

1.2 Besiyerlerinin Hazırlanması

Besiyerleri ticari dehidre formülasyonlardan hazırlandığında üreticinin talimatları tam olarak takip edilmelidir. Miktar/hacim, hazırlama tarihi, pH, sterilizasyon şartları ve operatör gibi tüm ilgili veriler kayıt altına alınmalıdır.

1.2.1 Saf Su

Besiyeri hazırlamak için kullanılan saf su mikroorganizmaların gelişmesini etkilemesi veya inhibe etmesi muhtemel maddeler (Ör., ağır metaller) içermeyen **distile (damıtık)** su veya eşdeğeri olmalıdır. Saf su distilasyon (damıtma), deiyonizasyon (demineralizasyon) ve ters ozmos gibi yöntemler ile elde edilebilir. Deiyonizasyon yöntemi ile elde edilmiş saf suya **deiyonize (demineralize)** su adı verilir. Safılık düzeyini arttırmak amacı ile iki kere distile edilen saf suya ise **bidistile** su adı verilmektedir. Distile su klorlanmış sudan hazırlandı ise distilasyondan önce klor nötralize edilmelidir. Nötralizasyon için eşdeğer miktarda Sodyum tiyosülfat veya Sodyum sülfat kullanılabilir.

Besiyeri hazırlamak için kullanılacak saf suyun elektriksel iletkenliği 25°C' da **25 µS/cm (Elektrik direnci olarak $\geq 0,4 M\Omega$)** ' den yüksek olmamalıdır. Saf su kullanılmadan önce muhafaza edilecek ise veya iyon değiştirme yöntemi ile üretildi ise mikrobiyolojik kontaminasyon kontrolü yapılmalıdır. Besiyeri hazırlamak için kullanılan saf suyun toplam koloni sayısı (ISO 6222' ye göre 22°C' da 72 saat inkübasyon sonunda) **1000 kob/ml'** yi aşmamalıdır. İdeal olarak toplam koloni sayısı 100 kob/mL' nin altında olmalıdır. EA tarafından yayınlanan rehber dokümana (EA 04/10) göre mikrobiyoloji laboratuvarlarında saf suyun iletkenliğinin haftalık olarak mikrobiyolojik kalitesinin ise aylık olarak kontrol edilmesi tavsiye edilmiştir. Yine aynı rehber dokümana göre distilasyon sistemleri üç ayda bir temizlemelidir.

Saf su tercihen doğal cam gibi inert materyalden imal edilmiş ağzı kapalı kaplarda ve alg gelişimi engellemek için doğrudan güneş ışığına maruz bırakılmadan muhafaza edilmelidir. Muhafaza edilen saf suyun havadaki CO₂' i absorbe etmesi nedeni ile pH' sının düşebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle muhafaza edilen saf suyun pH' sı kontrol edilmelidir. Besiyeri hazırlamak için kullanılacak saf suyun pH' sı **5,0-7,5** arasında olmalıdır.

1.2.2 Tartım, Sulandırma ve Çözündürme

Gerekli miktarda dehidre besiyeri 0,1 g doğrulukta tartılmalıdır. Bazı formülasyonlar deri ve gözü tahriş edici bileşenler içerebildiklerinden dolayı tartım esnasında maske ve gözlük kullanılmalıdır.

Dehidre besiyerinin çözündürülmesi için Borosilikat camdan imal edilmiş cam kaplar kullanılmalıdır. Sodali cam kapların içindeki solüsyonun pH' sın yükseltebileceği unutulmamalıdır. Su ve dehidre besiyerinin çok hızlı karıştırılması topaklanmaya neden olabilir. Bunu önlemek için önce gerekli hacmin 1/3' ü kadar su sürekli çalkalayarak kaba ilave edilebilir. Kullanılan su dehidre besiyerine ilave edilmeden önce kesinlikle ısıtılmamalıdır.

Agar içeren besiyerlerinin çözündürülmesi için su banyosunda ısıtılmaları gerekmektedir. Besiyerleri çözündürme amacı ile hızlı ısıtılmalı ve hızlı soğutulmalıdır. Besiyerleri ısıtılırken aralıklarla çalkalanmalıdır ve kaynamaya başladıklarında su banyosundan çıkartılmalıdırlar. Düşük oranda agar içeren besiyerleri ısıtıldıklarında köpürebilirler ve taşabilirler. Bunu önlemek için ısıtılırken sık çalkalanmalıdırlar. Besiyerlerinin sterilizasyon için cam tüplere veya kaplara taksim edilmeden önce berrak ve iyi karışmış bir solüsyon haline geldiklerine emin olunmalıdır. Su banyosuna alternatif olarak ısıtıcı manyetik karıştırıcı kullanılabilir.

Otoklav esnasında besiyerlerinin pH' sında genellikle bir miktar (0,1-0,2 birim) azalma olmaktadır. Aksi belirtilmediği sürece besiyerlerinin sterilizasyon sonrasında ölçülen pH değerinin istenen pH değerinden en fazla $\pm 0,2$ birim farklı olması beklenir. pH otoklav öncesi veya otoklav sonrası ölçülebilir. pH ölçümü besiyeri 25°C' ye soğutulduktan sonra gerçekleştirilmelidir. Çok yüksek olmamak koşulu ile pH ölçümü daha yüksek sıcaklıklarda (Ör., 45°C) yapıldı ise sonuçlara sıcaklık düzeltmesi yapılmalıdır. Sıvı besiyerlerinin pH' sının ölçülmesi için bir miktar besiyeri bir erlenmayere alınmalıdır ve manyetik karıştırıcıda bir süre karıştırıldıktan sonra pH ölçülmelidir. Agarlı besiyerlerinin pH' sının ölçülmesi için bir miktar besiyeri uygun sıcaklığa kadar soğutulur. Katılmış besiyeri küçük parçalar halinde bir test tüpüne, tüpün yarısını dolduracak şekilde aktarılır ve üzerine 3 mL distile su ilave edilir ve 5 d bekletildikten sonra besiyerinin pH' sı ölçülür.

Ticari dehidre formülasyonlardan besiyerlerinin hazırlanmasında uygun nitelikte saf su kullanıldığı takdirde pH ayarlamasına gerek kalmayacaktır. Otoklav öncesi pH ayarlaması gerektiğinde 1 N HCl veya 1 N NaOH solüsyonları kullanılmalıdır. Bazı kaynaklara göre pH farkının 0,5 birimin altında olması durumunda otoklav sonrası pH ayarlaması yapılabilir. Şayet otoklav sonrası ölçülen ve beklenen pH değerleri arasındaki fark

0,5 birimden fazla ise besiyeri kullanılmamalıdır. Otoklav sonrası pH ayarlaması için filtrasyon ile steril edilmiş 0,1 N NaOH veya 0,1 N HCl solüsyonları ve steril pipetler kullanılmalıdır. pH ölçümü yapılan kaptaki besiyerinin hacmi ve pH' sının ayarlanması için gerekli olan asit veya alkali solüsyonu miktarı ile tüm besiyeri hacmi için gerekli asit veya alkali solüsyonu miktarı belirlenebilir.

Sterilizasyondan önce son aşama besiyerlerinin tüp veya daha küçük hacimde kaplara taksim edilmeleridir. Sterilizasyon için kullanılacak kabın hacmi besiyeri hacminin **1,2 ile 3** katı arasında olmalıdır. Otoklav ile sterilizasyon esnasında su kaybına bağlı olarak besiyeri hacminde bir miktar azalma olacaktır. Hacimdeki bu azalma özellikle kantitatif analizlerde başlangıç süspansiyonunun (90 mL veya 225 mL) veya ileri dilüsyonların (9 mL) hazırlanması için kullanılacak dilüentler için önemlidir. Dilüentlerin otoklav sonrası hacim kaybı kontrol edilmelidir. Dilüent hacimlerinde otoklav sonrası azalma **%5'** in altında olmalıdır. Diluentlerin otoklav ile sterilizasyondan kaynaklanacak kayıp kadar fazla hacimde (Ör., 9 mL yerine 9,2 mL) taksim edilmeleri önerilebilir.

Besiyerleri taksim edilmelerinin ardından **2 saat** içinde steril edilmelidirler. Otoklav ile sterilizasyon öncesinde vida kapaklı tüp ve şişelerin kapakları gevşetilmelidir ve kontaminasyonu önlemek için otoklav sonrası tekrar sıkıştırılmalıdır.

1.2.3 Sterilizasyon

Besiyerlerinin ve ayıraçların sterilizasyonu basınçlı buhar sterilizasyonu (Otoklav) ve filtrasyon ile gerçekleştirilebilir.

Gram negatif bakterilerin sayımı veya izolasyonu için kullanılan bazı besiyerleri yalnızca kaynatılarak kullanılmaktadır. Kaynatma ile tüm Gram negatif bakteriler ve spor oluşturmeyen Gram pozitif bakteriler yok edilir. Isıya dayanıklı spor oluşturan Gram pozitif bakterilerin gelişmesi ise besiyerinin seçiciliği ile engellenir.

1.2.3.1 Otoklav ile Sterilizasyon

Otoklavlar yüksek basınç ile su buharının daha yüksek sıcaklığa ulaşabilmesini sağlayan cihazlardır. Suyu kaynatmak için gerekli ısı aynı hacimdeki suyu buhar haline getirmek için gerekli ısıdan **7** kat azdır. Otoklavın etkinliği su buharının bu yüksek ısı kapasitesi ile açıklanabilir. Otoklav kelimesi Auto ve Clavis (Latince; anahtar) kelimelerinden gelmektedir. Basınç arttığı zaman cihazın kapağının otomatik olarak kilitlemesinden dolayı bu isim verilmiştir.

İdeal olarak otoklavın sterilizasyon sıcaklığını **±3°C** içinde koruyabilmesi gerekmektedir. Otoklav ile sterilizasyonda yaygın olarak kullanılan sıcaklık ve zaman kombinasyonu **121°C (15 psi)** ve **15** dakikadır. Büyük hacimdeki besiyerlerinin ısınma ve soğuma süreleri küçük hacimdeki besiyerlerine nazaran daha kısadır. Bir litrelik hacimdeki besiyerleri için uygun sterilizasyon döngüsü 100 mL hacimdeki besiyerleri için uygun olmayabilir. Uygulanan sterilizasyon prosesi yüksek hacimdeki besiyerleri için yetersiz kalabilir veya düşük hacimdeki besiyerleri aşırı ısınabilir. Bir litrenin üzerindeki hacimler farklı sterilizasyon döngüsü gerektirebilir. Bu nedenle oldukça farklı hacimdeki besiyerlerinin (tüp ve şişelerin) birlikte sterilizasyonundan mümkün olduğu sürece kaçınılmalıdır. Besiyerleri otoklav ile ikinci kez steril edilmemelidirler.

Agarın ısı iletimi oldukça zayıftır ve agar içermeyen besiyerlerinin agarlı besiyerlerine nazaran ısı penetrasyonu düşüktür. Rutin uygulamalarda sıvı ve agarlı besiyerlerinin otoklav ile birlikte sterilizasyonu için uygun maksimum hacimler sıvı besiyerleri için **1 L**, agarlı besiyerli için **200 mL'** dir.

Tablo 1.1 Cam şişe içindeki sıvı besiyerinin ısı penetrasyon sürelerinin karşılaştırılması

Hacim	121°C' a ulaşma süresi (d)
500 mL	18
1 L	22
2 L	27
5 L	37

Besiyerlerinin sterilizasyonunda toplam ısı girişi kavramı önemlidir. 50°C' in üzerinde ve özellikle 100°C ve 121°C arasında geçen ısınma ve soğuma sürelerinin uzun olması toplam ısı girişini kayda değer oranda arttırmaktadır. Toplam ısı girişindeki artış besiyeri performansını azaltabilir. Örneğin, fazla ısı yüksek karbonhidrat içeren besiyerlerinde karbonhidratlar ve amino asitler arasında Maillard reaksiyonu oluşmasına neden olabilir.

Maillard reaksiyonu sonucu bazı temel aminoasitler mikroorganizmalar tarafından metabolize edilemez hale gelebilirler. Bu nedenle otoklav işlemi sonrası basınç sıfır olduğu zaman besiyerleri bekletilmeden otoklavdan çıkartılmalı ve soğutulmalıdır.

Otoklav ile gerçekleştirilen sterilizasyonun etkinliği **Otoklav Bantları, Kimyasal İndikatörler (Browne's tüpleri)** ve **Biyolojik İndikatörler (Spor İndikatörleri)** ile kontrol edilebilir. Otoklav bantları arzu edilen sıcaklığa ulaşıldığının kontrolüne yöneliktir. Ancak istenilen sıcaklığın ne kadar süre korunduğuna dair fikir vermediklerinden dolayı tek başına sterilizasyon kontrolü için yeterli değildir.

Browne's tüpleri ısıya duyarlı solüsyon içeren cam tüplerdir. Tüplerdeki solüsyonun rengi yüksek sıcaklıkta belirli süre tutulduklarında kırmızıdan yeşile dönüşür. Sıcaklığın yanı sıra zaman faktörüne bağlı sonuç verdiklerinden dolayı otoklav bantlarından daha güvenilirlerdir. Bununla birlikte Browne' s tüplerinin otoklav kazanı içinde yalnızca yerleştirdikleri yer için sterilizasyon şartlarını gösterdiği unutulmamalıdır. Otoklavın hacmi göz önünde bulundurularak birden çok tüp kullanılması daha güvenilir bir yöntemdir.

Geobacillus stearothermophilus sporları ısıya oldukça dayanıklı olduklarından sterilizasyon prosesinin etkinliğinin kontrolü amacı ile kullanılabilirler. Doğrudan *G. stearothermophilus* sporlarını içeren besiyeri ampulleri veya spor stripleri şeklinde ticari biyolojik indikatörler mevcuttur. Strip formu kullanıldığında strip sterilizasyon sonrası aseptik bir şekilde strip ile birlikte sağlanan besiyerinin içine alınmalıdır. Biyolojik indikatörlerdeki spor sayısı (10^6) *G. stearothermophilus*' un 121°C için *D* değerine (*D* değeri; Belirli bir sıcaklıkta mikroorganizma sayısının 10 kat azalması için gerekli süre) göre belirlenmektedir.

Biyolojik indikatörler otoklav sonrası *G. stearothermophilus*' un optimum gelişme sıcaklığı olan **60°C** da 24-48 saat inkübe edilirler. Sterilizasyon sonrasında canlı kalan sporlar olduğu takdirde inkübasyon esnasında vejetatif duruma gelecekler ve besiyerinin bileşiminde bulunan karbondioksit kullanacaklardır. Bu durumda yine besiyeri bileşiminde bulunan pH indikatörü nedeni ile besiyerinin rengi değişecektir. Bu sonuç yetersiz sterilizasyonu gösterir.

Browne' s tüplerinde olduğu gibi biyolojik indikatörlerin otoklav kazanı içinde yalnızca yerleştirdikleri yer için sterilizasyon şartlarını gösterdiği unutulmamalıdır. Otoklavın hacmi göz önünde bulundurularak birden çok biyolojik indikatör kullanılması daha güvenilir bir yöntemdir.

Yukarıda anlatılan tüm kontrol yöntemlerinin ortak dezavantajı istenilen sıcaklığın **asıldığı** durumları işaret edememeleridir. Besiyerlerinin istenilen sıcaklığın üzerinde steril edilmesi besiyerlerinin özelliklerini kaybetmesine neden olabilir. Fazla ısınmanın kontrol edilmesinin tek yolu ise doğrudan besiyeri sıcaklığının ısıcıft (thermocouple) ile izlenmesidir. Isıcıft kullanımının mümkün olmadığı durumlarda sterilizasyon sıcaklığına dayanıklı materyalden imal edilmiş **maksimum termometreler** kullanılabilir. Günümüzde birçok otoklav modelinde bütünsel ısıcıft ve sıcaklık kayıt sistemleri mevcuttur. Güvenilir ölçümler için kullanılan ısıcıftlerin izlenebilir kalibrasyonlarının gerçekleştirilmesi gereklidir.

1.2.3.2 Filtrasyon ile Sterilizasyon

Filtrasyon ile sterilizasyon yöntemi ısıya duyarlı solüsyonların sterilizasyonu için kullanılmaktadır. Filtrasyon ile sterilizasyon vakum altında veya basınç ile **0,22 µm** por çapındaki ticari steril membran filtreler ile gerçekleştirilebilir. Filtrasyon ekipmanları birleştirilmiş olarak otoklav ile sterilize edilebilir veya ayrı steril edilerek laminar flow kabin içinde birleştirilebilir.

1.2.4 Agarlı Besiyerlerinin Yeniden Eritilmesi

Agarlı besiyerlerinin yeniden eritilmesi için su banyosu veya mikrodalga fırın kullanılabilir. Su banyosunda eritme suyun kaynama sıcaklığında gerçekleştirilir. Mikrodalga ile eritme ise cihazın defrost modunda yapılmalıdır. Besiyerleri eritildikten sonra termostatik kontrollü su banyosunda 47°C-50°C sıcaklığa soğutulmalıdır. Her eritme işleminin agarın jelleşme kuvvetini azaltacağından dolayı besiyerleri yalnızca **bir kez** yeniden eritilmelidir ve eritilmiş besiyerleri en fazla **dört saat** içinde kullanılmalıdır. Asit ve ısı kombinasyonu agarı tamamen hidrolize edeceğinden dolayı asitleştirilmiş Patato Dextrose Agar yeniden eritilmemelidir.

1.2.5 Katkıların ilavesi

Bazı besiyeri katkıları toksik bileşenler içerebilir. Bu nedenle katkı solüsyonlarının hazırlanmasında üretici talimatlarına uyulmalıdır. Üretici tarafından aksi beyan edilmediği sürece hazırlanan antibiyotik solüsyonları aynı gün kullanılmalı veya yalnızca bir kez dondurmak koşulu ile dondurularak muhafaza edilmelidirler.

Isıya duyarlı katkılar **47°C-50°C** a soğutulmuş besiyerine ilave edilmelidir. Katkılar besiyerine ilave edilmeden önce oda sıcaklığına getirilmelidir. Soğuk katkı solüsyonları besiyerindeki agarın jelleşmesine neden olabilir.



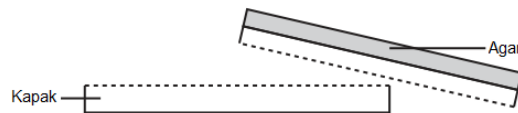
BİYOLOJİK İNDİKATÖRLER



1.2.6 Petrilerin hazırlanması ve muhafazası

Su banyosunda **47°C-50°C** a soğutulmuş agarlı besiyeri petrilere besiyeri kalınlığı **en az 3 mm** olacak şekilde (90 mm çapındaki petri için 18-20 mL) dökülür. İnkübasyon süresi 2 günden fazla veya inkübasyon sıcaklığı **40°C** ın üstünde ise besiyeri kalınlığı 3 mm' nin üzerinde olmalıdır. Petri kapakları kapanarak besiyerinin katılaşması için düz ve serin bir yüzeyde bekletilirler. Kontaminasyon riskini azaltmak için besiyerleri laminar flow kabin içinde dökülebilir. Petri kutuları üzerine hazırlama veya son kullanım tarihleri yazılmalı ve besiyerleri tanımlanmalıdır. Bu amaçla laboratuvarlar tarafından geliştirilen kodlama sistemleri de kullanılabilir.

İyi izole edilmiş koloniler elde etmek ve kolonilerin yayılmasını önlemek için kullanmadan önce besiyerlerinin yüzeylerinin kurutulması önemlidir. Kurutma **Şekil 1.1**' de gösterildiği şekilde **25°C-50°C** arasında etüve veya laminar flow kabin içinde yapılabilir. Kurutma işlemine besiyeri yüzeyinde su damlası gözlenmeyinceye kadar devam edilmelidir. Besiyerleri kesinlikle daha fazla kurutulmamalıdır. Su kaybının artması bazı durumlarda mikroorganizmaların gelişmesini olumsuz etkileyebilir.



Şekil 1.1 Petri kutusundaki besiyerlerinin kurutulması

GOSELIN

A Corning Brand

GOSELIN Avrupa' nın lider petri kutusu üreticisidir. GOSELIN petri kutuları aseptik şartlar altında temiz oda teknolojisine göre üretilmektedir ve birçok endüstriyel otomatik agar dolum cihazı ile uyumludur.



GOSELIN ,

- Mikroorganizma ve partikül kontrolleri
- Bağımsız laboratuvarlar tarafından gerçekleştirilen mikrobiyolojik testler
- Boyutsal kontroller
- Termal testler (55°C)
- Sath düzlük testleri
- Ham madde testleri (Ağır metal)
- Saydamlık testleri

ile yüksek kalitede, saydam, ısıya dayanıklı, hafif ve mükemmel düzgün satha sahip petri kutuları üretir.

Petri kutularındaki besiyerleri kullanılmadan önce bakterilerin termal şoka girmemesi için oda sıcaklığına getirilmelidirler.