

Bölüm 8

BAKTERİLERİN BOYANMASI VE BOYAMA METOTLARI

Mikroorganizmalar doğada çok yaygın olarak bulunurlar. Onbinlerce farklı cins ve türdeki mikroorganizmanın; buldukları yerler, yaşam fonksiyonları, üreme ve çoğalma özellikleri ve birbirleri ile olan ilişkileri büyük farklılıklar gösterir.

Mikroorganizmaların bazıları doğrudan veya dolaylı olarak insan yaşamına fayda sağlarken, bazıları zararlı hatta öldürücü özellik gösterirler. Bunun yanında aynı mikroorganizma belirli koşullar altında yararlı iken, koşulların değişmesi ile zararlı hale gelebilir. Ya da aynı mikroorganizma bazı özel kullanım koşullarında yararlı iken, bir gıdada bulunması bozulmalara yol açabilir. Örneğin, sirke üretiminde kullanılan asetik asit bakterileri şarap üretiminde büyük tehlikedir, biyogaz üretiminde kullanılan metan bakterilerinin, baklagillerde azot tesbit eden *Rhizobium* bakterilerinin, biyolojik kontrolde kullanılan *Bacillus* bakterilerinin gıda maddelerinde bulunması istenmez.

Benzer şekilde *Escherichia coli*, mikrobiyolojik çalışmalarda ve özellikle genetik araştırmalarda en çok kullanılan bakteri iken, bunun hiçbir gıda maddesinde, hatta sulama ve kullanma suları ile plajlarda bulunmasına izin verilmez. Çünkü *E.coli* doğada sadece sıcakkanlı hayvanların ve insanların bağırsaklarında bulunur. Gıda, su, toprak gibi materyallerde *E.coli* bulunması doğrudan doğruya o materyale *E. coli* bulaştığının veya lağım suyu ile temasta olduğunun kanıtıdır. Bununla beraber, yine fekal (dışkı) kaynaklı olan fekal *Streptococcus* cinsine ait bazı türler bugün özel peynirlerin yapılmasında kullanılmaktadır.

8.1. Bakteri Morfolojisi

Bakteri morfolojisi; makroskobik ve mikroskobik morfoloji olarak ikiye ayrılır. Makroskobik morfoloji bir anlamda koloni morfolojisidir. Ancak makroskobik morfoloji kavramı içinde, bakterilerin katı ve sıvı besiyerindeki üreme şekilleri, oluşturdukları yapılar ve meydana getirdikleri değişimler de incelenebilmektedir.

8.1.1. Makroskobik (koloni) morfoloji

Koloni, bir bakteri hücrelerinin (ya da sporunun) katı bir besiyerinde düştüğü herhangi bir noktada çok sayıda bölünmeler geçirerek oluşturduğu ve çıplak gözle görülebilen hücre topluluğu şeklinde bir yapı olarak tarif edilebilir.

Tek bir bakteri hücresi agarlı besiyerinin yüzeyinde logaritmik olarak üremeye başlayınca binlerce organizma meydana gelir ve bunlar gözle görülebilir hale ulaştıktan sonra koloni olarak adlandırılır. Her bir bakteri ve fungal organizma karakteristik koloni şekline sahiptir.

Bir kolonide yalnızca bir bakteri türü olduğundan, bir koloni bir hücreye eşdeğer sayılabilir. Bir bakteri farklı besiyerlerinde farklı koloni morfolojisi oluşturabilir.

Saf kültür olarak izole edilmiş klonları (tek bir birey) tanımlamak için koloni dış görünüşlerinden yararlanarak farklı koloni tiplerini belirlemek, mikrobiyolojik çalışmanın başlangıcını oluşturmaktadır. Bunlara ek olarak koloni özelliklerinin farklı kişilerin de anlayacağı ve yorumlayacağı şekilde tanımlanması gerekir. Buna göre koloni özellikleri şu şekilde tanımlanabilir:

1. Şekli ve büyüklüğü: yuvarlak, düzensiz ve ince.
2. Kenarları: düz, dalgalı, loplu.
3. Yüksekliği: konveks, düz, kabarık, çıkıntılı.
4. Rengi: renkli, opak, şeffaf, parlak, donuk veya mat.
5. Yapısı: nemli, mukozlu, kuru.

8.1.2. Mikroskobik morfoloji

Mikroskopik tanımlamalar özellikle klinik mikrobiyolojide oldukça önemli iken, gıda sanayiinde günlük analiz yapan laboratuvarlarda aynı öneme sahip değildir. Bunun başlıca nedeni, klinik mikrobiyolojide materyalin genellikle "Kanlı Agar" gibi zengin bir besiyerine sürülmesi ve izolatin bu şekilde genel bir besiyerinden elde edilmesi, buna karşın gıda mikrobiyolojisinde izolatin genellikle selektif bir besiyerinden elde edilmesidir. Örneğin Violet Red Bile Agar besiyerinden elde edilen tipik koloni zaten gram-negatif çubuk şeklinde bir bakteri olacaktır. Plate Count Agar'da gelişen bakterinin tanımlanması ise ancak çok özel koşullarda yapılır. Gıda mikrobiyolojisi araştırma laboratuvarlarında mikroskopik tanımlamanın yeri vardır.

8.2. Bakterilerin Boyanması

Bakteriler genelde şeffaftır, bu nedenle mikroskopta direkt olarak incelenmeleri güçtür. Bakterileri tanımlama yollarından birisi onları boyamaktır. Mikroorganizmaların boyanması ile mikroskopta onların iç organelleri belirgin hale gelmektedir. Dolayısıyla bakteriler daha iyi incelenmekte, morfoloji ve histolojileri hakkında daha iyi bilgi edinilmektedir. Yani boyama ile bakterilerin identifikasyonları da kolaylaşmaktadır. Bu nedenle biyolojik boyalar ile boyama metotlarının mikrobiyolojide önemli bir yeri vardır.

Bakteriler, çeşitli boyalara ve boyama metotlarına karşı gösterdikleri davranışlarına (şekilleri, büyüklükleri, diziliş şekilleri, belirli hücre organellerinin varlığı ve yapısı) göre gram-pozitif, gram-negatif ve aside dirençli bakteriler (*Mycobacterium* cinsi) olmak üzere gruplara ayrılabilirler.

Ancak bakteri hücreleri boyanmadan da **basit preparat** hazırlamak suretiyle incelenebilir. Basit preparat canlı hücrelerin incelenmesine olanak tanır. Böylece;

- Hareketlilik ve ikiye bölünme gibi hücre aktiviteleri gözlemlenebilir.
- Bakterilerin boyanması sırasında uygulanan ısıyla tespit işlemi (**fiksasyon**) ve kullanılan boyalar, hücre özelliklerinin değişimine neden olduğundan, hücrelerin doğal şekil ve boyutlarının incelenmesi amacıyla basit preparat hazırlanması daha uygun olmaktadır.

8.2.1. Boyalar

Özellikle kullanılan biyolojik boyaların içerikleri ve mikroorganizmaların boyanma metotları mikrobiyolojide önemli bir aşama olarak kabul edilmektedir.

Boya, bir benzen halkasına (C₆H₆) bağlı kromofor ve oksokrom grupları taşıyan organik bir bileşik olarak tanımlanabilir. Benzen halkasındaki H atomları yerine farklı element veya grupların girmesiyle değişik boyalar oluşmaktadır. Kromofor grup molekülün renk özelliğini verir, ancak ortamda oksokrom olursa bu boyayı bakteriye bağlar. Boyanın asidik veya bazik olduğunu oksokrom grubu belirler. Kromofor grupları ise renk verme özelliği fazla ve az olanlar olarak ikiye ayrılabilirler.

Renk verme özelliği fazla olanlar:	Azo	-N=N-
	Nitrozo	-N=O
	Azoksi	-N=*N-O
	Tiyo	C=S
Renk verme özelliği az olanlar:	Nitro	*NO-O
	İmino	C=N-
	Karbonil	C=O
	Etenil	C=C

Oksokrom grupları : -OH (hidroksil), I⁻ (İyot), Br⁻ (Brom), Cl⁻ (Klor)

Boyalar, boya molekülünün elektrik yüküne göre asidik, bazik ve nötr boyalar olmak üzere üçe ayrılır. Yine içerdikleri kromofor gruplarına göre nitro boyalar (pikrik asit vd.), azo boyaları (metil oranj, metil kırmızısı vd.), antrakinon boyaları (alizarin sarısı-S, purpurin), kuinonimin boyaları (metilen mavisi, resazurin vd) ve ksanten boyaları (eosin Y, eritrosin, bromtimol mavisi vd.) gibi gruplara ayrılmaktadır. Daha bunlar gibi birçok boya grupları kullanılmaktadır.

Yukarıda sözü edilen sentetik boyaların yanında doğal boyalar (indigo, karmin, litmus vd.) da bulunmaktadır.

8.2.2. Boyama teorileri

Bakterilerin boyanması ve bakteri ile boya arasındaki etkileşimleri açıklamak için bir çok fiziksel ve kimyasal teori ileri sürülmüştür. Boyama işlemi genel olarak preparat hazırlama ve boyama olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmektedir:

a. Preparat Hazırlama

Temiz bir lam 1-2 damla ksilol veya alkol ile temizlendikten sonra ortasına bir damla damıtık su konulur. Kültürden öze ile alınan örnek önce su damlası yanında ezilerek, daha sonra da su damlası ile azar azar karıştırılarak lamın üzerine ince bir film halinde yayılır. Havada kuruması sağlanır. Lam bunzen beki alevinden üç defa geçirilerek örneğin sabit hale gelmesi (fiksasyon) sağlanır.

b. Boyama

Genellikle bazik boyamanın yapıldığı boyama işleminde uygulanan yöntemler üç ayrı başlıkta toplanır.

1. Basit boyama: Başlıca işlem aşamaları lam üzerine aktarma, yayma, kurutma, fiksasyon, boyama, yıkama, kurutma ve mikroskopta incelemedir. Temel olarak morfolojik inceleme için yapılır. Her ne kadar doğrudan gram boyama ile hem gram reaksiyon hem de morfoloji belirlenebilirse de morfolojik inceleme için basit boyama önerilmektedir.

Boyamada tek bir boya (Loeffler'in metilen mavisi, kristal violet, sulu fuksin ve safranin gb.) kullanılır. Preparat hazırlandıktan sonra (yayma, kurutma, tespit) üzeri boya çözeltisi ile kaplanır ve 1 dakika beklenir. Boya dökülerek preparat damıtık suyla yıkanır ve kurutulan preparat mikroskopta immersiyon objektifiyle incelenir.

Bakterilerin boyanmasında genelde basit boyama tercih edilir. Bakteri yüzeyinde negatif yük varsa hücre asidik boyayı kabul etmez, bu nedenle de boyanmaz. Basit boyamada, boyama müddeti ve kullanılan boyaya bağlı olarak mikroorganizmanın rengi farklılık göstermektedir.

2. Diferansiyel boyama : İki farklı renkteki boyanın aynı preparat üzerinde belli tekniklerle ve ardı ardına uygulanmasıyla gerçekleştirilen bir boyama şeklidir. Diferansiyel boyama ile mikroorganizmaların gruplandırılması (gram boyama, asit-fast boyama) ve organellerin görüntülenmesi (flagella boyama, kapsül boyama, spor boyama, çekirdek boyama) mümkün olmaktadır.

Önce hücreler birinci boya ile boyanır, etil alkol gibi maddeler ile dekolorizasyon (renk giderme) işlemi yapılır. Bazı hücreler diğerlerine göre daha kolay dekolorize olur. Gram boyama ve diğer diferansiyel boyamalarda bakterilerin bu özelliğinden yararlanılır. Dekolorize olmuş hücreler karşıt boya ile tekrar farklı bir renge boyanır.

Diferansiyel boyamaya gram boyama, Ziehl-Neelsen boyama yöntemi (*M.tuberculosis* gibi aside dirençli bakteriler için), spor boyama yöntemleri, negatif diferansiyel boyama yöntemleri, yağ boyama yöntemi gibi yöntemler örnek verilebilir. Bunlardan en çok kullanılanı gram boyama yöntemidir.

- **Gram boyama:** Bakteriolojide çok önemli olan bu teknik 1884'de Christian Gram tarafından geliştirilmiş diferansiyel bir boyama tekniğidir. Gram boyama ile bakteriler gram-pozitif ve gram-negatif olarak ikiye ayrılabilir. Ancak bazı bakteriler vardır, ki örneğin *Mycobacterium* sp., onları gruplama imkanı yoktur. Gram boyama bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasında önemli bir kriter ve boyama tekniğidir. Sadece bakteriler için uygulanır. Bakteriler hücre çeperlerindeki lipit ve lipit türevlerine göre boyama sonunda mavi-mor (Gram-pozitif) ya da kırmızı-pembe (Gram-negatif) boyanırlar. Bazı gram-pozitif bakteriler boyama sırasında kullanılan dekolorizatör (renk giderici) çözeltisine duyarlı oldukları için bunlar da kırmızı-pembe renkte görülebilir. Bunlar Gram-labil (duyarlı) olarak adlandırılır. Bazı bakterilerin ise çok yaşlı kültürleri farklı reaksiyon verir. Bunlar da Gram-variable (değişken) olarak tanımlanır. Gram-variable etkiden sakınmak için bakterilerin 18-24 saatlik kültürleri kullanılır.

Gram boyama yöntemi şu şekilde yapılır :

1. 18-24 saatlik kültürden preparat hazırlanır.
2. Preparat kristal viyole ile kaplanır ve 1 dakika beklenir.
3. Preparat bol damıtık suyla yıkanır (ya da lugol çözeltisiyle).
4. Preparat üzeri lugol (Gram iyot çözeltisi) ile kaplanır ve 1 dakika beklenir.
5. Lugol akitılarak damıtık suyla yıkanır.
6. Preparat üzerine % 96'lık etil alkol yayılarak 10-15 saniye beklenir (preparat uygun bir kaptaki alkol içine daldırılarak da beklenebilir), bu işleme de dekolorizasyon adı verilmektedir.
7. Preparat hemen damıtık su ile yıkanır.
8. Karşıt boya sulu fuksin veya safranin ile kaplanarak 10-30 saniye beklenir.
9. Preparat bol damıtık su ile yıkanarak ya da kurutma kağıdı arasında kurutulur.
10. Preparat mikroskopta immersiyon merceğinde incelenir. Kristal viyole çözeltisini hücre içinde tutabilen, dolayısıyla mikroskop altında mor renkte görünen bakteriler **gram-pozitif**; adı geçen çözeltiyi tutamayıp hücre dışına bırakan ve bu nedenle pembe-kırmızı renkte gözükken bakteriler de **gram-negatif** olarak değerlendirilir.

- **Spor boyama** : *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakteri türleri ısıt işlemlere dayanıklı, endospor adı verilen yapılar oluşturmaktadır. Endosporlar ısıt işlemlere dayanıklılığın yanı sıra spor oluşturmeyen bakterilerin duyarlı olduğu pek çok kimyasala da dirençlidir. Kimyasallara ve ısıt işlemlere karşı dayanıklılığın temelinde kalın spor kılıfı rol oynamaktadır.

Spor boyamada uygulanan ısıt işlemle boya, spor kılıfına işlemekte ve hücre boyanmaktadır. Boya giderici işlemler ile boya uzaklaştırılmaz.

3. Negatif boyama: Mikroorganizmaların morfolojilerini incelemek için uygulanan ve mikroorganizmaları değil, bunların yayıldığı ortamı boyamayı amaçlayan bir boyama yöntemidir. Boyama için çini mürekkebi veya nigrosin boya çözeltisi kullanılır.

KAYNAKLAR

- Acar, J. 1987. Genel Mikrobiyoloji ders notları. Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü. Ankara
- Anonymous. 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A.K. Hlkman, Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara. 358 s.
- Gürgün, V., Halkman, A.K. 1988. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 7. 146 s.
- <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab2/lab2.htm>
- <http://www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/pages/101lab4.html>
- Karahan, A. G., Arıdoğan, B.C., Çakmakçı, L. 2002. "Genel Mikrobiyoloji". Uygulama Kılavuzu. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 24. 171 s.
- Özçelik, S. 1998. Genel Mikrobiyoloji. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 1 (İkinci Baskı). 259 s.
- Temiz, A. 1994. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yay. Ankara