

KÜLTÜR ELDE ETME

1. EKİM İŞLEMİ

1.1. Tanımı Dikkat Edilecek Noktalar

Ekim (inokülasyon), numunenin steril besiyerine aseptik tekniğe uygun olarak aktarılması olayıdır.

Ekim işlemleri sırasında şu hususlara dikkat edilmelidir:

- Ø Seyreltme işlemi bitirildikten sonra hızla ekim yapılmalıdır. Bu amaçla bir örneğin ekimi tümüyle bitirildikten sonra diğer örneğin seyreltme işlemine başlanmalıdır.
- Ø Dilüsyonların yapılmasından sonra, petri kutularına ekim sırasında, materyalin mikroorganizma yükü hakkında eğer yaklaşık bir bilgimiz varsa, tüm dilüsyonlardan değil sadece 3 dilüsyondan paralel ekim yapılır.
- Ø Ekim sırasında örneğin kontaminasyonu kesinlikle önlenmelidir. Bu amaçla çalışmalar bunzen beki alevi kullanılarak yapılmalıdır.

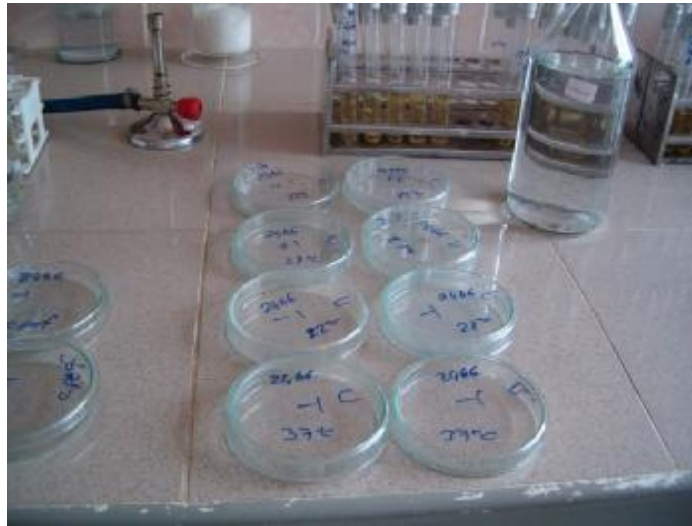


Resim 1.1: Bunzen beki

Ø Petri kutusuna yapılacak ekimlerde örnek ile ilgili bilgilerin asetat kalemi ile kapaklara doğru olarak yazılması gerekmektedir. Bunlar;

- Besiyeri türü,
- Numune numarası veya adı,
- Tarih,
- İnkübasyon ısı derecesi,
- Dilüsyon faktörü,
- Petri kutusuna pipetlenen hacim miktarı gibi bilgilerdir.

Ø İnkübasyon sonunda petri kutusunda sayılacak olan koloni adedi bu faktör ile çarpılarak materyaldeki canlı mikroorganizma sayısı hesaplanır. Örneğin, 2 numaralı dilüsyon tüpünden petri kutusuna 1 ml pipetlendiyse, kutu kapağına sadece 10^{-2} yazılır. Bu yazım şekli ekim ve sayım işlerinin farklı kişiler tarafından yapıldığı yoğun laboratuvarlarda karışıklığın önlenmesi için etkin bir yoldur. Ancak kapakların karışması olasılığı ile petri kutularında yazımlar tabana da yapılabilmektedir.



Resim 1.2: Petri kutularının yazımı

- Ø Ekim işlemi numune katı ise iğne, sıvı ise öze ile gerçekleştirilir.
- Ø Ekim işlemi seri olarak gerçekleştirilmelidir.
- Ø Tüm işlemler esnasında aseptik çalışma kurallarına uyulmalıdır.

1.2. Ekim Teknikleri

Mikrobiyolojide ekim, sıvı ve agarlı besiyerine yapılır.

1.2.1. Sıvı Besiyerine Ekim İşlemi;

1.2.1.1. Sıvı Besiyerine Öze ile Ekim İşlemi

- Ø Sıvı besiyerine ekim işleminin ilk aşaması, aktarılacak sıvı örnekteki mikroorganizmaların bulundukları sıvı içinde homojen dağılımını sağlamak için vorteks tüp karıştırıcısı kullanılarak çalkalanmasıdır. Bu cihazın olmadığı durumlarda tüp iki el ayası arasına yerleştirilir, el ayaları ile sürtme hareketi yaptırılarak homojen karışım sağlanabilir ya da tüpün alt kısmına birkaç kez vurulabilir. Ekimi yapılacak numune katı ise karıştırma işlemi yapılmaz.
- Ø Homojen karışımı sağlanmış numune tüpü sol ele alınır.
- Ø Öze, alevde akkor haline getirilerek sterilize edilir.
- Ø Sol elde bulunan tüpün kapağı ya da ağzındaki pamuk tıkaç, öze tutulan sağ elin parmaklarıyla, tüp hafifçe eksen etrafında çevrilerek çıkarılır. Tüpün ağız kısmı alevden geçirilir.



Resim 1. 3: Tüp ağzının alevden geçirilmesi

- Ø Tüp hafif eğilerek öze ucu sıvı örneğe daldırılır. Öze ucuna sıvı içinde karıştırma hareketi yaptırılır. Öze tüpe hiç değmeyecek şekilde dışarı çıkartılır.
- Ø Öze ile örnek alımını takiben örneği içeren tüpün ağız kısmı alevden geçirilir ve ağzı kapatılır. İş biten bu tüp, tüplüğe konur.
- Ø Sol ele steril sıvı besiyerini içeren tüp alınır ve olabildiğince dip tarafından tutulur, kapağı veya pamuk tıkaçı alev çatısı altında öze tutan sağ elin küçük ve yüzük parmaklarıyla avuç içine sıkıştırılarak çıkarılır.
- Ø Tüpün ağzı alevden geçirilir ve tüp hafifçe eğik vaziyette alev çatısı altına indirilir.
- Ø Öze tüp içerisine sıvı seviyesine kadar sokulur ve öze ucu sıvıya daldırılmadan, sıvı yüzeyinin hemen üstündeki kuru bir tüp bölgesine değdirilir ve sürtme hareketleri yaptırılarak incelencek örneğin bu bölgede yayılması sağlanır.
- Ø Daha sonra, öze ucu sıvı besiyerine daldırılır ve özeye karıştırma işlemi yaptırılır

- Ø Öze ucu besiyerinden çıkarılarak tekrar örneğin yayıldığı bölgeye temas ettirilir. Öze bu bölgede sürtme hareketleri yaptırılır, incelenecek örneğin besiyerine doğru yıkanarak aktarılması sağlanır.
- Ø Öze ile gerçekleştirilen bu ekim duruma göre birkaç kez tekrarlanabilir. Sonuçta, örneğin sıvı besiyerine aktarılması (inokülasyonu) sağlanmış olur. Besiyerinin ağzı kapatılır.
- Ø Son olarak öze sterilize edilir.
- Ø Tüpteki sıvı besiyerine ekim, örnek ve steril besiyeri tüpleri aynı elde tutularak da gerçekleştirilebilir.

1.2.1.2. Sıvı Besiyerine Pipet ile Ekim İşlemi

- Ø Homojen karışımı sağlanmış numune tüpü sol ele alınır.
- Ø Pipet birkaç kez alevden geçirilir.
- Ø Sol elde bulunan tüpün kapağı ya da ağzındaki pamuk tıkaç, öze tutulan sağ elin parmaklarıyla, tüp hafifçe eksenini etrafında çevrilerek çıkarılır. Tüpün ağız kısmı alevden geçirilir.
- Ø Tüp hafif eğilerek pipet ucu sıvı örneğe daldırılır.
- Ø Pipetle gerekli hacimde sıvı çekilir. Pipet ucu tüpe hiç değmeyecek şekilde dışarı çıkartılır.
- Ø Pipet ile örnek alımını takiben örneği içeren tüpün ağız kısmı alevden geçirilir ve ağzı kapatılır. İş biten tüp tüplüğe konur.
- Ø Sol ele steril sıvı besiyerini içeren tüp alınır ve olabildiğince dip tarafından tutulur, kapağı veya pamuk tıkaçı alev çatısı altında pipet tutan sağ elin küçük ve yüzük parmaklarıyla avuç içine sıkıştırılarak çıkarılır.
- Ø Pipetin alt ucu tüp içerisindeki besiyerine daldırılmadan, besiyeri seviyesinin hemen üstündeki kuru bir tüp bölgesine değdirilerek, pipetin kendi kendine boşalması ve örneğin sıvı besiyerine aktarılması (inokülasyonu) sağlanmış olur.
- Ø Besiyerinin ağzı kapatılır.
- Ø Pipet tekrar birkaç kez alevden geçirilip temizleme küvetine konur.
- Ø El ayaları ile sürtme hareketi yaptırılarak aktarılan örneğin ve besiyerinin homojen karışım sağlanır.



Resim 1.4: Kapakların çıkartılması



Resim 1.5: Ağızların alevden geçirilmesi



Resim 1. 6: Özeyle numunenin alınması



Resim 1.7: Ağızların tekrar alevden geçirilmesi



Resim 1.8: Özeyle ekim yapılması

1.2.2. Agarlı Besiyerine Ekim İşlemi

Petri kutularına dökülmüş agarlı besiyerlerine;

- Ø Sürme
- Ø Yayma
- Ø Dökme plak yöntemlerinden birisi kullanılarak ekim yapılabilir.

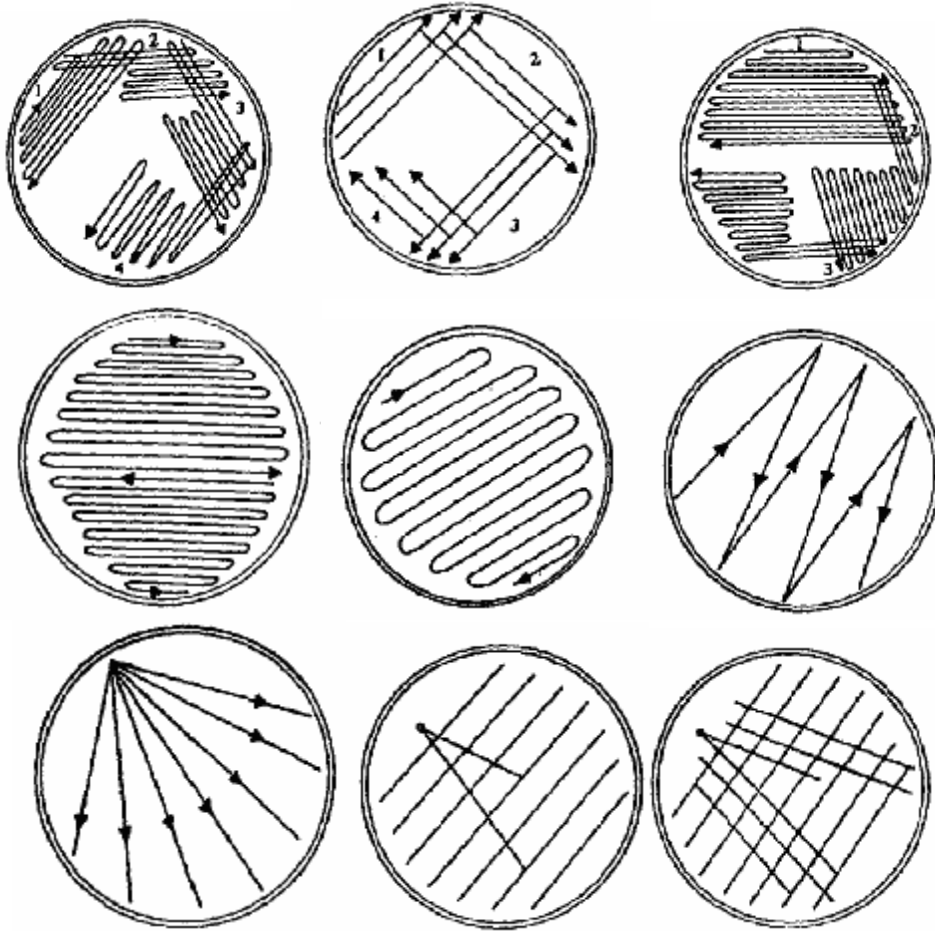
1.2.2.1. Sürme Yöntemi

Bu yöntemle petri kutusundaki katı besiyerinin belirlenen farklı bölgelerine numune ile temas ettirilen özenin sırayla sürülmesiyle numunenin miktarı ve içerdiği mikroorganizma sayısı giderek azalır. Böylece bakterilerin her sürme alanına bir önceki alandan daha az sayıda düşmeleri sağlanır. Son sürme alanında bakteri sayısı teke düşer. Bu bakteriler teke düştükleri bölgelerde çoğalarak tek koloni oluşturur.

Bu yöntemle ekimin amacı her canlı hücrenin inkübasyon sonucu bir (1) adet koloni oluşturmasıdır. Bu nedenle sürme yöntemine **tek koloni düşürme** yöntemi de denir.

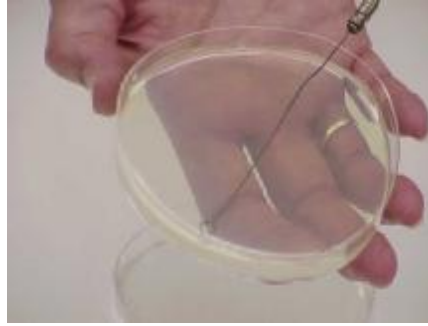
Sürme yöntemiyle ekim şu şekilde yapılır:

- Ø Ekimi yapılacak örnek öze veya pipet ile sıvı besiyerine ekim işlemindeki gibi alınır.
- Ø Agarlı besiyerini içeren petri kutusu sol elin ayasına yerleştirilir ve bu elin baş ve işaret parmağı ile kapak kısmı açılır.
- Ø Öze bu aralıktan içeri sokularak öze ucunun örnek alınan kısmı agar yüzeyinin seçilecek bir bölgesine temas ettirilir. Örnek bu bölgede hafifçe ezilerek birkaç mm çapında yayılır.
- Ø Daha sonra öze ile bu yayılma alanından başlayarak sürme işlemine geçilir. Sürme işlemi değişik şekillerde gerçekleştirilebilmektedir. Ancak ayrı ayrı koloni elde edebilmek için en ideal olanı 4 ayrı bölgenin çizilmesidir.



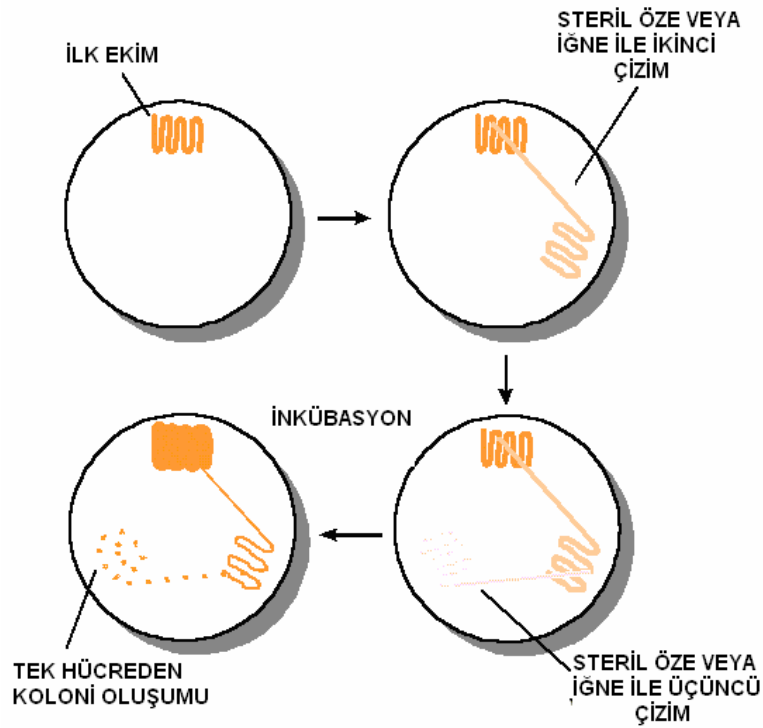
Şekil 1.1: Sürme yöntemiyle ekim şekilleri

- Ø Sürme yapılırken özenin agar yüzeyinde uygun açı ile tutulmasına ve agar yüzeyini parçalamadan temas ettirilmesine dikkat edilmelidir.



Resim 1.9: Katı besiyerine sürme işlemi

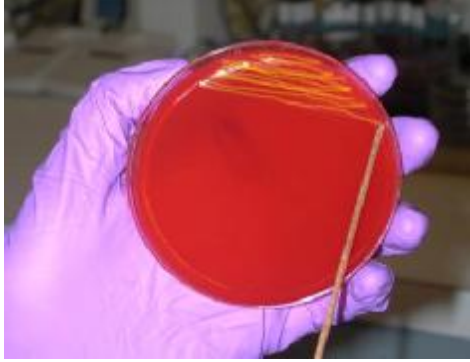
- Ø Sürme olayı ilerledikçe örnekteki mikroorganizma sayısı, özenin ilk sürüldüğü bölgeye göre gittikçe azalacaktır. Bunun sonucunda da inkübasyondan sonra, son sürme işlemlerinin yapıldığı agar yüzeyi bölgelerinde izole koloniler elde edilebilecek, diğer bir deyimle koloniler tek tek düşebilecektir. İkinci, üçüncü ve dördüncü ekim bölgelerine her geçişte öze, bek alevinde tutularak soğutulduktan sonra bir önceki bölgeye temas ettirilir ve sürme işlemine devam edilir.



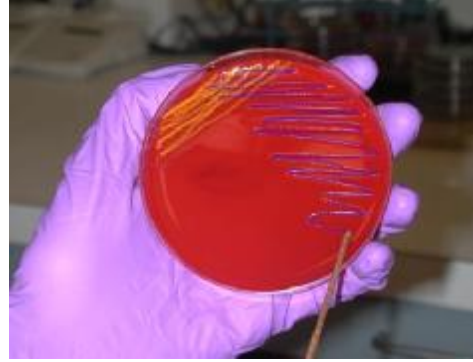
Şekil 1.2: Sürme yöntemiyle koloniye teke düşürme

- Ø Sürme işlemi bitince petri kutusunun kapağı kapatılarak inkübasyona bırakılır.

Agar yüzeyinde bir bölgeden diğer bölgeye geçişte kaç defa sürme yapılacağı, aktarma yapılan örnekteki mikroorganizma yükünü tahmin etmeye bağlıdır.



Resim 1. 10: Birinci sürme



Resim 1. 11: İkinci sürme



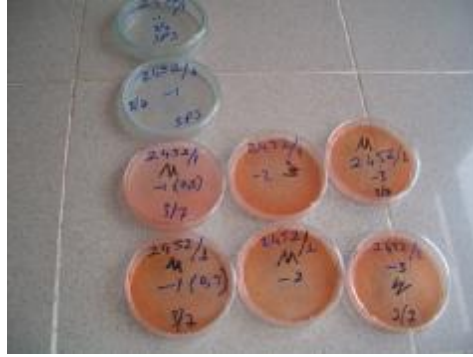
Resim 1. 12: Üçüncü sürme



Resim 1. 13: Dördüncü sürme

1.2.2.2. Yayma Yöntemi

- Ø Ekim öncesinde standart petri kutularına 12–15 ml agarlı besiyeri dökülerek yüzeyin kuruması sağlanır.
- Ø Petri kutusuna gerekli bilgiler yazılır.



Resim 1. 14: Petri kutusunun yazılması

- Ø Numunenin bulunduğu tüp ya da kaptan 1 ml lik gibi düşük hacimli bir pipetle 0.1 ml örnek alınır.
- Ø Petri kutusundaki katı besiyeri yüzeyine pipetle 0.1 ml örnek aktarılır.



Resim 1. 15. Numunenin katı besiyerine aktarımı

- Ø Drigalski spatülü, temiz ve yeterli konsantrasyonda alkol ile sterilize edilir. Spatül üzerinde kalan alkol, besiyerine aktarılan mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etki yapabileceği için alevden geçirilerek uzaklaştırılır. Ancak mikroorganizmaya zararlı olabilecek kadar ısıtılmaz. Besiyeri üzerinde kültür aktarılmamış bir yerde dokundurularak soğuyup soğumadığı kontrol edilir ve örnek besiyeri yüzeyine homojen olarak yayılır.



Resim 1. 16. Drigalski ıspatul ile numunenin yayılması

- Ø Numune yüzeye yayıldığı için tüm mikroorganizmalar eşit oranda oksijen varlığı nedeniyle aynı morfolojide koloni oluşturacaktır.
- Ø Bu yöntem gıda maddesinin gramında 100'den fazla Staphylococcus aureus bulunma olasılığı varsa uygulanmaktadır.

1.2.2.3. Dökme Plak Yöntemi

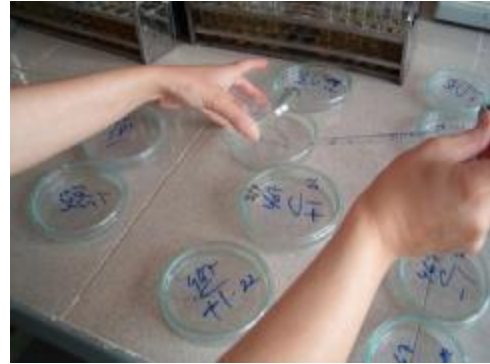
Bakterinin 45–50 °C'a kadar soğutulmuş katı besiyerinin her tarafına karıştırılmak suretiyle ekilmesidir.

Dökme plak yönteminde ekim şu şekilde yapılır.

- Ø Dilüsyonu yapılmış gıda örneğinden 1 ml sıvı pipete alınır ve steril boş petri kaplarına aktarılır.



Resim 1. 17: Numunenin alınması



Resim 1. 18: Numunenin boş petriye aktarılması

- Ø Örneğin üzerine 15–20 ml, yaklaşık 45°C' taki agarlı besiyeri dökülür. Besiyeri sıcaklığı fazla olursa termal şok nedeni ile mikroorganizmalar zarar görür, düşük olursa dökme esnasında katılaşacağı için istenen sonuç elde edilemez.



Resim 1. 19: Besiyerinin dökülmesi

- Ø Besiyeri döküldükten hemen sonra düzgün bir zeminde dikkatlice hafif eğim verilerek ileri geri hareket ettirilir. Bu sayede numune ve örneğin tam olarak karışması sağlanır.



Resim 1. 20: Petriye ileri geri sallama hareketinin yaptırılması

- Ø Petri kutularının düzgün bir zeminde kendi halinde jelleşmesi sağlanır.
- Ø Uygun sıcaklıktaki inkübasyona bırakılır.

Besiyerine diğer yöntemlerden fazla numune aktarıldığı için daha hassas sonuç verir. Bu yöntemde numunenin tüm besiyeri kütlesine yayılması nedeniyle mikroorganizmalar taban ve yüzeye yakın kısımlardaki oksijen varlığı nedeniyle farklı morfolojide koloni oluşturabilecektir.

1.2.3. Yüzeylerden Alınan Örneklerin Ekim İşlemi

Yüzeylerden örnek alma;

- Ø Eküvyon
- Ø Agar sucuğu
- Ø Sellobant tekniği
- Ø Yüzey kazıma ya da yüzeyden ince kesitler alma,
- Ø Yüzey yıkama
- Ø Dilüsyon sıvısına daldırma tekniklerinden biri seçilerek yapılabilir.

Eküvyon:

- Ø Steril eküvyon örnek alınacak bölgeye götürülür.
- Ø Eküvyon çubuğu aseptik koşullarda tüpünden çıkarılır.
- Ø Uçtaki pamuk kısma değişik eğimler verilerek örnek alınacak yüzeye kuvetlice bastırılır. Bu sayede yüzeydeki mikroorganizmaların pamuk ucunun tamamına geçmesi sağlanır. Eküvyon çubuğu bu işlemler sırasında üst ucundan tutulur.
- Ø Eküvyon çubuğu daha sonra hiçbir yere temas ettirilmeden tüpüne yerleştirilerek tüp hızla laboratuvara ekim için götürülür.
- Ø Eküvyon çubuk, alev çatısı altında tüpten çıkarılarak uç kısmı daha önceden hazırlanmış petri kutusundaki agarlı besiyeri yüzeyinin kenar kısmındaki herhangi bir noktaya temas ettirilir. Bu işlem sırasında besiyerinin yırtılmamasına dikkat edilmelidir.
- Ø Daha sonra petri kutusunun kapağı kapatılır.
- Ø Eküvyon çubuğu tüpüne yerleştirilerek sterilize edilmek üzere ayrılmalıdır.
- Ø En son aşamada ise petri kutusundaki besiyerinde örneğin temas ettirildiği noktadan başlamak üzere öze ile sürme ekime geçilir.

Yüzeydeki mikroorganizmalar sayılmak istendiğinde ise eküvyon çubuğu laboratuvarında tüpten çıkarılarak, daha önceden hazırlanmış olan tüpteki steril 10 ml'lik dilüsyon sıvısına aseptik koşullarda daldırılır ve tüpün ağzı kapatılır. Bu işlemler sırasında çubuğun tüpe giren kısmına elle dokunulmamalıdır. Daha sonra sıvı besiyerine ekim işlemleri takip edilerek ekim gerçekleştirilir.

Agar sucuğu:

Direkt olarak bir besiyerini örnekle temas ettirme esasına dayanır. Steril agar sucuğu yüzeye temas ettirilir daha sonra steril bistüri ile ince kesitler alınarak steril petri kutusuna yüzeye sürülen kısmı üste gelecek şekilde yerleştirilip laboratuvara gönderilir. Yaygın kullanımı yoktur.

Sellobant tekniği:

Bu yönteme çok sık başvurulmamaktadır.

- Ø İncelenecek yüzeye sellobantın yapışkan yüzeyi temas ettirilerek örnek alınır.
- Ø Örnek alınan kısım petri kutusundaki agarlı besiyeri yüzeyine temas ettirilir
- Ø Diğer yüzünden hafifçe baskı yapılarak belli bir süre beklenir.
- Ø Daha sonra da bant buradan çıkarılarak bir dezenfektan çözeltisine atılır.
- Ø Sürme ekim yöntemi uygulanarak inkübasyona bırakılır.

Bunların dışında;

- Ø Yüzey kazıma ve yüzeyden ince kesitler alma
- Ø Yüzey yıkama
- Ø Dilüsyon sıvısına daldırma gibi yöntemlerde uygulanabilmektedir.

1.2.4. Dik Agarlı Besiyerine Saplama Ekim

Tüpteki yüksek tabakalı (10–15 ml besiyeri bulunan) katı besiyerine, bakterinin uzun bir iğne ile tüpün dip kısımlarına kadar batırılmasıyla yapılan ekim yöntemidir. Bu şekilde bakterinin jelatin eritmesi veya karbonhidratlı jelozlu besiyerinde gaz oluşturma kolayca incelenir, üreme bölgesine göre bakterinin aerob, anaerob, fakültatif veya mikroaerobmi olduğu, bakterinin hareketli olup olmadığı hakkında bilgi edilir.

2. İNKÜBASYON

Ekimi gerçekleştirilen sıvı ya da katı besiyerinin bulunduğu tüp veya petri kutusunun, uygun bir inkübatörde, mikroorganizmaların üreyebileceği sıcaklık ve sürede tutulması işlemine inkübasyon denir.

İnkübasyon sıklıkla etüv ve su banyosunda gerçekleştirilir. Küflerin inkübasyonu oda sıcaklığında yapılabilmekle birlikte kontrolsüz ortam olduğu için tercih edilmemektedir.

2.1. Etüvde İnkübasyon

Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan, 0-90°C aralığında çalışmaya imkan veren etüvlere **inkübatör** adı verilir. İnkübatörde (etüvde) mikroorganizmaların üremesi için uygun sıcaklık ve süre diğer bir deyişle üreme ortamı sağlanır.

İnkübatör (etüv); mikroorganizmanın üremesi için gerekli ısıya göre ayarlanabilen ve bu sıcaklığı belli derecede muhafaza edebilen elektrikli cihazlardır. En çok 100°C civarında sıcaklık sağlanabilir. Sterilizatör ve kurutma dolaplarına benzer, genellikle dört köşelidir. Tek veya iki kapılı olanları vardır. Anaerob tipleri de mevcuttur.



Resim 2 1: Etüv çeşitleri

2.2. Su Banyosunda İnkübasyon

Su banyosunda genellikle yüksek sıcaklığa duyarlı besiyerlerinin inkübasyonu yapılır. Burada önemli olan su banyosunun termostatlı olması ve istenilen sıcaklığın homojen şekilde dağılmasını sağlayan karıştırma düzeneğinin olmasıdır. Ayrıca inkübasyon süresince sıcaklık kontrolleri de yapılmalıdır.



Resim 2 2: Su banyosu

Su banyolarında sıcaklık 100°C'ye kadar ayarlanabilir. Bu banyo içine daldırılan bir kaptaki maddenin sıcaklığı en fazla 80–85°C'ye yükseltilebilir. Sıcaklığı ayarlanabilen, termostatlı su banyoları ile istenilen sıcaklığı ayarlamak mümkündür. Su banyoları ile uzun süre çalışılacaksa içlerindeki suyun tamamen buharlaşmamasına dikkat edilmeli ve eksilen su ilave edilmelidir.



Resim 2 3: Su banyosu çeşitleri

2.3. İnkübasyonda Dikkat Edilecek Hususlar

İnkübasyonda aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir;

- Ø Belirtilen inkübasyon süresi ile sıcaklık derecesine dikkat edilmelidir. Bu amaçla inkübatör sıcaklığı minimum-maksimum termometre ile kontrol edilmelidir. Anaeroblar için gaz atmosferine uyulmalıdır.
- Ø İnkübasyon 37°C ve üstündeki sıcaklık derecelerinde gerçekleştiriliyorsa petri kutuları ters çevrilerek (tabanları üstte, kapakları altta olacak şekilde) inkübatöre konulmalıdır. Bu sıcaklık derecelerindeki inkübasyon 24 saatten fazla sürecekse, inkübatöre içinde su olan bir beher konularak petri kutularında yüzey kuruması önlenmelidir. Petri kutularının stretch filme sarılması veya naylon torba içerisinde inkübatöre bırakılması da kurumayı önleyici bir uygulamadır.
- Ø Membran filtrasyon uygulamalarında petri kutuları düz çevrilerek (kapakları üstte, tabanları altta) inkübatöre konulmalıdır.
- Ø İnkübatörde cam petri kutuları 6 'dan plastik petri kutularında 8'den daha fazla üst üste konulmamalıdır.



Resim 2 4: İnkübatörde inkübasyon için yerleştirilmiş besiyerleri

- Ø İnkübatörde sıcaklık değişmelerini önlemek için kapağın gereksiz yere açılmamasına özen gösterilmelidir.
- Ø Petri kutularının ve inkübatör duvarlarının arasındaki boşluk sıcaklık dağılımının düzenli olması için yaklaşık 2.5 cm olmalıdır.
- Ø İnkübasyon sonrasında petri kutusu tartılmalıdır. İnkübasyon öncesi ve sonrasında izin verilen maksimum ağırlık kaybı oranı %15'tir. Ağırlık kaybı daha fazla ise düzeltici işlemler yapılmalıdır.
- Ø İnkübasyon sıcaklık derecesi üremesi istenen bakteri özelliği doğrultusunda şu şekilde belirlenir:
 - Bazı mikrokok çeşitleri gibi serin sıcaklığı seven **psikrofil** bakteriler için inkübasyon sıcaklığı genel olarak +7°C'dir.
 - Ilık sıcaklığı seven **mezofil** bakteriler için 25-40°C'dir.
 - Yüksek sıcaklıkları seven **termofil** bakteriler için inkübasyon ısı derecesi genellikle 55-60°C'dir.
 - Çok yüksek sıcaklıkları seven **ekstrem termofiller** için ise inkübasyon sıcaklığı genel olarak 85°C'dir.

3.1. Kùltür Çeşitleri ve Tanımları

3.1.1. Saf Kùltür

Doğada her yerde mikroorganizmalar, birçok farklı türlerin oluşturduğu topluluklar şeklinde bulunur. Buradan alınan örnekler besiyerine ekilerek birçok bakteri türü bir arada üretilir. Birden fazla bakteri türünün ürettiği kùltürlere **karışık kùltürler** denir.

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında her bir mikroorganizmanın özelliğinin incelenmesi ve tanısının yapılabilmesi için saf kùltürlerinin elde edilmesi de gerekir. Bu nedenle karışık kùltürlerin saflaştırılması gerekmektedir.

Bir koloniden alınan ve üretildiğinde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genel özellikleri birbirinin aynı olan bakteri kùltürüne “**saf kùltür**” adı verilmektedir. Saf kùltür yalnızca bir tür mikroorganizma üretilmesi ile elde edilen kùltürdür.

Gıdada mevcut mikroorganizmanın cins, tür düzeyinde tanısını yapabilmek ve adlandırmak için saf kùltür halinde üretilmesi zorunludur.

Saf kùltür, önce katı besiyerinde oluşmuş her farklı koloniden steril bir başka tüp içindeki sıvı veya katı yatık agara ekim yapılarak elde edilir. Saf kùltür için tek koloni elde etme gerekliliğı vardır.

3.1.2. Stok Kültür

Saf kültürün laboratuvarda yapılacak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklanması işlemine “**stok kültür**” elde etme denir. Ölmeden saklanmaları için yeni besiyerlerine ekilmelidir. Bazı bakteriler eski kültürlerinde de uzun süre canlı kalabilmektedir. Saf kültürün yeni besiyerlerine ekilmesi veya deney hayvanlarına nakledilmesi işlemine “pasaj yapmak” denir.

3.2. Saf Kültür Elde Etme Aşamaları

Ø Birinci aşama: İzole koloniler elde etme

Saf kültür elde etmede öncelikle izole koloniler elde edilmelidir. İzole kolonileri elde etmek için;

- Örnekten ekim yapılarak karışık kültür elde edilir.
- Bir miktar kültür öze ile alınır, mikroorganizma hücrelerinin daha rahat yayılarak ayrı ayrı koloni oluşturmaları için petri kutusuna sürme tekniği ile ekilir. Bu sırada bir önceki sürme alanına değmemeye özen gösterilir. Petri kutusunun tercih nedeni besiyeri yüzeyinin daha geniş olmasıdır.



Resim 3.1: Sürme tekniği ile ekim

- Petrinin üzerine gerekli bilgiler yazılarak ters çevrilir.
- Önerilen sıcaklık ve sürede inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrası oluşan koloniler incelenir. Tek kolonilerin gelişip gelişmediğine bakılır.
- Tek hücreden oluşmuş koloniler seçilir ve seçim yaparken tipik koloni görünümünde olmalarına ve diğer bir koloni ile temasta olmamalarına dikkat edilmelidir. Son izolasyon bölgelerinde tek düşen mikroorganizma hücresi çoğalarak saf koloniyi oluşturur.



Resim 3.2: İzole koloninin tespiti

- Eğer tek koloniler gelişmemişse, daha seyreltilmiş kültürlerden tekrar ekim yapılır. Diğer tüm işlemler tekrarlanır.

Ø İkinci aşama: Saf kültür elde etme

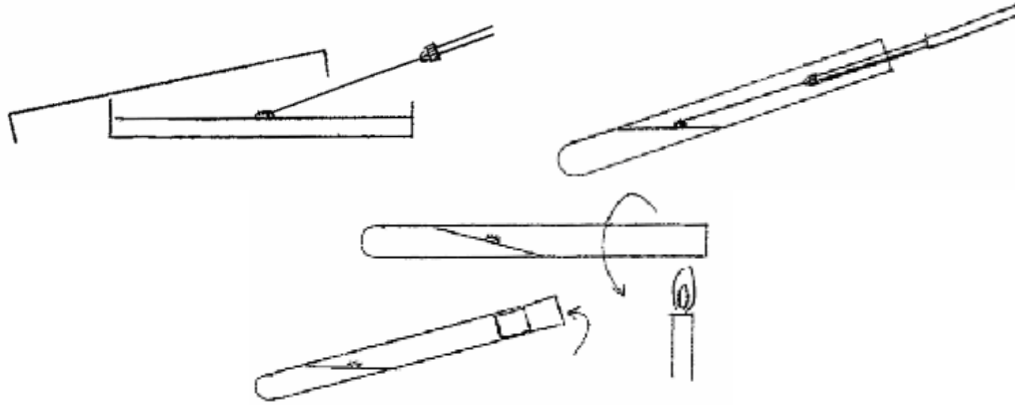
Bunun için;

- İzole koloni öze ile önce sıvı bir besiyerine adaptasyon ve canlandırma amacıyla aktarılır. Bu aşamada koloniler birbirine çok yakınsa iğne öze tercih edilmelidir.



Resim 3.3: İzole koloninin alınması

- Tüp üzerine gerekli bilgiler yazılır ve önerilen sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakılır.
- Inkübasyonu takiben elde edilecek kültürden uygun bir katı besiyerine, genellikle tüpteki yatık agarlı besiyerine tekrar ekim yapılarak inkübasyon gerçekleştirilir. Inkübasyon sonrasında saf kültür elde edilmiş olur.



Şekil 3 1: Saf kültür elde etme

Ø Üçüncü aşama: Saflık kontrolü

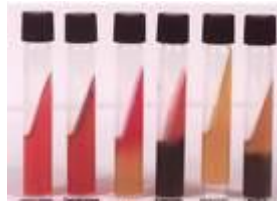
Elde edilen kültürün saf olup olmadığı kontrol edilir. Bunun için;

- Elde edilen kültürden tek koloni düşürme tekniklerinden birisi kullanılarak petri kutusundaki agarlı besiyerine ekim yapılır ve inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrasında besiyeri yüzeyinde oluşan koloniler şekil, yapı, büyüklük, renk vb özellikleri yönünden incelenir. Farklı özelliklere sahip kolonilerin varlığı gözlemlendiğinde kültürün karışık olmasından şüphelenilir.

3.3. Stok Kültür Elde Etme Aşamaları

Stok kültür elde etmenin 2 temel yöntemi vardır:

1.Yatık kültür: Bu yöntemde tüp içinde yatık agarlı uygun bir besiyeri kullanılır.



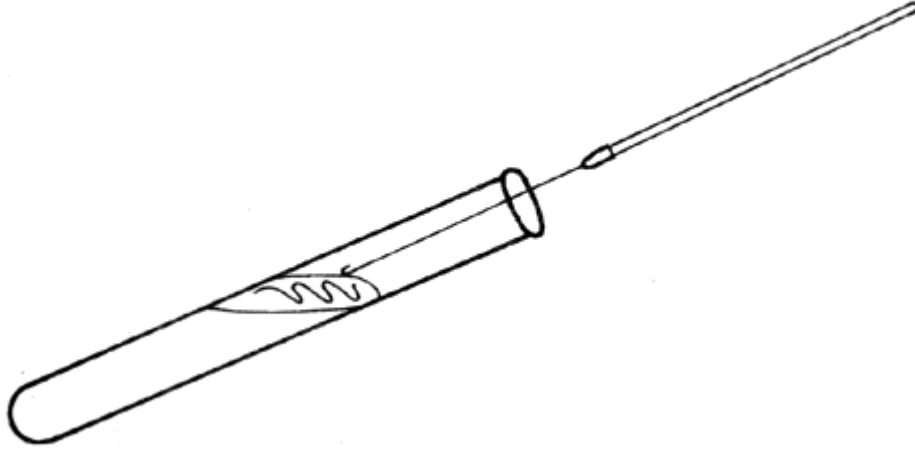
Resim 3.4: Yatık agar kültürleri

Bakteri ve maya kültürleri bu şekilde stoklanır.

Yatık agarlı kültür elde etmek için;

- Ø Öze ile örnek alınır ve alınan örnek tüpteki yatık agar yüzeyinin en alt kısmına temas ettirilir. Örnek burada öze ile hafifçe ezilir ve tüpteki besiyeri içinde, yukarı doğru zikzaklar çizerek tüpten çıkartılır.

Küf kültürlerinin yatık agarlı besiyerine ekimi için öze ile alınan örnek tüpteki yatık agar yüzeyinin tam orta kısmına temas ettirilerek ekilir.



Şekil 3 2: Yatık besiyerine ekim

- Ø Besiyerleri inkübasyona bırakılır. Stok kültürde inkübasyon süresi kısa tutulur, yüzeyde kolonilerin görünmesine yetecek kadar süre yeterlidir.

2.Liyofilize (dondurulmuş ve kurutulmuş) kültürler: Bu yöntemle kültürler uygun ambalaj materyali içerisinde liyofilize edilerek uzun süre dayanabilir. Dondurarak kurutma (freze-drying) adı da verilen liyofilizasyon tekniğinde, yüksek oranda canlılık ve aktivite elde edilir. Bu yöntem özel bir liyofilizasyon aleti ile gerçekleştirilir. Bu yöntemde seçilen bakteriler besiyerinde üretilerek santrifüjlenir. Mikroorganizma kültürü cam bir şişe veya tüp içinde mikroorganizmaların tahrip olmasını önlemek için steril süt, kan serumu veya bazı koruyucu maddelerle eşit oranda karıştırılarak süspansiyon yapılır. Sıvının bulunduğu şişe buz ve alkol karışımı içinde tutularak, kültür -40 ile -70°C arasında dondurulur.



Resim 3.5: Kùltürlerin dondurulması

<0.1mm Hg basınç altında kùltürdeki donmuş su, sıvı hale geçmeden vakumlanır, kurutulur ve toz haline getirilerek ambalajlanır. Ambalaj içindeki kùltür kullanılmak istendiğinde aseptik koşullarda uygun sıvı besiyerine aktararak inkübasyona bırakılır.

3.4. Kùltürleri Muhafaza Etme

Saklama esnasında izole koloni kùltür bakterilerin çoğunun canlı kalması ve mümkün olduğu kadar genetik, fizyolojik değişikliklere uğramaması gerekmektedir.

Bunun için, çeşitli saklama yöntemleri geliştirilmiştir. Soğukta muhafaza, dondurma ve kurutma yöntemleri bunlardan başlıcalarıdır.

Kùltürler buzdolabında 0-5°C’de muhafaza edilmektedir. Bazı fakültatif anaeroplara, tüpte yüksek jelozda üretildikten sonra buzdolabında saklanır. Aerop bakteriler, yatık agar besiyerinde buzdolabında aylarca saklanabilirse de bu yöntem uzun süreli saklamalar için kùltürlerin pasajları esnasında mutasyonlar oluşacağından uygun değildir. Ancak diğere yöntemler kullanılarak bu zorlukların üstesinden gelinebilir.

Dondurarak derin dondurucuda; -20°C’de, muhafaza edilir. Mikroorganizmalar liyofilize stok kùltürlerini hazırlayarak kuru formda canlılık ve aktivitelerini yitirmeden uzun süre saklanabilir.

Buharlaşmayı önlemek için, tüpün ağzı steril mineral yağı ile kapatılır. Zorunlu anaeroplara “tiyoglikolatlı buyyon” gibi kuvvetli indirgen ortamlarda üretildikten sonra saklanır. Şayet saklanan mikroorganizma metabolizma ürünü olarak asit oluşturursa, kullanılan vasatın iyi bir şekilde tamponlanması gereklidir.

Petri kutuları veya tüpteki kùltürleri buzdolabında muhafaza ederken hava ile direkt teması kesmek ve yüzeyel kurumayı önlemek için, petri kutularının alt ve üst kapakları parafilm (veya sellobant) ile birbirine tutturulur, tüplerin ise ağız kısımları parafilm ile kaplanır. Tüpler için parafilm yerine erimiş vazelin, parafin veya vaspara daldırılmış pamuk tıkaçlar da kullanılabilir. Ağzı vida kapaklı tüplerde bunlara gerek yoktur.