

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

LABORATUVAR HİZMETLERİ

BESİYERİ

Ankara, 2015

- Bu modül, Mesleki ve Teknik Eğitim Okul/Kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
- Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.
- PARA İLE SATILMAZ.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| GİRİŞ | 1 |
| ÖĞRENME FAALİYETİ-1 | 3 |
| 1. BESİYERİ..... | 3 |
| 1.1. Besiyerinin Tanımı ve Kullanım Amaçları | 3 |
| 1.2. Besiyerlerin Sınıflandırılması | 4 |
| 1.2.1. Genel Sınıflandırma | 4 |
| 1.2.2. Fiziksel Özelliklerine Göre Sınıflandırma | 4 |
| 1.2.3. Kaynaklarına Göre Sınıflandırma | 4 |
| 1.2.4. Kullanım Amaçlarına Göre Sınıflandırma | 5 |
| 1.3. Besiyeri Bileşimine Giren Maddeler..... | 7 |
| 1.4. Besiyerinin Sahip Olması Gereken Özellikler | 9 |
| 1.5. Dehidre Besiyerleri | 10 |
| 1.5.1. Etiketle Yer Alan Bilgiler | 11 |
| 1.5.2. Dehidre Besiyerlerinin Muhafazası | 11 |
| 1.6. Besiyeri Hazırlamada Ön İşlemler | 11 |
| UYGULAMA FAALİYETİ | 14 |
| ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME | 15 |
| ÖĞRENME FAALİYETİ-2 | 16 |
| 2. BESİYERİ HAZIRLAMA | 16 |
| 2.1. Besiyeri Hazırlık Aşamaları..... | 16 |
| 2.2. Besiyeri Hazırlarken Dikkat Edilecek Hususlar | 19 |
| UYGULAMA FAALİYETİ | 21 |
| ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME | 23 |
| ÖĞRENME FAALİYETİ-3 | 24 |
| 3. BESİYERLERİNDE STERİLİZASYON SONRASI İŞLEMLER..... | 24 |
| 3.1. Katkı Maddelerinin Eklenmesi | 24 |
| 3.2. Petri Kutusunda Agarlı Besiyeri Hazırlanması | 25 |
| 3.3. Tüpde Agarlı Besiyerlerinin Hazırlanması | 26 |
| 3.4. Besiyerlerinde Yüzey Kurutma İşlemi | 27 |
| 3.5. Besiyeri Sterilizasyon Kontrolü | 27 |
| 3.5.1. Biyolojik (Bakteriyolojik) İndikatörler..... | 27 |
| 3.5.2. Kimyasal İndikatörler | 28 |
| 3.5.3. Elektrikli İndikatörler | 29 |
| 3.6. Hazırlanmış (Stok) Besiyerlerin Muhafazası | 30 |
| 3.7. Agarlı Besiyerlerinin Yeniden Eritilmesi..... | 30 |
| 3.8. Kullanıma Hazır Besiyerleri | 31 |
| UYGULAMA FAALİYETİ | 32 |
| ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME | 34 |
| MODÜL DEĞERLENDİRME | 36 |
| CEVAP ANAHTARLARI | 38 |
| KAYNAKÇA | 39 |

AÇIKLAMALAR

| | |
|--|---|
| ALAN | Laboratuvar Hizmetleri |
| DAL/MESLEK | Alan Ortak |
| MODÜLÜN ADI | Besiyeri |
| MODÜLÜN SÜRESİ | 40/25 |
| MODÜLÜN AMACI | Bireye/öğrenciye hazırlanacak besiyerinin özelliği ve kullanım amacına uygun besiyeri hazırlama işlemlerine yönelik bilgi ve becerileri kazandırmaktır. |
| MODÜLÜN ÖĞRENİM KAZANIMLARI | <ol style="list-style-type: none">1. Kullanım amacına uygun olarak besiyeri hazırlama ön işlemlerini yapabileceksiniz.2. Hazırlanacak besiyerinin özelliği ve kullanım amacına uygun olarak besiyeri hazırlama işlemlerini yapabileceksiniz.3. Kullanım amacına uygun olarak besiyeri hazırlamada sterilizasyon sonrası işlemleri yapabileceksiniz. |
| EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI | Donanım: Yerel Ağ (İnternet), otoklav, su banyosu, pH metre, buzdolabı, bunzen bek, dehidre besiyeri ya da besiyeri bileşenleri, hassas terazi, balon, erlen, pamuk, alüminyum folyo, saf su, spatül, mezür, deney tüpü, pipet, tüplük, cam yazar kalem Ortam: Laboratuvar ortamı, kütüphane, bireysel öğrenme ortamları vb. |
| ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME | Modül içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen ölçme araçlarıyla kendinizi değerlendireceksiniz. Öğretmen modülün sonunda ölçme aracı (çoktan seçmeli test, doğru-yanlış testi, boşluk doldurma, eşleştirme vb.) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığımız bilgi ve becerileri ölçerek sizi değerlendirecektir. |

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Laboratuvarda incelenecek mikroorganizmaların öncelikle laboratuvar şartlarında üretilerek çoğaltılmaları amacıyla ihtiyaç duydukları besin maddeleri ve ortam şartlarının sağlanması gerekir. Mikroorganizmaların üremeleri ve çoğalmaları için gerekli besin maddeleri ve fiziksel şartları içeren ortamlara besiyeri denir.

Laboratuvar çalışmalarında farklı amaçlar için kullanılan yüzlerce çeşit besiyeri vardır. Aynı amaç için kullanılan farklı besiyeri çeşitleri, hatta aynı isimde farklı bileşen ve bileşen miktarları içeren besiyerleri de mevcuttur. Bunlardan dolayı besiyerleri çok farklı şekillerde hazırlanabilmektedir.

Besiyeri hazırlamada genel olarak temel işlem basamakları; besiyeri hazırlama ön işlemleri, tartım, çözündürme, berraklaştırma, pH ayarlama, sterilizasyon ve sterilizasyon sonrası işlemler şeklindedir. Bu modül, besiyeri hazırlama, sterilizasyon sonrası işlemleri yapma ile ilgili becerileri kazanmanızda sizlere yardımcı olacaktır.

ÖĞRENME FAALİYETİ-1

ÖĞRENME KAZANIMI

Kullanım amacına uygun besiyeri hazırlamanın ön işlemlerini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Besiyerleri ve özelliklerini araştırınız.
- Çevrenizdeki mikrobiyoloji laboratuvarlarına giderek kullandıkları besiyerleri ve kullanım amaçlarını araştırınız.

1. BESİYERİ

1.1. Besiyerinin Tanımı ve Kullanım Amaçları

Mikroorganizmaların üretilmesi ve çeşitli faaliyetlerinin belirlenmesi amacıyla ihtiyaç duyduğu maddeleri ve özellikleri içeren yapay veya doğal ortamlara **besiyeri** denir. Besiyerleri; vasat, kültür ortamı, medium gibi değişik isimlerle de anılmaktadır.



Resim 1.1: Çeşitli besiyerleri

Besiyerleri çok farklı amaçlarla kullanılabilir. Bunlar mikroorganizmaların;

- Üretilmesi, geliştirilmesi ve canlılıklarının korunması,
- Saf kültürlerinin elde edilmesi (izolasyonu),
- Tanımlanmaları (identifikasyonu),
- Sayımlarının yapılması,
- Yapılarının ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi,
- Antimikrobiyel duyarlılık ve sterilitate testleri,
- Biyolojik ve metabolik ürünlerinin elde edilmesi,
- Gıda, su ve çevre kontrollerinin yapılması gibi çeşitli konuları kapsar.

Besiyeri seçimi, ekim yapılacak numunenin nereden alındığına, numunede bulunabilecek mikroorganizmaların ve bu mikroorganizmaların beslenme gereksinimlerine göre yapılır.

1.2. Besiyerlerin Sınıflandırılması

Besiyerleri doğal ve yapay besiyerleri olarak sınıflandırılmakla beraber, fiziksel özelliklerine, kaynaklarına ve kullanım amaçlarına göre de sınıflandırılmaktadır.

1.2.1. Genel Sınıflandırma

Besiyerleri doğal ve yapay (sentetik) besiyerleri olmak üzere iki kısımda incelenir.

- **Doğal besiyerleri:** Doğal besiyerleri, canlı ve cansız ortamlar olarak ikiye ayrılır. Canlı besiyerleri hücre kültürleri, embriyolu yumurta ve deney hayvanlarından (kobay fare, sıçan, tavşan, hamster vb.) yararlanılmaktadır. Embriyolu yumurta, özellikle virüsler ve **riketsialar** için önemli bir ortamdır. Cansız besiyerleri süt, yumurta, patates, havuç gibi doğal maddelerden yapılan besiyerleridir.
- **Yapay (sentetik) besiyerleri:** Belirli miktarlarda saf kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanan, yapısı ve içeriği tam olarak bilinen besiyerlerine sentetik besiyerleri denir. Bu tür besiyerleri, genellikle besiyerine belirli kimyasal maddeleri ilave etmek veya çıkartmak suretiyle bir bakterinin esansiyel ihtiyaçlarını belirlemek, bakterilerin metabolizmalarını incelemek ve biyolojik ürünlerini saf olarak elde etmek amacıyla kullanılır.

1.2.2. Fiziksel Özelliklerine Göre Sınıflandırma

Besiyerleri fiziksel özelliklerine göre üç şekilde sınıflandırılır.

- **Sıvı besiyerleri:** İçinde katılaştırıcı madde bulunmayan, daha çok mikroorganizmaların üretilmesinde kullanılan sıvı hâldeki besiyerleridir. Nutrient Broth ve peptonlu tuzlu et suyu (adi buyyon) sıvı besiyerine örnektir.
- **Katı besiyerleri:** Bileşimine kıvam verici, katılaştırıcı madde katılmış besiyerleridir. Katılaştırıcı madde olarak en çok agar, nadiren jelatin, yumurta, serum, alginatlar ve silika jel kullanılır(örneğin; nutrient agar, EMB agar gibi).
- **Yarı katı besiyeri:** Sıvı besiyerlerine % 0,3-0,5 oranında agar ilave edilerek hazırlanmış besiyerleridir. Örneğin; craigie besiyeri, bakterilerin hareket muayenesi için kullanılan ve % 0,4 oranında agar içeren yarı-katı bir besiyeridir.

1.2.3. Kaynaklarına Göre Sınıflandırma

Besiyeri bileşimine giren besin maddelerinin kaynağına göre yapılan sınıflandırmadır.

- **Hayvansal kaynaklı besiyeri:** Yumurta sarısı, karaciğer, balık unu, süt, et suyu gibi hayvansal dokulardan elde edilmiş besiyerleridir.
- **Bitkisel kaynaklı besiyeri:** Patates ekstraktı, portakal serumu gibi bitkisel dokulardan elde edilmiş besiyerleridir.

1.2.4. Kullanım Amaçlarına Göre Sınıflandırma

Besiyerlerinin kullanım amacına göre sınıflandırılması bileşimleri ile doğrudan ilgilidir ve sınıflandırmada en yaygın olarak kullanılan yöntemdir.

- **Genel (amaçlı) besiyerleri:** Herhangi bir inhibitör madde içermeyen, besin maddelerince yeterli veya zengin, herhangi bir mikroorganizma grubunun gelişmesini özel olarak desteklemeyen, bazı zor gelişenlerin de dâhil olduğu çok sayıda mikroorganizmanın gelişmesini sağlayan besiyerleridir. Plate count agar (PCA), nutrient agar ve nutrient broth, tamponlanmış peptonlu su en sık kullanılan genel amaçlı besiyerleridir.
- **Özel (Amaçlı) besiyerleri:** Özel amaçlı besiyerleri, kullanım amaçlarına bağlı olarak aşağıdaki gibi incelenebilir.
 - **Seçici (selektif) besiyerleri:** Üretilmek istenen özel bir bakteri dışındaki mikroorganizmaların üremesini inhibe eden maddeler içeren besiyeridir. Örneğin; chapman besiyeri, içerdiği % 7,5 oranındaki NaCl ile diğer mikroorganizmaların üremesini inhibe ederken stafilkokların selektif olarak üremesini sağlar.
 - **Ayırt edici (diferansiyel) besiyerleri:** İçerdikleri ayıraçlar sayesinde benzer bakterilerin farklı görünümde koloniler oluşturmasını sağlayarak bakterileri birbirinden ayırmaya imkân veren besiyerleridir. Örneğin; endo agar ve EMB (Eosine Methylen Blue) agar bu tür besiyerleridir. *E. coli*, endo agarda tipik bir görüntü vererek diğer koliform grubu mikroorganizmalardan ayırt edilir.
 - **Selektif / ayırt edici besiyerleri:** Bazı besiyerleri hem selektif hem de ayırt edici özellik taşıyabilir. Bakterilerin identifikasyonu amacıyla biyokimyasal özelliklerini incelemek için kullanılan besiyerleri selektif/ayırt edici özellik taşır.
 - **Zenginleştirici besiyerleri:** Çok sayıda farklı mikroorganizma bulunan bir ortamda, izole edilmesi istenen bakteri çok az sayıda bulunuyorsa zenginleştirici besiyerleri kullanılır. Başka bir deyişle özel büyüme faktörlerine ihtiyaç duyan mikroorganizmalar için üreme ortamına gerek duyulan maddelerin ilavesiyle hazırlanan besiyerleridir (örneğin; laktik asit bakterileri için süt agarı veya nutrient agarda bulunan besin maddelerine ilaveten % 2 sükröz ilavesi ile hazırlanan besiyerleri, kanlı agar, lewenstein – jensen besiyeri).
 - **Transport besiyerleri:** Herhangi bir örnekten izole edilmek istenen mikroorganizmalar, çevre koşullarına karşı çok duyarlı ise bu durumda laboratuvara taşınmaları sırasında canlılıklarını koruyabilmeleri için uygun ortam sağlayan besiyerleri de nakledilir (örneğin, stuart besiyeri gibi).
 - **İdentifikasyon (tanımlama) besiyerleri:** Mikroorganizmalarının laktoz, glikoz gibi maddeleri kullanarak oluşturdukları metabolizma

ürünlerinin incelenmesiyle bakterilerin tanımlanmasının yapıldığı besiyerleridir. Besiyeri içine konan ayıraçların (andrade ayırıcı, fenol kırmızısı vb.) oluşan metabolizma ürünlerine göre renk değişikliği meydana getirmesiyle metabolizma ürünlerinin varlığı anlaşılır(örneğin, İndol'da olduğu gibi).

- **Anaerob bakteriler için besiyerleri:** Ortamdaki oksijeni gideren redükleyici maddeler (sodyum tiyoglikolat gibi) eklenmiş ve böylece anaerob bakterilerin daha kolay üremesini sağlayan besiyerleridir. Redükleyici maddeler, besiyerlerinde çözülmüş olarak bulunan oksijen ile kimyasal reaksiyona girerek mikroorganizmalar tarafından kullanılmasını engeller.
- **Özgül besiyerleri:** Sadece bir mikroorganizmanın üreyebildiği besiyerleridir. Löwenstein jensen besiyeri sadece *Mycobacterium tuberculosis*'in üretilmesinde kullanılır.

| BESİYERİ ADI | KULLANIM AMACI |
|-------------------------------|---|
| Baird-Parker Agar | Stafilokok bakterilerinin tanımlanma ve sayımında |
| Brilliant Green Bile Broth | Koliform grubu bakterilerinin tanımlanması, doğrulanması, izole edilmesi ve sayımında |
| Eosin Metilen Blue (EMB) Agar | Enterobacteriaceae familyası gram (-) bakterilerinin ayrımı ve izolasyonunda |
| Laktoz Broth | EMS yöntemi ile koliform bakterilerin sayımında |
| Mac Conkey Agar | Koliform grubu bakteriler ile salmonella ve shigella bakterilerinin ayırım ve tanımlanmasında |
| Malt Extract Agar | Maya ve küflerin geliştirilmesi, izolasyonu ve sayımında |
| Mueller Hinton Agar | Antibiyogram duyarlılık testinde |
| Nutrient Broth | Bakterilerin gelişimi için genel amaçlı besiyeri olarak |
| Plate Count Agar | Toplam mezofil aerob bakteri sayımında |
| Potato Dextrose Agar | Fungusların üretilmesinde |
| Simmons Sitrata Agar | Enterobacteriaceae familyası bakterilerinin ayırımlarında |
| Violet Red Bile Agar | Koliform grubu bakterilerinin tanımlanması ve sayılmasında |
| VRB Agar | Katı besiyeri yöntemiyle koliform bakteri sayımında |
| XLD Agar | Salmonella bakterilerinin ayırım ve tanımlanmasında |

Tablo 1.1: Sık kullanılan besiyerleri ve kullanım amaçları

1.3. Besiyeri Bileşimine Giren Maddeler

Besiyerleri hazırlanırken amaç, hedef organizmanın gelişmesi için en uygun ortamı oluşturacak oranlarda gerekli besin maddeleri ile dengelenmiş karışımı sağlamaktır. Besin öğelerini fazla miktarda eklemekle optimal besiyeri elde edilemez.

Gelişme için gerekli olan maddeler, doğrudan mikroorganizmaların beslenme şekilleri ile ilgilidir ve besiyerinde zorunlu olarak bulunur. İnhibitörlerse gelişmesi istenmeyen mikroorganizmalar için gerektiğinde selektif besiyerlerine ilave edilir. Bunların dışında yine gerektiğinde indikatörler, jelleştiriciler vb. pek çok madde de besiyeri bileşimine girer.

Besiyeri bileşiminde bulunan maddeler ve özellikleri aşağıda açıklanmıştır.

- **Su:** Besiyeri hazırlamada kullanılan suyun damıtma veya deiyonizasyon ile taze hazırlanmış olması, başta bakır olmak üzere toksik metalleri içermemesi gerekir. Taze hazırlanmış saf suyun pH'ı 6,5 - 7,5 arasında olmalıdır. Depolanmış saf su atmosferik karbondioksitin absorbe edilmesi sonucu asidik pH gösterir. Saf suyun pH'ı 5,5'in altında ise bu su ısıtılarak CO₂ uzaklaştırılır ve pH yeniden kontrol edilir pH hâlâ düşükse NaOH ile nötral pH'a getirilir ve saf su sistemi kontrol edilir.
- **Pepton:** Proteinlerin hidroliziyle elde edilen ürünlere verilen genel isimdir. İstisnalar dışında, mikroorganizma gruplarının oldukça büyük bir bölümü, proteinleri azot kaynağı olarak kolaylıkla kullanamaz.
- **Maya ekstraktı (Maya özütü, yeast extract):** Bileşimindeki aminoasitler, peptitler, vitaminler, karbohidratlar ve mineraller nedeniyle pek çok mikrobiyolojik çalışmada besiyeri katkısı olarak kullanılır.
- **Malt ekstraktı (Malt özütü, malt extract):** Biralık arpanın çimlendirilmesi ve kavrulması ile elde edilen malttan üretilir. Maya ve küflerin geliştirilmesi için kullanılır.
- **Et ekstraktı (Et özütü, meat extract):** Karbohidrat içermez. Bu nedenle karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılabilir.
- **Beyin ekstraktı (brain extract) ve kalp ekstraktı (heart extract):** Zor gelişen patojen bakterilerin geliştirilmesi için brain heart broth ve brain heart infusion gibi isimlerle anılan besiyerlerinin bileşimine katılır.
- **Karbohidratlar:** Bazı besiyerlerinin bileşimine bakteriler için enerji ve karbon kaynağı olarak katılır ayrıca asit oluşturmaya dayalı identifikasyon testlerinde de kullanılmaktadır. Karbon kaynağı olarak en çok kullanılan karbohidratlar glikoz, laktoz ve sakkarozdur.

| BESİYERİ BİLEŞENLERİ | Nutrient Broth | Laktoz Broth | BGBB | PCA | BPA | VRBA | SimSit Agar | EMB Agar | MacConkey Agar |
|-----------------------------|----------------|--------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-------------|-----------|----------------|
| Agar | | | | 14 | 20 | 15 | 15 | 13,5 | 13,5 |
| Amonyum di hidrojen fosfat | | | | | | | 0,2 | | |
| Bile Salts No.3 | | | | | | 1,5 | | | 0,03 |
| Brillant geen | | | 0,0133 | | | | | | |
| Brom timol mavisi | | | | | | | 0,08 | | |
| Di potasyum hidrojen fosfat | | | | | | | | 2 | |
| Eosin Y | | | | | | | | 0,4 | |
| Et ekstraktı | 1 | 3 | | | 5 | | | | |
| Glikoz | | | | 1 | | | | | |
| Glisin | | | | | 12 | | | | |
| Kristal viyole | | | | | | 0,002 | | | 1,5 |
| Laktoz | | 5 | 10 | | | 10 | | 5 | 10 |
| Lityum klorür | | | | | 5 | | | | |
| Magnezyum sülfat | | | | | | | 0,2 | | |
| Maya ekstraktı | 2 | | | 2,5 | 5 | 3 | | | |
| Metilen mavisi | | | | | | | | 0,065 | |
| Nötral kırmızısı | | | | | | 0,03 | | | 0,001 |
| Ox-bile (safra tuzları) | | | 20 | | | | | | |
| Pepton | 5 | 5 | 10 | | | 7 | | 10 | 20 |
| Sakkaroz | | | | | | | | 5 | |
| Sodyum amonyum fosfat | | | | | | | 0,8 | | |
| Sodyum piruvat | | | | | 10 | | | | |
| Tribazik sodyum sitrat | | | | | | | 2 | | |
| Tripton | | | | 5 | 10 | | | | |
| Tuz (NaCl) | 5 | | | | | 5 | 5 | | 5 |
| TOPLAM | 13 | 13 | 40 | 22,5 | 67 | 41,5 | 23,3 | 36 | 50 |

Tablo 1.2: Sık kullanılan besiyerleri ve bileşenleri

- **Agar:** Deniz yosunlarından elde edilen, besiyerlerinin katı hâle getirilmesi için kullanılan jelleştirici bir maddedir. Yaklaşık 85-90 °C'de erir, 40-45 °C'de jelleşir. Besiyerine amaca göre % 0.05-2 gibi geniş bir sınırdan ilave edilebilir. Genel olarak katı besiyeri hazırlamada kullanım konsantrasyonu %1-2'dir yani 1 litre besiyeri hazırlamak için 10-20 gram agar kullanılması gerekir.
- **Jelatin:** Sinir, deri, kemik, kıkırdak gibi hayvansal dokulardan elde edilen protein yapısında bir maddedir. Agar gibi katılaştırıcı özelliği vardır fakat daha çok mikroorganizmaların proteolitik aktivitelerini ortaya çıkarmak için kullanılır.
- **Tuz:** Aksi belirtilmedikçe tuz denilince sodyum klorür anlaşılır. Çoğu besiyerinin bileşimine izotonik bir ortam oluşturmak için katılır. % 0.9 NaCl, serum fizyolojik adı ile seyreltme çözeltisi olarak yaygın şekilde kullanılır.
- **İnhibitörler:** Selektif besiyeri bileşimlerinde istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini baskılayan çeşitli inhibitör maddeler kullanılır.

İnhibitör maddelerin etki şekilleri çok farklıdır ve güçleri yoğunluklarına bağlıdır.

- **Diğer maddeler:** Besiyerlerine farklı amaçlarla katılan pek çok madde çeşidi vardır. Bunlar tampon (pH değişimlerini geciktiren) maddeler, inaktivatör (antimikrobiyel maddeleri inaktive eden) maddeler, stimülatör (gelişmeyi teşvik eden) maddeler, özel besin (istenen mikroorganizmanın kullanabileceği, diğerleri için besin maddesi olarak yararlanılamayan) maddeleri, indirgeyici (anaerobik ortam oluşturan) maddeleri, doğal ortam oluşturanlar, identifikasyon amacıyla kullanılan maddelerdir.

1.4. Besiyerinin Sahip Olması Gereken Özellikler

- Uygun miktarda su bulunmalı yani su aktivitesi yüksek olmalıdır.
- Besiyerlerinin esasını teşkil eden suyun saf olması, içinde mikropların üremesine engel olan organik veya inorganik toksik etkili maddelerin bulunmaması gerekir. Örneğin; fazlaca kireçli sular, içinde Cu ve Zn gibi metal bulunan sular mikroorganizmalar için toksiktir.
- Mikroorganizmaların gereksinimini karşılayacak kolayca kullanılabilir besin maddeleri içermelidir.
- Besiyerlerine katılan kimyasal maddelerin saf olması lazımdır. Bozuk, kötü kokulu, sulanmış veya çok eskiyerek dekompoze olmuş maddeler kullanılmamalıdır.
- Besiyerlerine katılan maddelerde antogonist (karşıt) etkiler bulunmamalıdır. Örneğin, dekstroz bazı tuzlarla (fosfatlarla) birlikte otoklava verilince bazı inhibitör bileşikler meydana gelebilir. Onun için karbonhidratlar ayrı ayrı sterilize edilir. Sonradan besiyerine katılır.
- Uygun asit baz (pH) dengesine sahip olmalıdır.
- Besiyerinin pH'ı otoklavdan önce 0,2-0,4 kadar yüksek ayarlanmalıdır çünkü otoklavdan sonra ortamın pH'ı bir miktar düşebilir.
- Besiyerlerinin pH düşmelerini geciktirmek ve böylece bakterilerin üremelerini hızlandırmak için tampon maddeler (buffer) konmalıdır.
- Berraklık, katılık gibi fiziksel özellikleri elverişli olmalıdır.
- Osmotik basıncı, oksidasyon/redüksiyon (indirgenme/yükseltgenme) potansiyeli mikroorganizmalara uygun olmalıdır.
- Mikrobiyolojik anlamda steril olmalı, sterilizasyon kontrolü yapılmalıdır.
- Ekim öncesi sterilizasyon hazırlığı ve sterilizasyon uygulaması titizlikle yapılmalıdır.
- Besiyerleri, otoklavda 121 °C'de 20 dakika sterilize edilmelidir. Proteinli, karbonhidratlı veya sütlü besiyerleri koch cihazında 100 °C'de 30 dakika olmak üzere 3 gün süreyle sterilize edilir (Tindalizasyon metodu).
- Dış ortamdan mikroorganizma kontaminasyonunun önlenmesi için özel kaplarda hazırlanmalı ve saklanmalıdır.

- Besiyeri muhafaza edilen kaplar, pamuktan veya kâğıttan hava geçirebilen tıparlarla kapatılmalıdır.



Resim 1.2: Dehidre besiyeri

Storage: Hygroscopic. Store in a cool dry place below 25°C away from light.

Directions for Use:
Dissolve 51.55 gm in 1000 ml distilled water. Quickly heat to dissolve the medium completely. Sterilize by autoclaving at 15 psi (121°C) for 15 minutes. Cool to room temperature before use.

Caution:
Keep the container tightly closed and away from sunlight after use.
For best performance use within the expiry limit and as per standard operating procedure.

Disposal: User must ensure safe disposal by autoclaving and/or by incineration, used or unusable preparation of this product and derivatives thereof or completion of work to avoid contagion.

Disclaimer: No liability accepted for accidents arising while handling or use.

MacConkey Agar w/cv & 1% Lactose
Recommended for isolation of coliform and lactose fermenting enteric bacteria.

| Standard Formula | gm/liter |
|-----------------------------|----------|
| Peptic digest animal tissue | 20.0 |
| Agar | 15.0 |
| Lactose | 10.0 |
| Sodium chloride | 5.0 |
| Bile salt | 1.5 |
| Neutral red | 0.05 |
| Crystal violet | 0.001 |
| pH (at 25°C) | 7.2±0.2 |

Product Code: 1MAC31
Pack Size: 100 gm

Date of Receiving _____
Date of Opening _____

Batch No. _____
Month and year of Mfg. _____
Best Before: 36 months from month of Mfg.
M.F.P. (Exclusive of all taxes)

Packed for servicing industry (including industrial quality control laboratories, academic and research institutions, universities etc.)

RFCL
Solutions, Solvents & LSH
RFCL Limited, A-3, Okhla Industrial Area, Phase-1, Delhi - 110023
e-mail: RFCL.HQ@rfcl.in, Website: www.rfcl.in

**Hazırlanışı
Depolama
Koşulları**

Bileşim

**Ambalaj
Özellikleri**

**Ürün
Kodu**

**Ürün
Özellikleri**

**Uyarı
İşaretleri**

Resim 1.3: Dehidre besiyeri etiket bilgileri

1.5. Dehidre Besiyerleri

Besiyeri bileşenleri, formülasyonda belirtilen oranlarda bir araya getirilip kurutulularak toz veya granül şekilde ambalajlarda hazır karışım hâline getirilmiş ticari besiyerlerine, dehidre besiyerleri denilmektedir.

Dehidre besiyerleri günümüzde piyasada yaygın olarak kullanılmaktadır. Piyasada kullanım amacına, analiz yöntemine uygun üretilmiş kimyasal bileşimi bilinen birçok farklı marka dehidre besiyeri bulmak mümkündür.

1.5.1. Etiketle Yer Alan Bilgiler

Dehidre besiyeri kutularının üzerinde bulunan etiketlerde, kataloğunda ya da prospektüsünde genel olarak aşağıdaki bilgiler bulunmaktadır.

- Besiyerinin ismi (Brillant geen bile broth, EMB agar gibi)
- Bileşiminde bulunan maddelerin isimleri (kazein, pepton, glikoz, agar gibi)
- Bileşiminde bulunan maddelerin gram/litre olarak miktarları yani tipik bileşimi
- Bir litre besiyeri hazırlamak için ne kadar kullanılacağı
- Sterilizasyonunun nasıl ve kaç °C'de yapılacağı
- Kurallara uygun hazırlandığında oluşacak pH'ı ("25 °C'de pH:7,0" gibi)
- Saklama koşulları ("15 – 25 °C'de ağzı kapalı ve kuru olarak" gibi)
- Ambalaj miktarı (500 g gibi)
- Üreten firma, üretildiği ülke, üretim kodu
- Besiyerinin raf ömrü (son kullanma tarihi)

1.5.2. Dehidre Besiyerlerinin Muhafazası

Hazır olarak satılan kuru formdaki besiyerleri veya besiyeri bileşenleri genellikle nem çekicidir, sıcaklığa ve ışığa karşı çok duyarlıdır. Kapağı açılmış besiyerleri ve besiyeri bileşenleri kuru, karanlık ve serin bir yerde saklanmalıdır. Toz hâldeki besiyeri ve bileşenleri için en büyük tehlike, nemdir. Orijinal ambalaj kapağının açılmasından sonraki raf ömrü, saklama koşullarına doğrudan bağlıdır.

Nemden korumanın en emin yolu, kullanımdan sonra dehidre besiyeri kapaklarının sıkıca kapatılması ve bunların kuru bir yerde depolanmasıdır. Kapağı açılmamış bir dehidre besiyerinin raf ömrü genellikle 3-5 yıl kadardır. Ticari firmalar tarafından üretilen besiyeri ambalajlarında son kullanım tarihi (exp. date) yazmaktadır. Dehidre besiyerlerinin, etiketinde yazan koşullarda muhafazası sağlanmalıdır.

Dehidre besiyerlerinin büyük çoğunluğu oda sıcaklığında (15-25°C), bazıları ise 15 °C'nin altında depolanmalıdır. Dehidre besiyerlerinin buzdolabında saklanması önerilmez. Bunun nedeni, buzdolabından çıkarıldıktan sonra kutu üzerindeki olası nem yoğunlaşması riskidir.

1.6. Besiyeri Hazırlamada Ön İşlemler

Laboratuvarlarda çalışma kapasitesi, iş yükü, çalışma konusu, yöntem, numune ve analiz sayısı gibi etkenler, analiz öncesi hazırlıkları etkileyen unsurlardır. Küçük bir laboratuvarında besiyeri hazırlama işlemi numune geldikten sonra bile yapılabildiği hâlde iş yükü fazla olan laboratuvarlarda önceden hazırlanmış ve elde kullanıma hazır hâlde bulunması gerekir.

Öncelikle çalışılan laboratuvarlarda normal koşullarda kullanılan besiyeri çeşitleri, kullanım şekli ve miktarlarının belirlenerek hazırlık planlamasının yapılması gerekir. Örneğin; laboratuvarıda bir haftada kullanılan besiyeri çeşitleri ve miktarları belirlenip tek seferde hepsini hazırlamak mümkündür. Besiyerlerinin tek seferde hazırlanması zaman, iş gücü ve maliyet açısından faydalı olacaktır. Birden fazla besiyeri çeşidi ve malzeme tek seferde benzer işlemlere (otoklavda sterilizasyon gibi) tabi tutulabilir.

Hazırlanacak besiyeri şekli (petride, deney tüpünde gibi) ve miktarı belirlendikten sonra gerekli hacim hesaplanmalıdır. Bu hesaplamada aksi belirtilmedikçe her bir petri kabı için 15-25 ml, deney tüpleri için ise 5-10 ml hacim kullanılır. Bu miktarlar, petri kabının veya deney tüpünün çapına, kullanım amacına göre değişiklik gösterebilir.

Örneğin A besiyerinden haftada ortalama 30 deney tüpü ve 20 petri kullanılıyorsa;

$$\text{Hazırlanacak besiyeri hacmi} = (\text{Petri sayısı} \times 20 \text{ ml}) + (\text{Deney tüpü sayısı} \times 10 \text{ ml})$$

$$\text{Hazırlanacak besiyeri hacmi} = (20 \times 20) + (30 \times 10)$$

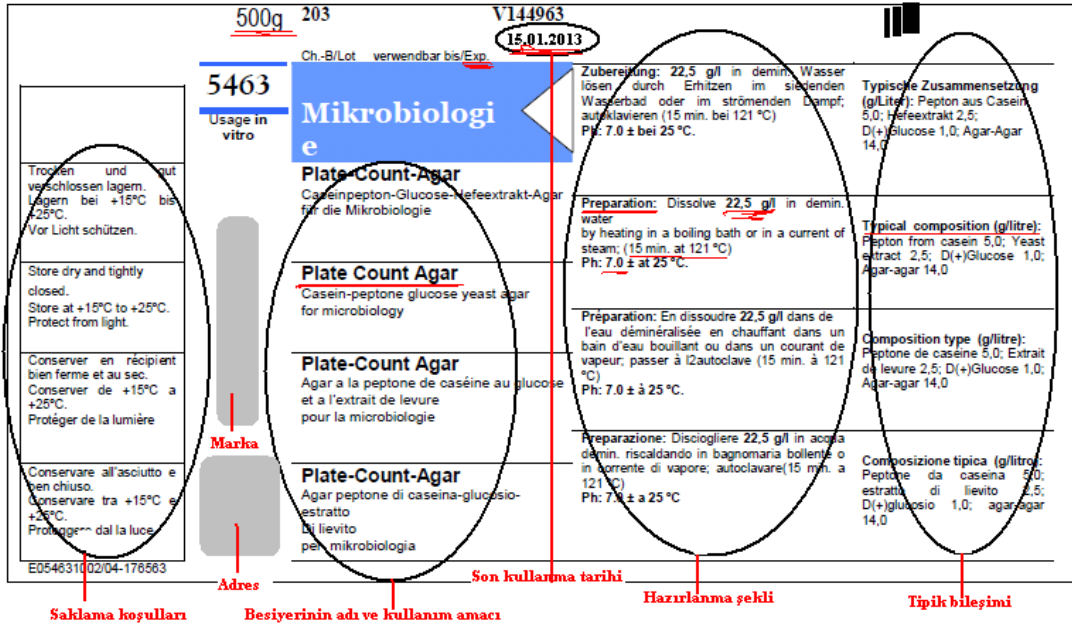
$$\text{Hazırlanacak besiyeri hacmi} = 700 \text{ ml}$$

Hazırlanacak besiyeri hacmi belirlendikten sonra besiyeri hacmine göre uygun bir kap (erlen veya balon) seçmek gerekir. Seçilen kabın hacmi, hazırlanacak besiyeri hacminin en az 4/3'ü kadar olmalıdır çünkü ısıtma ve çalkalama gibi işlemlerin daha rahat yapılabilmesi için boşluk hacmi göz önünde bulundurulmalıdır.

Besiyeri hazırlama işlemlerine başlamadan önce gerekli araç ve gereçlerin hazır olduğundan emin olunmalıdır. Genellikle hassas terazi, otoklav, su banyosu, pH metre, spatül, tartım kayıkçığı, mezür, balon, erlen, deney tüpü, steril petri kutusu, pamuk, alüminyum folyo, saf su, pipet, tüplük, cam yazar kalem gibi araç ve gereçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Hazırlanacak besiyeri, hazır karışım hâlinde ise ambalaj üzerinde belirtilen bilgilerden yararlanarak hazırlanacak hacme göre hesaplama yapılır, hazır karışım hâlinde değilse bileşimine giren maddelerin tek tek hazırlanacak hacme göre hesaplanması gerekmektedir.

Hazır ticari besiyerlerinin formülleri genellikle hacim (litre) olarak verilmektedir. Hazırlanacak besiyeri hacmine göre basit bir orantı ile besiyeri bileşenlerinin tartılacak miktarları hesaplanır.



Resim 1.4: Dehidre besiyeri etiket bilgileri

Örneğin; 700 ml plate count agar (PCA) hazırlanması istenmişse aşağıdaki gibi hesaplanır. **Hazır karışım hâlinde PCA kullanılacak ise:**

1 litre besiyeri hazırlamak için 22,5 gram dehidre PCA tartmak gerekir.

$$\frac{1000 \text{ ml besiyeri hazırlamak için}}{700 \text{ ml besiyeri hazırlamak için}} = \frac{22,5 \text{ g PCA tartılırsa}}{X \text{ g PCA tartılır}}$$

$$X = 700 \times 22,5 / 1000 = 15,75 \text{ g dehidre PCA tartılarak } 700 \text{ ml besiyeri hazırlanır.}$$

Eğer PCA formüldeki bileşenler ayrı ayrı tartılıp hazırlanacaksa her bileşen için ayrı hesaplanır, PCA'nın bileşiminde 5 g tripton, 2,5 g maya ekstraktı, 1 g glikoz, 14 g agar bulunur.

$$\frac{1000 \text{ ml besiyeri hazırlamak için}}{700 \text{ ml besiyeri hazırlamak için}} = \frac{5 \text{ g tripton tartılırsa}}{X \text{ g tripton tartılır}}$$

$$\text{Kullanılacak tripton miktarı} = 700 \times 5 / 1000 = 3,5 \text{ g}$$

$$\text{Kullanılacak maya ekstraktı miktarı} = 700 \times 2,5 / 1000 = 1,75 \text{ g}$$

$$\text{Kullanılacak glikoz miktarı} = 700 \times 1 / 1000 = 0,7 \text{ g}$$

$$\text{Kullanılacak agar miktarı} = 700 \times 14 / 1000 = 9,8 \text{ g}$$

3,5 g tripton + 1,75 g maya ekstraktı + 0,7 g glikoz + 9,8 g agar tartılarak alınır ve 700 ml PCA besiyeri hazırlanır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak besiyeri hazırlama ön işlemlerini yapınız.

Uygulamada kullanılan malzemeler: Hesap makinesi, hazır ticari besiyeri ya da besiyeri bileşenleri, terazi, balon, erlen, cam yazar, deney tüpü, su banyosu, otoklav, alüminyum folyo, saf su, spatül, mezür, pipet, tüplük

| İşlem Basamakları | Öneriler |
|--|---|
| <p>➤ Hazırlanacak besiyeri çeşitlerini belirleyiniz.</p>  | <p>➤ Kullanım amacı, analiz metodu ve eldeki dehidre besiyerlerini göz önünde bulundurularak seçim yapınız.</p> |
| <p>➤ Hazırlanacak besiyeri adedini belirleyiniz.</p> | <p>➤ Çalışma kapasitesi, iş yükü, çalışma konusu, yöntem, numune ve analiz sayısı gibi etkenleri göz önünde bulundurularak karar veriniz.</p> |
| <p>➤ Hazırlanacak besiyeri hacmini hesaplayınız.</p>  | <p>➤ Hesaplama her bir petri kabı için 15-25 ml, deney tüpleri için ise 5-10 ml hacim aralığında değer kullanınız.</p> <p>➤ Petri kutusu veya deney tüpü çapını, yapılacak analize uygun besiyeri kalınlığına uygun seçim yapınız.</p> |
| <p>➤ Besiyeri hazır karışım hâlinde ise ambalaj üzerinde belirtilen bilgiden yararlanarak hazırlanacak hacme göre hesaplama yapınız.</p> | <p>➤ Hazır karışım hâlindeki besiyerlerinin etiketinde 1 litre besiyeri hazırlamak için alınması gereken miktarın belirtildiğini unutmayınız.</p> <p>➤ Hazırlanacak besiyeri hacmine göre doğru orantı kurarak miktarları hesaplayınız.</p> |
| <p>➤ Besiyeri hazır karışım hâlinde değilse bileşime giren maddeleri tek tek hazırlanacak hacme göre hesaplayınız.</p> | <p>➤ Hazırlanacak besiyeri hacmine göre doğru orantı kurarak miktarları hesaplayınız.</p> |
| <p>➤ Gerekli araç ve gereçleri hazırlayınız.</p> | <p>➤ Hazırlanacak besiyeri hacmini, şeklini ve sterilizasyon yöntemi gibi konuları göz önünde bulundurunuz.</p> |

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Proteinlerin hidrolizi sonucu elde edilen besiyeri bileşeni aşağıdakilerden hangisidir?
A) Maya ekstraktı
B) Pepton
C) Agar
D) Tampon
2. Aşağıdaki seçeneklerden hangisinde agarın sıvılaştırma ve katılaştırma sıcaklık aralıkları doğru olarak verilmiştir?
A) 70-80/45-50
B) 85-90/40-45
C) 65-70/35-40
D) 95-100/40-45
3. Bileşiminde 5g et ekstraktı, 4g pepton, 9 g agar, 3g laktoz bulunan bir besiyerinden 500 ml besiyeri hazırlamak için ne kadar tartılmalıdır?
A) 21 g
B) 12 g
C) 10,5 g
D) 1,15 g
4. Üretilmek istenen özel bir bakteri dışındaki mikroorganizmaların üremesini inhibe eden maddeler içeren besiyeri çeşidi aşağıdakilerden hangisidir?
A) Zenginleştirici besiyerleri
B) Sentetik Besiyerleri
C) Transport besiyerleri
D) Selektif besiyerleri
5. A besiyerinden 10 petri, 25 deney tüplük besiyeri hazırlanacaksa en uygun besiyeri hacmi aşağıdakilerden hangisidir?
A) 450 ml
B) 1000 ml
C) 250 ml
D) 600 ml

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

ÖĞRENME KAZANIMI

Hazırlanacak besiyerinin özelliği ve kullanım amacına uygun besiyeri hazırlama işlemlerini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

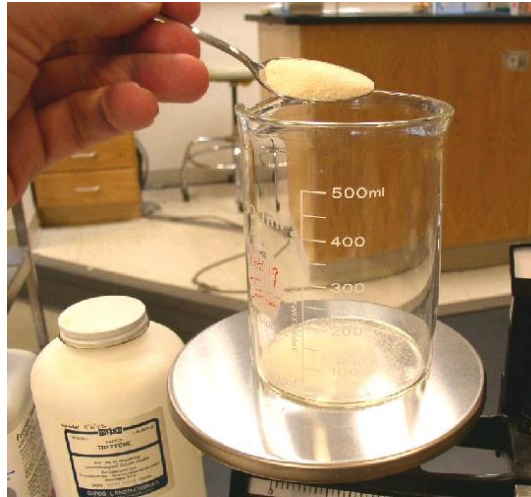
- Çevrenizdeki mikrobiyoloji laboratuvarlarını ziyaret ederek besiyeri hazırlama aşamalarını gözlemleyiniz.
- Besiyeri sterilizasyon yöntemlerini araştırınız.

2. BESİYERİ HAZIRLAMA

2.1. Besiyeri Hazırlık Aşamaları

Piyasada farklı amaçlar için kullanılan yüzlerce besiyeri çeşidi vardır. Aynı amaç için kullanılan farklı besiyeri çeşitleri de mevcuttur bu nedenle besiyerleri çok farklı şekillerde hazırlanabilir fakat temel basamaklar değişmemekte, basamaktaki yöntem, şekil, süre gibi unsurlar değişebilmektedir.

Genel olarak besiyeri hazırlamada temel işlem basamakları; besiyeri hazırlama ön işlemleri (besiyeri seçimi, hacmi ve tartılacak dehidre besin maddesi miktarlarının hesaplanması gibi), tartım, çözündürme, berraklaştırma, pH ayarlama, sterilizasyon ve sterilizasyon sonrası işlemler şeklindedir.



Resim 2.1: Tartım işlemi

➤ **Tartım**

Tartımın yapılacağı terazinin duyarlılığı, besiyerinin hazırlanış şekli ile doğrudan ilgilidir. Günlük kullanım için genel olarak 0,1 gram duyarlılığındaki terazi yeterli olacaktır.

Tartım için özel tartım kayıkçıları ya da küçük beherler kullanılmalı, doğrudan erlen ya da balona tartımdan olabildiğince kaçınılmalıdır. Özellikle bileşimden hazırlamalarda tartım sırasında her madde için temiz spatül (kaşık) kullanılması, besiyeri ve/veya besiyeri bileşenlerinin kapakları açıldıktan sonra hata yapmamaya özen gösterilerek tartımın elden geldiğince çabuk bitirilmesi ve besiyeri kapağının sıkıca kapatılması gerekir.

➤ **Çözündürme**

Besiyerine ilave edilecek su ayrı bir mezürde bulundurulmalıdır. Prensip olarak kullanılacak suyun hacmi ile mezurun hacmi birbirine yakın olmalıdır. Suyun yaklaşık 1/3'ü uygun bir kaba aktarılır ve bunun üzerine tartılmış dehidre besiyeri ilave edilir. Bu uygulama ile cam kabın tabanına dehidre besiyerinin yapışarak erimemesine bağlı sterilizasyon hatalarının önüne geçilir.

Suyun geri kalan kısmı, cam kap boğazında ve iç çeperlerde kalabilen besiyeri parçacıkları yıkanarak kaba ilave edilir. Bazı besiyerleri soğuk suda kendi hâlinde 5-10 dakika bırakılıp elle hafifçe bir çalkalama sonunda tümüyle eriyebilir. Bazı besiyerleriye sıvı formda olsalar bile eritilmeleri için mutlaka ısıtılması gerekir.

Agarlı besiyerleri, hazırlandığı kapta otoklavlanacak olsa bile önce agarın erimesini sağlayacak şekilde ısıtılmalı, iyice karıştırılıp sonra otoklavlanmalıdır. Isıtma işleminde genellikle benmari, ısıtıcı tabla gibi cihazlardan yararlanır.

Isıtıcı tabla kullanılıyorsa manyetik karıştırıcılı olanlar tercih edilmelidir aksi hâlde sürekli elle karıştırılıp erlen dibinde kalabilecek erimemiş parçaların yapışmasına ve yanmasına engel olunmalıdır. Erlen, açık alevde ısıtılarak besiyeri eritme yoluna gidilmemelidir.

➤ **Berraklaştırma**

Ürediklerinde bulanıklık oluşturan mikroorganizmaların tanımlanmalarında kullanılan ve doğal çökelti maddeleri içeren besiyerleri berraklaştırılır. Besiyeri, adi filtre kâğıdından veya pamuktan geçirilerek, santrifüjlenerek veya kapta bekletilerek kaba partiküllerin çöktürülmesi ile berraklaştırılabilir. Besiyerinde çökelmiş veya çözünmemiş parçacıklar mikroorganizma gelişmesinin değerlendirilmesinde yanıltıcı olabilir.

➤ **pH ayarlama**

Besiyeri pH'ı denince sterilizasyon sonrası oda sıcaklığındaki (25 °C) pH değeri anlaşılır. Yöntemine uygun depolanmış ve raf ömrü bitmemiş ticari dehidre besiyerlerinde nötral su ve temiz cam malzeme kullanılması, besiyerinin doğru hazırlanması ve sterilizasyonun sulandırmadan sonra vakit geçirmeden yapılması ile besiyeri pH'ında bir sorun çıkmaz.

Besiyerinin pH'ı otoklavlanmadan önce ayarlanacaksa 0,2-0,4 kadar yüksek ayarlanmalıdır çünkü otoklavdan sonra besiyerinin pH'ı bir miktar düşebilir. Sterilizasyon sonrasında pH ayarlanması gerekiyorsa aseptik koşullarda alınacak belirli bir hacimdeki besiyerinde titrasyon ile pH ayarlaması yapılır, basit orantı ile asıl kaptaki besiyerine ilave edilecek asit ya da alkali miktarı hesaplanır.

pH ayarlaması için pH metre veya pH indikatör kâğıdı da kullanılabilir. Bunun için ölçüm ve ayar yapılacak sınırları açıkça gösteren pH kâğıdı kullanılmalıdır. pH kâğıdı ile yapılan ölçümün çok duyarlı olmadığı, sadece fikir vereceği göz önünde tutulmalıdır.

Potato dextrose agar, BAT agar örneklerinde olduğu gibi besiyerinin çok asitli olması gerekiyorsa sterilizasyon sonrasında asit ilave edilir. Örneğin, potato dextrose agar otoklavlanıp 45 °C'ye soğutulduğunda üzerine filtre ile sterilize edilmiş %10 tartarik asit çözeltisinden 14 ml/l olacak şekilde ilave edilir, karıştırılır ve petri kutularına dökülür. Bu işlem ile pH 5,6' dan 3,5' e düşürülmüş olur.

➤ Sterilizasyon

Kullanıma hazır steril besiyerleri ve besiyeri katkıları dışında laboratuvarında hazırlanan tüm besiyerleri ve besiyeri katkı maddeleri sterilize edilmelidir. Sterilizasyonda amaç; dehidre besiyeri, besiyeri katkıları ve besiyeri hazırlanırken kullanılan araç gereç ve ortamdan bulaşabilecek tüm mikroorganizmaları yok etmektir. Böylece besiyerinde yalnızca örnekten veya ana kültürden gelen mikroorganizmaların gelişmesi sağlanır.

Deney tüpünde besiyeri hazırlanacaksa pH ayarlaması yapıldıktan sonra deney tüplerine dağıtılarak tüplerin ağızları pamuklanır. Tüplerin pamuklanmasında yağlı pamuk (kalaycı pamuğu) kullanılmalıdır. Hidrofil pamuk besiyerinin ve havanın nemini çekerek küflerin üremesi için elverişli bir ortam sağlayacağı için kullanımı uygun değildir ayrıca absorban pamukların, bakterilerin üremesine engel olan bazı maddeler salgıladıkları da anlaşılmıştır.



Resim 2.2: Besiyerlerin deney tüplerine dağıtılması

Tüplerin ağzındaki pamuk tıplar ne fazla sıkı ne de gevşek olmalıdır. Tüp, pamuk tıpadan tutulduğundan rahatça havaya kaldırılabilir. Pamuğun tüp içinde kalan kısmı 1,5-2 cm kadar, besiyerine olan uzaklığı da en az 1,5 cm olmalı, besiyeri ile temas etmemelidir.



Resim 2.3: Sterilizasyona hazırlanmış besiyeri

Besiyerlerinin sterilizasyonunda genel olarak otoklavda basınçlı buhar altında sterilizasyon yöntemi kullanılır. Bu yöntemle steril edilemeyen bazı besiyerlerindeyse kaynatma, çok nadiren tindalizasyon ve membran filtrasyon yöntemi uygulanmaktadır. Işınlama ise pratik olarak uygulanacak bir yöntem değildir, sadece özel amaçlı dehidre besiyeri üretiminde kullanılır. Besiyerleri ve çözeltiler gibi sıvıların kuru sıcakta sterilize edilmesi söz konusu değildir.

**Sterilizasyon yöntem ve uygulamaları ile ilgili
detaylı bilgi için
“Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon”
modüllerine bakınız!**

Petri kaplarında besiyeri hazırlanacaksa besiyerinin erlen veya balon içinde sterilize edilmesi gerekir. Petri kapları içinde sterilizasyon işlemi yapılmaz. Erlen veya balonun ağzı da pamuk tıplarla kapatılır. Büyük pamuk tıpların tülbente sarılıp üstten bağlanmaları veya alüminyum folyo ile kaplanmaları gerekir. Böylece pamuk liflerinin aralarındaki boşluklardan besiyerinin kontamine olması engellenebilir. Burgulu kapaklar ise besiyeri otoklava girmeden önce yarı açık bırakılmalı, otoklavdan çıkartıldıktan sonra tamamıyla kapatılmalıdır.

2.2. Besiyeri Hazırlarken Dikkat Edilecek Hususlar

Besiyeri hazırlarken aşağıda belirtilen hususlara dikkat etmek gerekir.




- Besiyerleri üretici firma tarafından belirtilen şekilde hazırlanmalıdır.



- Aynı isimdeki besiyerine ait farklı marka ürünlerin hazırlanmasında farklılıkların (sterilizasyon yöntemi, tartılacak miktar gibi) olabileceği unutulmamalıdır.
- Katkı ilave edilecek besiyerleri içine manyet (balık) ilave edilmeli, bu şekilde sterilize edilmelidir.
- Agarlı besiyerleri otoklavlama öncesinde mutlaka kaynar su banyosunda ya da mikrodalga fırında eritilmeli sonra otoklavlanmalıdır ancak besiyeri hazırlanmasında otoklav kullanılmıyor ise bu koşul geçersizdir, ilgili besiyerinin hazırlanması ile ilgili talimata uyulmalıdır.
- Agarlı besiyerlerinin otoklav sonrası tekrar eritilmesi ile besiyeri performansında azalma olacağı unutulmamalıdır. Bu performans kaybı besiyerinin bileşimi ile doğru orantılıdır. Genel olarak plate count agar gibi basit bileşimli besiyerleri daha az zarar görür. Otoklavlanmadan ve sadece ısıtılarak sterilize edilen besiyerleri (Örneğin rambach agar) tekrar eritilmez. Besiyerine katkı ilave edilmiş ise tekrar eritilmez.
- Besiyeri hazırlanmasında distile su kullanılmalıdır.
- Otoklav sonrası katkı ilave edilecek ise sıvı besiyerinin oda sıcaklığına gelmesi beklenir. Agarlı besiyeri ise bir süre oda sıcaklığında tutulup yaklaşık 50 °C' de soğuduğunda 45 °C' deki su banyosuna alınır, bu sıcaklığa düştüğü zaman daha önce oda sıcaklığına getirilen katkı ilave edilir, tercihen manyetik karıştırıcıda katkı ile besiyeri yavaşça karıştırılır ve petri kutularına dökülür. Karıştırma işleminin anafor olacak düzeyde yüksek devirde yapılmamasına özen gösterilmelidir aksi hâlde oluşacak hava kabarcıkları da petri kutusuna geçer ve daha sonra yapılacak çalışmaları zorlaştırır.
- Agarlı besiyerine otoklav sonrası buzdolabında korunmakta olan katkı ilave edilecekse katkının soğuk olması hâlinde yer yer donmalar görülür. Bu nedenle katkı, önceden oda sıcaklığına getirilmelidir.
- Sterilize edilmiş besiyerlerinin kontamine edilmemesine özen gösterilmeli, kuşku duyulursa bu besiyerleri asla kullanılmamalıdır.
- Otoklavlama süresi besiyerinin hacmi, kullanılan cam kapların et kalınlığı, besiyerinin agarlı olup olmamasına göre belirlenmelidir.
- Besiyeri hazırlandıktan sonra bekletilmeden sterilize edilmelidir. Dehidre besiyeri ve/veya besiyeri bileşenleri ile cam kaplar, su, tartım ekipmanı vb. materyalde mikroorganizma bulunması doğaldır. Bunlar hazırlanmış besiyerinde hızla gelişerek besiyerinde başta pH değişmesi olmak üzere bir seri olumsuzluklar meydana getirir. Buna bağlı olarak hazırlanmış besiyerleri en geç 1 saat içinde sterilize edilmelidir.
- Tüm besiyerleri ısıya duyarlı olan pepton ya da ekstraktlar içerir. Bu nedenle aşırı ısı girişinden kaçınılmalıdır. Pepton ve şekerleri içeren besiyeri aşırı ısı işlem görürse karamelleşme oluşur. Bu şekilde kararmış besiyerleri analizlerde kullanılmamalıdır.
- Kullanılacak besiyerleri ile önceden kullanılmış ve yıkama öncesi sterilize edilecek besiyerleri aynı anda otoklavlanmamalıdır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak besiyeri hazırlama işlemlerini yapınız.

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç gereçler: Otoklav, su banyosu, pH metre, dehidre besiyeri ya da besiyeri bileşenleri, hassas terazi, balon, erlen, pamuk, alüminyum folyo, saf su, spatül, mezür, deney tüpü, pipet, tüplük, cam yazar kalem

| İşlem Basamakları | Öneriler |
|--|--|
| <p>➤ Besiyeri hazırlık ön işlemlerini yapınız.</p> | <p>➤ 1. Öğrenme faaliyetinde verilen hazırlık işlemlerini yapınız.</p> |
| <p>➤ Belirlenen miktarı/miktarları tartıp balona veya erlene aktarınız.</p>  | <p>➤ Hassas terazide tartımı doğru ve dikkatli yapınız.</p> |
| <p>➤ Üzerine az miktarda saf su koyarak karıştırınız.</p>  | <p>➤ Çalkalama esnasında etrafa sıçratmayınız.</p> |
| <p>➤ Hazırlanacak hacmi saf su ile tamamlayınız.</p> | <p>➤ Dikkatli ölçüm yapınız.</p> |
| <p>➤ Karışımı 15 dakika bekletiniz.</p> | <p>➤ Laboratuvar çalar saatini kullanınız.</p> |
| <p>➤ Sıvı seviyesini cam yazar kalemle kap üzerinden işaretleyiniz.</p> | <p>➤ İşaretleme yapacağınız yer ıslak ise kurutunuz.</p> |
| <p>➤ Katı partiküller çözülene kadar uygun sıcaklıktaki su banyosunda tutunuz.</p>  | <p>➤ Zaman zaman çalkalayınız.</p> |
| <p>➤ Buharlaşma yoluyla su kaybı varsa işaretli yere kadar saf su koyunuz.</p> | <p>➤ Seviye kontrollerini göz hizasında yapınız.</p> |

| | |
|--|--|
| <p>➤ Besiyeri doğal çökelti maddeleri veya çözünmemiş partikül içeriyorsa partikülleri süzerek uzaklaştırınız.</p>  | <p>➤ Kaba filtre kâğıdı kullanınız.</p> |
| <p>➤ Besiyerinin PH'ını ayarlayınız.</p> | <p>➤ Besiyeri istenen pH'ta değilse 0,1 N HCl veya 0,1 N NaOH ilave ederek uygun pH değerine ayarlayınız.</p> |
| <p>➤ Tüpte besiyeri hazırlanacaksa boş tüplere uygun miktarda besiyeri aktarınız.</p> | <p>➤ Tüplerin temiz olmasına dikkat ediniz.</p> |
| <p>➤ Tüplerin, balon veya erlenlerin ağızlarını pamuklayıp folyolayınız.</p>  | <p>➤ Pamukları ne çok gevşek ne de çok sıkı yapmayınız. ➤ Petri kaplarında sterilizasyon işlemi yapılamadığından bu besiyerlerini balon veya erlenle steril etmelisiniz.</p> |
| <p>➤ Tüplerin, balon veya erlenlerin üzerine gerekli bilgileri yazınız.</p> | <p>➤ Suyla silinmeyecek asetatlı cam yazar kalem kullanınız.</p> |
| <p>➤ Besiyerlerini sterilize ediniz.</p> | <p>➤ Uygun sterilizasyon yöntemini seçiniz. ➤ Sterilizasyon yapma kurallarına uygun olarak sterilizasyon işlemini yapınız.</p> |

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Besiyerlerin berraklaştırılmasında aşağıdaki yöntemlerden hangisi kullanılmaz?
A) Adi filtre kâğıdından veya pamuktan geçirilerek
B) Santrifüjlenerek
C) Kaynatarak
D) Sedimentasyon
2. Aşağıdaki yöntemlerden hangisi besiyerlerinin sterilizasyonunda kullanılmaz?
A) Basınçlı buhar
B) Kaynatma
C) Tindalizasyon
D) Kuru ısıda bekletme
3. Aşağıdaki seçeneklerden hangisi doğrudur?
I. Agarlı besiyerleri petri kutularına döküldükten sonra sterilize edilmez.
II. Agarlı besiyerlerinin sterilizasyonuna gerek yoktur.
III. Petri kutularına dökülen agarlı besiyeri kalınlığı en az 10 mm olmalıdır.
A) Yalnız I
B) I ve II
C) Yalnız III
D) I, II ve III
4. Aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?
A) Besiyeri hazırlandıktan sonra 1 gün dinlendirilerek sterilize edilmelidir.
B) Besiyeri hazırlanmasında distile su kullanılmalıdır.
C) Sterilizasyonundan kuşku duyulan besiyerleri asla kullanılmamalıdır.
D) Tüplerin ağzındaki pamuk tıpalara ne fazla sıkı ne de gevşek olmalıdır.
5. Besiyerinin pH'ı otoklavlanmadan önce ayarlanacaksa istenilen pH değerinden aşağıdaki gibi farkla ayarlanmalıdır.
A) 0,2–0,4 kadar düşük değere ayarlanır.
B) 0,2–0,4 kadar yüksek değere ayarlanır.
C) Orantı kurularak belirlenir.
D) Fark uygulanmaz, istenilen pH değerine ayarlanır.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-3

ÖĞRENME KAZANIMI

Kullanım amacına uygun besiyeri hazırlama da sterilizasyon sonrası işlemleri yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Besiyerlerinde sterilizasyon sonrası yapılan işlemleri ve hangi amaçlarla yapıldığını araştırınız.

3. BESİYERLERİNDE STERİLİZASYON SONRASI İŞLEMLER

3.1. Katkı Maddelerinin Eklenmesi

Çeşitli antibiyotikler, vitaminler, kan ve yumurta sarısı başta olmak üzere besiyeri bileşimine giren bazı maddeler, otoklavlama sırasında tahrip olur ya da yüksek sıcaklıkta besiyeri bileşimindeki maddelerle reaksiyona girer. Bunun en tipik örneği, asit agar etkileşimidir. Bu gibi maddelerin zarar görmemesi, besiyerinin amaca uygun sonuç verebilmesi için bu maddelerin otoklavlama işleminden sonra besiyerine ilave edilmesi gerekir.

Sıvı besiyeri için katkıların ilavesinde herhangi bir sorun yoktur. Besiyeri ve katkı maddeleri sterilizasyon sonrası oda sıcaklığında aseptik olarak karıştırılır. Agarlı besiyerlerindeyse katkı maddeleri, agarın henüz sıvı formda kalabildiği düşük bir sıcaklıkta ilave edilir.

Katkı maddelerinin eklenmesinde aşağıdaki konulara dikkat edilmesi gerekir.

- Katkı maddesi asla soğuk olmamalı, oda sıcaklığında hatta 30-35 °C'de, agarlı besiyeri ise 45-50 °C'de tutulmalıdır. Böylelikle agarlı besiyerlerinde katkının ilave edilmesiyle ani soğuma ve bölgesel jelleşme önlenmiş olur.
- Katkı ilave edilecek agarlı besiyeri içine sterilizasyon öncesi manyet atılarak beraberce sterilize edilmesi, katkı ilavesinden sonra manyetik karıştırıcıda hafifçe karıştırarak katkının besiyeri içinde homojen olarak dağılması sağlanabilir. Bu işlemde, anaför oluşturacak kadar hızlı yapılan karıştırma, ani soğumalara ve/veya besiyeri içinde hava kabarcığı oluşumuna neden olur.
- Sıvı besiyerine de sterilizasyon öncesi manyet atılması yararlı olur. Ancak bu manyet blender gövdesine ya da stomacher torbasına zarar verir. Bu nedenle manyet, karıştırma işlemi bittikten sonra erlenden çıkarılmalıdır.

- Katkı ilave edilmiş agarlı besiyeri, hızla petri kutularına dökülmelidir. Aksi hâlde katkı yüksek sıcaklıktan olumsuz etkilenir ve sahte negatif sonuçlar alınabilir. Asit ilave edilmiş ise agarın jelleşme gücü zayıflar.

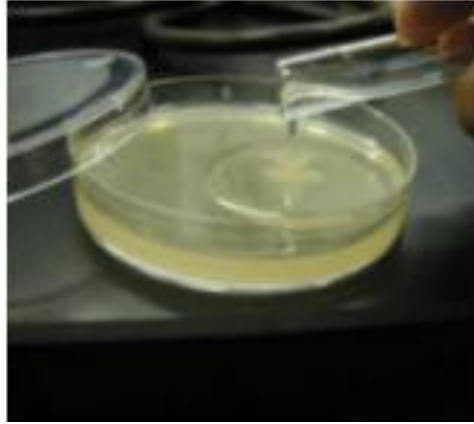
Katkı maddelerinden bir kısmı (yumurta sarısı içeren maddeler gibi) sıvı hâlde, bir kısmı (antibiyotikler gibi) ise küçük şişelerde (vial) liyofilize formdadır. Bunların üzerine gereken miktarda steril damıtık su (bazen su ve alkol) ilavesinden sonra sterilize edilmiş besiyerine eklenir.

Küçük şişelerde pazarlanan katkılar, genellikle 500 ya da 1000 ml besiyeri için hazırlanmıştır. Buna göre besiyeri, uygun hacimde hazırlanır veya hazırlanan besiyeri hacmine uygun miktarda katkı hesaplanarak ilave edilir.

Katkılar, genel olarak belirli bir miktar besiyerinde 1 keredede kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Pratik uygulamada 1 şişe katkının tümünün 1 defada kullanılması beklenmez. Bu durumda katkıdan aseptik koşullara uyularak gereken miktarın alınmasından sonra yine aseptik koşullara uyularak ağzının kapatılmasına özen gösterilmelidir.

3.2. Petri Kutusunda Agarlı Besiyeri Hazırlanması

Sterilizasyondan sonra agarlı besiyerleri, petri kutularına aseptik şartlarda dökülerek kullanılır. Besiyeri dökülmeden önce homojenliğinden emin olmak için çalkalanmalıdır.



Resim 3.1: Besiyerinin petri kutularına dökülmesi

Agarlı besiyerlerinin petri kutularında sterilize edilmesi uygulanan bir yöntem değildir. Agarlı besiyerleri, her zaman erlen gibi büyük kaplarda sterilize edilir ve sterilizasyon sonrası steril petri kutularına aseptik koşullarda dökülür.

Petri kutularına dökülecek agarlı besiyeri miktarı, farklı kaynaklarda farklı değerler ile verilmektedir. Bu miktar, öncelikle petri kutusu çapı ile ilgili olduğu için agarlı besiyeri döküldükten sonra besiyeri kalınlığının 2 - 5 mm olması tercih edilmektedir. Genellikle çapı 9 cm olan bir petri için 15-25 ml (ortalama 20 ml) besiyeri hacmi hesap edilir.

Otoklav sonrası besiyerleri yaklaşık 50 °C'de soğutulmalı ve bu sıcaklıkta petri kutularına dökülmelidir. Yüksek sıcaklıklarda dökme, petri kutusunun kapağı içinde aşırı su yoğunlaşmasına yol açar. Ayrıca yüzey kurutma işlemi daha uzun zaman alır.

Eğer petri kutusunda "dökme yöntemi ile kültürel sayım" amacıyla önceden ilave edilmiş örnek varsa dökme sıcaklığı 40 °C'yi geçmemelidir. Bu uygulamada petri kutusunda bulunan mikroorganizmaları olası termal şok etkilerinden korumak için petri kutularının oda sıcaklığında tutulması gerektiği unutulmamalıdır. Herhangi bir nedenle otoklavlandıktan sonra 50 °C su banyosunda uzun süreli beklemler, agarın jelleşme özelliğinde kayıplara neden olur. 48 °C'de 4 saat bekletmek, izin verilebilecek en yüksek sıcaklık süre kombinasyonudur.

Besiyeri döküldükten sonra petri kutuları düz bir zeminde soğumaya ve katılaşmaya bırakılır. Dökme sırasında besiyerinde oluşabilecek hava kabarcıkları bunzen beki alevi ile giderilir. Bu işlem, herhangi bir amaçla önceden ilave edilmiş numune içeren petri kutularına yapılmamalıdır. Petri kutularının tabanına gerekli bilgiler (besiyeri döküm tarihi, besiyeri adı, hazırlayan kişi gibi) asetatlı kalem ile yazılmalıdır.

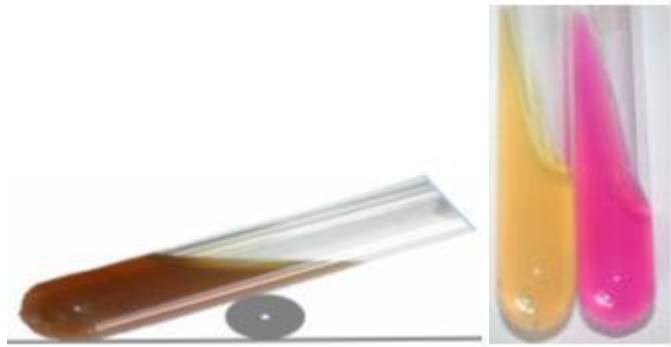
3.3. Tüpde Agarlı Besiyerlerinin Hazırlanması

Standart deney tüplerine 5-10 ml olacak şekilde tam olarak eritilmiş agarlı besiyeri dağıtılır ve otoklavlanır. Tüpde dik agar besiyeri hazırlanacaksa tüpler, sterilizasyondan sonra tüplükte bekletilerek katılaşması sağlanır.

Tüpde yatık agar hazırlanmasında amaç, geniş bir yüzey elde etmektir. Otoklav sonrasında besiyeri henüz sıvı iken tüpler bir çubuk üzerine, ağız kısmı 1 cm kadar yüksek olacak şekilde yerleştirilir ve katılaşması sağlanır. Bu aşamada dikkat edilmesi gereken husus, tüplerin dip kısımlarının yaklaşık 2,5 cm derinliğinde olmasıdır. *Salmonella* analizinde kullanılan triple şeker iron agar, bu tür besiyerine örnek verilebilir.



Resim 3.2: Tüpde dik agar

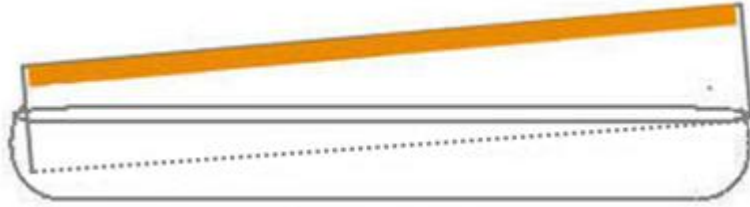


Resim 3.3: Tüpde yatık agar

3.4. Besiyerlerinde Yüzey Kurutma İşlemi

Petri kutularına dökülmüş katı besiyeri yüzeylerinin aşırı ıslak (yüzeyinde su damlacıkları) ve aşırı kuru olması istenmez. Çünkü besiyeri yüzeyinin aşırı ıslak olması, inkübasyonda buharlaşma ile petri kapağında su damlacıklarının oluşmasına ve kontaminasyonlara neden olur. Ayrıca hareketli bakteriler için yayılıcı, hareketsiz bakteriler için ise daha büyük koloni oluşturmaya dolayısıyla bu durum da hatalı değerlendirmelere neden olabilmektedir.

Besiyeri yüzeyinin aşırı kuru olması öze ile ekim kalitesinin düşmesine ve mikroorganizmaların normalden daha küçük koloni oluşturmalarına; bu durum da hatalı değerlendirmelere neden olabilmektedir.



Şekil 3.1: Besiyerlerinde yüzey kurutma

Besiyerlerinde yüzey kurutma işlemi sırasında dışarıdan gelebilecek bulaşları önlemek için besiyeri dökümünde oluşturulan aseptik koşullar (aşılama kabinlerinde, kuru hava sterilizatörlerinde (KHS), UV ışınları ile steril edilmiş alanlarda, hava akımları önlenmiş bunzen alev çatısı altında) sürdürülmelidir. Besiyerlerinde yüzey kurutma işlemi oda ısısında veya KHS'de 37 °C'de 10-15 dakika kapakları alta gelecek ve çok az açık bırakılacak şekilde bekletilerek yapılır. Besiyerlerinin kurutulması için ekim yapılmış besiyerlerinin inkübasyonunda kullanılan etüvler, kesinlikle kullanılmamalıdır.

3.5. Besiyeri Sterilizasyon Kontrolü

Hangi yöntem kullanılmış olursa olsun, malzemenin gerçekten steril olup olmadığının kontrolü yapılmalıdır. Bu kontrol bir anlamda sterilizasyon uygulamasının kontrolü demektir. Kontrollerde sterilizasyon uygulaması sonrası kontaminasyon (bulaşma) olmamasına özen gösterilmelidir. Sterilizasyon kontrolü bakteriyolojik, kimyasal ve elektrikli indikatörler ile yapılabilir.

3.5.1. Biyolojik (Bakteriyolojik) İndikatörler

Otoklavda sterilizasyon kontrolü için biyolojik sterilizasyon indikatörü (**Sterikon**) kullanılması önerilir. Bu kullanım, pek çok uluslararası standartta yer almaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan bakteri, *Geobacillus stearothermophilus* (Syn. *Bacillus stearothermophilus*) sporlarıdır. Bu sporlar, 2 ml nutrient broth ve bir pH indikatörü olan ampul içinde yaklaşık 10^7 sayıda bulunur. Sporlar 121 °C'de 15 dakikalık ısı işlem uygulanması sonunda tümüyle ölür.

Standart bir otoklavlama işleminde 250 litre hacme kadar olan otoklavlar için 2 ampul, daha büyük olanlar için 6 ampul farklı yerlere yerleştirilir. Otoklavlama sonunda ampuller otoklavlanmamış olan şahit 1 ampul ile birlikte 60 °C'de 48 saat inkübe edilir. Otoklav doğru çalışıyorsa -121 °C'ye erişip bu sıcaklıkta 15 dakika kalıyorsa- ampul içindeki tüm sporlar ölmüş olacağı için inkübasyon sonunda ampullerde bir değişiklik olmaz ve menekşe renk korunur aksi hâlde ampulde sterilizasyon yetersizliği nedeniyle tek bakteri sporu bile canlı kalırsa bu spor bakteri hücrelerine dönüşerek hızla çoğalır ve pH indikatörü aracılığı ile ampul rengi sarıya döner.



Resim 3.4: Biyolojik sterilizasyon indikatörleri (Sterikon)

Aşağıdaki tabloda farklı sterilizasyon teknikleri için kullanılması önerilen mikroorganizmalar, test materyalleri ve bunların kontrol şekli gösterilmektedir.

| İşlem | Spor (10° adet) | Test Materyali | Inkübasyon |
|-----------------|---|---------------------------|-----------------------|
| Otoklav | <i>Bacillus stearothermophilus</i> | Kâğıt şerit ya da diskler | 55 °C 5 gün aerobik |
| Kuru hava | <i>Clostridium tetani</i> (toksik olmayan) | Steril kum | 37 °C 5 gün anaerobik |
| Etilen oksit | <i>Bacillus globigii</i> | Alüminyum folyo | 37 °C 5 gün aerobik |
| Gamma radyasyon | <i>Bacillus pumilis</i> | Kâğıt şerit ya da diskler | 37 °C 5 gün aerobik |

Tablo 3.1: Bakteriyolojik indikatörler

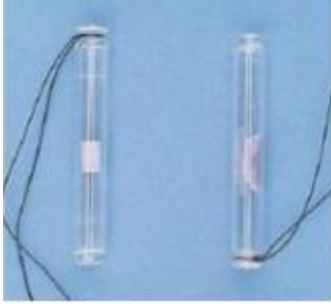
3.5.2. Kimyasal İndikatörler

Kimyasal indikatörler, sterilizasyon işlemlerinin rutin kontrollerinde uygun bir yöntemdir. Hızlı sonuç almada büyük avantaj sağlar. Bunlar ya ürüne sterilizasyon işlemi uygulandığını göstermek üzere paket dışına ya da işlemde uygulanan sterilizasyon sıcaklığına ulaşıldığını göstermek amacıyla paketin içine yerleştirilir. Bunlar genellikle ısı ve radyasyon ile yapılan sterilizasyon işleminde kullanılmakla beraber bazen etilen oksit sterilizasyonunda da kullanılmaktadır.

| İndikatörler | Değişim | Sterilizasyon işlemi |
|----------------------------|-------------------------------------|---|
| Brownie tüpleri | Kırmızıdan yeşile dönüşür. | Basınç altında buhar veya kuru sıcaklıkta kullanılır. |
| Steam - Clox kâğıtları | Mordan yeşile dönüşür. | Basınç altında buharda kullanılır. |
| Diack Tüpleri | Erir ve bej renk kırmızıya dönüşür. | Basınç altında buharda kullanılır. |
| Otoklav şeridi | Açık renkten koyuya dönüşür. | Basınç altında buharda kullanılır. |
| Bowie - Dick şeritleri | Açık renkten koyuya dönüşür. | Basınç altında buharda kullanılır. |
| Azo boyalı klorid şeritler | Sarıdan kırmızıya dönüşür. | Gamma radyasyonunda kullanılır. |
| Royce keseciği | Sarıdan mora dönüşür. | Etilen oksit sterilizasyonunda kullanılır. |

Tablo 3.2: Sterilizasyonda kullanılan kimyasal indikatörler

Uygulamada yaygın olarak kullanılan kimyasal indikatörler diack tüpleri ve otoklav şeritleridir. Diack tüpleri, kapalı cam tüpler içine yerleştirilmiş ve sıcaklık 121 °C'ye erişince 5 - 8 dakikada eriyen veya buharlaşan soğuduktan sonra renkleri bejden kırmızıya dönüşen tabletlerdir. Bunlar, pratikte kullanılmakla beraber buhar penetrasyonunu ölçmeye yaramaz.



Resim 3.5: Diack tüpleri



Resim 3.6: Otoklav şeritleri

Otoklav şeridi ise basit olarak paket hâlindeki eşyaların otoklavlardaki sterilizasyonlarının olup olmadığını anlamada kullanılır. Bu testin olumlu sonuç vermesi, hızlı buhar penetrasyonun gerçekleştiğini ve otoklav içindeki havanın mutlak bir şekilde uzaklaştırılmış olduğunu gösterir. Şeridin otoklavlama işlemi sonucunda renginin homojen olarak değişmesi, emin bir sterilizasyonun göstergesi olarak kabul edilir.

3.5.3. Elektrikli İndikatörler

Otoklavdaki malzemelerin içine veya otoklav ve fırınların çeşitli yerlerine yerleştirilen ısı sensörleri buldukları yerdeki sıcaklığı doğrudan doğruya ölçmektedir. Bunların elektrotlarının uçları, sıcaklığa duyarlı kurşundan yapılmıştır. Sterilizatör dışındaki bir kaydedici alete bağlıdır. Kontrol için seçilen paketlerin içine uçların yerleştirilmesi hâlinde buharın kurşun boyunca paket içine yoğunlaşmasını önlemek amacıyla gerekli önlemler alınmalıdır aksi takdirde buharın paket içine kurşun taşınması sonucunda kurşun zehirlenmesi görülebilir.



Resim 3.7: Elektrikli ısı ölçer



Resim 3.8: Isı sensörü

3.6. Hazırlanmış (Stok) Besiyerlerin Muhafazası

Çoğu laboratuvarında, besiyerleri hazırlandıktan sonra sterilize edilir, daha sonra kullanılmak üzere depolanır. Bu uygulamaya çeşitli besiyeri katkıları da girer. Piyasadan kullanıma hazır hâlde petri kutularında, vida kapaklı şişelerde vb. şekillerde besiyerleri sağlanabilir, bunların muhafazası da laboratuvarında hazırlananlar gibidir.

Hazırlanmış besiyerlerinin depolanabilme süresi öncelikle bileşimine, hangi ambalajda (tüp, vida kapaklı şişe, plastik petri kutusu, cam petri kutusu vb.) olduğuna ve saklama koşullarına bağlıdır. Her laboratuvar, kendi hazırlama, paketlenme ve saklama koşullarına (ışık, nem ve sıcaklık durumuna) göre hazırlanmış her besiyeri için depolama süresini belirlemelidir.

ISO 11133'e göre besiyerleri katkı ilave edilmemiş olmak kaydı ile buzdolabında en çok 3 ay, oda sıcaklığında en çok 1 ay süre ile depolanabilir. Bununla birlikte bazı besiyerlerinin hazırlandığı gün kullanılma zorunluluğu da vardır.

3.7. Agarlı Besiyerlerinin Yeniden Eritilmesi

Sterilize edildikten sonra soğutulmuş ve katılaşmış agarlı besiyerlerinin çeşitli nedenlerle yeniden eritilmesi gerekebilir. Burada akla gelen ilk iki neden, istem dışı agarlı besiyerinin jelleşmesi ve besiyerinin her an kullanılabilir şekilde elde hazır tutulmasıdır. Bazı ticari besiyerleri, vida kapaklı şişe içinde pazarlanır. Bunların eritilmesi zaten zorunludur.

Hangi nedenle olursa olsun jelleşmiş bir agarlı besiyerinin yeniden eritilmesi için 90 °C'de 1-2 dakika tutulma zorunluluğu vardır. Bu uygulama toplam ısı girişi açısından önerilmez. Bununla birlikte pek çok laboratuvarında çeşitli besiyerleri arasında agarlı besiyerleri de sterilize edildikten sonra steril şekilde belirli bir süre depolanır. Bu uygulama daha çok günlük kontrol yapan laboratuvarlarda, (Örneğin, 1 hafta boyunca kullanılacak besiyerlerini bir kerede hazırlamak amacıyla) yapılır.

Katkı ilave edilmiş agarlı besiyerinin yeniden eritilmesi söz konusu değildir. Benzer şekilde yüksek sıcaklığa duyarlı olan ve otoklavda sterilize edilmeyen agarlı besiyerlerinde de yeniden eritme önerilmez. Hatta bazı agarlı besiyerlerinin prospektüslerinde yeniden eritilmemesi gerektiğine özellikle dikkat çekilir. Düşük pH'lı besiyerlerini tekrar eritmekten kaçınılmalıdır, burada sınır pH 6,0 verilmektedir.

Agarlı besiyerinin eritilmesi gerektiğinde elden geldiği ölçüde az ısı girişinin sağlanması, bu amaçla kaynar su banyosunda yaklaşık 90 °C'de tutularak erimenin gerçekleştirilmesi yeterlidir. Yeniden eritilmiş agarlı besiyerinin 3 saat içinde petri kutularına dökülmüş olması gerekir. Laboratuvardaki iş akışı buna göre planlanmalıdır.

3.8. Kullanıma Hazır Besiyerleri

Piyasada uygun kap içinde steril ve çok basit bir işlemle kullanılacak hâle getirilebilen veya kullanıma hazır hâlde bulunan besiyerleridir. Steril ambalajı açıldıktan sonra hemen kullanılmalıdır. Tekrar kullanılma imkânı yoktur. Bu besiyerleri vidalı kapaklı tüp ve şişelerde sıvı besiyerleri, yatık agar besiyeri, dik agar besiyeri ile petri kutularında agarlı besiyeri olarak üretilmektedir. Genellikle plastik petri kutularında hazırlanan agarlı besiyerleri sadece tek çeşit besiyerini içerebileceği gibi iki ya da üçe bölünmüş kutularda farklı besiyerleri de bulunabilmektedir.

➤ Kurutulmuş hazır besiyerleri

Petri kaplarında veya tek tek paketlenmiş kurutulmuş steril besiyerleridir. Optimum şartlarda hazırlanmış agarlı besiyerinin özel bir kartona emdirilmesi ve kurutulması ile hazırlanan, kurutulmuş olduğu için uzun süre saklanabilen besiyerleridir. Bu besiyerleri kullanılacağı zaman aseptik teknikle ambalajından çıkarılarak 3-5 ml steril saf su ile ıslatıldığında kullanıma hazır hâle gelmektedir.

➤ Agar slaytları (Dip slide)

Yüzey kontaminasyonlarının belirlenmesi ve/veya kültürlerin taşınmasında kullanılan bir plastik levha üzerindeki hazır agarlı besiyerleridir.



Resim 3.9: Agar slaytları




Bu hazır besiyerlerinin 2 farklı yüzünde 2 farklı besiyeri bulunan tipleri aynı örnekte hem toplam bakteri hem de koliform grup bakteri analizine olanak sağlamaktadır. Bunların bir yüzü maya-küf, diğer yüzü toplam bakteri vb. çeşitleri de vardır. Bu tip besiyerlerini kullanmak işletme laboratuvarında büyük kolaylık sağlamaktadır.

Dip slide besiyerlerinde kontaminasyon olasılığı, asgari düzeyde mikrobiyoloji deneyimine sahip kişiler için bile yok gibidir. Dip slide besiyerlerinin bulunduğu plastik levhanın bükülebilir olması, besiyerinin yüzeye daha iyi temas etmesini sağlamaktadır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak petri kutusunda katı besiyeri hazırlayınız.

Uygulamada kullanılan kimyasal madde, araç gereçler: Sterilize edilmiş besiyeri, steril petri kutusu, buzdolabı, steril kabin, bek

| | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">➤ Sterilize edilmiş besiyerini 45-50 °C'ye soğutunuz. | <ul style="list-style-type: none">➤ Laboratuvar kıyafetlerinizi giyiniz.➤ Ellerinizi her çalışma öncesi ve sonrası yıkayıp dezenfekte ediniz. |
| <ul style="list-style-type: none">➤ Aseptik ortam oluşturunuz.  | <ul style="list-style-type: none">➤ Aseptik çalışma kurallarına uyunuz. |
| <ul style="list-style-type: none">➤ Besiyeri çeşidine göre gerekliyse katkı maddesi ilave ediniz. | <ul style="list-style-type: none">➤ İlave edilen miktarların doğru hesaplandığından emin olunuz. |
| <ul style="list-style-type: none">➤ Besiyerini aseptik ortamda steril petri kutularına aktararak kapaklarını kapatınız.  | <ul style="list-style-type: none">➤ Besiyerlerini petri kutularına dökme işlemini aseptik tekniğe uygun yapınız.➤ Dökme işleminde kullanılacak cam malzeme ve diğer ekipmanların steril olmasına dikkat ediniz.➤ Besiyerini petri kaplarına dökmeden önce homojen olması için çalkalayınız.➤ Hava kabarcıkları oluşursa besiyeri üzerinde bek alevi gezdirerek kabarcıkları uzaklaştırınız. |
| <ul style="list-style-type: none">➤ Düz bir zemin üzerine yerleştirerek katılaşmasını bekleyiniz.  | <ul style="list-style-type: none">➤ Kontaminasyonları önlemek için gerekli önlemleri alınız. |

| | |
|---|--|
| <p>➤ Üzerlerine gerekli bilgileri yazınız.</p>  | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Agarlı besiyerleri petri kaplarına döküldükten sonra bir süre depolanacaksa üzerlerine döküm tarihini yazmayı unutmayınız. ➤ Kapakların değişme olasılığını da dikkate alarak bilgileri petri kutusunun tabanına yazmayı tercih ediniz. |
| <p>➤ Tüm besiyerlerini buzbolabına yerleştirerek uygun sıcaklıkta muhafaza ediniz.</p>  | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Hazırlanan besiyerlerinin depolanma sürelerinin bileşenlerine, ambalaj şekline ve saklama koşullarına göre değiştiğini unutmayınız. ➤ Saklama süreleri üzerine sıcaklık, nem ve ışığın etkili olduğunu göz önünde bulundurunuz. |
| <p>➤ Hazır ticari besiyerlerini talimatları doğrultusunda muhafaza ediniz.</p>  | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Bu konuyla ilgili mevcut talimatlara uyunuz. |

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Besiyerlerinin sterilizasyon kontrolünde 250 litre hacme kadar olan otoklavlar için kullanılması gereken biyolojik (bakteriyolojik) indikatör ampul sayısı kaç olmalıdır?
A) 2
B) 4
C) 6
D) 5
2. Besiyerlerinin sterilizasyon kontrolünde kullanılan sterikon ampullerin, otoklavlama işleminden sonra otoklavlanmamış şahit ampulle birlikte 60 °C'de, 48 saat inkübe edilerek renginin mordan sarıya dönüşmesi neyi ifade eder?
A) Otoklavlama işlemi başarısızdır, spordan bir kısmı canlı kalmıştır.
B) Otoklavma sonucunda tüm sporlar öldürülmüştür.
C) Sterikon ampül içeriği bozulmuştur.
D) Yoruma gerek olmayan bir sonuçtur.
3. Aşağıdakilerden hangisi sterilizasyon kontrolünde kullanılan kimyasal indikatörlerden biri değildir?
A) Diack tüpleri
B) Bowie-Dick şeritleri
C) Turnusol kâğıdı
D) Brownie tüpleri
4. Otoklavda sterilize edildikten sonra agarlı besiyerlerine uygulanabilecek en yüksek sıcaklık süre kombinasyonu hangisidir?
A) 50°C'de, 6 saat
B) 25°C'de, 10 saat
C) 48°C'de, 4 saat
D) 60°C'de, 3 saat
5. Aşağıdakilerden hangisi besiyeri katkı maddelerinden biri değildir?
A) Antibiyotikler
B) Kan
C) Yumurta sarısı
D) Antikor
6. Aşağıdakilerden hangisi petri kutularına dökülecek agarlı besiyeri miktarı için uygundur?
A) 20 ml
B) 10 ml
C) 50 ml
D) 5 ml

Aşağıda boş bırakılan parantezlere, cümlelerde verilen bilgiler doğru ise D, yanlış ise Y yazınız.

7. () Kullanıma hazır besiyerleri, piyasada uygun kap içinde, steril ve çok basit bir işlemle kullanılacak hâle getirilebilen veya kullanıma hazır hâlde bulunan besiyerleridir.
8. () Hazır besiyerlerinin steril ambalajı açıldıktan sonra hemen kullanılmayacaksa saklanarak tekrar kullanılabilir.
9. () Kurutulmuş hazır besiyerleri, kullanılacağı zaman aseptik teknikle ambalajından çıkarılarak 3-5 ml steril saf su ile ıslatıldığında kullanıma hazır hâle gelmektedir.
10. () Kurutulmuş hazır besiyerleri yüzey kontaminasyonlarının belirlenmesi ve/veya kültürlerin taşınmasında kullanılan hazır agarlı besiyerleridir.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise “Modül Değerlendirme”ye geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi katı besiyerlerinde kullanılan ortak maddedir?
A) NaCl
B) Kan
C) Et ekstraktı
D) Agar
2. Aşağıdakilerden hangisi agara ait bir özellik değildir?
A) Besiyerlerine % 1–3 oranında katılır.
B) Besiyeri pH'ından etkilenmez.
C) Besiyeri pH'ı 5'ten düşük olduğunda katılaşma özelliğini yitirebilir.
D) Mikroorganizmalar için besin maddesi değildir.
3. Aşağıdakilerden hangisi besiyerinin sahip olması gereken özelliklerinden biri değildir?
A) Besiyerine katılan kimyasal maddeler saf olmalıdır.
B) Katkı maddeleri antagonist (birbirine zıt) etkiye sahip olmamalıdır.
C) Kullanılan su Cu, Zn gibi metal iyonlarından zengin olmalıdır.
D) Uygun asit-baz dengesine sahip olmalıdır.
4. Aşağıdakilerden hangisi besiyeri sterilizasyon yöntemlerinden biri değildir?
A) Nemli sıcak uygulaması
B) Tindelizasyon
C) Dondurma
D) Memran filtrasyon yöntemi
5. Tüpte yatık agar hazırlanmasında asıl amaç nedir?
A) Geniş üreme yüzeyi elde etmek
B) Selektif besiyeri elde etmek
C) Sterilizasyon işleminde avantaj sağlamak
D) Besiyerinin çabuk katılaşmasını sağlamak
6. Katkı maddelerinin ilavesi sırasında agarlı besiyerinin tutulması gereken sıcaklık aralığı aşağıdaki şıklardan hangisinde doğru verilmiştir?
A) 80-90 °C
B) 45-50 °C
C) 20-30 °C
D) 60-70 °C
7. Aşağıdakilerden hangisi yanlıştır?
A) Dehidre besiyerlerinin nem alması istenmez.
B) Hazırlanmış besiyerlerinde nem kaybından kaçınılmalıdır.
C) Agarlı besiyerlerinin dondurulmasından kesinlikle kaçınılmalıdır.
D) Agar mikroorganizmalar için besin maddesidir.

Aşağıdaki cümlelerde boş bırakılan yerlere doğru sözcükleri yazınız.

8. Yüksek sıcaklık ekisiyle tahrip olan ya da birleriyle etkileşime giren birtakım katkı maddeleri besiyerlerine işleminden sonra ilave edilir.
9. Asit ilave edilmiş agarlı besiyerinin gücü zayıflar.
10. Besiyerinin sterilizasyon kontrolünde kullanılan biyolojik indikatörleredenir.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki modüle geçmek için öğretmeninize başvurunuz.

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ -1'İN CEVAP ANAHTARI

| | |
|---|---|
| 1 | B |
| 2 | B |
| 3 | C |
| 4 | D |
| 5 | A |

ÖĞRENME FAALİYETİ -2'NİN CEVAP ANAHTARI

| | |
|---|---|
| 1 | C |
| 2 | D |
| 3 | A |
| 4 | A |
| 5 | B |

ÖĞRENME FAALİYETİ -3'ÜN CEVAP ANAHTARI

| | |
|----|--------|
| 1 | A |
| 2 | A |
| 3 | C |
| 4 | C |
| 5 | D |
| 6 | A |
| 7 | Doğru |
| 8 | Yanlış |
| 9 | Doğru |
| 10 | Yanlış |

MODÜL DEĞERLENDİRMENİN CEVAP ANAHTARI

| | |
|----|---------------|
| 1 | D |
| 2 | B |
| 3 | C |
| 4 | C |
| 5 | A |
| 6 | B |
| 7 | D |
| 8 | sterilizasyon |
| 9 | jelleşme |
| 10 | sterikon |

KAYNAKÇA

- AKSOY A. Murat, **Laboratuvar Uygulama Kılavuzu, Bakterilerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri**, AÜTF Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD Ankara, 2006-2007.
- ARDA Mustafa, **Temel Mikrobiyoloji**, Medisan Yayınları, Ankara, 2007.
- BEŞE Muzaffer, **Mikrobiyolojide Kullanılan Biyokimyasal Testler ve Besiyerleri**, AÜ Veteriner Fakültesi Yayınları.
- GÜVEN Sedat, Anaerob **Mikroorganizmalar ve Bakteriyolojik Muayene Metodları**, Pendik Vet. Kontrol ve Arş Ens Yayınları, İstanbul, 1972.
- HALKMAN A. Kadir, **Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları**, Başak Matbaacılık Ltd. Ş., Ankara, 2005.
- HAYRAN Murat, KOCAGÖZ Tanıl, **Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvar El Kitabı**, Hacettepe Ü'si Mikrobiyoloji ABD, Feryal Matbaası, Ankara, 1991.
- SEZGİN Nazan, **Mikrobiyoloji Laboratuvarı**, Baran ofset, Ankara, 2002.
- <http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/iozerol/BAKTERIYOLOJI/BESIYERI>
- www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM/1213/unite05.pdf