

BOYAMA VE BOYAMA YÖNTEMLERİ

Mikrobiyoloji –I Lab Uygulama

Araş. Gör. Evrim Genç

Mikrobiyoloji AbD.

PREPARAT HAZIRLAMA

PREPARATIN HAZIRLANMASI

Lam üzerinde,

Sıvı kültür süspansiyonundan veya

Katı besiyerinden alınan koloni süspansiyonundan

(koloni steril fizyolojik tuzlu suda süspansiyon edilir)

bir öze dolusu alınır hazırlanır.



PREPARAT HAZIRLAMA

➤ PREPARATIN KURUTULMASI

➤ PREPARATIN TESPİTİ (FİZİKZASYON)

I) FİZİKSEL TESPİT (Isı ile).... Alevden 3 defa geçirilir.

II) KİMYASAL TESPİT (metanol, etanol, alkol eter, alkol aseton vs ile)

Metil alkol ile 3-4 dk. / etil alkol ile 10 dk. tespit edilir.

Hafif akan suda yıkanır.

Bir öze dolusu sıvı kültür



Sıvı kültürlerden yayma preparat hazırlamanın ilk adımı



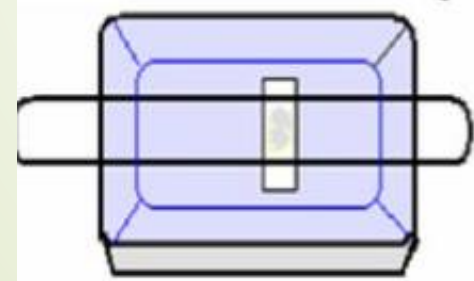
1 damla su

Lam üzerine yayılacak bakteri kültürü

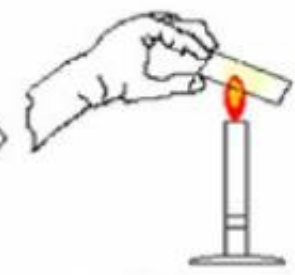


Katı kültürlerden yayma preparat hazırlamanın ilk adımı

Sonraki aşamalar her ikisinde de aynı şekildedir:



Lam üzerine yayılan bakteri kültürün hava akımıyla savunun



Isı fiksasyonu

Boyama Yöntemleri

Basit ve Bileşik Boyama Yöntemleri

- **Basit Boyama;** tek bir boya kullanılarak yapılan boyama yöntemi
Mikroorganizmaların morfolojileri ve büyüklükleri hakkında bilgi edinilir.
- **Bileşik Boyama;** birden fazla boya kullanılarak yapılan boyama yöntemi
Bileşik boyama yöntemi ile mikroorganizmalar daha ayrıntılı olarak gruplara ayrılabilir.

Basit Boyama

- Lam üzerinde sıvı kültür süspansiyonu veya katı besiyerinden alınan koloni süspansiyonu (FTS ile) hazırlanır.
- Havada Kurutulur
- Tespit edilir.
- Üzerine Karbol fuksin, kristal violet vs konulur.
- Karbol fuksinde 5-10 sn, kristal violet boyasında 30 sn, Metilen Mavisi (5-8 dakika) beklenir.
- Su ile yıkanır.
- Lam kurutulur (kurutma kağıdı veya havada).
- X 100'lük objektifte immersiyon yağı konularak incelenir.
- diyafram açık, kondansatör yukarıda

BASİT BOYAMA

Negatif Boyama

Lam üzerine bir damla çini mürekkebi veya nigrosin konur.

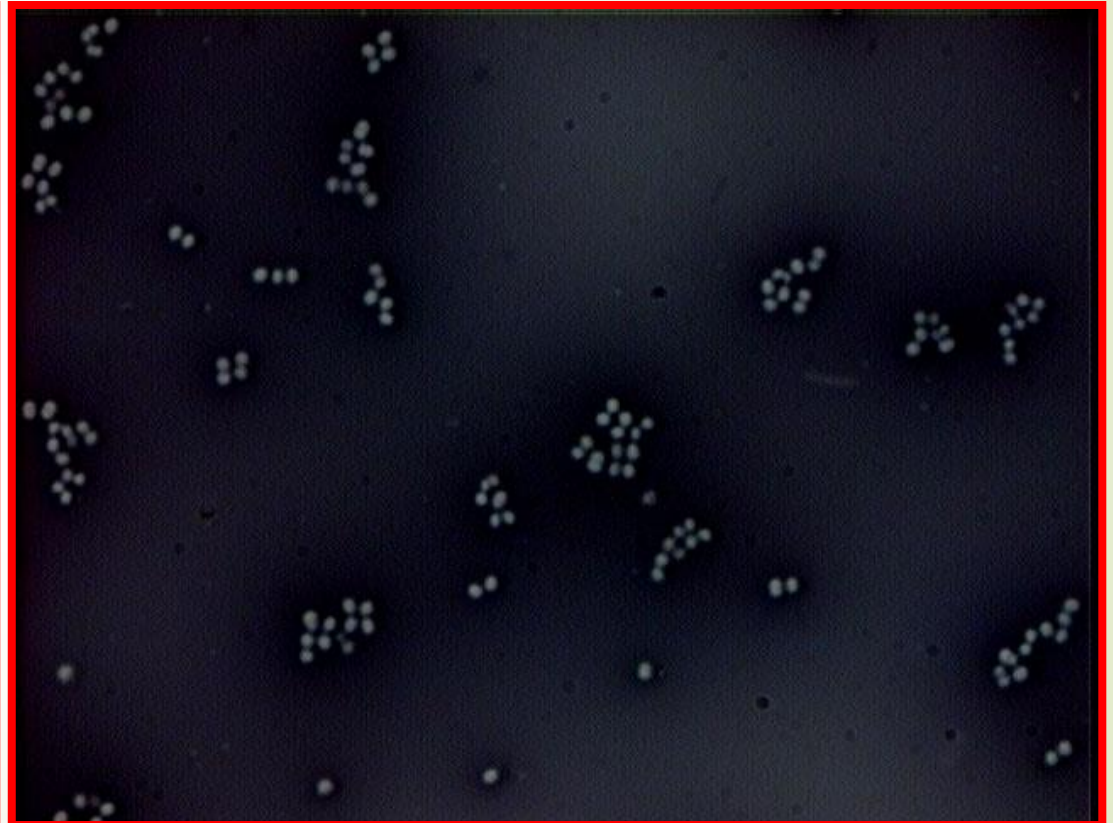
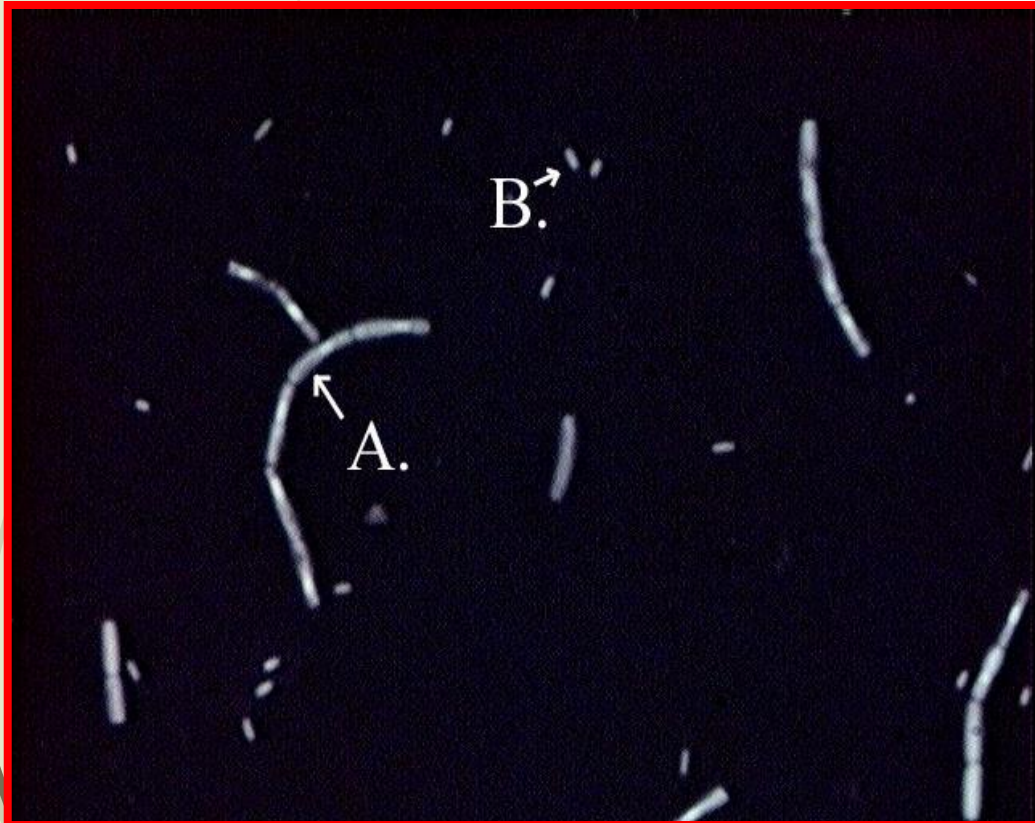
Bir damla bakteri kültürü ilave edilir, yayılarak froti hazırlanır.

Lam Kurutulur ve incelenir.

!!! Bakteriler boyanmaz, saha boyanır. Karanlık olan sahada mikroorganizmalar renksiz veya parlak görülür.

➤ **Kapsül ve spiroketleri** görmek için yararlanılır.

Negatif boyama





Bileşik boyama yöntemi

I) Strüktürel (yapısal) boyama yöntemi

- Mikroorganizmaların sahip olduğu flagella, fimbriya, kapsül, spor (spor oluşturan mikroorganizmalarda) vb. yapılar belirlenir.

II) Diferansiyel (ayırıcı) boyama yöntemi

- Bakteri hücre duvar yapıları ayırımı ve aside-dirençli (asido-rezistant) ve duyarlı olarak gruplandırmalar yapılabilmektedir.

- 
- 
- Kan ve dokudan yapılan boyamalarda hücrelerin yapılarının bozulmaması için kimyasal maddeler kullanılarak (aseton, alkol, vb...) tespit işlemi yapılır.
 - Kùltürlerden preparat hazırlanmasında fiziksel tespit (ısı işlemi) yapılmalıdır.

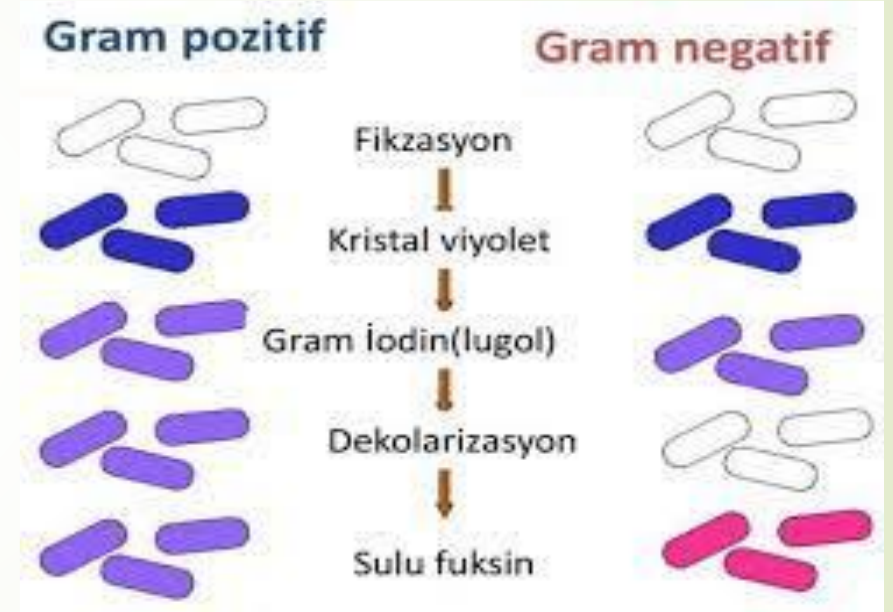
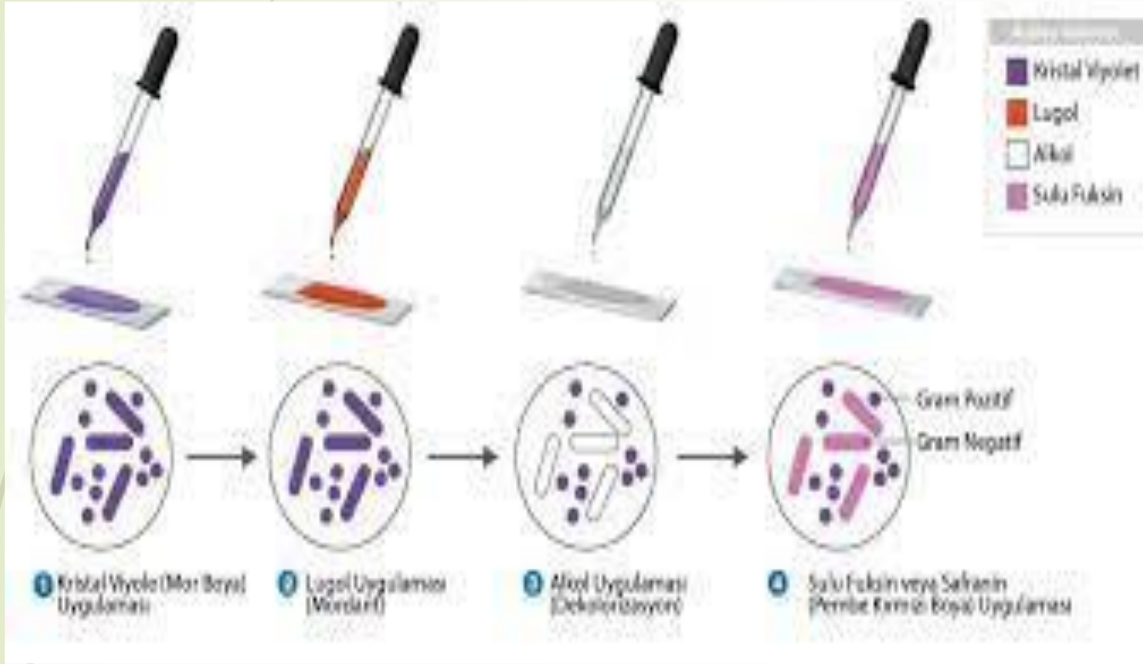
Gram boyama

- Bu yöntemle bakteriler Gram pozitif (+) ve Gram negatif (-) olarak ikiye ayrılmaktadır.
- Ancak Gram değişken ve intermediate bakteriler de bulunduğundan tüm bakterileri bu yöntemle ikiye ayırmak mümkün değildir.

Gram Boyama Yöntemi

- Kültürden preparat hazırlanır, kurutulur ve ısı ile tespit edilir.
- .Preparatın üzerine **kristal viyole** dökülerek 2-3 dakika boyanması sağlanır.
- Boya dökülür ve preparat üzerine **lugol solusyonu** (mordant) konarak 1-2 dakika beklenir.
- Lugol solusyonu dökülerek **absolut alkolde** 10-15 sn dekolore edilir.
- Su ile yıkanır.
- **Safranin-eosin** veya **sulu fuksin** ile 30 saniye boyanır.
- Su ile yıkanarak boya giderilir.
- .Preparat kurutma kağıdında veya havada kurutulur.
- Sedir yağı konulur ve x100 lük büyütme ile incelenir.

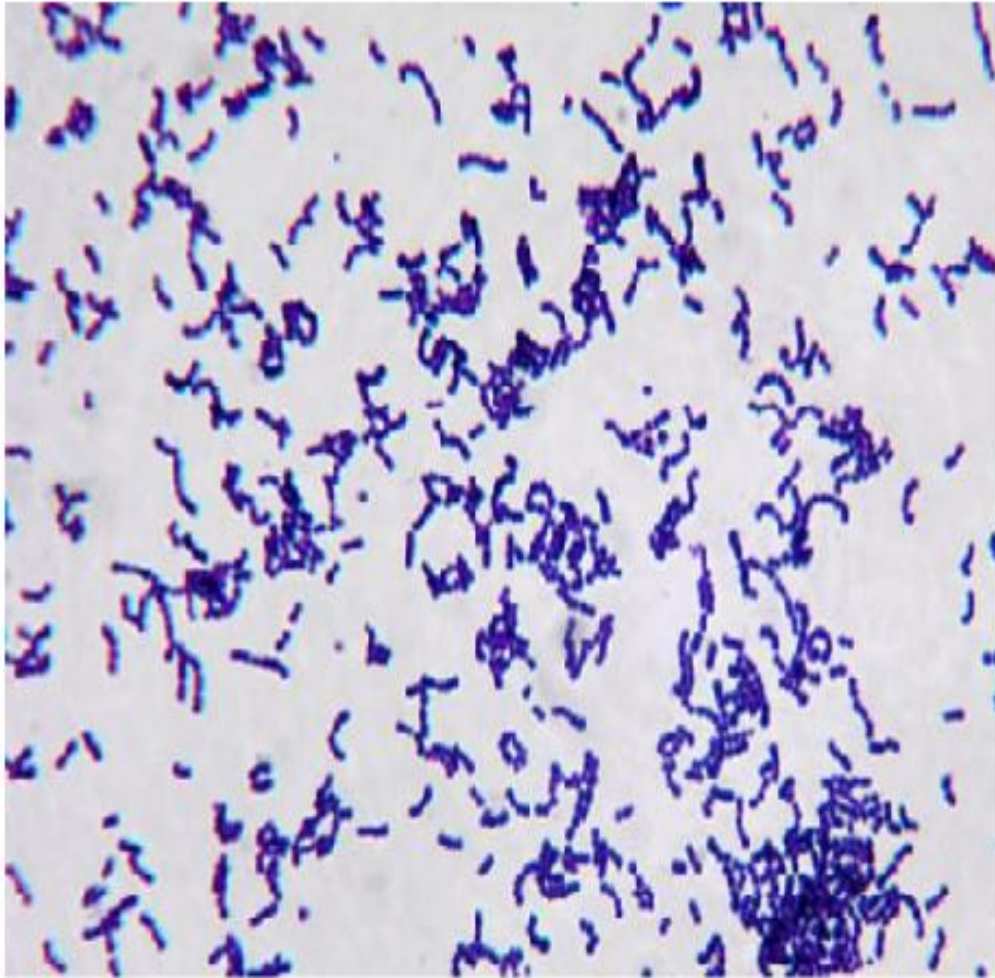
Gram Boyama Aşamaları



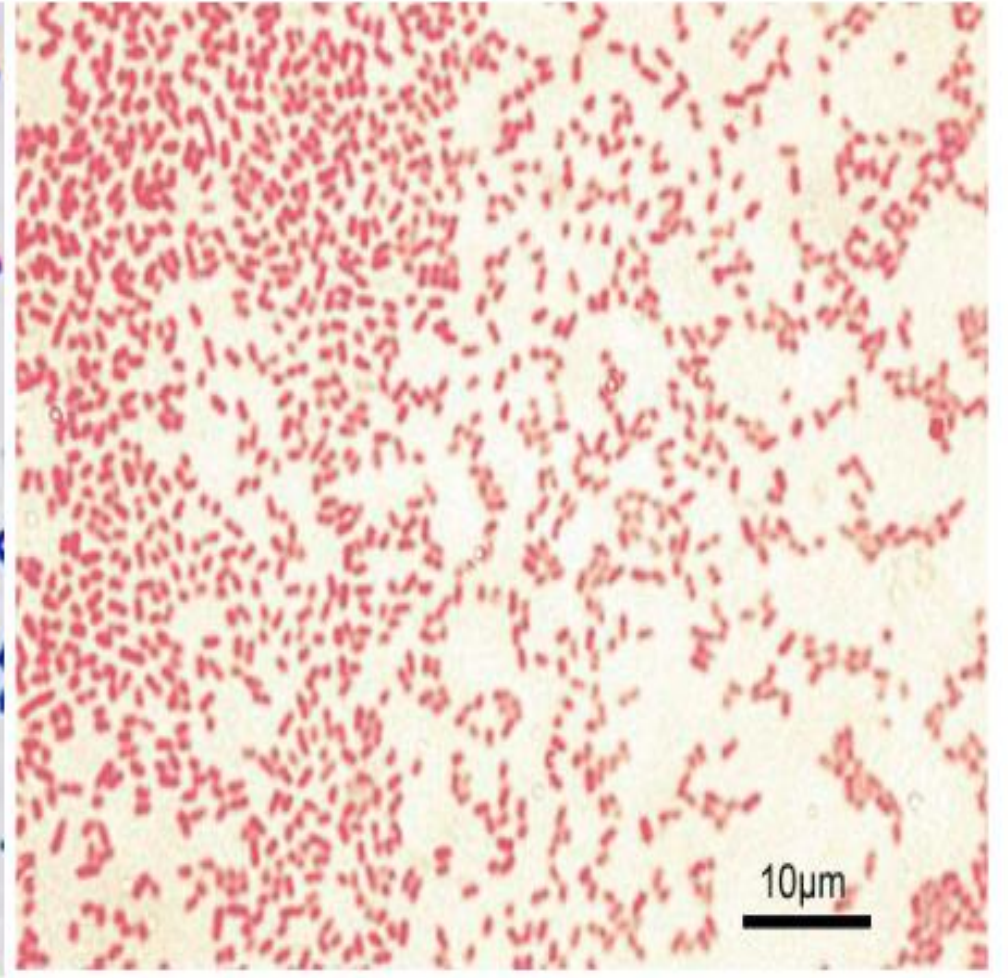
Gram Boyama

- Gram pozitif mikroorganizmalar **mavi-mor** renkte,
- Gram negatif mikroorganizmalar **kırmızı** veya **pembe** renkte boyanır.

!!!! Kùltùrler eskidikçe mikroorganizmalar Gram negatif boyanırlar.

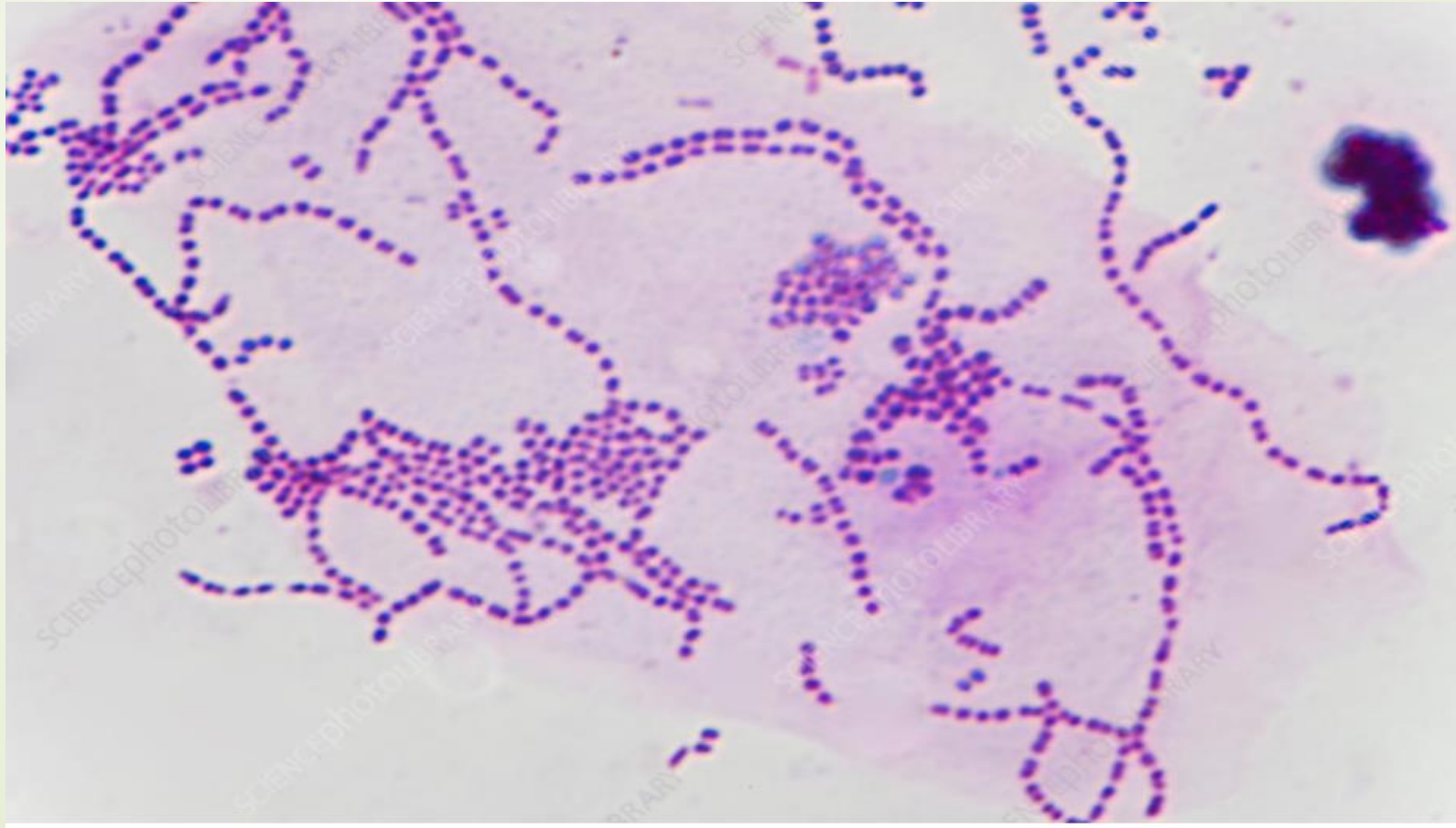


Gram positif bakteri

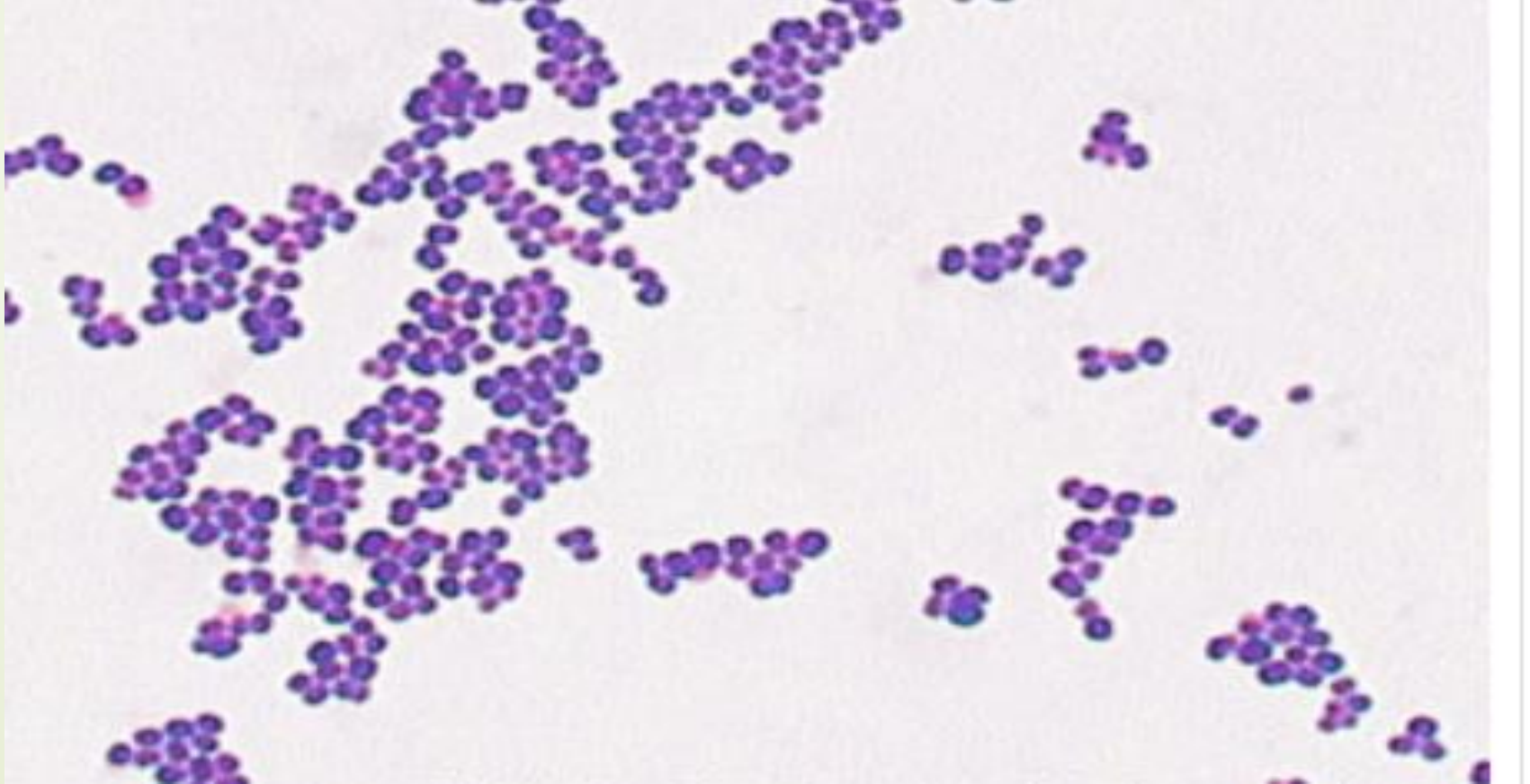


Gram negatif bakteri

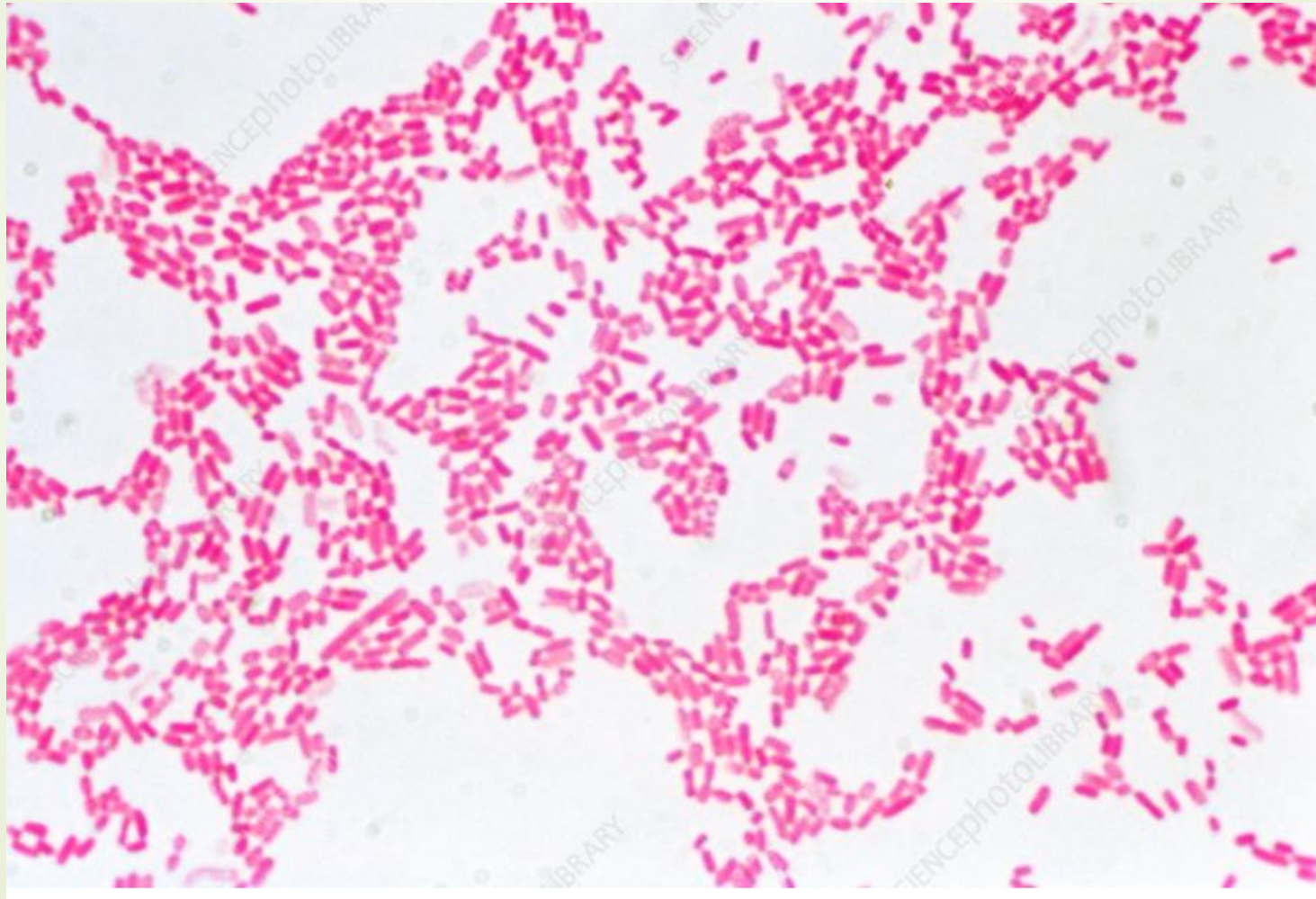
***Streptococcus agalactiae* gr(+)** pozitif kok
tesbih taneleri gibi yan yana dizilen koklar



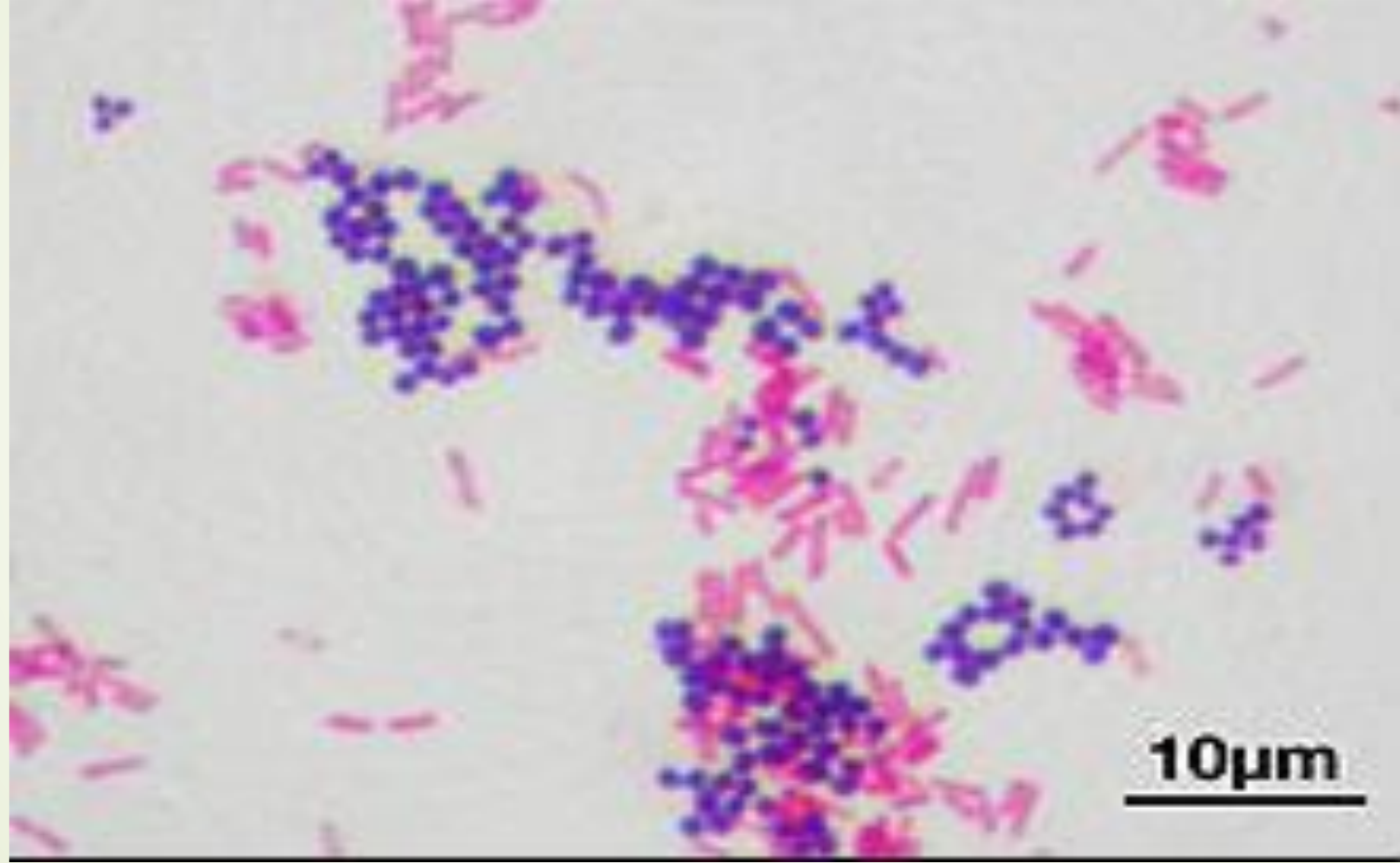
***Staphylococcus aureus* gr(+)** kok
üzüm salkımı gibi düzensiz kümeler yapan koklar



Escherichia coli Gr(-) basil



Staphylococcus aureus (Gram pozitif kok) ve *Escherichia coli* (Gram negatif basil) içeren bir kültürden yapılan Gram boyama.





Gram Boyama

- ▶ Gram-pozitif bakteriler
 - ▶ *Bacillus, Listeria, Staphylococcus, Streptococcus,*
 - ▶ *Enterococcus, Corynebacterium , Clostridium*
- ▶ Gram-negatif bakteriler
 - ▶ *Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Brucella,*
 - ▶ *Pasteurella, Campylobacter, Vibrio, Spiroketler*

Gram Boyama ile boyanamayan bakteriler

I- Hücre duvarı bulunmayan *Mycoplasma'lar*

II- Aside dirençli bakteriler

-Mycobakteriler

-Nocardia

-Korinebakteriler

III- Spiroketler (Treponema, Borrelia, Leptospira)

IV- Zorunlu hücre içi, besiyerinde üretilemeyen bakteriler (Chlamydia, Rickettsia, Coxiella)

Tüberküloz (aside dirençli) boyama (Ziehl Neelsen boyama-Asit-Fast Boyama)

- Tüberküloz, paratüberküloz gibi **aside dirençli bakterilerin hücre duvarı yapısına sahip** olan **Mikobakterilerin boyanması**
- Bu boyama yönteminde daha çok incelenecek numune (örnek) madde olarak çeşitli dokularda bulunan tüberküloz lezyonlarından (tüberkellerden) froti hazırlanır.

!!!! Boyanmaları için yoğun fenollü eriyiklerin ısı ile beraber uygulanması gerekir.

Tüberküloz (aside dirençli) boyama Yöntemi

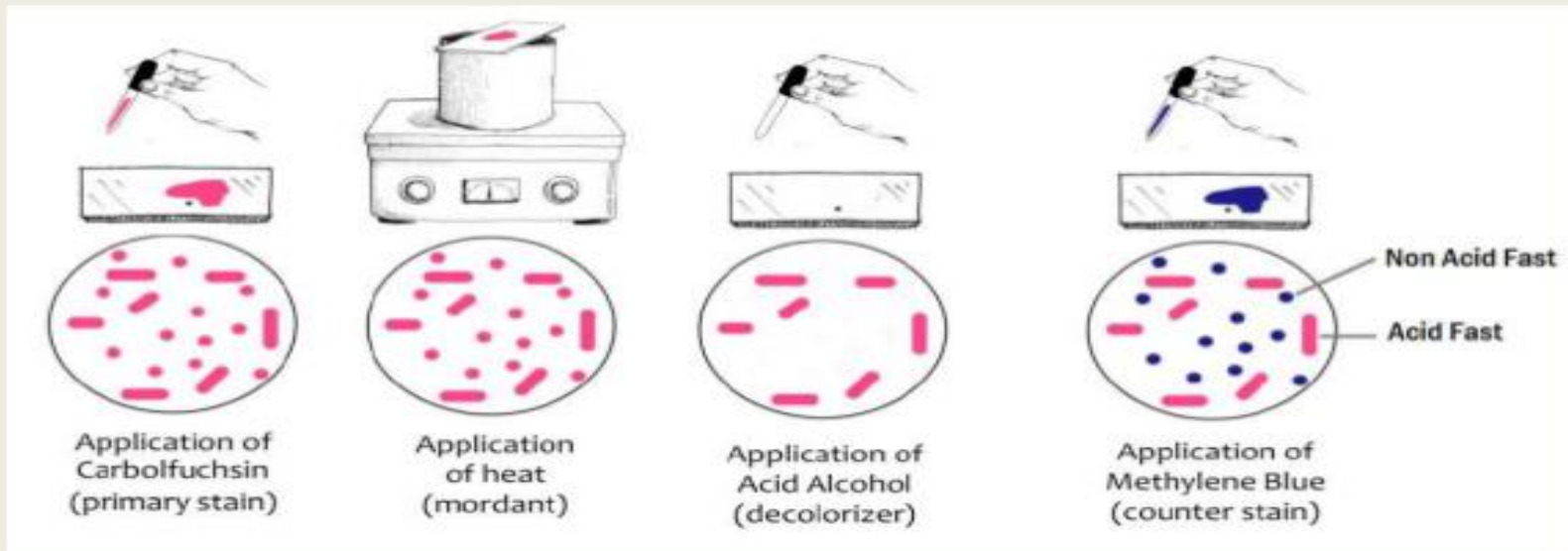
- Preparat tespit edilir.
- Lam üzerine **karbol fuksin solusyonu** ilave edilir.
- Preparat alttan 4-5 dakika ısıtılarak boyanın lipid tabakasını aşarak içeriye girmesi sağlanır.(Bu ısıtma işlemi esnasında preparatın kaynamamasına ve kurumamasına dikkat edilmelidir.)
- Boya dökülür ve preparat **asit-alkol** (%5 asit+%95 alkol) ile **dekolore** edilir. Lam su ile yıkanır.
- Preparat üzerine **metilen mavisi** dökülerek 10-15 saniye boyanır. Lam su ile yıkanır.

Tüberküloz (Aside dirençli) Boyama metodu

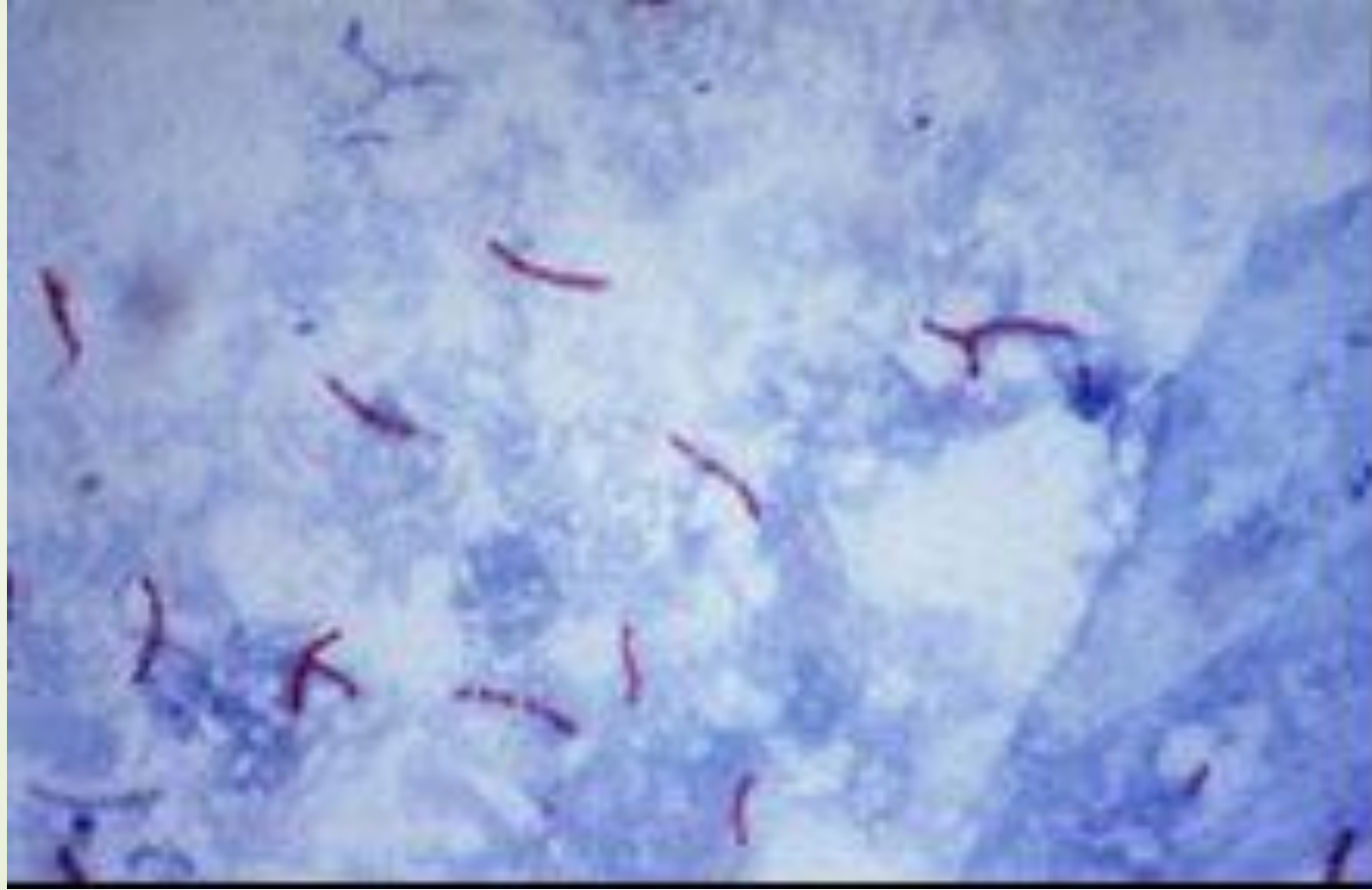
- Preparat kurutulur ve immersiyon objektifi ile incelenir.
- Tüberküloz etkenleri kırmızı renkte küçük, çomaklar tarzında görülür, diğer bakteriler mavi renkte gözlenir.
- Diğer bakteriler asit-alkol ilavesinde karbol-fuksini bırakırlar. Renksiz kalan diğer bakteriler metilen mavisi ilavesi ile boyanarak mavi renkte gözlenirler.

Asit-Fast Boyama Yöntemi

Procedure



Ziehl–Neelsen boyama sonucu aside dirençli
Mycobacterium tuberculosis etkenleri



Giemsa boyama yöntemi

- Giemsa boyasının bileşiminde **asidik ve bazik boya** bulunmaktadır.
- **Azur-eozin ve metilen mavisinden** ibarettir.
- Bu boya ile asit unsurlar bazik, bazik unsurlar ise asidik boya ile boyanır.

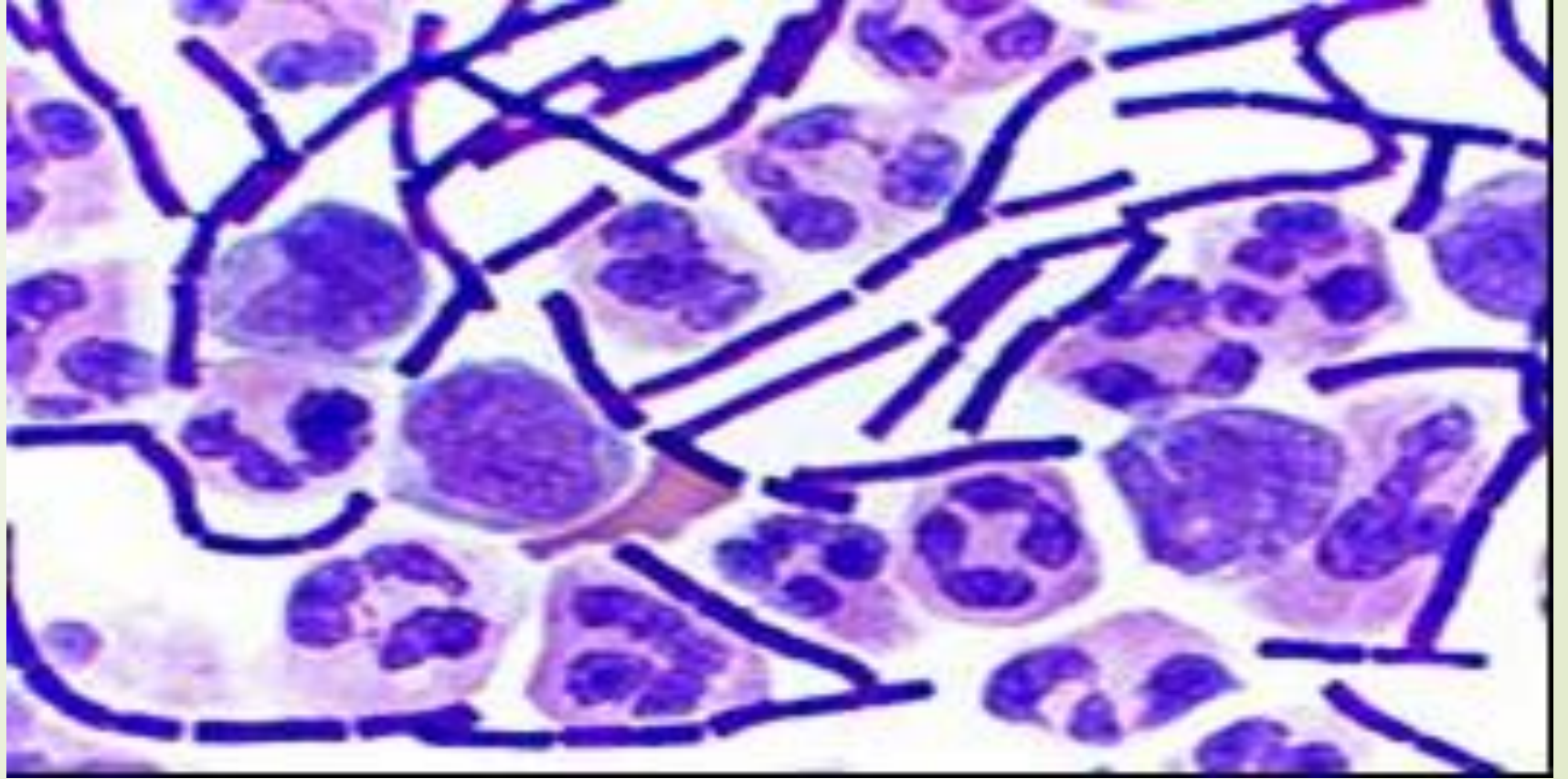
Giemsa Boyama Yöntemi

- Dokudaki hücrelerin (eritrositler, akyuvarlar vs) ve hücrelerde yer alan mikroorganizmaların tespitinde,
- Anthraks'da ise ***Bacillus anthracis***'te kapsül varlığının gösterilmesi amacıyla kullanılmaktadır.
- Kapsül kırmızı renkte bir hâle olarak görülür, bakterinin diğer unsurları ise eflatun renkte boyanır.
- Ayrıca **Spiroketaların** gösterilmesinde kullanılan bir boyama yöntemidir.
- Yine bu boyama yöntemi ile Vebanın etkeni ***Yersinia pestis***'te ve **pastörellozide** etkenler **bipolar** tarzda boyanır.

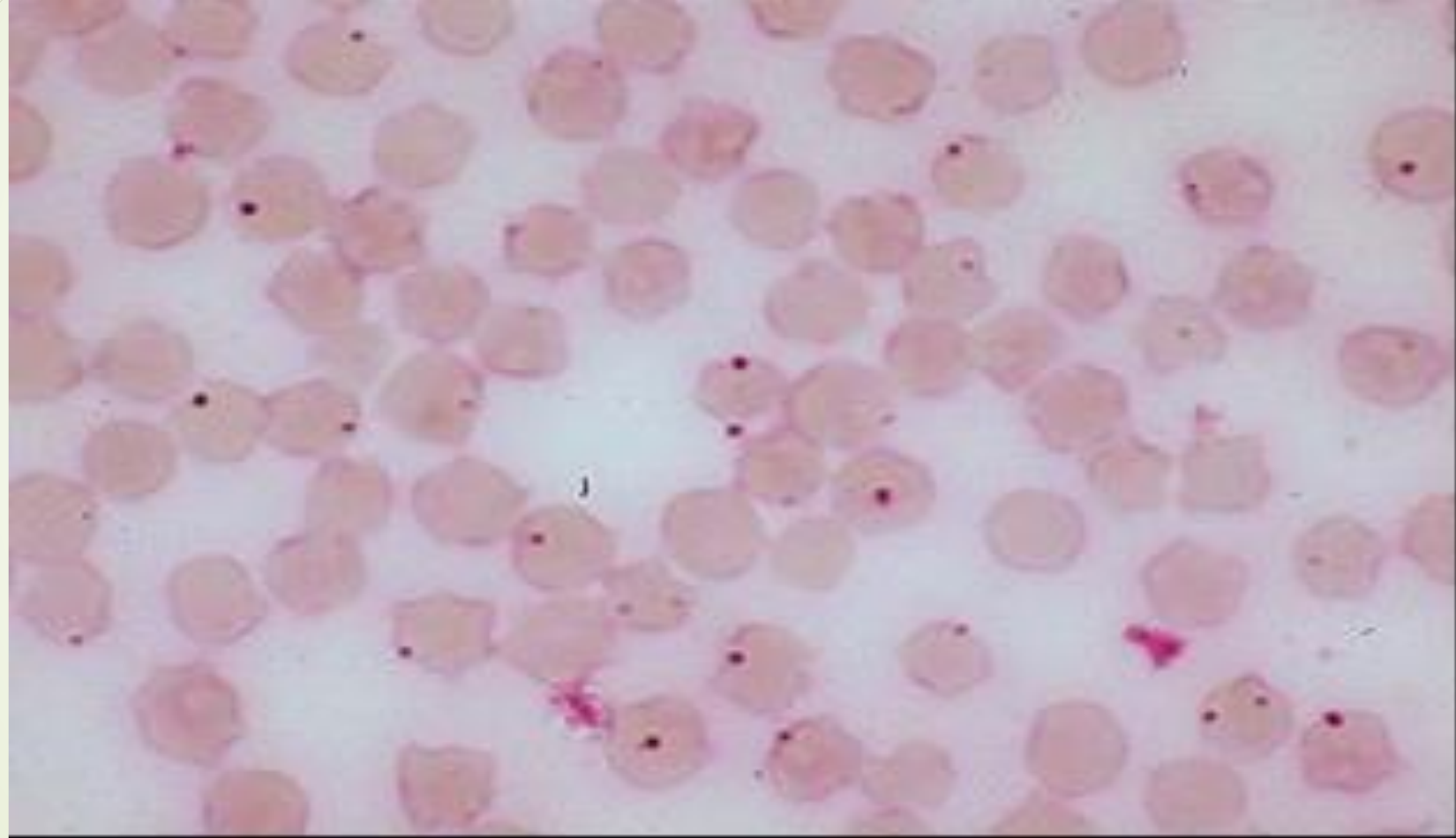
Giemsa boyama yöntemi

- Dokulardan yapılan boyamalarda sıkça kullanılan bir yöntemdir.
- Lam üzerine lamın uç kısmına yakın olarak antikoagülanlı/antikoagülansız bir damla kan damlatılır.
- İkinci bir lamı birinci lamla 30° to 35° açı oluşturacak şekilde yayma yapılır.
- Preparat metanol ile kimyasal olarak tespit edilir.
- Giemsa boya çözeltisi (azur eosinmethylene-blue) lamın üzerini kaplayacak şekilde konur.
- 5% Giemsa solusyonu ile 20-30 dakika, çok acil durumlarda %10 luk solusyon ile 5-10 dakika boyama yapılır.
- Hafif akan su ile yıkanır.
- Kurutulur-**immersiyon objektifi** ile incelenir.

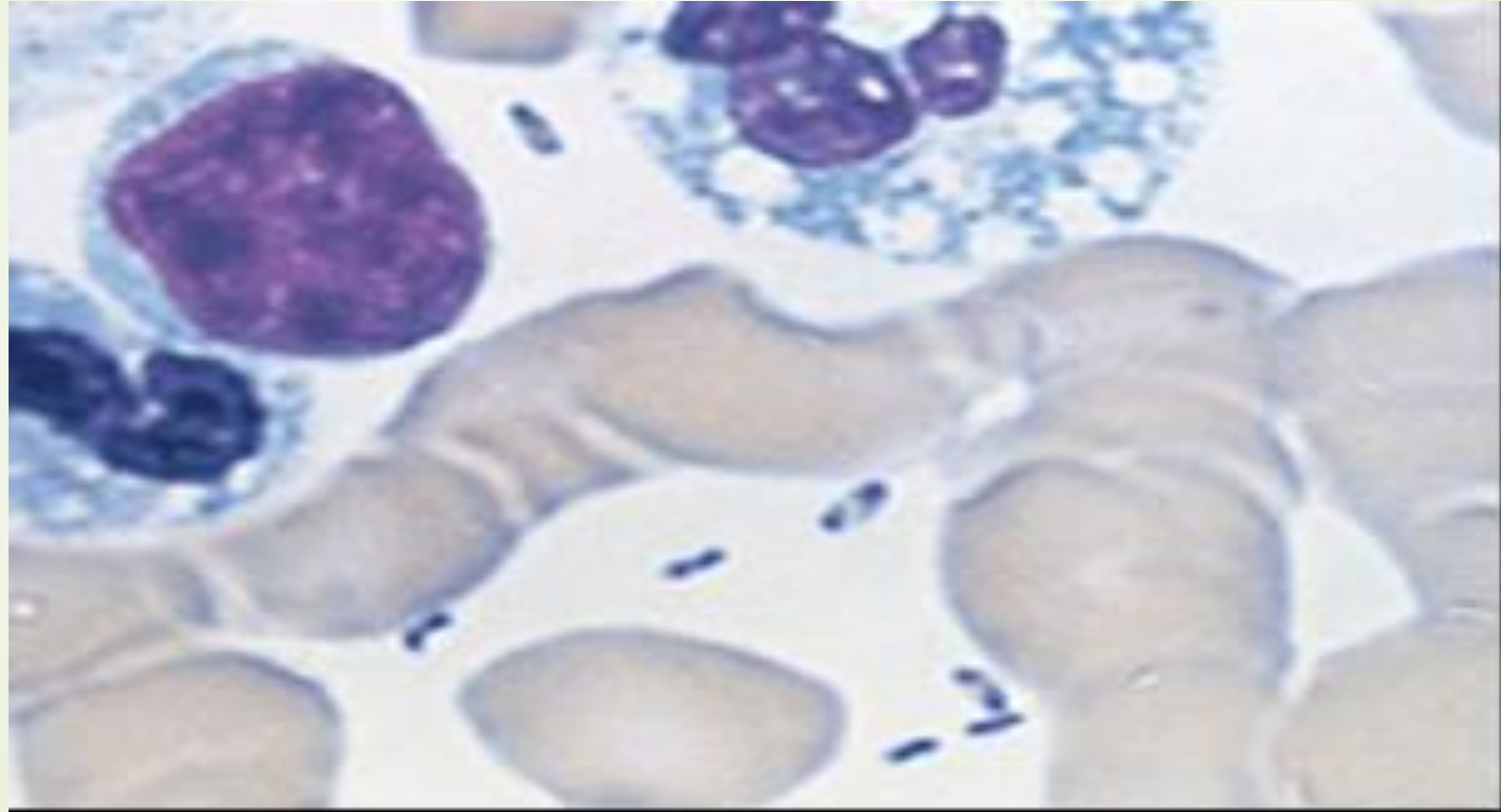
Giemsa boyama sonucu kandan yapılan froti örneğinde Çomak tarzında *B. anthracis* etkenleri



Eritrositlerde Anaplasma marginale etkenleri



Bipolar tarzda boyanan *Yersinia pestis* etkenleri



Spor Boyama

- Bazı bakteriler belirli koşullarda, hücre içerisinde dış etmenlere karşı daha dirençli olan ve Endospor olarak adlandırılan özel formlar oluştururlar.
- Endospor oluşumundan sonra, bakteri hücresi ölebilir veya lize olarak dağılabilir.
- Bu durumda endosporlar serbest hale geçerler. Bunlara serbest spor yada kısaca spor denir.
- Spor oluşumu Bacillaceae familyasının tipik özelliğidir.
- Spor bu familyanın üyeleri olan Bacillus ve Clostridium cinsi bakterilerde görülür.

Spor Boyama

- 1. İncelenecek bakteri kültürü ile preparat hazırlanır (yayma, kurutma, tespit),
- 2. Preparat kaynar su banyosu düzeneđi üzerine yerleřtirilir
- 3. Preparatın üzeri **%5'lik malaşit yeşili boya** çözeltisi ile kaplanır.
- 4. Üzerine lamdan daha küçük olacak şekilde kesilerek hazırlanmış olan bir kurutma kağıdı yerleştirilir. Kurutma kağıdı boya çözeltisini çekerek ıslanır.

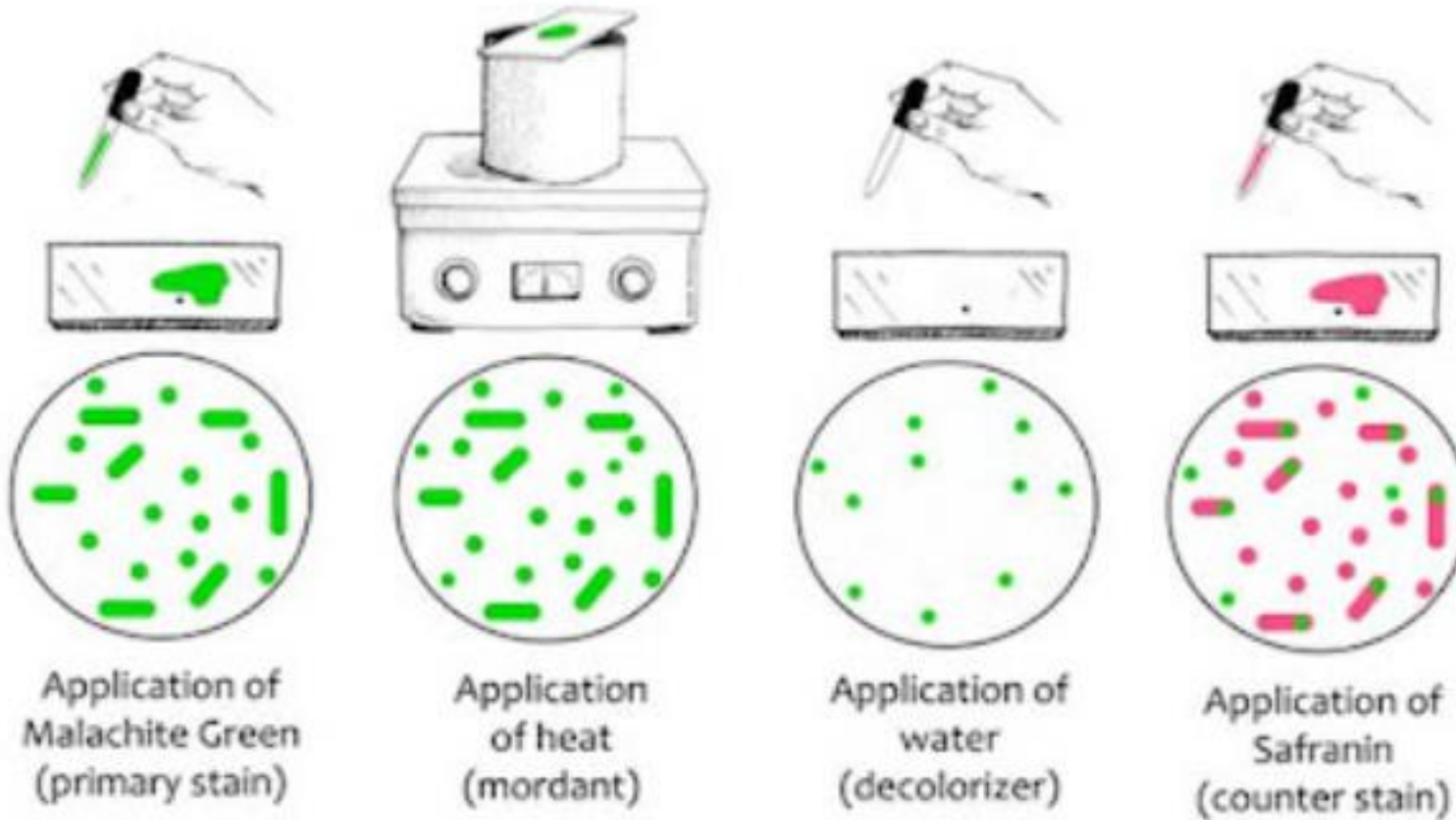
Spor Boyama

- 5. Kurutma kağıdı üzerine malaşit yeşili boya çözeltisi damlatılır ve kağıdın sürekli olarak ıslak kalmasını sağlayacak şekilde hareket edilir. Bu amaçla, kurutma kağıdının ıslaklığı azaldıkça, üstüne malaşit yeşili boya çözeltisi damlatılır ve bu şekilde preparat 5-6 dk boyanır.
- 6. Süre sonunda kurutma kağıdı bir pensle kaldırılarak atılır, preparat yıkanır.

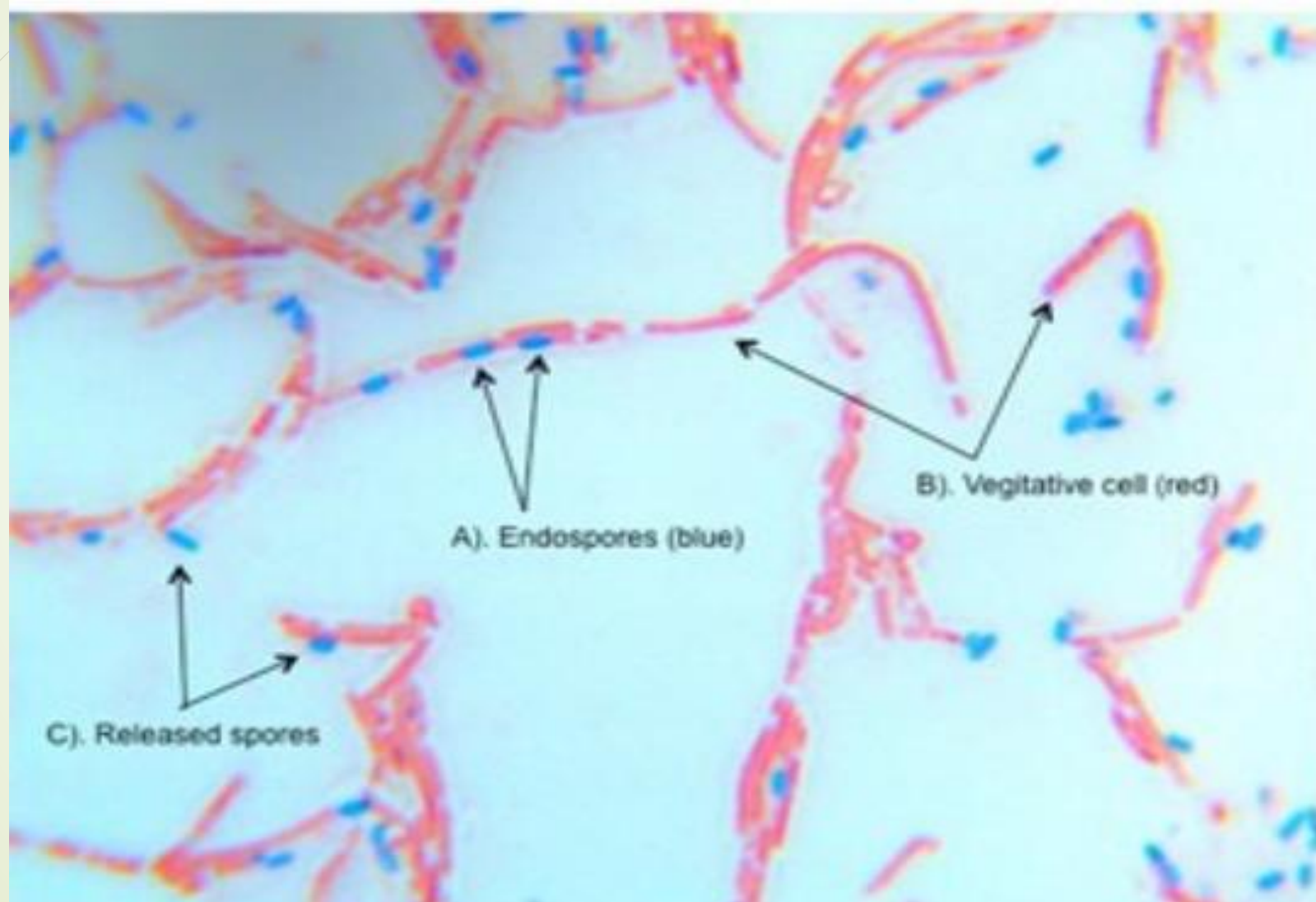
Spor Boyama

- Karşıt boya olarak **bazik fuksin yada safranin (%0.5)** ile 20-30 sn boyanır
- 7. Preparat yıkanır ve havada kurutulur.
- 8. Mikroskopta immersiyon merceğinde (100X'lik objektif) incelenir.
- **Bu boyamada bakteriler pembe-kırmızı, sporlar yeşil olarak görülür.**

Spor Boyama



Bakteriler kırmızı, sporlar ise yeşil olarak görülür



Sonuç

!!! Boyama bakteriyolojik tanıda ilk aşamadır

Laboratuvar tanıda yürütülmesi gereken yöntemler hakkında bilgi verir.

Tek başına boyama yöntemi tanıda yeterli değildir.