



YTÜ Çevre Mühendisliği Bölümü Çevre Mikrobiyolojisi Uygulama Notları

MİKROSKOP KULLANIMI

MİKROSKOP

Bakteriler çok küçük olduklarından çıplak gözle görülmezler. Görülebilmeleri için, çok fazla büyütülmeleri lazımdır. Bu büyütme 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** (= Müşahade etme) kelimelerinin birleştirilmesinden meydana gelmiştir. 1674 yılında tek mercekli basit bir mikroskobu **Anton van Leeuwenhoek** bulmuş, günümüze kadar geliştirilerek ulaşılmıştır. Mikroskoplar, büyütme kistas 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- Ultraviole Mikroskobu
- 4- Flouresans Mikroskobu
- 5- Faz Kontrast Mikroskobu.
- 6- Stero Mikroskobu

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

- 1- Transmission Elektron Mikroskobu (TEM)
- 2- Scanning Elektron Mikroskobu (SEM)

olarak iki çeşidi yaygın olarak kullanılır. Çizelge'de bazı mikroskop çeşitleri ve özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge: 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 (mikroorganizma) canlı yapıların incelenmesi
Elektron Mikroskobu	200.000 400.000	Cansız yapılar incelenir. İncelemeden önce örnekler özel bir işleme tabi tutulur.	Virüslerin ayrıca mikroorganizma ince yapısının incelenmesi

Işık Mikroskobu

Öğrenci tatbikatlarında laboratuarlarda mikroorganizmaların incelenmesinde devamlı olarak kullanılan ve özel bir ışıklandırma sistemine ihtiyaç göstermeyen, yani güneş ışığı veya elektrik ışığı ile çalışan mikroskoplardır.

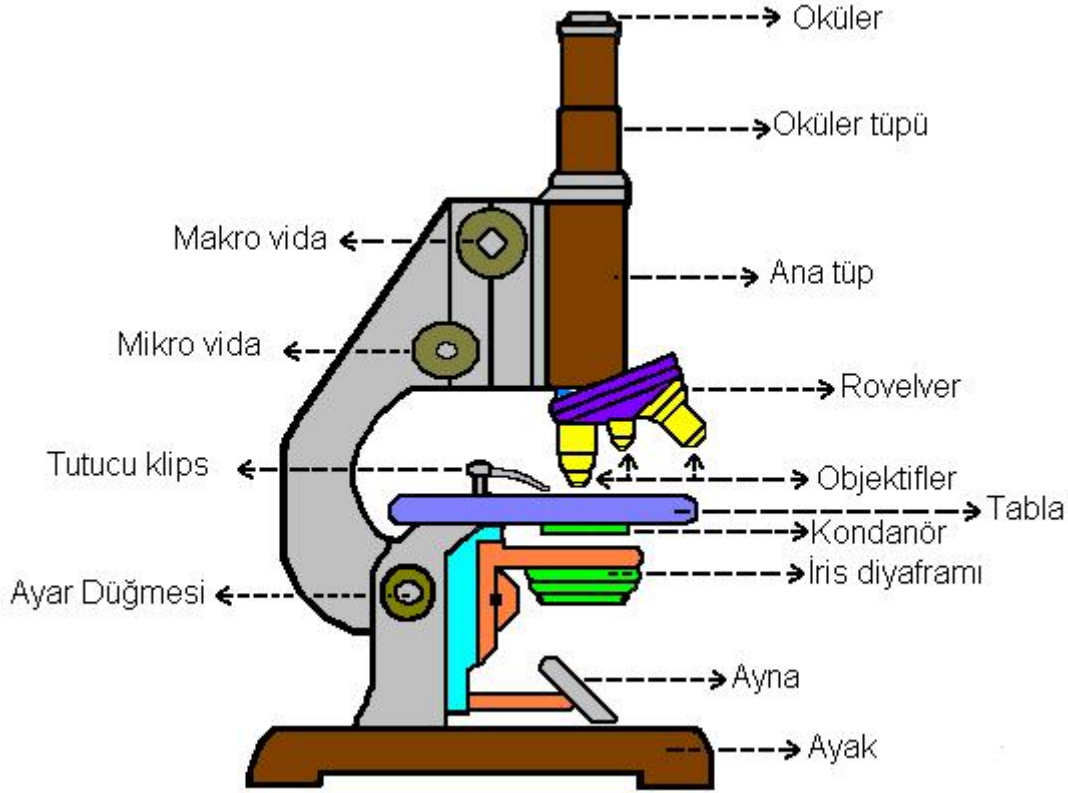
MİKROSKOP PARÇALARI

Mikroskobik çalışmalarda en iyi sonucu alabilmek için, mikroskop özellikleri, kullanım ve bakımını iyi bilmek gerekir, Genel olarak ışık mikroskobu Şekil 1'de görüleceği üzere, mekanik, aydınlatma ve optik olmak üzere üç ana kısımdan oluşur.

Mekanik Kısım

Bu kısım tüp, kol, tabla ve ayaklardan meydana gelir. Aydınlatma ve optik kısmın taşıyıcısıdır. tüp silindirik 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 preparasyonlar tablaya konur ve delik kısım ışık kaynağından gelen ışınları geçirmeye yarar. Mikroskobun ayağı genelde U ve V şeklinde yapılmış olup, ağırdır.

Mekanik Kısım; 1 Mikroskop ayağı, 2 Preparat tablası, 3 Makro ve mikro vida, 4 Objektif tablası, 5 Tüp



Şekil: Işık Mikroskobunun Şematik Çizimi ve Kısımları

Aydınlatma

Teferruatlı bir inceleme ve hassas bir çalışma için elektrik lambası ışığı iyi bir sonuç verir. Preparatı aydınlatmak ve iyi bir ışık ayarı için kondansatör kullanılır

Kondansör: Işığı obje üzerinde odaklar ve yoğunlaştırır, ışığın dağılırarak görüntünün bozulmasını önler ve rezolüsyon artırır, sıcak lambayı optik bölümlerden ve kullanıcıdan uzak tutar.

Diyafram: Işık kaynağından gelen ışık demetinin çapını kontrol etmek için kullanılır, ışık kaynağının üstünde ya da kondansörün altında yerleşiktir. Işığın şiddetini azaltmak için değil, en iyi kontrast ve rezolüsyon elde edilecek ışık çapını ayarlamak için kullanılır.

Optik Kısım

Optik kısmı oküler ve objektifler oluşturur; **a-Oküler:** Tüp içinde objektif tarafından oluşturulan görüntüyü büyütür. Zahiri görüntüyü hazırlar. Objektifin ışık kusurlarını düzeltir. oküler genel olarak 10x büyütmeli olurlar. 5, 7, 15 ve 20x tipleri de vardır.

b-Objektifler; Mikroskopta ilk büyütme yapan optik kısımdır. Çok sayıda merceğin uygun düzende bir araya getirilmesi ile oluşur. Objeden gelen ışık demetlerini toplamak ve büyümüş gerçek görüntü oluşturmaktır. Laboratuvarımızdaki mikroskoplarda obje/ görüntü oranı 4, 10, 40 ve 100 X olan 4 adet objektif bulunmaktadır. 10x objektifi, küçük büyütme objektifi; 40x orta büyütme objektifi, 100x ise; immersiyon objektifi olarak adlandırılır.

MİKROSKOP KULLANILIŞI

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

Küçük büyütme objektiften revolverin döndürülmesi ile mikroskoptaki görüntü orta büyütme objektifte odaklanır. Şayet görüntü tam olarak görünmüyorsa, makro ayar ile objektifleri biraz aşağıya indirerek veya mikro ayar düğmesi ile oynayarak görüntünün netleşmesi sağlanır. Orta büyütme 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 büyütme 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 lamanın 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 bulunduğu optimum ışıklandırma için diyafram aralığı ayarlanır.

MİKROSKOP TEMİZLENMESİ VE MUHAFAZASI

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 büyütme objektif yerine getirilir. Üzeri örtüsü ile örtülerek muhafazası içine yerleştirilir.

KULLANILACAK MALZEMELER

- Işıık Mikroskobu
- Lam
- Lamel
- Temizleme Çözeltisi ve Bezi
- İğne, Öze

METOT

Mikrobiyolojide çalışılan neredeyse tüm organizmalar çıplak gözle görülemeyip, tespitleri için mikroskoba ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroorganizma çalışmalarının iyi bir şekilde yürütülebilmesi için iyi derecede mikroskop kullanımı becerisi gerekmektedir.

Bu laboratuvar uygulamasında mikroskobun nasıl çalıştığı ve materyalin mikroskopta nasıl inceleneceği öğrenilecektir.

Mikroskopta inceleme adımları;

- 1- Preparatı (lam ve lameli) nesne tablasının üzerindeki sıkıştırma klipslerinin altına yerleştir. (Lamel olan tarafın daima yukarıda olacaktır)
- 2- Her zaman için en küçük objektif (10X) ile çalışmaya başla.
- 3- Kaba ayar düğmesi (Macro Vida) ile nesne tablasını en üst seviyeye çıkartıncaya kadar tablanın kenarına bak.
- 4- Okülere bakarak preparattaki görüntü belirinceye kadar kaba ayar düğmesini (Macro Vida) aşağıya doğru çevir.
- 5- Kaba ayar yapıldıktan sonra ince ayar düğmesi (Micro Vida) ile keskin bir görüntü alıncaya kadar ayar yap.
- 6- Gözlem yaparken gözünüzü okülere yapıştırma.
- 7- Büyütmeyi arttırmak için hareketli revolveri saat yönünde çevir ve her objektif değişikliğinde sadece ince ayar düğmesini (Micro Vida) ayarlayarak görüntüyü odakla.

Not 1: Objektif değiştirirken tablayı aşağı indirmeyi unutma!!!

Not 2: Her büyütmeye ışığa gereksinim artacağından diyafram daha fazla açılmalıdır.

- 8-** İnceleme işlemi bittikten sonra, objektifi tüpteki oküler ile birlikte en düşük büyütme seviyesine (10X) getirip bırak.
- 9-** Aydınlatma sistemini kapat.
- 10-** Mikroskop sadece gövde kolu üzerinden tutulmalı ve taşınmalıdır.
- 11-** Toz, mikroskop ve optik aksamın en kötü düşmanıdır. Bu nedenle mikroskopun hassas iç bölümlerine tozun girmesini engellemek için herhangi bir objektifi veya oküleri kesinlikle mikroskop üzerinden çıkartma.
- 12-** Eğer mikroskopun gövdesi ve tablası tozlu ise, tozun silinmesi için yumuşak pamuklu bez parçası kulan.
- 13-** Tüm bu işlemlerden sonra artık mikroskobu koruma örtüsüyle ört.