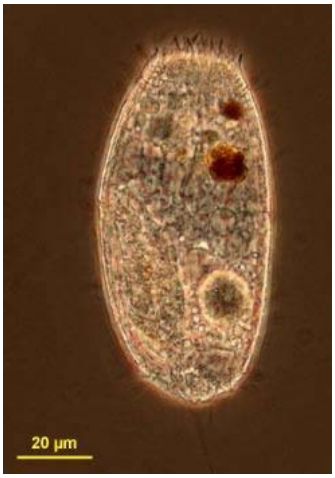
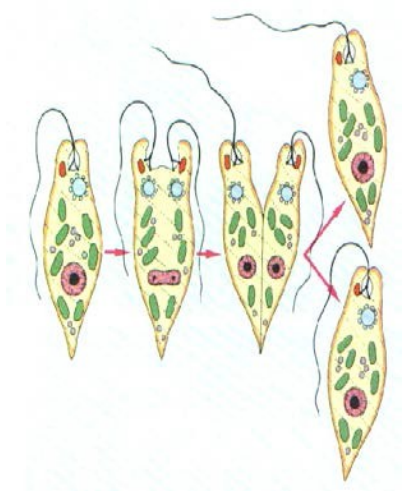
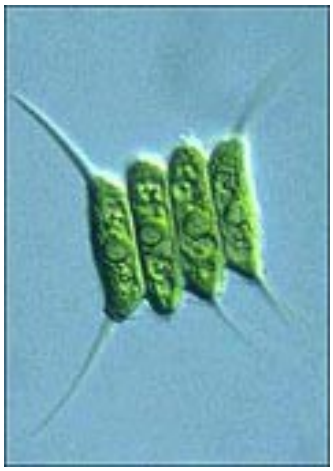
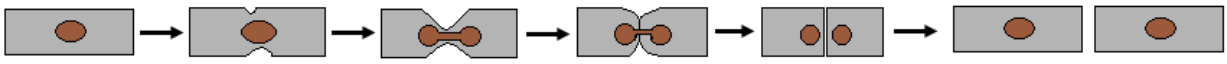






ÇEVRE MİKROBİYOLOJİSİ LABORATUAR NOTLARI



Dr. Öğretim Üyesi Süleyman ŞAKAR

İstanbul - 2020

GİRİŞ

Çevre Mühendisliği Bölümü'nde okutulan Çevre Mikrobiyolojisi dersinin Laboratuar uygulamaları için, hazırlanmış bir ders notuna ihtiyaç duyulmaktaydı. Bu Laboratuar notları, uzun yıllar Çevre Mikrobiyolojisi tatbikatlarında edinilen tecrübelerden faydalanarak böyle bir ihtiyaca cevap vermek için hazırlanmıştır. Ders notlarda eksiklikler çok fazladır. Zaman içinde bu eksiklikleri yeni araştırmacı arkadaşların dolduracağı kanaatindeyim. Değiştirilmesi ve ilave edilmesini uygun buldukları konularda yardımcı olacaklar için teşekkür ederim.

Bu laboratuvar notlarının Çevre Mühendisliği öğrencilerine ve camiasına hayırlı olmasını temenni ederim.

Dr. Öğretim Üyesi Süleyman ŞAKAR

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER 3
BÖLÜM I: ÇEVRE MİKROBİYOLOJİSİ LABORATUVARI GENEL BİLGİLER 5
1.1. Giriş 5
I.2. Laboratuar Çalışma Düzeni 5
I.2.1. Alet ve Cihazların Kontrolü 5
I.2.2. Cam Eşyanın Temizlenmesi ve Sterilizasyonu 5
I.2.3. Besi Yerlerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu 6
I.2.4. Sterilizasyon İşlemlerinin Kontrolü 6
I.2.5. Deneyin Yürütülmesi 6
I.2.6. Sonuçlarının Değerlendirilmesi 6
I.3. Çevre Mikrobiyolojisi Laboratuvarında Çalışma Kuralları 6
BÖLÜM II: ÇEVRE MİKROBİYOLOJİSİ LABORATUARINDA KULLANILAN CİHAZ VE MALZEMELER 8
II.1. İnkübatör-Etüvler 8
II.2. Kuru-Sıcak Hava Sterilizatörü (Pasteur Fırını) 8
II.3. Otoklav 9
II.3.1. Otoklavın Kullanılması 10
II.4. Gaz Sterilizatörleri 10
II.5. Koloni Sayıcılar 11
II.6. pH Metre 11
II.7. Terazi 11
II.8. Dereceli Pipet, Otomatik Pipetler ve Pipet Kapları 12
II.9. Buzdolabı 12
II.10. Termometre 13
II.11. Seyreltme Şişeleri, Deney Tüpleri 13
II.12. Membran Filtre Süzme Takımı 14
II.13. İğne, Öze 14
II.14. Numune Şişeleri 14
II.15. Su Banyosu 15
II.16. Mikroskop 15
II.17. Işık Mikroskobu 16
II.17.1. Mekanik Kısım 17
II.17.2. Aydınlatma ve Ayarlama 17
II.17.3. Optik Kısım 18
II.17.4. Mikroskobun Kullanılması 18
II.17.5. Temizleme ve Muhafaza 19
II.18. Cam Balon, Erlen, Lam, Lamel 19
II.19. Numune Alma Kabı Ve Cihazı 19
BÖLÜM III: CAM EŞYANIN TEMİZLENMESİ VE STERİLİZASYON 20
III.1. Cam Eşyanın Temizlenmesi 20
III.2. Mikrobiyal Kontrolün Önemi 20
III.3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon 20
III.4. Sterilizasyon Çeşitleri 21

III.5. Fiziksel Metotlarla Sterilizasyon 22
III.5.1. Isı İle Sterilizasyon 22
III.5.2. Kuru Sıcak Sterilizasyon İşlemleri 22
III.5.3. Nemli Isı İle Sterilizasyon İşlemleri 22
III.5.4. İyonize Eden Işınlarla Sterilizasyon 23
III.5.5. Mekanik Olarak Yapılan Sterilizasyon 24
III.6. Kimyasal Metotlarla Yapılan Sterilizasyon 24
BÖLÜM IV: MİKROORGANİZMALARIN ÜRETİLMESİ İÇİN BESİYERLERİ 26
IV.1. Giriş 26
VI.2. Besiyeri Çeşitleri 26
VI.2.1. Sıvı Besiyerleri 26
VI.2.2. Katı Besiyerleri 27
VI.2.3. Özel Besiyerleri 27
VI.3. Besiyerlerinin Hazırlanması 27
IV.3.1. Kullanılan Suyun Özellikleri 27
IV.3.2. Reaksiyon Uyumu 28
IV.3.3. Besiyerlerinin Sterilizasyonu 28
IV.3.4. Besiyerlerinin Saklanması 29
IV.4. Seyreltme Suyu 30
IV. 4.1. Seyreltme Suyu Hazırlanışı 30
IV. 4.1.1. Tamponlu Su 30
IV. 4.1.2. Peptonlu Su 30
V.3. Boyalar Ve Boyama Metotları 31
V.3.1. Basit Boyama Metodu 32
V.3.2. Kombine Boyama Metodu 32
V.4. Gram Boyama Metodu 32
V.4.1. Gram Boyamada Dikkat Edilecek Hususlar 33
BÖLÜM VI: MİKROBİYOLOJİK PARAMETRELER İÇİN NUMUNE ALMA VE KORUMA 34
VI.2. Deklorlama 34
VI.3. Numune Alma İşlemleri 35
VI.3.1. İçme Su Şebekelerinden Numune Alma 36
VI.3.2. Su Temin Edilen Yerlerden Numune Alma 37
a) Akarsulardan Numune Alma 37
b) Göl ve Rezervuarlardan Numune Alma 37
c) Kuyulardan Numune Alma 37
VI.3.3. Yüzeysel Sulardan Numune Alma 37
VI.3.4. Yüzme Amaçlı Kullanılan Sulardan Numune Alma 38
VI.3.5. Sediment ve Çamurlardan Numune Alma 38
VI.4. Numune Alma Sıklığı 38
VI.5. Numunelerin Nakli Ve Korunması 38

BÖLÜM I: ÇEVRE MİKROBİYOLOJİSİ LABORATUVARI GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Mikrobiyoloji bilimi, mikroorganizmaları ve onların aktivitelerini kapsar. Diğer bir ifade ile çıplak gözle görülmeyip ancak mikroskopla görülebilen, canlıların şekillerini, yapılarını, üremelerini fizyolojilerini, tanılarını (teşhis), doğada yayılış şekillerini, birbirleri ile ve diğer canlılarla olan ilişkilerini, insanlara yararlı ve zararlı yönlerini ve onların çevresinde yaptıkları fiziksel ve kimyasal değişiklikleri inceleyen bir bilimdir.

Çevre Mikrobiyolojisi Laboratuvarı'nın amacı, genel mikrobiyoloji laboratuvar konularına değinerek, her sınıf mikroorganizmaları tanıtmak, Çevre Mühendisliği ile alakalı mikrobiyolojik incelemelerin nasıl yürütüleceğinin öğretilmesini sağlamaktır. Bu genel amaç çerçevesinde, su ve pissu arıtımında rol oynayan mikroorganizma türleri ve faaliyetlerini tanımlamak, içme suyu olarak kullanılacak suların bakteriyolojik analiz ve kontrollerini temin etmek ve bilhassa Çevre Mikrobiyolojisi'nin temel parametresi olan, toplam ve fekal koli deneylerinin nasıl yapıldığının gösterilmesi, Çevre Mühendisliği'nde özel öneme sahiptir.

I.2. Laboratuar Çalışma Düzeni

Çevre Mikrobiyolojisi laboratuvar çalışmaları aşağıdaki adımları takip ederek yürütülür.

I.2.1. Alet ve Cihazların Kontrolü

Laboratuar çalışmalarına başlamadan önce, kullanılan alet ve cihazların elektrik aksamı, ısı ayarı v.b. özellikleri kontrol edilir. Bilhassa etüv sıcaklık ayarının uygun olup olmadığı sabah ve akşam olmak üzere en az iki defa kontrol edilmelidir.

I.2.2. Cam Eşyanın Temizlenmesi ve Sterilizasyonu

Laboratuvarda kullanılan bütün cam malzemeler uygun deterjan ile sıcak suyla iyice yıkanır ve durulanır. Sıcak suyla durulama işleminden sonra distile sudan geçirilir. Temizlenen cam malzemeler 70°C de etüvde kurutulur. Kullanım özelliklerine göre hazırlanan cam malzemeler kuru sıcak havayla sterilize edilir.

I.2.3. Besi Yerlerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

İlgili deneylere uygun olarak steril cam malzemelerde hazırlanan besi yerleri, genellikle otoklavda sterilize edilirler.

I.2.4. Sterilizasyon İşlemlerinin Kontrolü

Tüpte hazırlanan sıvı besi yerlerinin % 10'u, plaklara dökülen besi yerlerinin bir kısmı ve membran filtreler besi yerleri ile beraber 24 saat 35°C de inkübasyona tabi tutularak sterilizasyon kontrolü yapılır.

I.2.5. Deneyin Yürütülmesi

Ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra deney çalışmalarına geçilir. Deney sırasında dikkat edilecek en önemli husus, aseptik şartlarda çalışmaların yürütülmesidir.

I.2.6. Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Deney sonuçları, deney prosedürüne göre değerlendirilerek rapor yazılır.

I.3. Çevre Mikrobiyolojisi Laboratuvarında Çalışma Kuralları

Mikrobiyoloji Laboratuvarında gözle görülmeyen canlılar ile çalışılmaktadır. Bundan dolayı kendine özgü farklı bir laboratuvar tekniği vardır. Laboratuvarda çalışan kimseler, yapılacak işten çabuk sonuç almak ve kendilerini çeşitli tehlikelerden korumak için aşağıda bildirilen kurallara uymak mecburiyetindedir.

1) **Laboratuar çalışma metotları aynen ve tam olarak uygulanır.**
2) Palto, pardösü, ceket, şapka gibi giyim eşyası, çanta ve kitaplar laboratuvar çalışması yapılan masaların üzerine bırakılmaz. Bu eşyalar için ayrılan yerlere konur. Çalışma masası üzerinde oturulmaz ve uzanılmaz.
3) **Mutlaka beyaz ve temiz bir laboratuvar önlüğü giyilerek çalışılmalıdır.**
4) Deneye başlamadan önce, ilgili kısımlar iyice okunmalıdır. Takip edilecek işlemler hakkında ve ilgili diğer konularda sorunuz varsa, mutlaka sorunuz ve deneyin gayesini iyice kavrayınız.
5) **Laboratuvarda yiyecek yenmez, su içilmez, sakız çiğnenmez, sigara içilmez,**

yüksek sesle konuşulmaz, sert lüzumsuz hareketler yapılmaz.

6) Bu laboratuvarda kullanılan kâğıt kalem ve diğer eşya, yüze bilhassa ağıza sürülmez. Parmaklar ve eller kesinlikle ağıza sürülmez.

7) Çalışırken temizliğe ve intizama önem verilmelidir. Çalışma masası, mikroskop ve diğer aletler daima temiz olmalıdır. Ortada fazla lüzumsuz bırakılmamalıdır.

8) Numune ve kültür yapılan kapların üzerinde tarih, saat ve numunenin alındığı yer ile bilgiler yazılır.

9) Mikropların ekiminde kullanılan iğne ve öze kullanılmadan önce ve sonra mutlaka ileride anlatılacağı gibi, iyice yakılarak sterilize edilmelidir.

10) Kullanılan pipet, baget, lam, lamel gibi cam eşya masanın üzerine bırakılmaz ve dezenfektan madde (lizol) konmuş kaba konur.

11) İçinde besi yeri, kültür veya numune maddesi bulunan tüpler masanın üzerine yatırılmaz. Tel sepet ve sporlara veya kutunun içine yerleştirilir.

12) Tüp, petri kutusu vb. mikroorganizma ihtiva eden kaplar kırılıp dökülecek olursa hemen ilgililere haber veriniz. Ayrıca dökülen yeri dezenfektan madde ile iyice siliniz. (Dezenfektan maddeyi laboratuvar sorumlularından isteyiniz).

13) Eller infekte madde ile temas ettirilmez. Temas etmişse hemen antiseptik madde ile sonra sabun ve bol su ile iyice yıkanmalıdır.

14) El veya yüz mikroplu aletle kaza ile yaralanır ya da göze infekte madde sıçrarsa derhal antiseptik madde sürülür veya damlatılır. Antiseptik maddenin bulunması gecikecekse bol su ile yıkanır. Mikrobun cinsine göre diğer tedbirler alınmalıdır.

15) Kullanılmadığı zamanlarda havagazı (ispirto) ocakları söndürülür.

16) Çalışma bitince mikroskop ve kirletilen malzemeler temizlenir, yerine kaldırılır. Her laboratuvarın başlangıç ve bitiminde mutlaka masaların üstü dezenfektan madde ile ıslatılmış bezle silinerek, temizlenmelidir.

17) Her laboratuvar çıkışında eller antiseptik madde ve sabun ile yıkanmalıdır. Elektrikler kapatılmalıdır.

BÖLÜM II: ÇEVRE MİKROBİYOLOJİSİ LABORATUARINDA KULLANILAN CİHAZ VE MALZEMELER

Bu bölümde Çevre Mikrobiyolojisi laboratuvarlarında kullanılan ekipmanların özellikleri kısaca anlatılacaktır.

II.1. İnkübatör-Etüvler

Mikroorganizmalar kültür ortamlarına ekildikten sonra çoğalmalarını temini için, muayyen bir ısı derecesinde tutulmaları gerekir. Bu gaye için kullanılan aletlere inkübatör veya etüv denir. inkübatör içinde sabit sıcaklık, bütün zamanlarda ve her yerde aynı olmalı veya en az ±0,5 ^{O}C lik bir farktan büyük olmamalıdır. Sahip olduğu bir regülatör sayesinde devamlı aynı dereceyi muhafaza eder. Isı kontrolü için sabit bir termometreleri vardır. Etüvde kullanma alanı maksimuma çıkması halinde bile sıcaklık değişimi yukarıdaki değer arasında kalmalıdır.

Şekil II.1. İnkübatör ve Pasteur Fırını Resimleri

II.2. Kuru-Sıcak Hava Sterilizatörü (Pasteur Fırını)

Kuru hava sterilizatörü yeterli hacimde ve sterilizasyon sıcaklığının her tarafta eşit ve üniform verecek şekilde yapılmış olmalıdır. 180±10 ^{o}C Kuru sıcak hava ile çalışır. Uygun bir yerde termometresi olmalıdır. Pipet, tüp, petri kutusu, porselen süzgeçler, milipor süzme takımı gibi her türlü cam ve madeni malzemenin sterilizasyonu için kullanılır. Sterilize edilecek malzeme temizlenmiş ve kurutulmuş olarak sterilizatöre yerleştirilir. Malzemeler yaş olarak konulmaz ve alet soğumadan, kapağı açılmaz. Her iki durumda da aletin içindeki cam malzemenin çatlama tehlikesi mevcuttur.

II.3. Otoklav

Otoklav, doymuş basınçlı su buharı ile 100 ^{o}C'nin üstünde çalışan bir sterilizasyon aletidir. Genellikle yüksek ısıya dayanıklı maddelerin sterilizasyonunda kullanılır. Yani, çözeltiler, besi yerleri, boş şişe ve pipet gibi cam malzeme ile bez eşyaların sterilizasyonu otoklavla yapılır.

Şekil II.2. Otoklav Resimleri

Otoklav içerisindeki su, kapalı bir yerde basınç altında kaynadığı zaman, meydana gelen buharın oluşturduğu sıcaklık 100 ^{o}C'nin üstüne çıkar. Otoklavlar silindir veya dikdörtgen şeklinde paslanmaz çelikten yapılmıştır. Silindir veya dikdörtgenin bir tarafında kapağı vardır. Kapak vidalarla gövdeye bağlanır. İçerisinde ızgara şeklinde raflar bulunur ve sterilize edilecek eşyalar bunun üstüne yerleştirilir. Kazanda, ızgaraların altında su konacak bir haznesi vardır. Otoklavın kapağında veya üst kısmında buharın çıkmasına yarayan bir musluk, içindeki sıcaklığı kontrol etmek için bir termometre, basıncı kontrol etmek için bir manometre bulunmaktadır. Ayrıca aleti patlamadan koruyabilen bir emniyet supabı mevcuttur.

Otoklav içindeki hava çok önemlidir. Hava bulunması istenmez. Çünkü otoklavda hava bulunmasının muhtelif mahzurları vardır. **Bu mahzurlar;**

- Hava ile karışık su buharının sıcaklığı düşüktür.
- Hava, buharın küçük alanlara girmesine engel olur.
- Hava buhardan daha ağır olduğundan, otoklavın alt kısmında toplanarak daha soğuk

bir tabakanın oluşmasına sebep olur. Bu kısımdaki eşya istenen sıcaklığa kadar ısınmaz. **Örneğin,** üst kısımda sıcaklık 115°C iken, alt kısımda 80°C olur.

II.3.1. Otoklavın Kullanılması

Kazanın içine yeterli miktarda su konur. Sterilize edilecek eşyalar, otoklav içerisine uygun bir şekilde yerleştirilir. Otoklavın kapağı vidaları karşılıklı sıkıştırılarak İyice kapatılır. Buhar musluğu açık tutularak alet ısıtılmaya başlanır. Otoklavdaki su ısınınca buhar çıkmaya başlar. Suyun kaynamasına paralel olarak çıkan buhar miktarı da artar. Bir müddet buhar hava ile karışık olarak musluktan çıkar. Otoklavdan hava tamamen çıkığında buhar musluğu kapatılır. Havanın tamamen çıktığı buhar musluğuna takılan lastik bir hortumun soğuk suya daldırılması sırasında kabarcık çıkmasıyla anlaşılır. Otoklav içinde oluşan buhar, çıkacak yer bulamadığından aletin içinde basınç meydana getirir manometre ibresi yükselir. İbre 1 atmosfer basıncı gösterdiği zaman, otoklavın içindeki sıcaklık 120 ^{o}C dir. Bu basınç ve sıcaklığa ulaştıktan sonra 15-45 dakika beklemek suretiyle istenen sterilizasyon işlemi tamamlanır. Isıtıcı kapatılarak aletin soğuması beklenir.

Basınç 0 (sıfır)'a düştüğü zaman, hemen buhar musluğu yavaşça açılır. Buhar çıkışı durduğunda otoklavın iç basınç ile dış basıncı eşit olur ve hemen kapak açılır. Basınç yüksek iken buhar musluğu açılırsa, basınç süratle düşer ve otoklav içindeki sterilize edilmek istenen sıvılar kaynamaya başlar. Netice de bulundukları kaplardan taşarlar. Aynı şekilde basınç sıfır da iken, otoklavın buhar musluğu açılmazsa, soğumakta olan otoklavdaki su buharı süratle yoğunlaşır. Bunun sonucu otoklav iç basıncı dış atmosfer basıncından daha aşağıya düşer. Bu esnada fazla miktarda yoğunlaşan su buharı otoklavdaki eşyayı ıslatır.

Sterilizasyon esnasında otoklavın doğru çalışıp çalışmadığı farklı yöntemlerle kontrol edilebilir. Otoklav içine termometre, indikatör boya ihtiva eden kağıtlar ile 120 ^{o}C de eriyen maddeler konulmasıyla veya biyolojik indikatörler kullanılmak suretiyle kontrol edilebilir.

II.4. Gaz Sterilizatörleri

Otomatik kontrollü gaz sterilizatörlerde, sterilizasyon gazı olarak % 10-12 inert gazla

seyreltilmiş etilen oksit kullanılır. Nem, sıcaklık, basınç ve sterilizasyon zamanı kullanılan gaz karışımına uygun olmalıdır.

II.5. Koloni Sayıcılar

a) Que-bec Tipi Koloni Sayıcısı

Dökme ve yayma plaklardaki kolonilerin sayımında kullanılır. Karanlık saha Modeli tercih edilir. Sayıcı yeterli görünüş ve 1,5 çapında eşdeğer büyütme sağlamalıdır.

b) Binoküler Mikroskop Tipi Koloni Sayıcısı

Membran filtre kolonilerin sayımında 10-15X büyütmeli binoküler mikroskop kullanılır. Kolonilerin üstünde 60 ila 80$^{o'}$lik açıda ışık kaynağı olarak gün ışığı flüoresanı temin edilmelidir. Düşük açılı aydınlatma pigment ihtiva etmeyen koloniler için kullanılır.

c) Mekanik Koloni Sayıcı

Mevcut kolonilerin sayımı işlemi için kullanılan basit koloni sayıcısıdır.

Şekil II.3. Koloni Sayıcısı Resmi

II.6. pH Metre

Ortamın pH değerlerini doğru tanımlamak için, en azından 0,1 hassasiyetinde elektrometrik pH metreler kullanılır.

II.7. Terazi

Laboratuvarlarda gerekli tartım işlerinde terazikullanılır. Uygun ağırlıklar ile 150 gr yüklemede en azından 0,1 gr hassasiyeti sağlayan teraziler kullanılır. 10 gramın altındaki yüklemelerdeki (2 gramdan daha az) tartım için 0.01 gram hassasiyete sahip analitik teraziler kullanılır. Laboratuvarda kullanılan terazilerin kaba, hassas tipleri vardır.

Hassas Terazi: 0,001-0,0001 g hassasiyete sahip olan örneklerin hassas tartımı için

kullanılan elektronik tartılardır.

Şekil II.4 Terazi Resmi

II.8. Dereceli Pipet, Otomatik Pipetler ve Pipet Kapları

Pipetler, üzerinde hacim taksimatı bulunan özel olarak yapılmış cam borulardan ibarettir. 0,1 ml'den 50 ml'ye kadar değişen çeşitli boylarda pipetler mevcuttur. Laboratuvarda kültür vasatlarının tüplere taksim olunmasında, çeşitli deneylerin yapılmasında farklı gayeler için kullanılır.

Pipet Kapları alüminyum veya paslanmaz çelikten yapılmış, takriben 40 cm uzunluğunda 5 ila 7,5 cm çapında silindir veya dikdörtgen kutulardır. Ambalaj kâğıdı veya toksik olmayan kâğıtlar da pipetlerin muhafazası için kullanılabilir. Pipet kapları olarak bakır ve bakırlı bileşiklerden oluşan kaplar, sülfatı kâğıtlar kullanılmaz.

Şekil II.5. Otomatik Pipet, Dereceli Pipet Ve Pipet Kabı Resmi

II.9. Buzdolabı

Çözelti, besiyeri, numune vb. sıvıları saklamak için, 1-4,4^{o}C sıcaklığı sağlayan buzdolabı kullanılır. Uçucu solventler, besin veya buzdolabında bozulacak ortamlar saklanmaz. Besiyerlerinin bir haftadan daha fazla buzdolabında saklanmasında özellikleri kaybolur, bozulmalar meydana gelir.

II.10. Termometre

Buzdolabı ve daha çok inkübatörlerin sıcaklığını kontrol etmek için, 0,5^{o} C aralıkla derecelenmiş metal veya cam termometreler kullanılır. 40 ^{o}C nin üstünde işlem gören inkübatörler için 0,1 ^{o}C li termometreler kullanılır.

II.11. Seyreltme Şişeleri, Deney Tüpleri

Şişe ve tüpler; dayanıklı camdan, tercihen borosilikatlı camdan yapılmış ve cam kapaklı olmalıdır. Şişe ve tüplerin kenarlarında, sterilizasyon sonunda toksik veya bakteriyostatik bileşikler meydana gelmemelidir. 100 ml ve işaretlenmiş şişe veya tüpler, bu amaç için kullanılır. Ayrıca istenilen hacimlerde ve uygun şekilde sterilize edilebilirse, toksik madde içermeyen plastik şişelerde kullanılabilir.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında gerek mikrop kültürlerinin hazırlanmalarında ve gerekse çeşitli testlerin yapılmalarında değişik büyüklüklerde **deney tüpleri** kullanılır. Bunlar ısıya dayanıklı camdan yapılmıştır. Laboratuarda tüpler daima temizlenmiş, ağızları pamukla kapatılmış ve steril edilmiş olarak muhafaza olunur ve ihtiyaç duyuldukça steril olarak kullanılır.

Durheim Tüpü: Çok küçük özel tüplerdir. Karbonhidratlı ortamlarda gaz çıkıp çıkmadığını kontrol etmek için kullanılır.

Petri Kutuları: İç içe geçen yuvarlak cam kapaktan ibarettir. Çeşitli büyüklükte olanları vardır. Yükseklikleri fazla değildir, özellikle katı kültür ortamları petri kutularına konarak daha geniş bir yüzey elde edilir. Böylece mikroorganizmaların izole edilmelerinde veya koloni şekillerinin taksim edilmesinde kullanılır. Ayrıca membran filtre tekniği için gevşek kapaklı 60x15 mm ebadında petri kutuları veya sıkı kapaklı 50x12 mm ebadında plastik petri kutuları kullanılır. Sterilize işlemleri ambalaj kâğıdı, paslanmaz çelik veya alüminyum kaplar da gerçekleştirilir ve saklanır.

II.12. Membran Filtre Süzme Takımı

Filtre hunisi ve membran konan yuva, paslanmaz çelik, cam veya otoklava dayanıklı plastikten yapılmış olanı kullanılır. Korozyona sebep olacak ve otoklava dayanıksız olanlar kullanılmaz. Standart laboratuvar filtrasyon ekipmanı ve ihtiyaç duyulan işlemler için kullanılır.

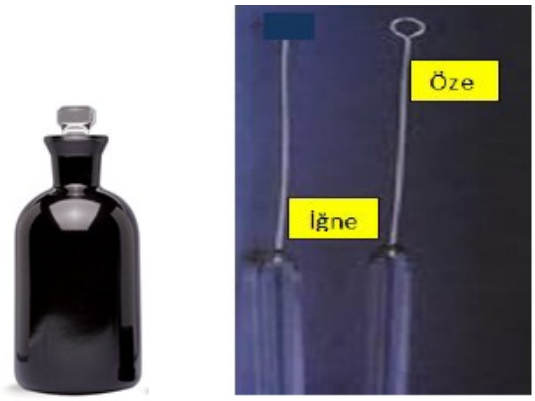
Şekil II.6. Membran Filtre Süzme Takımı

II.13. İğne, Öze

Mikroorganizmaları kültür ortamlarına ekme veya onların lam üzerindeki preperasyonlarını hazırlamak için, mikrop naklinde kullanılan, ince platin veya nikel alaşımlı telden yapılmış küçük aletlerdir. Uç kısmında üç milimetre çapında daire olana öze, düz olana da iğne ismi verilir. Öze ve iğne kullanmadan evvel ve sonra alevde kızıl dereceye kadar tutulmak suretiyle sterilize edilmelidir.

II.14. Numune Şişeleri

Numune alma şişesi olarak 100 ml, 250 mi veya 500 ml'lik renkli cam kapaklı, borosilikat veya ısıya dayanıklı camdan yapılmış olanlar kullanılır. Kuru sıcak hava ile sterilize edilir. Ayrıca sterilizasyona dayanıklı, uygun hacim ve şekillerde plastik kaplarda kullanılabilir.



Şekil II.7.Numune Şişesi, İğne Ve Öze Resmi

II.15. Su Banyosu

Su banyosu yuvarlak veya dört köşe, metalden yapılmış derinlikleri farklı olabilen bir kaptır. Elektrik veya hava gazı ile çalışır. Sıcaklık için termometre ayarlı termostat olmalıdır. Muhtelif amaçlar için kullanılır.

II.16. Mikroskop

Bakteriler çok küçük olduklarından çıplak gözle görülmezler. Görülebilmeleri için, çok fazla büyütülmeleri lazımdır. Bu büyütmeyi bize temin eden mikroskop, bakteriyoloji çalışmalarında en çok kullanılan bir aletidir. Genel anlamda mikroskop, küçük cisimleri büyüterek görünmelerini temin eden, merceklerden yapılmış bir alet olarak tarif edilebilir. Sözcük olarak Latince; **MİCROS** (=küçük) ve **SKOPEIN** (= Müşahede etme) kelimelerinin birleştirilmesinden meydana gelmiştir. 1674 yılında tek mercekli basit bir mikroskobu **Anton van Leeuwenhoek** bulmuş, günümüze kadar geliştirilerek ulaşa gelmiştir. Mikroskoplar, büyütmeleri kıstas olarak ele alındığında;

a) Işık (optik) Mikroskobu
b) Elektron Mikroskobu

olarak iki kategoride toplanırlar.

Işık mikroskobunda büyütme optik mercekler sistemi ile elde edilir. Başlıca çeşitleri şunlardır.

1) Aydınlık Saha Mikroskobu (Adi Işık Mikroskobu)
2) Karanlık Saha Mikroskobu

3) Ultraviyole Mikroskobu
4) Flüoresans Mikroskobu
5) Faz Kontrast Mikroskobu
6) Stero Mikroskobu

Elektron mikroskobu, isminden de anlaşılacağı üzere, büyütme ışık dalgaları yerine elektron şuaları ile sağlanır. Elektron mikroskopları;

1) Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)
2) Scanning Elektron Mikroskobu (SEM)

olarak iki çeşidi yaygın olarak kullanılır. Tablo II.1. de bazı mikroskop çeşitleri ve özellikleri gösterilmiştir.

Tablo II.1. Bazı Mikroskop Çeşitleri ve Özellikleri (Pelczar ve ark.).

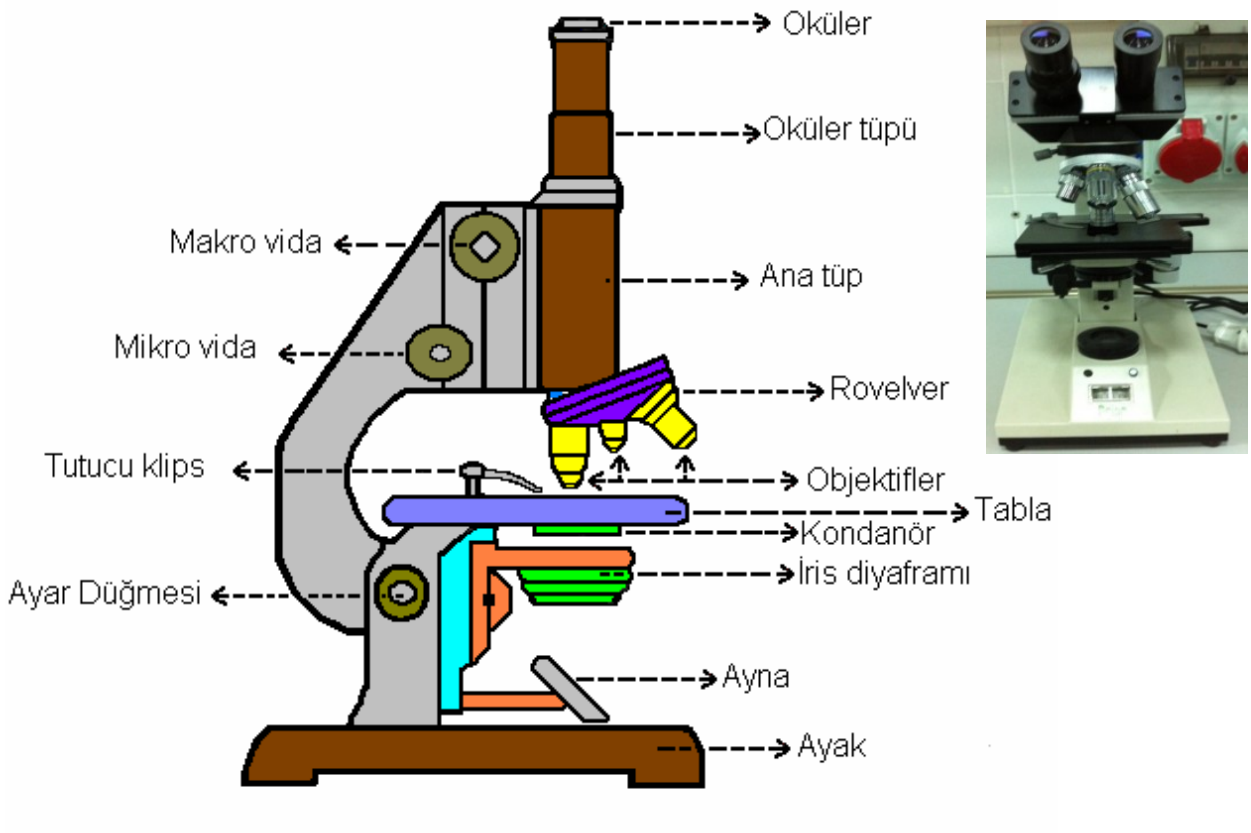
Mikroskop Tipi	**Maksimum Büyütme**	**İncelenen örneğin özelliği**	**Mikrobiyolojide Kullanım Alanı**
Adi Işık Mikroskobu	1000-2000	Boyamış veya boyanmamış örnekler	Bakteri, Mantar, Alg ve Protozoa'nın kabaca morfolojik özelliklerinin incelenmesi
Karanlık Alan Mikroskobu	1000-2000	Boyanmamış örnekler	Özelleşmiş morfoloji gösteren mikroorganizmaların canlı olarak incelenmesi
Faz-kontrast Mikroskobu	1000-2000	Boyanmamış örnekler	Hücrelerdeki (mikroorgazma) canlı yapıların incelenmesi
Elektron Mikroskobu	200.000 400.000	Cansız yapılar incelenir. İncelemeden önce örnekle özel bir işleme tabi tutulur.	Virüslerin ayrıca mikroorganizma ince yapısının incelenmesi

II.17. Işık Mikroskobu

Öğrenci tatbikatlarında laboratuvarlarda mikroorganizmaların incelenmesinde devamlı olarak kullanılan ve özel bir ışıklandırma sistemine ihtiyaç göstermeyen, yani güneş

ışığı veya elektrik ışığı ile çalışan mikroskoplardır. Mikroskobik çalışmalarda en iyi sonucu alabilmek için, mikroskop özellikleri, kullanım ve bakımını iyi bilmek gerekir.

Genel olarak ışık mikroskobu Şekil II.8. de görüleceği üzere, mekanik, aydınlatma ve optik olmak üzere üç ana kısımdan oluşur.



Şekil II.8. Işık Mikroskobunun Şematik Çizimi ve Kısımları

II.17.1. Mekanik Kısım

Bu kısım tüp, kol, tabla ve ayaklardan meydana gelir. Aydınlatma ve optik kısmın taşıyıcısıdır. tüp silindir şeklinde bir parça olup, üst ucunda oküleri alt ucunda objektifleri taşır. Kol mikroskobu tutmaya, tüp ile ayakları birbirine birleştirmeye ve tablayı tutmaya yarar. Tabla dört köşe veya yuvarlak olup ortası deliktir İncelenecek preperasyonlar tablaya konur ve delik kısım ışık kaynağından gelen ışınları geçirmeye yarar. Mikroskobun ayağı genelde U ve V şeklinde yapılmış olup, ağırdır.

II.17.2. Aydınlatma ve Ayarlama

Teferruatlı bir inceleme ve hassas bir çalışma için elektrik lambası ışığı iyi bir sonuç verir. Preparatı aydınlatmak ve iyi bir ışık ayarı kondansatör kullanılır. Kaba ayar düğmesi ile objektifler yukarı kaldırılır. İyi boyanmış bir preperat seçilerek kondansatör merkezi üzerine gelecek şekilde tablaya yerleştirilir ışık ayarı yapılır ve ince ayar düğmesi ile ayar yapılır.

II.17.3. Optik Kısım

Optik kısmı oküler ve objektifler oluşturur, oküler genel olarak 10x büyütmeli olurlar. 5, 7, 15 ve 20x tipleri de vardır. Objektifler genel olarak 4, 10, 40 ve 100x lük büyütme şeklindedirler. 10x objektifi, küçük büyütmeli objektif; 40x orta büyütmeli objektif, 100x ise; **İmmersiyon Objektifi** olarak adlandırılır.

II.17.4. Mikroskobun Kullanılması

Mikroskobik inceleme ilk küçük büyütmeli (10x) objektif ile başlar. Küçük büyütmeli objektif gözetleme pozisyonuna getirilir ve preparatın üzerine indirilir. Makro ayar düğmesi İle objektifler yükseltilerek görüntü odaklanır. Mikro ayar düğmesi ile de görüntü netleştirilir. Diyafram vasıtasıyla ışık şiddeti kontrol edilir.

Küçük büyütmeli objektiften revolverin döndürülmesi ile mikroskoptaki görüntü orta büyütmeli objektifte odaklanır. Şayet görüntü tam olarak görünmüyorsa, makro ayar ile objektifleri biraz aşağıya indirerek veya mikro ayar düğmesi ile oynayarak görüntünün netleşmesi sağlanır. Orta büyütmeli objektif lama kesinlikle dokundurulmaz. Mikroskopta görüntü işlemi net değilse, bu durum ayar düğmelerinin hızlı kullanılmasından kaynaklanmış olabilir. Baştaki işlemler tekrar edilerek net görüntü sağlanır.

İmmersiyon Objektifi (100x) kullanarak görüntüyü netleştirme işlemi, orta büyütmeli objektif ile yapılan işlemlerin tekrarıdır. Boyalı preparatların incelenmesi esnasında, rezolusyonu artırmak için preparat ile objektif arasına immersiyon yağı konur. İmmersiyon objektifi ile incelemede ilk önce objektif lamın üzerinde 1 cm kadar yükseltilir. İmmersiyon objektifini pozisyona getirmek için revolver döndürülür. Preparatın merkezine bir damla immersiyon yağı damlatılır. Objektif yağ ile temas edinceye kadar yavaşça indirilir. İmmersiyon objektiflerinin çalışma aralığı son derece küçük olduğundan ilk başlarda görüntünün netleştirilmesinde güçlük çekilebilir Görüntü bulunduğunda optimum ışıklandırma için diyafram aralığı ayarlanır.

II.17.5. Temizleme ve Muhafaza

Oküler ve objektifler özel mercek kağıtları ile temizlenir. Mikroskop kullanılmadan önce ve kullanıldıktan sonra temizlenmelidir. Bilhassa immersiyon objektifi üzerindeki yağ kalıntıları ve tabla üzerindeki döküntüleri temizlemek için **% 30 Ksilen + % 70 Etil alkol** çözeltisi kullanılır. Mikroskop temizlendikten sonra revolver küçük büyütmeli objektif yerine getirilir. Üzeri örtüsü ile örtülerek muhafazası içine yerleştirilir.

II.18. Cam Balon, Erlen, Lam, Lamel

Altı düz, orta kısmı yuvarlak, boyun kısmı uzun, balon şeklinde cam kaplardır. Isıya dayanıklı camdan imal edilmişlerdir. Laboratuvarlarda diğer cam malzeme gibi balonlarda temiz, steril ve ağzı kapalı olarak muhafaza olunur. Çeşitli kültür vasatlarının ve kimyasal bileşiklerin hazırlanmasında ve deneylerin yapılmasında kullanılırlar.

Erlen, ağzı dar, alt kısmı geniş ve düz olan koni şeklinde cam kaplardır. Bunlardan da balonların kullanıldıkları yerlerde istifade edilir.

Her türlü mikroskobik incelemenin yapılabilmesi için **lam ve lamel** kullanılır. Lam üzerine muayene maddesi konulan küçük dikdörtgen şeklinde cam parçasıdır. Lamel daha küçük ve ince kare şeklinde, lamelin üzerine kapatılmaya mahsus cam parçasıdır.

II.19. Numune Alma Kabı Ve Cihazı

Nehir, göl ve denizlerden bakteriyolojik numune alma da kullanılır. Ucunda kurşun ağırlık bulunan tel bir kafesten ibarettir. Kafesin içerisine steril bir numune şişesi yerleştirilir. Bir ipe bağlanmış mantar tıpa ile ağzı kapatılır. İstenilen derinlikle tıpanın ipi çekilerek şişenin dolması sağlanmak suretiyle numune alınır.

Ayrıca istenilen derinlikten otomatik numune alma cihazları geliştirilmiş olup, derin göl ve deniz ortamı çalışmalarında kullanılmaktadır.

BÖLÜM III: CAM EŞYANIN TEMİZLENMESİ VE STERİLİZASYON

III.1. Cam Eşyanın Temizlenmesi

Mikrobiyoloji Laboratuvarında kullanılan bütün cam eşyalar uygun bir deterjan ve sıcak su ile iyice yıkanır. Yıkamadan sonra sıcak su ile güzelce durulanır. Distile sudan geçirilir. Mekanik cam eşya yıkayıcıları kullanılıyorsa, ekipman paslanmaz çelikten veya toksik olmayan diğer maddelerden yapılmış olmalıdır. Mekanik cam eşya yıkayıcıların sutaşıma sistemlerinde bakır veya toksik özellikte olan metal borular kullanılmaz. Deneyde kullanılmış ve mikroorganizma ihtiva eden tüpler, önce otoklavda sterilize edilir ve daha sonra yıkama işlemine geçilmelidir.

III.2. Mikrobiyal Kontrolün Önemi

Bir mikroorganizmanın teşhisi ancak saf kültür halinde üretilmesi ile mümkündür. Bu da, besi yeri cam eşya ve diğer aletlerle aseptik şartlarda çalışarak diğer mikroorganizmaların karışmasını önlemekle olur. Steril bir ortam veya malzeme hiçbir canlı varlık ihtiva etmez. Bu amaçla sterilizasyon işlemi; mikrobiyoloji laboratuvar tekniğinin temel taşlarından birisidir. Uygun bir sterilizasyon yapmadan mikrobiyolojik çalışmalar yapılamaz. Mikroorganizma kontrolünü gerektiren temel sebepler,

- Hastalık yapıcı (patojen) mikroorganizmalarının bulaşmasını önlemek,
- İstenmeyen mikroorganizmaların büyümesini ve çevreye yayılıp bulaşma ve zarar vermesini önlemek,
- Mikroorganizmaların saf kültürlerini elde etmek,
- Mikroorganizmalarca materyallerin çürüme ve bozulmasını engellemek,

olarak gösterilir.

III.3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon

Canlı organizmaların tümünün kendine has bir yaşama şekli mevcuttur. Tabiattaki en küçük canlı grubunu oluşturan mikroorganizmalar, hayatlarını idame ettirebilmeleri için diğer bazı canlıların yok olmalarına sebep olurlar. Bundan dolayı mikroorganizmaların kontrol altına alınması gerekir.

Sterilizasyon, *mikroorganizmaların vejetatif ve spor şekillerinin öldürülmesi olayıdır.*

Diğer bir ifadeyle, mikrobiyal yaşamın tüm formlarının yok edilmesidir. "Hemen hemen steril" gibi bir ifade söylemez. Zira tek bir canlı organizma bile içeren bir obje veya çevre steril değildir. Dış ortamlardan istenmeyen mikroorganizmaların bulaşmasının önlenmesinde ve laboratuvar çalışmaları esnasında enfekte olan araç ve gereçlerin yeniden kullanılır hale getirilmesinde sterilizasyon işlemleri büyük önem taşır.

Dezenfeksiyon *ise,* ***bir ortamdaki patojen mikroorganizmaları öldürmek veya zararsız hale getirmek için yapılan işleme denir.*** Dezenfeksiyon esnasında diğer zararsız mikroorganizmalar da ölebilir. Fakat bu işlemin gayesi, hastalık yapıcı mikroorganizmaların zararsız hale getirilmesidir. Dezenfeksiyon için kullanılan maddelere "***dezenfekten madde*** " ismi verilir.

Dezenfektan maddelerin fazla sulandırarak, insan ve hayvan vücuduna uygulanmasına **antisepsi**, bu işlemde kullanılan maddelere ***antiseptik ma*****dde** adı verilir. Genel olarak mikroorganizmaları öldürebilen veya üremelerini durdurabilen maddelere **"antiseptik"** denir. Bakteriyosid, mikrobiyosid, bakteriyosidal, mikrobiyosidal, antibakterial, antimikrobial kelimelerinin hepsi aşağı yukarı aynı manayı taşıyıp, mikrop öldürücü anlamına gelmektedir. **Bakteriostatik, mikrobiostatik** kelimeleri ise, **mikroorganizmaların üremelerini durdurucu tesir anlamında kullanılmaktadır.** Bundan başka fungusid, virusid, sporosid terimleri, sırası ile funguslar, virüsler, sporlar üzerine etkiye sahip manalarına gelmektedirler.

Mikroorganizmaların çeşitli etkenlere karşı dayanırlıklarına rezistans ve hassasiyetlerine de dispozisyon denir.

III.4. Sterilizasyon Çeşitleri

Mikroorganizmaların kontrol altına alınmasının çeşitli şekilleri mevcuttur. Bu metotlar; sterilize edilecek malzemenin farklılıklarından, kullanılan fiziksel etkenlerden ve kimyasal maddelerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca kontrol altına alınacak mikroorganizma türlerinin sayısı, cinsi ve bulunduğu ortamlar bu çeşitliliği artırmaktadır.

Sterilize edilen eşyanın, mikroplar ile tekrar kirlenmemesi için, dış ortamla ilgisinin kesilmesi gerekir. Steril eşya açık kalırsa, havadan gelen tozların üzerindeki bakterilerle tekrar kontamine olur.

Tüp, balon gibi cam eşyaların ağzı sterilize işleminden önce pamuklanır. Bu işte kullanılan pamuk uzun elyaflı ve tozlu olmamalıdır. Bunun için yağı alınmış pamuk kullanılır. Pipetlerin, ağız kısmı pamuklanır ve teker teker yada birkaçı bir arada kağıtlara sarılarak sterilize edilebilir. Genellikle pipetler, cam yada madenden yapılmış silindir şeklindeki kutulara konur ve kutuların ağzı pamuk veya madeni bir kapakla kapatılarak sterilize edilir. Sterilizasyon işlemi, genel olarak, fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki yolla yapılır.

III.5. Fiziksel Metotlarla Sterilizasyon

Fiziksel metotla yapılan sterilizasyon işlemi genelde, üç grup altında toplamak mümkündür. Bunlar;

a) Isı ile sterilizasyon
b) İyonize eden ışınlarla yapılan sterilizasyon
c) Mekanik olarak yapılan sterilizasyon'dur.

III.5.1. Isı İle Sterilizasyon

Yapılması kolay ve ucuz olduğundan ve iyi sonuç verdiğinden sterilizasyon da en çok ısı kullanılır. Yalnız sterilize edilecek malzemenin ısıya dayanıklı olması lazımdır. Bu husus daima göz önünde bulundurulmalıdır.

III.5.2. Kuru Sıcak Sterilizasyon İşlemleri

a) Kızıl Dereceye Isıtma: Alevde tutulduğunda bozulmayan, iğne öze ve benzeri madeni aletleri, alevde kızıl dereceye gelinceye kadar ısıtılması işlemidir. Bu tür aletler soğuduktan sonra kullanılır.

b) Kuru Sıcak Hava Fırını (Pasteur Fırını) : Kuru sıcak hava ile sterilizasyonda özel yapılmış fırınlar kullanılır. Cam, balon, petri kutusu, pipet ve cam şişeler gibi cam eşyanın sterilizasyonu için en uygun metottur. Bu yolla sterilizasyon, 180 ^{o}C de 1 saat veya 160 ^{o}C de 2-2,5 saat fırını çalıştırmak suretiyle yapılır.

III.5.3. Nemli Isı İle Sterilizasyon İşlemleri

a) Kaynatma: 100 ^{o}C de 5-10 dakika kaynatmakla bakterilerin vegetatif şekilleri ve bazı

bakterilerin spor şekilleri ölürler. Fakat kaynatma işlemi, her zaman iyi bir sterilizasyon temin etmez. Genellikle cam eşya, pens makas ve benzeri madeni eşya, cam ve madeni kısımları olan şırıngalar kaynatılarak sterilize edilmesinde uygun metottur.

b) Buharla Sterilizasyon: İyi bir sterilizasyon için su baharı sıcak havadan daha elverişlidir. Zira buharın öldürücü etkisi daha fazladır ve eşyayı daha çabuk ısıtır. Ayrıca su buharının pamuk, yün, kumaş, kâğıt ve diğer kirli maddelere nüfusu daha kolaydır. Buharla sterilizasyon işlemi, bilhassa besi yerleri ve çözeltiler için çok uygundur. Ortam yeteri kadar buharlı olduğundan ısınma esnasında sterilize edilecek sıvılardan buharlaşma ile su kaybı da olamaz. Buharla sterilizasyon için en çok kullanılan alet otoklav'dır. Otoklavla sterilizasyon işlemi için 120 ^{o}C 'de 15-45 dakika yeterlidir.

c) Tindalizasyon: Yüksek sıcaklık derecelerinde bozulan maddeler için kullanılan bir metottur. Bu metotla, birkaç gün arka arkaya 56-100 ^{o}C sıcaklıkla ısıtmakla sterilizasyon işlemi yapılır. Isıtma süresi günde bir saat olmak üzere en az üç gündür. Bazı sporlu bakteriler için 8 gündür. Çok az kirli çözeltiler için iyi sonuç verir.

III.5.4. İyonize Eden Işınlarla Sterilizasyon

Suyun ve mikrobiyoloji de kullanılan bazı maddelerin sterilizasyonu için, iyonize eden ışınların etkisinden faydalanılır. Genellikle iyonize eden ışınların sterilizasyon işlemi mikropların haricinde ortama da etkilidir. İyonize ışınlarla sterilizasyon sentetik, polietilen gibi maddelerden yapılmış alet ve malzemelerin sterilizasyonunda yaygın olarak kullanılır. Her canlı hücrenin dış ortama karşı gösterdikleri hassasiyet farklıdır.

Radyasyonla sterilizasyon işleminde her hücre için farklı dozajlara ihtiyaç vardır. Farklı dozaj uygulanması bu metodun dezavantajını oluşturur. Dolayısıyla kullanılışı sınırlıdır.

Ultraviyole ışının dalga boyu x ışınlarınkinden daha uzun olup, 14-400 nm arasındadır. 300-400 nm dalga boyundaki ultraviyole ışınları orta derecede öldürücü etkiye sahiptir. Güneş ışığı da bu dalga boyundaki ultraviyole ışınlarına sahiptir. Ancak atmosferde tutuldukları için etkili olamazlar. Şayet 290 nm'nin altındaki ultraviyole ışınları atmosferde tutulmamış olsaydı yeryüzünde hayat olmazdı. İyonize eden ışınlar;

a) Elektromanyetik Işınlar

- Ultraviyole Işınları
- X Işınları
- Gama Işınları

b) Partiküler Işınlar

- Beta (katod) Işınları

ışınlar olarak incelenir.

III.5.5. Mekanik Olarak Yapılan Sterilizasyon

Mekanik yolla yapılan sterilizasyon, sterilize edilecek sıvıların değişik özelliklerdeki filtrelerden süzülmesi işlemidir. Özellikle ısıtılınca bozulan maddelerin ve serumların sterilizasyonu filtrasyon ile yapılmaktadır. Bu filtreler, filtrenin cinsine göre sınıflandırılırlar. Bunlar;

- Diyatome toprağı filtreler
- Porselen filtreler
- Asbest süzgeçli filtreler
- Cam tozu filtreler
- Kollodyum zarlı filtreler,

dir. Çevre Mikrobiyolojisi laboratuvarında ise, yaygın olarak **membran filtreler** kullanılır.

III.6. Kimyasal Metotlarla Yapılan Sterilizasyon

Muhtelif kimyasal maddeler kullanılarak gerçekleştirilir. Daha çok patojen mikroorganizmaların kontrol altına alınması için yapılan işlemdir. Dezenfektan ve antiseptik olarak kullanılan bazı kimyasal maddeler, kullanım alanları ve özellikleri Tablo III.1. de verilmiştir.

Tablo III.1. Dezenfektan Ve Antiseptik Olarak Kullanılan Bazı Kimyasal Maddeler, Kullanım Alanları Ve Özellikleri

DEZENFEKTAN MADDELER	KULLANIM ALANLARI VE ÖZELLİKLERİ
Antiformin	10 gr sodyum hipoklorit ve 7,5 gr NaOH 'in 10 ml sudaki çözeltisi olup, hasta atıklarının dezenfeksiyon işleminde kullanılır.
Benzoik Asit	%1'lik konsantrasyonu besinlerdeki bakteri ve mantar üremesine
Borik Asit	% 1-3 çözeltisi göz antiseptiği olarak, toz halinde yara üzerine
Etil Alkol	Sudaki % 60-70 lik çözeltisi deri antipseptiği olarak çok kullanılır. Deride lipid çözücü etkisiyle mikroorganizmaların mekanik olarak
Fenol	% 0.5 lik konsantrasyonu serum ve aşıların saklanmasında, % 3-5 lik çözeltisi yüzeylerin dezenfeksiyonunda kullanılır
Formalin	Formaldehitin sudaki % 37 lik çözeltisidir. Bakteri sporları dahil hemen hemen tüm mikroorganizmaları öldürdüğünden, bu madde
Hidrojen Peroksit	% 3 lük çözeltisi, yara antiseptiği olarak kullanılır.
İyot	Bakterisit ve fungusit etkiye sahiptir. % 10 alkollü sudaki çözeltisi
Kalsiyum Hipoklorit	İçme suyu dezenfeksiyonunda kullanılır.
Klor (Cl_2)	İçme sularının ve yüzme havuzlarının dezenfeksiyonunda kullanılan bir
Kloramin	Hidroklorik asidin, amid gruplarını içeren organik maddelerle oluşturduğu bir bileşik olup, %5 lik çözeltisi ellerin, madeni ve cam
Kloroform	Bir sıvıya % 0,25 oranında ilave edilen kloroform, sıvıda bakteri ve
Krezol	% 5 lik çözeltisi yüzey dezenfeksiyonunda kullanılır.
Potasyum	1/1000 lik çözeltisi deri antiseptiği olarak kullanılır.
Lizol	%3 lük çözeltisi deri antisepsisinde, laboratuvar alet ve çamaşırları ile laboratuvar ortamının dezenfeksiyonunda çok yaygın olarak
Sabun Ve Deterjanlar	Mekanik temizleme yapar. % 5 krezollu, % 5 lik fenollu ve % 3 lük hesoklorofenli sabunlarla deri antisepsisinde kullanılır. Daha
Sodyum Hipoklorit	%3-5 lik çözeltisi, çamaşır ve yer dezenfektanı olarak kullanılır.

BÖLÜM IV: MİKROORGANİZMALARIN ÜRETİLMESİ İÇİN BESİYERLERİ

IV.1. Giriş

Mikroorganizmaların üremesi, gelişmesi ve çoğalması için lüzumlu organik ve inorganik maddeleri, sentetik veya doğal olarak ihtiva eden ortamlara besiyeri denir. Besiyerleri genelde sentetik, doğal ve yarı sentetik olarak hazırlanır. Besiyerinde canlının üreme ve gelişmesi için;

- Besiyerinin elverişli olması,
- Besiyerinin kıvamı,
- Hidrojen iyonları yoğunluğu (pH),
- Oksidasyon-redüksiyon potansiyeli
- Kültürün yapılacağı ısının uygun olması

lazımdır. Bir besiyerinde üretilmiş mikroorganizmaların tümüne **kültür** adı verilir.

Her cins mikroorganizmanın kendine göre değişik besinlere ihtiyacı vardır. Patojen bakteriler, organik maddeleri sentez kabiliyetleri az olduğundan, üremeleri için kompleks besiyerlerine ihtiyaç gösterirler. Besiyerlerinde genelde azot kaynağı olarak, polipeptit, dipeptit ve amino asit ihtiva eden pepton kullanılır. Karbon kaynağı olarak, karbonhidrat gibi parçalanabilen organik bileşiklerden veya havadaki CO_2'ten yararlanırlar. Ayrıca Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, K^{+} gibi metal iyonları içermelidir. Besiyerlerinde canlıların üreyebilmeleri için diğer kompleks şartları tam olmasının yanında, fosfor, kükürt, sodyum gibi maddelere ve bazı amino asitlerin mevcudiyetine ihtiyaç gösterirler. Ticari olarak hazırlanmış sıvı besiyerleri de vardır.

VI.2. Besiyeri Çeşitleri

Genelde laboratuvarda hazırlanan ve kullanılan üç tip besiyeri vardır.

VI.2.1. Sıvı Besiyerleri

Bazı besiyerleri sıvıdır. Sıvı besiyerinde bulunan bir bakteri çoğalma özelliğine girer ve ortam şartlarına bağlı olarak uzunca bir zaman ölmeden kalırlar. Sıvı besiyerinde üreyen bir bakteri buradaki lüzumlu maddeleri kullanır. Ortama metabolizma ürünlerini bırakır. Besiyerinde daha önce bulunmayan bu ürünlerin gösterilmesi bakterinin teşhisine yarar

(indol, H_2S teşkili, karbonhidratlardan gaz ve asit teşkili gibi). Bakteri sıvı besiyerinde homojen bir bulanıklık meydana getirerek üreyebileceği gibi dipte çöküntü veya yüzeyde zar teşkil ederek de üreyebilir. Sıvı besiyerlerine **Buyyonlu Besiyerleri** adı da verilir.

VI.2.2. Katı Besiyerleri

Katı besiyerine ekilen bakteri ancak ekildiği yerde ürer ve koloni teşkil eder. Meydana gelen koloniler, bakterinin türüne göre özellik gösterirler. Katı besiyerine yaymak suretiyle bakteri hücrelerine ayırmak ve meydana getirdikleri kolonileri ayrı ayrı elde etmek (yani saf kültürlerini) mümkündür.
Katı besiyerine besin kıymetini değiştirmeyen bir madde ilavesiyle elde edilir. Bunun için en fazla **jeloz (agar)** kullanılır. Bundan dolayı katı besiyerlerine **jelozlu besiyerleri** de denir. Agar, **"*Agar agar*"** adındaki bir deniz yosunundan elde edilir. Jelatin ilavesi ile de katı besiyeri elde edilir.

VI.2.3. Özel Besiyerleri

Mikrobiyoloji laboratuvar çalışmalarında kullanılan birçok besiyeri vardır. Bazen benzer deneyler için bile farklı besiyerleri kullanılmaktadır. Çoğunlukla özel amaçlar için hazırlanıp kullanılan besiyerlerine **özel besiyerleri** adını veriyoruz. Mesela zenginleştirilmiş, tecrit, ettirici besiyerleri gibi.

VI.3. Besiyerlerinin Hazırlanması

Besiyerleri hazırlanırken aşağıdaki adımlara ve işlemlere dikkat edilir.

IV.3.1. Kullanılan Suyun Özellikleri

Kültür ortamlarının ve çözeltilerin hazırlanmasında yalnızca distile veya deiyonize su kullanılır. Distile sudaki toksite florür, fenol vb. maddelerden meydana gelebilir. Ayrıca toksitenin diğer kaynakları gümüş, kurşun ve tanımlanmamış muhtelif organik kompleksler olabilir. Bakiye klor ve kloraminler dahi, klorlu sudan temin edilmiş distile suda bulunabilir. Distile suda klor bileşikleri bulunduğu zaman, aynı eşdeğer oranda sodyum sülfit veya sodyum tiyosülfat ilavesiyle nötralize edilmelidir.

Distile su nütrient bulaşmalarından uzak olmalıdır. Şayet bu tür bulaşma varsa, distilasyon esnasında organiklerin tutulmasını temin eden karbon filtre kolonlarının değiştirilmesi gerekir.

Distile suyu, alglerin büyümesini önlemek için direkt güneş ışığından ve nütrient bulaşmasını engelleyecek şekilde plastik kaplarda saklama yapılır.

IV.3.2. Reaksiyon Uyumu

Kültür ortamının reaksiyonu, pH olarak ifade edilen hidrojen iyonu konsantrasyonu teriminde belirlenir. Sterilizasyon esnasında (pH'da) hidrojen iyonu konsatrasyonundaki artma veya azalma, sterilizasyonu yapan ferde bağlı olabilir. pH daki azalma 0,1 ile 0,2 bazen çift kuvvetli ortamlardan 0,3 olarak büyük olabilir. Fosfat gibi tamponlama tuzları hazırlanan ortamda mevcut olduğu zaman, pH değerlerindeki azalma ihmal edilebilir.

Hazırlanan besiyerlerinin ihtiyaç duyulan pH ayarlamaları pH metre ile yapılır. Uygulamada standart pH ölçümleri kullanılır. İstenilen pH'a ayarlamak için, NaOH çözeltisi kullanılır. Bilinen hacimdeki besiyerine, NaOH ile pH ayarlaması yapılır. Daha sonra tüm karışımın pH kontrol edilir ve uygun pH' a kadar ayarlama uzatılır.

Ticari hazır besi maddelerinin her birinin, hazırlanırken ihtiyaç duyulan son pH değerleri verilmiştir. Bu tür besiyerleri hassas tartım ve prosedürüne uygun hazırlandığı zaman pH ayarı gerekmeyebilir.

IV.3.3. Besiyerlerinin Sterilizasyonu

Besiyerleri hazırlandıktan sonra, derhal kültür kaplarına (tüp ve şişelere) dağıtılır ve iki saat içinde sterilize edilir. Sterilize edilmemiş besi maddeleri saklanmaz. Bütün besi maddeleri, özelliklerine göre bazıları (MF Koliform broth vb. gibi) hariç tutulursa otoklavda 121 ^{o}C de 15 dakika sıcaklıkta 1 atmosfer basınç altında tutularak sterilize edilir. Basınç sıfıra düştüğü zaman otoklavdan ortamları hemen uzaklaştırmak ve çabucak soğutmak gerekir. Besiyerlerinin ısınmaya maruz kalması vasıtasıyla bozulmasını önlenmelidir. Küçük kaplarda az miktarlardaki besi maddeleri sterilizasyon esnasında üniform ısınmayı ve çabuk soğumayı temin eder. Şekerli besi maddeleri 121 ^{o}C de 12 ila 15 dakika için sterilize edilmelidir. Şekerli besi maddelerinin sterilizasyon esnasında maruz kaldıkları

maksimum zaman 45 dakikayı geçmemelidir.

Otoklavın açma-kapama zaman aralığı da çok kısa olmalıdır. İhtiyaç duyulan toplam ısınma zamanını 45 dakikayı geçmemesi için besiyerlerinin sterilizasyonunda ön ısınmalı çift duvarlı otoklav kullanılması tercih edilmelidir.

IV.3.4. Besiyerlerinin Saklanması

Toz halinde dehidrat besiyerleri, karanlıkta, düşük nemli atmosferde ağızları iyice kapatılmış şişelerde 30 ^{o}C nin altındaki sıcaklıklarda saklanır. Renkleri değişmiş, serbest hareket özelliklerini yitirmiş veya kekleşmiş besi maddeleri kullanılmaz. Dehidrat besi maddelerini küçük miktarlardaki ambalaj ile satın alınır. Bu tür besiyerlerinin ağzı açıldıktan sonra en fazla 6 ay kullanılabilmektedir. Stok besi maddeleri optimum dozajlarda da olsa, sodyum asit, safra tuzları veya antibiotik türevleri, sülfür ihtiva eden amino asitler gibi seçici çözeltiler ihtiva etmelidir.

Hazırlanan kültür ortamları, güneş ışığının direkt temas etmesinden ve aşırı buharlaşmadan korumak için uygun ortamlarda saklanmalıdır. Tüplerdeki sıvı besiyerleri, buzdolabında veya düşük sıcaklıklarda saklandığı zaman, deneyde kullanılmadan önce 35 ^{o}C inkübasyonda kontrol testine tabi tutulmalıdır. 25°C lik sıcaklıkta da deney tüpleri saklanabilir. Fakat bu durumda buharlaşma çabuk ilerlediğinden, tüp içindeki besiyeri karışımındaki konsantrasyon değişebilir. 1 ml 'yi aşan buharlaşma olduğunda tüplerdeki besiyerleri deneyde kullanılmaz.

Besiyerleri bir haftadan daha az kullanılabilecek şekilde hazırlanır. Mamafih, besiyeri vida-kapaklı tüplerde hazırlandığı zaman, üç ay içinde kullanılabilir. Besi yerlerinin saklanması ile ilgili olarak ayrıntılı özellikler Tablo IV.1 de verilmiştir.

Tablo IV.1. Hazırlanan Besi Yerlerinin Saklanma Süreleri

Besiyeri	Ortam	Saklama Süresi
MF Broth	Sıkı vida kapaklı şişelerde +4 oC de	96 saat
MF Agar	Sıkı kapaklı petrilerde +4 oC de	2 hafta
Agar, Broth	Pamuk tıkaçlı tüplerde +4 oC de	1 hafta
Agar, Broth,	Sıkı vida kapaklı tüplerde +4 oC de	3 ay

Agar	Plastik torba ile kaplı sıkıştırılmamış petri kutularında +4ºCde	2 hafta
Büyük hacimli Agar	Sıkı vida kapaklı şişe tüplerde +4 oC de	3 ay

IV.4. Seyreltme Suyu

Seyreltme suyu, çok yoğun mikroorganizma topluluklarını, deney şartlarındaki oranlara düşürmek için, seyreltme amacı ile kullanılan özel suya denir.

IV. 4.1. Seyreltme Suyu Hazırlanışı

IV. 4.1.1. Tamponlu Su

Stok tamponlu su olarak hazırlanır. İlk önce, 34,0 gram Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) 500 ml distile su içinde çözündürülür. pH'sını 7,2 ± 0,5'e 1 N NaOH ile ayarlayarak distile su ile bir litreye tamamlanır.

1,25 ml stok fosfat tampon çözeltisiyle 5.0 ml magnezyum klorür çözeltisi, (81,1 gram $MgCl_2$ $6H_2O$ /litre distile su) bir litre distile suya ilave edilerek hazırlanır.

99±2,0 ml seyreltme şişelerine veya 9,0 ± 0,2 tüplere konarak otoklavda 15 dakika sterilize edildikten sonra buzdolabında da kullanılmak üzere saklanır.

IV. 4.1.2. Peptonlu Su

İlk önce distile su ile peptonun % 10 'luk çözeltisi hazırlanır. Nihai olarak % 0,1 çözeltiyi sağlayacak şekilde seyreltilir. Çözeltinin son pH sı 6,8 olmalıdır.

99,0 ± 2,0 ml seyreltme şişelerine veya 9,0±0,2 ml tüplere konarak otoklavda 15 dakika sterilize edildikten sonra kullanılmak üzere saklanır.

Hazırlanan seyreltme sularını oda sıcaklığında bırakıldıkları zaman bakteri çoğalması meydana gelmemelidir.

Şekil V.1. Fiziksel Yolla Yapılan Tespit İşlemi

V.3. Boyalar Ve Boyama Metotları

Mikrobiyolojide kullanılan boyalar, tabii ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılırlar. Önceleri

çok kullanılan, şimdi yalnız birkaç tanesinden istifade edilen tabii boyalar, daha çok doku boyamalarında kullanılır. Bugün daha çok suni boyalar kullanılmaktadır.
Boyalar, asit, bazik ve nötr olmak üzere üç gruba ayrılabilir. Asit boyalar asit özellikte, bazik boyalar baz özellikte, nötr boyalar nötr özellikteki boyalardır. Asit boyalar mikroorganizmaların asidik kısımlarını, bazik boyalar bazik kısımlarını, nötr boyalar ise nötr kısımlarının boyanmasını sağlarlar. Çünkü asit boyalar negatif yüklü anyondan, baz olanlar pozitif yüklü katyondan teşekkül etmişlerdir.

Asit boyaların renkli maddeleri asit kökte bulunur ve renksiz baz kısmı vardır. Bazik boyaların renkli maddeleri baz kısmındadır ve renksiz asit kökleri vardır. Nötr boyaların hem bazik hem de asitik kısımları renkli madde ihtiva eder.

Mikrobiyoloji laboratuarında kullanılan muhtelif boyama metotları mevcuttur. Bu metotları, basit ve kombine olmak üzere iki kategoride toplamak mümkündür.

V.3.1. Basit Boyama Metodu

Tek bir boya ile yapılan boyama işlemine basit boyama denir. Basit boyamada en çok, bazik fuksin, metilen mavisi malaşit yeşili bu amaçla kullanılır.

V.3.2. Kombine Boyama Metodu

Birden fazla boya maddesi kullanılarak yapılan boyama metodudur. Preparasyonun tespit işleminden sonra, bazik, asit ve nötr boyalarla ayrı ayrı yapılan boyama işlemi olarak da bilinir. Örneğin; Gram boyama, Ziehl-Neelsen boyama metotları gibi.

V.4. Gram Boyama Metodu

1884 yılında Danimarka'lı bilgin **GRAM** ilk defa **Antrax basili** üzerine metilen violet ile boyandıktan sonra, iyot çözeltisiyle muamele neticesinde, bakterilerin boyayı tuttuğunu ve yıkamakla rengin giderilmediğini gözlemiştir. GRAM bu metodu diğer bakterilere de uyguladığında, bunların bazılarının alkolle yıkandıktan sonra, bu rengi kaybederek eski saydam halini aldığını görmüştür. Böylece bakterilerin metilen violeti tutup, tutmadıklarına göre, iki gruba ayrılabileceklerini ortaya koymuştur. Metilen violeti tutan bakterilere **Gram (+),** tutmayan bakterilere **Gram (-)** adını vermiştir.

Şayet gr (+) ve gr (-) bakteriler bir arada incelemek gerekirse, bu takdirde alkolle yıkanmadan sonra, diğer boya tatbik edilerek Gr (-) olanları da boyamak mümkündür. Tatbik edilen bu ikinci boyaya Karşıt Boya adı verilmektedir. Gram (+) ile Gram (-) bakteriler arasında, boyanmadan başka tespit edilmiş olan diğer farklar Tablo V.1. de belirtilmiştir.

Tablo V.1. Bakterilerin Gram Boya Özellikleri

GRAM (+) BAKTERİLER	GRAM (-) BAKTERİLER
Magnezyum ribo nükleat ihtiva eder.	Magnezyum ribonükleat ihtiva etmezler.
% 1 KOH da erimezler.	% 1 KOH da erirler.
Kristal violet boyasna çok hassastırlar	Kristal violet boyasına az hassastırlar.
Ekzotoksine sahiptir.	Endo toksine sahiptirler
Spor yapan bakterilerdir.	Spor yapmayan bakterilerdir.
pH 2-3	pH 4-5

Bakteriler Gr (+) lik veya Gr (-) lik özellikleri bazı hallerde değiştiği görülmüştür. Gerçekten, boyama sırasında bakterilerin alkole uzun zaman muamele edilmesi, bakterinin yaşı, ortamın bileşimi ve pH 'sı da bu hususlarda etkili olmaktadır.

Gram (-) bakterilerin hücre zarı Gr (+) olanlara nazaran daha fazla miktarda Lipid ihtiva ettiklerinden, bunun alkolle erimesi sonucunda boya-iyod kompleksinin dışarı çıkması mümkün olmamaktadır. Gr (-) ve Gr (+) bakterilerin protoplazmalarında bulunan asidik tabiattaki maddelerle, boyanın bazik grupları ve bazik tabiattaki maddelerle boyanın asidik grupları arasında bir birleşme olmaktadır. Hücre içerisine giren iyod çözeltisi ise, protein-boya kompleksine dahil olmakta ve boyanın proteinden ayrılmasını sağlamaktadır.

Renk giderme safhasında kullanılan % 95 lik alkol gram pozitif bakterilerde hücre zarının suyunu almak suretiyle kuruttuğundan boya iyod komplekslerinin dışarı çıkmasına mani olmaktadır.

V.4.1. Gram Boyamada Dikkat Edilecek Hususlar

Gram boyamada renk alma safhası en kritik safhadır. Çok şiddetli bir renk alma işlemi kullanırsak, tüm bakteriler birinci boyayı kaybedecekler, sonuçta hepsi Gr (-) miş gibi görüneceklerdir. Diğer taraftan çok hafif bir renk alma işlemi uygularsak, Gr (-) bakteriler

bile Gr (+) gibi görüleceklerdir. Renk alma işlemi gerçekte tarif ve açıklamayla yapılacak bir işlem olmayıp deneyimlerle en ideal süre ayarlanmalıdır. Gram boyamada diğer önemli bir faktör de kültürün yaşıdır.

BÖLÜM VI: MİKROBİYOLOJİK PARAMETRELER İÇİN NUMUNE ALMA VE KORUMA

VI.1. Numune Kapları

Mikrobiyolojik incelemeler için numuneler; iyice temizlenmiş, dikkatlice durulanmış ve nihayet tekrar distile sudan geçirilmiş ve özelliklerine uygun olarak sterilize edilmiş şişeler ile alınır.

Bazı uygulamalarda numuneler, sterilize edilebilen plastik kaplarla da alınabilir.

VI.2. Deklorlama

Bakiye klor ve diğer halojenleri ihtiva eden sulardan numune alımlarında özellikleri belirtilen numune şişelerine broth ihtiva etmeyen indirgeme unsurları ilave edilir.

Sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3$) yeterli bir deklorlama unsurudur. Numune alımı ve nakledilmesi esnasında bakteriyosidal etkinin devamını sağlayan halojen artıkların hepsini nötralize eder. Bu işlemden sonra numune alma zamanında suyun gerçek mikrobiyal bileşenlerini daha doğru olarak görmek mümkündür.

Klorlanmış atıksu deşarjlarından numune almak için, temiz numune şişesine, numunede 100 mg/litre konsantrasyonu verecek şekilde yeterli $Na_2S_2O_3$'ü ilave edilir. 120 ml'lik şişede % 10'luk $Na_2S_2O_3$ çözeltisinden 0,1 ml, takriben 5 mg/L artık klor ihtiva eden numuneyi nötralize eder.

İçme suyu numunelerinde, 120 ml'lik şişelere % 3'lük $Na_2S_2O_3$ çözeltisinden 0,1 ml yeterli olabilir. Bu numunede 18 mg/lt nihai konsantrasyonu verir ve 5 mg/lt artık kloru nötralize eder.

Çok yüksek konsantrasyonlarda klor ile ani dezenfekte edilmiş numunelerde, 100 mg/ lt konsantrasyon olacak şekilde uygun deklorlama unsuru ilave edilir. Numune şişelerinin kapakları kuru yada nemli sıcak hava ile sterilize edilir. Numune alımlarında, ticari olarak satılabilen ve içerisinde $Na_2S_2O_3$ bulunan sterilize edilmiş plastik şişelerde kullanılabilir.

Su numuneleri yüksek miktarda bakır veya çinko ihtiva ediyorsa yahut yüksek oranlarda ağır metal ihtiva eden atıksu numuneleri toplandıkları numune şişelerinde metal toksitesine maruz kalırlar. Bu durum özellikle bazı numunelerin laboratuara dört saatten daha uzun sürede nakledildiği zaman önemlidir. Ağır metal ihtiva eden su numunelerine, disodyum tuzu, etilen di amin tetra asetik asit (EDTA)'ten 372 mg/lt ilave edilir. EDTA çözeltisi'nin pH'sı kullanımdan önce 6,5'a ayarlanır. Sterilizasyondan önce numune şişesine EDTA'dan bir spatül miktarı ilave edilebilir. Ağır metal ihtiva eden klorlanmış numunelere hem EDTA hemde $Na_2S_2O_3$ birlikte ilave edilir.

VI.3. Numune Alma İşlemleri

Numunenin incelemeden önce, çalkalamayla iyi bir karışımının sağlanması için, 120

ml'lik numune şişelerinde numune alırken üstten (en azından 2,5 cm) bir boşluk bırakılmalıdır. Numune alınırken ve alındıktan sonra laboratuvara taşırken veya laboratuvardaki çalışmalar esnasında, bulaşmalardan korunmak için aseptik tekniklere uyulmalıdır.

Numune şişelerinin ağzının, numune alıncaya kadar kapalı tutulmasına dikkat edilir. Numune almadan önce şişenin ağzındaki pamuk ve kağıt atılır. çalkalamadan numune şişesi doldurulur. Numune şişesinin kapağındaki kağıt kabı uzaklaştırılarak, şişe kapatılır. Bu arada şişe kapağının yüzeyine elle temas edilmemesine dikkat edilir. Kapağın çıkması, vb. durumların emniyeti açısından şişe ile kapak birbirine bantlanır.

VI.3.1. İçme Su Şebekelerinden Numune Alma

Su numunesi dağıtım sisteminden alınacaksa; örneğin, sarnıç veya deposu olmayan, direkt olarak ana servis borusundan temin edilen bir musluk seçilir. Musluk tamamen açılır. 2 veya 3 dakika veya borudaki suyu boşaltıncaya kadar su akıtılır. Suyu sıçratmadan şişe doldurulur. Şayet musluğun temizliğinden şüphe ediliyorsa, (100 mg NaOH /lt) temin edilen sodyum hipoklorür çözeltisiyle numune almadan önce musluk işleme tabi tutulduktan 2 ila 3 dakika sonra su numunesi alınır. Su sızdıran musluklardan numune alınmaz. Numune alma süresi suyun sıcaklığına bağlı olarak 2 ila 3 dakikayı geçmemelidir.

Musluk iyice kapatılarak, musluğun ağzı alkollü bir pamukla veya bir çakmak yardımıyla 3 dakika yakılır. 2-3 dakika soğuması beklendikten sonra, musluk yavaşça açılarak yukarıda anlatılan özelliklere uygun olarak numune alınır.

İçme suyu değerlendirmelerinde, numuneler dağıtım sisteminin başlangıç ve bitiş yerlerinden her ay sistematik olarak alınmalıdır. Dağıtım sistemlerindeki numune alma istasyonları, sisteme bulaşmaları ve sistemin bakteriyolojik kalitesini göstermesi bakımından dikkatlice seçilir.

Seçilen numune istasyonları; halkın toplu halde bulunduğu (örneğin, polis ve itfaiye merkezleri, yönetim binaları, okullar, otobüs ve tren istasyonları, hava alanları ve parklar

gibi) yerler, ticari kuruluşlar (lokantalar, gaz servisleri, çarşılar, endüstriyel fabrikalar v.b.) ve meskenlerdedir (evler, oteller, apartmanlar ve köy tipi kompleksler). Ayrıca dağıtım sisteminde özel numune alma yerleri de olmalıdır. Bölgesel sağlık kuruluşlarına danışarak da numune alma programları yapılabilir.

VI.3.2. Su Temin Edilen Yerlerden Numune Alma

Direkt olarak, nehir, akarsu, göl, rezervuar, kaynak veya yüzeysel sulardan numune alınır. Alınan numune su kaynağını temsil edici özellikte olmalıdır.

a) Akarsulardan Numune Alma

Nehir, dere, çay vb. akarsulardan numune alınmak istendiği zaman, numune şişesi 0,3 m derinliğe kadar dik olarak batırılır. Akıntıya paralel yönde şişe yatay konuma getirilerek doldurulur.

b) Göl ve Rezervuarlardan Numune Alma

Göl yüzeyinden veya düzgün su birikintileri, rezervuar ve su depolarından numune alınmak istendiğinde, numune şişesi dik olarak suya daldırılır. 30 cm su altında yüzeye doğru çevrilerek doldurulmak suretiyle numune alınır.

c) Kuyulardan Numune Alma

Kuyuda motor veya tulumba varsa bunlar yardımıyla alınır. Kuyuya inen borudaki su tamamen boşaldıktan sonra numune alma işlemi yapılır. Kuyu merdivenli ise, merdivenle inilerek alınır veya steril numune şişesine bir ip bağlanmak suretiyle de alınabilir.

VI.3.3. Yüzeysel Sulardan Numune Alma

Akarsuların bakteriyolojik özellikleri bakımından, kısa veya uzun süreli çalışmalarda, çalışılacak alan tanımlanır ve akarsu özelliklerini yansıtacak istasyonlar seçilir. Seçilen alanda, akarsuya endüstri ve şehir kanalizasyon atıklarının deşarj noktaları tespit edilir. Deşarj edilen noktalarda kirli suyun akarsu bulanıklığına % 10 kadar tesir ettiği durumlarda; deşarj öncesi ve sonrası, akış hızına bağlı olarak numune alma istasyonları tespit edilir. Ayrıca, kirlenmenin tamamen kaybolduğu tahmini yapılan yerlerden de

numune alma istasyonu seçilmelidir. Akarsu üzerinden numuneler bir bot yardımıyla veya köprülerden ve kritik çalışma alanları olmayan kısımlardan alınabilir. Numune alma sıklığı akarsuyun ve sudaki şartların durumuna göre seçilir. Akarsu göl kalitesini izlemek için, kritik yerlere de devamlı numune alma istasyonları kurulması faydalıdır.

VI.3.4. Yüzme Amaçlı Kullanılan Sulardan Numune Alma

Yüzme ve sportif amaçlı havuz ve sahiller ile banyo sularından numune almak için seçilen istasyonlar, bu bölgenin tamamı içinde su kalitesini tanımlamaya cevap verecek özelikte olmalıdır. Yüzme alanlarında numuneler, takriben 1 m derinlikten, 10-20 metreye kadar açık kısımlardan, sabah ve öğleden sonra alınır. Ayrıca denizlerde, met-cezir olaylarını dikkate alarak numune alınmalıdır.

Banyo suları ve yüzme havuzlarından numune alma sıklığı, banyo ve havuzların kullanımına göre seçilmelidir. Genel olarak banyo ve havuzlardan sabah ve öğleden sonra numune alınması uygundur.

VI.3.5. Sediment ve Çamurlardan Numune Alma

Su temininde kullanılan rezervuar, göl ve nehirler ile rekreasyon amacıyla kullanılan kıyı sularında ve balık çiftliklerinde, sedimentte bakteriyolojik açıdan önemlidir.

Sedimentler, bakteriyolojik değişikliklerin bir göstergesi olarak da kabul edilebilir.

VI.4. Numune Alma Sıklığı

Rezervuar, göl, akarsu ile dağıtım sistemlerinden bakteriyolojik numune alma sıklığı, özel durum ve şartlara bağlı olarak seçilir. Ayrıca sıcaklık değişimleri de numune alma sıklığı için önemli bir etkendir.

VI.5. Numunelerin Nakli Ve Korunması

Alınan numuneler, tercihen buzluklu bir kap içerisinde (özellikle hava sıcaklığı 13 ^{o}C den fazla ise) en kısa zamanda laboratuarda incelemeye alınmalıdır. Aksi halde bakteri sayı

ve tiplerinde değişmeler olacaktır. Uzun süre inceleme yapılmayacaksa, +4 ^{o}C de buzdolabında saklanabilir. Numune nakilleri 2 saatten fazla sürecek olursa, +4 ^{o}C yi geçmeyecek sıcaklıklar sağlanarak yapılmalıdır. Buzdolabındaki numuneler en fazla 2 gün içinde incelemeye alınmalıdır.