

Mikro-Lab-II-Besiyeri Hazırlama ve Kültür

**Mikrobiyoloji Uygulama
2022**

- **BESİYERİ** Mikroorganizmaların üretilmeleri için gerekli maddeleri içeren hazırlanmış ortamlardır.
- Besiyerleri, mikroorganizmaların üretilmesinde, benzerlerinden ayırt edilmesinde ve özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır.
- Besiyerleri farklı tipte mikroorganizmaların ihtiyaç duydukları genel gıda maddeleri ve üreme faktörlerine göre hazırlanır.
- Prototrof bakteriler : Üreyebilmek için basit ortamlara gerek duyarlar.
- Okzotrof bakteriler: Üreyebilmek için organik ve inorganik maddeler ve üreme faktörlerine gerek duyarlar.

- **Klinik örneklerden (doku, organ) ekim**

İnsan ve hayvanlarda hastalık oluşturan çeşitli mikroorganizmaların izole edilmesi, saf olarak elde edilmesi ve identifikasyonu (tanımlanması) amacıyla ekim yapılır.

Bakterilerin canlılığını sağlamak için belirli aralıklarla pasaj yapılmaları (aynı tip başka besiyerine ekim yapılır).

- Mikroorganizmalardan aşı, antiserum, antijen gibi gerekli maddelerin elde edilmeleri ve bilimsel araştırma amaçlı olarak üretilmeleri gerekir.

Besiyerleri

- Mikroorganizmalar 2 farklı ortamda üretilir
 - * **Canlı ortamlar**
 - Deney hayvanları (konvansiyonel, SPF, GF)
 - Doku kültürleri
 - Embryolu Tavuk Yumurtası
 - * **Cansız Ortamlar**
 - Besiyerleri (sıvı, katı, yarı katı)

Besiyeri Çeşitleri

- 1) **Genel besiyerleri:** Laboratuarda her zaman hazırlanan ve kullanılan hazırlanması kolay besiyerleridir. Mikroorganizmaları üretecek karbon ve enerji kaynaklarına ve diğer faktörlere (amino asit, mineral) sahiptir. Sıvı veya katı olabilir. Serum, kan veya pişmiş kıyma gibi diğer maddeler ilave edilmiş olabilir. Kanlı agar, serumlu buyyon vb.

Özel Besiyerleri

- Çalışma amacına göre farklı tipte besiyerleri kullanılır.
- **a) Seçici (selektif) besiyerleri:** Bu tür besiyerlerinin içinde üretilmesi istenen mikroorganizmayı baskılamayan ancak, istenmeyen mikroorganizmaların üremesini inhibe eden seçici antimikrobik maddeler, kimyasal maddeler, safra tuzları bulunur.
- Örnek: Gram negatif mikroorganizmaları izole etmek için Gram pozitif bakterilerin çoğunu inhibe eden Kristal violet besiyerine katılır.
- Safra tuzları Salmonellaları koliform bakterilerle kontamine ortamdan ayırt etmede kullanılır.
- Gram pozitifleri izole etmek için, ortama Gram negatifleri inhibe eden maddeler (thallium asetat vb) ilave edilir

- **b) Diferensiyel (Ayırtıcı) besiyerleri**
- Bu besiyerlerine katılan çeşitli indikatörler ve kimyasal maddeler yardımıyla, üreyen kolonilerin aldıkları renge göre mikroorganizmaları tanımlamak mümkündür.
- Örn: Laktoza etkili barsak bakterilerini, farklı kolonilerden ayırt etmede kullanılan Endo agar, EMB (Eosin metilen blue) agar ve Mac Conkey agar gibi besiyerleri kullanılabilir.
- Mac Conkey agarda Salmonellalar renksiz koloniler oluşturur.
- Kanlı agar hemolitik olanlar ile olmayanları ayırmada kullanılır

c) Zenginleştirilmiş besiyerleri

İstenmeyen mikroorganizmaların üremesine engel olan ve izolasyonu yapılacak olan mikroorganizmanın bol üremesini sağlayan besiyerleridir. Genelde sıvı temel besiyerlerine kan, serum, glukoz, yumurta gibi maddelerin ilavesi ile hazırlanır. Basit besiyerlerinde üretilmeyen bazı mikroorganizmalar bu ortamlarda üretilir.

- Salmonellaları ayırt etmek amacıyla Selenit F, tetrathionatlı buyyon kullanılır.

d) Özgül besiyerleri

Yalnız tek veya sınırlı sayıda mikroorganizmanın üretilmesi amacıyla kullanılan besiyerleridir.

- *Mycobacterium tuberculosis* için kullanılan Löweinstein Jensen besiyeri,
- *Corynebacterium diphtheriae* için kullanılan Löffler besiyeri

e) Ayıraçlı besiyerleri

Sıvı ve katı olarak hazırlanan bu besiyerlerinin bileşimine çeşitli indikatörler (bromtimol mavisi, fenol red,...) ve kimyasal maddeler (karbonhidrat, sitrat, üre....) katılır. Bu maddeler yardımıyla mikroorganizmaların çeşitli biyokimyasal özellikleri belirlenir.

f) Özel Amaçlar için Kullanılan Besiyerleri

Toksin, enzim, ara maddeler ve antibiyotikleri elde etmek için kullanılır.

g) Sentetik Besiyerleri

Bu besiyerlerinin bileşimine giren maddelerin kimyasal yapıları bellidir. İçerikleri mikroorganizmaların ihtiyaçlarını karşılayacak yeterliliktedir.

Karbon ve enerji kaynağı olarak glukoz veya laktat, inorganik nitrojen olarak amonyum tuzları ve inorganik maddeler kullanılır.

Besiyerlerinin İçeriğine Giren Maddeler

Su: Besiyerlerinin temelini oluşturur. Distile su kullanılır.

Agar: Deniz yosunlarından elde edilir. Yapısında, polisakkaritler, inorganik tuzlar, çok az miktarda protein benzeri maddeler de yer alır.

Agar, parçalayabilen az sayıdaki bakterinin dışında, mikroorganizmaların büyük çoğunluğu tarafından ayrıştırılamaz.

Agar sıvıların içerisinde ısıtılınca 95°C de erir.

Soğumaya bırakıldığında 42°- 45°C de katılaşır



- **Agar**, sıvı ortamları katılaştırmak amacıyla %1.5-3, yarı katı besiyeri elde etmek için %0.3 -0.5 oranında besiyerine eklenir.
- Agar, genellikle nötral olduğundan besiyerinin pH'nı etkilemez.
- **Pepton**: Et, kazein, soya küspesi gibi proteinli maddelerin proteolitik enzimlerle sindirilmeleri yolu ile elde edilir.

- Et ekstraktı:** Yağsız etten hazırlanan ham et suyunun suyunun uçurulması ile elde edilen koyu renkte macun gibi bir maddedir.
- Kan:** Besiyerlerine katılan kanların steril ve pıhtılaşması önlenmiş olmalıdır. Aseptik koşullarda hayvan ve insanlardan alınan kanların fibrinsizleştirilmesi için en iyi yöntem cam boncuklarının bulunduğu steril balonları kullanmaktır. Defibrine kan besiyerlerine %5 -10 oranında eklenir. En sık kanlı agar yapımı için kullanılır.

- **Serum:** Koyun, at, tavşan kanı steril koşullarda alınıp ayrıştırılan serum besiyerlerine %5-10 oranında katılır. Güç üreyen mikroorganizmaların üremesini kolaylaştırır.
- **Maya ekstraktı (özütü):** Ekmek veya bira mayasından elde edilir. İçeriğinde aminoasitler, üretme faktörleri, inorganik maddeler ve karbonhidratlar bulunur.
- **Sodyum klorür:** Besiyerine ozmotik basıncı ayarlamak amacıyla katılır.

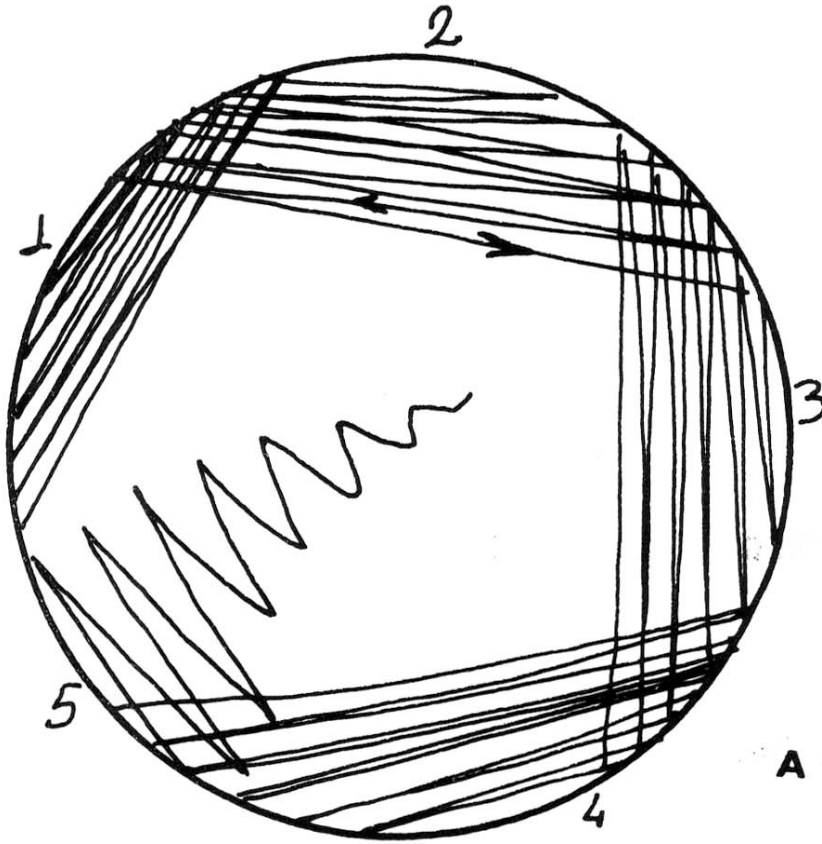
BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI VE SAKLANMASI

- Besiyerlerinin yapılarında yer alan maddeler bir araya getirilerek eritilir,
- Otoklavda sterilize edilir,
- Petri kutusu ya da tüplere dökülür.
- Hazırlanan besiyerleri soğuduktan sonra, buzdolabına konur ve kullanılıncaya kadar orada saklanır.
- Yeni hazırlanmış besiyerleri en fazla 15 gün içinde kullanılmalıdır.

Ekim Yöntemleri

- Ekim teknikleri besiyerinin katı, sıvı oluşuna göre farklıdır. Sıvı bir ortama ekim, bir öze dolusu ya da bir eküvyon çubuğu (swab) ile tüpün kenarından yapılır.
- Katı besiyerlerine ekim tüp ya da bir petri kutusunda olabilir.
- Petri kutusunda besiyerinin bir kenarına sürülen klinik örnek öze ile azaltma ekimi biçiminde yayılır.

Tek Koloni Dilusyon Ekim



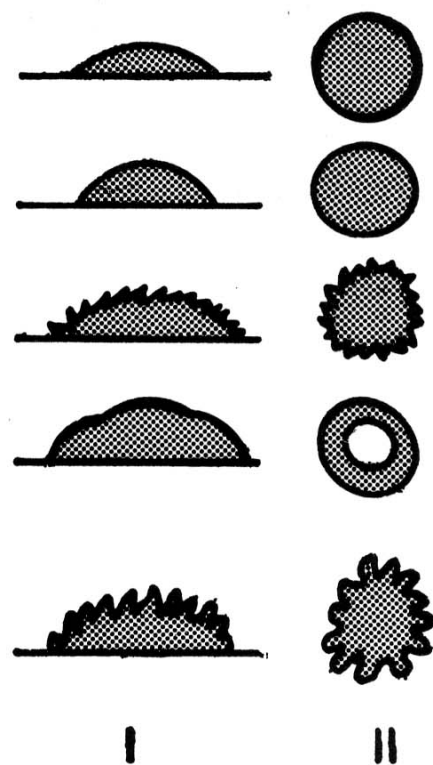
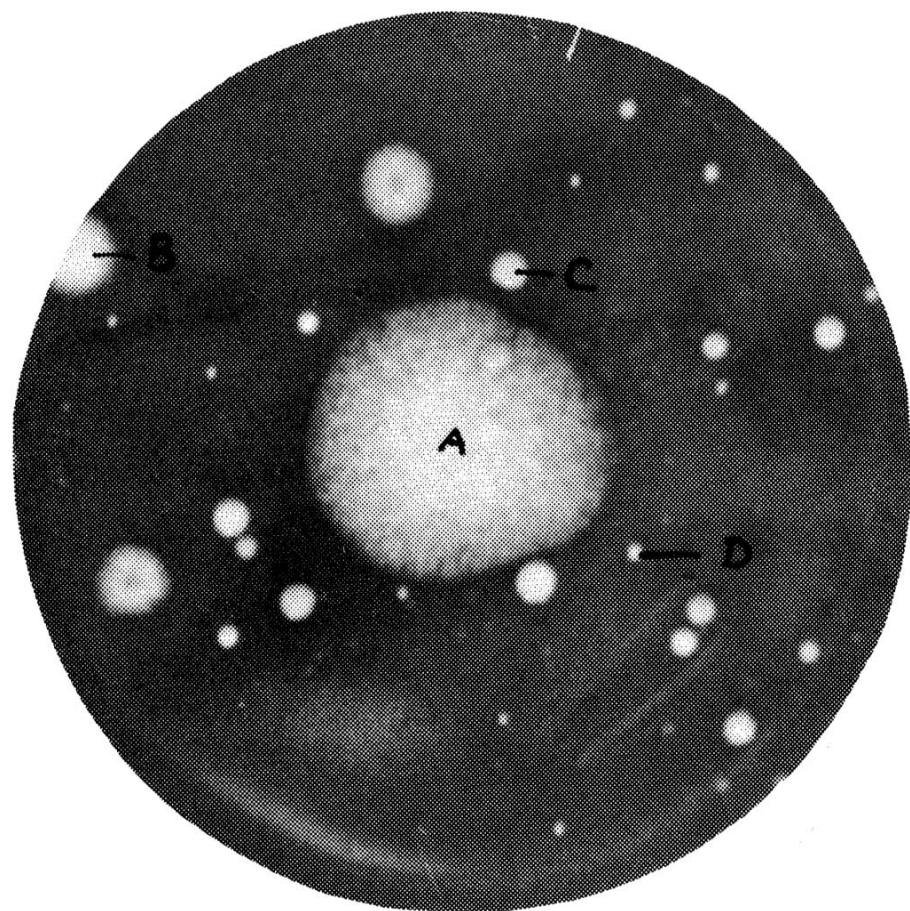
Tek Koloni Çizme Ekim



Microbeonline.com

- Kullanılan katı üreme ortamlarının amacı koloni oluşmasını sağlamaktır.
- Ekim yapıldıktan sonra tüpler veya petriler etüvde inkube edilir. (Örn: 37°C'de 24-48 saat)
- **ÜREMELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ**
- Sıvı besiyerlerinde ekim ve inkübasyon sonrası oluşan bulanıklık, tortu ya da zar oluşumu üremeyi gösterir.
- Üreme, bir öze dolusu alınan sıvının preparat yapılarak boyanması ve mikroskopta x100 büyütmede incelenmesi ile belirlenir.

- **Bakteri kolonileri şekil bakımından dörde ayrılır.**
- **S** tipi koloni: Kenarları düzgün olup yandan bakıldığında tam bir bombelik gösterir.
- **R** tipi koloni: Koloni çevresi zikzaklı ve yüzeyi pürüklüdür.
- **M** tipi koloni: Koloniler sümüksü görünümündedir. Oldukça iri ve bombeli kolonilerdir. M tipi kolonileri genelde kapsüllü bakteriler oluşturur.
- **L** tipi Koloni: Hücre duvarı olmayan bakteriler tarafından oluşturulur. Görünüşü şekil olarak sahanda pişmiş yumurtayı andırır.



- Bir bakteri kolonisinde,
- koloninin büyüklüğü, şekli, koloni kenarlarının ve yüzeyinin düzgün olup olmadığı,
- koloninin mat ve parlaklık durumu,
- rengi,
- kokusu,
- kıvamı ile
- kanlı besiyerlerinde oluşmuş bir koloni ise, hemoliz yapıp yapmadığı gözlenir.

- Bakteriler kanlı besiyerindeki hemoliz durumlarına göre üçe ayrılırlar.
- ■ **Alfa Hemoliz:** Bakteri kolonisi etrafında hemoliz sahalarına mikroskopun küçük büyütmesi ile bakıldığında ortamda sağlam eritrositlerin varlığı görülür. Hemoliz bölgesi yeşilimsi renktedir.
- ■ **Beta Hemoliz:** Tam hemolizdir. Bakteri kolonileri etrafında tam bir saydam alan görülür. Bu bölgedeki eritrositler tamamen erimiştir. Petri kutusunun arkası görülebilir.
- ■ **Gamma Hemoliz:** Kanlı agarda üreyen bakteri kolonisi hiç hemoliz oluşturmamıştır.

Kanlı Agarda Hemoliz Çeşitleri

Blood Agar:

Shows three types of hemolysis

α Hemolysis

β Hemolysis

γ Hemolysis



Beta Hemolysis



Alpha Hemolysis



Gamma Hemolysis

Sıvı Ortamda Üreme

- optimal şartlarda sıvı besi yerinde, katı ortamlardakinden daha çabuk üreme
- üreme hızı mikroorganizma türüne özgü genetik bir özelliktir
- besi yeri bileşimi ve diğer çevresel koşullardan etkilenir

Sıvı Ortamda Üreme

Bakteriyel Üreme Eğrisi

- Laboratuvarı, uygun koşullar altında, üreyen bir bakteri populasyonu düzenli aralıklarla iki kat artar
- Logaritmik (1, 2, 4, 8,...)

Jenerasyon Süresi

Bir bakteri hücresinin bölünmesi için veya bir bakteriyel hücre popülasyonunun ikiye katlanması için gerekli zaman aralığı jenerasyon (jenerasyon) süresi olarak adlandırılmaktadır.

Jenerasyon süreleri bakteriler arasında değişiklik göstermekte olup 12 dakika' dan 24 saate kadar, hatta daha uzun bile olabilir.

Tablo1. Optimal koşullar altında bazı bakterilerin jenerasyon süreleri

Bakteri	Besi yeri	Jenerasyon süresi
<i>Escherichia coli</i>	Glukoz-tuzlar	17
<i>Bacillus megaterium</i>	Sukroz-tuzlar	25
<i>Streptococcus lactis</i>	Süt	26
<i>Streptococcus lactis</i>	Lactoz buyyon	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kalp infüzyon buyyon	27-30
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Süt	66-87
<i>Rhizobium japonicum</i>	Mannitol-tuzlar-maya ekstrakt	344-461
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Sentetik	792-932
<i>Treponema pallidum</i>	Tavşan Testisleri	1980

Jenerasyon Süresinin Hesaplanması

G = jenerasyon süresi, T = saat veya dakika olarak zaman aralığı

A = başlangıçtaki bakteri sayısı, B = son bakteri sayısı

N = jenerasyon sayısı

$$N = (\log B - \log A) / \log 2 \longrightarrow (9 - 3 : 0.3 = 20)$$

$$N = T / G \longrightarrow (20 = 960 / G, G = 48)$$

$$T / G = (\log B - \log A) / \log 2$$

$$G = (T \times \log 2) / \log B - \log A$$

Katı Ortamda Üreme

- Uygun besiyeri, inkubasyon, koloni oluşumu
- Kolonilerin rengi, kokusu, yapısı, şekli, büyüklüğü, parlaklığı, besi yerine yapışma durumu, hemoliz yapma özelliği,vb birçok özellikleri mikroorganizmalar arasında değişiklik göstermekte olup bu özellikler mikroorganizmanın cinsine ve türüne bağlı olduğu gibi çeşitli çevresel koşullara da bağlı olabilir.

Katı Ortamda Üreme

- koloni şekli ve büyüklüğü:
yuvarlak,düzensiz, nokta şeklinde (ince)
- sınırları: bütün (düzgün), dalgalı,loblu
- yüksekliği:konveks,düz, kabarık
- rengi: renk veya pigment, opak veya saydam,parlak veya mat
- yapısı:nemli,mukoid,kuru

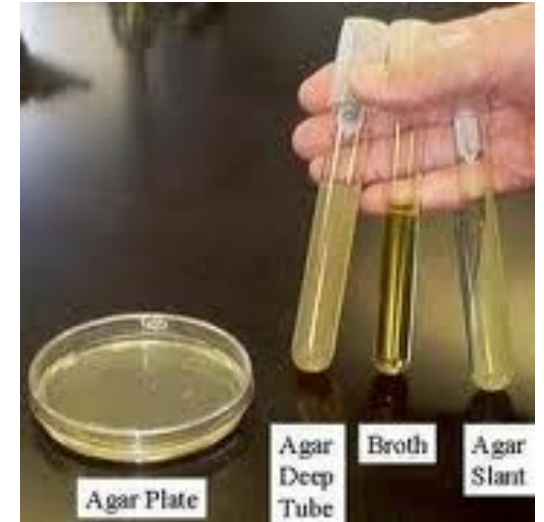
Sıvı ve Katı Besiyerleri



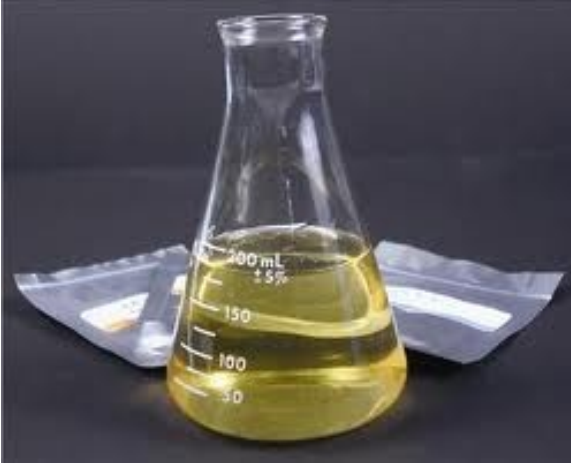
Sıvı besiyeri



Kanlı Agar



Besiyeri Hazırlanması Aşamaları



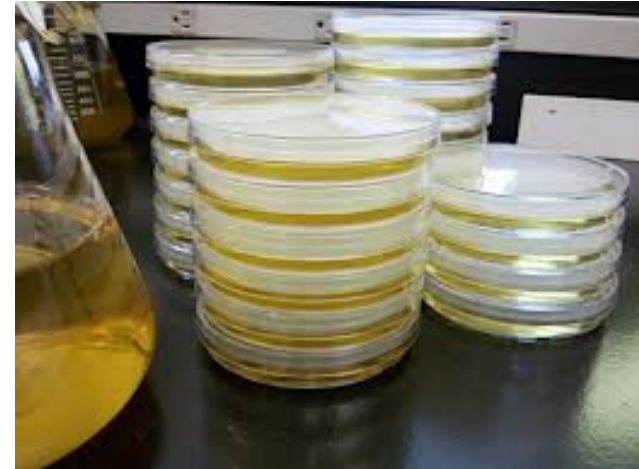
Besiyeri içeriğine giren kimyasallar
Tartılır, suda eritilir ve pH ayarlanır



Otoklavda steril hale getirilir



Katı besiyeri petrilere dökülmekte



Katı besiyerlerinin katılaşması beklenir

Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ekim



Ekimi öncesi ve bakteri ekimi yapıldıktan sonrası inkübe edilmiş bakteri kültürü



Sıvı Besiyeri

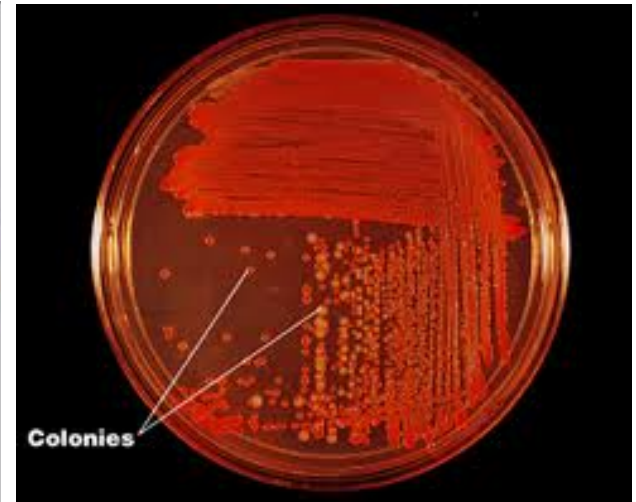


Bakteri Sıvı Kültürü

Tek Koloni (Saf Kültür) Elde Etmek Amaçlı Ekim



Farklı bakterilere ait koloni tipleri



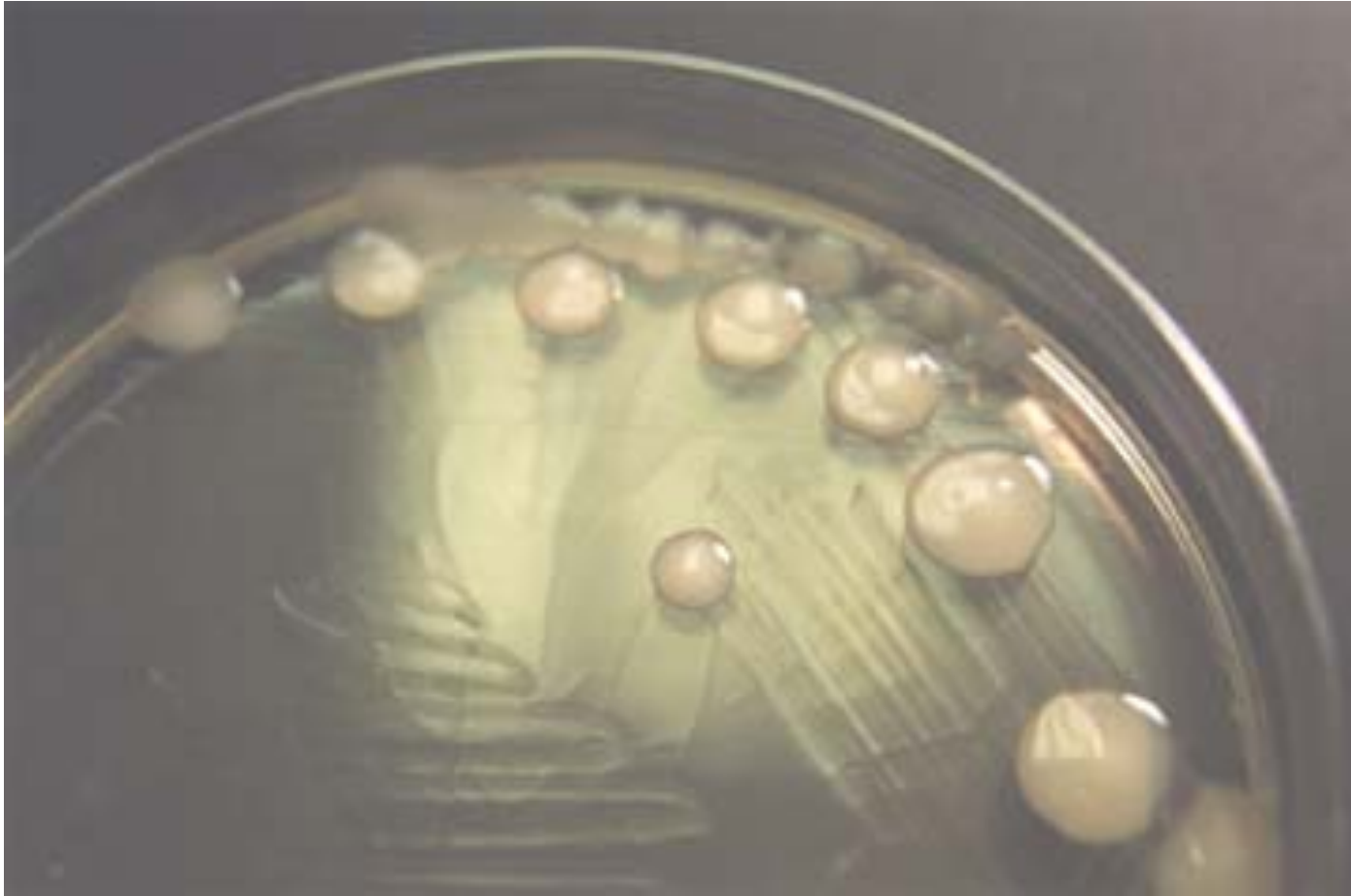
S (Smooth) tipli koloniler



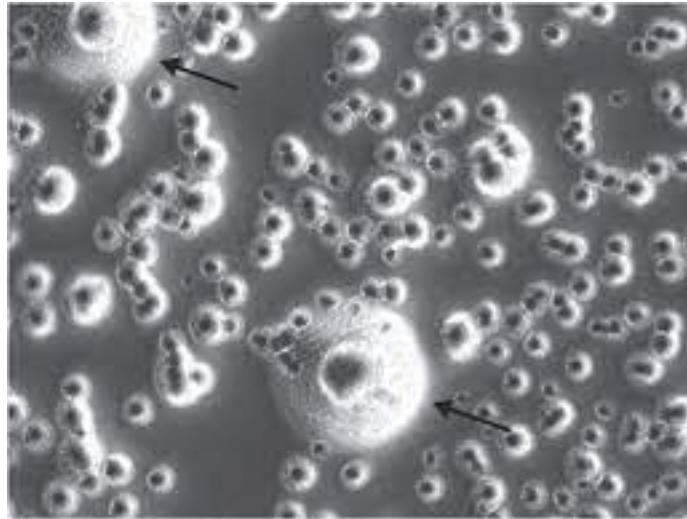
R (Rough) tipli koloniler



M (mukoid) tipli koloniler



Mycoplasma ve L-form koloniler



nature.com



researchgate.net