

03. Besiyerleri ¹

Prof. Dr. A. Kadir Halkman

Ankara Üniv. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

03.01. Genel Bilgiler

03.02. Kısa Tarihçe

03.03. Besiyeri Hazırlama Şekilleri

- 03.03.01. Formülden Hazırlama
- 03.03.02. Dehidre Besiyerlerinden Hazırlama
- 03.03.03. Kullanıma Hazır Besiyerleri
- 03.03.04. Özel Uygulamalar

03.04. Besiyeri Bileşimine Giren Maddeler

- 03.04.01. Su
- 03.04.02. Peptonlar
- 03.04.03. Maya Ekstraktı
- 03.04.04. Et Ekstraktı
- 03.04.05. Malt Ekstraktı
- 03.04.06. Beyin ve Kalp Ekstraktı
- 03.04.07. Agar
- 03.04.08. Karbohidratlar
- 03.04.09. Tuz
- 03.04.10. Tampon Maddeler
- 03.04.11. pH İndikatörleri
- 03.04.12. Redoks İndikatörleri
- 03.04.13. Diğer İndikatörler
- 03.04.14. İnhibitörler
- 03.04.15. Diğer Maddeler

03.05. Besiyeri Çeşitleri

- 03.05.01. Genel Besiyerleri
- 03.05.02. Selektif Besiyerleri
- 03.05.03. Diferansiyel (Ayırt Edici; Fark Ettirici) Besiyerleri
- 03.05.04. Zenginleştirme Besiyerleri
- 03.05.05. İdentifikasyon Besiyerleri
- 03.05.06. Diğerleri

03.06. Besiyerlerinin Hazırlanması

- 03.06.01. Cam Malzeme
- 03.06.02. Tartım ve Eritme
- 03.06.03. pH Ayarlama
- 03.06.04. Katkıların İlavesi
- 03.06.05. Petri Kutularına Döküm
- 03.06.06. Kurutma
- 03.06.07. Yeniden Eritme

03.07. Depolama

- 03.07.01. Dehidre Besiyerlerinin Depolanması
- 03.07.02. Çözeltilerin Depolanması
- 03.07.03. Katkıların Depolanması
- 03.07.04. Hazırlanmış Besiyerlerinin Depolanması

03.08. Çözeltilerin Hazırlanması

03.09. Besiyeri Kalite Kontrolü

03.10. Besiyeri Hataları

03.11. Tehlikeli Maddeler

¹ www.mikrobiyoloji.org ana sayfasında görülen Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları; "Anonymous, 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa." adlı kitabın 03. bölümüdür.

03.01. Genel Bilgiler

Besiyerleri (besi ortamı, ortam, vasat, kültür ortamı, kültür vasatı, kültür besiyeri) mikroorganizmaların geliştirilmesi için formülize edilmiş ortamlardır. Bunlar, mikroorganizmaların geliştirilmesi, izolasyon, identifikasyon, sayım, duyarlılık testleri, sterilite testleri, klinik örneklerin incelenmesi, gıda, su ve çevre kontrolleri, biyolojik ürünlerin elde edilmesi, antibiyotik ve vitamin analizleri, endüstriyel analizler vb. gibi çok farklı amaçlara yönelik olabilir.

Besiyerleri çok farklı şekillerde hazırlanabilir ve kullanılabilir. Örneğin, süt bir "genel besiyeri" olup, mikroorganizmaların gelişmeleri için gerekli bütün besin maddelerini ve bunların kullanılabilmesi için yeterli suyu içerir. Üzüm suyunda da gelişme için gereken besin maddeleri ve su bulunmasına karşın, yüksek asitliği nedeni ile sadece bu asitlikte gelişebilecek olan mikroorganizmaların (bazı bakteriler ve özellikle mayaların) gelişimine uygundur.

Besiyerleri hakkında TS EN 12322; "Vücut Dışı Kullanılan Tıbbi Tanı Cihazları- Mikrobiyoloji Kültür Besiyerleri- Kültür Besiyerlerinin Performans Kriterleri, Direktif: 93/42/EEC, 98/79/EC" adlı yayın Türk Standartları Enstitüsü'nden sağlanabilir.

03.02. Kısa Tarihçe

Mikrobiyolojinin tarihçesinde kilometre taşı olarak anılan iki gelişme; 1674 yılında Antoni van Leeuwenhoek'un mikroskobu icat etmesi ve bundan yaklaşık 2 yüzyıl sonra 1881 yılında Robert Koch'un jelatin kullanarak elde ettiği katı besiyerinden *Bacillus anthracis* 'i izole etmesidir. Böylece, hastalık etmeni olan pek çok bakteri izole edilebilmiş ve "Hasta bireyden muhtemel hastalık etmenini saf halde izole et. Bu etmeni sağlıklı bireye aşıla. Hastalık semptomlarının aynı olduğunu izle. Hastalandırılmış bireyden saf halde izole edeceğin etmenin, ilk hasta bireyden izole ettiğin ile aynı olduğunu göster." şeklindeki Koch postulatı, giderek sistematik analiz yöntemi haline dönüşmüştür. Louis Pasteur tarafından 1882'de aşılamanın bulunması, 1928'de Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesi de mikrobiyoloji tarihinin önemli kilometre taşları arasındadır. Bu bölümdeki amaç, tüm mikrobiyoloji tarihini vermek değildir ve bu konu, kitabın kapsamı dışında kalır.

Aşağıda besiyerlerinin geliştirilmesi üzerine kısa bir kronoloji verilmiştir.

1817: Bartholomeo Bizio, ekmeğin üzerindeki kan gibi kırmızı renklenmelerin gerçekte ne olduğunu araştırmış, bunları mikroskop altında incelemiş ve mikroorganizmaları görmüştür. Kırmızı renkli sütlü ekmeği taze sütlü ekmeğe değiştirerek, *Serratia marcescens* olarak adlandırdığı bu mikroorganizmanın gelişmesini sağlamış ve renklenmenin insan eliyle yapıldığını kanıtlamıştır.

1861: Louis Pasteur, mayaların oksijenli ve oksijensiz ortamda gelişimini inceleyip, bunların geliştirilmesi için sıvı besiyeri formülünü açıklayan ilk bilim adamı olarak tarihe geçmiştir.

1869: Ferdinand Cohn, besiyeri bileşiminde mineral maddelerin önemini göstermiştir. Böylece farklı grup mikroorganizmalar ile çalışma olanağı doğmuştur.

1872: Alman botanikçi Oscar Brefeld, sıvı besiyerine jelatin ekleyerek elde ettiği katı besiyerinde tek spordan küf kolonilerini ürettiğini bildirmiştir.

1873: Edwin Klebs, "fraksiyon yöntemi" olarak adlandırdığı bir seyreltme tekniği kullanarak ayrı kültürler elde eden ilk bakteriyologlardan biridir. Bu yöntem basit olarak, sıvı ortamdan

az miktarda örneğin başka bir besiyerine inokülasyonudur. Bu yöntemin dezavantajları karışık kültürlerden sadece baskın türün izole edilebilmesi ile çok fazla işgücü ve malzeme gerektirmesidir.

1877: John Tyndall, bugün Tindelizasyon olarak anılan ardışık ısıl işlem ile sterilizasyonu açıklamıştır.

1878: İlk saf kültür, "seyreltme tekniği" ile Joseph Lister tarafından elde edilmiştir. Lister, Pasteur'un laktik fermentinden, sütte ekşimeye yol açan *Bacterium lactis* adını verdiği bakteriyi izole etmiştir. Bir öze ucu dolusu kesilmiş sütü steril kaynamış suya aktarmış, gerekli seyreltmeyi mikroskop kullanarak belirlemiş ve tek bakterinin olduğu seyreltiyi inokülasyon amacıyla kullanmıştır.

1880: İsviçreli bir botanikçi olan Karl Wilhelm von Nägeli, besiyeri hazırlamada pepton kullanımını öneren ilk bilim adamıdır.

1881: Robert Koch, aseptik olarak kesilmiş patates dilimlerinin, katı besiyeri olarak kullanımındaki yetersizliği üzerine, %10 jelatin eklenmiş sıvı besiyeri kullanarak *Bacillus anthracis* 'in saf kültürünü elde etmiştir.

1882: Koch'un çalışma arkadaşları olan Walter Hesse ile eşi Fanny Eilshemius Hesse tarafından katılaştırıcı olarak agar önerilmesi ile birlikte sıvı besiyerinin katılaştırılmasında yeni bir dönem başlamıştır.

1883: Gayon ve Gabriel Dupetit, şekerler ve alkoller gibi basit organik bileşiklerin kompleks organiklerin yerini alabileceğini göstermişlerdir.

1889: Limbourg, inhibitör olarak safra tuzları kullanmıştır. Safra tuzları (Ox Bile) günümüzde de koliform bakteriler için olan besiyerlerinin çoğunda bulunmaktadır.

1891: Coprado, safranin *B. mallei* gelişmesini teşvik ederken, *B. anthracis* için bakterisit olduğunu ve *B. typhosus* ile *B. pneumoniae* üzerinde etkisi olmadığını gözlemiştir. Bu şekilde inhibitör kullanımı üzerinde yoğunlaşmıştır.

1900: MacConkey ve Hill, Safra Tuzu Glikoz Broth'u fekal kontaminasyon için basit bir test olarak önermişlerdir. Hemen arkasından MacConkey bu besiyerinde *B. enteritidis* 'i geliştirmek için glikoz yerine laktoz kullanmıştır.

1902: Wilhelm von Drigalski ve Heinrich Conradi, *Salmonella typhi* ile *E. coli* 'yi ayırt etmek için bu iki bakterinin şeker metabolizmasındaki farkını kullanmayı önermişlerdir. Böylece, selektif izolasyon kavramı daha da belirginleşmiştir.

1908: Christiaan Eijkman, sıcak kanlı hayvanların bağırsağından izole edilmiş koliform bakterilerin Glikoz Broth besiyerinde, 46 °C'da inkübe edildiğinde gaz ürettiğini göstermiştir. Bu test günümüzde de benzer bir şekilde kullanılmaktadır.

1908: Prof. R. Doerr, laboratuvarlar için Petri kutusuna Nutrient Agar dökerek hazırlanan besiyeri önermiştir.

1909: Prof. E.L. Marx, laboratuvar ölçeğinde dehidre Nutrient Broth, Nutrient Agar ve Endo Agar formüllerine öncülük etmiştir.

1910: Amerikan Bakteriyologlar Derneği toplantısında W.D. Frost tarafından hazır besiyeri için benzer bir proses açıklanmıştır.

1910: İlk ticari besiyeri üretimi Nutrient Agar ve Nutrient Broth ile başlamıştır.

1916: Holt-Harris ve Teague, patojenik enterobakteri tanımlama ve izolasyonu için kullanılmak üzere Eosin Methylene Blue Lactose Sucrose (EMB) Agar besiyerini geliştirmişlerdir. EMB Agar, günümüzde de kullanılan bir besiyeridir.

1950: Granül besiyeri üretimine başlandı.

03.03. Besiyeri Hazırlama Şekilleri

Standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarı tipik bir ev mutfağına benzer. Besiyeri hazırlamak ise, evde yemek yapmaktan çok farklı değildir. Mikrobiyolojik amaçla kullanılacak bir besiyerinin hazırlanması çok basit olarak mutfakta çorba yapmaya benzetilebilir. Örneğin, domates çorbası yapmak için yemek kitaplarında miktarları verilerek tarif edildiği şekli ile; önce un yağda kavrulur, üzerine domates suyu, süt ve tuz ilave edilir, pişirilerek "çorba" hazırlanır. Ya da daha basit olarak, hazır toz haldeki domates çorbası belirli miktarda su ile pişirilir.

Benzer şekilde, besiyeri bileşimine giren maddeler ayrı ayrı tartılarak, ya da hazır dehidre besiyeri doğrudan tartılarak su içinde çözülür. En basit olarak; Nutrient Broth'un bileşimi litrede 5 gram pepton ve 3 gram et ekstraktı şeklindedir.

Laboratuvarda pepton ve et ekstraktı varsa, bunlar doğrudan tartılıp, 1 litre damıtık su içinde çözülür ve gerekli büyüklükteki cam kaplara dağıtılarak sterilize edilir. Laboratuvarda hazır dehidre Nutrient Broth varsa, bundan 8 gram tartılarak, 1 litre damıtık su içinde çözülür ve yukarıdaki işleme devam edilir.

Nutrient Broth gibi basit bir besiyerine giren maddeler, çoğu mikrobiyoloji laboratuvarında her zaman "el altında" bulunur. Dolayısı ile, Nutrient Broth'u bileşimden hazırlamak genellikle sorun değildir.

Ancak, yabani maya izolasyonu ve sayımında kullanılan Lysine Medium besiyerinde 25 madde olduğu, bunlar arasında 0,000001 g/L folik asit gibi tartımın da bulunduğu dikkate alındığında, bu tip besiyerlerini standart bir mikrobiyoloji laboratuvarında bileşimden hazırlamanın kolay ve günlük uygulamada hiçbir şekilde pratik olmadığı ortaya çıkar.

Alicyclobacillus spp. aranmasında kullanılan BAT Agar ile özellikle *Listeria monocytogenes* aranmasında kullanılan ALOA Agar besiyerlerinin de standart bir laboratuvarda bileşimden hazırlanması oldukça güçtür.

Kuşkusuz, bileşimine 2 madde giren Nutrient Broth ile bileşimine 25 madde giren Lysine Medium besiyerleri uç noktalarda örneklendirilen besiyerleridir.

Besiyerinin bileşimi ister basit, ister kompleks olsun, bileşimden hazırlamak yerine dehidre hazır besiyeri kullanmanın 3 önemli üstünlüğü vardır:

- Her maddeyi ayrı ayrı tartmak yerine hazır besiyerinden 1 kez tartım yapmak çok daha kolay ve güvenilir bir uygulamadır.

- Özellikle miligram düzeyinde tartım yapılacak besiyeri bileşenlerinde hata yapma olasılığı vardır. Oysa bu maddeler hazır dehidre besiyerleri içinde homojen dağıtıldıklarından tartımlar çok daha güvenilir olur.

-Hazır besiyeri kullanmanın en önemli üstünlüğü -hatta bir diğer deyiş ile zorunluluğu- bileşenlerin performansı ile ilgilidir. Aynı ayrı tartılan bileşenlerden birisinin dahi özelliğini yitirmiş olması, o madde ile hazırlanan besiyerinin performansında kayda değer ölçüde kayba, hatta o besiyerinin tümüyle kullanılamaz hale gelmesine yol açar.

Besiyerlerinin bileşimine çok genel bir ortalama olarak 5–7 madde girer. Laboratuvarında bulunabilen bu bileşenlerin tümünün yeterli performans göstermesi beklenmemelidir. Özellikle organik bileşenlerin depolanma ömürleri anorganik maddelere göre çok daha kısadır. Buna göre bileşenlerin bir ya da bir kısmının performansında kayda değer düşme olmuş ise, bu düşüş doğrudan besiyeri performansına yansıyacaktır.

03.03.01. Formülden Hazırlama

Yukarıda çeşitli örnekleri verildiği gibi besiyeri bileşenlerinin ayrı ayrı tartılarak besiyerinin hazırlanma şeklidir. Genel olarak önerilen bir yöntem olmamakla birlikte, aşağıda verilen 2 koşulda besiyerinin bileşim üzerinden hazırlanması bir anlamda zorunludur:

-Her besiyerinin ticari olarak pazarlanan dehidre hazır besiyeri formu yoktur. Özellikle yeni geliştirilen besiyerleri -güvenilirliklerini kanıtlayana ve/veya yeterli pazarlama potansiyeline ulaşmaya kadar- besiyeri üreticisi firmalar tarafından dehidre halde hazırlanmamaktadır.

-Özellikle çeşitli bilimsel araştırmalarda yeni ve modifiye besiyeri çalışmaları için bileşenlerin ayrı ayrı kullanılması gerekmektedir.

Besiyerinin bileşimden hazırlanması gerektiğinde, bazen bileşime giren malzemelerin tümü formülde verildiği şekli ile laboratuvarında bulunmaz.

Örneğin, laktik asit bakterileri için kullanılan MRS Agar besiyerinin formülünde $MgSO_4$ 0,2 g/L olarak verilmektedir. Laboratuvarın kimyasal madde deposunda $MgSO_4$ yok, ama bunun yerine $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ varsa molekül ağırlığı üzerinden hesaplanarak kullanılabilir.

$MgSO_4$ 'ın molekül ağırlığı Mg: 24; S: 32; O: 16 (4 atom oksijen olduğuna göre $4 \times 16 = 64$) olmak üzere 120 mol gramdır. $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ 'da ise, ilave 6 su olduğuna göre molekül ağırlığı $120 + 108 = 228$ mol gram olarak hesaplanır.

İkinci aşamada basit orantı kurulur:

Mol ağırlığı 120 olan maddeden	0,20 gram gerekiyorsa
Mol ağırlığı 228 olan maddeden	0,38 gram gerekir.

Buna göre, 0,2 g/L $MgSO_4$ yerine 0,38 g/L $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ kullanılması aynı anlama gelmektedir. Aradaki fark $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ 'da bulunan sudan kaynaklanmaktadır.

03.03.02. Dehidre Besiyerlerinden Hazırlama

Besiyeri üreticisi firmalar tarafından üretilmiş dehidre besiyerleri kullanımının tartışılmaz bir üstünlüğü vardır.

Burada dikkat edilmesi gereken konu kalitedir. Pazarda düşük fiyatla satılan, bu nedenle cazip gösterilen, ancak kayda değer düzeyde performans eksikliği olan markaların bulunduğu da dikkate alınmalıdır.

03.03.03. Kullanıma Hazır Besiyerleri

1950'li yıllardan bu yana, bazı besiyeri üreticisi firmalar tarafından kullanıma hazır halde besiyerleri üretilmekte ve pazarlanmaktadır. Bunlar, vida kapaklı tüp ve şişelerde sıvı ve katı besiyerleri ile oldukça yaygın olarak Petri kutularında agarlı besiyerleridir. Genellikle, plastik Petri kutularında hazırlanan agarlı besiyerleri sadece tek çeşit besiyerini içerebileceği gibi, iki ya da üçe bölünmüş kutularda farklı besiyerleri de bulunabilmektedir. Bunlar içinde en yaygın kullanılanlardan biri Kanlı (Blood) Agardır. Bu besiyerinin neden hazır halde sağlanması gerektiği ve bu uygulamanın neden daha ucuz olduğu 10. Bölümde anlatılmıştır.

Yüzey kontaminasyonlarının belirlenmesi ve/veya kültürlerin taşınmasında kullanılan hazır agar slaytları da bulunmaktadır. 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.

Mikrobiyolojide, başta sayım ve var/yok testlerinde kullanılmak üzere çeşitli amaçlarla membran filtreler kullanılmaktadır. Örneğin, içme ve kullanma sularında *E. coli* aranması ya da sayılması için en yaygın uygulamalardan biri, su örneğinin membran filtreden geçirilip, bu filtrenin uygun bir katı besiyerine yerleştirilerek inkübasyona bırakılmasıdır. Burada, amaca uygun bir şekilde hazırlanmış ve Petri kutusuna dökülmüş bir katı besiyeri kullanılabileceği gibi, bu amaçla hazırlanmış özel besiyerleri de kullanılabilir. Bu tip besiyerleri uygun bir pede emdirilmiş, kurutulmuş ve plastik bir kutu içine konularak sterilize edilmiş bir şekilde pazarlanmaktadır. Kullanıcı için yapılacak tek işlem pedi steril su ile ıslatmak ve filtreyi bu pede yerleştirerek inkübasyona bırakmaktır.

Kullanıma hazır besiyerleri içinde bir diğer yaklaşım gama radyasyonu ile sterilize edilmiş dehidre besiyerleridir. Bunlardan ışınlanmış Tryptic Soy Broth, genellikle serum gibi steril olması gereken tıbbi malzemede sterilite testi yapmak için kullanılır. Serum içine steril koşullarda ilave edilen besiyeri kolaylıkla erir ve inkübasyon sonunda bulanıklık oluşursa serumun steril olmadığı anlaşılır. Bu testin mantığı, steril dehidre besiyerini, steril kap içinde, steril olması gereken sıvı ile çözerek bir çeşit besiyeri hazırlamaktır. Membran filtrasyon sisteminde bazı sporlar ile *Hydrogenophaga pseudoflava* (Syn. *Pseudomonas pseudoflava*) gibi küçük bakteriler ve *Acholeplasma laidlawii* gibi mikoplazmalar 0,1µ porlu membran filtrelerden geçebilir ve bu nedenle membran filtre tekniği ile bu gibi bakterilerin varlığı fark edilemez. Işınlanmış Tryptic Soy Broth yönteminde ise böyle bir olumsuzluk yoktur. Aynı yaklaşım ile, sularda koliform grup bakteri ve *E. coli* ile enterokok analizinde kullanılan ReadyCult sistemi sırası ile 12.03. ve 22.01. Bölümlerde verilmiştir.

03.03.04. Özel Uygulamalar

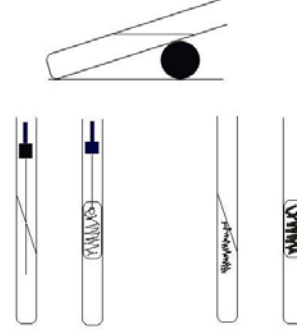
Standart bir gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında kullanılan besiyerlerinin tamamına yakını tüpte ya da erlende (balon, dilüsyon şişesi, vb.) broth formunda ve Petri kutularında agar formunda hazırlanır. Bunlara ilaveten, aşağıda verilen kullanım amaçlarına yönelik olarak özel hazırlama şekilleri de bulunmaktadır.

Çift kuvvetli broth: EMS ile yapılan sayımda (bakınız; 07.02.01. Bölüm) 10 mL besiyerine 10 mL örnek aktarıldığında, besiyerinin konsantrasyonu yarı yarıya azalır ve burada sağlıklı bir mikrobiyel gelişme olmaz. Bunun önüne geçmek için, 10 mL gıda örneği (homojenizat) ilave edilecek tüplerde, başlangıçta bu besiyerleri çift kuvvette (2 misli konsantrasyonda)

hazırlanır. Örneğin, koliform grup bakteri analizinde kullanılan LST Broth besiyeri normal olarak 35,5 g/L konsantrasyonda hazırlandığında, 10 mL tüp içinde 0,355 g madde vardır. Çift kuvvetle hazırlanması gerektiğinde, başlangıçta 71 g/L (0,71 g/10 mL) olarak hazırlanır, bunun üzerine 10 mL örnek konulduğunda LST konsantrasyonu 0,71 g/10 mL'den 0,355 g/10 mL standart değere iner. Bu tip ekimler için yeteri büyüklükte tüp kullanılmalıdır.

Tüpte yatık agar: Tanımlama, kültür koleksiyonu vb. pek çok amaçlarla kullanılan agarlı besiyeridir. Amaç, tüpte geniş bir yüzey elde etmektir. Standart deney tüplerine 7 mL olacak şekilde tam olarak eritilmiş agarlı besiyeri dağıtılır ve otoklavlanır. Otoklav sonrasında besiyeri henüz sıvı iken tüpler bir çubuk üzerine yatırılarak katılaşması sağlanır. Bu aşamada dikkat edilmesi gereken husus, tüplerin dip kısımlarının yaklaşık 2,5 cm derinliğinde olmasıdır. *Salmonella* spp. analizinde kullanılan Triple Sugar Iron Agar en tipik örnektir.

Şekil 02. Yatık Agar Hazırlanması



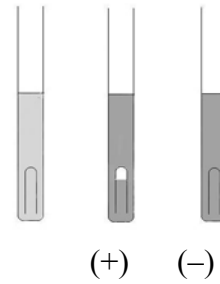
Roux Şişesi: Genel olarak, çok miktarda mikroorganizma kültürü elde etmek amacı ile kullanılır. Yüzey alanı 250 cm² kadardır. Buna göre 100 mL kadar agarlı besiyeri ile birlikte sterilize edilir. Otoklav sonrasında düzgün bir yere yatırılarak agarın donması sağlanır. Geniş ağzından sürme (svap) çubuğu yardımı ile yoğun bir inokülasyon yapılabilir. İnkübasyon sonrası yıkama ile kültür elde edilir. Bu işlem, hasat (harvesting) olarak da adlandırılır.

Şekil 03. Roux Şişesi



Durham tüpü olan besiyerleri: Koliform grup bakterilerin analizinde laktozdan gaz oluşumu tipik bir reaksiyondur. Besiyerinde gaz çıkışı, standart tüpün içine ters olarak yerleştirilen ve Durham tüpü olarak adlandırılan küçük tüplerde gaz birikimiyle anlaşılır. Besiyeri hazırlanırken, standart tüpün içine önce Durham tüpünün atılması, üzerine besiyeri ilavesi ile sterilizasyon öncesinde daha az hava kalması sağlanır. Standart otoklavlamada tüpte kalan hava çıkar.

Şekil 04. Durham Tüpü



Çift Kat Ekim: Koliform grup bakteri ekiminde yaygın olarak uygulanır. Yayma ya da dökme yöntemiyle standart ekimde; dökme yönteminde besiyerinin tam jelleşmesinden sonra, yayma yönteminde ise besiyerinin yayılan kültürü tam emmesi için 10 dakika beklendikten sonra üzerine 4–5 mL kadar ikinci kat besiyeri dökülür. Bu uygulamada genellikle aynı besiyeri kullanılmakla beraber, özel çalışmalar amacıyla farklı bir besiyeri de kullanılabilir. Temel amaç, kısmi bir mikroaerofil ortam yaratmaktır. Bu amaçla toplam bakteri sayımında da çift kat ekim yapılabilir. Başta basiller olmak üzere aerobik bakteriler bu ortamda yine gelişir, ancak yayılıcı koloni oluşturamazlar. Eğer toplam bakteri analizinde çift kat ekim yapıldı ise analiz raporunda bu durum belirtilmelidir.

03.04. Besiyeri Bileşimine Giren Maddeler

Besiyerleri hazırlanırken amaç, hedef organizmanın gelişmesini optimize edecek konsantrasyonlarda gerekli besin maddelerinin dengelenmiş karışımını sağlamaktır. Bütün besin öğelerini oldukça fazla miktarda sağlayarak, olabildiğince zengin bir besiyeri yapma yaklaşımı ile optimal besiyeri elde edilemez.

Örneğin, aminoasitlerin dengelenmemesi ve bir amino asidin fazla olması, ilişkili bir amino asidin gelişme için kullanımını baskılayabilir. Glikoz dahil olmak üzere tüm besin öğeleri, konsantrasyonları arttıkça baskılayıcı etki yaparlar.

Besiyeri bileşimine giren maddeler gelişme açısından; a)Gelişme için gerekli olanlar, b)İnhibitörler, c)Diğerleri olmak üzere 3 gruba ayrılabilir. Gelişme için gerekli olan maddeler doğrudan mikroorganizmaların beslenme şekilleri ile ilgilidir ve besiyeri içinde bir anlamda zorunlu olarak bulunur.

İnhibitörler ise gelişmesi istenmeyen mikroorganizmalar için gerektiğinde selektif besiyerlerine ilave edilir. Bunların dışında yine gerektiğinde indikatörler, jelleştiriciler vb. pek çok madde de besiyeri bileşimine girer.

03.04.01. Su

Besiyeri hazırlamada kullanılan suyun damıtma veya deiyonizasyon ile taze hazırlanmış olması, başta bakır olmak üzere toksik metalleri içermemesi gerekir. İyon değiştirici reçineden geçirilerek elde edilen deiyonize (demineralize) su kullanıldığında bunun içinde yüksek sayıda mikroorganizma bulunabileceği dikkate alınmalıdır. Damıtık (distile) su için en ideali, cam sistemlerden elde edilen suyun kullanılmasıdır.

Gerek deiyonize gerek damıtık su elde edilmesinde saf su sisteminin ve benzer şekilde saf suyun depolandığı kapların belirli aralıklarla temizlenmesi gerekir. Bu kaplarda zamanla alg gelişimi olabilir ve alg metabolitleri bazı duyarlı mikroorganizmaların gelişimini baskılayabilir.

Taze hazırlanmış saf suyun pH'sı 6,5–7,5 arasında olmalıdır. Depolanmış saf su atmosferik karbondioksitin absorbe edilmesi sonucu asit pH gösterir. Eğer saf suyun pH'sı 5,5'in altında ise, bu su ısıtılarak CO₂ uzaklaştırılır ve pH yeniden kontrol edilir. Eğer pH hala düşük ise, NaOH ile nötral pH'ya getirilir ve saf su sistemi kontrol edilir. Besiyeri hazırlamada kullanılan su asidik özellik gösteriyorsa ve besiyeri bileşimde bikarbonat tamponlar varsa, bunları etkileyerek hazırlanan besiyerinde bir takım olumsuzluklara yol açabilir.

Özellikle klinik ve veteriner mikrobiyolojiyi ilgilendiren bazı bakteriler, besiyeri hazırlamada kullanılan suyun içindeki safsızlıklara karşı çok duyarlıdır. Bu gibi bakterilerle çalışıldığında suyun çok özenle hazırlanması gerekir. Tersine olarak, gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren ve günlük (rutin) olarak analizleri yapılan mikroorganizmalar bu tip maddelere genellikle duyarlı değildir. Dolayısıyla bu analizler için, doğal kaynak suları besiyeri hazırlanması amacıyla kullanılabilir.

Suyun çok kireçli olduğu bölgelerde damıtık su elde edilmesi bazen sorun olmaktadır. Bu gibi yerlerde besiyeri hazırlamada doğal kaynak sularının kullanılması mümkündür. Ancak, doğal kaynak suları bu amaçla kullanılıyor ise belirli aralıklarla (örneğin üç ayda bir) kullanılan

suyun -ya da bu su kullanılarak hazırlanmış besiyeri örneklerinin- bir dış laboratuvara gönderilerek standart şekilde hazırlanmış besiyerine karşı performans denemesi yapılmalıdır. Bu deneme basit olarak, aynı gıda örneğinden iki farklı besiyerine ekim ve sayım sonuçlarının karşılaştırılması şeklindedir. Akü suyu, ütü suyu gibi adlarla satılan suların kaynağı ve elde ediliş şekli bilinmedikçe kullanılmalarından olabildiğince kaçınılmalıdır.

Kaynağı ne olursa olsun, besiyeri hazırlamada kullanılan suyun besin maddelerini ya da inhibe edici maddeleri içermemesi, en az 300.000 Wcm direnç ve en fazla 10 mS (microSiemens) kondüktivite (iletkenlik) göstermesi, 25 °C'da rezistans 0,5 megohm/cm ya da kondüktans 2,0 umhos/cm'den daha az olması gerekir.

Burada değinilen fiziksel değerler farklı kaynaklardan elde edilmiştir. Buna göre, kullanılacak su, bu kriterlerden en az birisini sağlamalıdır. Birden fazla kriter test edildiğinde bunlardan birini sağlıyor, ancak diğer(ler)ini sağlamıyorsa bunun nedeni araştırılmalıdır.

Besiyeri hazırlamada kullanılan suda ayda bir olarak yapılacak ölçümlerde toplam bakteri sayısı 1.000 kob/mL'den, eğer su depolanmış ise 10.000 kob/mL'den az olmalıdır. Benzer şekilde toplam klor kalıntısı negatif ya da kullanılan testin belirleme sınırından daha az olmalıdır. Yılda bir kere toplam metaller (Pb, Cd, Cr, Cu, Ni ve Zn) için yapılan analizde, her bir metal 0,05 mg/L'yi ve metaller toplamı 0,1 mg/L'yi geçmemelidir. Bu kriterler sağlanamıyor ise, düzeltici ve tekrarını önleyici faaliyet (eylem) yapılmalı ve kayda geçilmelidir.

03.04.02. Peptonlar

Pepton terimi, proteinlerin hidrolizi ile elde edilen ürünlere verilen genel isimdir. Bu terim ilk kez R. Koch'un çalışma arkadaşlarından Nägeli tarafından 1880 yılında kullanılmıştır. Nägeli, kemoorganotrof mikroorganizmaların kısmen parçalanmış (hazmedilmiş, sindirilmiş) protein içeren besiyerinde iyi geliştiklerini açıklayan ilk bilim adamıdır.

Yaşayan tüm hücrelerde olduğu gibi mikroorganizmalar da azot, karbon, tuzlar ve diğer besin maddelerine gereksinim duyarlar. İstisnalar dışında, mikroorganizma gruplarının oldukça büyük bir bölümü, proteinleri azot kaynağı olarak kolaylıkla kullanamaz. Bu nedenle azotlu bileşikler, çok daha kolay kullanabildikleri protein hidrolizatlarından sağlar.

Peptonlar sadece azot değil, karbon kaynağı olarak da mikroorganizmalar tarafından kullanılır. Bunun yanında, peptonların bileşiminde bulunan bazı aminoasitler ve vitaminler de bazı mikroorganizmalar için gelişme faktörü olarak oldukça önemli işlev görür.

Proteinler; kuvvetli asitler ve kuvvetli alkaliler ile ya da enzimatik olarak temel bileşenleri olan peptit ve aminoasitlere ayrışır. Bu amaçla en çok kullanılan proteolitik enzimler papain, pepsin ve pankreatindir.

Peptonlar, birçok ticari firma tarafından çeşitli hayvansal dokulardan, süttten ve soyadan farklı yöntemlerle elde edilir ve farklı ticari isimlerle pazarlanır ve/veya dehidre besiyerleri içine katılır.

Ham madde ve üretim yöntemi farklılığı doğal olarak peptonların bileşimlerinde de farklılıklar oluşturur. Dolayısı ile değişik amaçlar için farklı peptonlar kullanılır.

Proteinler, aminoasit zincirlerinden oluşmuş makro moleküllerdir. Aminoasitler birbirlerine peptit bağları ile bağlanırken 1 molekül su açığa çıkar. Peptit bağlarının kuvvetli asitler

kullanılarak, yüksek basınç ve yüksek sıcaklık altında tam olarak kırılması, böylece proteinin tümüyle kendisini oluşturan aminoasitlere dönüştürülmesi mümkün değildir. Bu işlem sırasında bazı aminoasitler (örneğin triptofan) tümüyle kaybolur, sistin, serin ve treonin zarar görürken, asparagin ve glutamin etkilenmez. Benzer şekilde, pepton bünyesindeki vitaminler ciddi ölçüde zarar görür. Bu işlem sırasında karbohidratlar ile aminoasitler arasında meydana gelen bir seri reaksiyon sonunda oluşan bazı kimyasallar, mikroorganizma gelişimi için toksik olur. Bu nedenle, kuvvetli asitler ile peptonların elde edilmesinde peptit bağlarının tümünden değil, mikroorganizma için yeterli azot kaynağı sağlayacak düzeyde -sadece bir kısmının- kırılması hedef alınır.

Proteinlerin enzimatik olarak parçalanması -asit hidrolizine göre- pepton bileşimine daha az zarar verir. Kullanılan enzimler peptit bağlarına özel olup, sadece bu bağlarda parçalanmaya neden olur. Dolayısıyla, elde edilen peptonda kullanılan enzimin çeşidine göre protein parçalanma ürünü olan polipeptitler bulunur. Teorik olarak farklı enzimler kullanılarak, proteini oluşturan tüm aminoasitlere kadar parçalanma mümkün ise de bunun pratik bir önemi yoktur ve besiyeri bileşiminde kullanılacak proteinler sadece -amaca uygun şekilde- belirli düzeyde parçalanarak peptonlar elde edilir.

Günümüzde ticari olarak üretilen ve pazarlanan peptonların hemen hemen tümü enzimatik olarak elde edilmektedir. Sadece kazein, asidik reaksiyon ile hidrolize edilir. Bazik olarak elde edilen peptonun ticari üretimi yoktur. Son zamanlarda BSE tehlikesine karşı bazı ticari firmalar hayvansal dokulardan elde edilen peptonların BSE içermediğine ilişkin sertifika vermektedir.

Mikrobiyolojinin değişik alanlarında farklı peptonlar kullanılır. Besiyerlerinin bileşiminde farklı peptonlar kullanılabilirken, aşı üretimi için bitki kökenli peptonlar uygun değildir. Buna karşın, bitkisel peptonlar enzim üretiminde başarılı bir şekilde kullanılabilir.

Besiyeri formülünden hazırlanmak zorunda ise, formülde verilen peptonun kullanılması gereklidir.

Peptonlar mikrobiyolojide tek başlarına besiyeri olarak kullanılabilen ender maddeler arasındadır. Pek çok bakteri, bileşimi sadece %1 pepton olan besiyerinde kolaylıkla geliştirilebilir.

Aksine bir belirtme yoksa, mikrobiyolojide "pepton" denildiğinde, pankreatin enzimi ile hidrolize edilmiş et peptonu (Peptone from meat, pancreatic) anlaşılır. Bu pepton ticari firmalar tarafından farklı isimlerle anılır.

03.04.03. Maya Ekstraktı

Maya ekstraktı (maya özütü, yeast extract), proteolitik olarak otolize edilmiş (parçalanmış) bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) sulu ekstraksiyonu ile elde edilir. Özellikle, yüksek B kompleks vitamini konsantrasyonu sayesinde çoğu mikroorganizmanın iyi bir şekilde gelişmesini sağlar.

Bileşimindeki aminoasitler, peptitler, vitaminler, karbohidratlar ve mineraller nedeniyle pek çok mikrobiyolojik çalışmada besiyeri katkısı olarak kullanılır. Karbohidrat içermesi nedeniyle karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılmaz.

Maya ekstraktı üretiminde otoliz düzeyi sürekli olarak kontrol edilir ve otolitik aktivite ısıtma ile durdurulur. Böylelikle B kompleks vitaminleri korunmuş olur.

03.04.04. Et Ekstraktı

Et ekstraktı (et özütü, meat extract), genellikle yağı ve tendonları ayrılmış, ekstraksiyon öncesi hafifçe hidrolize edilmiş etten elde edilir. Karbohidrat içermez. Bu nedenle karbohidratlardan asit oluşturma testlerinde kullanılabilir. Çeşitli besiyerlerinde et peptonlarının yerini alabilir.

03.04.05. Malt Ekstraktı

Malt ekstraktı (malt özütü, malt extract), biralık arpanın çimlendirilmesi ve kavrulması ile elde edilen malttan üretilir. Başta maltoz olmak üzere, çeşitli karbohidratların yüksek konsantrasyonuna bağlı olarak maya ve küflerin geliştirilmesi için kullanılır. %1,7 konsantrasyondaki çözeltisi maya ve küflerin geliştirilmesi için uygun bir besiyeridir. Gerekirse bu çözelti çeşitli peptonlar ile desteklenebilir ve/veya asitlendirilebilir ve/veya agar ve pepton eklenerek Malt Extract Agar şeklinde katı besiyeri olarak kullanılabilir.

03.04.06. Beyin ve Kalp Ekstraktı

Beyin ekstraktı (brain extract) ve kalp ekstraktı (heart extract) streptokoklar, pneumokoklar, meningokoklar, gonokoklar vb. gibi zor gelişen (fastidious) patojen bakterilerin geliştirilmesi için Brain Heart Broth ve Brain Heart Infusion gibi isimlerle anılan besiyerlerinin bileşimine katılır. Ayrıca, çeşitli toksin testleri için patojenlerin bu besiyerinde geliştirilmesi önerilmektedir.

03.04.07. Agar

Besiyerlerinin katı hale getirilmesi için en çok kullanılan jelleştiricidir. Çoğu kez diğer agarlı besiyerleri ile karıştırılmaması için "agar agar" olarak anılır. Agar bir poligalaktozid olup, "Agarophytes" olarak adlandırılan bazı kırmızı deniz yosunlarından (*Gelidium*, *Eucheuma*, *Gracilaria*, *Acanthopeltis*, *Ahnfeltia*, *Pterocladia* türleri) elde edilir. Bazı hidroksil grupları sülfürik asit ile esterleştirilmiştir. Mikrobiyolojik kullanım amacıyla en iyi kalitedeki agar *Gelidium* türünden elde edilir. Gıda sanayisinde de jelleştirici olarak kullanılan agar, yeteri kadar saf olmadığı için mikrobiyolojik analizlerde kullanılamaz.

Agarın katılaştırma (jelleştirme) özelliğini bileşimindeki D-galakton sağlar. Bileşiminde ayrıca inorganik tuzlar, çok az miktarda protein benzeri maddeler ve eser miktarda yağ vardır. Mikrobiyolojide kullanılan agarlar özel olarak saflaştırılarak antimikrobiyel maddeler ve pigmentlerden arındırılır. Bileşiminde bulunan agaroz ve agaropektin adlı iki polisakkarit, agarın etkisini belirler. Agaroz, agarın yüksek jelleştirme özelliğinden sorumlu iken, agaropektin viskoz özellik verir. Agardaki agaroz/agaropektin oranı ham maddeye göre değişir. Agardaki agaroz oranı en çok %75'e kadar çıkabilir. Özel çalışmalarda saf agaroz kullanılır.

Agar, besiyeri bileşimine sadece jelleştirici olarak katılır. Uzun ve dallanmış zincir yapısı nedeniyle -bir kaç istisna dışında- mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılamaz.

Yaklaşık olarak 85–90 °C'da erir, 40–45 °C'da jelleşir. Gerek erime gerek jelleşme sıcaklığına besiyeri pH'sı etkilidir. Besiyeri pH'sını etkilemez, ancak düşük pH'dan olumsuz şekilde etkilenir. 6'dan daha düşük pH'ya sahip besiyerlerinde genel olarak daha fazla agar kullanılır. pH'sı 5 ve daha altında olacak ise, bu besiyeri nötral pH'da otoklavlanır ve 45 °C'a soğutulup, gerekli miktar asit ilave edilir. Bu şekilde hazırlanmış besiyerleri tekrar eritilirse agar jelleşme özelliğini tümüyle yitirir.

Agarın jelleşme sıcaklığı literatürde 32–39 °C olarak verilmektedir. Döküm sırasında Petri kutularının oda sıcaklığında (20 °C) olduğu ve dolayısıyla Petri kutusu ile besiyeri arasında ısı değişimi olacağı dikkate alınarak döküm sıcaklığının 40–45 °C kadar olması gerekir.

Besiyerine amaca göre %0,05–2 gibi geniş bir sınırdan ilave edilebilir. Düşük agar konsantrasyonları (%0,05–0,3) genellikle hareketliliğin belirlenmesi, mikroaerofil karakterdeki bakterilerin geliştirilmesi gibi özel amaçlarla kullanılır. Standart kullanım konsantrasyonu %1–1,5'tir. Yüksek konsantrasyonlar ise yüksek asitli besiyerlerinde agarın jelleşme özelliğini koruması amacıyla kullanılır. Yukarıda da belirtildiği gibi agar yüksek sıcaklıkta yüksek asitlikten olumsuz etkilenir. Daha yüksek agar konsantrasyonu bu olumsuzluğu gidermek içindir.

03.04.08. Karbohidratlar

Bazı besiyerlerinin bileşimine bakteriler için enerji ve karbon kaynağı olarak katılan karbohidratların bir başka kullanım şekli karbohidratlardan asit oluşturmaya dayalı identifikasyon testleridir (bakınız; 37.07. Bölüm).

Besiyeri bileşiminde karbon kaynağı olarak en çok kullanılan karbohidratlar glikoz, laktoz ve sakkarozdur. Bunlardan glikoz pek çok bakteri tarafından kullanılabilirdiği için, daha çok genel besiyeri bileşimlerinde yer alır.

Adonitol, arabinoz, dekstroza (glikoz), dulsitol, galaktoz, inositol, inulin, laktoz, levuloz (früktoz), maltoz, mannitol, mannoz, melezitoz, melibiyoz, nişasta, rafinoz, ramnoz, sakkaroz (sukroz), salisin, sellobiyoz, selüloz, sorbitol, trehaloz ve ksiloz çeşitli karbohidrat testlerinde kullanılmak üzere çoğunlukla sıvı ya da katı besiyerlerine katılabilmektedir.

Glikoz, laktoz sakkaroz, mannitol gibi bazı karbohidratlar çeşitli katı besiyerlerine yine karbohidratlardan asit oluşumunun izlenmesi ve buna göre koloninin ön identifikasyonu amacı ile katılır.

Koliform grubu bakterilerin geliştirileceği besiyerlerinin hemen hepsinde karbon kaynağı olarak laktoz kullanılır. Koliformların analizi için hazırlanmış sıvı besiyerlerinde laktozdan gaz oluşumu bu grup için belirleyicidir. Gaz çıkışı basit olarak Durham tüpü ile belirlenir (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

Nişasta kullanımı (hidrolizi) bazı bakteriler için tipik olduğundan çeşitli özel besiyerlerinin bileşimine katılır.

Genel olarak karbohidratların çözelti halinde filtrasyon ile sterilize edilmesi önerilir. Çeşitli besiyerlerinin bileşimine katılan glikoz, laktoz, sakkaroz gibi şekerler besiyeri ile birlikte otoklavda da sterilize edilebilir.

03.04.09. Tuz

Aksine bir belirtme yoksa "tuz" denilince sodyum klorür anlaşılır. Çoğu besiyerinin bileşimine izotonik bir ortam oluşturmak için katılır. %0,85 NaCl, serum fizyolojik adı ile seyreltme çözeltisi olarak yaygın olarak kullanılır. Klinik birimlerde bu ad ile bilinen çözelti de budur ve insan vücudu için de aynı şekilde izotonik denge oluşturur.

Tuza dayanıklı (halotolerant) ve tuz seven (halofil) bakterilerin selektif izolasyonu için yüksek konsantrasyonlarda özel besiyerlerinin bileşimine katılır.

03.04.10. Tampon Maddeler

Mikroorganizmalar genel olarak nötr ve nötre yakın pH'larda iyi gelişir. Bazı mikroorganizmalar alkali pH'ları yeğlerken (örneğin *Rhizobium* bakterileri), bazıları (örneğin mayalar, küfler, asidofilik bakteriler) asidik ortamları severler.

Bir besiyerinde elden geldiğince çok sayıda mikroorganizma geliştirilmesi isteniyorsa pH nötre yakın değerde olmalıdır. Tersine olarak geliştirilmesi istenen mikroorganizma yüksek asitliğe veya yüksek alkaliliğe dirençli ise, besiyeri pH'sı bu mikroorganizmanın gelişebileceği pH'ya ayarlanmalıdır.

Asitlik/alkalilik, besiyerlerine selektivite kazandırmak amacıyla, çok kolay ve dolayısıyla çok yaygın olarak kullanılan bir faktördür. Örneğin maya ve küflerin, asidofilik bakterilerin geliştirileceği ortamlarda pH düşürülerek pek çok bakterinin gelişmesi kayda değer ölçüde baskılanır.

Metabolizmaya bağlı olarak besiyeri pH'sında değişimler meydana gelir. Sadece pepton olan ortamda geliştirilen bakteriler pH'yı yükseltir. Buna karşın bileşiminde pepton yanında karbohidrat da olan besiyerinde karbohidrat tükenmediği sürece pH düşer. Bazı çalışmalarda inkübasyon sırasında pH'nın değişmesi, geliştirilmesi istenen mikroorganizmaya zarar vereceği için istenmez. pH değişiminin minimumda tutulması amacıyla besiyerine çeşitli tampon maddeler ilave edilir.

Büyük ölçekli endüstriyel üretimlerde pH stabilitesi tampon eklenerek değil, belirli pH aralığında tutmak üzere "pH-stat" denilen sistemlerle dışarıdan asit ya da baz ilavesi ile yapılır.

Tampon (buffer) olarak en çok kullanılan maddeler, fosfatlar (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , β gliserofosfat), karbonatlar, asetatlar ve sitratlardır. Basit olarak, Skim Milk besiyerine 1 g/10 mL kalsiyum karbonat ilavesi ile laktik asit bakterilerinin oluşturduğu asitlik kayda değer ölçüde tamponlanır.

Çizelge 01'de 4,8–8,0 arasında tampon çözelti hazırlamak için kullanılan tamponlar gösterilmiştir. Buna göre;

Çözelti "A": 0,067 M KH_2PO_4 (9,073 g/L KH_2PO_4)

Çözelti "B": 0,067 M Na_2HPO_4 (11,866 g/L Na_2HPO_4).

Örnek: pH'sı 5,90 olan tampon çözelti hazırlanmak isteniyorsa, çizelgeden 5,90'ın karşılığı olarak 9,80 mL bulunur. Bu miktar "B" çözeltisinin (Na_2HPO_4) üzerine 100 mL'ye

tamamlayacak şekilde 90,20 mL "A" çözeltisi (KH_2PO_4) eklenir. Besiyeri bileşimine giren maddeler tartılır, su yerine bu çözelti kullanıldığında besiyeri pH'sı 5,90'a tamponlanmış olur. Hazırlanan tampon çözeltisinin güvenilir olması için, "B" çözeltisi üzerine "A" çözeltisi ekleme işleminin pH metre kontrolü ile yapılması önerilir.

Çizelge 01. Tampon çözelti hazırlamak için "B" çözeltisinden alınacak miktar (mL)

pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"	pH	"B"
4,80	0,35	5,40	3,00	6,00	12,1	6,60	37,1	7,20	72,6	7,80	93,6
4,90	0,60	5,50	3,90	6,10	15,0	6,70	43,0	7,30	77,7	7,90	95,5
5,00	0,95	5,60	4,90	6,20	18,4	6,80	49,2	7,40	81,8	8,00	96,9
5,10	1,35	5,70	6,20	6,30	22,1	6,90	55,2	7,50	85,2		
5,20	1,80	5,80	7,90	6,40	26,4	7,00	61,2	7,60	88,5		
5,30	2,30	5,90	9,80	6,50	31,3	7,10	67,0	7,70	91,2		

* : Kaynak: www.kimyaevi.org Bu çizelge, 2. desimali de gösteren şekilde bu sitede vardır.

03.04.11. pH İndikatörleri

Mikrobiyel metabolizma sonunda bazı besiyeri bileşenlerinden çeşitli asit veya alkali ürünler meydana gelir. pH'daki değişme en kolay olarak pH indikatörleri ile belirlenir ve bunların renk değişimine bağlı reaksiyonlar o besiyerinde gelişen mikroorganizmalar için önemli göstergeler olur.

Aşağıda, besiyeri bileşimlerinde yaygın olarak kullanılan pH indikatörleri ve pH'ya bağlı renkler verilmiştir.

Çizelge 02. pH İndikatörleri ve Renk Değişim Sınırları

İndikatör	Asit pH / renk	Alkali pH / renk
Fenol blue	3,0 / sarı	4,9 / mavi
Fenol red	6,8 / sarı	8,4 / kırmızı
Bromocresol green	3,8 / sarı	5,4 / mavi
Bromocresol purple	5,2 / sarı	6,3 / menekşe
Bromothymol blue	6,0 / sarı	7,6 / mavi
Cresol red	7,2 / sarı	8,8 / kırmızı
Litmus	5,6 / kırmızı	8,3 / mavi
Metil red	4,4 / kırmızı	6,2 / sarı
Neutral red	6,8 / kırmızı	8,0 / sarı
Rosalic acid	6,8 / sarı	8,2 / kırmızı

Bunlara ek olarak kimyasal analizlerde kullanılan pek çok pH indikatörü bulunmakla birlikte, besiyeri bileşimine girenler sınırlıdır. İndikatör, öncelikle geliştirilmesi istenen mikroorganizmaya zarar vermemelidir. Ayrıca besiyerinde stabilite, hedef pH'larda kesin renk dönüşümü vb. özellikleri de olmalıdır.

03.04.12. Redoks İndikatörleri

En yaygın olarak kullanılan redoks indikatörü TTC (2,3,5 Triphenyl-tetrazolium chloride)'dir. Enterokokların selektif geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılır ve buna bağlı olarak besiyeri bileşimlerinde yer alır.

Enterokoklar TTC'yi indirgeyerek kırmızı renkli bir bileşiğe (formazon) dönüştürür. Bu şekilde besiyerinde oluşan kırmızı renkli kolonilerin enterokok olduğu anlaşılır.

Resazurin, yaygın olarak kullanılan bir diğer redoks indikatörüdür. Çiğ sütlerde metabolizmaya dayalı bir sayım yönteminde kullanılmasına karşın, sütte antibiyotik ya da gelişmeyi engelleyici bir madde bulunması halinde doğru sonuç alınamaz. Bu konuda 07.05. Bölümde ayrıntılı bilgi verilmiştir.

03.04.13. Diğer İndikatörler

Mikrobiyel metabolizmaya bağlı olarak bazı kimyasalların çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşturdukları belirli ürünlerin saptanması, bu besiyerlerinde gelişen mikroorganizmaların ön identifikasyonunda kullanılır. Bu tip reaksiyonlarda kullanılan indikatör örnekleri aşağıda verilmiştir.

-MUG (4-Methylumbelliferyl- β -Glucuronide): *E. coli* tanımında son yıllarda en yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir. *E. coli* 'deki β -D-Glucuronidase (MUGase) enzimi MUG'u uzun dalga boylu (366 nm) UV ile floresan ışığa veren bir bileşiğe (methylumbelliferone) parçalar. MUG hakkında 14. Bölümde ayrıntılı bilgi verilmiştir. Floresan ışığa, loş bir ortamda belirgin bir şekilde görülür.

-MUP (Methylumbelliferyl-phosphate): *Cl. perfringens* için karakteristik olan asit fosfataz enzimi MUP'u yine uzun dalga boylu UV ile floresan ışığa veren bir bileşiğe (methylumbelliferone) parçalar.

-Kan: Aksine bir uyarı yoksa besiyeri bileşimine giren "defibrine koyun kanı"dır. Hemoliz reaksiyonunun belirlenmesi için kullanılır. Hemoliz reaksiyonları 37.13. ve kan hakkında bilgi 40.06. Bölümde verilmiştir. Gıda mikrobiyolojisinde *Listeria* tanımlanmasında yaygın olarak kullanılır.

-Jelatin ve kazein: Bunlar, proteolitik bakterilerin belirlenmesi amacıyla besiyeri bünyesine katılır. Jelatin kullanılan yöntemde inkübasyon sonrası soğutulan besiyerinin katılaşmaması jelatinin hidrolize edildiğini gösterir. Kazein kullanılan yöntemde ise proteolitik bakteri kolonileri etrafında proteolize bağlı olarak berrak zonlar meydana gelir.

-Lesitin: Yumurta sarısı ve soya fasulyesinde bulunan lesitin, çeşitli bakterilerdeki lesitinaz enzim aktivitesi sonunda parçalanır ve lesitin katılmış katı besiyerinde koloni etrafında berrak zonlar görülür. Gıda mikrobiyolojisinde *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* besiyerlerinin bileşiminde yer alır.

-Kromojenik substratlar: Katı besiyerinde şeker ve pH indikatörüne bağlı selektif izolasyon sistemi yerine, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl, 5-bromo-6-chloro-3-indolyl ya da 6-chloro-3-indolyl gibi indolil türevleri olan kromojenik substratların kullanımı giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu sistemin prensibi, kromojenik substratın hedef bakteri ya da bakteri grubu için özgün olan enzim ile şeker ve kromojene parçalanması, oksijen varlığında sıvı besiyerinin ya da katı besiyerindeki koloninin renk değiştirmesidir. Klasik pH indikatöründen farklı olarak bu sistemde koloni etrafında zon oluşmaz, doğrudan koloni rengi değişir ve bu değişim pH'dan etkilenmez.

-Tributirin: Lipolitik aktivitenin belirlenmesi için kullanılır. Lipolitik bakteri kolonileri etrafında lipoliz sonunda berrak zonlar oluşur.

03.04.14. İnhibitörler

Selektif besiyeri bileşimlerinde, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini baskılayan çeşitli inhibitör maddeler kullanılır. İnhibitör maddelerin etki şekilleri çok farklıdır ve güçleri konsantrasyonlarına bağlıdır.

Bir yaklaşıma göre her maddenin yüksek konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi vardır. Örneğin, pek çok besiyerine ozmotik basınç sağlamak için katılan NaCl, yüksek konsantrasyonlarda pek çok mikroorganizmanın gelişimini engeller. Mikroorganizma için C kaynağı olarak kullanılan glikoz, %50 konsantrasyonda ozmofilik/ozmotolerant mayaların gelişimine izin verirken, diğer tüm bakteri, maya ve küflerin gelişimini inhibe eden bir etki gösterir.

Besiyerlerinde inhibitör olarak kullanılan maddeler genel ve selektif inhibitörler olarak kabaca ikiye ayrılabilir. Genel inhibitörler daha geniş bir spektrumda istenmeyen mikroorganizmaların gelişimini engellerken, selektif inhibitörler belirli mikroorganizmaların gelişimini etkiler.

İnhibitör etki, yukarıda belirtildiği gibi öncelikle konsantrasyona bağlıdır. Bunun dışında mikroorganizma cinsi ve hatta türü ile serotipi inhibisyonunda önemlidir. Örneğin, *E. coli* O157:H7 serotipi diğer *E. coli* 'ler ve refakatçi floraya oranla sefiksim–tellurit kombinasyonuna kayda değer ölçüde direnç gösterir. Belirli bir madde (örneğin tellurit), bazı bakteriler için inhibitör etki yaparken, bazı bakteriler telluriti metalik tellura indirger, sonuçta gri–siyah renkli koloni oluşumu stafilokok ve mikrokoklar için tipik bir morfolojik göstergedir.

İnhibitör olarak kullanılan maddenin görevi, istenmeyen mikroorganizmaların gelişmesini önlemek iken, gelişmesi istenen mikroorganizma için inhibitör etki yapmaması gerekir. Sadece belirli bir türün dışındaki tüm mikroorganizmaların gelişimini etkileyen inhibitör madde kullanımı oldukça enderdir. Örneğin, Cetrimide (cetyltrimethylammonium bromide) *Pseudomonas aeruginosa* dışında pek çok refakatçi florayı inhibe ettiği için *Pseudomonas* besiyerlerinin bileşiminde yer alır. Besiyerinde tek inhibitör yerine, birden fazla inhibitör de kullanılabilir.

İnhibitör olarak kullanılan tüm maddelerin hangi mikroorganizmalar için hangi konsantrasyonda ve hangi mekanizma ile inhibisyon etki sağladığını listelemek çok güçtür ve bu kitabın konu kapsamı dışındadır. Bununla beraber, en çok kullanılan inhibitörler hakkında aşağıda kısaca bilgi verilmiştir:

-Boyalar: Metakrom sarısı (metachrome yellow) *Proteus* kolonilerinin yayılmasını, eosin Y ve metilen mavisi (methylen blue) Gram pozitif bakterilerin gelişimini, malahit yeşili *Pseudomonas aeruginosa* dışındaki pek çok refakatçi floranın gelişimini baskılar.

-Sodyum azid: Gram negatif bakterilerin gelişimini engeller.

-Safr tuzları (Bile salts, Ox bile): Gram pozitif bakterilerin gelişimini engeller.

-Antibiyotikler: Genellikle bakterileri engellemek için geniş spektrumlu olarak küf geliştirme besiyerlerinde ya da refakatçi bakteriyel florayı inhibe etmek için dar spektrumlu olarak kullanılırlar. Örneğin, *Bacillus cereus* refakatçi floraya göre Polimiksin B sülfattan daha az etkilendiği için, bu bakteri ile ilgili çalışmalarda besiyeri bileşimine katılır. Benzer şekilde *E. coli* O157:H7 serotipi ile ilgili çalışmalarda sefiksim yaygın olarak kullanılır.

-Deoksiçolat (Deoxycholate): Gram pozitif bakterileri, kısmen koliformları ve zayıf olarak *Shigella* 'yı engeller. *Salmonella* besiyerlerinin çoğunda bulunur.

Ayrıca, selenit, tetrasyonat, bizmut, lauryl sülfat, yüksek konsantrasyonda asetat vb. maddeler çeşitli besiyerlerinde inhibitör madde olarak kullanılır.

03.04.15. Diğer Maddeler

Besiyerlerine çeşitli amaçlarla katılan ve yukarıdaki gruplara girmeyen daha pek çok madde vardır. Bunlardan bazıları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

-İnaktivatörler: Lesitin, sistein, Tween 20, Tween 80 gibi maddeler başta ilaç ve kozmetik endüstrisinde ham madde, ara ürün ve son ürünlerindeki çeşitli antimikrobiyel maddeleri inaktive ederek bu gibi ürünlerde bulunması olası mikroorganizmaların belirlenmesini sağlarlar.

-Stimulatörler (Gelişmeyi teşvik ediciler): Analiz edilen örnekte gelişmesi istenen mikroorganizmayı teşvik etmek amacıyla besiyeri bileşimine çeşitli maddeler katılabilir. Bunlar arasında vitaminler, glisin, piruvat, Tween 80 ve çeşitli elementler ilk akla gelenlerdir.

-Özel besin maddeleri: Besiyerleri içinde gelişmesi istenen mikroorganizmanın kullanabileceği, diğerleri için besin maddesi olarak yararlanılamayacak çeşitli maddeler yer alabilir. Bunlara en tipik örnek azot kaynağı olarak nitrat (NO₃) kullanılmasıdır. Özel besin maddeleri olarak nişasta ve glutamat da kullanabilir.

-İndirgeyiciler: Anaerobik ortam oluşturmak için çeşitli maddeler kullanılır. Bunlar arasında ilk akla gelen thioglycollate'tır.

-Doğal ortam oluşturanlar: Bazı bakterilerin gelişmesini teşvik etmek için onların doğal olarak bulundukları ortamlar besiyerine katılır. Örneğin, sütte bulunan bakteriler için süt tozu, deniz balıklarındaki bakteriler için deniz suyu besiyeri bileşiminde yer alır.

-İdentifikasyon amacıyla kullanılan bileşikler: Yukarıda ilgili bölümlerde identifikasyon amacıyla çeşitli kimyasalların besiyerleri bünyesinde yer aldığına değinilmiştir. Bunların dışında pek çok kimyasal madde çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere besiyerlerinin bünyesinde yer almaktadır. Üre, KCN, çeşitli aminoasitler (lisin, arjinin, ornithin vb.) identifikasyon amacı ile besiyeri bileşimine giren maddelerin tipik örnekleridir.

-Anorganikler: Mikroorganizmalar beslenme için çeşitli anorganik maddelere de gerek duyar. Çeşitli makro ve iz (mikro) elementler -başta peptonlar ve ekstraktlar olmak üzere- çeşitli besin maddelerinin bileşiminde yeterli miktarlarda bulunmakla birlikte, bu maddeler bazı besiyerlerine mikrobiyel gelişmenin sağlanması için katılmaktadır.

03.05. Besiyeri Çeşitleri

Besiyerleri, birbirinden farklı mantıklar altında gruplandırılabilir. Örneğin besiyerleri, fiziksel özelliklerine göre sıvı ve katı olmak üzere iki gruba ayrılırken, bir başka bakış açısı ile kaynağına göre bitkisel, hayvansal, sentetik, türev, karışık vb. şekillerde de sınıflandırılabilirler.

Besiyerlerinin kullanım amacına göre sınıflandırılması ise bir anlamda besiyeri bileşimleri ile doğrudan ilgilidir ve sınıflandırmada en yaygın olarak kullanılan uygulamadır. Kullanım amacına göre sınıflandırılmalarında da farklı yaklaşımlar vardır. Kimi araştırmacı ve kullanıcıya göre belirli bir grupta yer alan bir besiyeri, bir diğerlerine göre başka bir grupta sınıflandırılmaktadır. Aşağıda, "Kanlı Agar" besiyeri bu konuda tipik bir örnek verilmiştir.

Bu kitapta besiyerleri, kullanım amacına göre en çok kabul gören sınıflandırma şekline göre gruplandırılmıştır. Bu sınıflama şeklinde besiyerleri öncelikle "genel besiyerleri" ve "özel besiyerleri" olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Özel besiyerleri ise kendi içinde farklı alt gruplar altında değerlendirilir.

Bir yaklaşıma göre genel besiyerleri dışında kalan tüm besiyerleri "özel besiyerleri" grubuna girer.

03.05.01. Genel Besiyerleri

Herhangi bir inhibitör madde içermeyen, besin maddelerince yeterli veya zengin, herhangi bir mikroorganizma grubunun gelişmesini özel olarak desteklemeyen, bazı zor gelişenlerin de dahil olduğu çok sayıda mikroorganizmanın gelişmesini sağlayan besiyerleridir.

Bu grupta değerlendirilen besiyerleri genel olarak bakteriler için kullanılır. Bununla beraber, bu besiyerlerinde maya ve küfler de gelişebilir. Benzer şekilde *E. coli* fajları ile ilgili bir çalışmada genel nitelikli bir besiyeri kullanılabilir.

Genel besiyerleri başlıca toplam mezofil aerob bakteri sayımı, toplam psikrofil aerob bakteri sayımı, bozulma ya da hastalık etmeninin ön izolasyonu gibi amaçlar için kullanılır. Buna göre;

- Başta gıda maddeleri olmak üzere pek çok örnekte "toplam mezofil aerob bakteri sayısı" ile "toplam psikrofil aerob bakteri sayısı" tayinleri önemli kalite kriterleridir. Toplam mezofil aerob bakteri sayısından kasıt 28–30 °C'da (kimi kaynaklara ve amaca göre 35–37 °C'da) gelişebilen aerob bakterilerin sayısıdır.

- Günlük kullanımdaki bakterilerin aktifleştirilmesi, basit olarak korunması vb. amaçlarla da genel besiyerleri yaygın olarak kullanılır.

- Nedeni hakkında bir ön fikir edinilemeyen bozulma ya da hastalık etmeninin izolasyonu için de genel besiyeri kullanılır. Burada amaç, etmenin her ne olursa olsun öncelikle izole edilmesidir ve genel bir besiyeri kullanmak bir anlamda zorunludur. Etmenin, zor gelişen bir mikroorganizma olabileceği varsayımı ile bu tip izolasyonlarda bunların gelişebileceği zenginleştirilmiş besiyerleri kullanmak daha doğru olur.

Tüm bakterilerin geliştirilebileceği nitelikte bir besiyeri yoktur. Genel besiyerleri zor gelişen bakterilerin sadece bir bölümünün gelişmesini sağlayabilir. Klinik mikrobiyolojide farklı gruplardaki zor gelişen bakteriler için genel besiyerlerine başta kan olmak üzere katkılar ilave edilerek zenginleştirmeler yapılmaktadır. Gıda mikrobiyolojisinde bu tip uygulamalara genellikle gerek duyulmaz.

Genel besiyerleri, inkübasyon koşullarının değiştirilmesi ile psikrofillerin, termofillerin, mikroaerofillerin, aerotolerantların ve özel inkübasyon koşullarının sağlanması ile kısmen anaerobların geliştirilmesinde de kullanılır.

Gıda mikrobiyolojisi açısından ele alındığında, Plate Count Agar, Nutrient Agar ve Nutrient Broth, CASO (Tryptic Soy) Agar ve CASO (Tryptic Soy) Broth en sık kullanılan genel besiyerleri içinde yer alırlar.

Ayrıca, Brain–Heart (Infusion) Broth ve Brain–Heart Agar ile Tamponlanmış Peptonlu Su da genel besiyeri olarak değerlendirilir. Kanlı Agar ise, basit bileşimli bir genel besiyerine kan ilavesi ile hazırlanır.

Kanlı agar üzerinde bir diğer yaklaşım, besiyerlerinin kullanım amacına göre farklı gruplarda değerlendirebileceğini gösterir. Kanlı agar, klinik mikrobiyolojide standart genel besiyerlerinde gelişemeyen "zor gelişen" bakterilerin izolasyonu için kullanıldığında "zenginleştirilmiş genel besiyeri" olarak değerlendirilir. Gıda mikrobiyolojisinde elde edilen bir izolatin hemoliz reaksiyonunun belirlenmesi amacı ile kullanıldığında ise identifikasyon besiyeridir. Bir klinik örnekten sadece β hemoliz yapan bakterilerin izolasyonu için kullanılıyorsa bu kez diferansiyel besiyeri olarak değerlendirilir.

03.05.02. Selektif Besiyerleri

Selektif besiyerleri, karışık bir mikrobiyel floradan gelişmesi istenmeyenleri olabildiğince fazla baskılamak, ancak gelişmesi istenenler için -tersine olarak- minimum düzeyde olumsuz etki yapmak üzere formüle edilir. Bu amaçla genellikle çeşitli inhibitör maddeler kullanılır.

İnhibitörlerin konsantrasyonu ile baskılanması hedeflenen mikroorganizmaların cins ve türlerine göre değişmek üzere, selektif besiyerleri bunlar için zayıf, orta veya yüksek selektivite gösterir.

Yüksek selektivite gösteren besiyerleri, tek cins ya da türde mikroorganizma gelişmesine izin vereceğinden bu besiyerleri selektif izolasyon, selektif sayım ve hatta ön identifikasyon amaçları ile kullanılabilir.

Bununla birlikte, sadece bir tür mikroorganizmanın gelişebileceği selektivitede besiyeri örneği çok azdır. Bu gibi örnekler, gelişmesi istenen mikroorganizmanın belirli bir inhibitöre aşırı direnç göstermesi ile ilgilidir.

Osmofil mayalar ve halofil bakterilerin analizi için geliştirilen besiyerleri bunların tipik örnekleridir. Cetrinide Agar ise oldukça ender örneklerden birisidir.

Bir besiyerine selektivite kazandırılması sadece inhibitör madde ilavesi ile yapılmaz. Geliştirilmesi istenilen mikroorganizmanın kullanabileceği, ancak refakatçi mikroflora tarafından kullanılamayan besin maddeleri besiyerine karbon ve azot kaynağı olarak verilerek de selektivite sağlanabilir. Örneğin, gıda sanayisinde *Pseudomonas* aranması için kullanılan GSP Agar besiyerinde glutamat ve nişastadan başka besin maddesi yoktur.

Nişasta ve glutamat *Pseudomonas* ve *Aeromonas* türleri tarafından besin maddesi olarak kullanılırken, gıda maddeleri, atık sular ve gıda endüstrisi ekipmanında bu bakteriler ile birlikte bulunan refakatçi mikroflora bu maddeleri metabolize edemediği için gelişemez. Bu maddeleri çok kısıtlı olarak kullanabilenler ihmal edilebilecek kadar küçük koloni oluştururlar.

Selektif besiyeri hazırlamak ve kullanmak; inhibitörlerin gelişmesi istenen mikroorganizmaya az da olsa bir miktar zarar verebilmesi, inhibitör kullanımı ile refakatçi flora inhibisyonunun her zaman mümkün olmaması, bazı inhibitörlerin insan sağlığına zararlı olması vb. nedenlerle her zaman istenilen sonucu vermemektedir.

Mikrobiyolojide besiyeri olarak selektif ortamlar yerine diferansiyel besiyerlerinin hazırlanması ve kullanılması ile çoğu kez tatmin edici sonuçlar alınmaktadır.

03.05.03. Diferansiyel (Ayırt Edici, Fark Ettirici) Besiyerleri

Diferansiyel besiyerlerinde gelişmesi istenen mikroorganizma yanında diğer mikroorganizmalar da gelişebilir. Ancak başta koloni morfolojisi olmak üzere çeşitli farklılıklar ile hedef mikroorganizma diğerlerinden ayrılır. Bu tanımlamaya göre diferansiyel besiyerleri, zayıf ve orta güçte selektivite gösteren selektif besiyerlerinin modifikasyonu olarak nitelendirilebilir.

Ayırt edici koloni özelliği, çeşitli pH indikatörleri, boya maddeleri, indirgeyiciler, diğer indikatörler vb. maddelerin besiyerine ilavesi ile yapılır. Pek çok mikroorganizma belirli bir karbohidratı kullanırken asit oluşturur ve bu asitlik pH indikatörü ile kolayca belirlenebilir. Ayrıca mikroorganizmanın jelatinaz, lipaz, lesitinaz vb. enzim aktiviteleri besiyerinde oluşan berrak zonlar ile belirlenebilir.

Bu besiyerleri sıvı ya da katı olabilir. Katılardan koloni izolasyonu mümkündür ancak, sıvı besiyerinde sadece hedef mikroorganizmanın var/yok olduğu anlaşılır.

Örneğin, koliform grup bakteriler için laktozdan gaz oluşturulması tipik bir ayırt edici özelliktir ve gaz oluşumu Durham tüpleri kullanılarak belirlenir. Gaz görülen tüpte koliform grup bakteri olduğu kesindir. Ancak, diğer bazı bakteriler besiyerinde gaz oluşturmada gelişebilir (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

Diferansiyel besiyerinde gelişen mikroorganizmaların ayrımı koloni morfolojisi, enzimatik aktivitelerin belirlenmesi, gaz oluşumunun izlenmesi vb. çıplak gözle yapılabileceği gibi, floresansa dayalı olarak kolayca yapılabilmektedir.

Diferansiyel besiyerleri sadece selektif besiyerlerinin bir modifikasyonu değildir. Çeşitli genel besiyerlerine ilave edilen özel bazı katkıları bu besiyerlerine diferansiyel bir nitelik kazandırabilir.

Hemoliz reaksiyonları için kullanılan kanlı agar besiyeri bunun en tipik örneğidir. EC Broth'a MUG ilave edilerek hazırlanan bir besiyerinde, fekal koliform bakteriler yanında *E. coli* analizi de floresan testi ile yapılabilir.

Diferansiyel besiyerleri, amaca göre selektif izolasyon, selektif sayım ve ön identifikasyon amaçları ile kullanılmaktadır.

03.05.04. Zenginleştirme Besiyerleri

Karışık bir mikroflora içinde hedeflenen bir mikroorganizmayı geliştirmek, sayısını artırmak, hücrede olası hasarların giderilmesini sağlamak vb. amaçlarla kullanılan zenginleştirme besiyerleri, ön zenginleştirme besiyerleri ve selektif zenginleştirme besiyerleri olarak 2 alt gruba ayrılır.

Ön zenginleştirme besiyerleri genel olarak hasar görmüş (yaralanmış, stres altında) mikroorganizmaların aktivitelerini kazanmaları için kullanılan, bileşiminde inhibitör içermeyen, dolayısı ile aktivite kazanması istenen mikroorganizma yanında refakatçi mikrofloranın da gelişmesini sağlayan sıvı besiyerleridir. Buna göre "özel amaçla kullanılan genel besiyerleri" olarak da nitelendirilebilirler.

Bu besiyelerine en tipik örnek, gıdalarda *Salmonella* aranmasına yönelik çalışmaların ilk aşaması olan ön zenginleştirmede kullanılan "Tamponlanmış Peptonlu Su" besiyeridir. Bileşimi 10 g/L et peptonu, 5 g/L NaCl ve 10 g/L fosfat tampon olan bu besiyerinde *Salmonella* yanında ortamdaki diğer bakteriler de kolaylıkla ve iyi bir şekilde gelişebilir.

Selektif zenginleştirme besiyerleri ise özel amaçla kullanılan selektif sıvı besiyerleridir. Bunlara en tipik örnekler *Listeria* ve *Salmonella* aranmasında kullanılan besiyerleridir.

Selektif zenginleştirme aşamasında karışık kültür olarak bulunan bakterilerden gelişmesi istenmeyenler, çeşitli selektif inhibitörlerin kullanımı ile kısmen ya da tümüyle engellenir.

Selektif zenginleştirme aşamasını genellikle selektif bir katı besiyerine sürme yapılarak aranan bakterinin selektif izolasyonu aşaması izler. Buna göre selektif zenginleştirmenin amacı, selektif izolasyonda başarı şansını artırmak için aranan bakterinin karışık kültür içindeki sayısını artırmaktır.

Selektif zenginleştirme aşaması, her zaman ön zenginleştirme aşamasını izlemez. Hedef bakteri ve analiz edilecek örneğe göre doğrudan selektif zenginleştirme ile de analize başlanabilir. Örneğin, *E. coli* O157:H7 analizi doğrudan selektif zenginleştirme ile başlarken, *Listeria* analizinde ise yarı selektif zenginleştirme ve selektif zenginleştirme şeklinde bir uygulama vardır.

Klinik mikrobiyolojide ise *Salmonella* kuşkusu duyulan dışkı örneği selektif zenginleştirme aşamasına alınmakta, hatta gerekirse bu aşama bile geçilip, selektif katı besiyerine sürme yapılmaktadır. Bu uygulamanın nedeni, tüm zenginleştirme aşamalarının bağırsakta bitmiş olmasıdır. Diğer bir deyişle, dışkıda aktif ve yüksek sayıda *Salmonella* varsa bunu zenginleştirmeye gerek yoktur.

03.05.05. İdentifikasyon Besiyerleri

Selektif ve diferansiyel besiyerlerinin ön identifikasyonda kullanılabileceğine yukarıda değinilmiştir.

Tam selektif bir besiyerinde gelişen bir mikroorganizmanın identifikasyonu cins ve hatta tür bazında tamamlanabilir. Diferansiyel besiyerlerinde de aynı durum geçerlidir. MUG içeren bir selektif katı besiyerinde floresan veren koloni *E. coli* olarak değerlendirilir.

Bir mikroorganizma izolatının tanımlanması için halen en çok kullanılan testler biyokimyasal nitelikli olanlardır. İdentifikasyon besiyerleri, mikroorganizmanın belirli bir besin maddesini (örneğin, laktoz) kullanıp kullanmadığının saptanması, belirli bir besin maddesinden metabolizma sonunda tayin edilebilecek metabolitleri (örneğin, triptofandan indol) oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi vb. amaçlar ile kullanılır. Bakterinin hareketli olup olmadığının saptanması amacıyla kullanılan yarı katı besiyerleri de bu gruba dahil edilmektedir. Yarı katı olarak Nutrient Agar gibi genel besiyeri ya da SIM Medium gibi kombine bir besiyeri kullanılabilir.

Bir besiyerinde birden çok mikrobiyolojik tanımlama testi aynı anda beraberce yapılabilir. Bunun en tipik örneği *Salmonella* analizinde yaygın olarak Triple Sugar Iron Agardır. Yatık agar olarak tüplerde hazırlanan bu besiyerinde tek ekim ile glikoz, laktoz ve sakkarozdan asit

oluşturma, glikozdan gaz oluşturma ve H₂S oluşturma testleri yapılmaktadır. Bu gibi identifikasyon amaçlı ve birden çok test uygulananlar "kombine besiyeri" olarak adlandırılır.

03.05.06. Diğerleri

Agar disk difüzyonu ile yapılan antimikrobiyel duyarlılık ve minimal inhibisyon konsantrasyonu testleri, vitamin ve aminoasitlerin mikrobiyel yolla belirlenmesi, saf kùltürlerin korunması (koleksiyonu), taşınması gibi özel amaçlara yönelik olarak kullanılan çeşitli besiyerleri de vardır.

Endüstriyel üretimde kullanılan besiyerleri ise oldukça farklı bir gruptur. Bunların dışında istenilen formülde "sipariş üzerine" üretilen besiyerleri de vardır. Bunlar talebe göre dehidre, sıvı, şişede ya da Petri kutusuna dökülmüş şekilde hazırlanabilmektedir.

03.06. Besiyerlerinin Hazırlanması

Laboratuvarlarda kullanılan pek çok besiyeri, dehidre formdan hazırlanır. Bu amaçla, gereken miktar dehidre besiyeri tartılıp, üzerine damıtık su eklenir ve gerekli ise başka kaplara (örneğin tüplere) dağıtılıp, sterilize edilir. Bazı besiyerlerinin formülden hazırlanması gerektiği gibi, selektif besiyerlerinin bir kısmına sterilizasyon sonrasında çeşitli katkılar ilave edilir. Besiyerlerinin bir kısmı otoklavda, bir kısmı sadece kaynatılarak sterilize edilir.

Bir diğer deyiş ile, kullanılan besiyerlerine göre değişmek üzere bunların hazırlanma şekillerinde kayda değer ölçüde farklar vardır. Hatta bazen aynı besiyerinin 2 farklı ticari markası arasında bile hazırlanma farkı görülebilmektedir. ISO gibi uluslararası bir kuruluşta yapılan talimat değişikliği, besiyeri formülüne ve dolayısı ile hazırlanış şekline de yansımaktadır. Bu gibi nedenlerle aynı marka kullanılıyor olsa da, besiyeri ambalajı üzerindeki bilgiler her zaman çok dikkatlice okunmalıdır.

Her besiyeri kutusunda, katalogunda ya da prospektüsünde, o besiyerinin nasıl hazırlanması gerektiği son derece basit ve 40–50 sözcükle İngilizce olarak yazmaktadır. Çoğunda İngilizce'ye ek olarak Almanca, Fransızca, İtalyanca vb. dillerde de açıklamalar bulunur.

Aşağıda besiyeri kutularında ve kataloglarında geçen bazı İngilizce sözcük ve terimlerin Türkçe karşılıkları gösterilmiştir. Bu kitabın 4. ana bölümünde gıda mikrobiyolojisini ilgilendiren besiyerlerinin büyük çoğunluğunun hazırlama şekilleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

Gerek kutu üzerinde yabancı dilde yazan hazırlama bilgileri gerek ilgili talimatlarda kuşkuya düşölür ise derhal bir üst yetkiliye danışılmalıdır.

Çizelge 03. Besiyeri hazırlamada yaygın olarak kullanılan İngilizce sözcük ve terimlerin Türkçe karşılıkları

İNGİLİZCE	TÜRKÇE
About	Yaklaşık
Add	İlave edin
Autoclave	Otoklav, otoklavlayın
Autoclave under mild conditions	Düşük sıcaklık ve sürede otoklavlayın
Avoid	Sakının, yapmayın

İNGİLİZCE	TÜRKÇE
Below	Altında, daha düşük
Blue	Mavi
Boil	Kaynatın
Briefly	Yavaşça, hafifçe
Brown	Kahverengi
Caution	Uyarı, dikkat
Clear	Berrak
Completely	Komple, tümüyle
Cool	Soğutun
Dark	Koyu
Demin. water	Deiyonize (damıtık, saf) su
Dispense	Dağıtın
Dissolve	Eritin
Distilled water	Damıtık su
DO NOT ...	... Yapmayın
DO NOT AUTOCLAVE	(Besiyerini) otoklavda sterilize etmeyin
DO NOT OVER HEAT	(Besiyerini) fazla ısıtmayın
DO NOT REHEAT	(Besiyerini) tekrar ısıtmayın, eritmeyin
Filter-sterilize	Filtre ile sterilize edin
Filter-sterilized	Filtre ile sterilize edilmiş
Flask	Erlen
Frequent stirring	Sürekli çalkalayarak
Freshly	Taze, yeni hazırlanmış
Gently	Yavaşça, hafifçe
Green	Yeşil
Greenish	Yeşilimsi
Heat	Isıtın, ısıtmak
If	Eğer
Immediately	Derhal, hemen
Just before use	Kullanımdan hemen önce
Liquefy	Sıvılaştırma, eritme, eritin
Medium	Besiyeri
Melt	Eritmek, eritin
Min(ute)	Dakika
Mix	Karıştırın
Necessary	Gerekli
Over	Üzerinde, fazla
Pale	Soluk, mat
Plate(s)	Petri kutusu (kutuları)
Pour	(Petri kutularına) Dökün
Prepared	Hazırlanmış
Prior	Öncesinde
Red	Kırmızı
Reddish	Kırmızımsı
Refrigerator	Buzdolabı
Reheat	Yeniden ısıtmak, yeniden ısıtın
Reliquefy	Yeniden eritmek, yeniden eritin

İNGİLİZCE	TÜRKÇE
Room temperature	Oda sıcaklığı
Selective supplement	Selektif katkı
Semi solid	Yarı katı
Shake	Sallamak, karıştırmak, sallayın, karıştırın
Slant (agar)	Yatık (agar)
Steam	Buhar
Store	Saklayın (depolayın)
Suitable	Uygun
Supplement	Katkı
Suspend	Çözün, eritin
Swarming	Yayılıcı
Swirl	Çalkalayın
Thick layer	Kalın tabaka
Thin layer	İnce tabaka
Thoroughly	Düzgün (tam) bir şekilde
Tube(s)	Tüp(ler)
Vial	Küçük şişe
Vigorously	Sertçe, kuvvetlice
Water	Su
Well	İyice
White	Beyaz
Yellow	Sarı
Yellowish	Sarımsı

*Kaynak: www.mikrobiyoloji.org

03.06.01. Cam Malzeme

Besiyeri hazırlamada kullanılacak cam malzemenin çok iyi bir şekilde yıkanmış ve durulanmış, besiyeri hazırlamada kullanılan kalitede sudan geçirilmiş ve yeterince kurutulmuş olması gerekmektedir. Kırık ve çatlak cam malzeme kullanılmamalıdır. Besiyerinin hazırlanacağı cam malzemenin yeterli büyüklükte olması çoğu kere ihmal edilen, ancak çok önemli bir ayrıntıdır. Cam kapların hacmi mutlaka yeterli bir karıştırma sağlanacak ölçüde olmalıdır.

İdeal olarak, hazırlanacak besiyeri hacminin yaklaşık 2 katı hacimde cam kap kullanılmalıdır. Sıvı besiyerleri için, besiyeri hacmi cam kap hacminin en fazla 3/4'ü olabilir.

Cam kabın büyük tutulmasının nedeni otoklavlama sırasında ısı geçişinin daha sağlıklı olması, otoklav sonrasında da rahat ve güvenilir çalışma sağlamasıdır. 1 litrelik bir erlende 1 litre besiyeri hazırlanırsa soğuk noktanın yeri nedeni ile ya soğuk nokta yeterince sterilize edilemeyecektir ya da çepere yakın yerler gereğinden fazla ısıya maruz kalmış olacaktır. Büyük miktarlardaki besiyerlerinin balonda hazırlanması aynı nedenle benimsenmez.

Besiyerleri hazırlamak amacıyla kullanılan her türlü cam malzemenin yüksek kalitede ve düşük alkaliborosilikat özellikte, otoklavda ve etüvde (kuru hava sterilizatörü) sterilizasyona dayanıklı olması gereklidir.

03.06.02.Tartım ve Eritme

Tartımın yapılacağı terazinin duyarlılığı, besiyerinin hazırlanış şekli ile doğrudan ilgilidir. Genel olarak günlük kullanımda 0,1 gram duyarlılıktaki terazi kullanımı yeterlidir. Bileşimden giderek az miktarda hazırlanan besiyerlerinde bu duyarlılık yeterli olmaz ise seyreltme tekniği uygulanabilir ya da daha duyarlı bir terazi kullanılabilir. Özellikle bileşimden hazırlanarak çok düşük miktarda tartım yapılacak ise, terazinin kalibrasyonuna özellikle önem verilmelidir.

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. Tartım sırasında besiyeri ve/veya bileşenlerinin çok az da olsa toz bulutu oluşturmamasına özen gösterilmeli, eğer toz bulutu oluştu ise kesinlikle solunulmamalıdır.

Tartım sırasında besiyeri ve/veya bileşenlerinin çıplak deriye ve özellikle göze temas etmemesi sağlanmalıdır. Eğer bu temas varsa bol su ile ivedilikle yıkanması gerekir. Bu tip ayrıntılara NaCl, sakkaroz gibi günlük hayatta sürekli iç içe olunan maddelerin de dahil edilmesi, laboratuvar disiplini açısından son derece önemlidir. Bunun dışında, dehidre besiyerlerinin hepsinin higroskopik olduğu, solunulması halinde solunum sisteminde zamanla hastalıklara neden olabileceği, bazı besiyeri bileşenlerinin toksik olduğu göz ardı edilmemelidir.

Tartım sonrasında oluşabilen toz bulutu terazinin iç parçalarına girerek, terazide fark edilemeyecek arızalara neden olur ve bunun sonucunda hatalı tartımlar yapılır. Bu nedenle tartım sonrasında terazi üzerinde toz oluşmuş ise yumuşak fırça ile temizlenmeli ve damıtık su ya da %70 etil alkol ile silinmelidir.

Besiyerine ilave edilecek su ayrı bir ölçü silindirin de bulundurulmalıdır. Prensip olarak suyun hacmi ile silindirin hacmi birbirine yakın olmalıdır. Bir diğer deyiş ile 100 mL su ölçmek için 1 litrelik silindir kullanılmamalıdır.

Suyun yaklaşık 1/3'ü uygun bir kaba aktarılır, bunun üzerine tartılmış dehidre besiyeri ilave edilir. Bu uygulama ile cam kabın tabanına dehidre besiyerinin yapışarak erimemesine bağlı sterilizasyon yetersizliğinin önüne geçilir.

Daha sonra suyun geri kalan kısmı cam kap boğazında ve iç çeperlerde kalmış olabilen besiyeri parçacıklarını yıkayarak kaba ilave edilir.

Bazı besiyerleri soğuk suda kendi halinde 5–10 dakika bırakılıp elle hafifçe bir çalkalama sonunda tümüyle eriyebilir. Bazı besiyerleri ise "Broth" formunda olsalar bile eritmeleri için mutlaka ısıtılmalarına gerek vardır. Agarlı besiyerleri hazırlandığı kapta otoklavlanacak olsa bile, önce agarın erimesini sağlayacak şekilde ısıtılmalı, iyice karıştırılıp sonra otoklavlanmalıdır.

Eğer besiyeri sıvı ise, dehidre besiyeri ya da besiyeri bileşenleri tümüyle eridikten sonra daha küçük cam kaplara dağıtılır ya da doğrudan sterilize edilebilir.

Besiyeri bileşiminde agar varsa ve daha küçük hacimli kaplara dağıtılması gerekli ise besiyeri ısıtılıp, agar tam olarak eritildikten sonra sürekli karıştırılarak 50–55 °C'da su banyosunda tutulurken dağıtılması gereklidir. 60 °C üzerindeki agarlı besiyerinin 25 mL'lik pipetle tüplere dağıtılması sırasında, eğer pipet ağızla çekilirse ağızda önemli yanmalara neden olabileceği unutulmamalıdır.

Özellikle agarlı besiyerlerinin otoklav öncesinde agarın mutlaka tam olarak eritilmesi için farklı uygulamalar söz konusudur. Bunlar arasında mikrodalga fırın, kaynar su banyosu, ısıtıcı tabla yaygın olarak kullanılır.

-Mikrodalga fırın ani ısınmalara ve kaynamalara neden olacağı için dikkatli kullanılması gerekir. Besiyerinin kaynadığının görülmesi, agarın eridiği anlamına gelmez, ısının tüm besiyeri kütlesine eşit olarak dağıtılmış olması gerekir. Bu nedenle mikrodalga fırın kullanılarak eritme yapıldığında, kaynamadan sonra erlen tercihen manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmalı, erlen iç çeperinde agar ya da diğer besiyeri partiküllerinin kalmadığından emin olunmalı, endişe edilirse tekrar mikrodalga fırına konulmalı ve yeniden karıştırılmalıdır. Manyetik karıştırıcıda kullanılan manyetin (balık) mikrodalga uygulaması sırasında erlenden çıkartılması önerilmektedir.

-Laboratuvarlarda genel olarak "sıcak su banyosu" bulunur. Çoğunun ulaşacağı en yüksek sıcaklık 80 °C'dır ve buna bağlı olarak agarlı besiyeri eritilmesinde kullanılamazlar. Erleni rahatça içine alacak ve su kaynatmaya uygun herhangi bir kap bu amaçla kullanılabilir. Bu amaç için tercihen "benmari" şeklindeki kaynar su banyoları kullanılmalıdır.

-Isıtıcı tabla kullanılıyorsa manyetik karıştırıcılı olanlar tercih edilmelidir. Aksi halde sürekli olarak elle karıştırılıp, erlen dibinde kalabilecek erimemiş parçaların yapışmasına ve yanmasına neden olunmamalıdır. Eritme amacıyla kullanılan ısıtıcı tablanın iş bitiminde kolaylıkla soğumadığı ve çeşitli laboratuvar kazalarına neden olduğu da unutulmamalı ve laboratuvar personeli bu konuda uyarılmalıdır.

-Erlen açık alevde ısıtılarak besiyeri eritme yoluna gidilmemelidir.

Eritme sırasında erlenin ağzı alüminyum folyo ile hafifçe kapatılarak buharlaşma ve buharın laboratuvara dağılması önlenmelidir. Eritme işleminin -başta agar olmak üzere- bileşenlerin tam olarak eritilmesi amacıyla yapıldığı, günlük kullanılan besiyerlerinde en zor eriyen bileşenin agar olduğu ve 90 °C'da eridiği, bunlara dayanarak besiyerinin kaynatılmaması gerektiği unutulmamalı, ancak bileşenlerin tam olarak eritilmiş olduğundan da emin olunmalıdır.

Otoklavlama öncesi ısıtarak eritme dikkatli yapılması gereken bir iştir. Sürekli karıştırılarak yapılmalıdır. Aksi halde tam erimemiş partiküllerin yanmasına neden olunabilir. Özellikle düşük miktarda agar içeren besiyerleri eritme sırasında aniden kaynayarak kaptan taşabilir. Besiyeri hafifçe çalkalandığında erlen iç çeperinde partikül kalmaması erimenin tam olarak gerçekleştiğini gösterir.

Besiyerine ilave edilecek su miktarı çoğu kez hatalı ölçülür. Örneğin, besiyeri hazırlamada "dehidre hazır besiyerinden 23 gram, 1 litre suda çözülür" şeklindeki bildirinin anlamı 23 gram dehidre besiyeri üzerine toplam 1 litre su ilave edilmesi demek değildir. Erlen ya da balona önce 1 litre su doldurulur, cam yazar kalemle su düzeyi hassas bir şekilde işaretlenir, suyun yarısından fazlası bir başka temiz kaba alınır, tartım yapılır, besiyeri ya da besiyeri bileşenleri bu kapta -agar hariç olmak üzere- eritilir, işaretli yere kadar damıtık su ilave edilir. Sonra tam eritme sağlanır.

Burada ilave edilecek toplam su hacmi 1 litreden daha az olacaktır. Az olan kısım dehidre besiyerinin hacmi kadardır. Pek çok ulusal ve uluslararası standart bu nedenle besiyeri hazırlanmasında "1 litre su ilave edilir." yerine "1 litreye su ile tamamlanır." şeklinde bir açıklama getirmiştir. Bu uygulama standart besiyerlerinin hazırlanmasında ihmal edilebilecek bir ayrıntı iken, özellikle %50 Glikoz Broth gibi besiyerlerinin hazırlanmasında çok önemlidir.

03.06.03. pH Ayarlama

İster ticari olarak hazırlanmış dehidre besiyeri hazırlama katalogları ve prospektüslerinde ister bilimsel çalışmalara yönelik literatür bilgisinde olsun, besiyeri pH'sından kasıt, sterilizasyon sonu ve oda sıcaklığındaki (25 °C) pH'dır. Usulüne uygun olarak 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'sında bir sorun çıkmaz.

Besiyeri pH'sının sterilizasyon öncesi ayarlanması yanlış olur. Çünkü sterilizasyon sonrasında pH az da olsa değişir. Dolayısı ile besiyeri pH'sının sterilizasyon öncesinde ayarlanması, sterilizasyon sonrasında yanlış pH elde edilmesine yol açar.

Sterilizasyon sonrasında pH ayarlanması gerekli ise, 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.

Aksine bir belirtme yoksa, pH ayarlamasında filtre kullanılarak sterilize edilmiş olan 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılır. Sıvı besiyerinde pH ayarlaması, katı besiyerine göre çok daha kolaydır. Katı besiyerinde pH ölçüm ve ayarlama işleminin agarın jelleşme sıcaklığının üzerinde yapılması, pH metre kullanılıyor ise sıcaklık düzeltilmesine dikkat edilmesi gereklidir.

Tüpte hazırlanacak sıvı besiyerinde pH ayarlaması gerekli ise, besiyeri erlende otoklavlanmalı, otoklav çıkışında pH ayarlanmalı ve sonra steril tüplere dağıtım yapılmalıdır. Bu amaçla besiyerinden 10 mL gibi küçük bir örnek alınır, pH'sı kontrol edilir, 0,01 N NaOH ya da 0,01 N HCl kullanılarak pH'nın istenilen değere gelmesi için gereken miktar belirlenir, sonra orantı ile asıl besiyerine daha derişik (1 N) asit ya da baz ilave edilir.

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

Potato Dextrose Agar, BAT Agar örneklerinde olduğu gibi besiyeri çok asitli ise, sterilizasyon sonrasında asit ilave edilir.

Örneğin, Potato Dextrose Agar otoklavlanıp, 45 °C'a 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. Günlük uygulamada talimatta gösterildiği şekilde asit ilavesinden sonra pH kontrolüne gerek yoktur. Ancak, ilgili talimata göre asit ilavesinden sonra pH kontrolü isteniyor ise buna tümüyle uyulmalıdır.

Çeşitli bakterilerin tanımlama testleri içinde yer alan "belirli bir pH'da gelişebilme" gibi analizlerde besiyeri pH'sı tam olarak ayarlanmalıdır. Bu gibi analizlerde pH metre kalibrasyonunun son derece önemli olduğu açıktır.

Her ne kadar, "Doğru depolanmış taze besiyeri ile taze hazırlanmış damıtık su kullanılıyor, tartım doğru yapılıyor ve kurallarına uygun olarak sterilizasyon yapılıyor ise besiyeri pH'sının her defasında kontrolüne gerek yoktur." şeklindeki görüş geçerli olmakla beraber;

-En azından ayda bir kez sıvı besiyerlerinde otoklav sonrası kalibrasyonu yapılmış pH metre ile besiyerinde pH kontrolü yapılmalıdır.

-Gıda işletmelerinin iç standardında her otoklav sonrasında pH kontrolü varsa buna mutlaka uyulmalıdır.

03.06.04. Katkıların İlavesi

Çeşitli antibiyotikler, vitaminler, kan ve yumurta sarısı başta olmak üzere besiyeri bileşimine giren bazı maddeler otoklavlama sırasında tahrip olur ya da yüksek sıcaklıkta bileşimdeki maddeler birbirleri ile reaksiyona girer. Bunun en tipik örneği asit–agar etkileşimidir. Bu gibi maddeler otoklav sonrasında bazal besiyerine ilave edilir.

Sıvı besiyeri için katkıların ilavesinde herhangi bir sorun yoktur. Besiyeri ve katkı maddeleri oda sıcaklığında aseptik olarak karıştırılır.

Agarlı besiyerlerinde ise katkı maddeleri agarın henüz sıvı formda kalabildiği yeterince düşük bir sıcaklıkta ilave edilir. Bu ilavede aşağıdaki konulara dikkat edilmesi gerekir:

-Katkı maddesi asla soğuk olmamalı, oda sıcaklığında hatta 30–35 °C'da, agarlı besiyeri ise 45–50 °C'da tutulmalıdır. Böylelikle bazal (agarlı) besiyerlerinde katkının ilavesi ile ani soğumalar ve yerel jelleşmeler önlenmiş olur.

-Katkı ilave edilecek agarlı (bazal) besiyeri içine sterilizasyon öncesi manyet atılarak beraberce sterilize edilmesi, katkı ilavesinden sonra manyetik karıştırıcıda hafifçe karıştırarak katkının besiyeri içinde yeknesak olarak dağılması sağlanabilir. Bu işlemde, anaför oluşturacak kadar hızlı yapılan karıştırma ani soğumalara ve/veya besiyeri içinde hava kabarcığı oluşumuna neden olur. Anaför oluşturacak kadar hızlı karıştırma, Petri kutularına döküm ve jelleşme sonrasında hava kabarcıkları görülmüyor ise karıştırma işleminin, dolayısıyla katkı ilavesinin agarlı besiyeri çok sıcak iken yapıldığı anlaşılır.

-Sıvı besiyerine de sterilizasyon öncesi manyet atılması yararlı olur. Ancak bu manyet -eğer kullanılacak ise- blender gövdesine ya da stomacher torbasına zarar verir. Bu nedenle manyet, karıştırma işlemi bittikten sonra erlenden çıkartılmalıdır.

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

Başta antibiyotikler olmak üzere katkı maddelerinin büyük bir kısmı steril olarak pazarlanır. Yumurta sarısı içeren çözeltiler pastörize edilmiştir ve bunların steril olduğu kabul edilir. Asitler ve vitaminler ile bazı şekerlerin filtre ile sterilize edilmesi gerekir. Kan, -sağlıklı hayvandan aseptik koşullar altında alındığı için- steril olduğu kabul edilir.

Katkılardan; yumurta sarısı içerenler gibi bir kısmı sıvı halde, antibiyotikler gibi bir kısmı ise küçük şişelerde (vial) liyofilize formdadır. Bunların üzerine gereken miktarda steril damıtık su (bazen su ve alkol) ilavesinden sonra sterilize edilmiş besiyerine eklenirler.

Küçük şişeler içinde bulunan ve genellikle antibiyotik içeren selektif katkılar şişe içinde tablet gibi durur. Bunlar kırılmış gibi görülüyorsa sulandırılmaları sırasında toz oluşturmayacak

şekilde dikkatlice su ilave edilmelidir. Bu katkılar, kendi halinde bırakıldığında genellikle birkaç dakika içinde çözülür. Dairesel yavaş hareketlerle çalkalama erimeyi kolaylaştırır. Çözündürme sırasında kauçuk kapağa sıvının bulaşmamasına özen gösterilmeli ve şişe içeriğinin tam olarak çözülmüş olduğu kontrol edilmelidir.

Küçük şişelerde pazarlanan katkılar genellikle 500 ya da 1000 mL besiyeri için hazırlanmıştır. Buna göre bazal besiyeri hazırlanır, otoklavlanır, soğutulduktan sonra üzerine katkı ilave edilir.

Katkılar, genel olarak belirli bir miktar besiyerinde 1 kerede kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Örneğin, 50 mL yumurta sarısı tellurit emülsiyonu 1 L Baird–Parker Agar hazırlanması içindir ve bu miktardan standart çaplı 80 Petri kutusu hazırlanır. Pratik uygulamada, 1 şişe katkının tümünün 1 defada kullanılması beklenmez.

Bu durumda katkıdan steril koşullara uyularak gereken miktarın alınmasından sonra yine steril koşullara uyularak ağzının kapanmasına özen gösterilmelidir.

Benzer şekilde sadece antibiyotik içeren katkıların da depolanması mümkündür. Bu konuda 03.07.03. Bölümde bilgi verilmiştir.

03.06.05. Petri Kutularına Döküm

Otoklav veya daha geniş tarifi ile ısı işlem ile sterilizasyon sonrası agarlı besiyerleri çoğunlukla Petri kutularına dökülerek kullanılır. Besiyeri dökülmeden önce, homojenliğinden emin olmak için çalkalanmalıdır. Agarlı besiyerlerinin diğer kullanılış şekilleri arasında tüplerde yatık veya dik agar ile Roux şişelerinde kullanım sayılabilir. Bu diğer kullanım şekillerinde agarlı besiyeri genellikle anılan kaplarda sterilize edilir. Ancak, 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. Bazı işletmelerde "el altında" bulundurma amacı ile eritilmiş agar tüplere dağıtılır, sterilize edilir ve bu şekilde korunur. Gerektiğinde eritilip Petri kutusuna aktarılır.

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 kalınlığın "en az 2–3 mm" olması yaygın bir şekilde önerilmektedir. Bu kitapta önerilen standart dökme miktarı 12,5 mL'dir (100 mL agarlı besiyerinin 8 Petri kutusuna dağıtılması; standart 9 cm çaplı Petri kutusunda 2 mm kalınlık). VRB Agar besiyerinde dökme yöntemi ile kültürel sayımda 10 mL besiyeri dökülmesi, jelleştikten sonra üzerine 4–5 mL besiyeri ilavesi pek çok uluslararası standart tarafından önerilmektedir.

Agarlı besiyerinin otoklavlama sonrası Petri kutusuna hangi sıcaklıkta döküleceği konusunda pek çok yanlış uygulamaya rastlanmaktadır. Agarlı besiyeri için doğru uygulama şekli, otoklav sonrası besiyerinin yaklaşık 45 °C'a soğutulması ve bu sıcaklıkta Petri kutularına dökülmesidir. Yüksek sıcaklıklarda dökme, Petri kutusunun kapağı içinde aşırı su yoğunlaşmasına yol açar. Ayrıca yüzey kurutması daha uzun zaman alır.

Eğer Petri kutusunda "dökme yöntemi ile kültürel sayım" amacıyla önceden ilave edilmiş örnek varsa dökme sıcaklığı 40 °C'ı geçmemelidir. Bu uygulamada dikkat edilmesi gereken bir diğer özellik, Petri kutusunda bulunan mikroorganizmaları olası termal şok zararlarından korumak için Petri kutularının oda sıcaklığında tutulması gerekliliğidir.

Herhangi bir nedenle otoklavlandıktan sonra 50 °C su banyosunda uzun süreli beklemeler agarın jelleşme özelliğinde kayıplara neden olur. 48 °C'da 4 saat beklemek izin verilebilecek en yüksek sıcaklık/süre kombinasyonudur.

Besiyeri döküldükten sonra Petri kutuları yatay bir zeminde soğumaya ve katılaşmaya bırakılır. Yayma yöntemi ile çalışılacak ise dökme sırasında besiyerinde oluşabilecek hava kabarcıkları bunzen beki alevi ile uzaklaştırılabilir.

Agarlı besiyerleri dökümden sonra bir süre depolanacaksa Petri kutularının tabanına döküm tarihi yazılmalıdır.

03.06.06. Kurutma

Petri kutularına dökülmüş agarlı besiyerlerinde yüzeyin ıslak olması istenmez. Islak yüzeylerde hareketli bakteriler yayılıcı tip koloni oluştururken, hareketsizler olduklarından daha büyük koloni meydana getirir ve yanlış değerlendirmelere neden olur.

Tersine olarak, aşırı kurumalar da olumsuz sonuç verir. Koloniler aşırı kurumuş bir besiyerinde normalinden daha küçük boyut oluşturacakları için yine hatalı değerlendirmelere neden olur.

Kurallara uygun olarak Petri kutularına dökümde yüzey hafif nemli olur. Öze ile sürme gibi bir çalışma yapılacaksa, kurutma özellikle yapılmalıdır. Besiyerinin kurutma gerektirip gerektirmediği basit olarak yüzeyde su damlacıklarının görülmesi ile anlaşılır.

Dökümden sonra besiyeri yüzeyinin kurutulması gerektiğinde Şekil 05'te gösterildiği gibi 2 farklı yöntem uygulanabilir.

Şekil 05. Petri Kutularının Kurutulması



Petri kutularında agarlı besiyeri yüzeyinin çabuk kurutma yönteminde (a), kuruma hızlı olur, ancak kontaminasyon riski yüksektir. Diğer uygulama (b), tersine olarak geç kuruma ancak düşük kontaminasyon riski sağlar. Prensip olarak benimsenen şekil güvenli kurutmadır. Çabuk kurutma sadece acil durumlarda uygulanmalıdır.

Kurutma, mutlaka temiz ve serbest hava akımı olmayan yerlerde yapılmalıdır. Steril hava akımı ile çalışan aşılama kabini (Laminar air flow), sterilizasyon amacıyla kullanılan ve kurutma sırasında çalıştırılmayan etüvler (kuru hava sterilizasyon fırını) ve UV lamba ile sterilize edilen kabinler kurutma için kontaminasyon olmaması açısından en güvenilir yerler arasındadır. Kuru hava sterilizatörlerinde kurutma sırasında sıcaklığın 50 °C'da tutulması hızlı bir kuruma sağlar. Ancak bu uygulamada besiyerinin aşırı kuruma riski de vardır.

03.06.07. Yeniden Eritme

Sterilize edildikten sonra soğutulmuş ve jelleşmiş agarlı besiyerlerinin çeşitli nedenlerle yeniden eritilmesi gerekebilir. Burada ilk akla gelen iki neden, istem dışı olarak agarlı

besiyerinin jelleşmesi ile 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'da 1–2 dakika tutulma zorunluluğu vardır. Bu uygulama ise toplam ısı girişi açısından önerilmez. Bununla birlikte, pek çok laboratuvar da 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 besiyerlerinde yeniden eritme önerilmez. Hatta bazı agarlı besiyerlerinin prospektüslerinde yeniden eritilmemesi gerektiğine özellikle dikkat çekilir.

Prensip olarak, katkı ilave edilmiş ve/veya otoklavda sterilize edilmeyen agarlı besiyerleri yeniden eritilmez. Düşük pH'lı besiyerlerini tekrar eritmekten kaçınılmalıdır, burada sınır olarak pH 6,0 verilmektedir.

Agarlı besiyerinin eritilmesi gerektiğinde elden geldiği ölçüde az ısı girişinin sağlanması, bu amaçla kaynar su banyosunda yaklaşık 90 °C'da tutularak erimenin gerçekleştirilmesi yeterlidir.

Eritme amacıyla otoklav da kullanılabilir. Bazı otoklavların 90 °C'a ayarlanması mümkün değildir. Bazılarında "eritme" seçeneği vardır. Otoklav bu amaçla kullanılacak ise asla sterilizasyon normunda değil, 105 °C'da 5 dakika süre ile ısıtılmalıdır. Burada, eritilecek besiyeri hacminin önemli olduğu açıktır. Büyük hacimlerde besiyerlerinin eritilebilmesi için doğal olarak daha yüksek sıcaklık ve/veya süreye gerek vardır.

Eritme amacıyla aşırı ısıtmadan kaçınılmalıdır. Basit bir şekilde dairesel hareketlerle yapılan çalkalamada hava kabarcıkları merkeze toplanıyorsa besiyerinin tümüyle erimiş olduğu anlaşılır. Agarlı besiyerlerinin yeniden eritilmesinde mikrodalga fırınlar da başarıyla kullanılmaktadır.

Agarlı besiyerlerinin otoklav sonrası tekrar eritilmesinde performans azalması olur. Bu azalma, besiyerinin bileşimi ile doğrudan ilgilidir. Yeniden yapılacak eritmeler ile performans azalması kabul edilemeyecek düzeye çıkar. Bu nedenle agarlı besiyerinin sadece bir kez eritilmesine izin verilir.

Genel olarak Plate Count Agar gibi basit bileşimli besiyerleri daha az zarar görür. Otoklavlanmadan ve sadece ısıtılarak sterilize edilen besiyerleri (örneğin Rambach Agar) yeniden eritilmez.

Yeniden eritilmiş agarlı besiyerinin 3 saat içinde Petri kutularına dökülmüş olması gerekir. Laboratuvardaki iş akışı buna göre planlanmalıdır.

03.07. Depolama

Her dehidre besiyeri ve katkı kutusu üzerinde depolama koşulları belirtilir. Genel olarak dehidre besiyerleri oda sıcaklığında nem almayacak şekilde, katkılar buzdolabı sıcaklığında

depolanır. Bununla beraber, kutu üzerindeki uyarılara dikkat etmek ve bunlara tümüyle uymak gereklidir. Hazırlanmış besiyerlerinin depolanma kuralları daha farklıdır.

03.07.01. Dehidre Besiyerlerinin Depolanması

Kapağı açılmış besiyerleri ve besiyeri bileşenleri kuru, karanlık ve serin bir yerde saklanmalıdır. Toz haldeki besiyeri ve bileşenleri için en büyük tehlike bunların nem almasıdır. Orijinal ambalaj kapağının açılmasından sonraki raf ömrü, saklama koşullarına doğrudan bağlıdır.

Kutu ilk açıldığı gün envanter kayıt defterine ve kutu üzerine açılış tarihi kaydedilmeli, ilk açıldığında renk, topaklanma ve kalıplaşma belirtileri için görsel olarak kontrol edilmelidir.

Dehidre besiyerinin kalitesindeki kayıp; toz akışında değişim, homojen yapı göstermeme, kalıplaşma, renk değişimi vb. ile anlaşılır. Nem almış ya da açıkça fiziksel değişim gösteren dehidre besiyerleri hiçbir koşulda mikrobiyolojik analizlerde kullanılamaz.

Salmonella–Shigella Agar besiyerinde şahit *Salmonella* kullanılarak yapılan bir çalışmada, kontrol örneğine kıyasla geri alma oranları %1,1 nem almış besiyerinde %47; %5,5 nem almış olanda ise %22 olarak bulunmuştur.

Nemden korumanın en emin yolu, kullanımdan sonra dehidre besiyeri kapaklarının sıkıca kapatılması ve bunların kuru bir yerde depolanmasıdır. Kutu açıldıktan sonra dehidre besiyerinin vida kapaklı renkli şişelere dağıtılarak ve ağızları sıkıca kapandıktan sonra kuru ve serin bir yerde tutulmaları raf ömrünü kayda değer ölçüde uzatır. Bu şekilde kullanım sırasında tüm besiyeri yerine sadece daha küçük bir ambalaj açılmış olur. Daha küçük kaplara dağıtımda dehidre besiyeri aşırı toz bulutu oluşturabilir ve bunun solunması zararlıdır. Bu işlemin çeker ocak sisteminde yapılması gerekir.

Kapağı açılmamış bir dehidre besiyerinin raf ömrü genellikle 3–5 yıl kadardır. Ticari firmalar tarafından üretilen besiyeri ambalajlarında son kullanım tarihi yazmaktadır. Ancak bu tarihin, serin bir yerde depolanan ve kapağı açılmamış ambalaj ya da açıldıktan sonra doğru (serin ve kuru yerde, kutu ağzı sıkıca kapatılmış olarak) depolama yapılması koşulunda geçerli olduğu unutulmamalıdır.

Aksine ve net bir uyarı yoksa dehidre besiyerlerinin oda sıcaklığında (15–25 °C) depolanması yeterlidir. Bazı besiyerleri ambalajlarında 15 °C altında saklanması önerisine uyulması gerekir.

Dehidre besiyerlerinin buzdolabında saklanması önerilmez. Bunun nedeni buzdolabından çıkarıldıktan sonra kutu üzerindeki kondensasyon riskidir.

Bu bilgiler ışığında, dehidre besiyerlerinin otoklav, yıkama odası, su banyosu ve kaynar su banyosu yakını gibi nemin yüksek olduğu yerlerde ve doğrudan güneş ışığı alan dolaplarda depolanmaması gereği ortaya çıkar.

Burada verilen tüm bilgiler dehidre haldeki besiyeri bileşenleri için de geçerlidir. Genel olarak, anorganik bileşenler organiklere kıyasla çok daha uzun süre ile depolanabilir.

03.07.02. Çözeltilerin Depolanması

Laboratuvarda hazırlanmış çözeltilerin pek çoğu ışığa duyarlıdır ve soğukta saklanması gerekmez. Buna göre tercihen cam çözelti şişelerinde ve oda sıcaklığında depolanabilirler.

Işığa duyarlı olan çözeltilerin amber renkli şişelerde depolanması gerekir. Benzer şekilde bazı çözeltiler buz dolabında korunmalıdır.

Çözeltilerde nem kaybı olması, konsantrasyon değişikliğine neden olacağı için, bunların ağzı iyi kapatılan kaplarda depolanması gerekir. Alkol uçucu olduğu için, ağzı açık kaplarda uzun süre beklerse konsantrasyonu düşer ve buna bağlı olarak dezenfeksiyon etkisi azalır.

03.07.03. Katkıların Depolanması

Aksine bir uyarı yoksa besiyeri katkıları 2–8 °C'da depolanır. Çoğu katkı için ağzı açılmamış (ya da açıldıktan sonra sıkıca kapatılmış halde, soğuk ve kuru bir yerde) olmak kaydı ile depolama süresi 3–5 yıldır. Yumurta sarısı içeren katkılarda bu süre daha azdır.

Bazı katkıları, üzerlerine steril damıtık su ve/veya alkol eklenerek kullanıma hazır hale getirilir. Bunlardan bazılarının hazırlandıkları gün kullanılma zorunluluğu varken, bazıları bir süre depolanabilir.

Sadece antibiyotik içeren katkıları sulandırıldıktan sonra uygun küçük miktarlar halinde (örneğin steril Eppendorf tüplerinde) dondurularak saklanabilir. Bu şekilde depolanmış olan çözeltiler eritildikten sonra tekrar dondurulmamalıdır.

Katkıda dondurma kaynaklı potansiyel aktivite kaybı olup olmadığı kullanıcı tarafından kontrol edilmeli ve bu şekilde bir katkının bazal besiyerine ilave edildiği laboratuvar kayıtlarında belirtilmelidir.

03.07.04. Hazırlanmış Besiyerlerinin Depolanması

Çoğu laboratuvarda, besiyerleri hazırlandıktan sonra sterilize edilir ve daha sonra kullanmak üzere depolanır. Bu uygulamaya çeşitli besiyeri katkıları da girer. Benzer şekilde kullanıma hazır halde Petri kutularında, vida kapaklı şişelerde vb. şekillerde kullanıma hazır halde besiyerleri sağlanabilmektedir.

Hazırlanmış besiyerlerinin stabilitesi sınırlıdır. Bunların depolanabilme süresi öncelikle bileşimine ve saklama koşullarına bağlıdır. Her laboratuvar, kendi hazırlama, paketleme ve saklama koşullarına göre hazırlanmış her besiyeri için depolama süresini belirlemeli, bu şekilde talimatlara geçmelidir.

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 vardır. Laboratuvar personeli bu konuda çok dikkatli olmalıdır.

Hazırlanmış besiyerlerinin ne kadar süre ile depolanacağı öncelikle besiyeri bileşimine, hangi ambalajda (tüp, vida kapaklı şişe, plastik Petri kutusu, cam Petri kutusu vb.) olduğuna, depolama koşullarına bağlıdır. Genel olarak, basit bileşime sahip ve içinde katkı içermeyen besiyerleri, diğerlerine göre daha stabildir ve buna bağlı olarak daha kolay depolanabilirler.

Hazırlanmış besiyerlerinde raf ömrünü belirleyen en önemli faktörler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Işık

Hazırlanmış besiyerleri, peroksitler gibi bakterisit ve bakteriostatik bileşiklerin oluşmasını önlemek için renkli şişelerde ya da doğrudan ışık almayacak şekilde depolanmalıdır. Standart depolamada ilave bir önleme gerek yoktur. Rose Bengal gibi bazı bileşenler ışığa aşırı duyarlıdır. Dolayısı ile bu bileşeni içeren hazırlanmış bir besiyerinin bulunduğu Petri kutularının (bakınız; 47.01. ve 47.08. Bölüm) mutfak tipi alüminyum folyo ile sarılarak depolanması (hatta inkübasyonu) önerilir.

Nem

Dehidre besiyerinin nem alması ne denli istenmiyor ise hazırlanmış besiyerlerinde nem kaybından da o denli kaçınmak gerekir. Tüplerde, erlen ve balonlarda hazırlanmış besiyerlerinde nem kaybının önlenmesi kolaydır. Bu tip cam malzemede kap ağzının parafilm veya mutfak tipi strech film ile sarılması nem kaybını önemli ölçüde önler.

Petri kutularında nem kaybını önlemek daha güçtür. Standart laboratuvar tüpünde hazırlanmış Nutrient Agar besiyeri ile sterilizasyondan sonra Petri kutularına dökülmüş Nutrient Agar arasında yüzey/hacim oranı farklılığından kaynaklanan bir nem kaybı farklılığı vardır. Kuşkusuz, Petri kutusundaki besiyerinde nem kaybı tüptekinden çok daha fazla olacaktır.

Basit bir örnek olarak, depolama başlangıcında 5 mm olan agarlı besiyeri kalınlığı depolama sürecinde 4 mm'ye inerse, bu durum çok yaklaşık olarak %20 nem kaybının göstergesidir. Besiyerinde ozmotik değişimler olması yanında, özellikle selektif besiyerlerinde selektivite veren bileşenlerin %20 konsantrasyon artışı pek çok sahte negatif sonuca yol açar. Ayrıca kuruma yüzey ve yüzeye yakın yerlerde çok daha fazla olur. Agarlı besiyerinde depolama sırasında (dara hariç olmak üzere) %15 ağırlık kaybı izin verilen sınırdır (bakınız; 06.02. Bölüm). Gram negatif bakteriler besiyerindeki kurumaya bağlı olumsuzluklardan daha fazla etkilenir.

Petri kutularına dökülerek depolanacak agarlı besiyerlerinde nem kaybının önüne geçilmesi için, Petri kutularını vakum altında depolamak önerilebilir.

Bu konuda da yine ev mutfaklarında çeşitli gıdaların vakum altında tutulması için üretilmiş basit makinelerden ve bunların özel torbalarından yararlanılabilir. Bu olanak yoksa Petri kutularının mutfak tipi strech film ile sarılarak depolanması basit, ancak raf ömrünü kayda değer ölçüde uzatan bir uygulamadır.

Genel olarak plastik Petri kutularında, kapakların tam olarak kapanmasına bağlı olarak cam olanlara göre daha az nem kaybı olur.

Depolanacak Petri kutularında yüzey kurutması yapılmamalıdır. Eğer kullanım öncesinde yüzeyde bir ıslaklık görülürse, kurutma bu aşamada yapılmalıdır.

Sıcaklık

Hazırlanmış besiyerleri elden geldiği ölçüde serin ortamlarda tutulmalıdır. Ancak, özellikle agarlı besiyerlerinin dondurulmasından kesinlikle kaçınılması gerekir.

Dondurma, agarın jelleşme özelliğine önemli ölçüde zarar verir.

Bileşimi bağlı olmak üzere hazırlanmış besiyerleri için değişik depolama sıcaklıkları önerilmektedir. Hazırlanmış besiyerlerinin standart buzdolaplarının çok soğuk olmayan orta ve alt bölmelerinde depolanması yaygın ve doğru bir uygulamadır. Aksine bir uyarı yoksa genel olarak hazırlanmış besiyerleri 4–12 °C'da karanlık ve nem kaybetmeyecek şekilde depolanmalıdır. Kan, yumurta sarısı, yumurta sarısı–tellurit emülsiyonu ve antibiyotik ilave edilmiş besiyerleri ise 2–8 °C'da depolanmalıdır. Rambach Agar gibi bazı besiyerleri için en düşük depolama sıcaklığı 6 °C'dır. Fraser Broth gibi bazı besiyerlerinde katkı ilave edildiği gün kullanılması gerektiği unutulmamalıdır.

03.08. Çözeltilerin Hazırlanması

Mikrobiyoloji laboratuvarında en çok kullanılan çözeltiler seyreltme amaçlı olanlardır. Bunlar genel olarak, 90 ve 9 mL hacimde hazırlanır. Çiğ süt örneklerinde doğrudan 100 misli seyreltme için bu çözeltiler 99 mL olarak da hazırlanabilir. 99 mL olarak hazırlanan çözeltiler istenirse 1 mL ilavesi ile 1:100, istenirse 11 mL ilavesi ile 1:10 seyreltme için kullanılabilir.

90 (ya da 99) mL olarak hazırlanan dilüsyon şişesindeki (erlendeki) sıvı hacmi sterilizasyondan sonra oda sıcaklığında kontrol edilir. Bu amaçla her 25 şişeden biri "A sınıf" dereceli silindir ya da eşdeğeri ile kontrol edilir.

İzin verilen sapma hacmi $\pm 2\%$ 'dir. Daha fazla sapma olursa, nedeni araştırılıp, düzeltici uygulama yapılmalı ve kayda geçilmelidir. Hacim değişikliklerinin temel nedenleri arasında otoklavın yanlış kullanılması da vardır.

Laboratuvarda hazırlanarak kullanılan diğer çözeltiler arasında alkol, asitler ve bazlar ile boyalar vardır. Alkol, dezenfektan olarak %76 (v/v) konsantrasyonda kullanılır. Genellikle %96 konsantrasyonda pazarlanır. Buna göre, 4 hacim alkol üzerine 1 hacim damıtık su eklendiğinde çok yaklaşık olarak bu değer elde edilir.

Derişik çözeltilerden daha seyreltik olanların hazırlanmasında, Pearson karesi ile hesaplama yapılır. Pearson karesi; % (dolayısı ile ppm gibi) ifade edilen çözeltiler için kullanılır. Aşağıda basit bir örnekle derişik olandan daha seyreltiğin hazırlanması verilmiştir:

-%96'lık alkolden damıtık su ile %76'lık alkol hazırlanması için sol üst köşeye 96, sol alt köşeye 0 (sudaki alkol konsantrasyonu) karenin merkezine 76 (hedeflenen konsantrasyon) yazılır. Köşegenler boyunca fark alınarak elde edilen değer diğer köşelere yazılır. Buna göre $96 - 76 = 20$ sağ alt köşeye, $76 - 0 = 76$ sağ üst köşeye yazılarak kare tamamlanır. Sonra karenin alt ve üst kenarları boyunca okuma yapılır: %96 konsantrasyondaki alkolden 76 kısım ve %0 konsantrasyonlu alkolden (damıtık su) 20 kısım karıştırıldığında %76'lık alkol elde edilir.

96		76	$\Rightarrow$ %96'lık alkolden 76 hacim
	76		
0		20	$\Rightarrow$ %0'lık alkolden 20 hacim

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında pH ayarlamak amacıyla genellikle 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılır. "Normal" çözeltilerin hazırlanmasında önce molekül ağırlığı hesaplanır. Molekül ağırlığı, bileşikteki atom ağırlıkları toplamıdır.

NaOH için molekül (mol) ağırlığı; Na: 23; O: 16; H: 1 olmak üzere 40'tır.

1 litre damıtık su içinde 40 g NaOH çözülmesi ile elde edilen çözelti 1 Molar (M) olarak tanımlanır. Molekül ağırlığının tesir değerine bölünmesi ve çıkan değer 1 litre suda çözülmesi ile 1 Normal (N) çözelti elde edilir. NaOH için tesir (etki) değeri: 1 olduğuna göre 40 g/L çözelti aynı zamanda 1 Normaldir.

Yukarıda besiyerlerinin formülden hazırlanması bölümünde örneği verilmiş olan $MgSO_4$ 'ın mol ağırlığı 108 gram ve tesir değeri 2'dir. Buna göre 108 g/L çözelti 1 M, 54 g/L çözelti 1 N'dir.

Asitlerden yapılan hesaplamalarda derişim de dikkate alınır. Örneğin, 1 N (1 M) HCl hazırlamak için son konsantrasyon 36,5 g/L olacak şekilde damıtık su üzerine asit ilave edilir (hiçbir koşulda asit üzerine su ilave edilmez). Burada dikkat edilecek konu HCl'in, NaOH gibi katı ve saf olmadığıdır.

Buna göre, standart derişik (%38) HCl asitten 80,1 mL alınıp, en az 0,5 litre damıtık suya ilave edilir ve sonra damıtık su ile litreye tamamlanır. Bu şekilde hazırlanmış çözeltide 36,5 g/L saf HCl bulunur.

Çözeltinin hazırlandığı tarih, bileşimi ve gerekli görülen diğer bilgiler şişe üzerinde açıkça belirtilmeli, etiket üzerindeki yazıların silinmemesi sağlanmalıdır.

Sterilize edilmiş çözeltilerin kontamine edilmemesine özen gösterilmeli, kuşku duyulursa bu çözelti asla kullanılmamalıdır.

Çözeltiler konusunda ayrıntılı bilgi www.kimyaevi.org sitesinden sağlanabilir.

03.09. Besiyeri Kalite Kontrolü

Besiyeri üreten firmalar, ürettikleri ve pazarladıkları dehidre besiyerleri, hazır besiyerleri ve katkılarını sistematik olarak kalite kontrolden geçirmektedirler. ISO 11133 sayılı standart üretici firmanın yükümlülüklerini belirlemektedir.

Dehidre besiyerleri, bileşenleri ve katkılarını kullananlar için ilave kontrol uygulamalarına genellikle gerek duyulmaz. Buna karşın, -özellikle kuşku duyulmayı gerektirecek bir durumla karşılaşıldığında- aşağıdaki kontrollerin kullanıcılar tarafından yapılması yararlı olacaktır:

-Önce, orijinal ambalajın fiziksel olarak zarar görmemiş olduğu kontrol edilir. Kapak açıldıktan sonra renkte anormallik, topaklaşma gibi kontroller yapılır.

-Laboratuvarda sık kullanılan dehidre besiyerleri için, halen kullanılmakta olan kutudan son parti besiyeri hazırlanırken yeni kutunun açılması, bu kutudan da yeteri miktarda besiyeri hazırlanması, ekimlerin her iki grup besiyerinde beraberce (paralel) yapılması ile bir anlamda yeni kutu için kalite kontrol yapılmış olur. Her iki grupta, istatistik olarak analiz yapılmak üzere birbirlerinden farksız sonuç alınması gerekir.

-Aynı uygulama besiyeri katkıları için de yapılmalıdır.

-Besiyeri üreten firmalar tarafından hazırlanan kataloglarda hangi besiyerinde hangi mikroorganizmaların nasıl gelişeceği "kalite kontrol mikroorganizmaları" adı altında

gösterilir. Bu mikroorganizmaları besiyeri üreten ve/veya pazarlayan firmalardan sağlamanın maliyeti çok yüksek olabilir. Laboratuvarında sürekli analizi yapılan mikroorganizmaların basit bir koleksiyonu ve otokontrol içerikli çalışmalar 09. Bölümde ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

-Besiyerinde kullanıcı tarafından çözilemeyen bir hata kaynağı varsa, öncelikle besiyerini pazarlayan firmayla temas kurulmalıdır.

03.10. Besiyeri Hataları

Besiyerlerinde, doğrudan analiz sonucuna yansıyabilecek çeşitli hatalar ile bunların olası nedenleri aşağıda listelenmiştir. Görüleceği gibi; nem almış, yanlış tartılmış, aşırı ısıtılmış, hazırlamasında damıtık su kullanılmamış besiyerlerinde pek çok hata görülmektedir. Bu gibi hatalar gösteren ya da hatalı olduğundan yana kuşku duyulan besiyerleri mikrobiyolojik analizlerde kullanılamaz.

-Dehidre besiyerinde topaklaşma: Depolamada aşırı nem, dehidre besiyeri kutu kapağının nemli bir ortamda uzun süre açık kalması ve/veya gevşek kapatılmış olması, besiyerinin çok eski olması.

-Yanlış pH: Nötral olmayan su kullanımı, aşırı ısıtma, dehidre besiyerinin çok eski olması, yanlış tartım, pH'nın yanlış sıcaklıkta ölçülmesi, pH metre kalibrasyon hatası, sulandırmadan sonra sterilizasyonun zamanında yapılmaması, yetersiz yıkanmış cam malzeme kullanılması, dehidre besiyerinin nem alması.

-Anormal renk: Saf olmayan su kullanımı, kirli cam malzeme, yanlış pH, aşırı ısıtma, hatalı tartım, dehidre besiyerinin çok eski olması.

-Besiyerinde kararma: Aşırı ısıtma, dehidre besiyerinin çok eski olması.

-Bulanıklık ve presipitasyon: Saf olmayan suyun kullanılması, temiz olmayan cam malzemenin kullanılması, hatalı pH, aşırı ısıtma, bileşimden hazırlanmış besiyerlerinde temel bileşen(ler)'in yeterli saflıkta olmaması, hazırlanmış besiyerinde depolama sırasında nem kaybı, dehidre besiyerinin çok eski olması.

-Yüksek jelleşme sıcaklığı: Hatalı tartım, uygun olmayan agar kullanılması.

-Zayıf jelleşme stabilitesi: Hatalı tartım, dehidre besiyerinin tam çözülmeden dağıtılmış olması, düşük pH, asidin besiyeri çok sıcakken ilave edilmesi, aşırı ısıtma, erimiş halde uzun süre ile su banyosunda bekletme.

-Zayıf gelişme: Yetersiz yıkanmış ve/veya durulanmamış cam malzemeden inhibitör madde kontaminasyonu, hatalı pH, besiyeri ve katkılarının hatalı tartımı ve/veya hatalı ilavesi, aşırı ısıtma, dehidre besiyerinin çok eski olması.

-Aşırı gelişme: Selektif inhibitörlerin bozulacağı kadar aşırı ısıtma veya selektif katkıların yüksek sıcaklıkta bazal besiyerine ilavesi, selektif inhibitörlerin eksik tartımı/ilavesi, inhibitör içeren besiyerlerinde standart dışı uzun süre depolama.

-Kolonilerin yayılması: Besiyeri yüzeyinin çok ıslak olması, selektif inhibitörlerin bozulacağı kadar yüksek sıcaklıkta katkı ilavesi.

-Atipik gelişme: Besiyerinin hatalı hazırlanması, dehidre besiyerinin çok eski olması, hazırlanmış besiyerinin uygun olmayan koşullarda ve/veya uzun süreli depolanması, cam malzeme ve/veya sudan çeşitli inhibitörler ve/veya yabancı maddelerin kontaminasyonu.

03.11. Tehlikeli Maddeler

Dehidre besiyerleri safra tuzları, asit, selenit, boyalar vb. zehirli maddeler ile toz gibi zararlı maddeler içerir. Toz besiyerleri kullanıldığında tartım sırasında yayılan tozu solumamak için önlem alınması önerilir. Tehlikeli maddeler başlıca; soluma, deri ile temas, göz ile temas ve yutma yolu ile çalışanlar için potansiyel hastalıklar oluşturur. Bunların bir kısmı vücuda kontamine olduğu anda etkisini gösterir, bir kısmının etkisi çok uzun süre sonra görülür.

Ayrıca, bazı besiyeri bileşenlerinin çevre açısından kirlilik oluşturduğu da dikkate alınmalı, buna göre besiyeri ve bileşenlerinin çöpe atılmasında gereken özen gösterilmelidir.

Bazı besiyerlerinin bileşiminde insan sağlığı açısından tehlikeli maddeler bulunur. Bu maddelerden bir kısmı sadece bu maddelere duyarlı kişiler için önemli iken, talyum gibi bazı kimyasallar ile çalışılırken özel önlem alınması gerekir. Aşağıda insan sağlığı için tehlikeli olan kimyasallara örnekler verilmiştir:

-Barbitone: "Narkotik" grupta değerlendirilir. Bileşimden hazırlanan bazı besiyerlerinde kullanılır.

-Bile salts (safra tuzları): Mukoz membranları tahriş eder. Koliform grup bakteriler için kullanılan bazı besiyerlerinde bulunur.

-Brilliant green: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Koliform grup bakteriler için kullanılan bazı besiyerlerinde bulunur.

-Cetrimide: Yutulması zararlıdır, göz ve deride tahriş yapar. Başta Cetrimide Agar olmak üzere Gram pozitif bakterilerin inhibisyonu için bazı *Pseudomonas* besiyerlerinde bulunur.

-Chloramphenicol: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Genel bakteri inhibitörü olarak DRBC ve RBC gibi bazı maya-küf besiyerleri bileşimindedir.

-Crystal violet: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Gram pozitiflerin inhibisyonu için başta VRB Agar olmak üzere bazı koliform grup bakteri besiyerleri bileşiminde bulunur.

-Cycloheximide: Selektif katkı olarak bulunduğu konsantrasyonu tehlikelidir. Ancak besiyerine ilave edildiğinde konsantrasyon, tehlikeli olabilecek düzeyin altına iner. Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Listeria* besiyerlerinin bazılarında bulunur. Bu selektif katkı ile çalışılırken dikkatli olunması gerekir.

-Deoxycholate: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Salmonella* ve koliform grup bakteriler için hazırlanmış bazı besiyerlerinin bünyesinde bulunur.

-Kanamycin: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Fekal streptokoklar ve *Cl. perfringens* için hazırlanmış bazı besiyerlerinin bünyesinde bulunur.

-Lithium choride: Yutulması zararlıdır, kusma ve ishale neden olur. Solunum sisteminde mukoza irritasyonu ile öksürüğe, deride tahrişe, göze bulaşması halinde irritasyona yol açar. Toksik doz, görme bozukluğu ve kalp ritim bozukluğuna neden olur. Baird-Parker Agar ve Fraser Broth gibi bazı besiyerlerinin bileşiminde yer alır.

-Malachite green: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. Gram pozitifleri inhibe eder. Özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella* için hazırlanmış RVS Broth gibi bazı besiyerlerinin bileşiminde bulunur.

-Nalidixic acid: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Pseudomonas aeruginosa* ve Fraser Broth gibi bazı *Listeria* besiyerlerinin bileşiminde bulunur.

-Potassium tellurite: Solunum sistemi, deri ve gözde tahriş yapar. *Staphylococcus* için hazırlanan besiyerlerinin çoğunda, *E. coli* O157:H7 için kullanılan CT–SMAC Agar besiyeri katkısında bulunur. Nutrient Broth'a %0,05 oranında katılarak *Listeria monocytogenes* zenginleştirmesinde kullanılabilir.

-Sodium azide: Dehidre besiyerlerinde az miktarda bulunmakla beraber, bazı kişilerde aşırı duyarlılık görülebilir. Sodium azide, başta bakır olmak üzere metaller ile temas ettiğinde patlayıcı metal azitleri oluşturur. Bu nedenle sodium azide içeren besiyerleri yıkama sırasında önce bol su ile muamele edilmelidir. Bunların dışında, sodium azide asitlerle temas ettiğinde toksik gaz oluşturur. Enterokoklar için hazırlanan besiyerlerinin bazılarında bulunur. %1'den yüksek konsantrasyonlar ile çalışılırken gereken önlem alınmalıdır (örneğin, çeker ocak).

-Sodium selenite: Solunması ile bronşiyal spazmlara, boğulma ve zatürre semptomlarına yol açar. Sindirilmesiyle bulantı, solgunluk ve mide şikâyetleri oluşur. Karaciğer, böbrekler ve merkezi sinir sistemine zarar verir, alerjik reaksiyonlara neden olabilir. Çözeltisi deri ve gözde tahriş yapar. Kümülatif etki riski vardır. Teratojenik potansiyeli olduğundan doğurgan yaşta kadınlar bu madde ile çalışmaları sırasında çok dikkatli olmalıdır. Selenite Cystine Broth gibi bazı *Salmonella* besiyerlerinde yer alır.

-Sodium metabisulphite: Asit ile temasında toksik bir gaz olan sodium dioxide oluşur; bu gaz solunum sistemi ve deriyi tahriş eder. *Campylobacter* analizinde kullanılan Bolton Selective Enrichment Broth (Base) bileşiminde bulunur.

-Sodium thioglycollate: Solunması ve yutulması toksik etki yapar, deriyi tahriş eder. Anaeroblar için kullanılan bazı besiyerlerinin bileşiminde yer alır.

-Thallium salts (talyum tuzları): Solunması veya sindirilmesi toksik etki yapar. Kümülatif etki riski vardır. Bileşimden hazırlanan bazı besiyerlerinde bulunur.