ORTA ÖĞRETİM PROJESİ

LABORATUVAR HİZMETLERİ

BOYAMA YÖNTEMLERİ

524LT0020

Ankara, 2011
Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.

Milli Eğitim Bakanlığına ücretsiz olarak verilmiştir.

PARA İLE SATILMAZ.
AÇIKLAMALAR .................................................................................................................. iii
GİRİŞ .................................................................................................................................. 1
ÖĞRENME FAALİYETİ–1 ................................................................................................. 3
1. PREPARAT HAZIRLAMA ............................................................................................... 3
   1.1. Lamların Temizlenmesi .......................................................................................... 3
   1.2. Preparat Hazırlama Aşamaları .............................................................................. 4
   1.3. Boyama .................................................................................................................. 5
       1.3.1. Boya Çözeltileri ............................................................................................. 6
       1.3.2. Boyama Yöntemleri ...................................................................................... 7
     UYGULAMA FAALİYETİ .............................................................................................. 9
     ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME ................................................................................. 11
ÖĞRENME FAALİYETİ–2 ................................................................................................. 12
2. DİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ .............................................................................. 12
   2.1. Basit Boyama ......................................................................................................... 12
   2.2. Gram Boyama ....................................................................................................... 12
   2.3. Spor Boyama ......................................................................................................... 14
       2.3.1. Malasit Yeşili ile Spor Boyama ...................................................................... 15
       2.3.2. Bartholomew ve Mittwer Spor Boyama ......................................................... 16
   2.4. ARB Boyama ......................................................................................................... 16
   2.5. Boyanmış Preparatların Muhafazası .................................................................... 18
     UYGULAMA FAALİYETİ .............................................................................................. 19
     ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME ................................................................................. 27
ÖĞRENME FAALİYETİ–3 ................................................................................................. 29
3. İNDIREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ ......................................................................... 29
   3.1. Yaş Preparasyon Tekniği ile Negatif Boyama ......................................................... 29
   3.2. Yayma Yöntemi ile Negatif Boyama ...................................................................... 30
   3.3. Negatif Differensiyal Boyama .............................................................................. 31
   3.4. Kapsül Boyama ..................................................................................................... 32
     UYGULAMA FAALİYETİ .............................................................................................. 33
     ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME ................................................................................. 37
MODÜL DEĞERLENDİRME .............................................................................................. 38
CEVAP ANAHTARI ........................................................................................................... 40
KAYNAKÇA ......................................................................................................................... 41
## AÇIKLAMALAR

<table>
<thead>
<tr>
<th>KOD</th>
<th>524LT0020</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>ALAN</td>
<td>Laboratuvar Hizmetleri</td>
</tr>
<tr>
<td>DAL/MESLEK</td>
<td>Ortak Alan</td>
</tr>
<tr>
<td>MODÜLÜN ADI</td>
<td>Boyama Yöntemleri</td>
</tr>
<tr>
<td>MODÜLÜN TANIMI</td>
<td>Preparat hazırlama ve boyama yöntemleri ile ilgili bilgi ve becerilerin kazandırıldığı öğrenme materyalidir.</td>
</tr>
<tr>
<td>SÜRE</td>
<td>40/32</td>
</tr>
<tr>
<td>ÖN KOŞUL</td>
<td>Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon-1 modülünü başarmış olmak</td>
</tr>
<tr>
<td>YETERLİK</td>
<td>Preparatı boyamak</td>
</tr>
</tbody>
</table>

### MODÜLÜN AMACI

**Genel Amac**
Gereklı ortam sağlanında teknigiine uygun olarak preparat hazırlayıp farklı boyama yöntemleri ile boyayabileceksiniz.

**Amaçlar**
1. Preparat hazırlayabileceksiniz.
2. Direkt boyama yöntemleri ile boyama yapabileceksiniz.
3. İndirekt boyama yöntemlerini ile boyama yapabileceksiniz.

### EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI

**Ortam**
Laboratuvar ortamı, kütüphane, internet, bireysel öğrenme ortamları vb.

**Donanım**
Lam, lamel, öz, bunzen beki, küvet, baget, pipet, beher, kurutma kağıdı, kültür, saf su, kristal viyole, metilen mavisi, lugol, sulu fuksin, safranin, çini mürekkebi, nigrosin, etil alkol, malaşit yeşili, karbol fuksin, asit-alkol karışımı, çini murekkebi, bazik fuksin, kristal viyole, sedir yağı

### ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Modül içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen ölçme araçları ile kendinizi değerlendirireceksiniz. Öğretmen modül sonunda ölçme aracı (çoktan seçmeli test, doğru yanlış testi, boşluk doldurma, eşleştirme vb.) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığınız bilgi ve becerileri ölçerek sizi değerlendirecektir.
Sevgili Öğrenci,

Mikroorganizmalar çok küçük ve genellikle şeffaf olduklarından mikroskop altında bile incelenmeleri zordur. Bu nedenle mikroskobik incelemelerini daha kolay yapabilmek, daha net görüntü ve kesin bilgi elde edebilmek amacıyla boyanarak incelenmeleri gerekir. Mikroorganizmaların mikroskobik morfolojileri (şekilleri, büyüklükleri, dizilişleri, belirli hücre organellerinin varlığı ve yapısı) ve çeşitli boyalara karşı davranışları (gram pozitif, gram negatif, aside dirençli bakteri) boyanarak belirlenebilir.

Mikroskobik incelme amacıyla şüpheli kültürlerden veya marazi (hastalık etmeni) maddelerden (organlardan, patolojik sıvılardan, kandan, idrar, gaita, sperma, süt vb.) preparatlar hazırlanır. Hazırlanan yayma preparatlarına, alınan örneğe ve muhtemel etke yönelik farklı boyama yöntemleri uygulanır.

Bu modül preparat hazırlama ve boyama yöntemleri ile ilgili bilgi ve becerileri kazanmanızda sızlere yardımcı olacaktır.
AMACı

Gerekli ortam sağlandığında tekniğine uygun olarak preparat hazırlayabileceğiınız.

ARAŞTIRMA

- Mikrobiyolojide kullanılan boyaları, boyama mekanizmalarını ve en sık kullanılan boyama yöntemlerini araştırınız.

1. PREPARAT HAZIRLAMA


Preparat hazırlamada kullanılacak lamların kalitesi (şeffaflıği, yüzeylerinin çiziksiz olması, kenarlarının ve ölçüplerinin düzgünluğu, kalınlığının homojenliği ve camın sağlamlığı) ve temizliği son derece önemlidir. Lam üzerinde bulunan çok küçük bir leke, toz, kalıntı veya çizik mikroskopta yanlıs algılamalarına neden olabilir ve görüntüün net olarak görülmesini engelleyebilir.

1.1. Lamların Temizlenmesi


- Hiç kullanılmamış (yeni) lamların temizliği toplu olarak yapılacaksa kromik asit çözeltisinde bekletilerek, tek tek veya kullanılmacağı anda yapılacaksa % 96’lık etil alkol - eter (1:1) karışımı ile yapılmaktadır.

Hiç kullanılmamış (yeni) lamların kromik asit çözeltisinin temizliğini yapmayı:
- Lamlar, birbirine temas etmeyecik şekilde izgaralara yerleştirilir.
- Kromik asit çözeltisinin bulunduğu kaba konulacak 12 saat bekletilir.
- Lamlar, kromik asit çözeltisinden alınarak musluk suyu altında iyice durulur.
- Saf su ile son durulama yapılır.
- Yumuşak dokulu, temiz ve kuru pamuklu bir bezle veya kâğıtla silinir.
Kullanılmış (kültürle temas eden) lamlar, kullanım sonrasında mutlaka dezenfektan içerisine konulmalıdır. Dezenfektan içerisinde biriken lamlar yeniden kullanılacaksa mutlaka temizlenmesi gerekir. Günümüzde lamların tekrar tekrar kullanmasına ihtiyaç (ekonomik ve teknik prosedür gereği) azalmıştır.

Kullanılmış kirli lamların temizliğinde aşağıdaki işlem basamakları takip edilir:

- Yıkama kabına deterjanlı su (mükünse sıcak su) hazırlanır.
- Lamlar deterjanlı suyun içerisine konularak 1–2 gün bekletilir.
- Lamlar yumuşak pamuklu bezle ovularak veya fırça ile fırçalanarak kırılar tamamen uzaklaştırılır.
- Kirli su boşaltılduktan sonra daha az deterjanlı su ile lamlar bir kez daha yıkanır.
- Musluk suyu altında iyice durulur.
- Saf su ile son durulama yapılır.
- Yumuşak dokulu, temiz ve kuru pamuklu bez veya kâğıtlı silinir.

Silme, paketleme ve kullanıma hazırlama işlemlerinde lamalar kenarlarından tutulmalı ve lamaların yüzeyine asla dokunulmalıdır. Yıpranmış, çizilmiş ve yeterince temiz görünmeyen lamalar kullanılmadan atılmalıdır.

1.2. Preparat Hazırlama Aşamaları

Preparat hazırlamada kullanılabilecek lam, ksilol veya etil alkolle ıslatılırak temiz bir bezle silinip alevden geçirilir ve aşağıdaki aşamalar takip edilerek preparat hazırlanır.

Şekil 1.1: Lam-lamel arası preparat hazırlama
Boyasız inceleme için preparat hazırlanma

- Temiz bir lamın ortasına 2–3 öze dolusu sıvı kültür konur.
- Lam üstündeki kültür sıvısının kenar kısmına yaklaşık 450 eğimle bir lamel temas ettirilir.
- Lamel yavaşça (lam ile lamel arasında hava kabarcığı kalmaya çak şekilde) lam üzerine kapatılır.

Direkt boyama yöntemleri için preparat hazırlanma

- Temiz bir lamın ortasına bir damla damıtık su veya FTS konur (Sıvı kültürlerden preparat hazırlanacaksa kültür yoğunluğuna bağlı olarak buna gerek görülmeyebilir.).
- Kültürden öze ile alınan örnek, su damlası yanında ezilerek su damlası ile azar azar karıştırılır.
- Lamın üzerine ince bir tabaka halinde ve yavaşça (etrafa sıçratmadan) yayılır.
- Havada kuruması sağlanır (Kurutma işlemi, preparatlar oda veya etüv ısısında bırakılmak suretiyle yapılabilir. Kurutma işlemi sırasında, lam üzerinde bulunan mikroplar hafifçe lama yaptırılırlar. Ancak, su ile yıkanılırsa da hafife lama yapılabilirler.).
- Mikroorganizmaların lam üzerine tespiti (fiksasyon) yapılır.

Preparatların tespit (fiksasyon) edilmesindeki temel amaç bakterilerin lama yapışmalarını sağlayarak tutturmaktır. Bu suretle üzerine uygulanacak sıvılarla lamanın ayrılması, tespit işlemini genellikle “ısıl uygulama ile tespit” veya “kimyasal maddelerle tespit” olmak üzere iki yöntemle yapılır.


İşte İlk kuruluş bileşenlerin hücrelerden ve protein yönünden zengin numunelerden (kan ve dokulardan) yapılan preparatlara kimyasal tespit uygulanır. Kimyasal tespit işlemi etil alkol, metil alkol, alkol-eter, alkol-aseton gibi kimyasal maddeler içerisinde bekletilerek yapılır. Metil alkol de 3–4 dakika, etil alkol de 10 dakika bekletilen preparat çok hafif akan suda yıkanıp kurutulur.

1.3. Boyama

Mikroorganizmalar, mikroskop altında boyasız incelenebildiği gibi iyi ve detaylı görebilmek, identifikasyonlarına (tanma, tanımlama, mikroorganizmanın cins ve türünün belirlenmesi) yarayacak bazı bilgileri (spor, kapsül, şekil, boya reaksiyonları vb.) elde edebilmek için boyanarak incelenmeleri de gerektir. Bu amaçla, kültürlerden veya marazi maddelerden usulüne uygun olarak preparatlar hazırlanır, boyanır ve mikroskopta incelenir.
1.3.1. Boya Çözeltileri

Boya, bir benzen halkasına bağlı kromofor ve oksokrom gruplarını taşıyan bir bileşiktir. Kromofor grup boyaya renk, oksokrom grup ise boyanacak materyale bağlanma özelliğini verir. Günümüzde, mikrobiyoloji alanında doğal boyalar (karmin, orsein, indigo, kinakına vb.) yerine daha çok sentetik boyalar kullanılmaktadır.

1.3.1.1. Boya Çeşitleri

Boyalar, boya molekülünün elektriksel yüküne göre asidik, bazik ve nötr boyalar olmak üzere üç gruba ayrılır:

- **Asidik Boyalar**: İyonize oldukları zaman, negatif elektrikle yüklenirler. Bunlar renkli asitlerin tuzlarıdır (Genellikle sodyum tuzudur, bazen potasyum, kalsiyum veya amonyum tuzları da olabilir.). Asidik boyalar arasında asit fuksin, safranin, pikrik asit, eozin, nigrosin, kongo kırmızısı bulunmaktadır.

- **Bazik Boyalar**: İyonize oldukları zaman, pozitif elektrikle yüklenirler. Bunlar renkli bazların tuzlarıdır (genellikle klorid benzen sulfat, okzalat ve asetat). Bazik boyalar arasında metilen mavisi, kristal viyole, bazik fuksin, safranin, malaşit yeşili bulunmaktadır.

- **Nötr Boyalar**: Asidik ve bazik boyaların uygun oranda karışımından elde edilir (Giemsa, Wright, Leishman vb.).

1.3.1.2. Boya Çözeltilerinin Hazırlanması

Boya çözeltileri hazırlanırken boyanın özelliği ve kullanıma amacıyla uygun olarak farklı işlemler veya farklı çözücü sıvılar kullanılabilir.

Genel olarak boya çözeltisi hazırlanmasında takip edilen işlem basamakları şunlardır:

- **Tablo 1.1’de belirtilen miktarda boya tartılır.**
- **Tartılan boya porselen havan içinde havan eli ile ezilir.**
- **Havana belirtilen miktarda çözücü (bazik boyalarda alkol, asidik ve nötr boyalarda ise su) azar azar eklenir ve havan eliyle ezme işlemine devam edilir.**
- **Boya maddesi tamamen çözündürüülüp uygun bir kaba aktarılır.**
- **Saf su ile hacmi tamamlanır.**
- **Çözelti filtre kağıdından süzülür.**
- **Koyu renkli şişelerde 1–2 gün dinlendirildikten sonra kullanılır.**
<table>
<thead>
<tr>
<th>BOYA ÇÖZELTİSİ</th>
<th>KULLANIM AMACI</th>
<th>HAZIRLANIŞI</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Bazik fuksin</td>
<td>Basit ve gram boyama</td>
<td>0,1 g boya tartılır ve 100 ml distile su içerisinde çözündürülür.</td>
</tr>
<tr>
<td>Karbol fuksin</td>
<td>ARB boyama</td>
<td>0,3 g boya tartılır ve 10 ml etanol (%95’lik) içerisinde çözündürülür. 90 ml %5’lik fenol çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırılır. 1 gün dinlendirildikten sonra kullanılır.</td>
</tr>
<tr>
<td>Sulu Karbol fuksin</td>
<td>Basit ve gram boyama</td>
<td>Karbol fuksin boya çözeltisi 10 kat sulandılarak hazırlanır.</td>
</tr>
<tr>
<td>Kristal viyole</td>
<td>Basit ve gram boyama</td>
<td>2 g boya tartılır ve 20 ml etanol (%95’lik) içerisinde çözündürülür. 0,8 g amonyum okzalat tartılır ve 80 ml distile su içerisinde çözündürülür. İki çözelti iyice karıştırılır.</td>
</tr>
<tr>
<td>Safranin</td>
<td>Basit ve spor boyama</td>
<td>0,5 g boya tartılır ve 10 ml etanol (%95’lik) içerisinde çözündürülür. 100 ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılır ve süzülür.</td>
</tr>
<tr>
<td>Malaşit yeşili</td>
<td>Spor boyama</td>
<td>5 g boya tartılır ve 100 ml distile su içerisinde çözündürülür.</td>
</tr>
<tr>
<td>Metilen mavisi</td>
<td>Basit ve ARB boyama</td>
<td>0,3 g boya tartılır ve 30 ml etanol (%95’lik) içerisinde çözündürülür. 70 ml distile su ilave edilerek iyice karıştırılır ve filtre kâğıdından süzülür.</td>
</tr>
<tr>
<td>Laktofenol</td>
<td>Küflerin boyasız incelenmesi</td>
<td>100 g fenol tartılır ve 100 ml distile su içerisinde hafifçe ısıtılırlarتأكيد çözündürülür. Üzerine 100 ml laktik asit ve 200 ml gliserol ilave edilerek iyice karıştırılır.</td>
</tr>
<tr>
<td>Laktofenol blue</td>
<td>Küflerin boyalı incelenmesi</td>
<td>100 g fenol tartılır ve 100 ml distile su içerisinde hafifçe ısıtılırlarتأكيد çözündürülür. Üzerine 0,075 g metilen mavisi, 100 ml laktik asit ve 200 ml gliserol ilave edilerek iyice karıştırılır.</td>
</tr>
<tr>
<td>Laktofenol pikrik asit</td>
<td>Küflerin boyalı incelenmesi</td>
<td>100 g fenol tartılır ve 100 ml doymuş pikrik asit çözeltisi içerisinde çözündürülür. Üzerine 100 ml laktik asit ve 200 ml gliserol ilave edilerek iyice karıştırılır.</td>
</tr>
<tr>
<td>Nigrosin</td>
<td>Negatif boyama</td>
<td>10 g boya tartılır ve 100 ml distile su içerisinde aktarılır ve kaynar su yanasında yarım saat tutulur. Üzerine 0,5 ml formalin koruyucu olarak eklenir. Çift katlı filtre kâğıdından süzülür.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Tablo 1.1: Boya Çözeltileri**

**1.3.2. Boyama Yöntemleri**

Mikroorganizmalar oldukça küçük ve genellikle şeffaf olduklarından dolayı mikroskop altında bile incelememeleri zordur. Mikroorganizmaların mikroskobik incelemelerini daha kolay yapabilirmek, daha net ve kesin bilgi elde edebilmek amacı ile boyanarak incelememeleri gerektir. Mikroorganizmalar boyandığında mikroskobik morfoloji (şekilleri, büyüklükleri, dizilş şekilleri, belirli hücre organellerinin varlığı ve yapısi) ve çeşitli boyalara karşı davranışıları (gram pozitif, gram negatif, aside dirençli bakteri) belirlenebilir.


Şekil 1.2: Direkt ve indirekt boyama


Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak preparat hazırlayınız.

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç gereçler: Lam, öz, kültür, bunzen beki

<table>
<thead>
<tr>
<th>İşlem Basamakları</th>
<th>Öneriler</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>➢ Temiz bir lam alınız.</td>
<td>➢ Bütün lamlar (hiç kullanılmamış olsa bile) mutlaka yıkanmalı, temizlenmeli ve ondan sonra kullanmalıdır.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Lamin ortasına bir damla saf su koyunuz (Sıvı kültürlerde buna gerek duyulmayabilir.).</td>
<td>➢ Steril kabin veya bunzen bek alev çatısı altında çalışınız. ➢ Aseptik teknik uygulayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Özeyi steril etikten sonra kültürden örnek alınız.</td>
<td>➢ Özeyi bunzen bek alevinde steril edip soğuttuktan sonra kullanınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Alınan örneği su damlasının yanında eziniz.</td>
<td>➢ Seri çalışınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Su damlası ile karıştırarak lamın üzerine yayınız.</td>
<td>➢ İnce bir film tabakası oluşturacak şekilde yayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>---</td>
<td>---</td>
</tr>
<tr>
<td><img src="image1.png" alt="Image" /></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Havada kurumasını sağlaymentiz.</td>
<td>➢ Tamamen kuryuncaya kadar bekleyiniz.</td>
</tr>
<tr>
<td><img src="image2.png" alt="Image" /></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><img src="image3.png" alt="Image" /></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Asidik boyalar bakterileri boyamaz zemini boyar böylece bakteriler renksiz görünür. Bu boyama türü aşağıdakiardıktan hangisidir?
   A) Direkt boyama
   B) Basit boyama
   C) İndirekt boyama
   D) Bileşik boyama

2. Preparat hazırlamada kullanılacak lamlar ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?
   A) Çok temiz olmalıdır.
   B) Hiç kullanılmamış (yeni) lamlar temizlenmeden kullanılmalıdır.
   C) Saydam olmalıdır.
   D) Çiziksiz ve pürüzsüz olmalıdır.

3. Boya ile boyanacak yüzey arasındaki tutuculuğu artırma etkisini ifade eden terim aşağıdakiardıktan hangisidir?
   A) Mordant
   B) Fiksasyon
   C) Kromofor
   D) Oksokrom

4. Bakteri hücresi bazik boyalar ile boyanır. Bunun sebebi aşağıdakiardıktan hangisidir?
   A) Bakteri hücresinin pozitif elektriksel yükle sahip olması
   B) Bakteri hücresinin negatif elektriksel yükle sahip olması
   C) Bazik boyaların kromofor grup içermesi
   D) Bazik boyaların oksokrom grup içermesi

5. Mikrobiyolojide kullanılan boyalarla ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?
   A) Boya bir benzen halkasına bağlı kromofor ve oksokrom gruplarını taşıyan bir bileşiktir.
   B) Kromofor grup boyaya renk özelliğini verir.
   C) Oksokrom grup boyanacak materyale bağlanma özelliğini verir.
   D) Bütün boyalar bakteri hücresinin boyanır.

6. İncelemesi biten preparatlar ne yapılır?
   A) Çöpe atılır.
   B) Hemen yıkanır.
   C) Dezenfektanın içine atılır.
   D) Antiseptiğin içine atılır.

DEĞERLENDİRME

AMAÇ

Gerekli ortam sağlandığında tekниğe uygun olarak direkt boyama yöntemleri ile boyama yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Direkt boyama yöntemlerini ve yapılış amaçlarını araştırınız.
- Gram pozitif ile gram negatif bakteriler arasındaki farkları araştırınız.

2. DİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ


2.1. Basit Boyama


Basit boyama yönteminde aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanır:

- 1.2’de belirtiltiadi şekilde preparat hazırlanır (yayma, kurutma, tespit).
- Preparatın üzerine boya çözeltisi eklenerek kaplanır.
- Boya dökülerek preparat distile suyla yıkanır.
- Preparat havada veya kurutma kâğıd ile kurutulur.
- Mikroskopta incelenir.

2.2. Gram Boyama

Gram boyama tekniği, mikrobiyolojide sık kullanılan bir boyama yöntemi olup mikroorganizmaların sınıflandırılmasında ve tanımlanmasında kullanılır. Gram boyama ile bakteriler “gram pozitif” (gram olumlu) ve “gram negatif” (gram olumsuz) olarak ikiye ayrılır.


**Şekil 2.1: Gram boyama aşamaları ve her aşamada bakterilerin renkleri**

En sık uygulanan gram boyama yönteminde aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanır:

- 1.2’de belirtildiği şekilde preparat hazırlanır (yayma, kurutma, tespit).
- Preparatın üzerine kristal viyole boya çözeltisi eklenerek kaplanmış ve 1 dakika beklenir.
- Preparat bol distile suyla yıkanır.
- Preparatın üzerine lugol çözeltisi eklenerek kaplanmış ve 1 dakika beklenir.
- Preparat distile suyla yıkanır.
- Preparatın üzerine %95’lik etanol veya asit-alkol karışımı eklenerek 10–15 saniye beklenir.
- Preparat distile suyla yıkanır.
- Preparatın üzerine sulu füksin veya safranin boya çözeltisi eklenecek kaplanmış ve 30 saniye beklenir.
- Preparat bol distile suyla yıkanır.
- Preparat havada veya kurutma kâğıd˘ ile kurutulur.
- Mikroskopa incelenir. Mor renkte görülen mikroorganizmalar gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise gram (–) olarak değerlendirilir.

Gram (–) bakterilerin renkleri alkolle gittiginden ortama daha sonra eklenen sulu fuksin ile boyanır. Böylece gram (+) bakteriler mor renkte (kristal viyole rengi), gram (–) bakteriler pembe-kırmızı renkte (sulu fuksin rengi) boyanır.

![Gram (+) ve Gram (–) hücre duvarı](image)

**Şekil 2.2: Gram pozitif ve gram negatif hücre duvarı**

Gram boyanma özelliği bakteri hücre duvarının (çeperi) yapısı ile ilgilidir. Hücre duvar yapıları arasındaki farklar:

- Gram (+) bakterilerin hücre çeperinde gram (–) bakterilere göre daha kalın peptidoglikan tabaka mevcuttur.
- Gram (+) hücre çeperinde teikoik asit olmasına rağmen gram (–) yoktur.

2.3. Spor Boyama


2.3.1. Malaşit Yeşili ile Spor Boyama

Malaşait yeşili ile spor boyama aşamaları aşağıda açıklanmıştır.

- 1.2’de belirtildiği şekilde incelenerek bakteri kültürü ile preparat hazırlanır (yayma, kurutma ve tespit).
- Preparat uygun bir kaynar su banyosu düzeneğinin üstüne yerleştirilir.
- Preparatın üzeri % 5’lik malaşit yeşili boya çözeltisi ile kaplanır. Bunun üzerine daha önceden lamdan daha küçük boyutta olacak şekilde kesilerek hazırlanmış olan bir kurutma kağıdı yerleştirilir. Kurutma kağıdı boya çözeltisini çekerek işlanır.
- Kurutma kağıdının üzerine malaşit yeşili boya çözeltisi damlatılarak kağıdın sürekli ıslak kalması sağlanır.
  - Kurutma kağıdın ıslaklığı azaldıkça malaşit yeşili boya çözeltisi damlatılarak preparat bu şekilde 5–6 dakika boyanır.
  - Süre sonunda kurutma kağıdı bir pensle alınarak atılır, preparat yıkanır.
  - Sulu fuksin veya % 0,5’lik safranın ile 20–30 saniye boyanır.
  - Yıkanır ve havada kurutulur.
  - Mikroskopta incelenir. Bu boyamada bakteriler pembe-kırmızı, sporlar yeşil olarak görülür.
2.3.2. Bartholomew ve Mittwer Spor Boyama

- 1.2’de belirtildiği şekilde incelenecek bakteri kültürü ile preparat hazırlanır (yayma, kurutma ve tespit).
- Preparat, alttan 20 kez bunzen bek alevinden geçirilir.
- Preparatın üzeri doymuş suyu malaşit yeşili çözeltisi ile kaplanır ve 10 dakika bekletilir.
- Boya, soğuk su altında 10 saniye kadar çıkarılır.
- Preparat karşıt boya olarak % 0.25’lik safranın çözeltisi ile kaplanır ve 15 saniye bekletilir.
- Su ile çıkarılır ve kurutulur.
- Mikroskopta incelenir.

2.4. ARB Boyama

Aside dirençli bakteriler diğer boyama yöntemleri ile kolay boyanamazlar. Boyanmaları için fenollü ve yoğun boya eriyiklerinin uzun süre ya da sıcaklık etkisi ile uygulanması gerekir. ARB boyama tüberküloz (verem) hastalığının tanısında en hızlı, ucuz ve pratik bir yöntemdir.

Preparat hazırlama aşaması, personel ve çevreyi korumak için güvenlik kabini içinde yapılmalıdır. Hazırlanan preparat korunaklı bir yerde kurutulmalı, tespit işleminden sonra da basınçlı kanı kalabileceği unutulmamalıdır.


Ehrlich Ziehl-Neelsen (EZN) ve Kinyoun yöntemlerinde birinci boya olarak karbol fuksin, zit boya olarak metilen mavisi kullanılır. Bu nedenle aside dirençli hücreler mavi zeminde pembe-kırmızı renkte görünür.

EZN boyama metodu, ARB boyama yöntemlerinden en sık kullanılanıdır. EZN boyama yönteminde aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanır:

1. 2’de belirtiliği şekilde incelenecik bakteri kültür ile preparat hazırlanır (yayma, kurutma ve tespit).
3. Preparatın üzerine bütün lamı kaplayacak şekilde karbol fuksin boya solüsyonu damlatılır.
4. Preparat alttan 5 dakika boyunca ısrıtırılır (İstifa işlemi, bunun beki veya pamuklu tel ile yapılabilir. Bunun için yaklaşık 30 cm uzunluğundaki bir telin ucuna pamuk sarılır ve bastırılarak sıkıştırılır. Pamuk alkol batırdıktan sonra yakılır, lamların altlarında gezdirilerek ısıtma işlemi gerçekleştirilir. İstifa oyle olmalıdır ki boyadan buhar çıkmalı ama kesinlikle kaynamamalıdır. Lamin üstünde buharlaşmadan dolayı boyasız yer görülürse hemen boya ilave edilmelidir.)
7. Tekrar boyama sehpasına koyulan lamların üzerinde metilen mavisi ile Kaplanır. 1 dakika beklenir.
8. Boya dökülür ve distile su ile yıkanır.

2.5. Boyanmış Preparatların Muhafaza

Boyanmış preparatlardan bazılarının inceleme sonrasında ileride tekrar faydalanmak üzere muhafaza edilmesi gerekebilir. Aşağıda belirttiği şekilde hazırlanmış preparat uzun süre bozulmadan saklanabilir.

- Preparat üzerinde immersiyon yağı varsa ksilol ile yıkanarak uzaklaştırılır.
- Havada kurutulur.
- Preparat üzerine bir damla kanada balsamı damlatılır.
- Üzerine lamel kapatılır ve lamelin üzerine hafiçe bastıralarak balsamın lamelin altında iyice yayılması sağlanır.
- 2–3 dakika süreyle lamel üzerine parmakla baskı yapılarak beklenir.
- Nemsiz, kuru bir ortamda iki hafta kurumasi için bekletilir.
- Lamel çevresindeki balsam artıkları temizlenir.
Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak basit boyama yapınız.

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç gereçler: Lam, öz, saf su, kültür, bunzen beki, kristal viyole

<table>
<thead>
<tr>
<th>İşlem Basamakları</th>
<th>Öneriler</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>➢ Preparatı hazırlayınız.</td>
<td>➢ 1. öğrenme faaliyetinde belirtildiği şekilde preparat hazırlayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatı üzerinde kristal viyole ile kaplayarak 1 dakika bekletiniz.</td>
<td>➢ Yeterli miktarda boyaya damlatınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>➢ Gereğinden fazla bekleterek boyanın kurumasına fırsat vermeyiniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Boyayı dökerek preparatı saf su ile yıkayınız.</td>
<td>➢ Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatı kurutunuz.</td>
<td>➢ Preparatı kendi halinde bekleterek (oda sıcaklığında) veya kurutma kağıdı ile kurutunuz.</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak gram boyama yapınız.

**Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç ve gereçler:** Kültür, metilen mavisi, kristal viyole, lugol, sulu fuksin, safranın, çini mürekkebi, nigrosin, öze, küvetler, baget, % 96’lık etil alkol, pipet, saf su, bunzen beki

<table>
<thead>
<tr>
<th>İşlem Basamakları</th>
<th>Öneriler</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>➢ Preparatı hazırlayınız.</td>
<td>➢ 1. öğrenme faaliyetinde belirtiliği şekilde preparat hazırlayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatı kristal viyole ile kaplayarak 1-2 dakika bekletiniz.</td>
<td>➢ Yeterli miktarda (preparatın überini tamamen kaplayacak şekilde) boyada damlatınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>➢ Gereğinden fazla bekleterek boyanın kurumasına fırsat vermeyziniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatı bol saf su ile yıkayınız.</td>
<td>➢ Boya kalıntı kalmayacak şekilde yıkayınız.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**UYGULAMA FAALİYETİ**
<table>
<thead>
<tr>
<th>İşlem</th>
<th>Aşamaları</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1.</td>
<td>Preparatın üzerini lugol ile kaplayarak 1-2 dakika bekletiniz.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Yeterli miktarda (preparatın üzerini tamamen kaplayacak şekilde) lugol damlatınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>2.</td>
<td>Lugol akıtıp saf su ile yıkaınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Lugol çözeltisi kalmayacak şekilde yıkaınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>3.</td>
<td>Preparatın üzerine % 95’lik etil alkol yayarak 10-15 saniye bekletiniz.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Alkolle beraber boya akmayıncaya kadar alkol damlatınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>4.</td>
<td>Preparatı saf su ile hemen yıkaınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Alkol kalıntısi kalmayacak şekilde yıkaınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>5.</td>
<td>Preparatı karşıt boya sulu fuksin veya safranın ile kaplayıp 30 saniye bekletiniz.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Yeterli miktarda (preparatın üzerini tamamen kaplayacak şekilde) boya damlatınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Gereğinden fazla bekleterek boyanın kurumasına fırsat vermeyiniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatı saf su ile yıkayıp kurutunuz.</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>---</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
|➢ Boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.  
➢ Preparatı kendi halinde bekleterek (oda sıcaklığında) veya kurutma kâğıdı ile kurutunuz. |
Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak spor boyama yapınız.

**Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç gereçler:** Kültür, lam, beher, bek, malaşit yeşili, sulu fuksin ya da safranın, saf su, metilen mavisi, kurutma kağıdı

<table>
<thead>
<tr>
<th>İşlem Basamakları</th>
<th>Öneriler</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>➢ Preparat hazırlayınız.</td>
<td>➢ 1. öğrenme faaliyetinde belirtildiği şekilde preparat hazırlayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Üzerine kurutma kağıdı yerleştiriniz.</td>
<td>➢ Kurutma kağıdını lam ebatlarından küçük olacak şekilde hazırlayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatı beher kullanarak hazırlanan su banyosu düzeneği üzerine yerleştiriniz.</td>
<td>➢ Preparatı düşmeyecek şekilde yerleştiriniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatın üstünü % 5’lik malaşit yeşili boya çözeltisi ile kaplayınız.</td>
<td>➢ Isıtma düzeneğinin devrilmemesi için dikkatli olunuz.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>➢ Yeterli miktarda boya damlatınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Kurutma kağıdının üzerinde boya azaldıkça boya ilave ederek 5–6 dakika bekletiniz.</td>
<td>➢ Boyannın kurumasına fırsat vermeden sürekli boya ekleyiniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Süre sonunda kurutma kâğıdını kaldırarak atınız.</td>
<td>➢ Kurutma kâğıdını pens yardımcıyla alarak dezenfektan içerisinde atınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatı saf su ile yıkayınız.</td>
<td>➢ Boya kalıntısi kalmayacak şekilde yıkayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Saf su ile yıkayınız.</td>
<td>➢ Boya kalıntısi kalmayacak şekilde yıkayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatı kurutunuz.</td>
<td>➢ Preparatı kendi halinde bekleterek oda sıcaklığında kurutunuz.</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak ARB boyama yapınız.

**Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç ve gereçler:** Kültür, lam, bek, karbol fuksin, asit-alkol karışımı, saf su, metilen mavisi, kurutma kağıdı

<table>
<thead>
<tr>
<th>İşlem Basamakları</th>
<th>Öneriler</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>➢ Preparat hazırlayınız.</td>
<td>➢ 1. öğrenme faaliyetinde belirtildiği şekilde preparat hazırlayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>➢ Risk etmeni yüksek numunelerden hazırlanacak preparatlar için güvenlik kabini kullanınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatları boya sehpası üzerine diziniz.</td>
<td>➢ Preparatlar arasında belirli bir aralık bırakınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>➢ Preparatların birbiriyle temas etmesinin çapraz kontaminasyona yol açabileceğine dikkat ediniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatların üzerine karbol fuksin boya solüsyonu damlatınız.</td>
<td>➢ Bütün lamı kaplayacak şekilde yeterli miktarda boya damlatınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatları 5 dakika boyunca alttan ısıtınız.</td>
<td>➢ İstima işlemini için bunzen bek veya pamuklu tel ile yapabilirsiniz.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>➢ Alevi lamların altlarında gezdirilerek istima işlemini yapınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>➢ İstima işleminde kesinlikle boyanın kaynamasına fırsat vermeyiniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Boya azaldıkça tekrar damlatarak ekleyiniz.</td>
<td>➢ Lamin üstünde buharlaşmadan dolayı boyasız yer görülürse hemen boya ilave ediniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>İşlem</td>
<td>Adım 1</td>
</tr>
<tr>
<td>-------</td>
<td>--------</td>
</tr>
<tr>
<td>preparatları soğuyuncaya kadar bekleterek</td>
<td>Preparat üzerindeki boyayı önce akıtınız daha sonra saf suдан geçiriniz.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>saf su ile yıkaınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>Asit alkol karışımı ile renk gideriniz.</td>
<td>Preparatların üzerine önce asit-alkol karışımı ile kaplayarak bir süre bekletiniz daha sonra boya akmayıncaya kadar damlatınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>Saf su ile yıkaınız.</td>
<td>Asit alkol kalıntısi kalmayacak şekilde yıkayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>Metilen mavisi ile 1 dakika boyayınız.</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Saf su ile yıkaınız.</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>preparatları kurutunuz.</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Gram boyamada gram pozitif bakteriler mikroskopta hangi renkte görülür?
   A) Pembe-Kırmızı
   B) Yeşil
   C) Renksiz
   D) Mor

2. Gram boyamada gram negatif bakteriler mikroskopta hangi renkte görülür?
   A) Pembe-Kırmızı
   B) Yeşil
   C) Mor
   D) Mavi

3. Gram boyamada dekolorizasyonda aşağıdaki maddelerden hangisi kullanılır?
   A) Lugol çözeltisi
   B) Etil alkol
   C) Metil alkol
   D) Isı

4. Gram boyamada mordant etkisinden dolayı aşağıdaki maddelerden hangisi kullanılır?
   A) Metil alkol
   B) Etil alkol
   C) Lugol çözeltisi
   D) Kristal viyole

5. Boyanmış preparattan ileride tekrar faydalanılması için muhafaza edilmek istenirse aşağıdaki maddelerden hangisinden faydalanılır?
   A) Metil alkol
   B) Etil alkol
   C) İmmersiyon yağı
   D) Kanada balsamı

6. Basit boyamada aşağıdaki boyalardan hangisi kullanılamaz?
   A) Malaşit yeşili
   B) Kristal viyole
   C) Metilen mavisi
   D) Nigrosin

7. Spor boyamada sporlar hangi renkte görülür?
   A) Mavi-mor
   B) Pembe-kırmızı
   C) Renksiz
   D) Yeşil
8. Spor boyamada aşağıdaki boyalardan hangisi kullanılır?
   A) Karbol fuksin-metilen mavisi
   B) Kristal viyole-sulu fuksin
   C) Malaşit yeşili-sulu fuksin
   D) Sulu fuksin-nigrosin

9. Spor boyamada dekolorizasyonda aşağıdaki maddelerden hangisi kullanılır?
   A) Metil alkol
   B) Etil alkol
   C) Dekolorizasyon işlemi yapılmaz.
   D) Ethanol+HCl

10. Vejetatif hücre normal boyalarla boyanmasına karşı, sporun etrafında kalın muhafazaların bulunması ve bunların geçirgen olmaması boyanmalarını zorlaştırır. Bundan dolayı diğer boyama yöntemlerinden farklı olarak sporları boymak için ne yapılır?
    A) Boyama esnasında ısıl işlem uygulanması
    B) Konsantrasyonu yüksek boyaların kullanılması
    C) Boya çözeltisi hazırlanırken alkol kullanılması
    D) Boyama esnasında UV ışın uygulanması

11. Ehrlich-Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyamada tüberküloz basilleri hangi renkte görülür?
    A) Pembe-kırmızı
    B) Mavi
    C) Kırmızı zeminde mavi basil
    D) Yeşil

12. Ehrlich-Ziehl-Neelsen yönteminde renk giderici olarak kullanılan madde hangisidir?
    A) Alkol
    B) Eter
    C) Asit-alkol
    D) Lugol-alkol

13. Aşağıdakilerden hangisi ARB boyama yöntemlerinden değildir?
    A) Florokrom boyama yöntemi
    B) EZN boyama yöntemi
    C) Kinyoun boyama yöntemi
    D) Mittwer boyama yöntemi

**DEĞERLENDİRME**

ÖĞRENME FAALİYETİ–3

AMAÇ

Gerekli ortam sağlanıngda tekniğe uygun olarak indirekt boyama yöntemleri ile boyama işlemlerini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- İndirekt boyama yöntemlerini araştırınız.
- Negatif boyama işlemi yaparken dikkat edilmesi gereken hususları araştırınız.

3. İNDİREKT BOYAMA YÖNTEMLERİ


3.1. Yaş Preparasyon Tekniği ile Negatif Boyama

Klasik boyama yöntemlerinden farklı preparat kurutulmadan fikse edilmeden hazırlanıp incelemesidir. Böylece hücre orijinal halıyla incelemen. Çünkü kurutulan ve fikse edilerek hazırlanan preparatlarda hücreler az veya çok büzülmektedir. Yaş preparasyon yöntemi ile negatif boyamada çini mürekkebi kullanılmaktadır. İyı sonuç alabilmek için preparatın çok ince yapıması gerekmektedir.

- Temiz, kuru ve yağsız bir lam alınır.
- Katı kültürle çalışılacaksa lamın ortasına bir öze dolusu saf su aktarılır. İncelemeck katı kültürden öze ile bir miktar alınarak lam üzerine su içerisinde çözüldürülür.
- Sıvı kültürle çalışılacaksa lam üzerine direkt kültürden bir öze dolusu aktarılır.
- Kültürün üzerine bir damla nigrosin veya çini mürekkebi konarak öze ile yumadan karıştırılır.
- Karışımın kenar kısmına yaklaşık 45° eğimle bir lamel değdirilir ve yavaşça üzerine kapatılır.
- Preparatın altında ve üstüne kurutma kağıdı konularak basparmak ile lamele bastırılır ve karışımın fazlası alınır.
- Kurutma kağıtları alınarak dezenfektan içerisinde atılır ve eller dezenfekte edilir.
- Preparatın kurumaması için kibrit çöpu veya kürdan yardımcıla lamelin çevresi immersiyon yağ ile kaplanır.
- Preparat mikroskopta incelenir.
3.2. Yayma Yöntemi ile Negatif Boyama

Bu yöntemde preparat kurutulur fakat fiksasyon işlemi yapılmaz. İyi bir görüntü elde edebilmek için yayma işleminin çok ince yapılması gereklidir. Bir lam Yardımıyla örneğin ince bir film tabakası şeklinde yayıldığı işleme kısaca “ince yayma” veya “fruti” denilmektedir.

Şekil 3.1: Yayma yöntemi ile negatif boyama
Temiz, kuru ve yağsız bir lamın uç kısmına yakın bir bölgesinde çini mürekkebi damlatılır.

İncelenecek kültürden öze ile alınarak çini mürekkebi damlası içerisinde ezilip çözündürülür.

Lamin ortasına yaklaşık 45⁰ eğimle yardımcı lam değdirilir ve karşımı temas edinceye kadar karşımı doğru çekilir.

Yardımcı lam karşımı temas edince lam hattı boyunca yayılır.

Yardımcı lam seri, tek bir hareketle (sabit hızla) lamin diğer ucuna doğru kaydırılır.

Preparatın havada kuruması sağlanır.

Preparat mikroskopta incelenir. Zemin siyah, bakteri hücreleri saydam, renksiz olarak görünür.

3.3. Negatif Differensiyal Boyama

Kapsül ya boyanarak ya da zemin ve bakteri gövdesinin boyanması sonucunda boyasız bir bölge olarak görülebilir. Kapsülü, boyanmayan boşluk görünümünde incelemek için zemin boyamada en sık çini mürekkebi, bakteri hücreini boyamada ise kristal viyole kullanılır.

- Yayma yöntemi ile negatif boya (3.2’de olduğu gibi) yapılır.
- Preparat üzerine kristal viyole veya bazık fuksin boyası eklenerek kaplanır ve 1 dakika beklenir.
- Preparat saflı suyla çok yavaş ve hassas (tespit işlemi yapılmadığı için) bir şekilde yıkanır.
- Preparatın havada kuruması sağlanır.
- Preparat mikroskopta incelenir. Bakteri hücresi kristal viyole kullanılmışsa mor, bazık fuksin ile boyanmışsa kırmızı renklı görünür. Zemin siyah, inceленen bakteri kapsülü ise kapsül hücre çevresinde saydam, renksiz olarak görünür.

Şekil 3.2: Negatif differansiyel boya yönteminde kapsül varlığı tespiti
3.4. Kapsül Boyama

Kapsülün boyanarak incelenmesinde Muir, His veya Antony yöntemleri kullanılır. His metodunda boyama işlemi aşağıda belirtilen işlem basamakları takip edilerek yapılmaktadır.

- Temiz bir lamın ortasına bir damla saf su veya FTS konur (sıvı kültürlerden preparat hazırlanacaksa kültür yoğunluğuna bağlı olarak buna gerek görülmeyebilir.).
- Kültürden öze ile alınan örnek, su damlası yanında ezilerek su damlası ile azar azar karıştırılır.
- Lamın üzerine ince bir tabaka halinde ve yavaşça (etrafa saçrtmadan) yayılır.
- Havada kuruması sağlanır.
- Preparatın üzerine kristal viyole boya çözeltisi eklenerek kapılanır ve 1–2 dakika bekletilir.
- Preparat %20’lik bakır sülfat çözeltisi ile yıkanır.
- Preparat havada kurutulur.
- Mikroskopta incelenir. Mikroskopta incelenirken kapsül açık mavi, bakteri hücresi ise koyu mor renkte görülür.
Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak yaş preparasyon tekniği ile negatif boyama yapınız.

**UYGULAMA FAALİYETİ**

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç ve gereçler: Lam, lamel, çini mürekkebi, bazik füksin veya kristal viyole, kurutma kağıdı, öz, kültür, sedir yağı

<table>
<thead>
<tr>
<th>İşlem Basamakları</th>
<th>Öneriler</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>➢ Temiz bir lam alınınız.</td>
<td>➢ Lamı kenarlarından tutunuz ve lamın yüzeyine parmağınızla dokunmayıniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Lam üzerine bir damla saf su koyunuz.</td>
<td>➢ Kenara yakın koymayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Öze ile incelenecek kültürden örnek alınız.</td>
<td>➢ Aseptik çalışma kurallarına uyunuz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Örneği lam üzerindeki su damlası içinde ezerek karıştırınız.</td>
<td>➢ Kültürün su damlası içerisinde tamamen çözünmesini sağlayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Bir damla çini mürekkebi damlataрак öz ile karıştırınız.</td>
<td>➢ Boya ile kültürün homojen bir şekilde karışmasını sağlayıniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Lamel kapatınız.</td>
<td>➢ Karışımın kenar kısmına yaklaşık 45° eğimle bir lamel değdiriniz ve yavaşça üzerine kapatınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Preparatı kurutma kağıdının üzerine yerleştirerek lamelin üzerine de kurutma kağıdı koyunuz.</td>
<td>➢ Kurutma kağıdının temiz ve kullanılmamış olmasıılmasına dikkat ediniz.</td>
</tr>
<tr>
<td>Lamel üzerindeki kurutma kağıdına bastıramak örnekleri yayınız.</td>
<td>Kurutma kağıdının üzerinden bağırlarınızı ile lamele bastıramak ve karışımın fazlasının alınmasını sağlayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>Lamelin kırılmaması için dikkat ve dengeli bastıramak.</td>
<td>Lamelin kırılmaması için dikkatli ve dengeli bastıramak.</td>
</tr>
</tbody>
</table>

| Kurutma kağıtlarını dezenfektan çözeltiye atınız. | Uygun dezenfektan kullanınız. |
| Lamelin çevresini ince bir tabaka halinde immersiyon yağ ile kaplayınız. | Temiz bir kibrit çöpünden veya kürdandan faydalanabilirsiniz. |
| Elinizi yıkayınız. | Ellerini sabunla köpürerek bol suyla durulayınız. |
Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak negatif differansiyel boyama yapınız.

**Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç ve gereçler:** Lam, lamel, çini mürekkebi, bazik fuksin veya kristal viyole, kurutma kağıdı, özé, kültür, sedir yağı

<table>
<thead>
<tr>
<th>İşlem Basamakları</th>
<th>Öneriler</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>➢ Temiz bir lamın üç kısımina bir damla çini mürekkebi damlatınız.</td>
<td>➢ Lamı kenarlarından tutunuz ve lamların yüzeyine dokunmayınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><img src="image1" alt="Temiz bir lamın üç kısımana bir damla çini mürekkebi damlatılması" /></td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Kültürden özé ile örnek alarak mürekkep damlasının içerisinde eziniz.</td>
<td>➢ Seri ve hızlı çalışınız.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><img src="image2" alt="Kültürden özé ile örnek alarak mürekkep damlasının içerisinde ezilmesi" /></td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Lamin ortasına yaklaşık 45° eğimle yardımcı lamı döşendiriniz ve karıştırma temas edinceye kadar karıştırma doğru çekiniz.</td>
<td>➢ Yardımcı lam karıştırma temas edince lam hattı boyunca yayılmasını bekleyiniz.</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><img src="image3" alt="Lamin ortasına yaklaşık 45° eğimle yardımcı lamı döşendirildiği" /></td>
</tr>
<tr>
<td>Adım</td>
<td>Aşaması</td>
</tr>
<tr>
<td>------</td>
<td>---------</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Yardımcı lamı seri, tek bir harekete (sabit hızla) lamın diğer ucuna doğru kaydırınız.</td>
<td>➢ Preparat lamını resimdeki gibi zemin üzerinde veya kısa kenarlarından baş ve işaret parmaklarınızla elinizde tutunuz.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Kristal viyole veya bazık fuksin ile preparatı 1 dakika boyayınız.</td>
<td>➢ Gereğinden fazla bekleterek boyanın kurumasına fırsat vermeiniz. ➢ Yıkama işlemini çok yavaş ve hassas (tespit işlemi yapılmadığı için) bir şekilde yapınız.</td>
</tr>
<tr>
<td>➢ Boyayı dökerek preparatı yıkayınız.</td>
<td>➢ Preparatı havada kurutunuz. ➢ Preparatı kendi halinde bekleterek (oda sıcaklığında) kurutunuz.</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Negatif boyamada aşağıdaki boyalardan hangisi kullanılabılır?
   A) Sülu fuksin
   B) Kristal viyole
   C) Metilen mavisi
   D) Çini mürekkebi

2. Negatif boyamada fiksasyon işleminde aşağıdakiilerden hangisi kullanılır?
   A) Metil alkol
   B) Etil alkol
   C) Ethanol+HCl
   D) Fiksasyon işlemi yapılmaz.

3. Kapsülün boyanarak incelenmesinde aşağıdaki yöntemlerden hangisi kullanılmaz?
   A) Muir
   B) Negatif differansiyel
   C) His
   D) Antony

4. Zeminin çini mürekkebi ile bakteri hücresinin ise kristal viyole ile boyandığı kapsülün boyanmadan boşluk şeklinde görüldüğü boyama yöntemi aşağıdakiilerden hangisidir?
   A) Muir
   B) Negatif differansiyel
   C) His
   D) Antony

5. Bir lamel veya başka bir lam yardımıyla örneğin ince bir film tabakası şeklinde yayıldığı işlem aşağıdakiilerden hangisi ile ifade edilebilir?
   A) Fruti
   B) Preparat
   C) Fiksasyon
   D) Yayma

---

DEĞERLENDİRME

MODÜL DEĞERLENDİRME


**Gerekli araç, gereç ve kimyasallar:** Öze, bunzen bek, kültür, saf su, FTS, kristal viyole, lugol, metil alkol, sulu fuksin, malaşit yeşili, çini mürekkebi, pens, kurutma kağıdı

<table>
<thead>
<tr>
<th>Değerlendirme Ölçütleri</th>
<th>Evet</th>
<th>Hayır</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>Laboratuvar kıyafetini giyip çalışma öncesi hazırlıklarınızı yaptıınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>2</td>
<td>Aseptik ortam oluşturduınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Preparat Hazırlama</strong></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>3</td>
<td>Temiz lamın ortasına bir damla damıtık su veya FTS koymadınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>4</td>
<td>Kültürden özle ile alınan örneği, su damlası yanında ezerek su damlası ile azar azar karıştırdınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>5</td>
<td>Lamın üzerine ince bir tabaka halinde ve yavaşça (etrafa sıçratmadan) yayınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>6</td>
<td>Havada kurumusunu sağladvınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>7</td>
<td>Lamın alt yüzünü üç defa bek alevinden geçirizdiniz mi?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Gram Boyama</strong></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>8</td>
<td>Hazırladığınız preparatın üzerine kristal viyole boyaya çözeltisi ekleyerek 1 dakika beklettiniz mi?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>9</td>
<td>Preparatı bol distille suyla yıkadınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>10</td>
<td>Preparatın üzerine lugol çözeltisi ekleyerek 1 dakika beklettiniz mi?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>11</td>
<td>Preparatı distille suyla yıkadınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>12</td>
<td>Preparatın üzerine %95’lik etanol veya asit-alkol karşıımı ekleyerek 10–15 saniye bekletip distille suyla yıkadınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>13</td>
<td>Preparatın üzerine sulu fuksin veya safranın boya çözeltisi ekleyerek 30 saniye beklettiniz mi?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>14</td>
<td>Preparat bol distille suyla yıkayarak havada veya kurutma kâğıdı arasında kuruttunuz mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Spor Boyama</strong></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>15</td>
<td>Hazırlanan preparatı uygun bir kaynar su banyosu düzeneğinin üstüne yerleştirizdiniz mi?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>16</td>
<td>Preparatın üzerine % 5’lik malaşit yeşili boya çözeltisi ile kaplayarak üzerine kurutma kâğıdı yerleştirizdiniz mi?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>17</td>
<td>Kurutma kâğıdının üzerine malaşit yeşili boya çözeltisi damlatarak kâğıdın sürekli ıslak kalmasını sağladınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>18</td>
<td>Kurutma kâğıdının ıslaklığı azaldıkça malaşit yeşili boya çözeltisi damlatarak preparatı bu şekilde 5–6 dakika boyadınız mı?</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Soru</td>
<td>Cevap</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>---------------------------------------------------------------------</td>
<td>----------</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Süre sonunda kurutma kâğıdını bir pensle alarak preparatı yıkadınız mı?</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Karıştı boya sılu fuksin veya %0,5’lik safranın ile 20–30 saniye boyadınız mı?</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Preparatı distile su ile yıkayıp havada kuruttunuz mu?</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Negatif Diferansiyel Boyama</strong></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Temiz bir lamın uç kısmına bir damla çini mümrekkebi damlattınız mı?</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Kültürden öz ile örnek alarak mümrekkep damlasının içerisinde ezdiniz mı?</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Başka bir lam yardımıyla örnek ince bir film halinde (frutı) yaydınız mı?</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Preparatı havada kuruttunuz mu?</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Kristal viyole veya bazik fuksin ile preparatı 1 dk boyadınız mı?</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Boyayı dökerek preparatı yıkadınız mı?</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Preparatı havada kuruttunuz mu?</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

**DEĞERLENDİRME**

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanılsı cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki modüle geçmek için öğretmenimize başvurunuz.
ÖĞRENME FAALİYETİ-1’İN CEVAP ANAHTARI

<p>| | |</p>
<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th></th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1.</td>
<td>C</td>
</tr>
<tr>
<td>2.</td>
<td>B</td>
</tr>
<tr>
<td>3.</td>
<td>A</td>
</tr>
<tr>
<td>4.</td>
<td>B</td>
</tr>
<tr>
<td>5.</td>
<td>D</td>
</tr>
<tr>
<td>6.</td>
<td>C</td>
</tr>
</tbody>
</table>

ÖĞRENME FAALİYETİ-2’NİN CEVAP ANAHTARI

<p>| | |</p>
<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th></th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1.</td>
<td>D</td>
</tr>
<tr>
<td>2.</td>
<td>A</td>
</tr>
<tr>
<td>3.</td>
<td>B</td>
</tr>
<tr>
<td>4.</td>
<td>C</td>
</tr>
<tr>
<td>5.</td>
<td>D</td>
</tr>
<tr>
<td>6.</td>
<td>D</td>
</tr>
<tr>
<td>7.</td>
<td>D</td>
</tr>
<tr>
<td>8.</td>
<td>C</td>
</tr>
<tr>
<td>9.</td>
<td>C</td>
</tr>
<tr>
<td>10.</td>
<td>A</td>
</tr>
<tr>
<td>11.</td>
<td>A</td>
</tr>
<tr>
<td>12.</td>
<td>C</td>
</tr>
<tr>
<td>13.</td>
<td>A</td>
</tr>
<tr>
<td>14.</td>
<td>D</td>
</tr>
<tr>
<td>15.</td>
<td>B</td>
</tr>
</tbody>
</table>

ÖĞRENME FAALİYETİ-3’ÜN CEVAP ANAHTARI

<p>| | |</p>
<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th></th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1.</td>
<td>D</td>
</tr>
<tr>
<td>2.</td>
<td>D</td>
</tr>
<tr>
<td>3.</td>
<td>B</td>
</tr>
<tr>
<td>4.</td>
<td>B</td>
</tr>
<tr>
<td>5.</td>
<td>A</td>
</tr>
</tbody>
</table>


http://homepages.wmich.edu/~rossbach/bios312/LabProcedures/Negative%20Stain%20Procedure.html

http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanual/lab6/index.html


http://www.klimik.org.tr/UserFiles/file/Nevin%20Sar%C4%B1g%C3%B6zel%20SAR.pdf

www.mikrobiyoloji.org