

## **BESİYERİ HAZIRLAMA**

# 1. BESİYERİ (ORTAM, VASAT)

Besiyerleri;

- Mikroorganizmaları, bulundukları ortam dışında ve laboratuvarlarda üretmek için formüle edilmiş,
- Mikroorganizmaların gereksinimini olan besin öğelerini içeren,
- pH'ı uygun,
- Besleyici,
- Katı veya sıvı, yapay ortamlardır.

Besiyerlerinin; ortam= vasat= kültür ortamı= kültür vasatı= kültür besiyeri gibi isimler de verilmektedir. Besiyerinin İngilizce karşılığı 'medium' dur.

Besiyerlerinin çok farklı amaçlarla kullanılabilir. Bunlar mikroorganizmaların;

- Üretilmesi, geliştirilmesi ve canlılıklarının korunması,
- Duyarlılık ve sterilité testleri,
- Saf kültürlerinin elde edilmesi(izolasyonu),
- Tanımlanmaları (identifikasyon),
- Sayımları,
- Yapılarının ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi,
- Biyolojik ve metabolik ürünlerinin elde edilmesi
- Gıda, su ve çevre kontrolleri,
- Antibiyotik ve vitamin analizleri olabilir.

Mikroorganizmaların kalıtsal yapıları ve enzim sistemleri farklıdır. Fakat tüm mikroorganizmaların bir ortamda gelişebilmesi için;

- Suya,
- Bir enerji kaynağına (ışık veya kimyasal),
- Bir karbon kaynağına,
- Bir azot kaynağına (organik veya inorganik),
- Vitamin ve mineral maddelere gereksinimleri vardır.

Besiyerlerinin bileşiminde mutlaka bulunması gereken maddeler:

- Su,
- Karbohidratlar veya karbohidratlar bulunmadığı ya da yetersiz olduğunda proteinler gibi enerji kaynakları,
- Proteinler, peptonlar, amino asitler vb. organik bileşikler,  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)\text{PO}_4$  vb. inorganik tuzlar gibi azot kaynağı maddeler,
- Vitaminler (özellikle B grubu), pürin ve primidin bazları, amino asitler gibi üreme faktörleri,
- Na, K, Cl, P, Ca, Fe, Mg, S vb. makro elementlerle, Zn, Mg, Br, Mo, Co, Cu, B vb. mikro elementler yani minerallerdir.

Ototrof (kendi beslek) mikroorganizmalar, çok basit ortamlarda üreyebilirler.

Heterotrof (dış beslek) mikroorganizmaların, gelişebilmesi ve üretilmesi için ortama üreme faktörleri, organik ve inorganik bileşiklerin ilave edilmesi gerekir. Ayrıca patojen bakteriler ve laktik asit bakterileri vb üretiminde kullanılacak besiyerlerine seçici veya ayırt edici maddeler de katılmaktadır.

Bu nedenlerle tüm mikroorganizmalar için uygun tek bir besiyeri formülü yoktur. Laboratuvarlarda;

- Kullanım amacına,
- Bileşimine,
- Hazırlanış şekline göre uygun besiyeri seçilir.

Örneğin süt tüm mikroorganizmaların gelişmeleri için gerekli besin öğelerini ve suyu içerir. Üzüm suyunda da mikroorganizmaların gelişmeleri için gereken besin maddeleri ve su bulunmaktadır. Fakat üzüm suyunun pH'ı düşük (asitliği yüksek) olduğundan, yalnızca düşük pH' da gelişen laktik asit bakterileri, asetik asit bakterileri ve mayalar için uygundur.(10. sınıf Genel Mikrobiyolojisi modüllerinde mikroorganizma gelişimine etki eden faktörlerden pH konusuna bakınız ).

Laboratuvarlarda kullanılan besiyerleri, bitki ve hayvan dokularının ezilmesinden veya ekstraksiyonlarının karıştırılmasından elde edilir.

## 1.1. Besiyeri Çeşitleri

Besiyerleri sınıflandırılması farklı şekillerde yapılabilir.

### 1.1.1. Fiziksel Özelliklerine Göre

#### 1.1.1.1. Katı Besiyerleri

Bileşimine kıvam verici, katılaştırıcı madde katılmış besiyerleridir. Katılaştırıcı madde olarak en çok agar daha az olarak da jelâtin, yumurta, serum, alginatlar ve silika jel kullanılır. Örneğin Nutrient Agar, EMB Agar gibi.

#### 1.1.1.2. Sıvı Besiyerleri

İçinde katılaştırıcı madde bulunmayan daha çok mikroorganizmaların üretilmesinde kullanılan besiyerleridir. Örneğin et suyu, peptonlu su, Nutrient Broth (besleyici buyyon).

### 1.1.2. Kaynaklarına Göre

#### 1.1.2.1. Hayvansal Kaynaklı Besiyerleri

Yumurta sarısı, karaciğer, balık unu, süt, et suyu gibi hayvansal dokulardan elde edilmiş besiyerleridir.

#### 1.1.2.2. Bitkisel Kaynaklı Besiyerleri

Patates ekstraktı, portakal serumu gibi bitkisel dokulardan elde edilmiş besiyerleridir.

### 1.1.3. Kullanım Amacına Göre

#### 1.1.3.1. Genel Besiyerleri

Mikroorganizmalar için gerekli besin maddelerince yeterli ve zengin, belli bir mikroorganizma grubunun gelişmesini özel olarak artırmayan, birçok mikroorganizmaların gelişmesini sağlayan besiyerleridir. Tüm mikroorganizmaların gelişebileceği özellikte bir besiyeri yoktur. Genel besiyerlerininde laktik asit bakterileri ve patojen bakteriler dışında pek çok mikroorganizma gelişebilir.

Genel besiyerleri, diğer bazı Besiyerinin hazırlanmasında **temel besiyeri** olarak kullanılır. Örneğin Nutrient Broth, Nutrient Agar.

Genel besiyerleri aşağıdaki amaçlar için kullanılır:

- Toplam mezofil ve psikrofil aerob bakteri sayımı
- Bozulma veya hastalık etmeninin ön izolasyonu
- Günlük kullanımdaki bakterilerin aktifleştirilmesi, korunması
- Genel besiyerlerinin inkübasyon koşullarının değiştirilmesi ve kontrolü
- Anaerob mikroorganizmaların geliştirilmesi

Nutrient Broth ve Nutrient Agar gibi genel besiyerlerininne maya ekstraktı, süt, serum, kan gibi maddeler ilave edilerek istenen amaca uygun, farklı besiyerlerinin elde edilir.

#### **1.1.3.2. Özel Besiyerleri**

Çalışma amacına göre seçilen, belli bir mikroorganizma grubu için hazırlanan ve yapıları daha kompleks (karmaşık) olan besiyerleridir. Özel besiyerlerinin çok çeşitlidir.

##### **1.1.3.2.1. Canlandırma Besiyerleri**

Bir ortamda zarar görmüş, üreme yeteneği azalmış, canlılık oranı düşük olan mikroorganizmaların canlanmasını, gelişmesini ve adaptasyonunu sağlayan sıvı besiyerleridir.

##### **1.1.3.2.2. Selektif (Seçici) Besiyerleri**

Formülasyonu yalnızca belli bir mikroorganizma veya mikroorganizma grubunun tipik gelişimini sağlayacak şekilde hazırlanmış besiyerleridir.

Selektif besiyerlerinin bileşimine diğer istenmeyen mikroorganizmaların enzim veya metabolizma sistemlerini olumsuz etkileyen, gelişmelerini engelleyen;

- Boyalar,
- Antibiyotikler,
- Kimyasal maddeler,
- Safra tuzları gibi inhibitör maddeler pH ayarlamalarıyla istenen mikroorganizmaların gelişmeleri sağlanır.

Örneğin ortama 1/500.000 oranında kristal viyole eklendiğinde gram (+) bakteriler gelişemez sadece gram(-) bakteriler gözlenir.

Eosin Metilen Blue Agar, SS Agar, Violet Red Bile Agar, Brilliant Green Bile Broth, Mac Conkey Broth gibi.

#### 1.1.3.2.3. Elektif (Seçime Yönelik) Besiyerleri

Formülasyonu belli bir mikroorganizmanın minimum düzeyde gelişimini sağlayan besin öğelerini karşılayacak şekilde hazırlanmış besiyerleridir. Elektif besiyerleri ile karışık bir mikroorganizma kültüründen istenen mikroorganizmalar ayrılır (izole edilir).

Örneğin Lizin Agar ile N (azot) kaynağı olarak yalnızca lizin amino asidini kullanabilen yabancı mayalar ayrılabilir.

#### 1.1.3.2.4. Diferansiyel (Farklara Dönük) Besiyerleri

Belli bir mikroorganizmanın kendi türüne özgü tipik koloniler oluşturduğu katı besiyerleridir. Ortama bazı boya ve kimyasal maddeler katılarak mikroorganizmaların üreme şekli ayrı bir özellik kazanır.

Örneğin; SS Agar Salmonella kolonilerini tanımada, EMB Agar ise E.coli'nin ayırımında kullanılır.

Not: Bazı besiyerlerinin, hem selektif (seçime yönelik) hem diferansiyel (farklara dönük) olabilir. Örneğin Mac Conkey Broth besiyerlerininde laktoz ve indikatör olarak da brom krezol moru vardır. Koliform bakterileri laktozu fermente ederek kırmızı renkli koloniler, laktozu fermente edemeyen Salmonella türleri ise renksiz koloniler oluşturur.

Selektif, elektif ve diferansiyel besiyerlerinin ile gıda örneklerindeki veya karışık kültürlerdeki belli bir mikroorganizma veya mikroorganizma grubu izole edilerek saf kültürleri elde edilir.

#### 1.1.3.2.5. Zenginleştirme Besiyerleri

Karışık mikroorganizma kültüründe istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen, izolasyonu istenen mikroorganizmaların ise bolca üreme ve gelişmesini sağlayan, genellikle sıvı besiyerleridir.

Zenginleştirme besiyerlerinin;

- İstenen mikroorganizmaların izolasyonu için besin öğeleri ve pH vb. ihtiyaçlarını en iyi düzeyde karşılar.
- Bu besiyerlerinin inkübasyonu sıcaklık ve süre açısından izolasyonu istenen mikroorganizma türüne göre kontrollü olarak yapılmasını sağlar.

Örneğin Selenit Broth 16–20 saat kadar koliform bakterilerinin gelişmelerini engellediğinden, Salmonella türü bakterilerin izolasyonunda kullanılan zenginleştirme besiyeri çeşididir.

#### 1.1.3.2.6. Biyokimyasal Test Besiyerleri

Mikroorganizmaların test edilen maddede biyokimyasal değişim oluşturup oluşturmadıklarını belirlemek amacıyla kullanılan sıvı veya katı olarak hazırlanabilen besiyerleridir.

Biyokimyasal test besiyerlerininne;

- Glikoz, laktoz, sakkaroz vb. karbohidratlar,
- Nitrat, sitrat, üre tuzları,
- Brom timol mavisi, fenol kırmızısı gibi indikatörler katılarak mikroorganizmaların çeşitli biyokimyasal özellikleri saptanır.

#### 1.1.3.2.7. Tamamlama yada Doğrulama Besiyerleri

İnkübasyondan sonra kültüre eklenen özel indikatörlerle (ayırıcı), mikroorganizmaların metabolizma ürünlerinin saptanmasını ve tanınmalarını sağlayan besiyerleridir. Tripton Water, Glikoz Fosfat Broth gibi.

#### 1.1.3.2.8. İndirgenmiş Besiyerleri

Formülasyonu oksijensiz ortamda yaşayabilen anaerob mikroorganizmaların iyi düzeyde gelişimini sağlayacak şekilde hazırlanmış besiyerleridir. İndirgenmiş besiyerlerine tiyoglikat gibi indirgen maddeler katılır. Bu maddeler, besiyerindeki çözünmüş oksijeni bağlar ve ortamı anaerob hâle getirir.

### 1.2. Birçok Besiyerinin Bileşimine Giren Temel Maddeler

#### 1.2.1. Agar

Bazı deniz yosunlarından elde edilen uzun zincirli polisakkarittir. Toz veya lifler hâlinde üretilir. Yapısında D-galaktopiranoz bulunur. D-galaktopiranoz katılaşma özelliği verdiği için agar sıvı besiyerinin katılaştırılmasında kullanılır.

- Agar çok az oranda Ca, Mg, SO<sub>4</sub> gibi inorganik tuzlar, protein benzeri maddeler bulunduğu ve uzun, dallanmış zincir yapısı nedeniyle mikroorganizmalar için besin maddesi değildir.
- 90 – 95°C’de erir, 40 – 45°C’de katılaşır.
- Besiyeri pH’ından etkilenmez.
- Besiyeri pH’ı 5’ten düşük olduğunda veya uzun süre yüksek ısı işlem uygulandığında, katılaşma özelliğini yitirebilir.
- Besiyerlerininne amaca göre %0.05 – 2 oranında katılır. (standart kullanım oranı %1 – 1.5’dir.).

- Mikroorganizmalarda hareketliliğin belirlenmesi, mikro aerob özellikteki bakterilerin geliştirilmesi amacıyla hazırlanan besiyerlerininde agar %0.05 – 0.3 gibi düşük oranda kullanılır.
- Yüksek asitli besiyerlerininde ise jelleşme özelliğini koruyabilmek için agar oranı artırılır.

### 1.2.2. Pepton

Süt proteini (kazein), kan proteini (fibrin), sığır eti, karaciğer veya soya proteininin tripsin, pepsin veya papain gibi proteolitik enzimlerle hidrolize edilmesinden üretilir. Pek çok mikroorganizmada proteinleri hidrolize ederek N kaynağı olarak kullanmalarını sağlayacak proteolitik enzim sistemleri bulunmadığından besiyerine pepton katılır.

- Peptonlar, mikrobiyolojide tek başına besiyeri olarak kullanılabilen nadir maddelerden biridir. Pek çok bakteri yalnızca % 1 peptonlu ortamda gelişebilir.
- Bileşiminde suda çözünen, küçük moleküllü amino asitler, peptitler, polipeptitler, inorganik tuzlar ve riboflavin, niasin gibi B grubu vitaminleri bulunur.
- Besiyerlerininne %1–2 oranında katılır.
- Elde edildiği kaynağa göre peptonların yapılarında farklar görülebilir. Örneğin, kazeinden elde edilen peptonda fazla oranda triptofan amino asidi, soyadan elde edilen peptonda ise, fazla oranda karbohidrat bulunur.
- Peptonun tampon madde özelliği de vardır. Çünkü mikroorganizma aktivitesi sonucu oluşan metabolik ürünlerin besiyeri pH'ını değiştirmesini belli ölçüde engeller.

### 1.2.3. Maya Ekstraktı (Yeast Extract)

Ekmek mayası (*Saccharomyces cerevisiae*), bira mayası gibi mayaların enzim veya asitle hidrolizinden elde edilir.

- Yapısında suda çözünen N (Azot)'lu maddeler, maltoz, glikojen, pentozlar vb. karbohidratlar, B grubu vitaminleri, K, PO<sub>4</sub> vb. tuzlar, organik asitler bulunur.
- Besiyerlerine % 0.5–1 oranında katılarak ortam zenginleştirilir.
- Maya ve küflerin geliştirilmesi için uygun besiyeridir.

### 1.2.4. Et Ekstraktı (Beef Extract)

Bakteriler için genel besiyeri olarak kullanılır. Yağsız, tendonları ayrılmış sığır etinden (kıymasından) elde edilir.

- Yapısında N (Azot)'lu madde olarak proteinler değil, suda çözünen amino asitler, küçük peptitler, mineraller, iz elementler, B kompleks vitaminleri, pürin bulunur.

- Karbohidrat içermediğinden karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılabilir.
- Besiyerlerininne %1 oranında katılır
- Piyasada hazır olarak buyyon denen et suyu ekstraktı satılmaktadır.Kullanılacağı zaman 10 g bulyon 1 litre suda çözündürülerek pepton, amino asitler,bazı vitaminler ve minerallerce zengin besiyeri elde edilmiş olur.

### 1.2.5. Tuz (NaCl)

Besiyerlerininnde iyon konsantrasyonunu ayarlamak ve izotonik (eş basınçlı) ortam yaratmak için kullanılır.

- Besiyeri pH'ı alkali (NaOH) ile ayarlandığı zaman çöken  $PO_4$  ve  $CO_3$ 'ların yerini alır.
- Besiyerlerininne % 0.5 oranında katılır.
- Tuz seven (halofilik) ve tuza dayanıklı (halotolerant) bakterilerin selektif izolasyonunda tuz oranı artırılır.

### 1.2.6. Jelâtin

Sinir, kemik, tendon vb. hayvansal dokulardan elde edilen protein yapısında bir maddedir. Agar gibi katılaştırıcı özelliği vardır fakat daha çok mikroorganizmaların proteolitik aktivitelerini ortaya çıkarmak için kullanılır.

- 37 °C'de erir, 23–26°C'de katılaşır.
- Besiyerlerine %12 – 15 oranında katılır.
- pH'ı 5' ten küçük olduğunda ve 120°C'de ısıtma işlemde katılaşma özelliğini kaybettiğinden jelâtin içeren Besiyerinin sterilizasyonu daha çok 110°C'de yapılır.

### 1.2.7. Karbohidratlar

Fermente olabilen karbohidratlar, mikroorganizmalar için enerji ve C kaynağıdır. Besiyerlerinde karbohidratlar;

- Mikroorganizmaların üremesini hızlandırmak,
- Fermantasyon özelliklerini saptamak,
- Mikroorganizmaların asit oluşturma özelliğini izleyerek asit oluşturan kolonilerin ön tanımlanmaları amacıyla kullanılırlar.
- Besiyerlerininne %0.1–1 oranında katılır.
- En çok kullanılan karbohidratlar glukoz, laktoz ve sakkarozdur.
- Karbohidratlar yüksek sıcaklıkta sterilize edilirse dekompoze (ayırışma) olurlar ve organik asitler meydana gelir. Organik asitler besiyeri pH'sını düşürdüklerinden mikroorganizmaların gelişimini inhibe edebilirler. Bu nedenle besiyerine katılacak karbohidratlar ya ayrı olarak sterilize edilip, daha sonra besiyerine katılmalı ya da sterilizasyonları tinalizasyon veya filtrasyon gibi yöntemlerle yapılmalıdır.

### 1.2.8. Kan

Sıvı veya katı bazı besiyerlerinin zenginleştirmek için ya da mikroorganizmaların hemoliz (alyuvarların parçalanması) özelliklerinin saptanması testlerinde kullanılır.

- Kan sterilize edilmiş ve 45–50 °C'a soğutulmuş agarlı besiyerine % 5 – 10 oranında katılır.
- Bileşiminde organik ve inorganik maddelerle üreme faktörleri vardır. Yavaş üreyen mikroorganizmaların gelişimini kolaylaştırır.

### 1.2.9. Tampon Maddeler (Buffer)

Mikroorganizmaların gelişimine etki eden en önemli faktörlerden biri pH'dır. Besiyerinde üreyen mikroorganizmaların metabolik artıkları ortamın pH'ını değiştirebilir. Besiyeri pH'ını kontrol altında tutmak için tampon maddeler katılır.

- Tampon maddeler, özellikle besiyerine fermente olabilir. Karbohidratlar katıldığında kullanılırlar.
- En çok kullanılan tampon maddeler  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $NaHPO_4$  gibi fosfatlar,  $Na_2CO_3$  gibi karbonatlar, asetat ve sitratlardır.
- Proteinler, peptonlar, peptit ve amino asitler tampon özelliği gösterdiğinden besiyerinde bu organik bileşikler bulunduğu ayrıca tampon madde eklenmesine gerek yoktur.
- Polifosfatlar gibi tampon maddeler +2 değerlikli Ca, Mg, Fe iyonlarını bağlayıp mikroorganizmaların bu iyonları kullanmasını engelleyebilirler ve besiyerinde bulanıklık oluşturabilirler. Bunları önlemek için ortama Ca, Mg, Fe iyonları katılmalı ve hazırlanan besiyeri hemen kullanılmalıdır.

### 1.2.10. İnorganik maddeler

Özellikle hazır olarak satılan sentetik besiyerlerinin mikroorganizmaların ihtiyacına göre mineraller eklenebilir. Fakat genellikle besiyerlerinin katılan pepton, bulyon, maya ekstraktı, et ekstraktı mikroorganizmaların mineral ihtiyacını yeteri kadar karşılamaktadır.

**Not:** Besiyerlerinin yukarıdaki maddeler dışında amaca göre inhibitörler, gelişmeyi artırıcı maddeler (stimülatörler), anaerobların gelişmesini sağlayan indirgeyici maddeler, doğal ortam oluşturan maddeler vb. katılabilir.

## 1.3. Besiyerinin Sahip Olması Gereken Özellikler

- Uygun miktarda su bulunmalı yani su aktivitesi yüksek olmalı,
- Mikroorganizmaların gereksinimini karşılayacak kolayca kullanılabilir besin maddeleri içermeli,
- Uygun asit-baz (pH) dengesine sahip olmalı,
- Berraklık, katılık gibi fiziksel özellikleri elverişli olmalı,

- Osmotik basıncı, oksidasyon/redüksiyon (indirgenme/yükseltgenme) potansiyeli mikroorganizmalara uygun olmalı,
- Mikrobiyolojik anlamda steril olmalı, sterilizasyon kontrolü yapılmalı.
- Ekim öncesi sterilizasyon hazırlığı ve sterilizasyon uygulaması titizlikle uygulanmalı,
- Dış ortamdan mikroorganizma kontaminasyonunun önlenmesi için özel kaplarda hazırlanmalı ve saklanmalı.

## 1.4. Besiyeri Formülasyonları

Her besiyerinin bileşimi (formülü) bellidir. Kullanım amacına, bileşimine ve hazırlanış şekline göre uygun besiyerinin seçilmesi gerekir. Laboratuvarlarda çok kullanılan bazı Besiyerinin formülleri ve hazırlanışları aşağıda verilmiştir.

### ➤ **Adi Sıvı Besiyeri (Adi Bulyon)**

**Bileşimi:** Yağsız sığır kıyması.....500 g  
Pepton.....10 g                      pH= 7.2-7.4  
Tuz (NaCl).....5 g  
Su.....1000 cc (L)

**Hazırlanışı:** 500g yağsız sığır kıymasına 1 L saf su konur ve serin bir yerde 2 saat bekletilir. Bir saat yavaş yavaş karıştırılarak kaynatılır. Süzülür. Sıcakken pepton ve tuz eritilir. Eksilen su kadar saf su konup litreye tamamlanır. pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanır. Deney tüplerine 15 ml kadar dağıtılır. Tüplerin ağızları pamuklanıp, 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir

### ➤ **Katı Besiyeri (Adi Agar)**

**Bileşimi:** Adi Bulyon.....1000 cc (L)  
Agar..... 15 g                      pH =7.2-7.4

**Hazırlanışı:** Cam balondaki adi buyyona tartılan agar katılır. Agar eriyene kadar karıştırılarak kaynar su banyosunda tutulur. pH'ı 7.2–7.4'e ayarlanır. Balonun ağzı pamuklanıp, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Sıcakken, besiyeri henüz katılaşımdan steril petri kutularına 15–20 ml boşaltılıp katılaşıması beklenir.

- **Nutrient Broth:** Bakterilerin gelişimi için kullanılan genel sıvı besiyeridir.

**Bileşimi:1)** Et ekstraktı.....1 g  
Maya ekstraktı.....2 gr      pH= 7.4 ±0.2  
Pepton.....5 g  
Tuz (NaCl).....5 g  
Saf su.....1000 cc (L)

**Bileşimi:2)** Et ekstraktı.....10 g  
Pepton.....10 gr      pH 7.5±0.2  
Tuz (NaCl).....5 g  
Saf su.....1000 cc (L)

**Bileşimi:3)** Et ekstraktı.....3 g  
Pepton.....5 g      pH= 6.8 ±0.2  
Saf su.....1000 cc (L)

**Bileşimi:4)** Et ekstraktı.....3 g  
Pepton.....5 g      pH= 7.3±0.2  
Tuz (NaCl).....8g  
Saf su.....1000 cc (L)

**Hazırlanışı:** Bileşenleri tartılır ve 1 L saf suda çözündürülür. pH'ı ayarlanır. Test tüplerine 10–15 ml kadar dağıtılır. Tüpler otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

- **Mac Conkey Agar:** Koliform grubu bakterileri ile Salmonella ve Shigella bakterilerinin ayırım ve tanımlanmasında kullanılan selektif besiyeridir.

**Bileşimi:** Pepton .....20g  
Laktoz.....10 g  
Tuz (NaCl).....5 g      pH= 7.1 ±0.2  
Bile Salts No.3.....1.5 g  
Nötral kırmızısı.....0.03 g  
Kristal viyole.....0.001 g  
Agar.....13.5 g  
Saf su.....1000 cc (L)

**Hazırlanışı:** Besiyeri bileşenleri tartılır ve 1 L soğuk saf suda çözündürülür. Agar eriyene kadar karıştırılarak kaynar su banyosunda tutulur. pH'sı ayarlanır. Tüplere 15 – 20 ml kadar paylaştırılıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir.

➤ **Nutrient Agar:** Agar katılmış Nutrient Broth besiyeridir.

**Bileşimi:1.** Et ekstraktı.....1 g  
Maya ekstraktı.....2 g pH=7.4 ±0.2  
Pepton.....5 g  
Tuz (NaCl).....5 g  
Agar.....15 g  
Saf su.....1000 cc (L)

**Bileşimi:2.** Et ekstraktı.....10 g  
Pepton.....10 g pH 7.5±0.2  
Tuz (NaCl).....5 g  
Agar.....15 g  
Saf su.....1000 cc (L)

**Bileşimi:3.** Et ekstraktı.....3 g  
Pepton.....5 g pH 6.8 ±0.2  
Agar.....15 g  
Saf su.....1000 cc (L)

**Bileşimi:4.** Et ekstraktı.....3 g  
Pepton.....5 g pH 7.3±0.2  
Tuz (NaCl).....8g  
Agar.....15 g  
Saf su.....1000 cc (L)

**Hazırlanışı:** Bileşenleri tartılır ve 1 L saf suda çözündürülür. Agar eriyene kadar kaynar su banyosunda tutulur pH'sı ayarlanır. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir.

➤ **Brillant Green Bile Broth:** Koliform grubu bakterilerinin tanımlanması, doğrulanması, izole edilmesi ve sayılmasında kullanılan selektif besiyeridir.

**Bileşimi:** Pepton.....10 g  
Laktoz.....10 g pH= 5.6±0.2  
Ox-bile(safra tuzları).....20 g  
Brillant gren veya %1'lik Brilliant gren sulu  
çözeltilisinden 13.3 ml).....0.0133 g  
Saf su..... 1000 cc (L)

**Hazırlanışı:** Hazır besiyerinden 40 g tartılır. Üzerine 1 L saf su eklenip kuvvetlice karıştırılır. Besiyeri hazır değilse pepton ve laktoz 500 ml saf suda çözündürülür. Daha sonra 200 ml saf suda ox-bile çözündürülür. İki çözelti birbirine karıştırılır ve %1'lik Brilliant green çözeltisinden 13.3 ml eklenir. Hacim saf su ile litreye tamamlanır pH'sı ayarlanır. Hazırlanan besiyeri, içine ters olarak Durham tüpleri yerleştirilmiş test tüplerine 10'ar ml dağıtılıp, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir.

- **Violet Red Bile Agar:** Koliform grubu bakterilerinin tanımlanması ve sayılmasında kullanılan selektif besiyeridir.

|                  |                       |             |             |
|------------------|-----------------------|-------------|-------------|
| <b>Bileşimi:</b> | Maya ekstraktı.....   | 3 g         |             |
|                  | Pepton .....          | 7 g         |             |
|                  | Laktoz.....           | 10 g        |             |
|                  | Tuz (NaCl).....       | 5 g         | pH=7.4 ±0.2 |
|                  | Bile Salts No.3.....  | 1.5 g       |             |
|                  | Nötral kırmızısı..... | 0.03 g      |             |
|                  | Kristal viyole.....   | 0.002 g     |             |
|                  | Agar.....             | 15 g        |             |
|                  | Saf su.....           | 1000 cc (L) |             |

**Hazırlanışı:** Hazır karışımdan 41.5 gr tartılır ve 1 L saf su eklenip, agar eriyene kadar kaynar su banyosunda tutulur. Su banyosunda kaynama sıcaklığında en çok 5 dakika tutulur. pH'sı ayarlanır. VRBA otoklavda sterilize edilmez. Çünkü VRBA besiyeri ekim yapıldıktan sonra 35–37°C'de 20–24 saat inkübasyon uygulanır. Besiyerinin su banyosunda kaynatılması sırasında ölmeyen mikroorganizmalar olsa bile bu kısa inkübasyon süresinde gelişemezler.

- **Baird-Parker Agar:** Gıdalardaki stafilokok bakterilerinin tanımlanma ve sayımlarında kullanılan selektif besiyeridir.

|                  |                     |        |             |
|------------------|---------------------|--------|-------------|
| <b>Bileşimi:</b> | Triptofan .....     | 10g    |             |
|                  | Et ekstraktı.....   | 5 g    |             |
|                  | Maya ekstraktı..... | 5 g    | pH=7.0 ±0.2 |
|                  | Sodyum piruvat..... | 10 g   |             |
|                  | Glisin.....         | 12 g   |             |
|                  | Lityum klorür.....  | 5 g    |             |
|                  | Agar.....           | 20 g   |             |
|                  | Saf su.....         | 950 ml |             |

**Hazırlanışı:** Hazır karışımdan 63 g tartılır ve 950 ml saf su ile çözündürülür. Agar eriyene kadar kaynar su banyosunda tutulur. pH'sı ayarlanır. Tüpler otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Otoklavlamadan sonra besiyeri sıcaklığı 40-45°C'ye düşürülüp aseptik koşullarda 50 ml egg yolk- tellurit emülsiyonu eklenerek kuvvetlice karıştırılır.

- **Plate Count Agar:** Gıdalarda, su, süt ve ürünlerinde canlı bakteri sayımlarında kullanılır.

**Bileşimi:** Tripton.....5 g  
Maya ekstraktı.....2.5 g pH= 7.0 ±0.2  
Glikoz.....1 g  
Agar.....15  
Saf su.....1000 cc (L)

**Hazırlanışı:** Besiyeri bileşenleri tartılır ve 1 L saf suda çözündürülür. Agar eriyene kadar kaynar su banyosunda tutulur. pH'sı ayarlanır ve gerekirse erlen, tüp vb dağıtılarak otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir.

- **Simmons Sitrat Agar:** Enterobacteriaceae familyası bakterilerinin ayrımları için kullanılan besiyeridir.

**Bileşimi:** Magnezyum sülfat .....0.2 g  
Amonyum di hidrojen fosfat.....0.2 g  
Tuz (NaCl).....5 g pH=7.1 ±0.2  
Sodyum amonyum fosfat.....0.8 g  
Tribazik sodyum sitrat.....2 g  
Brom timol mavisi.....0.08 g  
Agar.....15 g  
Saf su.....1000 cc (L)

**Hazırlanışı:** Hazır karışımdan 23 g tartılır ve 1 L saf su ile çözündürülür. Agar eriyene kadar kaynar su banyosunda tutulur. pH'sı ayarlanır. Test tüplerine 10 – 15 ml kadar dağıtılır. Tüpler otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir. Otoklavlamadan sonra tüpler yatık olarak katılaştırılır.

- **Laktoz Broth:** Gıdalarda, su, süt ve süt ürünlerinde koliform grubu bakterilerinin varlığının saptanması ve doğrulanması amacıyla kullanılan selektif besiyeridir.

**Bileşimi:** Et ekstraktı.....3 g  
Pepton.....5 g pH=6.7-7.1  
Laktoz.....5 g  
Saf su.....1000 cc (L)

**Hazırlanışı:** Besiyeri bileşenleri tartılır ve 1 L saf suda çözündürülür. pH'sı ayarlanır. Hazırlanan besiyeri içine ters olarak Durham tüpleri yerleştirilmiş test tüplerine 10'ar ml dağıtılıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir.

- **Eosin Metilen Blue Agar:** Enterobacteriaceae familyası Gram (-) bakterilerinin ayrımı ve izolasyonu için **kullanılır**.

|                  |                                  |             |             |
|------------------|----------------------------------|-------------|-------------|
| <b>Bileşimi:</b> | Pepton .....                     | 10 g        |             |
|                  | Laktoz.....                      | 5g          |             |
|                  | Sakkaroz.....                    | 5 g         |             |
|                  | Di potasyum hidrojen fosfat..... | 2 g         | pH= 7.2±0.2 |
|                  | Eosin Y.....                     | 0.4         |             |
|                  | Metilen mavisi.....              | 0.065 g     |             |
|                  | Agar.....                        | 13.5 g      |             |
|                  | Saf su.....                      | 1000 cc (L) |             |

**Hazırlanışı:** Hazır karışımdan 36 gr tartılır ve 1 L saf su eklenip, agar eriyene kadar kaynar su banyosunda tutulur. pH'ı ayarlanır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Besiyeri 60 °C'lere düşürülür. Sterilizasyon sırasında ısı etkisiyle metilen mavisi indirgendiğinden besiyeri turuncu renge dönüşür. Metilen mavisinin okside olup kendi mavi-mor renge dönmesi için besiyeri çalkalanıp, aseptik koşullarda, steril petri kutularına 15 – 20 ml kadar boşaltılır.

## 1.5. Etiket Bilgisini Kullanma

Hazır ticari besiyerlerinin bulunmadığında yukarıda verilen formüllere göre besiyeri bileşimine giren maddeler ayrı ayrı hassas olarak tartılarak istenen besiyeri hazırlanır.

Fakat günümüzde, laboratuvarlarda bazı firmalar tarafından üretilmiş hazır karışımlar hâlinde, özel ambalajlarda piyasaya sunulan kuru (dehidre) besiyerlerinin bulunmaktadır. Hazır ticari Besiyerinin üzerinde açıklayıcı bilgiler bulunan etiketleri vardır.

Dehidre ticari besiyerlerininni hazırlamak daha kolaydır. Laboratuvarda zamandan tasarruf sağlar. Genellikle, hazır besiyerinin ambalaj etiketinde yazılı miktarı tartılıp suda çözülerek hazırlanır ve sterilize edilir. Ancak hazır besiyerlerinin pahalıdır.

### 1.5.1. Etiketle Yer Alan Bilgiler

Hazır ticari Besiyerinin etiketlerinde şu bilgiler bulunur:

- Besiyerinin veya besiyeri bileşeninin ismi (pepton, Brilliant Green Bile Broth ),
- Hangi laboratuvarda kullanıldığı(mikrobiyoloji için-for microbiology- gibi),
- Bileşiminde bulunan maddelerin isimleri(kazein, pepton, glikoz, agar gibi),
- Bileşiminde bulunan maddelerin g/L, mg/L olarak miktarları yani tipik bileşimi,
- Bir litre besiyeri için ne kadar tartım yapılacağı,
- Sterilizasyonunun nasıl ve kaç °C'ta yapılacağı,
- Belli sıcaklıkta olması gereken pH'sı(25 °C'de pH=7,0 gibi ),
- Saklama koşulları (15 – 25 °C'de ağzı kapalı ve kuru olarak gibi)

500g

203  
15.01.99

V144963



Ch.-B/Lot verwendbar bis/Exp.

**5463**

Usage in  
vitro

**Mikrobiologi  
e**

### Plate-Count-Agar

Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar  
für die Mikrobiologie

**Zubereitung:** 22,5 g/l in demin. Wasser  
lösen durch Erhitzen im siedenden  
Wasserbad oder im strömenden Dampf;  
autoklavieren (15 min. bei 121 °C)  
**Ph: 7.0 ± bei 25 °C.**

**Typische Zusammensetzung  
(g/Liter):** Pepton aus Casein  
5,0; Hefeextrakt 2,5;  
D(+)-Glucose 1,0; Agar-Agar  
14,0

**Preparation:** Dissolve 22,5 g/l in demin.  
water  
by heating in a boiling bath or in a current of  
steam; (15 min. at 121 °C)  
**Ph: 7.0 ± at 25 °C.**

**Typical composition (g/litre):**  
Pepton from casein 5,0; Yeast  
extract 2,5; D(+)-Glucose 1,0;  
Agar-agar 14,0

**Préparation:** En dissoudre 22,5 g/l dans de  
l'eau déminéralisée en chauffant dans un  
bain d'eau bouillant ou dans un courant de  
vapeur; passer à l'autoclave (15 min. à 121  
°C)  
**Ph: 7.0 ± à 25 °C.**

**Composition type (g/litre):**  
Peptone de caséine 5,0; Extrait  
de levure 2,5; D(+)-Glucose 1,0;  
Agar-agar 14,0

**Preparazione:** Disciogliere 22,5 g/l in acqua  
demin. riscaldando in bagnomaria bollente o  
in corrente di vapore; autoclavare (15 min. a  
121 °C)  
**Ph: 7.0 ± a 25 °C**

**Composizione tipica (g/litro):**  
Peptone da caseina 5,0;  
estratto di lievito 2,5;  
D(+)-glucosio 1,0; agar-agar  
14,0

MARKA

ADRES

### Plate-Count-Agar

Agar peptone di caseina-glucosio-  
estratto  
Di lievito  
per mikrobiologia

|                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Trocken und gut<br>verschlossen lagern.<br>Lagern bei +15°C bis<br>+25°C.<br>Vor Licht schützen.            |
| Store dry and tightly<br>closed.<br>Store at +15°C to +25°C.<br>Protect from light.                         |
| Conserver en récipient<br>bien fermé et au sec.<br>Conserver de +15°C à<br>+25°C.<br>Protéger de la lumière |
| Conservare all'asciutto e<br>ben chiuso.<br>Conservare tra +15°C e<br>+25°C.<br>Proteggere dal la luce      |

E054631002/04-176563  
PE

Tablo 1. 1: Plate Count Agar besiyeri etiketi

- Ambalajdaki miktarı(500 g gibi),
- Üreten firma üretildiği ülke, üretim kodu,
- Besiyerinin raf ömrü (son kullanma tarihi)



Resim 1.1:Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan hazır besiyeri orijinal şişeleri ve etiketleri

### 1.5.2. Etiket Bilgilerine Göre Hesaplama Örnekleri

Hazır ticari besiyerlerinin formülleri genellikle hacim 1 L (1000 cc) olarak verilmektedir. Laboratuvarın iş yüküne göre daha az ya da fazla hacimde besiyeri hazırlamak gerekebilir. Bunun için basit bir orantı ile besiyeri bileşenlerinin tartılacak miktarları hesaplanır.

Örneğin:250 ml Plate Count Agar hazırlanması istenmişse aşağıdaki gibi hesaplama yapılır.

Plate Count Agar'ın bileşiminde 5 g Tripton, 2,5 g maya ekstraktı, 1 g glikoz, 15 g agar bulunur.

- Eğer hazır Plate Count Agar(PCA) ise

1 L saf su için

5 + 2.5 + 1 + 15 = 23,5 g tartılması gerekir

1000 ml saf su için

23.5 gr PCA tartılırsa

250 ml saf su için

X gr tartılır

$X = 250 \cdot 23.5 / 1000 = 5.875$  gr hazır Plate Count Agardan

tartılarak 250 ml saf su ile hazırlanması gerekir.

- Eğer Plate Count Agar formüldeki bileşenleri ayrı olarak tartılıp hazırlanacaksa

her bileşen için ayrı hesaplama yapılır;

$$\begin{array}{rcl} 1000 \text{ ml saf su için} & 5 \text{ g tripton tartılırsa} & \\ \underline{250 \text{ ml saf su için}} & \underline{X \text{ gr tartılır.}} & \\ X = 250. 5 / 1000 = 1.25 \text{ gr tripton} & & \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} 1000 \text{ ml saf su için} & 2.5 \text{ gr maya ekstraktı tartılırsa} & \\ \underline{250 \text{ ml saf su için}} & \underline{X \text{ gr tartılır.}} & \\ X = 250. 2.5 / 1000 = 0.625 \text{ gr maya ekstraktı} & & \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} 1000 \text{ ml saf su için} & 1 \text{ g glikoz tartılırsa} & \\ \underline{250 \text{ ml saf su için}} & \underline{X \text{ gr tartılır.}} & \\ X = 250. 1 / 1000 = 0.25 \text{ gr glikoz} & & \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} 1000 \text{ ml saf su için} & 15 \text{ g agar tartılırsa} & \\ \underline{250 \text{ ml saf su için}} & \underline{X \text{ gr tartılır.}} & \\ X = 250. 15 / 1000 = 3.75 \text{ gr agar} & & \end{array}$$

1.25 gr tripton + 0,625 gr maya ekstraktı + 0.25 gr glikoz + 3.75 gr agar ve 250 ml saf su ile hazırlanması gerekir.

## 1.6. Besiyeri Hazırlık Aşamaları

Bir gıda maddesinin mikrobiyolojik analizinde sonuçların geçerliliği;

- Analizlere uygun besi ortamının seçilmesine,
- Besiyerinin doğru olarak hazırlanışına,
- Doğru kullanımına bağlıdır.

Ortam bileşimine giren maddeler ve çözeltiler usulüne uygun olarak hazırlanmalı ve saklanmalıdır.

Bilgi ile iyi bir şekilde hazırlanan besiyerlerinde mikroorganizmaları üretmek ve izole etmek daha kolaydır.

Besiyerleri çok farklı şekillerde hazırlanabilir ve kullanılabilir. Tartılan besiyeri bileşenleri veya dehidre hazır besiyerlerinin hazırlanmasında sırasıyla;

Tartım ➡ Kaba aktarma ➡ Çözündürme ➡ Berraklaştırma şeklinde yol izlenmelidir.

### 1.6.1. Tartım

Formüle ve istenen hacme göre hesaplanan hazır besiyeri veya besiyeri bileşenleri hassas terazide tartılır.

Tartımda aşağıdaki noktalara dikkat edilmelidir;

- Tartımda kullanılan terazi 0.01 gram duyarlılıkta olmalıdır.
- Doğrudan besiyeri hazırlanacak erlen ya da balonda tartım yapılmamalı, küçük beher daha doğrusu özel tartım kayıkçıkları kullanılmalıdır.
- Besiyerlerine katılan organik ve inorganik kimyasal maddeler saf olmalı, bozuk, kötü kokulu, nemlenmiş veya son kullanma tarihi geçmiş maddeler kullanılmamalıdır.
- Tartım sırasında her besiyeri bileşeni için ayrı spatül kullanılmalı, tartım çabuk bitirilmeli, tartım sonunda besiyeri kabının kapağı sıkıca kapatılmalıdır.
- Tartım sırasında besiyeri veya besiyeri bileşenlerinin tozlanmamasına dikkat edilmelidir. Çok az da olsa toz bulutu oluşmuş ise kesinlikle solunmamalıdır.
- Besiyeri veya besiyeri bileşenleri deriye ve özellikle göze temas etmemelidir. Eğer temas varsa hemen bol su ile yıkanmalıdır.

### 1.6.2. Kaba Aktarma

- Tartılan besiyeri veya besiyeri bileşenleri uygun bir erlen veya cam balona aktarılır.
- Kullanılan kabın hacmi hazırlanacak besiyeri hacminden daha fazla olmalıdır. Özellikle besiyeri bileşiminde agar varsa besiyeri hacmi kap hacminin 2/3 veya 3/4' ünden fazla olmamalıdır.
- Aktarılan kap kuru olmalı, aktarma sırasında kabın ağız kısmına besiyeri veya besiyeri bileşenleri yapışmamalıdır.

### 1.6.3. Çözündürme

Besiyerlerininnde büyük oranda su bulunur. Besiyeri bileşimine giren maddelerin çözelti hâline gelebilmesi için su gerekir. Besiyerinin hazırlanmasında genellikle saf su kullanılır. Çeşme suyu bileşimi yörelere göre farklılıklar göstermekte ve dezenfeksiyonu için yüksek oranda klorlanmaktadır. Suyunun bileşimi aynı olmadığında mikrobiyolojik analiz sonuçları farklı çıkabilir. Klorun mikroorganizmalar üzerine öldürücü etkisi vardır. Ayrıca fazla kireçli olan sularda bulunan Cu, Zn gibi metal iyonları da mikroorganizmalara toksik etki yapar.

- Besiyeri hazırlamada kullanılan suyun pH'sı kontrol edilmeli, pH 5.5 değerinin altında ise su ısıtılarak CO<sub>2</sub> uzaklaştırılmalıdır.
- Besiyerine katılacak su miktarını hatalı ölçmemek için önce istenen hacim kadar saf su besiyeri hazırlanacak kaba konarak seviye cam kalemi ile işaretlenip suyun yarısından fazlası başka temiz bir kaba aktarılır.
- Kaba, yavaşça az miktarda su eklenerek boğaz kısmında kalmış olan besiyeri veya besiyeri bileşenleri yıkanır.
- Besiyeri veya besiyeri bileşenlerinin çözünmesi için karıştırılır.
- Çözünmenin tam olması ve kaynatma süresinin kısaltılması için oda sıcaklığında 10–15 dakika bekletilir.
- Daha önce işaretlenen yere kadar saf su eklenir.

- Besiyeri veya besiyeri bileşenlerinin tamamen çözünmesi için 50°C ta su banyosu veya ısıtıcı manyetik karıştırıcıda ısıtılır. Eğer besiyerine agar katılmışsa ısıtma işlemi kaynama sıcaklığında (90–95 °C) uygulanır.
  - Eritme sırasında erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak buharlaşma ve buharın laboratuvara dağılması önlenmelidir.
  - Isıtma işlemi gereksiz yere uzatılırsa buharlaşma ile su kaybı olur.
  - Özellikle az oranda agar içeren besiyerlerinde ani kaynama sonucu taşmaları önlemek için kaba cam boncuk konur veya sürekli karıştırılır.
- Besiyeri bileşenleri çok iyi çözündürülmezse sterilizasyon sırasında oluşan Maillard reaksiyonları nedeniyle esmerleşmeler görülebilir, bulanıklık ve çökelti oluşur, istenen pH'yı sağlamak zorlaşır.

#### 1.6.4. Berraklaştırma

- Ürediklerinde bulanıklık oluşturan mikroorganizmaların tanımlanmalarında kullanılan ve doğal çökelti maddeleri içeren besiyerleri berraklaştırılır. Besiyeri;
  - Adi filtre kâğıdından veya pamuktan geçirilerek,
  - Santrifüjle,
  - Kapta bekletilerek kaba partiküllerin çöktürülmesi (sedimentasyon) ile berraklaştırılabilir.
- Besiyerinde çökelmiş veya çözünmemiş partiküller kolonilere benzer görünüm oluşturarak mikroorganizma gelişmesinin değerlendirilmesinde yanıltıcı olabilir.

#### 1.6.5. Besiyeri pH'sının Ayarlanması

Bileşimine giren maddeleri tamamen çözünmüş, berrak besiyerinin pH'sı sterilizasyon sonrasında istenen pH değerine göre ayarlanır.

Raf ömrü bitmemiş, usulüne uygun olarak depolanmış, hazır ticari besiyerlerinin, saf su ve temiz cam malzeme kullanıldığında kurallara uygun ve doğru olarak hazırlanıp hemen sterilize edildiğinde pH'sında sorun olmaz.

**Besiyeri pH'ı, sterilizasyon sonu ve oda sıcaklığındaki (25 °C) pH'dır**

#### 1.6.6. Besiyeri pH'ının Ölçülmesi

Besiyerinin pH'sını belirlemek için pH metre veya pH kâğıtları kullanılır

- pH kâğıtları bir ucuna özel indikatör çözeltileri emdirilmiş ince kâğıt çubuklardır. Besiyeri pH'sı ölçülürken;
  - Besiyerinden bir damla besiyeri pH kâğıdı üzerine damlatılır veya pH kâğıdı besiyeri içine batırılır,
  - pH kâğıdı besiyerinden çıkartılıp bir süre beklenir.

- Kâğıtta oluşan renk, renk skalası ile karşılaştırılarak besiyerinin pH'sı belirlenmeye çalışılır.

pH kâğıtları besiyeri pH aralığı hakkında kabaca bir fikir verir, kesin olarak pH'ı belirtmez. pH kâğıtlarının yaklaşık bir sonuç belirtmesi nedeniyle besiyeri pH'ının ölçülmesinde ve ayarlanmasında pH kâğıtları yerine pH metre kullanılır.



Resim 1. 2. Besiyeri pH'ının pH kâğıtları ile ölçülmesi

- **pH metre** elektrotları ile çözeltideki  $H^+$  iyonu konsantrasyonunun sayısal değeri ölçülür. pH metre ile ölçüm yapılırken;
  - pH metrenin besiyeri sıcaklığına göre sıcaklığı ayarlanır.
  - Tampon çözeltiler (genellikle pH=4 ve pH=7 veya pH=4 ve pH=11 olan tampon çözeltiler kullanılır) ile pH metre ayarlanır (kalibre edilir).
  - Daha sonra pH metre elektrotları besiyerine batırılır.
  - pH değeri skaladan okunur.



Resim 1. 3: Pille çalışan el pH metresi



Resim 1. 4: Dijital pH metre

Besiyerinin pH'sı belirtilen pH'dan yüksek veya düşük olduğunda ayarlanmalı, formülde istenen pH'ya getirilmelidir.

- Besiyerinin pH'sı filtrasyonla sterilize edilmiş 1 N veya 0.1 N HCl ile ya da 1 N veya 0.1 N NaOH kullanılarak ayarlanır. Besiyeri pH'sı
  - İstenenden yüksekse 1 N veya 0.1 N HCl,
  - İstenenden düşükse 1 N veya 0.1 N NaOH kullanılarak formülasyonunda belirtilen dereceye ayarlanır.

Besiyeri pH'ının ayarlanırken şu noktalara dikkat edilmelidir;

- Besiyerinin pH'sını ayarlanırken besiyeri bir erlene aktarılır, manyetik karıştırıcı ve ısıtıcıya konur. Besiyerine duruma göre damla damla 1N veya 0.1 N NaOH ya da 1N veya 0.1 N HCl eklenerek pH ayarlanır.
- pH ayarlaması sırasında asit veya baz damlalarının elektrotlara değmemesine dikkat edilmelidir.
- Besiyerinde agar varsa agarın katılaşmaması için besiyeri 45 – 48°C'ye kadar soğutulur pH ayarlanır. Bu durumda pH metre kalibrasyonu da 45 – 48 °C'de yapılmalıdır.
- Besiyerinin pH'ında sterilizasyon sonunda 0.2 – 0.4 kadar düşme olabilir. Bunun için ya besiyerinin pH'ı istenenden 0.2 – 0.4 kadar yüksek ayarlanır ya da besiyerine PO<sub>4</sub> tuzları gibi tampon maddeler ilave edilir.
- Gıda işletmelerinde her otoklavlama sonrası mutlaka pH kontrolü yapılmalıdır.

## 1.7. Besiyeri Hazırlanan Kaplara Hazırlama Bilgilerini Yazma

Hazırlanan Besiyerinin hemen sterilize edilmesi gerekir. Sterilize edilmeden oda sıcaklığında bekletilen besiyerlerinin mikroorganizma gelişir ve bozulur. Bozulmuş besiyerlerinin de mikrobiyolojik analizlerde kullanılamazlar. Bekletilmeden kullanılması önerilen besiyerlerinin dışındakiler ve kısa bir süre sonra sterilize edilecek besiyerlerinin burgulu veya şilifli şişelere konarak buzdolabında bekletilebilir.

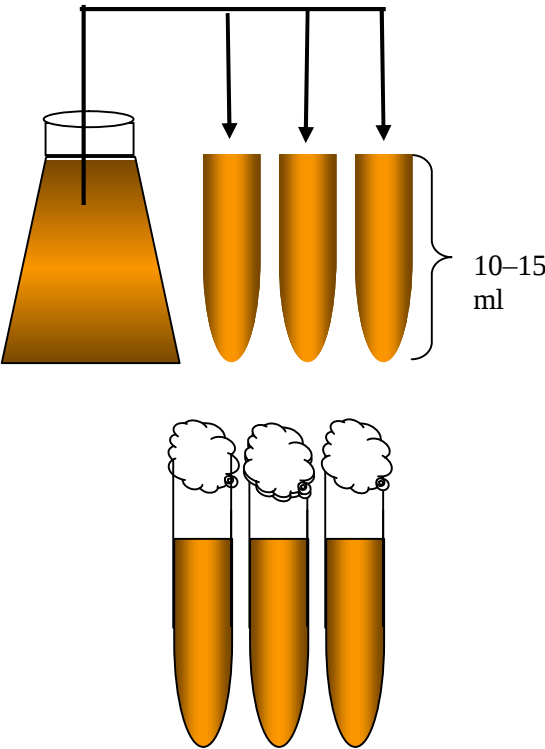
Besiyeri şişesi üzerine;

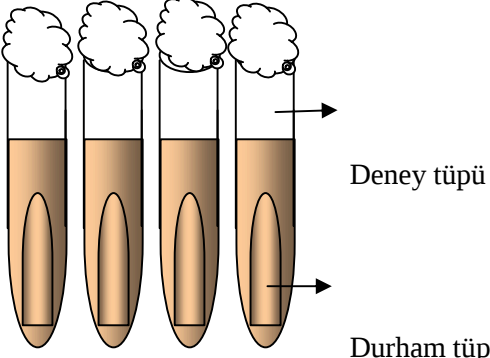
- Besiyerinin adı,
- Hazırlandığı tarih,
- Hazırlanan miktarı(hacim),
- Hazırlayan kişinin adı yazılır.

## 1.8. Besiyerlerini Sterilizasyona Hazırlama Aşamaları

pH'sı ayarlanan besiyeri istenen yöntem ve amaca göre sterilizasyona hazırlanır;

- EMBAgar, SSAgar, PCA, PDA gibi besiyerlerinin bulundukları cam kaplarda sterilizasyona hazırlanır.
- Besiyeri bulunduğu kaptan erlen, balon veya tüplere belirli hacimlerde dağıtılarak ağzı pamuklanır ve alüminyum folyo ile kapatılır.
- Durham tüplü besiyeri hazırlanacaksa Durham tüpleri, test tüplerine ters olarak yerleştirildikten sonra besiyeri konur, tüplerin ağzı pamuklanır.
- Besiyeri burgulu veya şilifli rock şişesine konmuşsa kapaklar gevşek bırakılır.
- Petri kutularında besiyeri sterilize edilmez.

|                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                          |                                                                                                                            |
| <p>➤ Hazırlanan besiyeri tüpte sterilize edilecekse; tüplere uygun miktarda (10–15 ml) besiyeri koyunuz. Tüplerin ağzını pamuklayıp alüminyum folyo ile kapatınız.</p>  | <p>➤ Tüplere dağıtım yaparken tüplükten yararlanınız.</p> <p>➤ Tüpleri tamamen doldurmayınız.</p> <p>➤ Dikkatli olunuz</p> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>➤ Hazırlanan besiyeri Durham tüplerinde sterilize edilecekse; Durham tüplerini test tüplerine ters olarak yerleştirdikten sonra uygun miktarda (5–10 ml) besiyeri koyunuz. Tüplerin ağzını pamuklayıp alüminyum folyo ile kapatınız.</p> <p>➤</p>  <p>Deney tüpü</p> <p>Durham tüpü</p> | <p>➤ Koliform grubu bakterilerinin gaz oluşturduğunu görebilmek için Durham tüpleri test tüplerine ters yerleştirilmelidir.</p> <p>➤ Besiyerini tüplere boşaltırken tüplerde hava kabarcığı kalmamalıdır.</p> <p>➤ İşlem sonunda kullandığımız araç-gereci temizleyiniz ve besiyerlerinin orijinal şişelerinin ağzını sıkıca kapatıp yerine kaldırınız.</p> |
| <p>➤ Hazırlanan besiyeri Petri kaplarında sterilize edilecekse; uygun miktarda besiyerini petri kaplarına aktarınız.</p> <p>➤ Petri kaplarının kapaklarını kapatıp, bulundukları yüzeyde sekiz rakamı doğrultusunda hareket ettiriniz.</p>                                                                                                                                  | <p>➤ Petri kabının iç çapı en az 80 mm, sayım için 12 mm. yükseklikte olmalıdır.</p> <p>➤ Agarlı besiyerleri petri kaplarında steril edilmez. Agarlı besiyerleri; erlen gibi büyük kaplarda steril edildikten sonra, aseptik koşullarda steril petri kaplarına dökülür.</p>                                                                                 |

## 2. BESİYERLERİNİN STERİLİZASYONU VE MUHAFAZASI

### 2.1. Besiyeri Sterilizasyonu ve Aşamaları

Gıda mikrobiyoloji laboratuvarında sonuçların güvenilirliğini etkileyen en önemli faktör sterilizasyondur.

#### ➤ Sterilizasyon

Bir ortamı tüm mikroorganizmalar ve sporelerden arındırmaktır.

Kullanıma hazır steril besiyerlerinin ve besiyeri katkıları dışında laboratuvarında hazırlanan tüm besiyerlerinin ve besiyeri katkıları sterilize edilmelidir.

#### ➤ Sterilizasyonun amacı

Dehidre besiyeri, besiyeri katkıları ve besiyeri hazırlanırken kullanılan cam araç-gereç, hassas terazi, su, pamuk, vidalı kapak vb.den kaynaklanabilecek tüm mikroorganizmaları yok etmektir. Böylelikle besiyerinde yalnızca örnekten veya ana kültürden gelen mikroorganizmaların gelişmesi sağlanır.

Besiyerlerinin yapısına ve özelliğine göre farklı yöntemlerle sterilize edilir. Besiyeri sterilizasyonunda;

- Isıl işlem (basınçlı buhar(=otoklav),tindalizasyon, kaynatma)
- Membran filtrasyon

- Işınla sterilizasyon yöntemleri kullanılır. Diğer sterilizasyon yöntemleri olan kuru hava sterilizasyonu ve kimyasal maddelerle sterilizasyon yöntemleri besiyeri sterilizasyonu için uygun değildir.

➤ **Besiyerlerinin ısı ile sterilizasyonunda amaç:**

Besiyeri içinde bulunabilecek tüm mikroorganizmaları ve sporlarını öldürmek

Fakat besiyerinin yapısına en az zarar verecek derecede ısı işlem uygulanmalıdır.

Çünkü çok yüksek sıcaklıkta ve uzun süre ısı işlem uygulandığında besiyerinin yapısı bozulabilir, agarın jelleşme özelliği olumsuz etkilenir, besiyerinde mikroorganizmalar için toksik bileşikler oluşabilir.

Düşük sıcaklıkta ve kısa süre ısı işlem uygulandığında besiyerinin sterilizasyonu yeterli olmaz ve özellikle kontrol amaçlı mikrobiyolojik analizlerde hatalı sonuç bulunur.

➤ **Besiyerlerinin sterilizasyon sıcaklık derecesi ve uygulama süresi;**

- Besiyeri cinsine,
- Hazırlanan besiyeri miktarına,
- Besiyerinin sıvı ya da katı oluşuna,
- Besiyerinin bulunduğu kabın cinsine göre değişir.

➤ **Besiyeri cinsi**

Besiyerlerinin kullanım kılavuzunda sterilizasyon koşulları belirtilir. Her besiyeri önerilen süre ve sıcaklıkta sterilize edilmelidir.

➤ **Hazırlanan besiyeri miktarı**

Balondaki 1 L besiyeri ile test tüpündeki besiyerinin ısı işlem süresi aynı olmamalıdır. Laboratuvarlarda pratik olarak besiyerlerinin 500 ml hacimlerde hazırlanması önerilir. Test tüplerindeki besiyerleri 121 °C’de 15 dakika sterilize edilirken, 2 L’liklerin 30 dakika sterilize edilmesi gerekir.

➤ **Besiyerinin sıvı ya da katı oluşu**

Agarın ısı iletim katsayısı düşük olduğundan agarlı besiyerleri sıvı besiyerlerinden 5–10 dakika daha uzun süre sterilize edilirler.

| Kap cinsi     | Sıvı hacmi | Süre (dakika) |
|---------------|------------|---------------|
| Test tüpleri  | 5–15 ml    | 15            |
| 500 ml erlen  | 250–350 ml | 20            |
| 1 litre erlen | 500–750 ml | 25            |
| 2 litre erlen | 1–1,5 L    | 30            |
| 5 litre erlen | 2–3 L      | 45            |

**Tablo 2. 1: Sterilize edilecek hacme göre 121 OC’ ta otoklavda sterilizasyon süresi**

➤ **Besiyerinin bulunduğu kabın cinsi**

Maddelerin ısı iletim katsayısı farklı olduğundan besiyerinin bulunduğu kabın cam, metal ya da plastik oluşu, ince ya da kalın çeperli oluşu sterilizasyon süresini etkiler.

**Not: Besiyerleri petri kutuları içinde sterilize edilmez.** Balon, erlen, şişe gibi kaplarda hazırlanan ve sterilize edilen agarlı besiyerleri, aseptik koşullarda steril petri kutularına 15–20 ml kadar dökülür ya da dökme plak yöntemiyle ekim yapılır.

### 2.1.1. Otoklavda Sterilizasyon

Su banyosunda en çok 100 °C'lık sıcaklık sağlandığından besiyerlerinin genellikle otoklavda sterilize edilir. Otoklav, basınçlı buhar üretilen çift cidarlı araçlardır.

➤ **Otoklavda sterilizasyonun esası**

Havanın su buharı ile yer değiştirmesi ve buhar aracılığı ile ısı aktarımının daha kolay yapılmasıdır.

Otoklav ile;

- Su buharı elde edilir.
- Su buharı istenen sıcaklıkta ve sürede kontrol altında tutulur.

**Otoklavda sterilizasyon genel olarak 15 atm basınçta 121 °C' sıcaklıkta 15 – 20 dakika olarak uygulanır.**

Otoklavda basınçla elde edilen doymuş su buharının sıcaklığı, açıkta kaynatma ile elde edilen su buharından daha yüksek sıcaklıkta olduğundan mikroorganizmalar üzerine öldürücü etkisi fazladır.

| Sıcaklık( °C) | Basınç(atm) | Sıcaklık( °C) | Basınç(atm) |
|---------------|-------------|---------------|-------------|
| 100           | 0,0         | 121           | 15.0        |
| 105           | 2,8         | 125           | 19.0        |
| 110           | 6,0         | 130           | 24.5        |
| 115           | 9,8         | 134           | 29.4        |

**Tablo 2. 2:Otoklavda sterilizasyonda sıcaklık-basınç dönüşümü**



**Resim 2. 1: Çeşitli otoklav örnekleri**

Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan otoklav kullanım talimatına göre çalıştırılarak hazırlanan besiyerlerinin sterilize edilir (Mikrobiyolojik Analizlere Hazırlık modülünü hatırlayınız).

➤ **Besiyerlerinin otoklav ile sterilizasyonunda dikkat edilecek noktalar:**

- Yerleştirme yapılırken;
  - o Otoklav aşırı doldurulmamalı,
  - o Vidalı kapaklı şişelerin ağızları çok sıkı olmamalı,
  - o Tüp ve erlenlerin pamuk ya da tıkaçları çok sıkı olmamalıdır. Aksi durumda hava paketleri oluşur ve sterilizasyon sağlanamaz.
- Otoklavda hava kalmamalı, buhar çıkış vanası açık olmalıdır. Otoklavda hava kalırsa oluşan su buharı istenen sıcaklığa ulaşamaz ve yeterli sterilizasyon yapılamaz.
- Sterilizasyon bittikten sonra basınç 0'a düşmeden otoklavın kapağı açılmamalıdır. Kapak hemen açılırsa ani basınç düşüşü nedeniyle sterilize edilmiş besiyerleri kaplardan taşabilir.

### **2.1.2. Su Banyosunda Sterilizasyon**

Su banyosu 100 °C'ye kadar sıcaklık elde edilebilen, içine saf su konan ve suyu istenen sıcaklıkta sabit tutmayı sağlayan termostatu olan özel ısıtıcılardır.

- VRBA besiyeri yalnızca kaynatılarak sterilize edilir. Çünkü burada amaç besiyeri hazırlamada kullanılan araç-gereç ve sudan kaynaklanabilecek Enterobacteriaceae ailesi bakterilerinin yok edilmesidir. Kaynatma sırasında mayalar, küfler ve sporsuz tüm bakteriler ölür. Canlı olarak kalmış sporlu bakteriler VRBA'nın bileşimindeki inhibitör maddeler nedeniyle standart analiz süresi olan 48 saat içinde gelişemezler.

- Selenit sistin Broth gibi bazı besiyerleri su banyosunda 60°C'de tutularak sterilize edilir.
- Su banyosu agarlı besiyerleri hazırlanırken agarın eritilmesinde kullanıldığı gibi jelâtin veya şeker içeren besiyerlerinin sterilizasyonunda da kullanılır.
- Su banyosunda kaynatma ve kademeli sterilizasyon yani tindalizasyon yöntemiyle sterilizasyon da yapılır.

- **Tindalizasyon**

Bileşiminde karbohidratlı, proteinli veya süt gibi yüksek ısıda bozulan gıda maddeleri bulunan besiyerlerininne uygulanır. Günümüzde artık pek geçerli olmayan tindalizasyon yöntemi otoklavın doğru çalışmadığından şüphelenildiği ya da otoklavın bozuk olduğu durumlarda kullanılabilir.

- **Tindalizasyonun esası;** art arda belli sürelerde, üç kez 100 °C'larda ısıtıl işlem uygulanmasıdır.
- **Tindalizasyon uygulamalarına örnekler:**

**Örnek 1:**

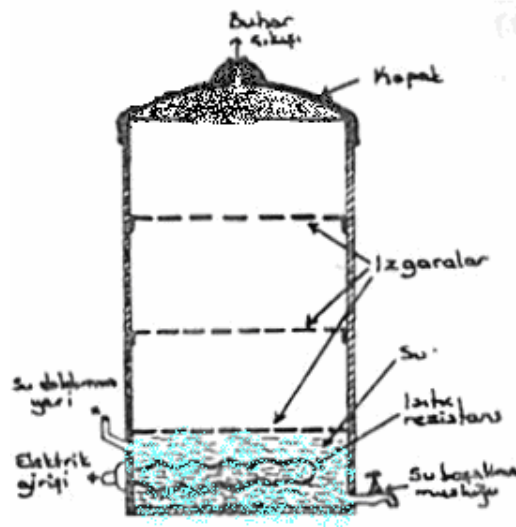
|                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • Besiyerine 1. gün 100°C'de 30 dakika -1 saat ısıtıl işlem uygulanarak mikroorganizmaların vegetatif formları öldürülür. Daha sonra besiyeri oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek ortamda bulunan sporların çimlenerek vegetatif hâle geçmesi sağlanır. |
| • Besiyerine 2. gün 85–100°C'de 30 dakika –1 saat ısıtıl işlem uygulanır. Var olan vegetatif formları yok edilir. Yine besiyeri oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek ortamda bulunan son sporların çimlenerek vegetatif hâle geçmesi sağlanır.           |
| • Besiyerine 3. gün 100°C'de 30 dakika –1 saat ısıtıl işlem uygulanır. Ortamda bulunan son vegetatif formları öldürülür.                                                                                                                                  |

**Tablo 2. 3: Tindalizasyon uygulamasının yapılışı ve mikroorganizmalara etkisi**

**Örnek 2:**

|                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| • Besiyeri kaynar su banyosunda 80°C'de 1 dakika tutulur, mikroorganizmaların vegetatif formları öldürülür. Daha sonra besiyeri oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek ortamda bulunan sporların çimlenerek vegetatif hâle geçmesi sağlanır. |
| • Besiyeri su banyosunda kaynama sıcaklığında 95–98°C'de 30 dakika tutulur ve hızla soğutularak oda sıcaklığında 8 saat bekletilir. Termal şok ve bekleme ile sporların çimlenerek vegetatif hâle geçen formları yok edilir.               |
| • Yukarıdaki işlem toplam 3 kez uygulanır.                                                                                                                                                                                                 |

**Tablo 2. 4: Farklı bir Tindalizasyon uygulamasının yapılışı ve mikroorganizmalara etkisi**

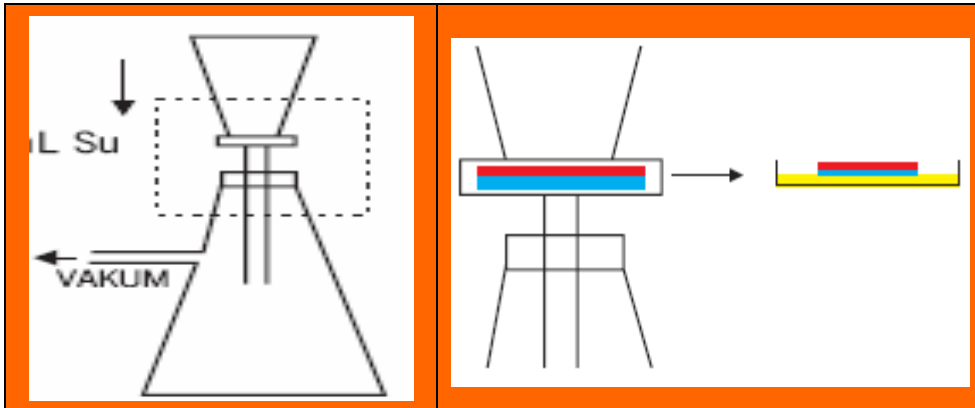


Şekil 2. 1:Özel tindalizasyon kazanı

### 2.1.3. Filtre ile Sterilizasyon:

Bir besiyerinde bulunan mikroorganizmaların geçemeyeceği kadar küçük gözenekli (<0,20- 0,45 mikron çaplı) özel filtrelerden geçirilerek ayrılmalarını sağlayan sterilizasyon yöntemidir.

- Porselen, diyatome toprağı, kiselgur, asbest-selüloz, nitroselüloz ve sinterlenmiş camdan yapılmış filtreler kullanılmaktadır.
- Vitamin ve früktoz gibi keton grubu içeren karbohidratlar sıcaklık etkisiyle bozulur. Bu maddeler önce filtre ile sterilize edilir daha sonra besiyeri bileşimine katılırlar.
- Filtre ve filtrenin yerleştirildiği gövde, otoklavda sterilize edildikten sonra vakum ve basınç uygulayarak besiyerinin sterilizasyonu gerçekleştirilir.
- Filtre edilecek çözelti tam çözünmüş olmalı ve filtrat mutlaka steril bir kaba aktarılmalıdır.



Şekil 2. 2: Filtre ile sterilizasyon

### 2.1.4. Mikrodalga Fırında Sterilizasyon

Radyasyon mikroorganizmaları öldürür, enzimlerini inaktive eder.

Yaklaşık 500 rad (=1 g madde tarafından absorbe edilen radyasyon miktarı) dozundaki radyasyon insanı öldürür. Bakteri sporlarının tamamen yok edilmesi ve sterilizasyonun sağlanması için birkaç milyon rad gerekir.

Işınlama ile sterilizasyon daha çok özel amaçlı dehidre besiyeri üretiminde kullanılır. Işınlama ile sterilizasyon, maddede sıcaklık yükselmediğinden soğuk sterilizasyon denir. Sterilizasyonda kullanılan ışınlar; UV, beta ve gama ışınları kullanılır.

- UV ışınları yüzeysel etkilidir. Gıda işletmelerinde hava, su, araç-gereç oda sterilizasyonunda kullanılır.
- X ve gama ışınları pratik olarak gıda mikrobiyolojisinde kullanılmaz. Yalnızca ışınlanmış Triptik Soya Broth ve Ready Cult uygulamalarında kullanılmaktadır.

Mikrodalgalar radyan enerjinin elektromanyetik dalgalarıdır. Dalga boyları 0.025–0.75 cm, frekansları ise 400–20000 megahertz olan ışınlardır. Bir megahertz saniyede bir milyon titreşim demektir.

Direkt alev, sıcak hava, sıcak buhar gibi ısı işlemlerde ısı, yüzeyden içeriye doğru ilerlerken mikrodalga ısıtmasında; ısı maddeye çok hızlı ve üniform bir şekilde girerek bütün su moleküllerini ve polar molekülleri aynı zamanda harekete geçirerek maddenin iç kısmındaki suyun kaynamasını sağlar.

Otoklavla sterilizasyonun zaman aldığı ve bazen sterilize edilecek malzemelere zarar verebildiği, filtre sterilizasyonu az miktarda ortama uygulandığı ve pahalı bir yöntem olduğu için mikrodalga fırında sterilizasyon yapılmaktadır. 700 Watt gücünde ev tipi mikrodalga fırın kullanarak %3 sakkaroz içeren 100 ml besi ortamı 5 dakikada, 250 ml besi ortamı 10 dakikada, 1000 ml=1 L besi ortamı 15 dakikada, agar içeren besi ortamları ise 15 dakikada sterilize edilebilir.

### 2.2. Sterilizasyonla İlgili Dikkat Edilecek Noktalar

- Besiyerlerinin hazırlanmasında ve dağıtımında kullanılan cam malzemelerin de mikroorganizmaların üremesini engelleyen maddelerden arındırılmış olması gerekir.
- Besiyeri katılan maddelerde zıt (antagonist) etkiler bulunmamalıdır. Örneğin: dekstroz, PO<sub>4</sub> gibi tuzlarla birlikte otoklavda sterilize edilirse inhibitör bileşikler oluşabileceğinden karbohidratlar ayrı olarak sterilize edilip besiyerine sonra katılır.
- Otoklavlama süresi sterilize edilecek besiyerinin hacmine, besiyeri bileşiminde agar olup olmadığına, kullanılan kabın cinsine ve et kalınlığına göre belirlenmelidir.

- Önerilen sterilizasyon sıcaklık ve sürelerine titizlikle uyulmalıdır. Çünkü uzun süre, yüksek sıcaklıktaki ısı uygulaması besiyeri pH'ını değiştirir, çökelme ve esmerleşmelere neden olur. Besiyerindeki agarın katılaşma özelliğini azaltır.
- Besiyeri hazırlandıktan sonra en geç 1 saat içinde sterilize edilmelidir.
- Otoklavın güvenlik ve etkinliği belli periyotlarla kontrol edilmelidir.
- 2 litreden fazla hazırlanan besiyerinin sterilizasyonunda kullanılan otoklavda besiyerini çalkalama, havalandırma düzenekleri olmalıdır.
- Katkı maddesi eklenecek agarlı besiyerine sterilizasyon öncesi manyetik taş atılarak, manyetik taşın da besiyeri ile birlikte sterilize edilmesi sağlanmalıdır.
- Uygulanan sterilizasyonun tarihi, başlangıç sıcaklığı, sterilizasyon sıcaklığına ulaşma ve bu sıcaklığında kalma süreleri kayıt altına alınmalıdır.
- Isıya duyarlı olan pepton ve şeker içeren besiyerlerinde sterilizasyon sonunda esmerleşme, kararma olmuşsa bu besiyerleri analizlerde kullanılmamalıdır.

## 2.3. Sterilizasyon Sonrası İşlemler

### 2.3.1. Katkı Maddelerinin Eklenmesi

Sterilizasyondan sonra agarlı besiyerine katkı maddesi ilave edilecekse katkı maddeleri 30–35°C'de, besiyeri ise 45–50 °C'de olmalıdır. Soğuk katkı maddesi besiyerinde yer yer jelleşmelere neden olur.

### 2.3.2. Sterilize Besiyerinin Petri Kutularına Dökülmesi

- Sterilize edilmiş PCA veya PDA gibi besiyerlerine dökme plak yöntemi ile ekim yapılacaksa besiyeri 45 °C 'ye kadar soğumaya bırakılır.
- Agarlı besiyerine çizme ya da yayma yöntemleri ile ekim yapılacaksa besiyeri 50°C'a kadar soğutup hemen steril petri kutularına 15–20 ml dökülür Petri kutusunda besiyeri kalınlığı ½ cm=5 mm kadar olmalı ve katılaşması beklenir.



Resim 2. 2: Tüpten steril petri kutularına agarlı besiyeri boşaltma

### 2.3.3. Agarlı Besiyerlerinin Yüzeylerinin Kurutulması

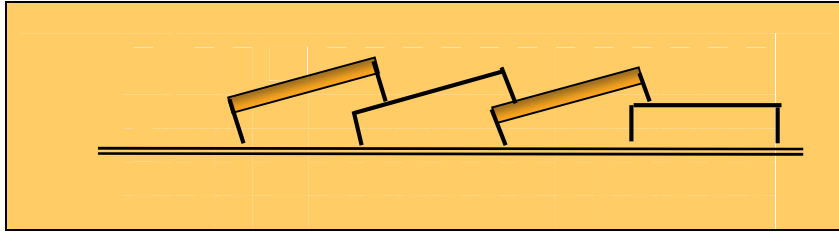
- Ekimde sürme tekniği kullanılacaksa gelişecek mikroorganizma kolonilerinin yayılmasını ve birbirine karışmasını önlemek için petri kutularındaki agarlı besiyerlerinin yüzeyleri kurutulur. Petri kutularına dökülmüş besiyerlerinin yüzeyi ıslak veya çok kuru olmamalıdır.
- Besiyerinin yüzeyinde su damlacıkları varsa kurutulması gerekir.

Besiyeri yüzeylerinin kurutulma nedenleri;

- Islak yüzeylerde hareketli bakteriler yayılıcı tip koloni, hareketsiz bakteriler ise normalden daha büyük koloniler oluşturur,
- Aşırı kuru yüzeylerde ise normalden daha küçük koloniler oluşur ve her iki durum da yanlış ve hatalı sonuçlara neden olur.

Besiyer yüzeyin kurutulmasında dikkat edilecek noktalar;

- Kurutma mutlaka serbest hava akımı olmayan, temiz yerlerde yapılmalıdır. Etüvler, steril hava akımı ile çalışan aşılama kabinleri, UV ışınları ile sterilize edilmiş kabinler, besiyerlerinin yüzeylerinin kurutulmasında en güvenli ortamlardır.
- Kurutma için petri kutuları kapağı alta gelecek ve çok az açık bırakılacak şekilde yerleştirilir.
- 37 °C'lik etüv raflarında 10–15 dakika bekletilerek kurutma yapılabilir.



Şekil 2. 3: Yüzeyi kurutulacak petri kutularının etüve kapağı alta gelecek şekilde yerleştirilmesi

### 2.3.4. Tüplerdeki Besiyerlerine Yapılan İşlemler

- Tüpte dik agar kültürü hazırlanacaksa tüpler, tüplükte bekletilerek katılaşması beklenir.
- Tüpte yatık agar kültürü hazırlanacaksa tüpler uygun bir destekle hafif meyilli olarak bekletilip katılaşması sağlanır.

- Besiyeri, Durham tüplerinde sterilize edilmişse Durham tüpleri otoklavdan çıkartılıp hemen akan çeşme suyunda soğutulur ve tüplerin besiyeri ile dolu olup olmadığı kontrol edilir.

### 2.3.5. Agarlı Besiyerlerinin Yeniden Eritilmesi

- Agarlı besiyerleri tekrar kullanılacağı zaman 35–90°C'deki su banyosunda eritilir. Eritme işlemi kısa sürede bitirilmeli, agarlı besiyeri 50°C'de 3 saatten fazla bekletilmemelidir. Aksi durumda agar katılaşma özelliğini kaybeder.
- Agarlı besiyerleri yalnızca bir defa eritilip kullanılmalıdır.
- Katkı ilave edilmiş besiyerleri, yüksek sıcaklığa duyarlı besiyerleri, otoklavda sterilize edilmemiş agarlı besiyerleri yeniden eritilip kullanılmamalıdır.



Resim 2. 3: Katı besiyerini eritme

### 2.4. Sterilizasyon Kontrolü

Hangi yöntemle sterilize edilmiş olursa olsun mikrobiyolojik analizlerde kullanılacak malzemelerin gerçekten sterilize olup olmadığının kontrolü yapılmalıdır. Sterilizasyon kontrolü yapılırken kontaminasyon olmamasına dikkat edilmelidir. Sterilizasyon kontrolü biyolojik ve kimyasal indikatörlerle veya daha basit olarak şahit besiyeri kullanılarak yapılabilir.

- **Kimyasal indikatörler:** Belli sıcaklıklarda renk değişimi gösteren kimyasal indikatörler içeren kâğıt, tüp, şerit vb. şekillerde hazırlanmış test materyalleridir.

Sterilizasyonda istenen sıcaklığa ulaşıp ulaşamadığı kullanılan indikatörün renk değişimi ile anlaşılır. En fazla kullanılan kimyasal indikatör otoklav şeritleridir. 121°C'de 15 dakika olan standart sterilizasyon süresinde şerit renk değiştirir. Renk değişikliği görülmemesi yeterli sterilizasyon yapılmadığını gösterir.

| Sterilizasyon yöntemi                      | Kullanılan indikatörler              | Oluşan renk değişimi           |
|--------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| Otoklavda veya kuru hava ile sterilizasyon | Browne tüpleri                       | Kırmızıdan yeşile              |
| Otoklavda sterilizasyon                    | Steam Clox kâğıtları                 | Mordan yeşile                  |
| Otoklavda sterilizasyon                    | Diack tüpleri                        | Eriyerek bej renkten kırmızıya |
| Otoklavda sterilizasyon                    | Otoklav şeridi                       | Açık renkten koyu renge        |
| Otoklavda sterilizasyon                    | Bowie-Dick şeritleri                 | Açık renkten koyu renge        |
| Gama ışınlarıyla sterilizasyon             | Azo boyalı polivinil klorid şeritler | Sarıdan kırmızıya              |

Tablo 2. 5:Kimyasal indikatörler

- **Biyolojik indikatörler:** Sterilizasyona direnci (rezistanslığı) bilinen, belli sayıda canlı sporları içeren özel test indikatörleridir ve otoklavın, sıcaklığa dirençli bakteri sporlarını öldürme yeteneğini ortaya koyarlar. Biyolojik indikatörler sterilizasyon sırasında sterilize edilecek maddelerle birlikte otoklava konur. Sterilizasyon sonunda ise inkübasyona bırakılarak mikroorganizma üremesi olup olmadığı kontrol edilir. İnkübasyonda mikroorganizma üremesi görülmemişse sterilizasyon yeterli yapılmış demektir. Biyolojik sterilizasyon indikatörlerine sterikon denir.

| Sterilizasyon yöntemi          | Bakteri türü ve spor sayısı(10 <sup>6</sup> adet <sup>1</sup> ) | Test Materyali           | Sterilizasyon sonrası inkübasyon şekli               |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------|
| Otoklavda sterilizasyon        | Bacillus stearothermophilus                                     | Kâğıt şerit veya diskler | 55 °C'de sıvı besiyerinde 5 gün aerobik inkübasyon   |
| Kuru hava ile sterilizasyon    | Clostridium tetani                                              | Steril kum               | 37 °C'de sıvı besiyerinde 5 gün anaerobik inkübasyon |
| Gama ışınlarıyla sterilizasyon | Bacillus pumilis                                                | Kâğıt şerit veya diskler | 37 °C'de sıvı besiyerinde 5 gün aerobik inkübasyon   |

Tablo 2. 6:Biyojik indikatörler



Resim 2. 4: Sterikon biyoindikatör; sarı turuncu renk yetersiz sterilizasyonu gösterir.

- **Şahit besiyeri ile sterilizasyon kontrolü:** Aşılanmamış (inoküle edilmemiş) bir besiyeri aşılanmış diğer besiyerleri ile birlikte inkübasyona bırakılır. Yeterli sterilizasyon yapıldığında aşılanmamış besiyerinde üreme görülmez. Üremenin gözlenmesi sterilizasyonun iyi yapılmadığını gösterir ve bu besiyerleri mikrobiyolojik analizlerde kullanılmaz.

## 2.5. Besiyerlerinin Muhafazası

Besiyerlerinin hazırlanması zahmetli ve zaman alıcı olduğundan fazla hazırlanabilir. Fazla hazırlanan besiyerleri uygun şekillerde muhafaza edilmelidir. Böylece besiyerlerinin kurumaları, kontaminasyonları ve bileşimlerinin bozulması önlenmiş olur.

- **Besiyerlerinin Muhafazasında Dikkat Edilecek Noktalar**
  - Besiyerleri erlen, cam balon veya kapaklı şişelere 1/3'i boş kalacak şekilde konulur.
  - Besiyerlerinin bulunduğu erlen, cam balon ve şişelerin ağzı kapaklı veya şilifli olmalı ya da pamuk tıkaçla kapatılmalıdır. Pamuk tıkaçın üzerine alüminyum folyo konup, kabın boyun kısmı iple sıkıca bağlanmalıdır. Aksi durumda besiyeri çok çabuk bozulur.
  - Besiyerleri hazırlandıktan sonra, burgulu veya şilifli rock şişesine konup sterilize edilmişse, sterilizasyon öncesi gevşek bırakılan kapaklar sıkıştırılarak buzdolabına konur.
  - Bekletilmeden kullanılması önerilen besiyerleri dışındakiler buzdolabında(+4°C' de) muhafaza edilmelidir.
  - Saklanabilen özellikte ve petri kutularına dökülmüş besiyerleri plastik torbalar içinde soğukta saklanmalıdır.
  - Buzdolabına konmayan besiyerleri nemli, serin ( 4–8 °C') ve karanlık bir yerde muhafaza edilmelidir.

- Rose Bengal Agar gibi bazı besiyerleri ışıktan da korunmalı ve renkli şişelerde muhafaza edilmelidir.
- Selektif ve diferansiyel besiyerleri bir hafta, on gün içinde kullanılmalıdır.
- Kontamine olmuş veya kurumuş besiyeri plakları atılmalıdır.
- ISO 11133'e göre katkı eklenmemiş olmak koşulu ile besiyerleri buzdolabında en çok 3 ay depolanabilir.
- Besiyerlerinin muhafazasında en önemli nokta su kaybının önlenmesidir. Petri kutularındaki besiyerleri, şişe ve balonlarda muhafaza edilen besiyerlerinden daha fazla nem kaybeder. Muhafaza edilen besiyerlerinde nem kaybı;
  - o Yüzeyin aşırı kurumasına neden olur.
  - o Ağırlık kaybına neden olur.
  - o Özellikle Gram (-) bakteriler ve selektif besiyerlerinde sahte sonuçlar ortaya çıkarır.

Agarlı besiyerlerinde izin verilen ağırlık kaybı oranı %15'tir. Petri kutularının vakum altında depolanması nem kaybını önler.



Resim 2. 5: Buzdolabında muhafaza edilmek için yerleştirilmiş petri kutuları ve saklama şişelerinde besiyerleri

## 2.6. Hazır Ticari Besiyerleri ve Muhafazası

Hazır olarak satılan kuru formdaki besiyerleri veya besiyeri bileşenleri genellikle nem çekicidir. Sıcaklığa ve ışığa karşı çok duyarlıdır. Bu nedenle hazır ticari besiyerleri;

- Satıldıkları orijinal kaplarında,
- 25°C'dan düşük sıcaklıkta,
- Kuru ve karanlık ortamlarda saklanmalıdır.
- Hazır ticari besiyerlerinin her kullanımdan sonra orijinal kaplarının kapakları sıkıca kapatılmalıdır.
- Kutu ilk açıldığında renk, topaklanma, kalıplaşma vb. özellikleri kontrol edilip açılma tarihi laboratuvar defterine kaydedilmelidir.

Son kullanma tarihi geçen ve iyi saklanmayan hazır ticari besiyerleri veya besiyeri bileşenleri kullanılarak hazırlanan besiyerlerinde bulanıklık, çökelme, pH gibi problemler oluşabilir.

Homojen yapısı olmayan, topaklanmış, kalıplaşmış, rengi değişmiş dehidre besiyerleri mikrobiyolojik analizlerde kullanılmaz.