GIDA VE KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

BESİYERİ HAZIRLAMA KILAVUZU

(EK-2)

2022

1. AMAÇ ve KAPSAM

Bu talimat, Mikrobiyoloji Laboratuvarında ekim yapılacak numuneler için besiyerinin hazırlanması ve bu hazırlanan besiyerlerinin kontrolünü tarif eder.

2. SORUMLULUKLAR

Bu talimatın yürütülmesinden yetkili tüm laboratuvar personeli sorumludur.

3. TANIMLAR ve KISALTMALAR

3.1. Genel Tanımlar

3.1.1. Kalite kontrol

Kalite gereklerini yerine getirmeye odaklanmış kalite yönetiminin bir parçasıdır.

3.1.2. Besiyeri partisi

Tanımlanmış üretim süresi içinde üretilmiş aynı parti (veya lot) numarası tahsis edilmiş belirlenen miktarda dökülerek hazırlanmış, yarı mamul ürünün veya son ürüne ilişkin besiyerinin homojen ve tamamen izlenebilir birimidir.

3.1.3. Kromojenik substrat

Florojenik Substrat

Bakteriler veya mantarlar tarafından kullanılan bir kromofor/florofor grubu ihtiva eden substrattır.

3.2. Performans Testlerinin Terminolojisi

3.2.1. Besiyeri Performansı

Belirli şartlar altında test organizmalarının besiyerinde oluşturduğu yanıttır.

3.2.2. Hedef mikroorganizma

Tespit edilecek veya sayılacak mikroorganizma veya gruptur.

3.2.3. Hedef olmayan mikroorganizma

Besiyeri tarafından ve/veya inkübasyon koşulları ile baskılanan veya hedef mikroorganizmayla benzer niteliklere sahip olmayan mikroorganizmalardır.

3.2.4. Besiyerinin üretkenliği

Belirli koşullar altında besiyerinde gelişen hedef mikroorganizma düzeyidir.

3.2.5. Besiyerinin seçiciliği

Tanımlanan koşullar altında hedef olmayan mikroorganizmanın veya seçici besiyerinin inhibisyon derecesidir.

3.2.6. Besiyerinin ayrımı

Besiyerinin özgünlüğü

Tanımlanan koşullar altında hedef olmayan mikroorganizmanın aynı şekilde görülmemesidir.,

3.3. Besiyerinin Terminolojisi

3.3.1. Besiyeri

Canlı mikroorganizmaların çoğalmasını (belli mikroorganizmaların inhibisyonu ile veya değil), tanımlanmasını ve korunmasını desteklemek için yapılmış, doğal ve/veya sentetik bileşenleri içeren sıvı, yarı-katı veya katı haldeki maddelerin formülasyonudur.

3.3.2. Kompozisyonuna göre besiyeri sınıfları

3.3.2.1. Kimyasal olarak tanımlanmış besiyeri

Moleküler yapısı ve saflık derecesi bilinen sadece kimyasal olarak tanımlanmış bileşenleri içeren besiyeridir.

3.3.2.2. Kimyasal olarak tanımlanmamış veya kısmen belirsiz besiyeri

Tamamen tanımlı veya kimyasal bileşimi doğal materyal, işlenmiş, başka türlü kısmen veya tamamen tanımlı olmayan besiyeridir.

3.3.2.3. Kromojenik besiyeri/ Florojenik besiyeri

Bir ve/veya fazla kromojenik/ florojenik substrat içeren besiyeridir.

NOT: Kromojenik besiyerinde tanımlanmış renk ve morfolojik özellikleri besiyerindeki tipik büyüme şekli aracılığı ile bakterilerin veya mantarların tanımlanmasını kolaylaştırır. Florojenik besiyerleri UV lamba kullanılarak görüntüleme gerektirir. Florojenik/kromojenik besiyerinin etkinliği için gerekli olan, biyokimyasal reaksiyon ürünleri, normal olarak bazı organizmaların enzimatik aktivitesinin sonuçlarıdır. Bunlar büyük ölçüde, sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, vb. koşulların sağlanmasına bağlıdır.

3.3.3. Fiziksel yoğunluğuna göre besiyerleri

3.3.3.1. Sıvı besiyeri

Bir ve/veya daha fazla bileşenin sulu çözeltisinden oluşan besiyeridir. Ör: Tamponlanmış Peptonlu Su, Nutrient Broth.

NOT: Bazı durumlarda katı parçacıklar sıvı besiyerine ilave edilebilir. Ör: Cooked Meat Medium.

3.3.3.2. Katı besiyeri/ Yarı-katı besiyeri

Sıvı besiyeri farklı konsantrasyonlarda katılaşan maddeleri (ör; agar-agar, jelatin) içerir.

NOT 1: Dünya çapında katılaştırıcı olarak “agar-agar” kullanıldığından kısaltılmış olarak katı besiyerleri için “agar” terimi kullanılır ve besiyerinin ismiyle bağlantılı olarak ör; “Plate Count Agar” denilir.

NOT 2: Besiyeri tüplerde eğik pozisyonda katılaştırılırsa genellikle "eğik" veya “yatık" agar olarak adlandırılır.

3.3.4. Kullanım şekline göre besiyerleri

3.3.4.1. Transport besiyeri

Numune toplama ve numunenin laboratuvara gelişi arasındaki süre içinde, mikroorganizmaların sayısal değişimini en aza indirgemek ve canlılığını korumak için tasarlanmış besiyeridir. Ör: Stuart veya Amies besiyeri.

3.3.4.2. Koruma besiyeri

Uzun bir süre boyunca depolanacak mikroorganizmayı bu dönemde meydana gelebilecek olumsuz etkilere karşı korumak ve canlılığını sağlamak, ayrıca bu dönem sonunda tekrar düzelmesini sağlamak için geliştirilmiş besiyeridir. Ör: Dorset Egg Medium, yatık Nutrient Agar.

3.3.4.3. Seyreltme besiyeri/ Süspansiyon besiyeri

Katı deney numunesinden sıvı bir faz içinde mikroorganizmaları ayırmak ve/veya seyrelterek kendi konsantrasyonunu azaltmak için kullanılan, temas süresi boyunca inhibisyonu veya çoğalmayı da önleyen besiyeridir.

3.3.4.4. Canlandırma besiyeri

Mikroorganizmaların çoğalmasını teşvik etmeden normal büyüme kapasitelerinde stresli ve hasarlı mikroorganizmaların onarımını ve canlanmalarını sağlayan besiyeridir. Ör: Tamponlanmış Peptonlu Su.

NOT: Canlandırma besiyeri ön zenginleştirme besiyeri olarak kullanılabilir.

3.3.4.5. Ön zenginleştirme besiyeri/ Zenginleştirme besiyeri

Genellikle bileşimleri nedeniyle mikroorganizmaların çoğalmaları için uygun ortam sağlayan sıvı besiyeridir. Ör: Tryptone Soya Broth.

3.3.4.5.1. Seçici zenginleştirme besiyeri

Kısmen veya tamamen, diğer mikroorganizmaların gelişimini inhibe ederken, belirli mikroorganizmaların çoğalmasını sağlayan zenginleştirici besiyeridir. Ör: Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone Broth.

3.3.4.5.2. Seçici olmayan zenginleştirme besiyeri

Çeşitli mikroorganizmaların gelişmesine olanak sağlayan zenginleştirme besiyeridir. Ör: Brain Heart Infusion Broth.

3.3.4.5.3. İzolasyon besiyeri

Mikroorganizmaların büyümesini sağlayan katı veya yarı-katı besiyeridir.

3.3.4.5.4. Seçici izolasyon besiyeri

Tamamen veya kısmen, diğer mikroorganizmaları inhibe ederken, belirli hedef mikroorganizmaların büyümesini sağlayan besiyeri. Ör: Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (mCCD agar).

3.3.4.5.5. Seçici olmayan izolasyon besiyeri

Bu besiyeri seçici olarak mikroorganizmaları engellemek için uygun değildir. Ör: Nutrient Agar.

3.3.4.5.6. Kromojenik seçici besiyeri/ Florojenik seçici besiyeri

Bu besiyerleri seçici bileşikleri içerdiğinden test numunesindeki rekabetçi florayı kısmen veya tamamen inhibe ederek hedef mikroorganizmanın kesin tespitini sağlar. Ör: Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) Agar, MUG/EC Broth.

3.3.4.6. Ayırıcı besiyeri/ Karakteristik besiyeri

Mikroorganizmaların bir ve/veya daha fazla biyokimyasal /fizyolojik özelliklerinin test edilmesine imkan veren besiyeridir. Ör: TBX Agar, Lactose Agar with tergitol 7 and TTC.

NOT: Ayırıcı besiyeri izolasyon besiyeri gibi kullanılabilir. Ör: Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar.

3.3.4.7. İdentifikasyon besiyeri

Genellikle ek doğrulama testleri gerektirmeyen özel tanımlama reaksiyonu üretmek için tasarlanmış besiyeridir. Ör: Bile Aesculin Azide Agar.

3.3.4.8. Sayım besiyeri

Mikroorganizma miktarını belirlemeye yarayan seçici veya seçici olmayan besiyeridir. Ör: Baird-Parker Agar, Yeast Extract Agar.

NOT: Sayım besiyeri bir canlandırma ve/veya zenginleştirme besiyerinin özelliklerini içerebilir.

3.3.4.9. Doğrulama besiyeri

Bir ön canlandırma ve/veya zenginleştirme ve/veya izolasyon aşamasından sonra mikroorganizmanın tanımlanması ve karakterizasyonunu sağlayan besiyeridir. Ör: Kligler Iron Agar.

3.3.4.10. Nötralizanlı besiyeri

Deterjanları/dezenfektanları veya diğer biyosidal ajanları etkisiz hale getirmek için nötralizan malzemeleri içeren besiyeridir.

3.3.4.11. Genel besiyeri

Birden çok kullanım alanına sahip çeşitli katagorilere girebilen besiyerleridir. Ör: Kanlı agar; canlandırma besiyeri, izolasyon besiyeri veya hemolizin tespitinde ayırıcı besiyeri olarak kullanılabilir. Tamponlanmış Peptonlu Su dilüsyon sıvısı veya ön zenginleştirme besiyeri olabilir.

3.3.4.12. Referans besiyeri

Genellikle seçici olmayan, test edilen besiyerinin performansından bağımsız olarak karşılaştırılabildiği, kontrol kullanımı için uygun besiyeridir. Ör: Tryptone Soya Agar (TSA).

3.3.5. Besiyerlerinin hazırlama şekline göre sınıflandırılması

3.3.5.1. Kullanıma hazır besiyerleri

Sıvı, katı veya yarı katı formda, petride, tüpte, şişede veya başka bir kapta kullanıma hazır veya erittikten sonra veya eritip supplement katıldıktan sonra kullanılan besiyerleridir.

3.3.5.2. Tamamlanmış besiyeri

İnokulasyon için hazır besiyeridir.

3.3.5.3. Yeniden eritildikten sonra kullanıma hazır besiyeri

Yeniden eritildikten sonra, örneğin dökme plak tekniği için kullanılacak veya petri plaklarına dökülecek besiyeridir.

3.3.5.3.1. Yeniden eritilip supplementi eklendikten sonra kullanıma hazır besiyeri

Kullanmadan önce yeniden eritilip supplementi eklenip dağıtılan besiyeridir (eksik kullanıma hazır besiyeri). Ör: Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar, Baird-Parker or Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF) Agar.

3.3.5.4. Ticari dehidre formülasyondaki hazır besiyerleri

Rehidrasyon gerektiren kuru formda besiyerleri olup kullanmadan önce iki şekilde olabilir:

- Tam besiyeri

- Supplement eklendikten sonra kullanılabilen eksik besiyeri. Ör: Tozlar, kompakt granüller, liyofilize ürünler.

3.3.5.5. Bileşenleri tek tek hazırlanan besiyerleri

Kendi özel malzemeleriyle bir mikrobiyoloji laboratuvarında üretilen besiyeridir.

4. UYGULAMA

4.1. Besiyeri Temini ve Muhafazası

- Laboratuvara alınan her seri ürün için (bileşen veya dehidre besiyeri) aşağıdaki kontroller yapılır.
  - Ürün kimliği
  - Ambalaj bütünlüğü
  - Ürünün son kullanma tarihi
  - Tedarik edilen dökümanlar (sertifikalar vb.)
  - Alınan ürün sayısı
- Laboratuvara alınan dehidre besiyerlerinde, aşağıdaki yazılı bilgiler sağlanmalıdır.
  - Besiyerinin, tek tek bileşenlerinin ve herhangi bir katkının adı ve mümkünse ürün kodları
  - Gerekli güvenlik ve/veya tehlike verileri
  - Seri numarası veya lot numarası
  - Tamamlanmış ortamda hedeflenen pH
  - Depolama bilgileri ve son kullanma tarihi
  - Kullanılan test organizması ve performans testi sonucunun kabul kriterlerini gösteren, kalite kontrol sertifikası
- Kullanıma hazır ticari besiyeri temin edilen üretici firma, kalite sistemine (ISO 9000 serisi) sahip olmalı ve besiyerleri ISO 11133'e göre kalite kontrolünden geçirilmiş olmalıdır. Besiyerleri, temin edildiğinde gerekli belgelendirmeler (kalite kontrol/analiz sertifikaları) sağlanmalıdır. Her yeni lot numaralı besiyeri ve yeni lot numaralı supplement temin edildiğinde kalite kontrol yapılmalıdır.
- Kullanıma hazır ticari besiyerleri için aşağıdaki bilgiler sağlanmalıdır.
  - Besiyeri içeriği (katkılar dahil)
  - Raf ömrü ve uygulanan kabul kriterleri
  - Depolama koşulları
  - Sterilite kontrolü
  - Kalite kontrol testleri ve kabul kriterleri.
- Laboratuvara alınan besiyerleri, uygun koşullar altında (ör: soğuk, kuru ve karanlık) ve üretici talimatları doğrultusunda depolanır.
- Dehidre besiyerlerinin, nem absorbe etmesini engellemek amacıyla kullanım sonrası, kapların kapakları sıkıca kapatılır.

- Yeni bir kutu açıldıktan sonra, depolama koşullarına bağlı olarak dehidre besiyerleri, nem absorbe etmesi ve fiziksel görünümünde değişiklikler göstermesi durumunda (topaklanma, renk değişikliği vb.) kullanılmaz ve atılır.

- Laboratuvarda kullanılan besiyeri, kit ve reaktifler ilk açıldıklarında, kapak contası ve kutu içerisindeki besiyerinin görünümü kontrol edilir, açan kişi tarafından üzerlerine açılış tarihi yazılır ve paraflanır.

- Besiyeri, kit ve reaktiflerin stok takipleri yapılmalıdır.

4.2. Besiyerinin Laboratuvarda Hazırlanması

4.2.1. Genel Kurallar

- Ticari dehidre besiyerleri, üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlanır. Formülden hazırlanan besiyerleri için ise, ilgili analiz talimatında bildirilen miktarlarda içerik maddeleri, tek tek tartılarak hazırlama işlemi gerçekleştirilir.

- Besiyeri hazırlanırken maske, eldiven ve gözlük kullanılır.

- Besiyeri tartımında, hazırlanacak besiyeri hacminin, iki katı büyüklüğünde hacme sahip cam malzeme kullanılır.

4.2.2. Su

- Besiyeri hazırlanmasında Sınıf (Tip) 3 saf su kullanılır. Saf su, demineralize, deiyonize veya ters osmoz ile üretilmiş veya klor kalıntısı, amonyak kalıntısı ve metal iyonu kalıntısı (ağır metaller olan Hg, Zn, Cu, ..yılda 1 kere bakılmalı)gibi test koşullarında, mikroorganizma gelişimini engelleyecek veya etkileyecek olası maddelerden arındırılmış, eşdeğer kalitedeki su olmalıdır.

- Saf su; ağzı sıkı kapalı, tüm inhibitör maddelerden arındırılmış, nötr cam, polietilen vb. inert materyalden yapılmış kap içinde depolanır. Saf su, üretildikten sonra en kısa zamanda kullanılmalıdır.

- Mikrobiyolojik kontaminasyon tercihen 10^2 kob/mL'nin altında olmalı ve 10^3 kob/mL'yi aşmamalıdır. Mikrobiyel kontaminasyon ISO 6222'de belirtildiği üzere 22±1 °C'de 68±4 saat veya eşdeğer bir metot kullanılarak ayda bir takip edilmelidir (ISO 11133:2014).

- Laboratuvarda kullanılan suyun iletkenliği 25 °C'de tercihen 5 μScm^{-1}'nin altında olmalı (sınıf 3 su; ISO 3696) ve 25 μScm^{-1}'nin üzerinde olmamalıdır (≥ 0.04 MΩ cm'ye eş değer direnç). Suyun iletkenliği haftada bir kontrol edilmelidir (ISO 11133:2014).

- Taze distile veya deiyonize suyun pH'sı 6,5-7,5 olmalıdır. Suyun pH'sı kullanımdan önce kontrol edilmelidir. Beklemiş su kullanılmamalıdır. Uzun süre bekletilen su, atmosferde bulunan CO_2'den dolayı asidik olmaktadır.

- Toplam CI değeri de besiyeri suyu için kayıt altına alınmalıdır.

- Sonuçlar "Saf Su Kontrol Formu''na kaydedilir.

4.2.3. Tartım ve Rehidrasyon

- Uygun güvenlik önlemlerini aldıktan sonra dehidre besiyeri veya tek tek içerikleri dikkatli bir şekilde gereken miktarda tartılır ve topaklanmayı engellemek için kademeli olarak gereken su miktarı ile karıştırılır. İzin verilebilir maksimum hata ISO 7218 ve ISO 8199'da belirtildiği üzere % 1 ve/veya daha az olmalıdır. Aksi bir durum olmadıkça bileşenler belirtilen su hacmine ilave edilir.

- Tartım sırasında besiyeri veya besiyeri bileşenlerinin tozlaşmamasına dikkat edilmelidir. Çok az da olsa toz bulutu oluşmuş ise kesinlikle solunmamalıdır.
- Besiyeri veya besiyeri bileşenleri deriye ve özellikle göze temas etmemelidir. Eğer temas varsa hemen bol su ile yıkanmalıdır.
- 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 veya % 70'lik etil alkol ile silinmelidir.
- Besiyerlerinin sulandırılması için gerekli miktarda saf su, kalibrasyonu yapılmış bir mezür veya terazide tartım yaparak eklenir. Kullanılan hacim ölçüm ekipmanlarının toleransı, hedef değerinin ±% 2'sini aşmamalıdır.
- Suyun eklenmesinden önce toplam suyun bir kısmı eklenir ve karışım çalkalanır. Daha sonra kalan su eklenir. Böylece besiyerinin kabın dibine yapışması engellenir.

4.2.4. Çözünme ve Dağılım

- Besiyerine ilave edilecek su ayrı bir ölçü silindirinde bulundurulmalıdır. Prensip olarak suyun hacmi ile silindirin hacmi birbirine yakın olmalıdır. Bir diğer deyiş ile 100 mL su ölçmek için 1 litrelik silindir kullanılmamalıdır.
- Besiyerine ilave edilecek su miktarı çoğu kez hatalı ölçülür. Örneğin, besiyeri hazırlamada "dehidre hazır besiyerinden 23 gram, 1 litre suda çözünür" şeklindeki bildirişin anlamı 23 gram dehidre besiyeri üzerine toplam 1 litre su ilave edilmesi demek değildir. 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. Besiyerine katılacak su miktarını hatalı ölçmemek için önce istenen hacim kadar saf su besiyeri hazırlanacak kaba konularak seviye cam kalemi ile işaretlenip suyun yarısından fazlası başka temiz bir kaba aktarılır. Bunun üzerine tartılmış dehidre besiyeri ilave edilir.
- Kaba yavaşça az miktarda su eklenerek kabın boğaz kısmında kalmış olan besiyeri veya besiyeri bileşenleri yıkanır.
- Besiyeri veya besiyeri bileşenlerinin çözünmesi için karıştırılır.
- Çözünmenin tam olması ve kaynatma süresinin kısaltılması için oda sıcaklığında 10–15 dakika bekletilir.
- Daha önce işaretlenen yere kadar saf su eklenir.
- Besiyeri veya besiyeri bileşenlerinin tamamen çözünmesi için 50 °C'de su banyosu veya ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda ısıtılır. Besiyerine agar katılmışsa ısıtma işlemi kaynama sıcaklığında (90–95 °C) uygulanır.
- Eritme sırasında erlenin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak buharlaşma ve buharın laboratuvara dağılması önlenmelidir.
- Isıtma işlemi gereksiz yere uzatılırsa buharlaşma ile su kaybı olur.
- Özellikle az miktarda agar içeren besiyerlerinde ani kaynama sonucu taşmaları önlemek için kaba cam boncuk konulur veya sürekli karıştırılır.

- Besiyeri bileşenleri çok iyi çözündürülmezse sterilizasyon sırasında oluşan Maillard reaksiyonları nedeniyle esmerleşmeler görülebilir, bulanıklık ve çökelti oluşur, istenen pH'yı sağlamak zorlaşır.
- Besiyeri sıvı ise, dehidre besiyeri veya besiyeri bileşenleri tümüyle eritildikten sonra daha küçük cam kaplara dağıtılır veya doğrudan sterilize edilebilir.

4.2.5. pH Ölçümü ve Ayarlama

- Besiyeri pH'sı sterilizasyon işlemi öncesi ölçülür ve gerekli ise, pH ayarlaması yapılır.
- 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 veya alkali miktarı hesaplanır.
- Ayarlama, normalde yaklaşık 40 g/L [c (NaOH) = 1 mol/L] sodyum hidroksit çözeltisi ve yaklaşık 36,5 g/L [c (HCl) yaklaşık 1 mol/L] hidroklorik asit çözeltisi kullanılarak yapılır.
- Ayarlama sterilizasyon sonrasında yapılacaksa solüsyonlar steril olmalıdır.
- Sterilizasyon sonrası 25 °C'ye soğutulan besiyerinde pH değişimi, aksi belirtilmedikçe ±0,2 olmalıdır.
- Otoklav sonrası pH ölçümü için bir miktar besiyeri aseptik koşullarda başka bir kaba aktarılarak ölçüm yapılır. Ölçümde kullanılan besiyeri, tekrar kullanılmaz.
- Katı besiyerinde pH ölçüm ve ayarlama işlemi agarın jelleşme sıcaklığının üzerinde yapılıyorsa, pH metre kullanılırken sıcaklık düzeltmesine dikkat edilmesi gereklidir.

NOT: Ticari olarak üretilen besiyerleri otoklavlama öncesi ve sonrasında önemli pH değişiklikleri gösterebilir. Buna karşın iyi kalitede olan distile su veya deiyonize su kullanıldığında otoklavlama öncesinde pH ayarlamaya genellikle gerek yoktur.

4.2.6. Dağıtma

- Otoklav ile ısıl işlem uygulama sonrası, eritme veya supplement ilavesinden sonra soğutma işlemi sırasında besiyerinin taşmaması için uygun kaplara dağıtımı yeterli tepe boşluğu bırakılarak yapılır.

NOT: Soğutma işlemi sırasında otoklav içindeki basınç korunursa bu tepe boşluğu gerekli olmayabilir.

4.2.7. Sterilizasyon

- Üretici talimatları doğrultusunda hazırlanan besiyeri, otoklavda belirtilen sıcaklık ve sürede aynı gün sterilize edilir.
- Ancak bazı besiyerleri otoklavlanmaz. Bu tip besiyerleri ısıtma ve ışığa karşı duyarlıdır. Bu tip besiyerleri mikrodalga fırın/su banyosunda agarı eriyinceye kadar ısıtılır. Örneğin *Enterobacteriaceae* için kullanılan besiyeri olan "Brillant Green" sıcaklığa ve ışığa duyarlı olduğundan kaynatma sonrasında hızla soğutulmalı ve güçlü ışıktan korunmalıdır.

4.2.8. Supplementlerin Hazırlanması

- Özellikle antibiyotik gibi toksik ajanlar içeren supplementler laboratuvar personelinde alerjik ve diğer reaksiyonlara yol açabileceğinden toz haldeki bu maddelerin dağılması önlenmelidir. Solüsyonları hazırlarken üretici talimatlarına uygun güvenlik önlemleri alınmalıdır.
- Antibiyotik ile çalışılan solüsyonlar genellikle hazırlandığı gün kullanılmakta olup bunlar belirtilen raf ömrünün ötesinde kullanılmamalıdır. Belirli koşullar altında antibiyotik solüsyonları uygun

miktarlarda dondurularak muhafaza edilebilir. Ancak bu solüsyonlar çözündürüldükten sonra tekrar dondurulmamalıdır. Dondurma sırasında potansiyel aktivite kaybı üretici veya kullanıcı tarafından test edilmelidir.

- Bazı reaktifler sterilizasyon olmadan kullanılabilir.
- Supplement asla soğuk olmamalı, oda sıcaklığında hatta 30–35 °C'de, agarlı besiyeri ise 45–50°C'de tutulmalıdır. Böylelikle bazal (agarlı) besiyerlerinde supplement ilavesi ile ani soğumalar ve yerel jelleşmeler önlenmiş olur.
- Supplement ilave edilecek agarlı (bazal) besiyeri içine sterilizasyon öncesi manyet atılarak birlikte steril edilmesi, supplement ilavesinden sonra manyetik karıştırıcıda hafifçe karıştırarak supplementin besiyeri içinde homojen olarak dağılması sağlanabilir. Bu işlemde, anafor oluşturacak kadar hızlı yapılan karıştırma ani soğumalara ve/veya besiyeri içinde hava kabarcığı oluşumuna neden olur.
- Her koşulda üretici talimatlarına ve uluslararası standarta uygun olması için kaynaklara bakılması gereklidir.

4.2.9. Laboratuvarda Hazırlanan Besiyerinin Raf Ömrü ve Muhafazası

- Besiyeri hemen kullanılmayacaksa spesifik standartlarda aksi belirtilmedikçe besiyerlerinin birleşiminde herhangi bir değişiklik olmayacak koşullarda, ışık ve kurumayı önleyecek şekilde 5±3 °C'de buzdolabında depolanır.
- Petrideki besiyerleri genellikle 2-4 haftadan, kapalı şişe ve tüplerdeki besiyerleri ise 3-6 aydan fazla depolanmaz. Dayanıksız katkı ilave edilen besiyerleri aynı gün kullanılır.
- Kimyasal reaktif (katkı vb.) içeren katı besiyerleri tekrar eritilmez. Otoklavlanmayan ve sadece ısıl işlem uygulanan besiyerleri (örn; VRBL) yeniden eritilmez.
- Kullanım veya ısıtma öncesi, besiyerinin ortam sıcaklığına gelmesi sağlanır.

4.2.10. Ürünün Petri Kabında Muhafazası

- Petrilere dökülen besiyerleri, petri kapağında yoğunlaşmayı en aza indirmek için soğutulur.
- Besiyeri dökülmüş petrinin hazırlandığı gün ve/veya son kullanma tarihi ve yapan kişinin kimliği petrinin tabanına veya yan tarafına yazılır. Bu şartları sağlayan alternatif kodlama sistemleri de kullanılabilir.
- Ardından, sızdırmaz plastik (streç film vb.) veya selofan (parafilm vb.) malzeme ile kaplanarak buzdolabına kaldırılır. Böylece besiyeri dökülen petrilerin raf ömrü uzatılabilir.

4.2.11. Kullanım için Hazırlama

- Sterilize edildikten sonra soğutulmuş ve katılaşmış agarlı besiyerleri (şişe/tüplerde), kaynar su banyosunda veya mikrodalga fırında eritilerek kullanılır. Besiyeri kalitesinin etkilenmemesi için, eritme işlemi mümkün olan en kısa sürede tamamlanmalıdır. Buzdolabından çıkarılan besiyeri şişeleri, eritme öncesinde kısa bir süre için (ör; 2 dk) ortamda bekletilerek, oda sıcaklığına gelmesi sağlanır. Isıtma öncesi şişenin kapağı gevşetilir ve ısıtma işlemi sonrası tekrar sıkıştırılır.
- Otoklav sonrası veya su banyosunda/mikrodalgada eritilen besiyerleri, termostatik kontrollü su banyosunda 47–50 °C'ye kadar soğutulur. Erimiş besiyeri, en kısa süre içerisinde kullanılmalıdır. Bu süre 4 saati geçmemelidir. Artan besiyerleri, tekrar katılaştırılmaz ve yeniden kullanılmaz.

- Besiyerinin havasının çıkarılması gerekiyorsa, kullanmadan önce kapak veya başlıklar gevşek olacak şekilde, besiyeri kaynar su banyosunda ısıtılır. Isıtma sonrası kapaklar sıkıştırılır ve çalışma sıcaklığına hızlı bir şekilde soğutulur.

- Otoklav sonrası besiyerine ilave edilecek katkılar, besiyeri 50 °C'nin altına soğutulduktan sonra ilave edilmelidir. Eğer besiyeri, agar içeriyorsa, ilave edilecek steril katkılar, oda sıcaklığına getirildikten sonra eklenir. Katkılar yavaşça ilave edilir ve besiyeri iyice karıştırılarak hızlı bir şekilde kaplara (petri, tüp vb.) dağıtılır.

- Agarlı besiyerleri, en az 3 mm kalınlıkta (ör: 90 mm çaplı petri için 18-20 mL besiyeri) olacak şekilde dökülür. Eğer petriye dökülen besiyeri depolanacaksa veya inkübasyon 72 saatten fazla sürecekse veya inkübasyon sıcaklığı 40 °C'nin üzerindeyse, daha fazla besiyeri dökülür. Petrilerin, ağzı kapalı şekilde katılaşması sağlanır.

- Katı besiyeri içeren petriler, yüzey ekimi için, kullanım öncesi, damlacıklar besiyeri yüzeyinden kaybolana kadar kısa süreli olarak kurutulur. Petriler aşırı kurutulmaz.

- Petriler 25–50 °C arasında sıcaklığa ayarlanmış bir kabin (inkübatör) içine yerleştirilerek, agar yüzeyi aşağı gelecek şekilde ters çevrilerek kurutulabilir. Kapak yüzeyindeki damlacıklar kaybolana kadar kurutulur.

- Agar petrileri agar yüzeyi yukarı bakacak şekilde laminar hava akım kabini içinde (oda sıcaklığında) 30 dakika ile 60 dakika aralığında veya gece boyunca oda sıcaklığında petri kapakları yerinde olacak şekilde kurutulabilir.

- Ticari olarak temin edilen kullanıma hazır besiyerleri için; depolama koşulları, son kullanma tarihi ve kullanımları konusunda üretici firma talimatları takip edilir.

4.2.12. Petri Kaplarında Bulunan Katı Besiyerinin İnkübasyonu

- İnkübasyon süresince agar besiyeri nem kaybeder. Bu durum kimi koşullarda mikroorganizmanın gelişimini etkileyebilir. Su kaybını etkileyen faktörler; besiyeri kompozisyonu, petrilerdeki besiyeri miktarı, inkübatör tipi (ör: fan destekli veya bunun dışındakiler), inkübatördeki atmosfer nemi, inkübatördeki petrilerin sayısı ve pozisyonu ve inkübasyon sıcaklığıdır. Su kaybı petrilerin üstü kapalı plastik torbalarda, en fazla 6 tanesinin üst üste konulması ile önlenebilir. Alternatif olarak inkübatördeki havanın nemi dip kısıma ağzı açık kaplarda su yerleştirilerek arttırılabilir. Su belirli aralıklarla değiştirilmeli ve kaplar fungal kontaminasyonu önlemek için sıklıkla dezenfekte edilmelidir.

4.2.13. Besiyeri İmhası

- Kullanılmayan veya kontamine besiyerlerinin her ikisi de güvenli bir şekilde imha edilmelidir.

4.3. Besiyeri Testleri ve Kalite Kontrolü

- Besiyeri kontrolünde kullanılacak uygun test organizmaları, kontrol yöntemleri ve kabul kriterleri Ek 1'de gösterilmiştir.

- Kullanıma hazır ticari besiyerlerinin gerekli kalite kontrolleri yapılmış ise, kapsamlı bir kontrol yapmaya gerek yoktur. Kullanıma hazır ticari besiyerlerine ait kalite kontrol sertifikaları kontrol edilir. İstenilen kalite kriterleri sağlanmıyorsa, ürün iade edilir. Kalite kontrol sertifikaları muhafaza edilir.

- Besiyerlerinin hazırlanışında laboratuvarda kullanılan tüm besiyerleri "Besiyeri Takip Formu'na" işlenir, hazırlandığı gün izolasyon besiyerleri sertifikasında bildirilen referans kültürle, diğer

besiyerlerinin (MRD, PCA vb.) sterilite kontrolü ise boş olarak inkübe edilerek kontrol edilir ve hesaplamaları yapılarak sonuçları "Verimlilik" olarak kaydedilir.

4.4. Besiyerlerinde Gözlenen Hatalar ve Muhtemel Nedenleri

Besiyerlerinde çeşitli nedenlere bağlı olarak gerçekleşen problemler Tablo 1'de tanımlanmıştır.

Tablo 1. Besiyerlerinde Oluşabilecek Hatalara Bağlı Ortaya Çıkabilecek Problemler

Problem	Muhtemel Neden
Agarın katılaşmaması	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük pH'nın asit hidrolizine neden olması Yanlış tartım Agarın tamamen çözünmemesi
Hatalı pH	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük saf su kalitesi Kimyasal kontaminasyon pH'nın yanlış sıcaklıkta ölçülmesi pH metrenin hatalı kalibrasyonu Düşük kalite dehidre besiyeri
Anormal renk	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük saf su kalitesi Düşük kalite dehidre besiyeri Hatalı pH Kontaminasyon
Presipitasyon	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük saf su kalitesi Düşük kalite dehidre besiyeri pH kontrolünün yetersizliği
Düşük verimlilik ve inhibisyon	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük saf su kalitesi Düşük kalite dehidre besiyeri pH kontrolünün yetersizliği Yanlış formülasyon (Ör., bileşenlerin doğru tartılmaması, katkıların yanlış konsantrasyonda ilavesi)
Düşük seçicilik	Hazırlama sırasında besiyerinin fazla ısınması Düşük saf su kalitesi Düşük kalite dehidre besiyeri Katkıların yanlış konsantrasyonda veya yanlış şekilde ilavesi
Kontaminasyon	Yanlış sterilizasyon Kötü aseptik koşullar Kontamine olmuş supplement kullanımı

4.5.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 ise çok uzun süre sonra görülür.

Ayrıca, bazı besiyeri bileşenlerinin çevre açısından kirlilik oluşturduğu 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.
✓ **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 *C. 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 bazı besiyerleride bulunur. % 1'den yüksek konsantrasyonlar ile çalışılırken gereken önlemler alınmalıdır (ör, çeker ocak).
✓ **Sodium selenite:** Solunması ile bronşiyal spazmlara, boğulma ve zatüre 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 bulunur.

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

5. REFERANSLAR

- TS EN ISO 11133 - Gıda, yem ve su mikrobiyolojisi - Kültür ortamının hazırlama, üretim, muhafaza ve performans deneyi, 2020.
- Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara,2005.
- TS 13134- Mikrobiyoloji lâboratuvarlarının akreditasyonu - TS EN ISO/IEC 17025 ‘deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için genel şartlar’ standardının uygulanması rehberi, 2005.

EK 1– GIDA VE SU MIKROBIYOLOJISINDE KULLANILAN KÜLTÜR BESIYERLERI IÇIN PERFORMANS KRITERLERI VE TEST MIKROORGANIZMALARI

GIDA MİKROBİYOLOJİSİNDE KULLANILAN KÜLTÜR BESİYERLERİ

Mikroorganizmaların Sayımı İçin Seçici Besiyeri

Besiyeri	Tip	Mikroorganizma	Uluslararası Standart	İşlem	İnkübasyon	Kontrol Suşu	WDCM Numarası	Referans Besiyeri	Kontrol Metodu	Kriter	Karakteristik Reaksiyon
BPA/Baird Parker Agar	Katı	Koagulaz-Pozitif Stafilokok	ISO 6888-1	Verimlilik	(24 ± 2) sa ile (48 ± 2) sa/ (37 ± °1) °C	*Staphylococcus aureus*	00034	TSA	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Saydam halkalı siyah veya gri koloniler)
				Seçicilik	(48 ± 2) sa/ (37 ± 1) °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Toplam İnhibisyon (0)	—
BGBLB/ Brilliant Green Lactose Bile Broth	Sıvı	Koliform	ISO 4831	Verimlilik	(24 ± 2) sa ile (48 ± 2) sa/ (30 ± 1) °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Bulanıklık (2)[f] ve Durham Tüpünde Gaz	Bulanıklık ve gaz üretimi
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	Gaz üretimsiz kısmı inhibisyon	—
DG18/ Dichloran Glycerol Agar	Katı	Küf ve Maya	ISO 21527-2	Verimlilik	5 gün/ (25 ± 1) °C	*Saccharomyces cerevisiae*	00058	SDA	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Herbir türe özgü karakteristik koloniler
				Seçicilik		*Escherichia coli*	00012	—	Kalitatif	Gelişme Yok	—

CFC/ Cephalothin Fucidin Cetrimide Agar	Katı	*Pseudomonas spp.*	ISO 13720	Verimlilik	(44 ± 4) sa / (25 ± 1) °C	*Pseudomonas fluorescens*	00115	TSA	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	—
				Seçicilik		*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Toplam İnhibisyon (0)	—
DRBC/ Dichloran-Rose Bengal Chloramphenicol Agar	Katı	Küf ve Maya	ISO 21527-1	Verimlilik	5 gün/ (25 ± 1) °C	*Saccharomyces cerevisiae*	00058	SDA	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Herbir türe özgü karakteristik koloniler
				Seçicilik		*Escherichia coli*	00012	—	Kalitatif	Gelişme yok	—
MYP/Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar	Katı	*Bacillus cereus*	ISO 7932	Verimlilik	(24 ± 3) sa ile (44 ± 4) sa/ (30 ± 1) °C	*Bacillus cereus*	00001	TSA	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Çökelekle çevrilmiş pembe kolonilerin oluşması
				Seçicilik	(44 ± 4) sa/ (30 ± 1) °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Toplam İnhibisyon (0)	—
TBX/Tryptone Bile X-Glucuronide Agar	Katı	β-d-Glucuronidase-pozitif *Escherichia coli*	ISO 16649-2	Verimlilik	(21 ± 3) sa/ (44 ± 1) °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	TSA	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Mavi/yeşil koloniler
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	Toplam İnhibisyon (0)	—
TSC/SC Tryptose Sulphite Cycloserine Agar/ Sulfite Cycloserine Agar Egg Yolk Katkısız	Katı	*Clostridium perfringens*	ISO 7937	Verimlilik	(20 ± 2) sa/ (37 ± 1) °C anaerobik atmosfer koşulları	*Clostridium perfringens*	00007	TSA veya anaeroblar için kullanılan seçici olmayan besiyeri	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Siyah koloniler
				Seçicilik		*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Toplam İnhibisyon (0)	—

VRBG/Violet Red Bile Glucose Agar	Katı	*Enterobacteriaceae*	ISO 21528-2	Verimlilik	(24 ± 2) sa/ (37 ± 1) °C	*Escherichia coli*	00012	TSA	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Çökelmiş zonlu veya zonsuz, pembe ve kırmızı koloniler
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	Total İnhibisyon (0)	—
VRBL/Violet Red Bile Lactose Agar	Katı	Koliformlar	ISO 4832	Verimlilik	(24 ± 2) sa/ (30 ± 1) °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	TSA	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Çökelmiş zonlu veya zonsuz, morumsu kırmızı koloniler
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	Total İnhibisyon (0)	—
CHROMAgar O157/ Chromogenic O157 Agar	Katı	*Escherichia coli* O157	ISO 16654	Verimlilik	(21 ± 3) sa/ (37 ± 1) °C	*Escherichia coli* O157:H7	00014 (Non-Toksijenik suş)	—	Kalitatif	İyi Büyüme (2)	Yaklaşık 1,5-2 mm çapında leylak rengi koloniler
				Seçicilik		*Staphylococcus aureus*	00034	—	Kalitatif	Total İnhibisyon (0)	—
CT-SMAC/ Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey Agar	Katı	*Escherichia coli* O157	ISO 16654	Verimlilik	(21 ± 3) sa/ (37 ± 1) °C	*Escherichia coli* O157:H7	00014 (Non-Toksijenik suş)	—	Kalitatif	İyi Büyüme (2)	Yaklaşık 1 mm çapında soluk sarımsı kahverengi görünümlü şeffaf koloniler
				Seçicilik		*Staphylococcus aureus*	00034	—	Kalitatif	Total İnhibisyon (0)	—

Mikroorganizmaların Sayımı İçin Seçici Olmayan Besiyerleri											
Besiyeri	**Tip**	**Mikroorganizma**	**Uluslararası Standart**	**İşlem**	**İnkübasyon**	**Kontrol Suşu**	**WDCM Numarası**	**Referans Besiyeri**	**Kontrol Metodu**	**Kriter**	**Karakteristik Reaksiyon**
PCA/ Plate Count Agar MPCA/ Plate Count Agar with Skimmed Milk/ Milk Plate Count Agar	Katı	Koloni Sayımı	ISO 4833	Verimlilik	(72 ± 3) sa/ (30 ± 1) °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	TSA	Kantitatif	$P_R \geq 0,7$	—
Seçici Zenginleştirme Besiyeri											
Besiyeri	**Tip**	**Mikroorganizma**	**Uluslararası Standart**	**İşlem**	**İnkübasyon**	**Kontrol Suşu**	**WDCM Numarası**	**Referans Besiyeri**	**Kontrol Metodu**	**Kriter**	**Karakteristik Reaksiyon**
Fraser/Fraser Broth	Sıvı	*Listeria monocytogenes*	ISO 11290-1	Verimlilik	(48 ± 2) sa/ (37 ± 1) °C	*Listeria monocytogenes* 4b	00021	—	Kalitatif	Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti üzerinde >10 koloni	Mat zonlu mavi yeşil koloniler
				Seçicilik		*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	TSA üzerinde Total İnhibisyon (0)	—
Half-Fraser/ Half Fraser Broth	Sıvı	*Listeria monocytogenes*	ISO 11290-1	Verimlilik	(24 ± 2) sa/ (30 ± 1) °C	*Listeria monocytogenes* 4b	00021	—	Kalitatif	Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti üzerinde >10 koloni	Mat zonlu mavi yeşil koloniler
				Seçicilik		*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	TSA üzerinde Total İnhibisyon (0)	—

MKTTn/ Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth	Sıvı	*Salmonella*	ISO 6579	Verimlilik	(24 ± 3) sa/ (37 ± 1) °C	*Salmonella* Enteritidis	00030	—	Kalitatif	XLD veya şeçilen diğer bir besiyeri üzerinde >10 koloni	Her besiyerine özgü karakteristik koloniler (bkz. ISO 6579)
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	TSA üzerinde <10 koloni	—
RVS/ Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone Broth	Sıvı	*Salmonella*	ISO 6579	Verimlilik	(24 ± 3) sa/ (41,5 ± 1) °C	*Salmonella* Enteritidis	00030	—	Kalitatif	XLD veya şeçilen diğer bir besiyeri üzerinde >10 koloni	Her besiyerine özgü karakteristik koloniler (bkz. ISO 6579)
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	TSA üzerinde <10 koloni	—
mTSB/Tryptone Soya Broth(Modified)	Sıvı	*Escherichia coli* O157	ISO 16654	Verimlilik	(21 ± 3) sa/ (37 ± 1) °C	*Escherichia coli* O157:H7	00014 (Non-Toksijenik suş)	—	Kalitatif	CT-SMAC Agar üzerinde >10 koloni	Yaklaşık 1 mm çapında soluk sarımsı kahverengi görünümlü şeffaf koloniler
				Seçicilik		*Staphylococcus aureus*	00034	—	Kalitatif	TSA üzerinde Total İnhibisyon (0)	—
Dextrose (Glucose Agar)	Katı	*Enterobacteriaceae*	ISO 21528-2	Verimlilik	(24 ± 2) sa/ (37 ± 1) °C	*Escherichia coli*	00012	—	Kalitatif	İyi Gelişme (Sarı Renk Değişikliği)	Sarı renk görünümü
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	Gelişme Yok (Renk Değişimi Yok)	—

MMG/Minerals-Modified Glutamate Medium	Sıvı	β-d-Glucuronidase-pozitif *E. coli*	ISO 16649-3	Verimlilik	(24 ± 2) sa/ (37 ± 1) °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Asit üretimi	Sarı renk değişikliği
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	Gelişme yok	—
Seçici Olmayan Sıvı Besiyeri											
Besiyeri	**Tip**	**Mikroorganizma**	**Uluslararası Standart**	**İşlem**	**İnkübasyon**	**Kontrol Suşu**	**WDCM Numarası**	**Referans Besiyeri**	**Kontrol Metodu**	**Kriter**	**Karakteristik Reaksiyon**
BHI/Brain Heart Infusion Broth	Sıvı	Koagulaz-positif staphylococci	ISO 6888-1	Verimlilik	(24 ± 2) sa/ (37 ± 1) °C	*Staphylococcus aureus*	00034	—	Kalitatif	Bulanıklık (1–2)	—
Quarter-Strength Ringer's Pepton solüsyonu Tamponlanmış Pepton-Tuz Fosfat solüsyonu	Sıvı	Dilüsyon Sıvıları	ISO 6887 (tüm bölümler)	Seyreltici	45 min – 1 h/ 20 °C to 25 °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	TSA	Kantitatif	±%30 koloni/ T0 (İlk ekimin ±%30)	—
Thioglycollate/Fluid Thioglycollate Medium	Sıvı	*Clostridium perfringens*	ISO 7937	Verimlilik	(21 ± 3) sa/ (37 ± 1) °C	*Clostridium perfringens*	00007	—	Kalitatif	Bulanıklık (1–2)	—
TSYEB/Tryptone Soya Yeast Extract Broth	Sıvı	*Listeria monocytogenes*	ISO 11290 (Tüm bölümler)	Verimlilik	(21 ± 3) sa/ (25 ± 1) °C	*Listeria monocytogenes* 4b	00021	—	Kalitatif	Bulanıklık (1–2)	—
Seçici İzolasyon Besiyeri											
Besiyeri	**Tip**	**Mikroorganizma**	**Uluslararası Standart**	**İşlem**	**İnkübasyon**	**Kontrol Suşu**	**WDCM Numarası**	**Referans Besiyeri**	**Kontrol Metodu**	**Kriter**	**Karakteristik Reaksiyon**
ALOA/Agar Listeria According to Ottaviani and Agostij	Katı	*Listeria monocytogenes*	ISO 11290	Verimlilik	(44 ± 4) sa/ (37 ± 1) °C	*Listeria monocytogenes* 4b	00021	—	Kalitatif	İyi gelişme (2)	Mat zonlu mavi yeşil koloniler
				Seçicilik		*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Total İnhibisyon (0)	—

PALCAM /PALCAM Listeria Selective Agar	Katı	*Listeria monocytogenes*	ISO 11290	Verimlilik	(44 ± 4) sa/ (37 ± 1) °C	*Listeria monocytogenes* 4b	00021	—	Kalitatif	İyi gelişme (2)	1,5-2 mm çapında zeytin yeşili-gri renkli, bazen siyah merkezli ancak her zaman siyah zonlu koloni
				Seçicilik		*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Total İnhibisyon (0)	—
XLD/Xylose Lysine Deoxycholate Agar	Katı	*Salmonella*	ISO 6579	Verimlilik	(24 ± 3) sa/ (37 ± 1) °C	*Salmonella Enteritidis*	00030	—	Kalitatif	İyi gelişme (2)	Besiyerindeki renk değişimi nedeniyle, kırmızımsı hafif zonlu siyah merkezli koloniler
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	Total İnhibisyon (0)	—
Chrom. Salmonella/ Chromogenic Salmonella Agar	Katı	*Salmonella*	ISO 6579	Verimlilik	(24 ± 3) sa/ (37 ± 1) °C	*Salmonella Enteritidis*	00030	—	Kalitatif	İyi gelişme (2)	Besiyerindeki renk değişimi nedeniyle, eflatun renkli koloniler
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	Total İnhibisyon (0)	—
Seçici Olmayan İzolasyon Besiyeri											
Besiyeri	**Tip**	**Mikroorganizma**	**Uluslararası Standart**	**İşlem**	**İnkübasyon**	**Kontrol Suşu**	**WDCM Numarası**	**Referans Besiyeri**	**Kontrol Metodu**	**Kriter**	**Karakteristik Reaksiyon**
Nutrient Agar	Katı	*Enterobacteriaceae*	ISO 21528 (Tüm bölümler)	Verimlilik	(24 ± 2) sa/ (37 ± 1) °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	İyi gelişme (2)	—
Nutrient Broth	Sıvı	Koloni Sayımı	ISO 4833	Verimlilik	(24 ± 2) sa/ (37 ± 1) °C	Escherichia coli	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Bulanıklık (1–2)	—
Tryptophan Broth	Sıvı	*Escherichia coli* O157	ISO 16654	Verimlilik	(21 ± 3) sa/ (37 ± 1) °C	*Escherichia coli* O157:H7	00014 (Non-Toksijenik suş)	—	Kalitatif	Bulanıklık (1–2)	—

TSYEA/ Tryptone Soya Yeast Extract Agar	Katı	*Listeria monocytogenes*	ISO 11290 (Tüm Bölümler)	Verimlilik	(21 ± 3) sa/ (37 ± 1) °C	*Listeria monocytogenes* 4b	00021	—	Kalitatif	İyi gelişme (2)	—
Çok Amaçlı Besiyeri											
Besiyeri	**Tip**	**Mikroorganizma**	**Uluslararası Standart**	**İşlem**	**İnkübasyon**	**Kontrol Suşu**	**WDCM Numarası**	**Referans Besiyeri**	**Kontrol Metodu**	**Kriter**	**Karakteristik Reaksiyon**
Tamponlanmiş Peptonlu Su /TPS	Sıvı	*Salmonella* aranmasında ön zenginleştirme	ISO 6579	Verimlilik	(18 ± 2) sa/ (37 ± 1) °C	*Salmonella* Enteritidis	00030	—	Kalitatif	Bulanıklık (1–2)	—
Mikroorganizma Sayımı için Referans Besiyeri											
Besiyeri	**Tip**	**Mikroorganizma**	**Uluslararası Standart**	**İşlem**	**İnkübasyon**	**Kontrol Suşu**	**WDCM Numarası**	**Referans Besiyeri**	**Kontrol Metodu**	**Kriter**	**Karakteristik Reaksiyon**
TSA/ Tryptone Soya Agar	Katı	Koloni Sayımı	—	Verimlilik	Metotta belirtildiği gibi TSA referans besiyeri olarak kullanılır.	*Escherichia coli*	00012	TSA besiyeri partisi zaten onaylıdır.	Kantitatif	$P_R \geq 0,7$	Her türe özgü karakterisitik koloni
SDA/Sabouraud Dextrose Agar	Katı	Koloni Sayımı	—	Verimlilik	Metotta belirtildiği gibi SDA referans besiyeri olarak kullanılır.	*Saccharomyces cerevisiae*	00058	SDA besiyeri partisi zaten onaylıdır.	Kantitatif	$P_R \geq 0,7$	Her türe özgü karakterisitik koloni
Su Mikrobiyolojisinde Kullanılan Kültür Besiyerleri											
Besiyeri	**Tip**	**Mikroorganizma**	**Uluslararası Standart**	**İşlem**	**İnkübasyon**	**Kontrol Suşu**	**WDCM Numarası**	**Referans Besiyeri**	**Kontrol Metodu**	**Kriter**	**Karakteristik Reaksiyon**
Lactoz TTC Agar	Katı	*Escherichia coli* / Koliform bakteriler	ISO 9308-1	Verimlilik	(21 ± 3) sa/ (36 ± 2) °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	TSA	Kantitatif	$P_R \geq 0,7$	Membranın altında besiyerinde sarı renk
				Seçicilik		*Enterococcus faecalis*	00009	—	Kalitatif	Total İnhibisyon (0)	—

mCP/ Membran *Clostridium perfringens* Agar	Katı	*Clostridium perfringens*	Council Directive 98/83/EC	Verimlilik	(21 ± 3) sa/ (44 ± 1) °C Anaerobic atmosfer koşulları	*Clostridium perfringens*	00007	TSA veya anaeroblar için kullanılan seçici olmayan besiyeri	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Sarı koloniler; fosfataz testi pozitif
				Seçicilik		*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Toplam İnhibisyon (0)	-
Slanetz and Bartley/ Slanetz and Bartley Medium	Katı	Bağırsak Enterekokları	ISO 7899-2	Verimlilik	(44 ± 4) sa/ (36 ± 2) °C	*Enterococcus faecalis*	00009	TSA	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Kırmızı bordo pembe koloniler
				Seçicilik		*Escherichia coli*	00012 veya 00013	—	Kalitatif	Toplam İnhibisyon (0)	-
Sulfite Iron/Iron Sulfite Agar Tryptose Sulfite (TS)/ Tryptose Sulphite Agar	Katı	Sülfit indirgeyen anaeroblar (clostridia)	ISO 6461-2	Verimlilik	(44 ± 4) sa/ (37 ± 1) °C Anaerobik atmosfer koşulları	*Clostridium perfringens*	00007	TSA,kanlı agar veya anaeroblar için kullanılan seçici olmayan besiyeri	Kantitatif	$P_R \geq 0,5$	Siyah koloniler
YEA/ Yeast Extract Agar	Katı	Total flora	ISO 6222	Verimlilik	(44 ± 4) sa/ (36 ± 2) °C	*Escherichia coli*	00012	YEA besiyeri partisi zaten onaylıdır	Kantitatif	$P_R \geq 0,7$	—
Saline Salt Peptone Diluent Peptone Tuz Solüsyonu Ringer's solution (1/4 strength) Tamponlanmış Fosfat Solüsyonu	Sıvı	Seyreltme sıvıları	ISO 8199	Seyreltici	45 dak – 1 h/ 20 °C– 25 °C	*Escherichia coli*	00012 veya 00013	TSA	Kantitatif	±30 % koloni/ T0 (İlk ekimin ±30%)	—