

Kültür

1

- ***Kültür*** : üzerinde veya içinde mikroorganizma üretilmiş besiyeri.
- ***Kültür tipleri:***
 - Saf kültür
 - Karışık kültür
 - Sıvı kültür
 - Katı kültür

KÜLTÜR TİPLERİ

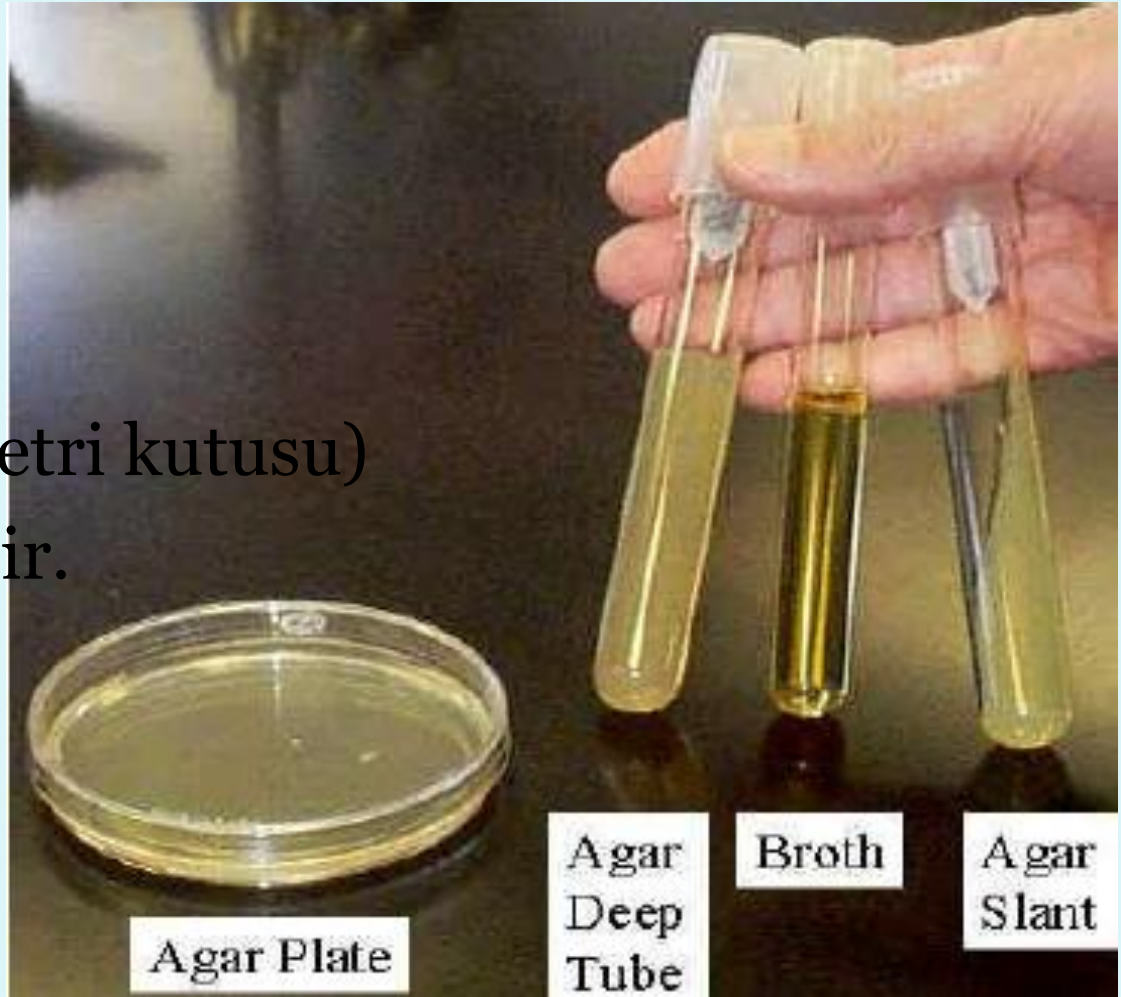
2

- Saf kültür: Besiyerinde yalnızca tek bir mikroorganizma türü üretilmiş kültürlerdir.
- Karışık kültür: İki veya daha fazla çeşitte mikroorganizma türü aynı besiyerinde üretilmişse buna karışık kültür denir.
- Sıvı kültür: Sıvı besiyerinde oluşturulmuş kültürlerdir.
- Katı kültür: Katı besiyerinde (agar içeren) üretilmiş kültürler.

KÜLTÜR TİPLERİ-KATI KÜLTÜR

3

- Yatık agarlı kültür
- Saplama kültür
- Yarı katı kültür
- Plak kültürler
(kültür kabı olarak Petri kutusu)
kullanılan kültürlerdir.





KÜLTÜR YAPMA (KÜLTİVASYON)

5

- Mikroorganizmaların bulundukları ortamdan belirli tekniklerle alınarak uygun besleyici ortama (besiyerine) aktarılması ve burada gelişmelerinin sağlanması aşamalarını içerir.
- Kültüre ait bilgiler hazırlık aşamasında örnek besiyerine aktarılmadan besiyerinin hazırlandığı petri kutusu, tüp, balon veya erlenmayer üzerine yazılmalıdır.

KÜLTÜRE AİT BİLGİLER-etiketleme

6

- İnkübasyonun başlatıldığı tarih ve gerekli ise saat
- Ekimi yapılan örneğin adı veya kodu
- Örneğin dilüsyon oranı (dilüsyon yapılmışsa)
- Gerekirse besiyerinin adı
- Gerekirse inkübasyon sıcaklığı ve süresi



KÜLTÜR ELDE ETME AŞAMALARI

7

Örnek alma ve alınan örneğin inokülasyona hazırlanması (aseptik koşullarda)



Dilüsyon hazırlama ve İnokülasyon (Ekim)



İnkübasyon



KÜLTÜR

AKTARMA TEKNİKLERİ VE KULLANILAN ALETLER

8

- İnokülasyon incelenecek veya geliştirilecek olan kültür mikroorganizmasının uygun besiyerine transferidir.
- İnokulasyon işleminde öze, iğne öze, pipet, eküvyon (yüzeylerden örnek alınırken) kullanılan aletlerdir.
- İnkübasyon: Kültür elde etmedeki en son aşamadır. Ekim yapılmış besiyeri içeren kabın uygun bir inkübatörde belirli sıcaklık derecesinde ve belirli süre tutulması işlemidir. İnkübasyon için genellikle etüv ya da su banyosu gibi inkübatörlerden faydalanılır.



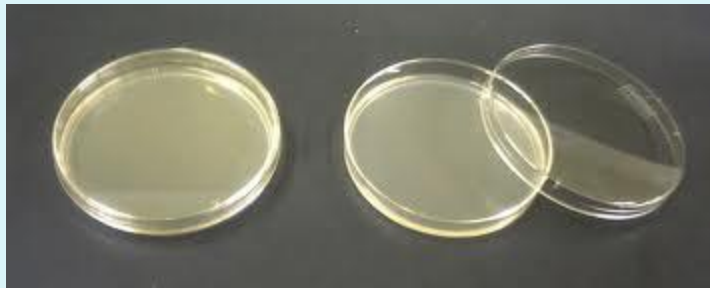
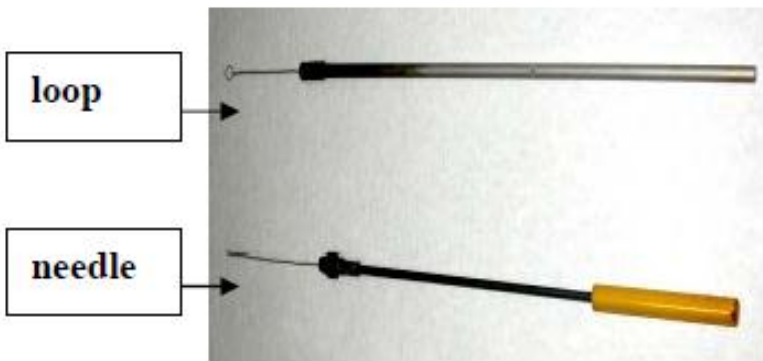
AKTARMA TEKNİKLERİ

10

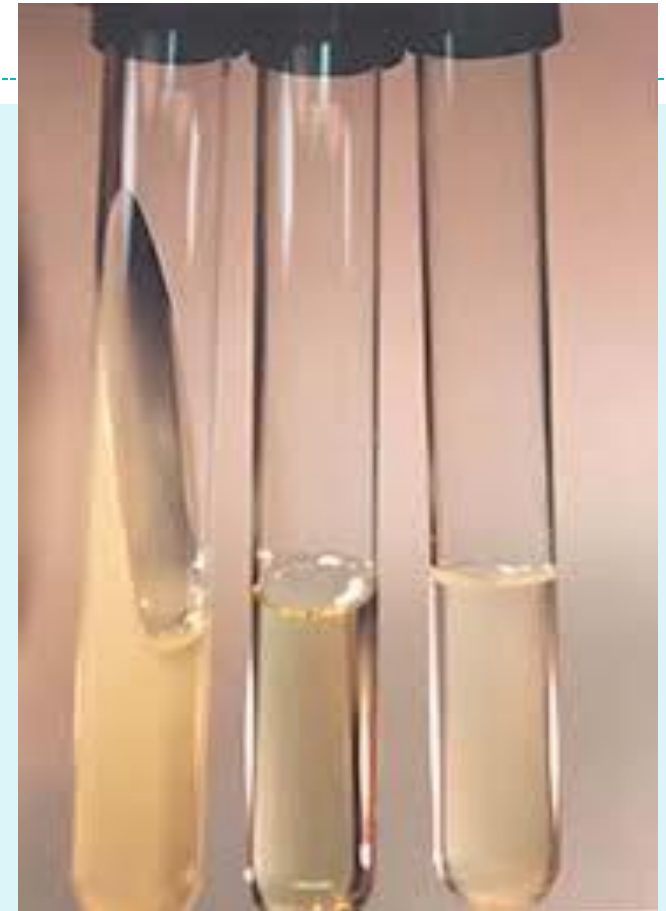
- Tüpteki sıvı besiyerine inokülasyon
- Petri kutusundaki agarlı besiyerine inokülasyon
- Sıvı örnekten direkt aktarma (aktarılacak hacmin önemli olmadığı durumlarda sıvı örnekten direkt olarak aktarma yapılır).
- Yüzeylerden örnek alma ve inokülasyon

Steril eküvyon örnek alınacak bölgeye götürülerek eküvyon çubuğu aseptik koşullarda tüpünden çıkarılarak ucundaki pamuk kısmı yüzeye kuvvetlice sürülür. Daha sonra eküvyon çubuğu hiçbir yere temas ettirilmeden tüpüne yerleştirilir. Tüp en kısa sürede ekim için laboratuvara getirilir. Bunzen beki yanında alev çatısı altında eküvyon çubuğunun ucu daha önceden hazırlanmış olan petri kutusundaki agarlı besiyeri üzerine besiyerine zarar vermeden temas ettirilir. Daha sonra petri kutusunun kapağı kapatılır ve eküvyon çubuğu tüpüne yerleştirilir. Sterilize edilmek üzere ayrılır. Daha sonra petri kutusundaki besiyerinde örneğin temas ettirildiği noktadan başlayarak öze ile sürme işlemi gerçekleştirilir.

- Dik agarlı besiyerine saplama ekim

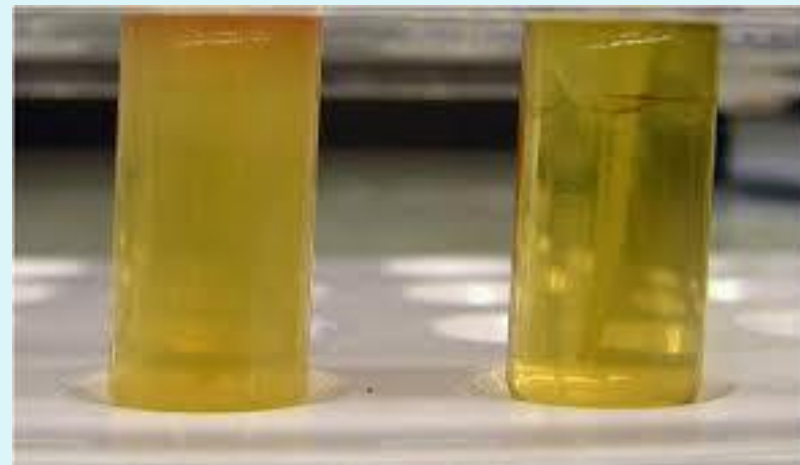
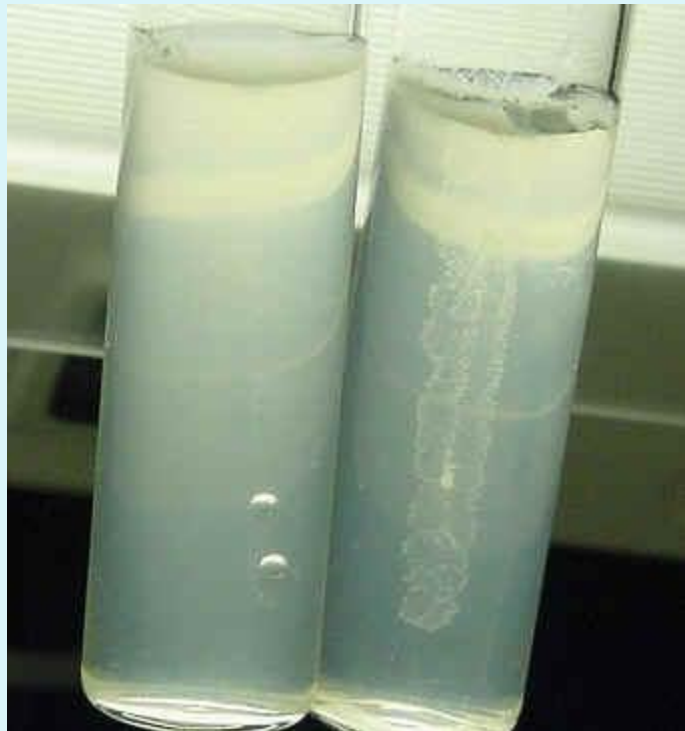


Agar Plate



Agar Slant Broth Agar Deep

DON'T FORGET TO LABEL !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!



PETRİ KUTUSUNDAKİ AGARLI BESİYERİNE İNOKULASYON

13

- Sürme, dökme, yayma tekniklerinden birisi kullanılarak inokülasyon yapılabilir.
- Sürme yönteminde öze kullanılır. Tek koloni düşürme tekniği olarak da ifade edilmektedir.
- Sürme tekniğinde öze ucuyla örnek alındıktan sonra örnek agar yüzeyinin seçilen bir bölgesinden temas ettirilir. Zigzag çizilerek sürme olayı ilerledikçe örnekteki mikroorganizma sayısı ilk sürüldüğü noktaya göre azalmaktadır. Bunun sonucunda inkübasyonu takiben son sürme işleminin yapıldığı agar yüzeyinde izole koloniler elde edilmektedir.

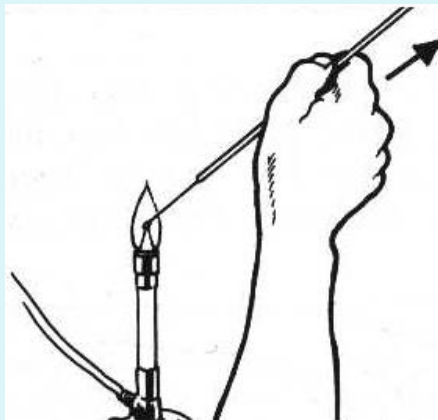
PETRİ KUTUSUNDAKİ AGARLI BESİYERİNE İNOKULASYON

14

- Yayma tekniği: petri kutusundaki besiyeri yüzeyine pastör pipeti ya da 0.1 mL örnek aktarılır. Örnek Drigalski özesi kullanılarak kurutulmuş agar yüzeyine uygun şekilde yayılır.
- Dökme plak yöntemi: Sıvı kültürlerden veya sıvı örnekten (seri dilüsyonlar yapılmış) steril pipetle 1mL alınarak steril boş petri kutusuna aktarılır. Üzerine daha önceden sterilize edilmiş ve 44-48°C'ye ayarlanmış su banyosunda tutulan katı besiyerinden petri kutusuna 15-20 mL dökülür. Besiyeri içerisinde örneğin homojen dağılması sağlanır.

Aseptik teknikler

15



Techniques for isolating Pure cultures

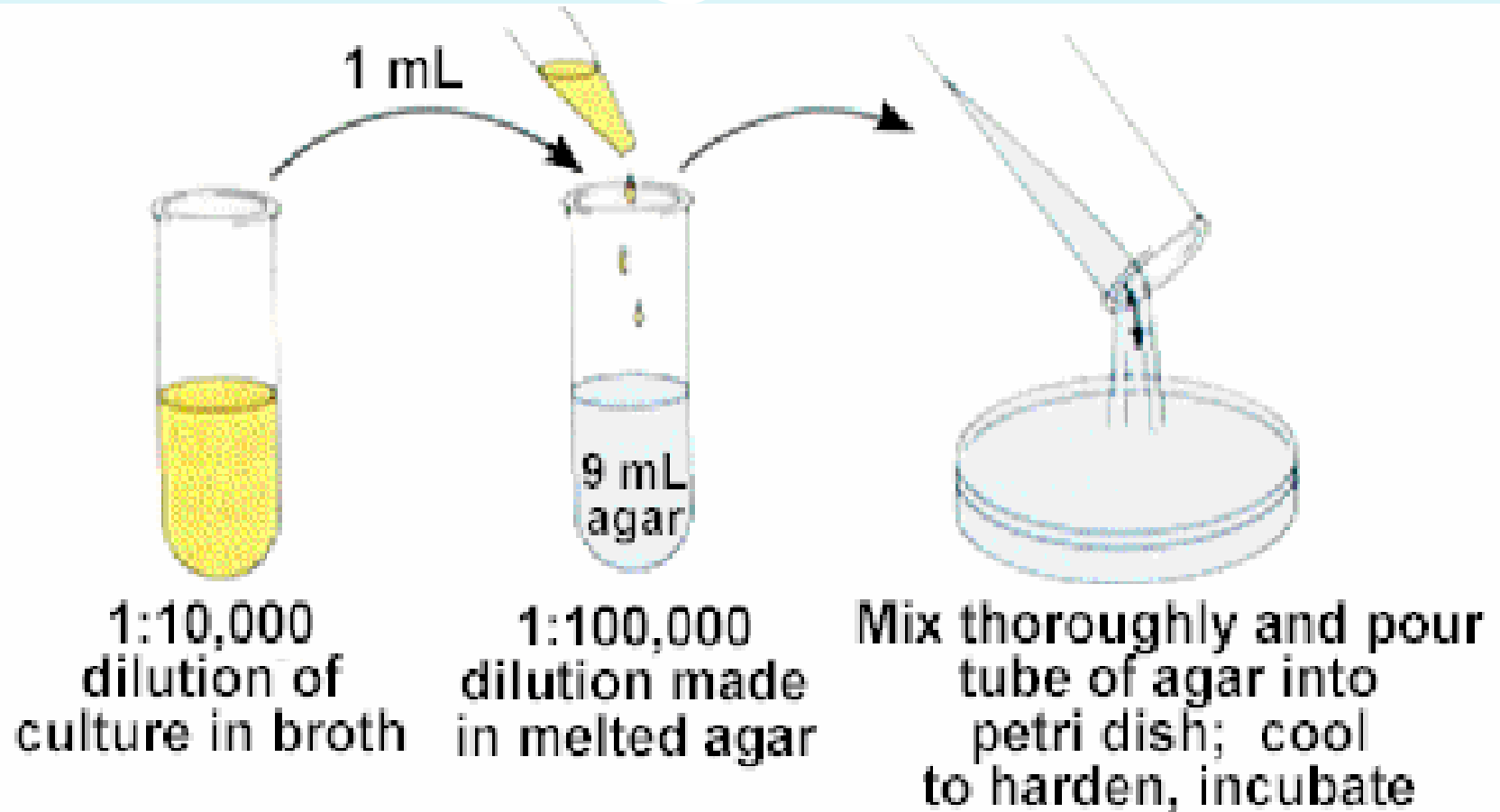
1 Pour Plate

2 Spread Plate

3 Streak Plate

Dökme plak Tekniği

17



Pour Plate Technique

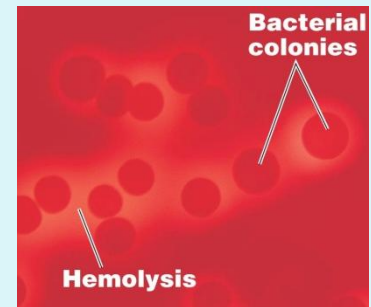
18

- Advantages;

- Microorganisms grow as individual colonies,
- Useful for quantifying microorganisms
- Motile bacteria make discrete colonies
- Supply a sufficiently oxygen deficient environment for growth and quantification of microaerophiles (facultative anaerobes).
- Can be used to determine hemolytic activity of deep colonies of bacteria ex: streptococci on blood agar

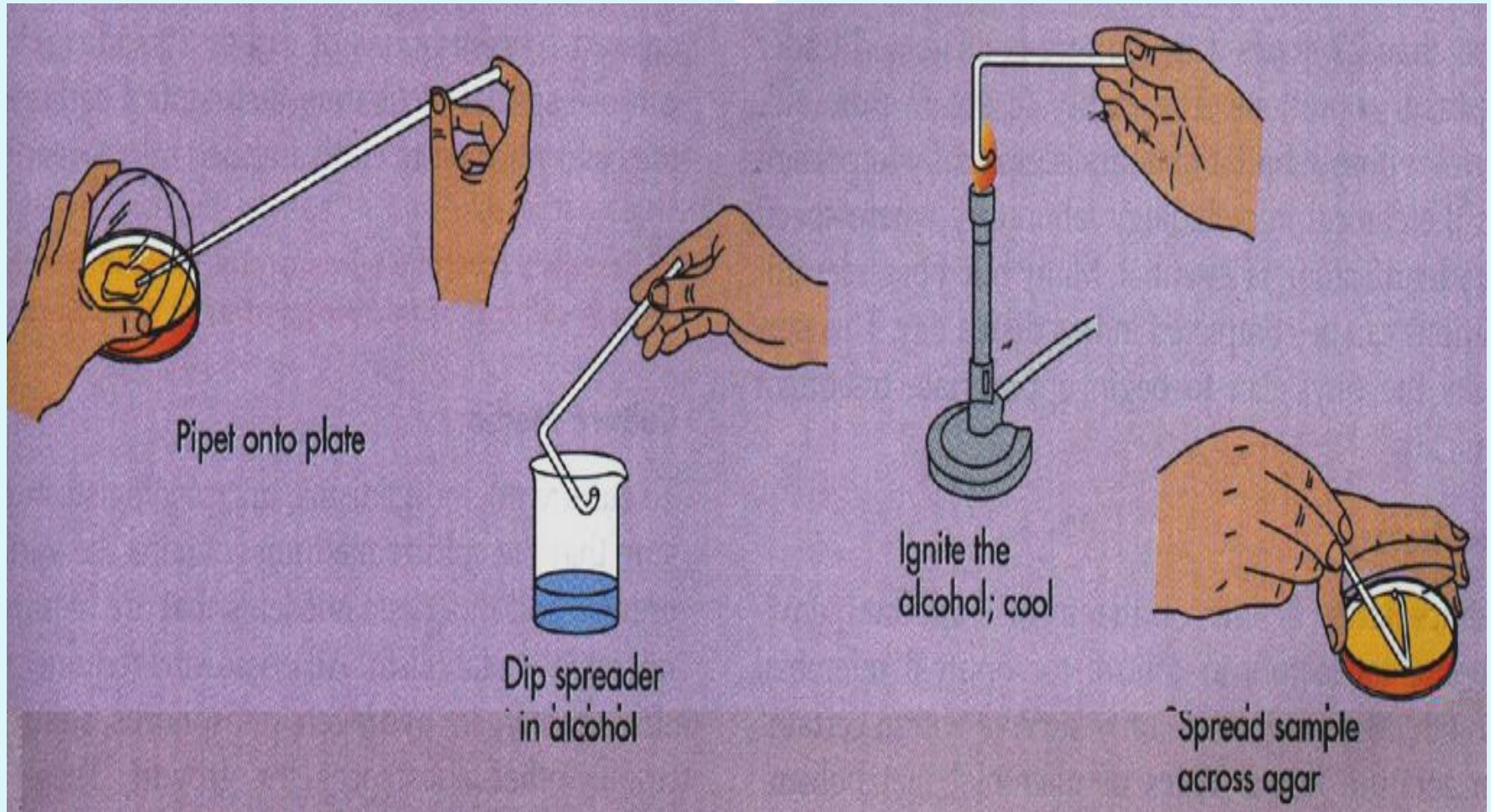
- Disadvantages;

- Similar-looking colonies
- Aerobes may not grow in deep of the plate
- Difficult to pick colonies from below the surface



Yayma plak tekniği

19

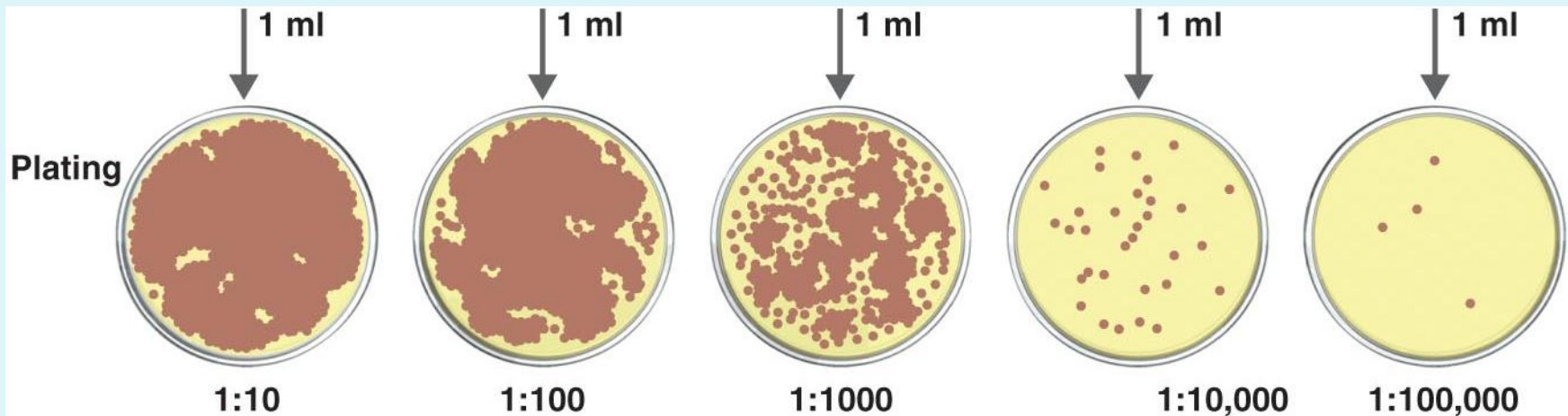
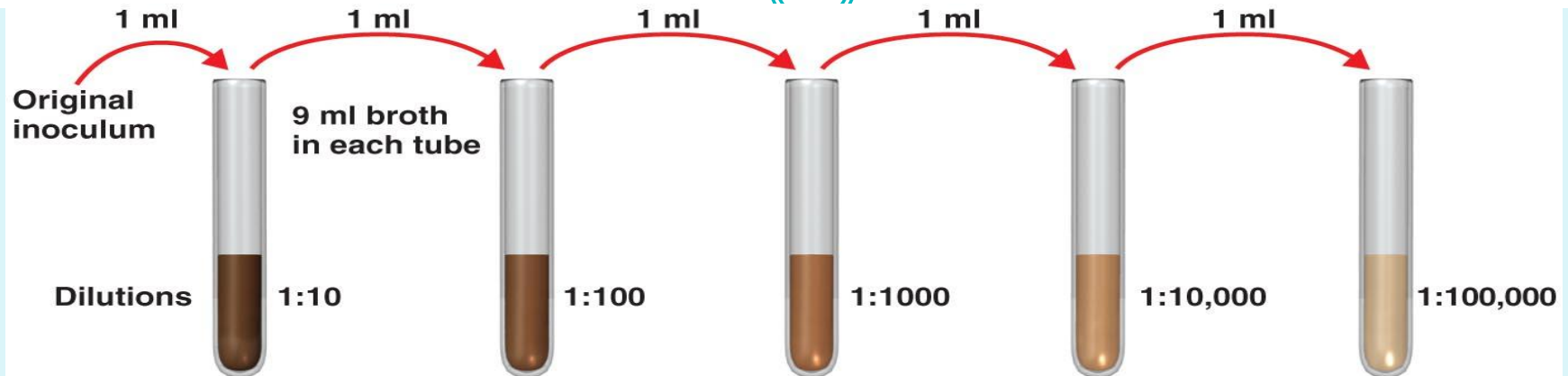


Spread Plate Techniques

20

- Advantages;
- Allow quantification of bacteria
- Bacteria grow on the surface of agar plate (aerobes)
- Bacteria never exposed to molten agar
- Easy to pick colonies for further studies

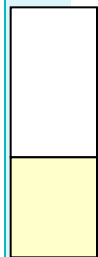
Serial Dilution



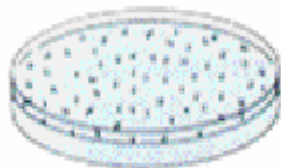
- 0.85% NaCl in dH₂O or broth can be used for dilution
- Count colonies on plates that have 25–250 colonies (CFUs)

Colony forming unit (CFU/mL)

$$\text{CFU/mL in original sample} = \frac{\text{Number of colonies on plate}}{\text{Dilution of solution}} \times \frac{1}{\text{Volume of inoculum}}$$



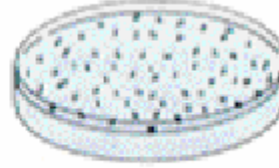
After incubation
count colonies
on each plate



78 colonies



83 colonies



81 colonies

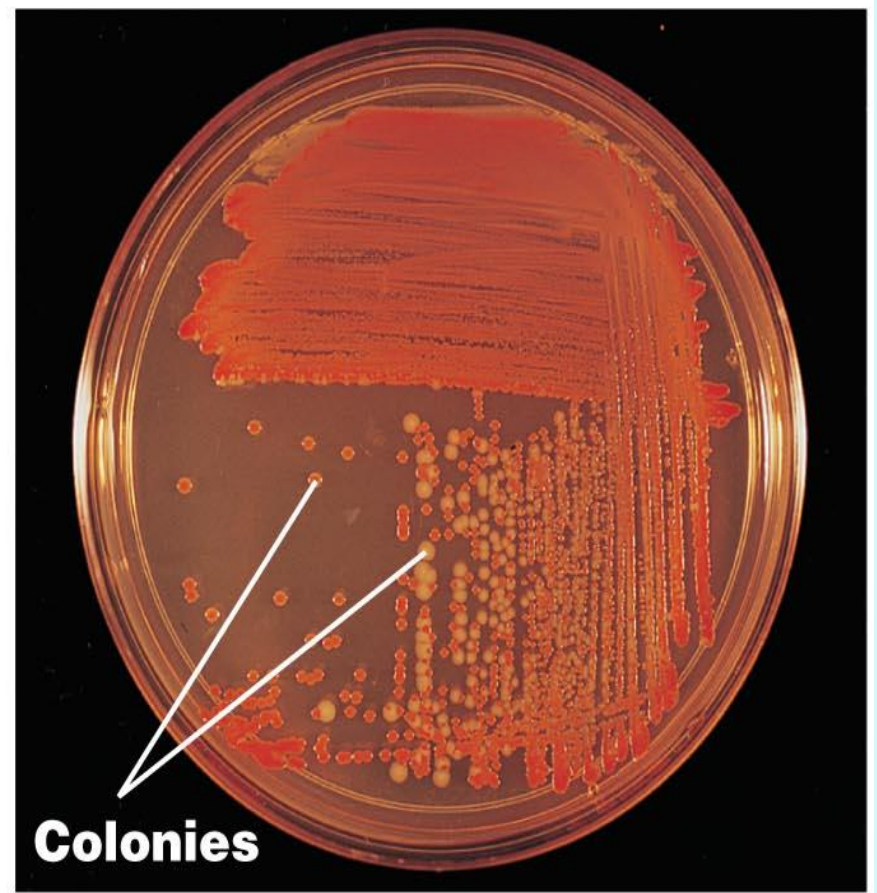
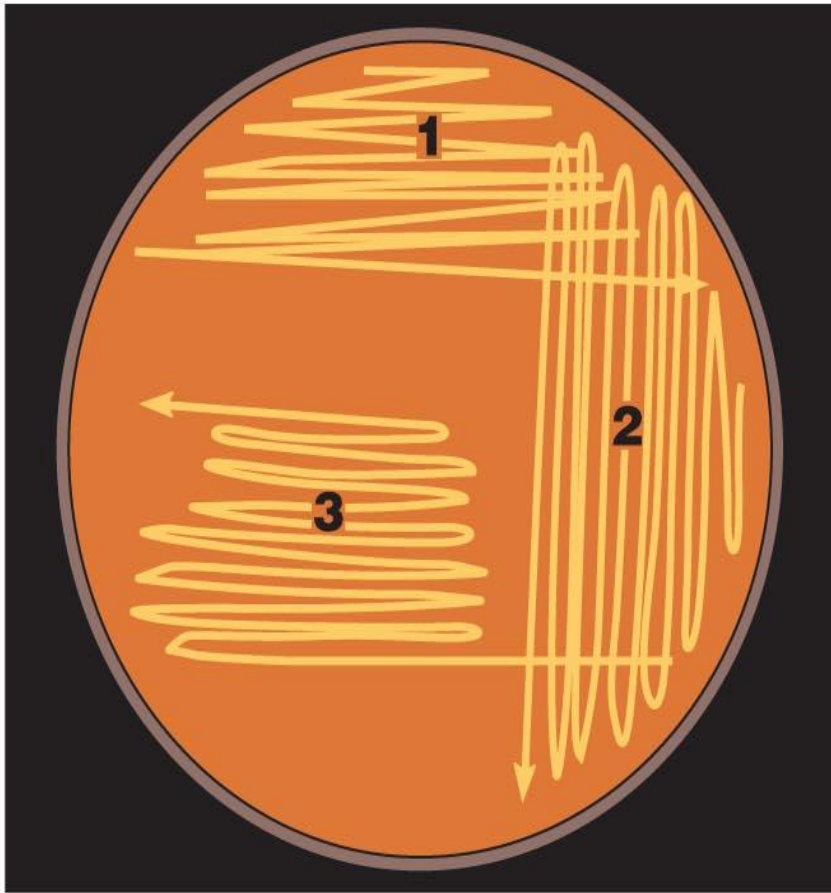
10⁻⁵

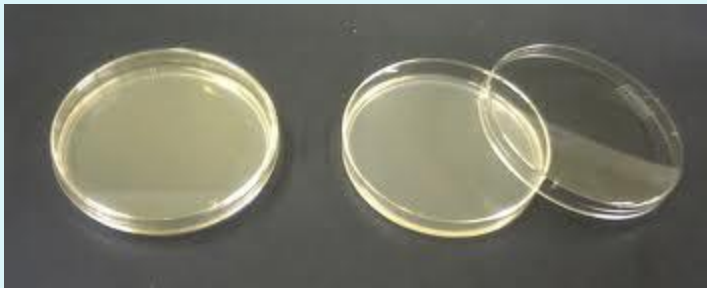
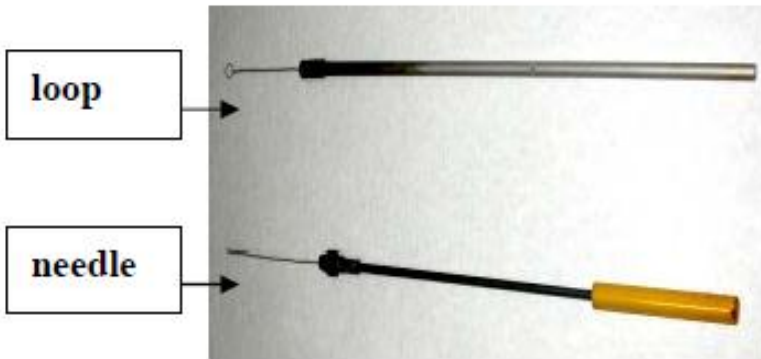
$$\text{CFU/mL} = \frac{78+83+81}{3} \times \frac{1}{10^{-5}} \times \frac{1}{0.1}$$

$$\begin{aligned} &= 81 \times 100.000 \times 10 \\ &= 8.1 \times 10^5 \text{ mL/culture} \end{aligned}$$

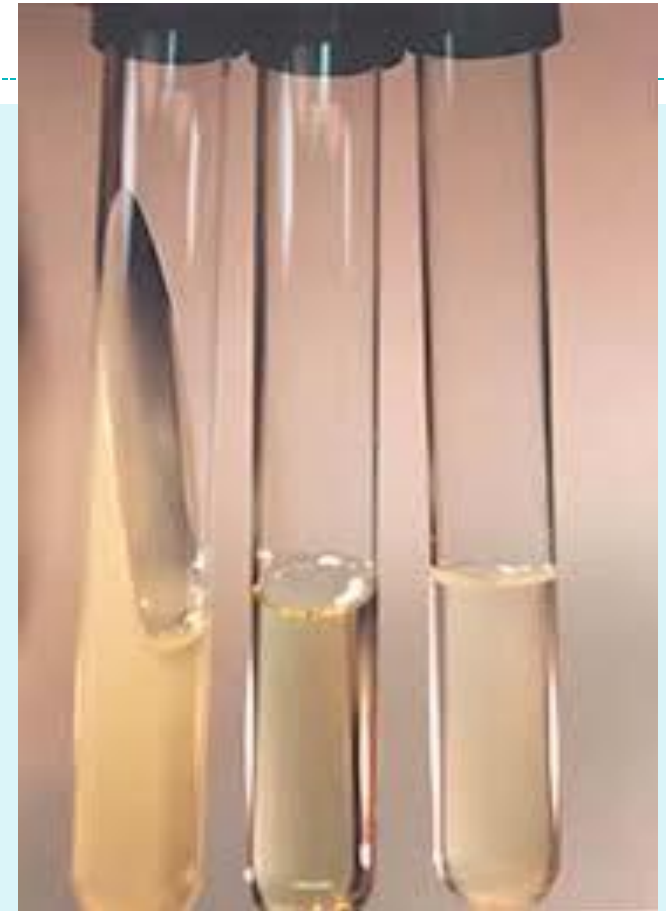
Çizgi plak tekniği

23





Agar Plate



Agar Slant Broth Agar Deep

DON'T FORGET TO LABEL !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

SAF KÜLTÜR ELDESİ

25

- 2 aşamada gerçekleştirilir.
 1. İzole kolonilerin elde edilmesi
(Petri kutusunda uygun besiyerinde)
 1. İzole koloninin ayrılması ayrı bir besiyerine aktarılması
(Genellikle önce sıvı sonra katı besiyerine aktarılması)

KÜLTÜRLERİN MUHAFAZASI

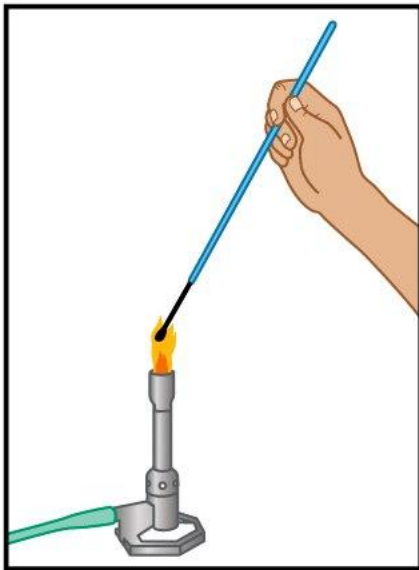
26

- Kùltùrler genellikle buzdolabında 0-5°C'de muhafaza edilmektedir.
- Ayrıca dondurarak derin dondurucuda -20 °C'de ,
- sıvı azot içerisinde -196 °C'de, donmuş halde veya
- liyofilize stok kùltùrlerini hazırlayarak kuru formda canlılık ve aktivitelerini yitirmeden uzun süre saklamak mümkündür.

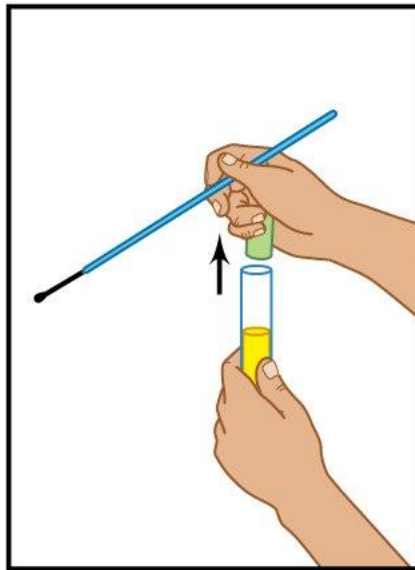
STOK KÜLTÜR

27

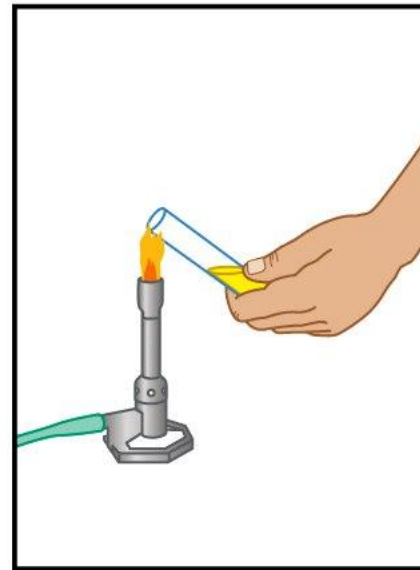
- Saf kültür olarak elde edilen kültürler daha sonra kullanılmak üzere stok kültürleri yapılarak saklanır.
- Stok kültür 2 şekilde yapılabilir.
- **Yatık kültür:** Yatık agarlı uygun besiyeri kullanılır.
- Stok kültür eldesinde inkübasyon süresi kısa tutulur. Agar yüzeyinde kolonilerin görünmesi süre için yeterlidir.
- Stok kültürler genellikle 0-5°C'de buzdolabında ya da karanlık serin bir yerde 1-6 ay bekletilebilir.(mikroorganizmanın özelliğine göre süre (daha az olabilmekte) değişebilmektedir.
- **Liyofilize (freeze-dried) kültürler:** Bu yöntemle mikroorganizmalar bir cam ampul ya da uygun materyalden yapılmış bir poşet içerisinde liyofilize edilerek kuru formda saklanabilir.
- Kültürün aktivasyonu için aseptik koşullarda uygun bir sıvı besiyerine kültürün aktarılarak inkübasyonu sağlanır.



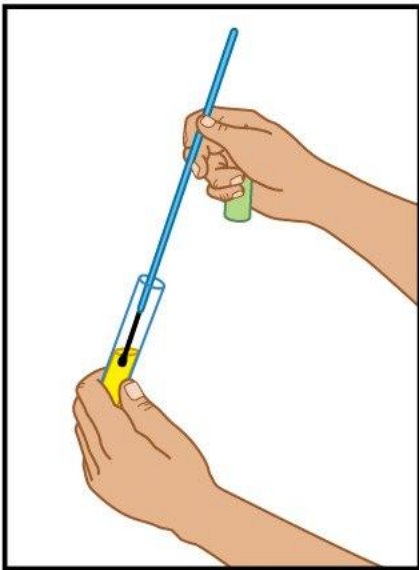
(a)



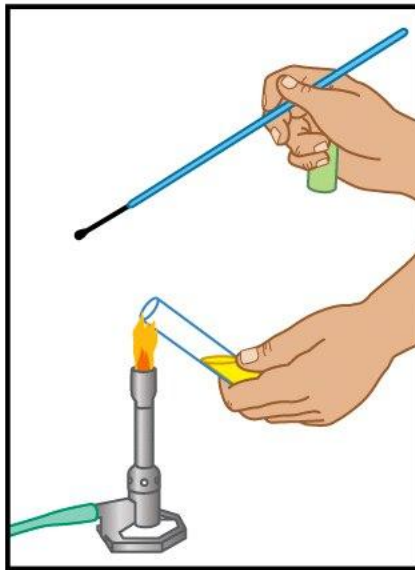
(b)



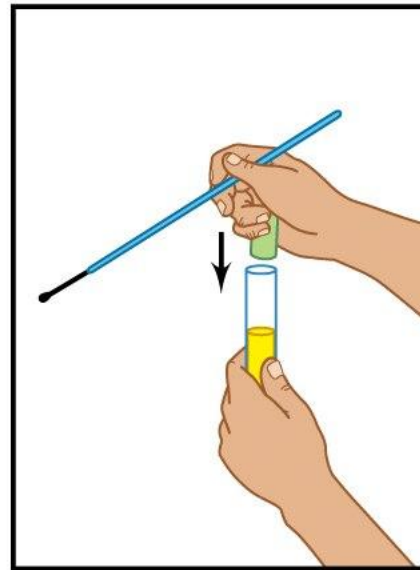
(c)



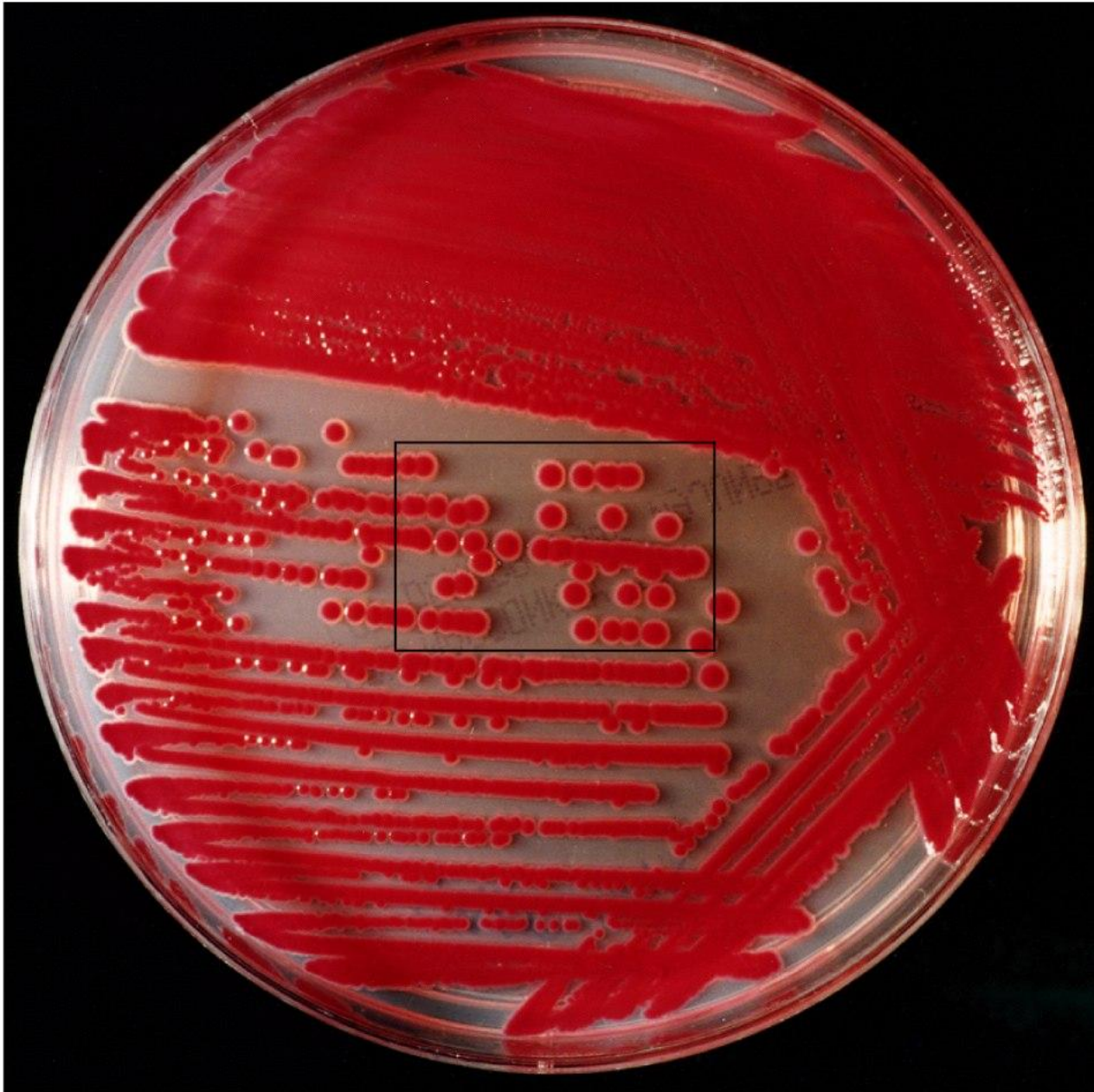
(d)



(e)



(f)



James A. Shapiro, University of Chicago

Figure 5-2a Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.



Figure 5-2b Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

James A. Shapiro, University of Chicago



James A. Shapiro, University of Chicago

Figure 5-2c Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

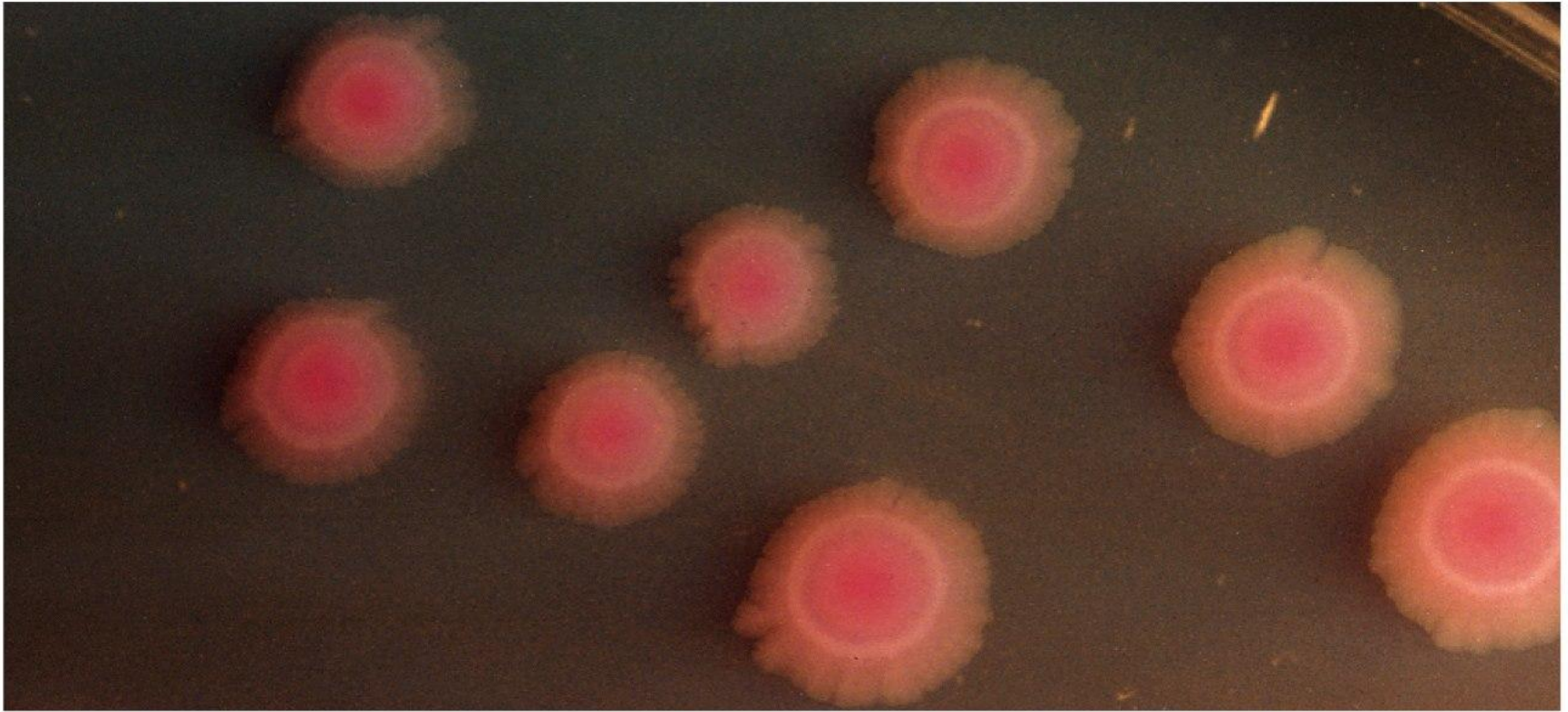


Figure 5-2d Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Başlıklar:

- I- Bakteri hücre bölünmesi**
- II- Bakteri kolonilerinin üremeleri**
- III- Mikrobiyal üremenin ölçümü**

Hücre bölünmesi binary fizyon

34

- Mikroorganizmalar nasıl ürerler?
- Mikrobiyal üreme hücre sayısındaki artışı kapsar
- Birçok mikroorganizmanın üremeleri ikiye ayrılarak (binary fizyon) gerçekleşir.

Hücre bölünmesi ve kromozom replikasyonu koordineli bir şekilde düzenlenir

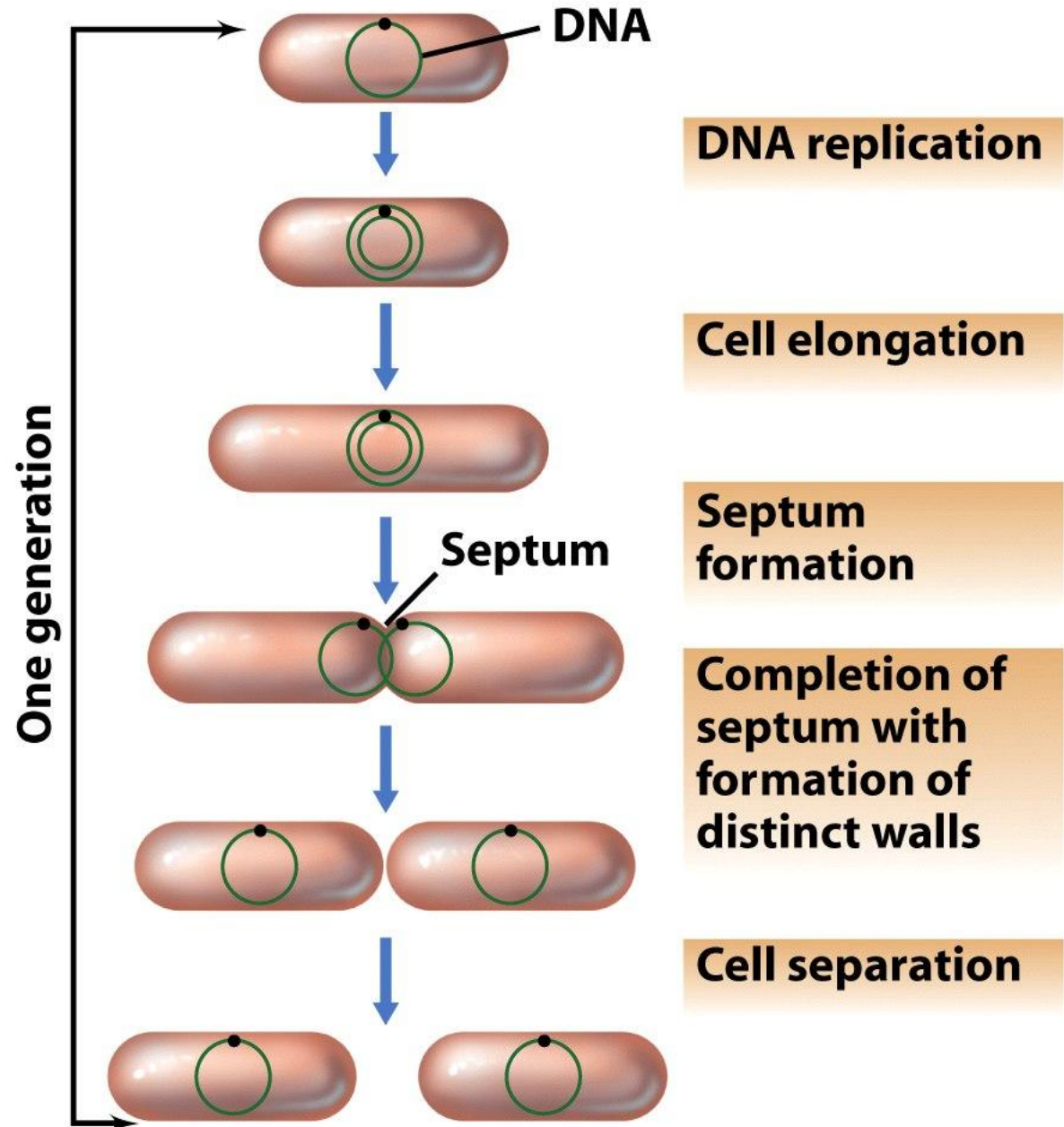
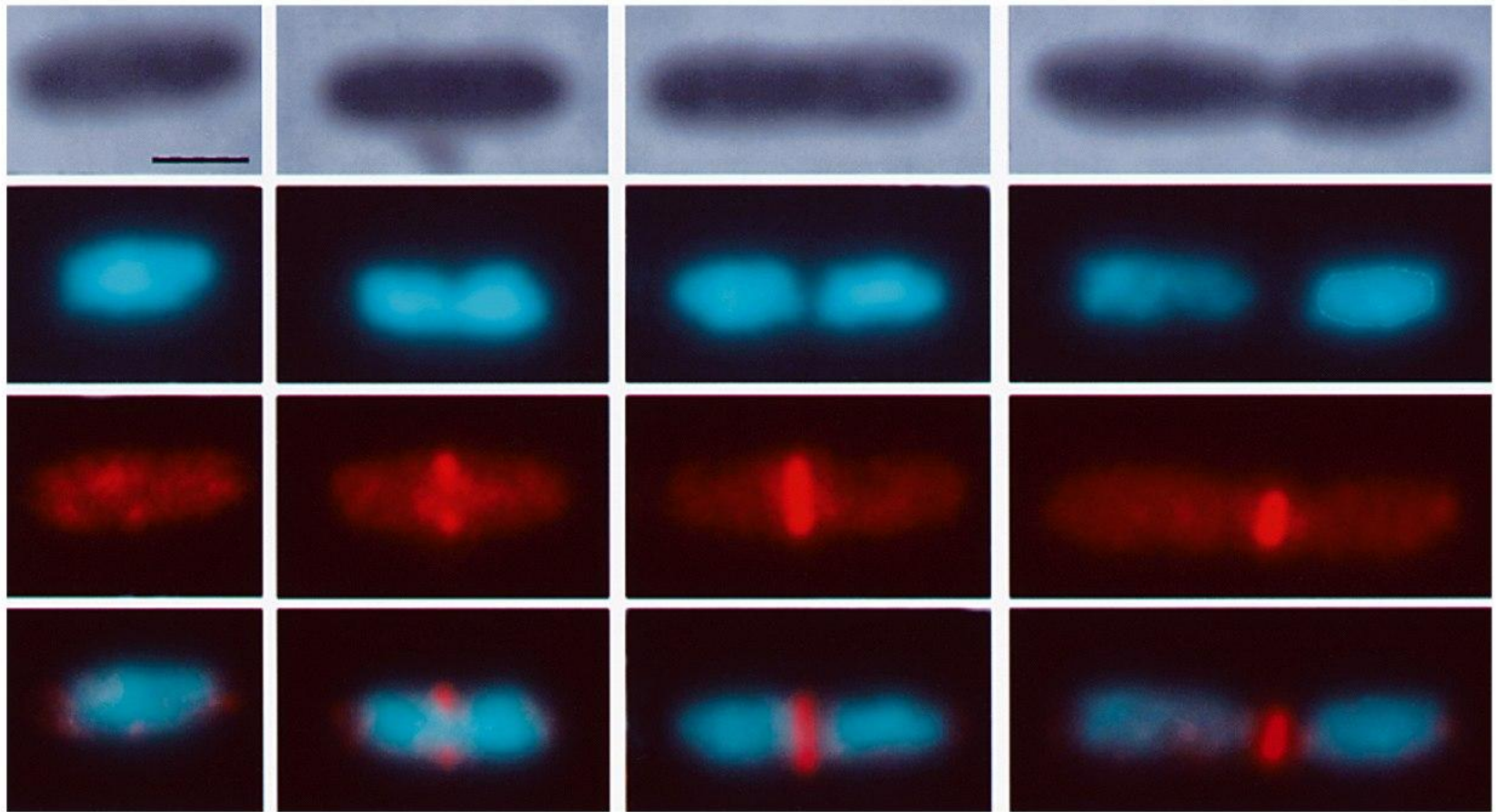


Figure 6-1 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.



T. den Blaauwen & Nanne Nanninga,
Univ. of Amsterdam

Figure 6-2b Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

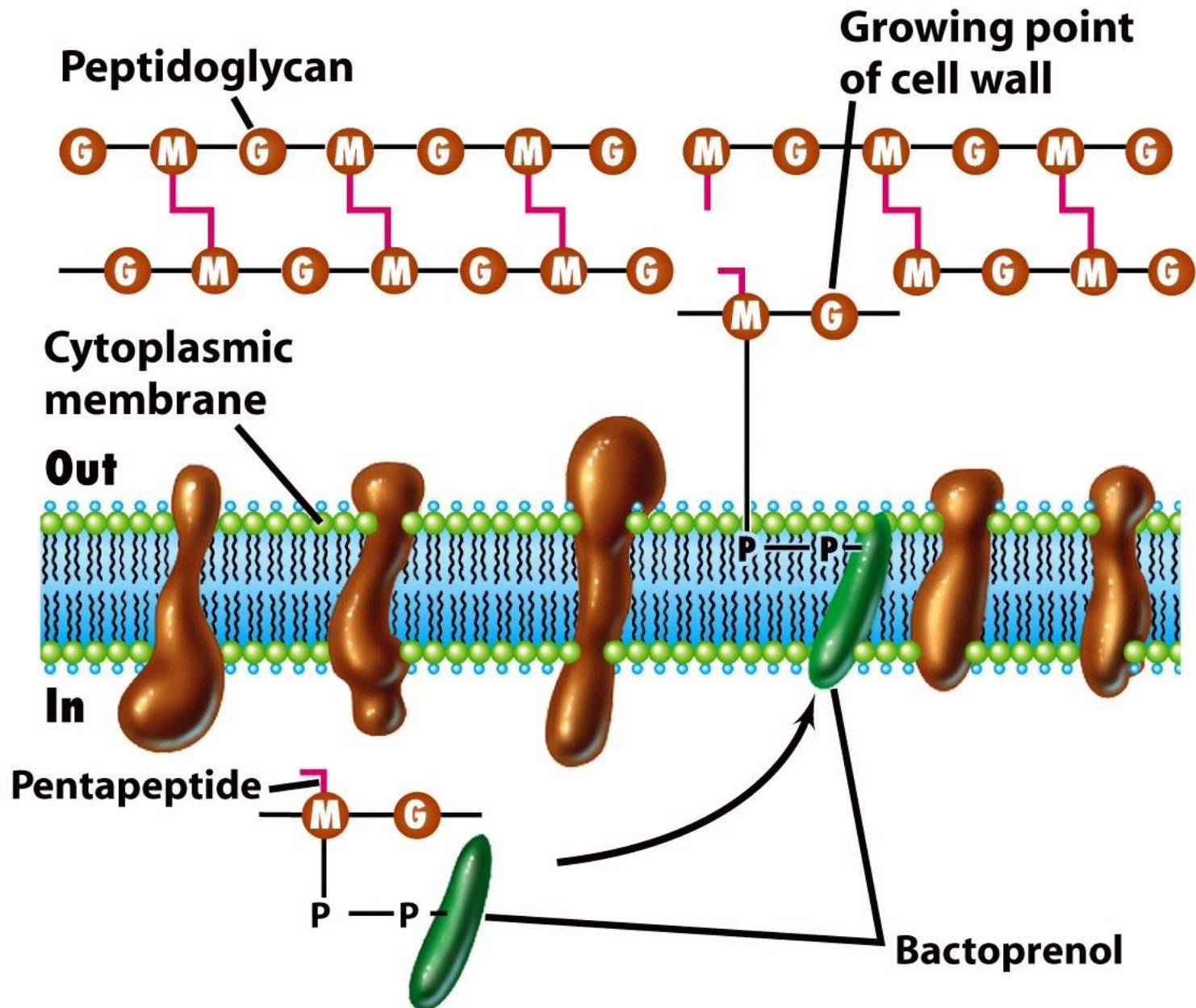


Figure 6-5a Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

- **Transpeptidasyon**

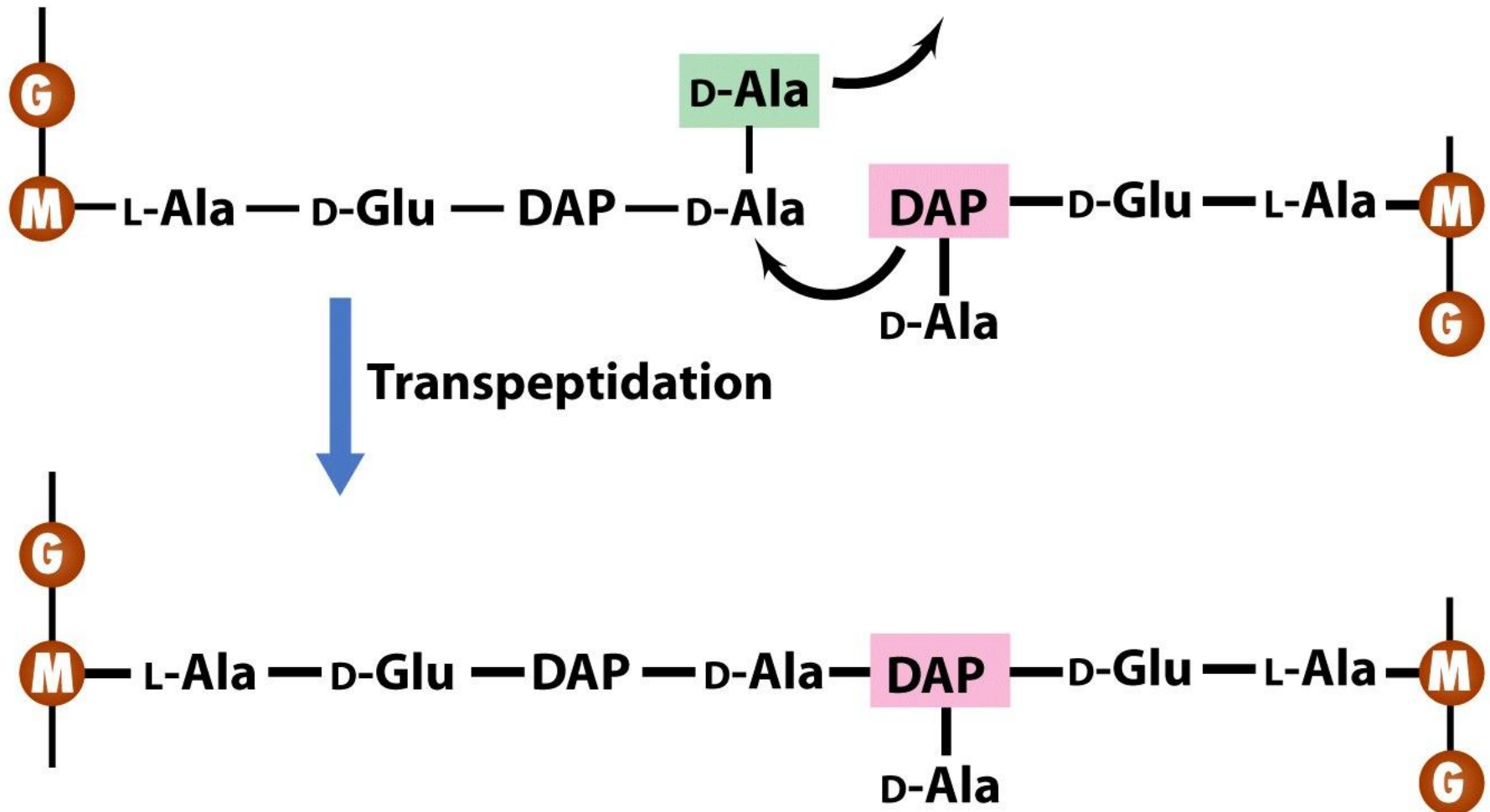


Figure 6-5b Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Penisilinin hedefi!

Mikroorganizmaların Çoğalma Aşamaları

39

- Mikroorganizmaların çoğalma aşamalarının bilinmesi, sanitasyonun sağlanmasında teknolojik işlemlerin öneminin anlaşılması açısından önem taşımaktadır.
- Uygun ortam koşullarında mikroorganizmalar hızla çoğalarak, gıdaların bozulmasına ya da sağlık açısından riskli hale gelmesine neden olmaktadır.
- Mikroorganizmalar uygun koşullarda geometrik bir çoğalma göstermektedirler.
- Örneğin bir bakteri hücresi uygun koşullar altında her 20-30 dakikada bir, ikiye bölünerek çoğalmaktadır.
- Buna göre 1 bakterinin ikiye bölünerek çoğalması sonunda 12 saatte 1 milyarın üzerinde bakteri meydana gelmektedir. (Tablo 2.1)

Saat	Bakteri sayısı
	40
12.00	1
12.20	2
12.40	4
13.00	8
14.00	64
15.00	512
16.00	4 096
17.00	32 768
18.00	262 144

Tablo 2.1 Bir bakterinin ikiye bölünerek çoğalması sonucu 6. saatte oluşan bakteri sayısı

- Mikroorganizmaların çoğalmasında 5 faz bulunmaktadır. Bakterilerin üreme eğrisi Şekil 2.2’de görülmektedir.
- **1.Lag (Adaptasyon) Fazı:** Kontaminasyondan sonra oluşan, mikroorganizmaların yeni ortama adapte olduğu aşamadır.
- ✓ Bu aşamada hücre sayısında önemli bir değişiklik gözlenmez.
- ✓ Lag fazında hijyenik tedbirlerin arttırılması ve sanitasyon uygulamaları ile mikroorganizma sayısı azaltılabilir, lag fazının süresi uzatılabilir veya bundan sonraki faz olan logaritmik üreme fazına giriş geciktirilebilir.
- ✓ Sıcaklık düşürüldüğü takdirde de lag fazı uzatılabilmektedir.

- ✓ Bu devrede mikroorganizmaların metabolik aktivitelerinde artış gözlenir ve mikroorganizmalar iki hücreye yetecek kadar prototoplazma ve diğer gerekli maddeleri sentezlerler, hücreler fazla su aldığından büyür.
- ✓ Özetle belirtmek gerekirse lag fazında mikroorganizmalar bulundukları yeni ortama alışmaya çalışırlar.

- **2.Logaritmik Gelişme Fazı:** Mikroorganizmaların bölünerek sayılarının arttığı aşamadır.
- ✓ Daha önce de belirtildiği gibi bakteriler ikiye bölünmek sureti ile geometrik bir tarzda çoğalırlar.
- ✓ Bu devrede bakteriler belli sürelerde sayıldığı takdirde çoğalma eğrisinin düz bir çizgi oluşturduğu görülür.
- ✓ Genel olarak 15-20 bölünmeden sonra üreme durmakta ve duraklama fazına girilmektedir.
- ✓ Ortamda bulunan besin maddeleri, ortamın sıcaklığı vb. gibi çevresel faktörler logaritmik gelişme fazını etkilemektedir.
- ✓ Bu fazda da etkili sanitasyon önlemlerinin uygulanması ile mikroorganizma sayısı artışının kontrol edilmesi mümkün olmaktadır.

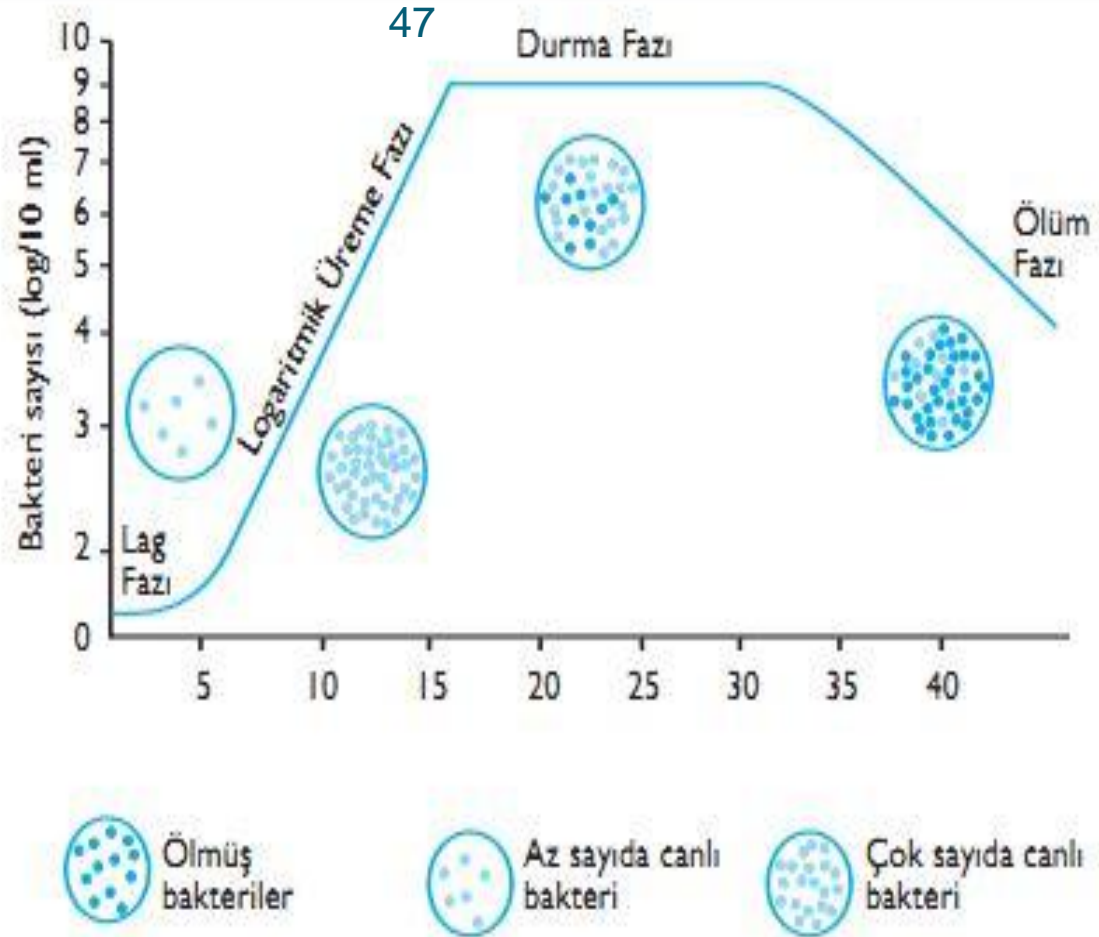
- **3.Duraklama Fazı:** Ortamda bulunan besin maddelerinin azalması, toksik metabolizma artıklarının birikmesi, pH değerinin değişmesi gibi faktörler sonucunda üreme durur.
- ✓ Üremenin durması sonucu sabit sayısal değerlere ulaşılır.
- ✓ Bu fazda ortamdaki metabolizma artıklarında artış gözlenir.
- ✓ Duraklama fazının uzunluğu 24 saat ile 30 günden fazla bir süre olabilmektedir.
- ✓ Bu durum ortamdaki enerji kaynaklarının varlığı ve ortamdaki olumsuz faktörlerle ilgilidir.

- **4.Hızlı ölüm fazı:** Mikroorganizmalar için ortamdaki besin maddelerinin kısıtlanması ve metabolik artıkları miktarının artışı gibi faktörler sonucunda mikroorganizmalarda ölüm oranı hızlanır.
- ✓ Hızlı ölüm fazı logaritmik üreme fazına benzer bir seyir göstermektedir.
- ✓ Bu fazın süresi de 24 saat ile 30 saat arasında değişmektedir.
- ✓ Bunu etkileyen faktörler içerisinde mikroorganizmaların cinsi, türü, uygulanan sanitasyon tekniği, vb. sayılabilir.

- **5.Yavaş ölüm fazı:** Bu faz hızlı ölüm fazının yavaşlaması ile oluşur.
- ✓ Mikroorganizmaların sayısı iyice azalır.
- ✓ Bu fazın sonucunda mikroorganizmalar yıkımlanır ve otosterilizasyon meydana gelir.

Şekil 2.2

Bakterilerin üreme eğrisi



- Mikroorganizmalar bulundukları ortamlarda (kültürler de dahil), optimal koşullar altında, cins ve türlerinin genetik karakterine göre, iyi bir üreme ve gelişme gösterirler.
- Ancak, bu uygun şartlar, aynı durumda uzun bir süre devam etmez ve belli bir zaman sonra, mikroorganizmaların üremeleri sınırlanır ve durur.
- Olumsuz koşullar değiştirilmezse veya iyileştirilmezse, mikroorganizma popülasyonunda ölümler başlar, giderek artar ve canlı mikroorganizma sayısında azalmalar meydana gelir.

- Mikrobiyal populasyonlar karakteristik üreme modellerini eksponensiyal üreme fazında gösterirler; semilogaritmik bir grafikte zamana bağlı olarak hücre sayısında meydana gelen değişme gösterilir

Time (h)	Total number of cells	Time (h)	Total number of cells
0	1	4	256 (2^8)
0.5	2	4.5	512 (2^9)
1	4	5	1,024 (2^{10})
1.5	8	5.5	2,048 (2^{11})
2	16	6	4,096 (2^{12})
2.5	32	.	.
3	64	.	.
3.5	128	10	1,048,576 (2^{19})

Figure 6-6a Brock Biology of Microorganisms 11/e
 © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

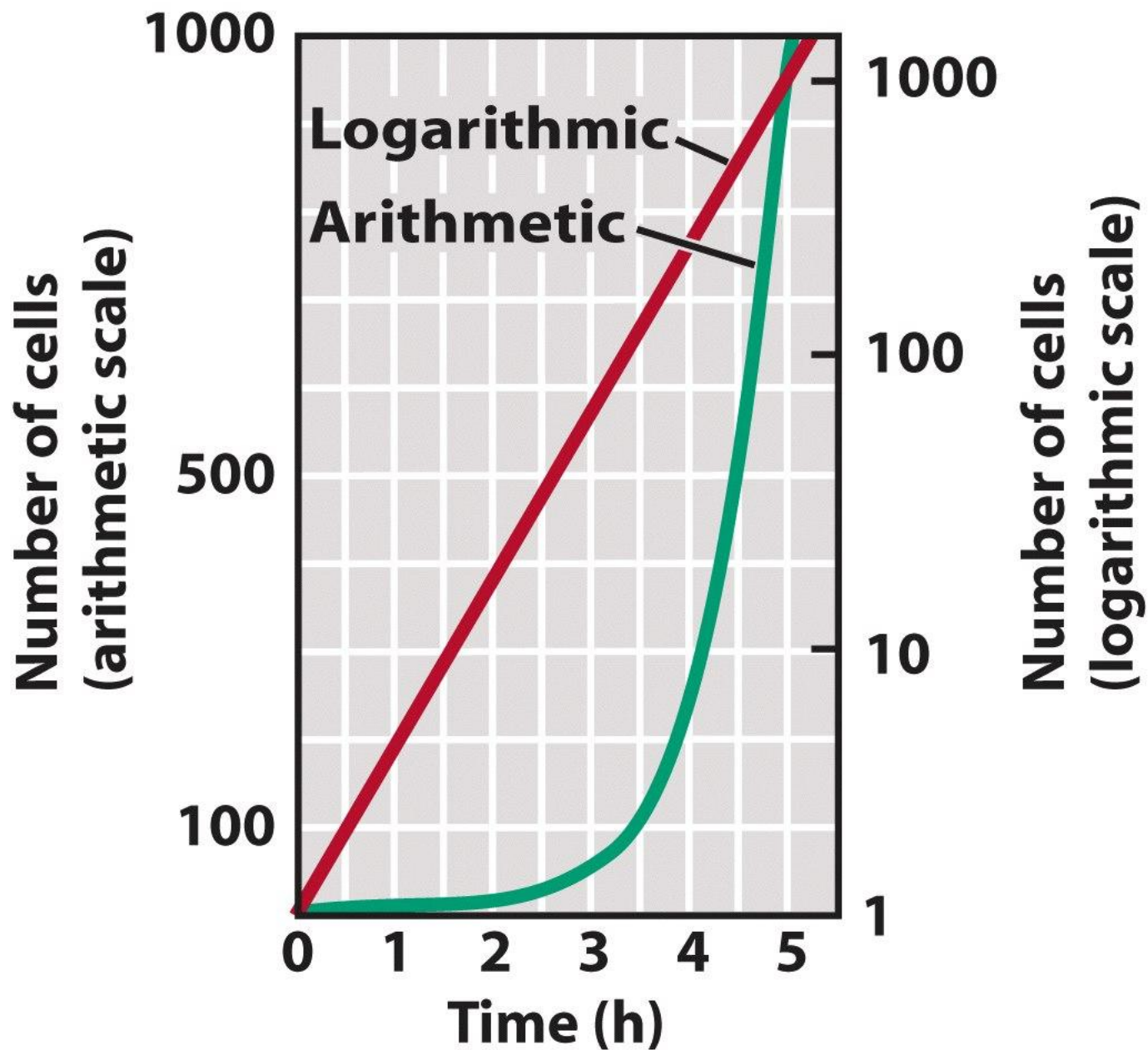


Figure 6-6b Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

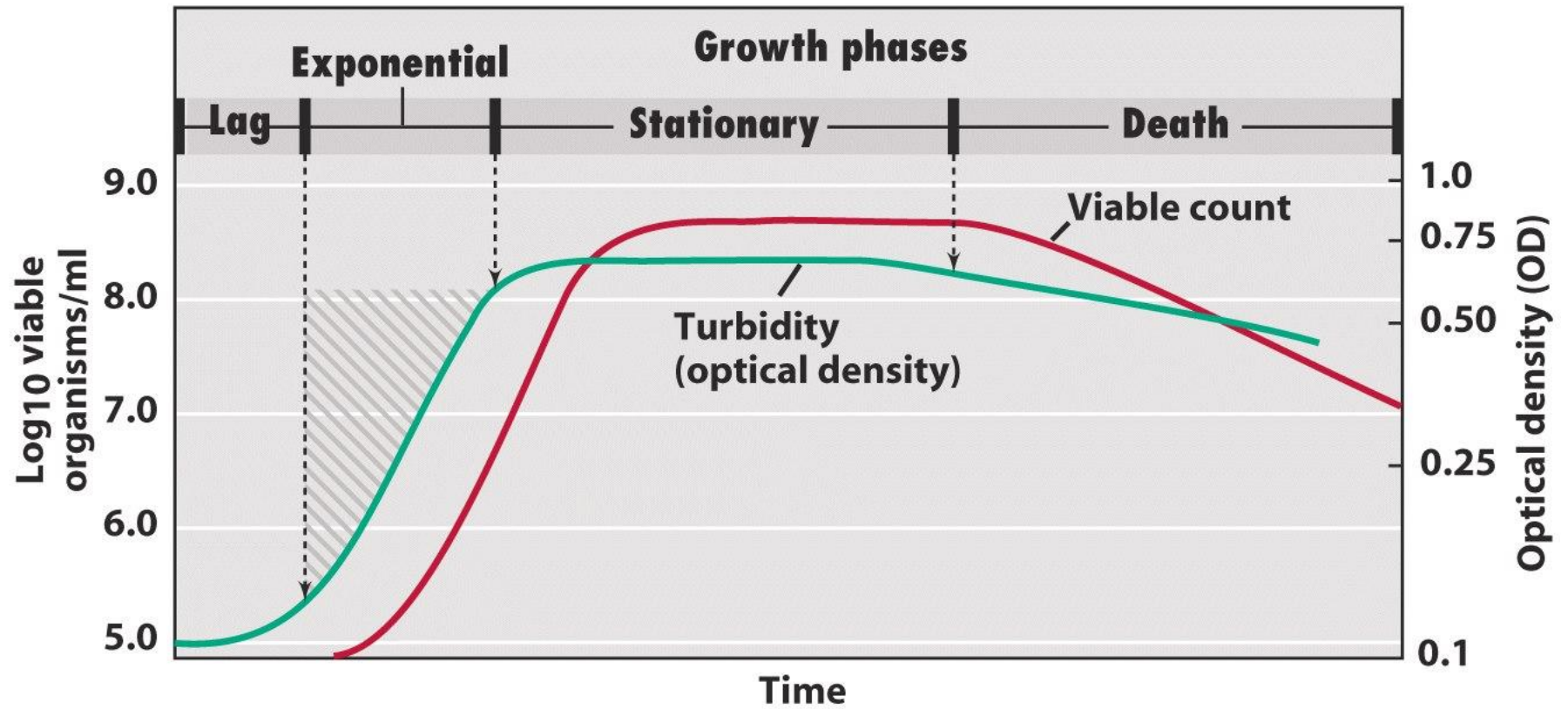
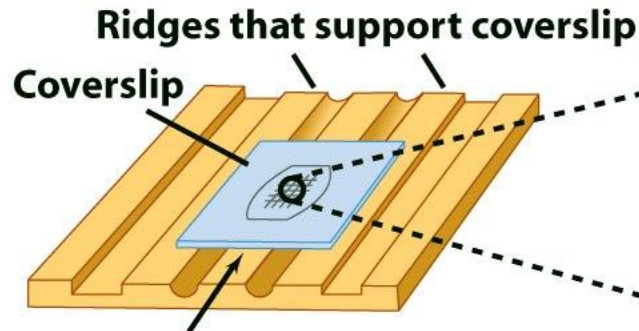


Figure 6-8 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Mikrobiyal üremenin doğrudan ölçülmesi: total ve canlı hücre sayısı

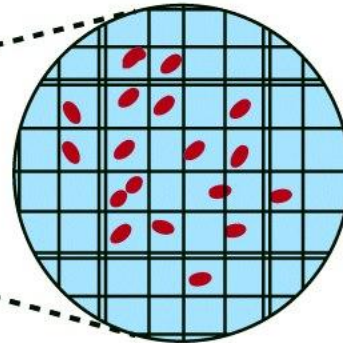
53

- Üreme zamanla hücre sayısındaki değişimle ölçülür. Mikroskopla belirlenen hücre sayısı bir popülasyondaki tüm hücre sayısını ölçer
- Oysa canlı hücre sayımı (plak sayımı) sadece canlı üreyen popülasyonu ölçer.



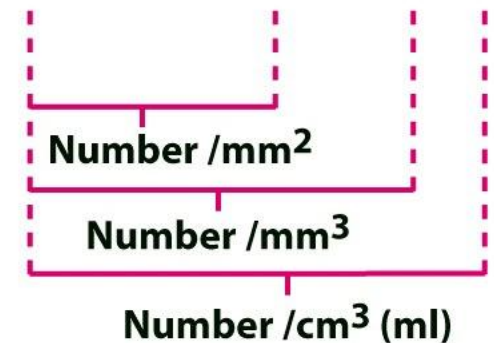
Sample added here; care must be taken not to allow overflow; space between coverslip and slide is 0.02 mm ($\frac{1}{50} \text{ mm}$). Whole grid has 25 large squares, a total area of 1 mm^2 and a total volume of 0.02 mm^3 .

Figure 6-9 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

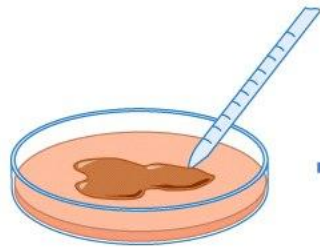


Microscopic observation; all cells are counted in large square: 12 cells (in practice, several squares are counted and the numbers averaged.)

To calculate number per milliliter of sample:
 $12 \text{ cells} \times 25 \text{ large squares} \times 50 \times 10^3 = 1.5 \times 10^7$



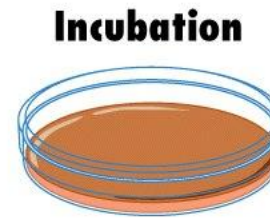
Spread-plate method



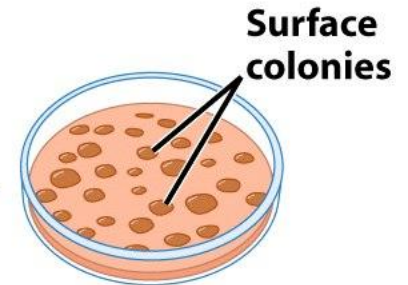
Sample is pipetted
onto surface of agar
plate (0.1 ml or less)



Sample is spread evenly over
surface of agar using sterile
glass spreader

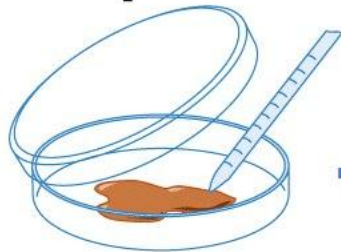


Incubation

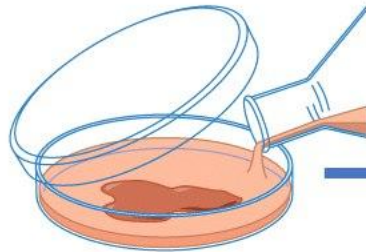


Typical spread-plate
results

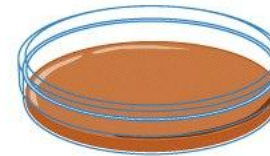
Pour-plate method



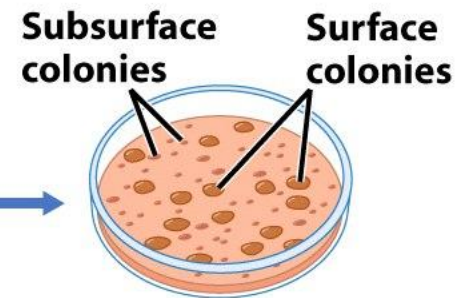
Sample is pipetted
into sterile plate



Sterile medium is added and
mixed well with inoculum



Incubation



Typical pour-plate
results

Figure 6-10 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

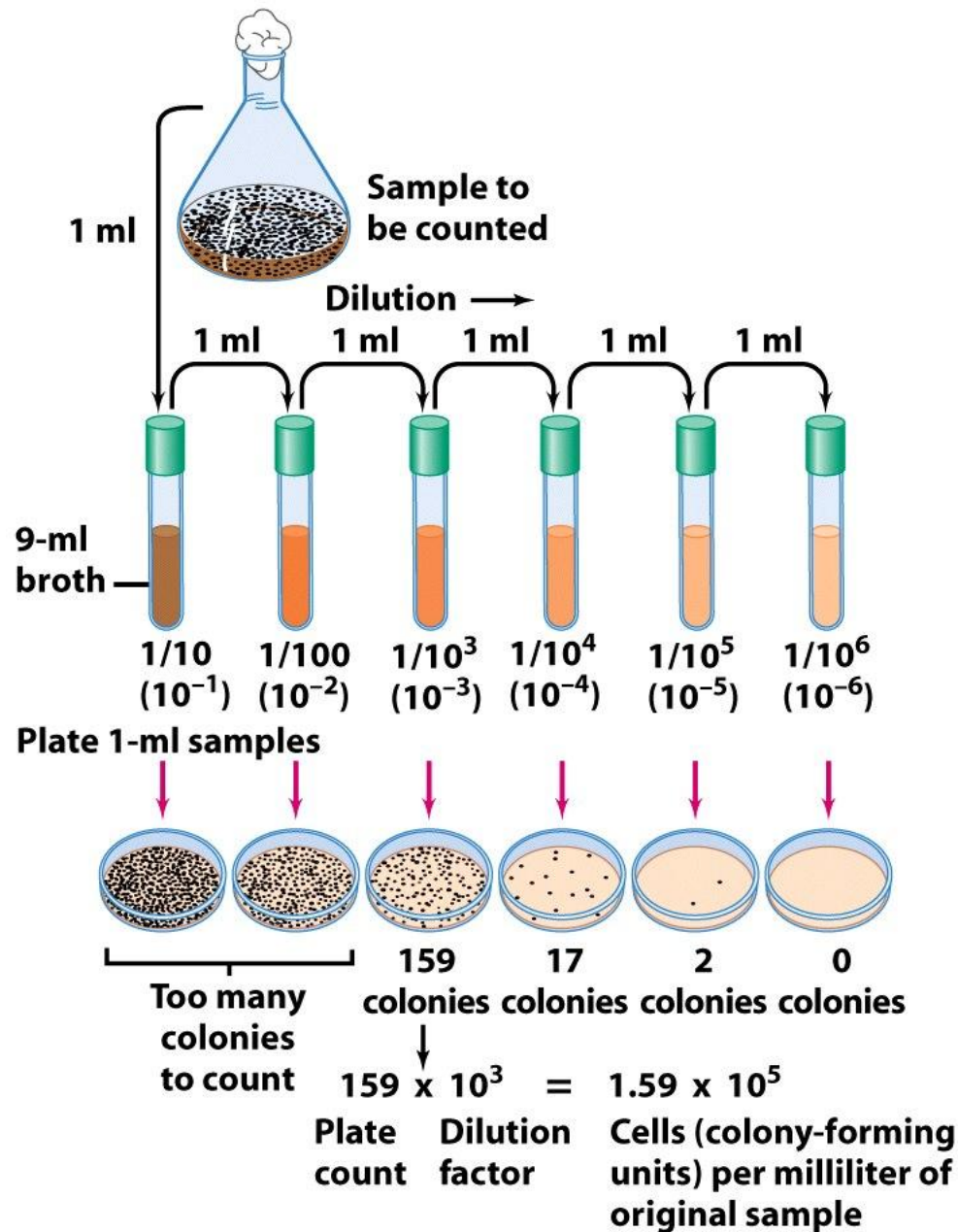


Figure 6-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Mikrobiyal üremenin dolaylı ölçümü:

Turbidite

57

- Bulanıklık (turbidite) ölçümleri dolaylı ancak hızlı ve kullanışlı bir mikrobiyal üreme ölçüm metodudur.
- Ancak, doğrudan hücre sayımını bir turbidite değeriyle ilişkilendirmek için standart eğri oluşturulmalıdır.

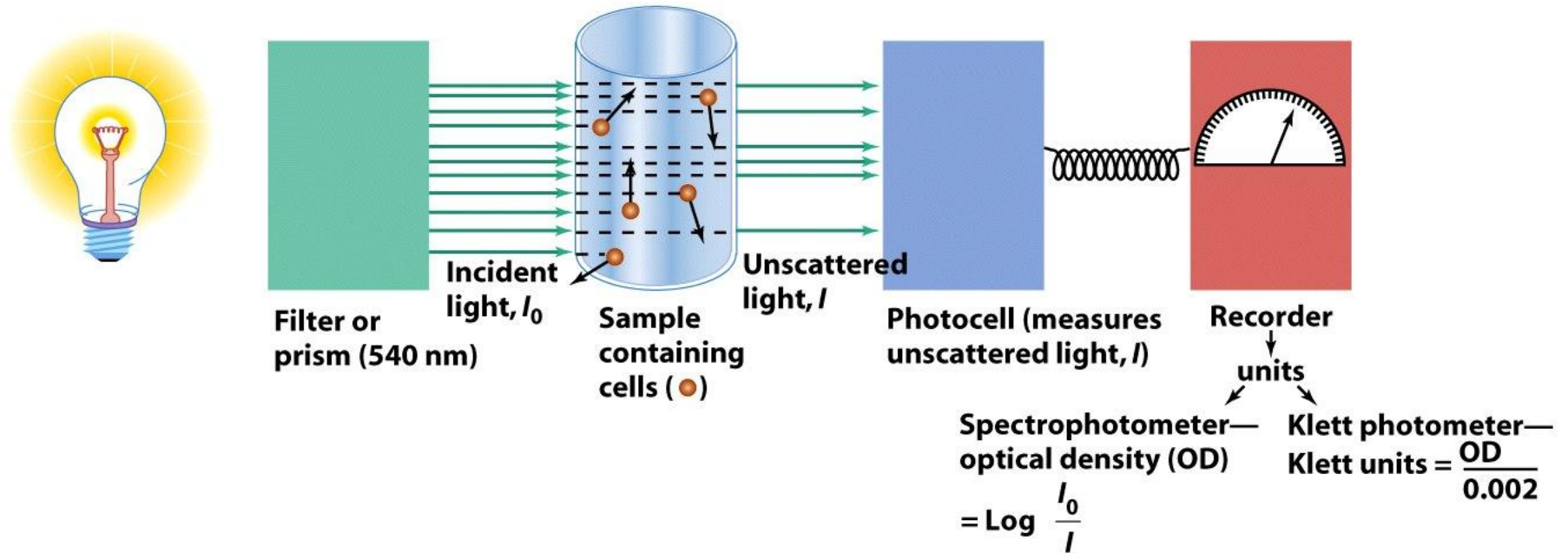


Figure 6-12a Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

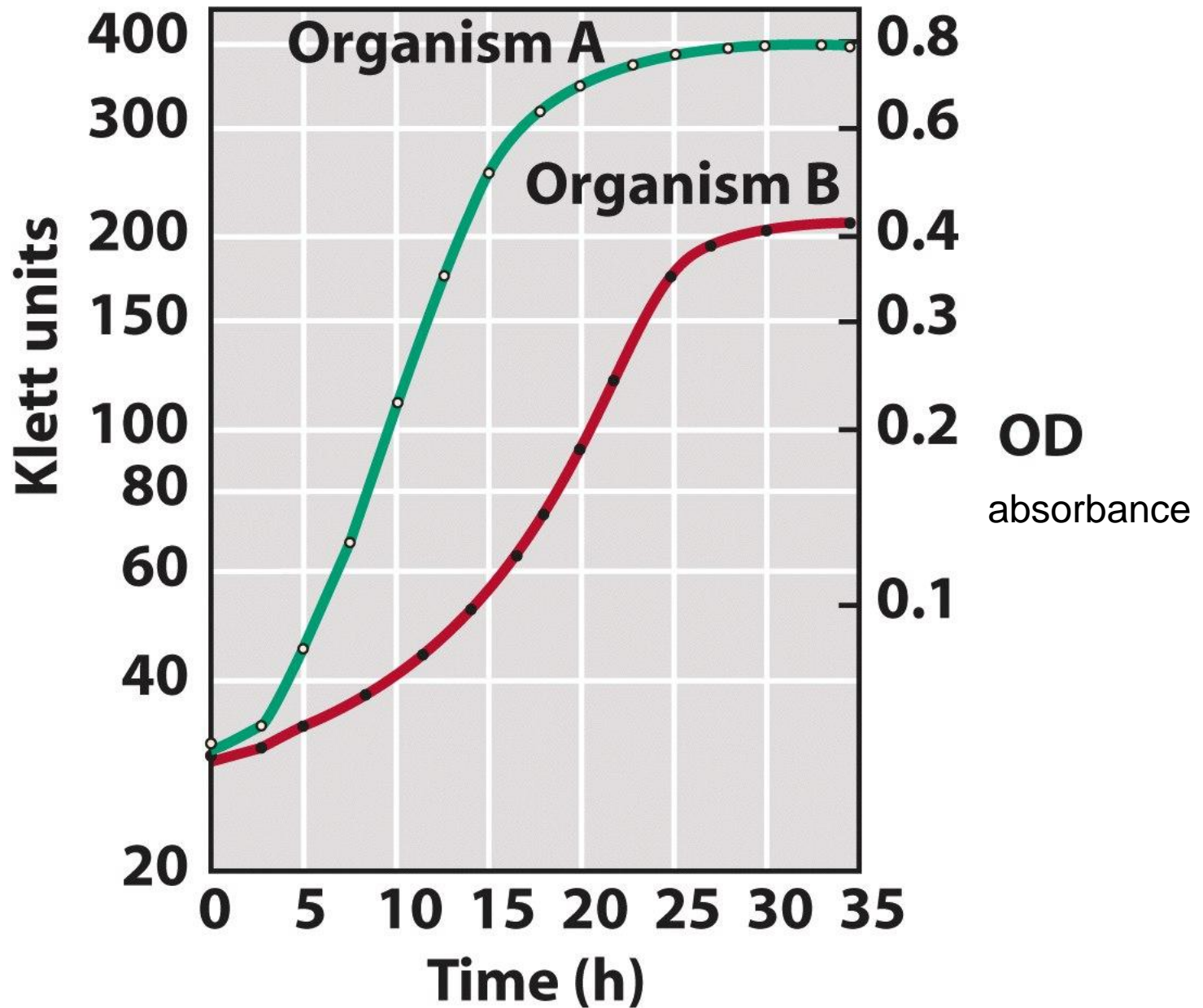


Figure 6-12b Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Sürekli Kültür: KEMOSTAT

60

- Kemostatlar uzun süre eksponensiyal üreme fazında hücre populasyonlarını tutma araçlarıdır.
- Populasyon büyüklüğü kemostata giren üreme sınırlayıcı besin konsantrasyonuyla yönetilir.
- Kemostatta, kültürün seyreltiği oran üreme oranı (hızını) ve üreme miktarını yönetir.