Şahin, İ., Başoğlu, F. (2014), **Gıda Mikrobiyolojisi**. Bursa: Dora Yayıncılık.
- Şahin, İ., ve Göçmen, D. (2019). **Gıda Laboratuvar Tekniği**. Bursa: Nobel Akademik Yayıncılık.
- Tağı, Ş. (2018). **Mikrobiyolojik Analiz Yöntemleri**. B. S. Cemeroğlu içinde, Gıda Analizleri (s. 311-392). Ankara: Bizim Grup Yayınevi.



- Tayar, M., ve Hecer, C. (2015). **Gıda Mikrobiyolojisi**. Bursa: Dora Yayıncılık.
- Temiz, A. (2016). **Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri**. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi.
- Tunalı, Y. (2014). **Farmasötik Mikrobiyoloji Uygulamaları**. Bursa: Dora Yayıncılık.
- Yazım Kılavuzu. (2012). Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları.

GENEL AĞ KAYNAKÇASI VE GÖRSEL KAYNAKÇASI

<http://kitap.eba.gov.tr/karekod/Kaynak.php?KOD=1549>

Ders materyalinin genel ağ kaynakçasına ve görsel kaynakçasına QR kodunu okutarak veya yukarıda bulunan linki web tarayıcınıza yazarak ulaşabilirsiniz.



