

MİKROBİYOLOJİDE BOYAMA YÖNTEMLERİ

Mikroorganizmalar renksiz ve şeffaf oldukları için mikroskopla yapılan gözlemede morfolojileri tam olarak belirlenemez. Bunun için mikroorganizmanın çeşitli boyalardan biri ile boyanması gerekir. Boyanmış olan mikroorganizma canlılığını kaybeder ve zeminle arasında oluşan renk ton farklılığı (kontrast) onun morfolojik olarak net görünmesini sağlar. Boyama işlemi bakterinin o boya grubuna karşı reaksiyonunu belirlemek için de yapılabilir (Gram boya metodu). Ayrıca mikroorganizmanın çeşitli organellerinin (Kapsül, spor, çekirdek, flagella vb.) belirlenmesi için de değişik tip boya ve metotları da kullanılmaktadır.

Boyama mikroorganizma ve boya arasında kimyasal bir reaksiyon sonucu meydana gelir. Boyalar genellikle iyonlardan bir tanesinin renkli olduğu tuzlardır. Tuz negatif ve pozitif yüklü iyonlardan oluşur. Renk pozitif iyon üzerinde ise bazik; negatif iyon üzerinde ise asidik olarak adlandırılır. Hücre kendisini çevreleyen ortamın nötr pH' a sahip olduğu genellikle negatif yüklüdür. Böylece bazik boya ile boyanan hücre, negatif ve pozitif yüklü iyonların birleşmesi sonucu boyanır. Metilen mavisi, safranin ve kristal violet bazik boyalara örnek olarak verilebilir.

Asit boya ise negatif yüklü hücreyi boyayamayacakları için, hücre etrafında deposit oluştururlar. Bu tür boyamaya negatif veya direk olmayan boyama denir. Bu tür boyama genelde bakteriyolojide kullanılmaz. Fakat bu tür boyama ile mikroorganizmanın şekli ve büyüklüğü daha net olarak görülür. Kapsüllerin görünmesi için negatif boyama yapılır. Bakteri çini mürekkebi veya nigrosin ile giremediklerinden dolayı, bakteriler mavimsi renkte boyanan zemine kıyasla daha açık renkte teşhis edilirler.

Mikrobiyolojide kullanılan boyama yöntemlerini başlıca iki gruba ayırmak mümkündür.

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

2) Bileşik boyamalar: Birden fazla boya ile yapılan boyama yöntemidir. Bunlar;

a) Diferansiyel boyamalar: Mikroorganizmaları birbirinden ayırmada kullanılır. (Gram boyama)

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

BASİT BOYAMA METODU

Deneyin Amacı:

Bakterilerin morfolojileri hakkında bilgi sahibi olmanın yanında bazı bakterilerin boyanma reaksiyonlarını belirlemek.

Bazı basit boyama yöntemleri:

1. Karbol Fuchsinle Boyama : Usulüne göre hazırlanmış, kurutulmuş ve fiske edilmiş preparatlar üzerine, karbol fuchsin solusyonu filtre kağıdından süzülerek konur ve 5 – 10 saniye boyama için bırakıldıktan sonra, boya dökülür ve hafif akan su ile yıkanır. Kurutma kağıdı ile veya havada kurutulduktan sonra, üzerine sedir yağı konarak immersiyon objektifi ile bakılır. Mikroorganizmalar kırmızı renkte görünür.

2 . Kristal Violet ile Boyama : Hazırlanan preparat üzerine kristal violet solusyonundan konarak 20 – 30 saniye kadar bekletilir. Sürenin sonunda boya dökülür, preparat su ile yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroorganizmalar mor renkte görülürler.

3. Metilen Mavisi ile Boyama : Bu amaçla Löffler metilen mavisi solusyonu kullanılır. Preparat üzerine boya solusyonu konarak 5 – 8 dakika bekletilir. Boya dökülür, yıkanır, kurutulur ve immersiyon objektifi ile muayene edilir. Mikroplar mavi renkte görülürler.

4. Negatif Boyama : Bu tür boyama yönteminde mikroorganizmalar değil, saha boyanır. Karanlık olan sahada mikroplar renksiz ve parlak olarak görünürler. Bu amaç için, nigrosin ve çin mürekkebi kullanılır. Lam üzerine bir damla boya ve sonra bir damla kültür konarak yayılır ve ince bir froti hazırlanır. Kuruduktan sonra muayene edilir. Bu yöntemden kapsülleri görmek için yararlanılır.

5. Spor Boyama : Safranin ile 30 saniye boyanır. Boya dökülür, saf su ile yıkanır. Kurutma kağıdı ile kurulanır. Sırasıyla olmak üzere tüm objektiflerle incelenir. İmmersiyon yağı ile immersiyon objektifinde sporlar yeşil, bakteriler kırmızıdır.

6. Mantar Boyama : Katı mantar kültüründen iğne ile numune alınır, kurutulur, tespit edilir. Laktofenol mavisi ile 3 dakika boyanır. Dökülür, saf su ile yıkanır. Kurutulur ve immersiyon objektifinde mantarlar mor olarak gözlenir.

Deneyde kullanılan alet ve malzemeler:

- Mikroskop
- Lam, öze, boyalar, immersiyon yağı, beher, kurutma kağıdı

Metilen Mavisinin Hazırlanışı: Bkz. EK 2

Deneyin Yapılışı:

- Kùltür ortam sıvı ise: Sterilize edilmiş olan öze ile alınan kùltür temiz bir lamın orta kısmına konarak yayılır.
- Kùltür ortamı katı ise: Hazırlanan peptonlu (% 0.1) veya fizyolojik tuzlu sudan (% 0.085) temiz lam üzerine pipetle (1 ml'lik) bir damla damlatılır. Katı vasattan sterilize edilmiş iğne öze ile alınan kùltür bu suda özelendirilir (Homojenize edilir).

Basit Boyama:

- Lam üzerine alınan numunenin havada kuruması sağlanır.
- Alevden geçirilerek (3 defa) fiziksel tesbit edilir,
- Eğer basit boyama yapılacaksa, kùltürün yayıldığı alanı örtecek şekilde boyalardan biri (Metilen mavisi veya safranin vb) lam üzerine dökülür 2 dakika beklenir.
- Boya kaba dökülerek, lam az miktarda akan musluk suyu ile yıkanarak kurutma kağıdı ile kurulanır.
- Bir damla immersiyon yağı damlatılarak, mikroskopla incelemeye alınır (100 x).