



# Işık Mikroskobu

Bilimin herhangi bir alanındaki ilerleme, hem teknoloji hem de enstrümantasyon alanındaki ilerlemeyi izler. Son yıllarda, biyoloji bilimindeki bilgi patlamasının kökeni çeşitli tekniklere ve aletlere dayandırılıyor. Bunlar arasındaki en önemli gelişme mikroskop ve mikroskop kullanma tekniklerindeki gelişmelerdir. Mikroskop, biyoloğun, küçük canlıların organizasyon ve düzenini görmesini sağlar. Bu bilgiler daha sonra başka teknikler kullanılarak elde edilen fizik ve kimya bilgileri ile birleştirilir. Nitekim, mikroskop canlının işleyiş ve yapısal resminin tamamının inşasında yer alan önemli bir gereçtir.

**I**NSANIN bir cismi daha iyi görmek amacıyla gerçekleştirdiği ilk eylem, cismi gözüne yaklaştırmak ve ona yakından bakmaktır. İlk aşamada "görme" ve "göz" e baktığımızda, bir nesneyi çıplak göze, çok fazla yaklaştıramadığımızı görürüz. Bu en yakın görme mesafesinde göz, birbirinden 0,15 mm kadar uzak iki noktayı ayırt edebilir. Bu koşullarda göz merceği, fiziksel olarak kalınlığını değiştirerek uyum sağlamaya çalışır. Bir insan çıplak gözle, eğer gözlerinde herhangi bir hastalık yoksa, metrenin binde biri büyüklüğündeki kurbağa ya da balık yumurtasını görebilir. Ancak bu kadarı

da yetmeyip, daha uzağı ya da daha küçüğü, görünmezi ve bilinmezi görmek isteyince insanoğlu kendisine yardımcı araç gereçler tasalamaya başlamıştır.



## Dünden Bugüne Mikroskop

M.S. I. yüzyılda, küresel bir camın içine su doldurarak bir mercek geliştirildi: Seneca merceği. Bu mercek, basit büyüteçlerin atası olarak tarihteki yerini aldı. Seneca'yı insanların o dönemde kullanma amaçları basit: Merceği bir ışık kaynağının önüne koyarak ışığın çoğalmasını, yayılmasını sağlamak.

Mercek alanındaki gelişmeler için insanoğlunun biraz beklemesi gerekti. Görme bozukluklarının yardımcı aletlerle giderilmeye başlaması daha sonraki yüzyıllar da ancak gerçekleştirildi.

Saydam minerallerden düzeltilerek kesilmiş parçalar çerçevelere yerleştirilerek insanların daha iyi görmeleri sağlanıyor. 13. yüzyılda, İtalya'da ilk silikat camı üretiliyor, bu gözlük uzağı göremeyen insanların sorunlarını çözüyor. Bu ilkeye dayanarak, daha güçlü merceklerin görme bozuklukları olmayan kişilerin, görme eşliğini azalttığını söyleyebiliriz. 16. yy'da içbükey mercekler üretildiğinde, artık yakını göremeyen insanların da sorunları bir nebze olsun azalmıştı.

Bu dönemde, Jacharias Jansen, iç bükey ve dış bükey merceklerin doğrusal kombinasyonlarını deneyerek, ilk mikroskobu gerçekleştirdi. Bu ilk kaba birleşik mikroskobun sonuçları harikaydı. Mikroskop bir nesneyi tamamen kapalı iken 3x (3 kat), açıkken 9x (9 kat) kadar büyütebiliyordu. Mikroskop, 2 mercek ve tüpler arasındaki bir diyaframdan oluşuyordu. Ne yazık ki, Jansen'in 16. yy'da yaptığı ve Hollanda'da Kraliyet ailesine sattığı bu mikroskoplardan hiçbiri günümüze ulaşmamıştır.

Jansen'in ürettiği mikroskopların ünü tüm Avrupa'yı sarmıştı. Mikroskop üreticilerinin sayısı artmıştı. Bu artış yeni arayışlara da yol açıyordu. 1619'da Connellius Drobbel, Londra'da ikili dışbükey gözmercekli ve bir tarafı dışbükey objektifli, küçük bir mikroskop geliştirdi. Mayıs 1624'te, Galileo, Drobbel'in mikroskobunu aldı ve birtakım değişikliklerle, mikroskobun gözlemcinin yorumuna bağlı olarak, hem mikroskop hem de teleskop olarak kullanılabilirdiğini herkese göstermiş oldu. Bu olay Galileo'nun zekasının ve yeteneğinin de bir kanıtını oluşturur.

Mikroskobun adının konulması 13 Nisan 1625'te Giovanni Faber tarafından gerçekleştirildi. O dönemde mikroskop, öznel olarak, küçük nesnelere ya da onların parçalarını görmek anlamına geliyordu. Fakat günümüzde, nesnel olarak mikroskop, sözlüklerde güçlü bir büyüteç olarak tanımlanır.

Günümüzde mikroskop kullanımının amacı, kesinlikle Robert Hooke (1635-1703) dönemindekinin aynıdır. 16.yy'da araştırmacılar dışında,



Claude Bernard bir grup arkadaşıyla, tavşan örneğini mikroskopta inceliyorlar.

asil kişiler mikroskobu bir oyuncak olarak görüyor ve değişik amaçlar için satın alıyorlardı.

1660-1665 yılları arasında Robert Hooke 'micrographia'yi yazdı. Micrographia'da Christopher Cock'un yaptığı objektif ve oküler mercekleri olan bir mikroskoptan ve o'nu nasıl geliştirdiğinden bahsediyordu. Hooke, mikroskoba orta cam da dediği üçüncü bir mercek yerleştiriyor ve böylece materyallerin daha iyi gözlemlendiğini ortaya koyuyordu. Hooke mikroskolla şişe mantarına baktığında, bunun nere-

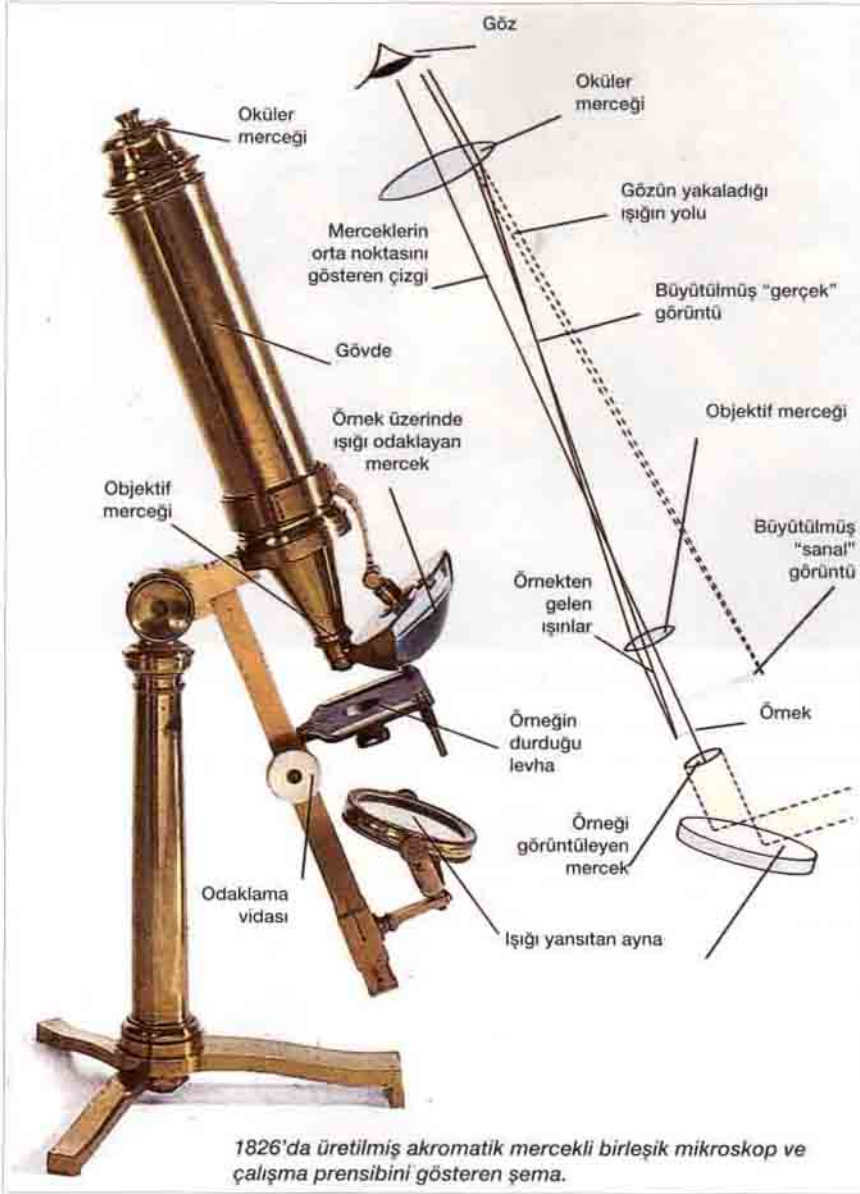
*Hooke'un ürettiği birleşik mikroskobun bir taklidini görüyoruz. Eğer yeteri kadar ışık yoksa, yağ lambasını resimdeki gibi bir düzeneğe kullanıyordu.*

deyse tamamının hava olduğunu gördü ve tüm bu havayı çerçeveleyen yapıları 'hücre' adını verdi. Fakat bu hücrelerin gerçekten hücre duvarı kalıntıları olduğunu bilmiyordu. Hooke, 1665'ten sonra o kadar güzel mikroskop örnekleri ortaya koydu ki halen Billings Mikroskop Koleksiyonu'nda ve Kraliyet Mikroskop Birliği Koleksiyonu'nda bu örnekler bulunmaktadır.

Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723) 40 yaşlarında mikroskop kullanmaya ve yapmaya başladı.

Hooke'un direktiflerini de göz önünde bulundurarak 400'den fazla mikroskop üretti. Ne yazık ki bunların da sadece 9 tanesi günümüze kalabilmiştir. Leeuwenhoek 1673'te basit mikroskoplarla yapılabilecek deneyler hazırlayarak, bunları Londra'daki Kraliyet Birliğine yolluyordu. Bunları yaparken ilk protozoa, bakteri ve spermatozoa'nın da tanımını yapan kişi oldu. Kendisi bunlara 'hayvancık' (animalcules) diyordu. İlk kırmızı kan hücresinin detaylı tanımını gerçekleştirdi. Leeuwenhoek ile mikroskop yavaş yavaş kullanım amacını saptıyordu. Aslında





bir zaman bırakmadı. O'nun başarısının sırrı, örnekleri, mercekleri ve gözlerini hep bir arada buldurmasında yatıyordu. Hooke ise hep birleşik mikroskop kullandı. Bu mikroskoplar iki ya da daha çok mercekle sistemlerinden oluşurlar. Bazı birleşik mikroskoplar sadece basit olarak oküler (göz yeri) ve objektiften oluşur, Hooke, mikroskopu Galileo'nun teleskobu kullanması gibi kullanıyordu. Ayrıca, daha detaylı görüntü için daha fazla büyütme gerektiğini düşünüyordu. Hooke'un mikroskopundaki aksaklık adese veya ayna sisteminde bütün ışınların bir noktada toplanmamasından kaynaklanıyordu.

17. yüzyıl boyunca mercek sayısı artırılarak, bunları tüpe yerleştirme deneyleri devam etti. Bu deneyler Hollanda'lı astronom ve fizikçi olan Christopher Huygens'in (1629-1695), Huygens okülerini keşfetmesine kadar sürdü. Bu oküler dışbükey kısmı objektife bakacak şekilde, iki tek taraflı dışbükey mercekten oluşuyordu. En alttaki mercekler gerçek görüntüyü, objektifin daha parlak fakat küçük görüntü vermesi için ayarlıyordu. Bu küçük görüntü, daha sonra üstteki mercek tarafından alınıyordu. Huygens tasarımı, hâlâ büyütme için geçerli temel ilkedir. Düzlemsel, hacimsel ya da açılmalı ölçek retikülleri (çarpaz şebekeler) Huygens'in yaşadığı dönemdeki gibi mikrometri için oküler için kullanılır.

O dönemde insanlar henüz mikroskopla bilimsel keşifler yapılabileceğini düşünmüyordu, çünkü mikroskopla birtakım küçük hayvanların bacaklarına, antenlerine ya da çiçek tozlarına bakmakla yetiniyorlardı. Sütü mikroskop altına koyup, içindekileri görememek ya da bir dokunun alt biriminin hücre olduğunu bilmemek, mikroskop kullanımının bu günkü amacından çok farklı olduğunu gösteriyordu.

Mikroskopun gerçek öneminin anlaşılması, Mercello Malpighi'nin (1628-1694) yaptığı keşiflerle gerçekten sağlanmış oldu. Malpighi en büyük mikroskop kullanıcılarından biri, bugün bile hâlâ embriyolojinin ve histolojinin babası sayılıyor. Malpighi'nin mikroskopla yaptığı ilk keşif hayvan fizyolojisinde anısal bir önem taşımaktadır.

Dolaşım sistemiyle ilgili olarak, kanın bağırsaklar da üretilip, karaciğ-

Leeuwenhoek bir bilim adamı değildi. Fakat daha iyi görüntü elde edebilmesinin böylece başarıya ulaşmasının nedenleri çok basitti. Bu yüzyılda kullanılan mercekler çok kaba sayılırdı. Mercek yapımı, cam eriğinin iki parça tahta arasında bastırılmasıyla sağlanıyordu. Bu yüzden büyütmede ve renklerde sorun çıkıyordu. Araştırmacı eğer mikroskopu 40x ya da 50x gücünde kullanmak istiyorsa, görüntünün bulanık olmasını kabullenmek zorundaydı. Leeuwenhoek düzgün işlenmiş tek mercekli mikroskopun birleşik mikroskoptan daha iyi sonuç verdiğini fark etmişti. Bu mikroskop, nesne yerleştirildikten sonra, göze çok yakın olacak şekilde kaldırılıyordu, böylece görüntüde 50x-200x arasında bir büyütme sağlanıyordu. Fakat, tüm bunların yanında odaklama için çok iyi konsantre

olmak gerekiyordu. Her şeye rağmen birleşik mikroskoptan kat kat üstün durumdaydı bu sistem.

Leeuwenhoek'un ince yüksek kaliteli ve güçlü merceklerinin sırrını o dönemde kimse çözememişti. Leeuwenhoek'un günümüze kalan mikroskoplarının merceklerine bakıldığında günümüz koşullarında sırrı ancak çözülebiliyor. Bu mercekler, cam şişirilerek elde edilen kürenin alt kısmındaki daha kalın camdan özenle kesilerek elde edilmiş. Bu küçük damlaeik Leeuwenhoek mikroskoplarının merceği görevini üstleniyormuş.

Zamanlarının en iyi mikroskop üreticileri, Hooke ve Leeuwenhoek birbirinden davranış olarak çok farklıydılar. Naif Hollanda'lı Leeuwenhoek, basit mikroskopuyla, mikroskopik nesnelere, 'hayvancıkları' araştırmayı hiç-

re doğru ilerlediğini, daha sonra kalbe vardığını en son olarak toplardamar ve atardamarlarla vücuda dağıtıldığını öne süren ilk kişi Galen'di(131-200). Fakat William Harvey, bu düşüncenin doğru olmadığını, toplardamar ve atardamarlar arasında görünmez bir bağlantı olduğunu savunuyordu. Harvey'den sonra Marcello Malpighi mikroskobu atardamar ile toplardamar arasındaki kılcal damarları görmek için kullandı. Bir kurbağanın kullanıldığı deneyde, atardamarlar ve toplardamarlar arasında kılcal damarların bulunduğu Malpighi tarafından kanıtlanmış oldu. Böylece Galen'in teorisi çürütülürken (1660), mikroskop kullanımında çağdaş yaklaşımın ilk adımları atılmış oldu.

18.yüzyılda, teknik bilgilerde gelişmeler doğrultusunda mikroskopta, görüntünün, bulanık ya da nesne etrafında renkli halkalarla çevrili olmasından çok, netliğin ve keskinliğin artırılması sağlanıyordu. Bu bulanıklıklar ve renk karmaşası camdaki sapıncan kaynaklanıyordu. Bunun sebebi, tek mercekli basit mikroskobun geçmiş yüzyıl boyunca daha çok üstünde durulması ve basit mikroskopta çok daha az sapıncan olmasıydı. Çoklu merceklerde ışığın çarpılması, bükülmesi katlanarak artıyordu. Bu, basit mikroskoplara 2 mikron çözünürlük sağlarken, en iyi birleşik mikroskoplarda 5 mikron çözünürlükte kalıyorlardı.

Işığı kırabilen herhangi bir nesne (cam) ışığı farklı dalga boylarını (renkleri) farklı miktarlarda kırabilecektir. Bu bizi, herhangi bir basit merceğin, her renk için az da olsa farklı odak ara-



Volvox - her küçük hücre, karanlık-alan mikroskobuyla görüntülenmiştir

lıklarının olacağı gerçeğine götürür. Eğer bir nesne beyazsa (her renge sahiptir), kırmızı, maviden farklı bir yere odaklanacaktır. Sonuç olarak, bir nesneyi odakladığımızda, nesnenin etrafında bulanık mavi ya da kırmızı halkalar olacaktır.

Bu problemi çözümü, 1730'larda Chaster More Hall 'Çakmaktaşı Camı' nı yarattığında bulunmuş oldu. 'Çakmaktaşı Camı', eski 'Göbek Camı' kadar büyüttüğü gibi, ortalığı birbirine katan renklerin de azalmasını sağlıyordu. Chaster More Hall, bu yeni iç büküye mercekleri eski göbek camlarının hemen arkasına yerleştirilirse, farklı renklerin geri gönderilebileceğini savunuyordu. Böylece akromatik mercekler doğdu.

Hall, kendi keşfinin önemini anlamıştı ve bunu deneyip kesinleştirene kadar beklemek istiyordu. Farklı iki optik dükkani ile kontrast yaparak, yeni mercekleri üretmelerini istedi. Fakat, optik dükkandan birinin ortağı olan George Bass bir arti bir eşittir iki diyerek, Hall'in ne yapmak istediğini anladı ve Hall hiçbir zaman kendi icadının patentini alamadı. George Bass da bu merceklerin sırrını 20 yıl kadar sakladı. 1750'lerde John Dolland adlı bir teleskop üreticisiyle buluştu. Dolland, Bass'tan akromatik lensleri duyunca cevabı bulduğunu düşündü ve 1759'da patenti aldı. Bu olay Dolland'ı kanun kadar zengin biri yapmıştı.

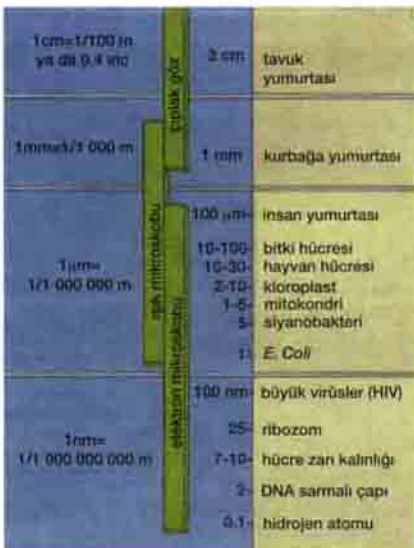
Akromatik mercekler teleskop için başarı sağlamsa da, ince objektif mer-

ceklerinin akromatik stilde yapımı çok zordu. Bu zorluklar yüzünden, ilk pratik akromatik mikroskop lenslerinin üretilebilir hale gelmesi 1800'lere kadar ertelenir.

Kromatik sapıncan sorunu çözüldükten sonra, ortada hâlâ bir küresel sapıncan sorunu vardı. Bu sorun, nesneden yansıyan ışığın, merceğin kenarına çarptığında, merkezine çarptığından farklı bir odak uzaklığı yaratmasından kaynaklanıyordu. Bu sorunda ışık açısını düşüren küçük mercek çapının ya da diagramların kullanılmasıyla, ya da merceği az kavisli üreterek çözülebilirdi. Eğer çoklu mercek sistemini, büyüme gücünü arttırmak için kullanacak olurlarsa, farklı merceklerdeki hata katlanarak artacak, ve görüntü daha da kötü olacaktı.

Joseph Jackson Lister (antiseptik tekniği keşfeden cerrah Lord Joseph Lister'in babası) 1830'da yayınladığı makalede, küresel kırınımaya çözüm bulduğunu belirtiyordu. Matematiksel olarak gösterdiği çözümde, çoklu düşük güçteki mercekler belli aralıklarla yerleştirildiği takdirde, ilk mercekteki küresel kırınım onu izleyen merceklerde artarak çoğalmayacaktı. İlk düşük güçteki mercekteki bulanıklık en düşük düzeyde olacağından, büyüme gücü toplamda çok olsa bile, tüm serinin bulanıklığı düşük olacaktı.

Lister bir mikroskop üreticisi değil bir kullanıcıydı. Londra'daki üreticilerin makaleden feyz alarak yeni mikroskobu üretmelerini bekledi, fakat yıllar



sonra kendi mikroskobunu kendi yapmaya karar verdi.

Üreticilerin bilmedikleri başka bir sorunda kromatik ve küresel bulanıklık çözülmüş olsa bile, fiziksel olarak mikroskop yapımından kaynaklanan açılal mercecek çapı (ağız çapı) sorunuydu. Ernst Abbe, 1877'de yayınladığı bir makalede, fiziksel kanunların, en düşük çözünürlük mesafesinin ( $d$ ), ışığın dalgaboyunun ( $\lambda$ ), nümerik mercecek çapına ( $N.A.$ ) bölünmesine eşit olduğunu, söylediğini belirtti. Burada, nümerik mercecek çapı, nesne üzerinde ki bir noktadan nesneye doğru gelen ışık konisi açısıyla ( $\theta$ ) doğru orantılıdır.

Daha basit bir dille aktarırsak, mikroskoptan mümkün olan en fazla çözünürlüğü elde etmek için, objektif, nesneden mümkün olduğunca çok ışık konisi toplamalıdır.

Bu formülü deneyen Ernst Abbe, Alman üretici Carl Zeiss'la çalışarak Zeiss firmasını mikroskop teknolojisinin en ön sırasına yerleştirmiş oldu.

1880'lerde yağ daldırma objektifleri (oil immersion) kullanarak, nümerik mercecek çapı (Numeric Aperture) 1.4 sayısına ulaşıldı. Bu değer, ışık mikroskobunun 0.2 micron aralıklı iki noktanın çözünürlüğünü sağlıyordu. Çok sıradışı daldırma sıvılarını ve mor ötesi

ışığını dışarda bırakırsak, bugün ki sınıır 1.4 N.A.'dır.

19.yüzyıl mikroskop için önemli bir dönemdir. Bu yıllarda mikroskop üreticileri daha çok optik görüntü kalitesiyle ilgilenmişlerdir, çünkü 1830'larda Dolland ve Lister optik sorunları çözmüş görünüyordular. 1850'lerde artık değişik mikroskop çeşitlerinden birini seçebiliyordunuz. En ileri kalitede üretim yapan üç firma vardı. Andrew Ross, Powell & Lealand, R. & J. Beck. Bir sonraki yüzyılda Swift & Son ve Watson & Sons önemli firmalar olarak yerlerini alacaklardı. Cary firması ucuz ve taşınabilir doğal modeller üretiyordu. Ve tabii Carl Zeiss ve Leitz firmaları önemli bir kaynak ve malzeme temincisi haline geliyordular.

19.yüzyılın sonlarına doğru mikroskop üzerindeki el işçiliği ve mikroskobun güzelliğinin yerini yüksek teknoloji ve ucuz seri üretim aldı.

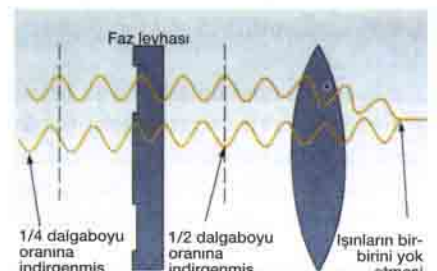
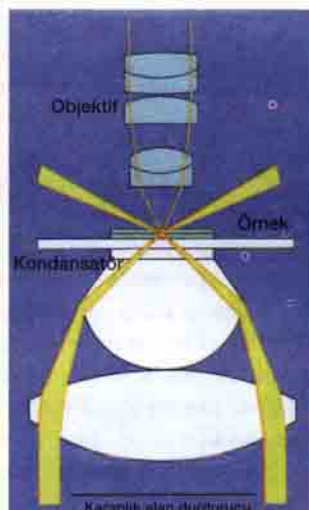
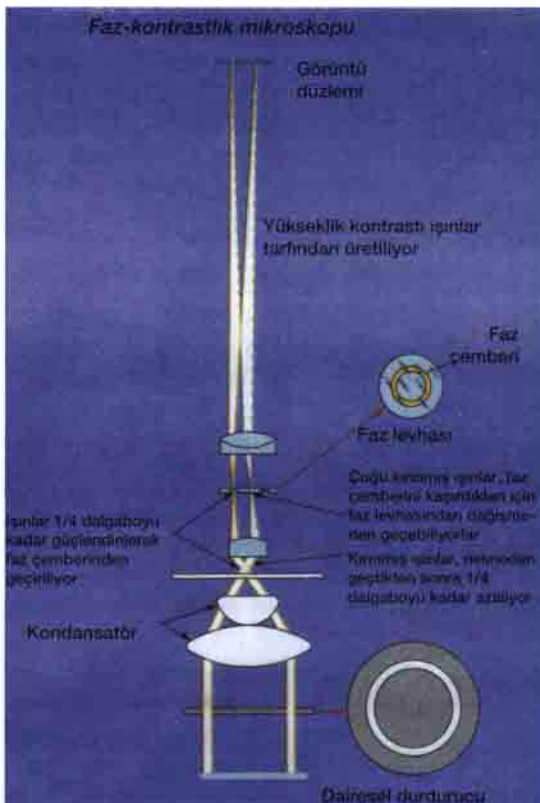
## Işık Mikroskobu

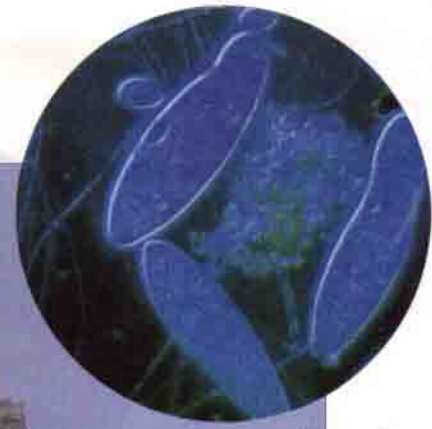
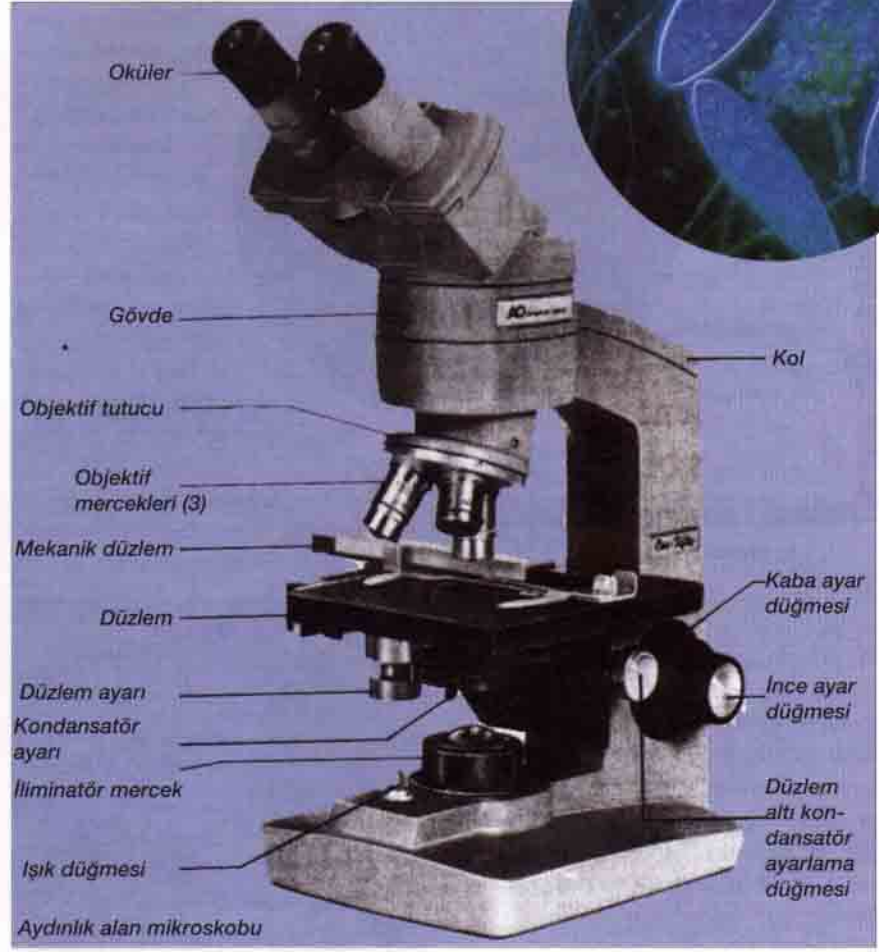
Işık mikroskobunun nasıl çalıştığını anlamak için önce merceklerin ışığı nasıl büküttüğünü ve nesneden gelen ışığı nasıl odakladığını anlamak gerekir. Bir ışık hüzmesi, bir ortamdan diğerine geçerken kırınım gerçekleşir.

Kırınım indisi, ışığın hızının bir nesne tarafından ne kadar yavaşlatıldığını ölçer ve kırınımın büyüklüğü ve yönü saptanır. Işık havadan cama geçtiğinde, daha yüksek kırınım indisinden olan ortamda, ışık yavaşlar ve normale doğru bükülür, yüzeye dik bir çizgi oluşturur. Işığın camdan çıkıp hava ile karşılaşmasıyla birlikte, ışık hızlanır ve normalden uzaklaşarak bükülür.

Tüm modern ışık mikroskopları, birleşik mikroskoplardır. Günümüzde 4 değişik ışık mikroskobu vardır. Bunlar parlak-alan mikroskobu, siyah-zemin mikroskobu, faz-kontrastlık mikroskobu ve floresans mikroskobudur.

Parlak-alan mikroskobu, kullanılan en sıradan mikroskoptur; çünkü daha açık renkli bir zemin üzerinde koyu renkli bir görüntü oluşturur. Siyah-zemin mikroskobunda, yaşayan boyanmamış hücreler ve organizmalar rahatça gözlenebilir. Işık hüzmesi öyle bir odaklanmıştır ki, ışık sadece örneğin üzerine yansır. Böylece sadece örneğe yansıyan ya da örnekten yansıyan ışık görüntü oluşturabilir. Örneğin etrafı koyu iken kendisi açık renktedir. Büyük ökaryotik mikroorganizmaların iç yapıları bu şekilde incelenebilir. Pigmentsiz canlı hücreler parlak-alan mikroskobu altında yeteri kadar görünür değillerdir; çünkü hücreler ve su

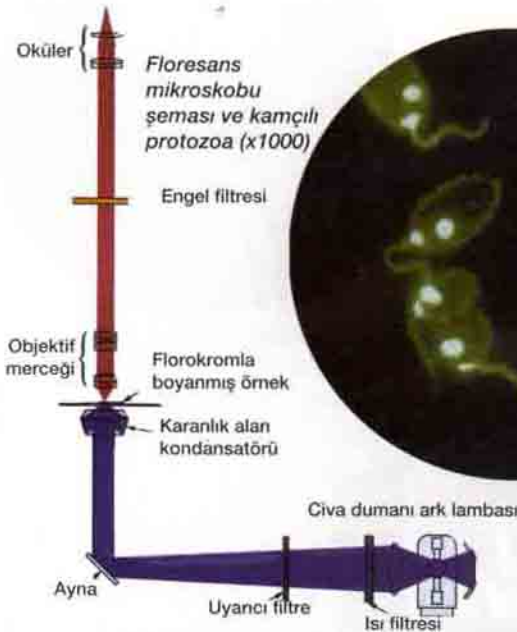




arasında çok az bir kontrast farkı oluşur. Böylece, mikroorganizmalar çoğunlukla gözlemeden önce hücre yapıları arasında farklı renkler yaratmak ve kontrastı artırmak için sabitlenirler (fixed) ve boyanırlar (stained). Bir faz-kontrastlık mikroskobu, farklı ışık şiddetlerini kolayca ayırtedilebilecek hücre yoğunluğundaki ve kırınım indisindeki farklılıkları dönüştürür; yaşayan bir hücreyi gözlemlenmenin de en iyi yoludur. Faz-kontrastlık mikroskobunun, kondansatörün halka biçiminde ışık üreten ince geçirgen halkalı opak bir disk vardır. Bu halka biçimindeki, ışık, hücre içinden geçerken, bazı ışık hüzmeleri, örnek içindeki kırınım indisindeki ve yoğunluk çeşitlilikleri yüzünden bükülürler ve 1/4 dalgaboyu oranında sınırlandırılırlar. Saptırılmış ışık, nesne üzerinde bir görüntü oluşturmak üzere odaklanır. Saptırılmamış ışık, objektifte bulunan özel bir optik disk olan faz levhasındaki faz çemberine çarpar. Aynı zamanda saptırılmış ışınlar çemberi kaçıtır ve levhanın diğer kısımlarından geçip gider. Eğer faz halkası saptırılmamış ışığın geçeceği şekilde yerleştirilmişse, ışık

1/4 dalgaboyu güçlendirilir, saptırılmış ve saptırılmamış dalgalar 1/2 dalgaboylu olarak faz dışında oluşurlar ve birbirlerini yok ederler; birleştikleri zaman bir görüntü oluştururlar. Zemin, saptırılmamış ışık tarafından oluşturulur ve parlaktır, aynı zamanda boyanmamış nesne koyu renk ve kontrast görünür. Bu tip mikroskop tekniğine siyah-faz-kontrastlık mikroskop tekniği denir. Çoğu zaman renk filtreleri kullanılarak görüntü geliştirilir. Faz-kontrast mikroskobu özellikle bakteri endosporlarının ve kükürt, poly-β-hidroksibütirat içeren organel ya da yapıların araştırılması için kullanılır. Bunlar açıkça görülebilir, çünkü sudan farklı kırınım indisleri vardır. Ayrıca, faz-kontrastlık mikroskobu ökaryotik hücre çalışmalarında da kullanılabilir. Şimdiye kadar üzerinde durduğumuz mikroskop türlerinin hepsi örnekten geçen ışıktan görüntü elde edilmesi ile ilgiliydi. Bir nesne, ışığı yaydığı için de görülebilir. Bu gerçek, floresans mikroskobunun temelini oluşturur. Bazı moleküller yayılan enerjiyi absorbe ettiklerinde, uyarılırlar ve daha sonra hapsedtikleri enerjinin çoğunu ışık

enerjisi olarak bırakırlar. Uyarılmış bir molekül tarafından yayılan herhangi bir ışık uzun dalgaboylu yani (düşük enerjili) olur; sonra radyasyon absorbe edilir. Floresans ışığı, uyarılmış molekül tarafından çabucak yayılır. Floresans mikroskobu, örneği morötesi, mor ya da mavi ışığa maruz bırakarak nesnenin floresans ışığı sonucuyla görüntü oluşturmasını sağlar. Civa buharlı ark lambası ya da başka kaynaklar yoğun bir ışık hüzmeleri üretirler ve ısı transferi özel bir kırmızıötesi filtre tarafından sınırlandırılır. Işık, sadece istenilen dalgaboyunu geçiren uyarıcı filtreden geçer. Siyah-zemin kondansatörü koyu bir zemin yaratarak floresans nesnenin parlamasını sağlar. Genellikle, örnek florokrom adlı boya molekülleri ile önceden boyanmış olur. Bu moleküller belli bir dalgaboyundaki ışığa maruz kaldıklarında parlalar, fakat bazı mikroorganizmalar kendilerinden floresansdır. Objektif merceklerinin arkasına yerleştirilen engel filtre, gözlemcinin gözüne zarar verebilecek geride kalan morötesi ışığını, görüntünün kontrastını düşürebilecek mavi ve mor ışığı ayırır.



Floresans mikroskobu tıbbi mikrobiyolojide ve mikrobiyal ekolojide kullanılan çok önemli bir alettir. Bakteriyel patojenler, floresansla boyanarak ya da floresan antikorları ile işaretlenerek tanımlanabilir. Ekolojik çalışmalarda, floresans mikroskobu, mikroorganizmaları floresan akrinin turuncusuyla boyanarak gözlemlenir. Böylece mikroorganizmalar ekolojik nişleri (göreceli olarak) bozulmadan doğrudan sayılabilirler.

#### Örnek Hazırlanması ve Boyama

Işık mikroskobuyla mikroorganizmalar doğrudan gözlenebildiği halde, çoğunlukla tesbit edilmiş ve boyanmış olarak kullanılırlar. Bu yöntem görünürlüğünü, özel morfolojik bölümleri kontrastlaştırılmasını ve ileriki çalışmalar için korunmasını sağlar.

Boyanmış hücreler yaşayan hücreyi mümkün olduğu kadar fazla temsil edebilmelidir. Sabitleme içsel ve dışsal yapının sabitlenip korunması demektir. Bu yöntemle hücre morfolojisini bozabilecek enzimlerin de aktivasyonu engellenmiş olur.

Genel olarak iki tür sabitleme yöntemi vardır.

1) Bakteriologlar, bakteriyi cam üzerine koyup, aşağıdan ısıtarak sabitliyorlar. Bu tüm morfolojiyi korur, fakat hücre içindeki yapılar bozulur.

2) Kimyasal sabitleme narin hücresel yapıların korunması için ve morfolojik olarak daha büyük mikroorganizmalarda kullanılır. Kimyasal sabitleyiciler, mikroorganizmanın içine, özellikle protein ve yağlara, nüfuz ederek hücre içi organik maddelerin çözünmez, hareket etmez ve aktivasyonsuz hale getirirler.

Çokça kullanılan sabitleyiciler, etanol, asetik asit, formaldehit ve glutaraldehitlerdir.

#### Boyalar ve Basit Boyama

Çokça çeşidi olmasına karşın boyaların genel olarak iki önemli özellikleri vardır.

1) Hepsisi kromofor grubundandır; boyaya kendi rengini veren bağlı gruba aittirler.

2) Hücreye iyonik, kovalan, ya da hidrofik bağla bağlanırlar. Örnek olarak, pozitif yüklü bir boya, hücrenin negatif

yüklü yapısına bağlanır. İyonlarına ayrılabilen boyalar da iki genel sınıfa ayrılırlar.

1) Bazik Boyalar-metilen mavisi, kristal viole, safran boyalarının pozitif yüklü grupları vardır ve genelde klorit tuzu olarak satılırlar. Bazik boyalar negatif yüklü moleküllere bağlanırlar. Bakterinin yüzeyinin negatif yüklü olması nedeniyle, bazik boyalar bakteriyolojide çok fazla kullanılırlar.

2) Asidik Boyalar- eosin, bengal kırmızısı, negatif yüklü grup taşırlar. Negatif yüklü olmaları nedeniyle pozitif yüklü hücre yapılarına bağlanırlar.

Anyonik boyalar asitli ortamlarda proteinler ve diğer pozitif yük taşıyan molekülleri boyarken, bazik boyalar yüksek pH derecelerinde en fazla etkinlik düzeyine ulaşabiliyor.

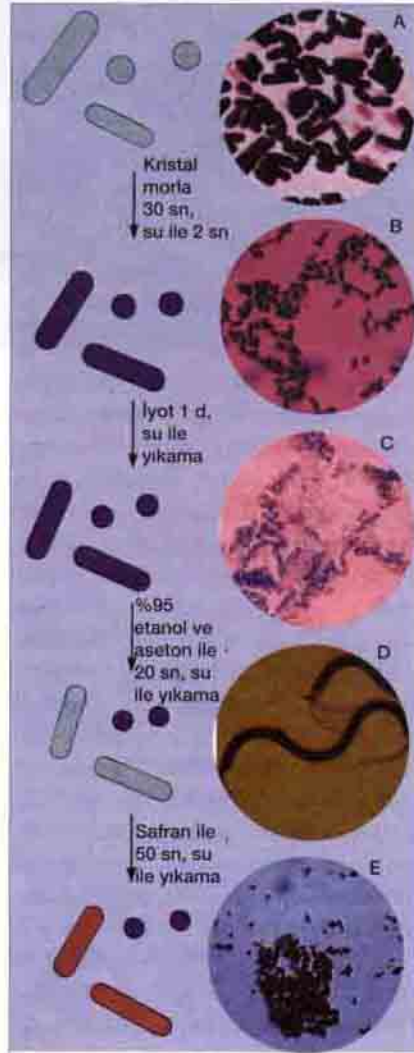
#### Differansiyel Boyama

Bu prosedürde bakteriler boyama özelliklerine göre ayrılırlar. Gram Boyama, 1884'te Hollandalı bir hekim olan Christian Gram tarafından geliştirildi. Bu prosedür bakteriyi iki ana gruba gram pozitif ve gram negatif olarak ayırıyor.

Gram-boyamanın ilk aşamasında bakteri bazik kristal mor ile boyanıyor. Daha sonra iyot çözeltisi ile yapılan işlemde, bu çözelti boyasaptar (mordan) görevi yapıyor. İyot, burada hücre ile kristal mor arasındaki bağı kuvvetlendiriyor. Bakteri etanol ve asetonla yıkılarak renksizleştiriliyor. Bu adım bakteri ayırımındaki en önemli adım. Gram-pozitif bakteri kristal mor ile boyanırken, gram-negatif bakteri renksiz oluyor. En son olarak bakteri bazik safran ile boyanıyor. Böylece renksiz gram-negatif bakteri pembemsi bir renk alıyor.

Tüm bunların yanında mikroorganizmaların özel yapılarını boyamak için de çeşitli yöntemler geliştirilmiş. Bakteri kapsülü için Hint mürekkebi kullanılıyor. Endospor boyaması için ilk önce malahit yeşili (bakır taşı yeşili) ile kaynatılıyor, yıkıyor, sonra tekrar safran ile boyanıyor. Kamçı (flagella) için farklı bir yöntem kullanılıyor, boyamadan ziyade kalınlaştırmak için üzeri tonik asit ve potasyum akım kullanılıyor.

Özgür Ergin



Gram-boyama metodu: Etanol ve asetonun gram-negatif hücrelerden kristal morunu ayırdığına dikkat etmek gerekir.

- A- Gram-pozitif Clostridium (x800),
- B- Staphylococcus aureus aydınlık-alan mikroskobu (x1000) gram pozitif.
- C- E.Coli (x500).
- D- Spor boyama (x1000).
- E- Kamçılı boyama (x400)

Konu Danışmanı: Adnan Ataç

Yrd. Doç. Dr. GATA Tıp Tarihi Dermatoloji Ana B. D.

Kaynaklar

- Prescott, M. Mikrobiyoloji, WCB, 1990
- Rachon, G. Microscopy by Means of Light, Electron, X-Ray or Laserlight, Plenum, 1994
- Starr, C. Biology: The Unity and Diversity of Life, Wadsworth, 1989
- The American Museum of Natural History, <http://research.amnh.org/diff/sem/ikb.html>

Hafif olan  
sadece ağırlığı değil



Safilo FLY çok hafif, çünkü çerçevesiz.

Ancak Safilo kalitesi ve garantisiyle  
üretilen Safilo FLY, diğer  
hafif gözlükler gibi değil.

Çünkü onun fiyatı da hafif.

Hafif gözlüğüne  
ağır bir fiyat ödemek  
istemiyorsanız

Şişli Optikler'e gelin.

Safilo FLY  
bütün model  
seçenekleriyle  
Şişli Optikler'de.

BY  
Safilo®

 Şişli Optik  
"Doğru gözlüğün adresi"

ŞİŞLİ

Halaskargazi Cad. No: 270  
(0) 212 - 233 63 17 - 246 74 84

AKMERKEZ

No: 177 Etiler  
(0) 212 - 282 01 27-28

ŞAŞKINBAKKAL

Bağdat Cad. No: 368/10  
(0) 216 - 358 73 45 - 411 37 61