

## AMAÇ

Gerekli ortam sağlandığında, tekniğine uygun olarak dilüsyon sıvısı hazırlayabileceksiniz.

## ARAŞTIRMA

- İnternet, kütüphane, laboratuvar vb. yerlerden dilüsyonun tanımını araştırınız.
- Yakında bulunan mikrobiyoloji laboratuvarlarını ziyaret ederek dilüsyonun amacını, hangi çözeltileri kullandıklarını ve dilüsyon sırasında nelere dikkat ettiklerini araştırınız.
- Araştırma sonuçlarınızı sınıftaki arkadaşlarınızla paylaşınız.

# 1. DİLÜSYON SIVISI (SEYRELTME ÇÖZELTİSİ) HAZIRLAMA

## 1.1. Dilüsyonun (Seyreltmenin) Tanımı ve Önemi

Dilüsyonun kelime anlamı, seyreltmedir. Konsantre bir çözeltilerden seyreltik (dilüe) bir çözelti hazırlanmasına **seyreltme (dilüsyon)** denir. Mikrobiyolojide ise incelenecek numunenin birim miktarında bulunan mikroorganizma sayısını azaltmak amacıyla mikroorganizma içermeyen sıvılarla numunenin karıştırılması işlemine dilüsyon denir.



Şekil 1.1: Orjinal solüsyonun seyreltilmesi

Örneğin 25 ml orijinal solüsyon 25 ml tuz çözeltisi ile karıştırılırsa; solüsyon  $25 / 50 = \frac{1}{2}$  oranında seyrelmiş olur (Şekil 1.1).

Aynı şekilde 1 ml orijinal solüsyon 50 ml'ye kadar çözücü ile tamamlanır ve bu dilüsyondan 1 ml alınarak 100 ml'ye tamamlandığında  $1/5000$  oranında dilüsyon elde edilmiş olur. Bu durumda dilüsyon faktörü 5000 olur. Elde edilen çözeltilerde ölçülen madde

konsantrasyonu 5000 ile çarpıldığında, orijinal solusyondaki madde konsantrasyonu bulunmuş olur.

- **Dilüsyon oranı:** Seyreltilmiş çözeltildeki çözünen madde miktarının, konsantre çözeltildeki çözünen madde miktarına oranına **dilüsyon (seyreltilme) oranı** denir. Dilüsyondaki mikroorganizma sayısının orijinal örneğe göre kaç kat seyrelmiş olduğunu belirten orandır.

$$\text{Dilüsyon oranı}(DO) = \text{numune miktarı} / (\text{numune miktarı} + \text{dilüsyon sıvısı miktarı})$$

- **Dilüsyon faktörü:** Dilüsyonla yapılan analiz sonucunda elde edilen sonucu orijinal örneğe uyarlamak amacıyla kullanılan çarpana ise **dilüsyon faktörü** denir.

$$\text{Dilüsyon faktörü} (DF) = (\text{numune miktarı} + \text{dilüsyon sıvısı miktarı}) / \text{numune miktarı}$$

Örneğin;  $10^{-3}$ 'lük (1/1000) dilüsyondan yapılmış ekimde dilüsyondaki mikroorganizma sayısı orijinal örneğe göre 1000 kat seyreltiğinden dilüsyon faktörü 1000'dir ve sayılan koloni miktarı 1000 ile çarpılarak orijinal örnekte bulunan mikroorganizma miktarı bulunur.

**Örnek 1:** 25 ml numune 225 ml dilüsyon sıvısı ile homojenize edilerek hazırlanan dilüsyonun, dilüsyon oranı ve dilüsyon faktörünü hesaplayınız.

$$DO = 25 / 25 + 225 = 25 / 250 = 1 / 10$$

$$DF = 10$$

**Örnek 2:** 1/5 'lik dilüsyondan 2 ml alınıp 8 ml 'lik dilüsyon sıvısıyla homojenize edilerek hazırlanan dilüsyonu, dilüsyon oranı ve dilüsyon faktörünü hesaplayınız.

$$DO = 1 / 5 \times (2 / 2 + 8) = 1 / 5 \times 2 / 10 = 1 / 25$$

$$DF = 25$$

**Örnek 3:** 1/25 'lik dilüsyondan 5 ml alınıp üzerine 20 ml dilüsyon sıvısı karıştırılarak elde edilen yeni dilüsyonun dilüsyon oranı ve dilüsyon faktörünü hesaplayınız.

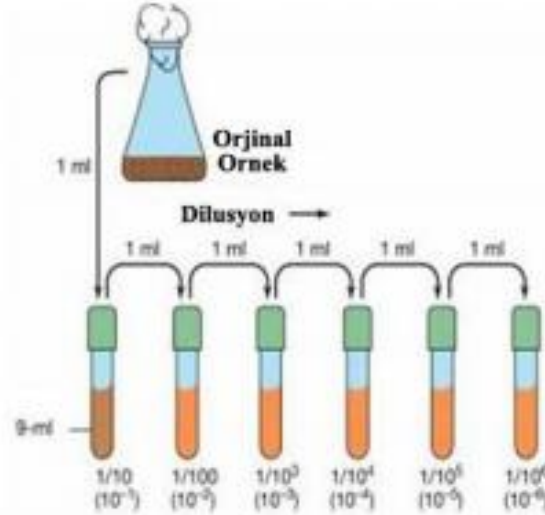
$$DO = 1 / 25 \times (5 / 5 + 20) = 1 / 25 \times 5 / 25 = 1 / 125$$

$$DF = 125$$

Analizi yapılacak örneğin ml'sinde binlerce hatta milyonlarca mikroorganizma bulunabilir. Bu şekilde direk orijinal örnekteki mikroorganizma sayısını bulmak mümkün olmamaktadır; bu yüzden genellikle incelenecek örneklerin uygun serilerde dilüsyonları hazırlanmaktadır.

Dilüsyon hazırlama, mikrobiyolojik açıdan incelenecek orijinal örnek içindeki mikroorganizma sayısının belli oranlarda sulandırılarak daha aza indirilmesini amaçlayan bir işlemdir. Diğer bir ifadeyle dilüsyonun amacı, bir materyaldeki hücre sayısını bir seri seyreltme yaparak kademeli bir şekilde azaltmak ve petri kutusunda fazla koloni oluşturmadan mikroorganizma sayımını kolaylaştırmaktır (Şekil 1.2).

Mikrobiyolojik analizlerde genellikle seyreltmenin 1'e 9 şeklinde yapılmasının sebebi hesap kolaylığı içindir; ancak bazı özel durumlarda değişik seyreltme oranları da kullanılabilir.



Şekil 1.2: Orijinal örnekten desimal dilüsyon serilerinin hazırlanması

## 1.2. Dilüsyon Sıvıları

Dilüsyon hazırlamada kullanılan sıvılara **dilüsyon sıvısı** (diluent=seyreltme çözeltisi) denilmektedir. Saf su, fizyolojik tuzlu su (FTS, serum fizyolojik), 1/4 kuvvetinde ringer çözeltisi, % 0,1'lik peptonlu su, tamponlanmış peptonlu su ve nutrient broth en sık kullanılan dilüsyon sıvılarıdır.

Saf su; göl, baraj ve deniz suyundan mikrobiyolojik analiz yapılacağı zaman kullanılan dilüsyon sıvısıdır. Saf su besin öğelerince zengin gıdaların homojenizasyonunda ve dilüsyonlarında kullanılmamalıdır.

Dilüsyon sıvılarının, incelenen örneğe veya mikroorganizma kültürünün özelliğine göre seçilip kullanılması çok önemlidir; aksi takdirde, seri dilüsyonların hazırlanması esnasında hücreler canlılık özelliklerini yitirebilir. Örneğin; göl suyundaki bakteri sayısı belirlenmek istendiğinde, dilüsyon sıvısı olarak steril damıtık su veya steril göl suyu kullanılabilir; ancak incelenecek örnek besin öğesi bakımından (organik maddelerce) zengin bir ortam ise, dilüsyon sıvısı olarak damıtık su tercih edilmemelidir; çünkü bakteri hücrelerinin içinde bulunduğu sıvı ortamın osmotik basıncı (çözünen madde konsantrasyonu) yüksektir.



Böylesi bir ortamdaki bakterileri damıtık suya aktarınca, osmatik basınçtaki büyük değişim bakteri hücrelerinde hasarlara, hatta ölümlere neden olabilir. Bu durumda da yanlış sonuçlar alınacağı açıktır.

Buna göre, dilüsyon sıvılarının seçiminde, incelenecek örnekteki osmatik basınç ile bu örneğin dilüe edileceği dilüsyon sıvısındaki osmatik basıncın birbirine çok yakın olmasına dikkat edilmelidir.

### **1.2.1. Fizyolojik Tuzlu Su (Serum Fizyolojik-FTS)**

FTS; tıp, diş sağlığı ve veteriner hekimlik gibi birçok sağlık alanında yaraların temizlemesi, solunum yolu enfeksiyonları sonucunda tıkanan burunların açılması vb. amaçlarla kullanıldığı gibi laboratuvar uygulamalarında da sıklıkla yararlanılan tuzlu su çözeltilisidir. Genel amaçlı seyreltme çözeltilisi olarak yararlanılan fizyolojik tuzlu suyun (% 0.85-0.90'luk NaCl), osmotik basıncı mikroorganizmaların osmotik basıncına eşdeğer yani izotoniktir.

#### **➤ Hazırlanışı**

- 8,5 g NaCl 1000 ml saf su içerisinde çözündürülür.
- Test tüpü, erlenmayer veya balon gibi cam malzemelere gerekli miktarlarda dağıtılır.
- Sterilizasyona hazırlanır.
- Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

### **1.2.2. Peptonlu Su (% 0,1)**

Genel amaçlı bir seyreltme çözeltilisidir. Mikrobiyolojik analizlerde bazen besiyeri amacıyla da kullanılmaktadır.

#### **➤ Hazırlanışı**

- 1 g pepton 1000 ml damıtık su çözeltilisi içinde çözündürülür.
- pH'ı uygun bir çözeltili ile 25°C'de  $7,0 \pm 0,2$  olacak şekilde ayarlanır.
- Tüplere veya erlenmayerlere gerekli miktarlarda (9 ml, 90 ml vb.) dağıtılır.
- Sterilizasyona hazırlanır.
- Otoklavda 121°C'de 20 dk. sterilize edilir.

### **1.2.3. Tamponlanmış Peptonlu Su**

Asit veya baz ilave edildiği zaman çok az pH değişimi gösteren çözeltilere "tampon" çözeltiler denir. Laboratuvarlarda yapılan bazı deneylerde kullanılan çözeltilere asit veya baz ilave edildiğinde veya mikroorganizmaların üremesi neticesinde ortama bıraktıkları atıklardan dolayı pH değerlerinin fazla değişmemesi istenir. Tampon çözeltilerin kullanılması ile bu değişim önlenmektedir.

Tampon çözeltiler, zayıf asit veya bazlarla bunların kuvvetli tuzundan oluşur. Tampon olarak en çok kullanılan maddeler; fosfatlar ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), karbonatlar, asetat ve sitratlardır.

Bu besiyeri ISO 6887 tarafından genel amaçlı bir seyreltme çözeltisi olarak da önerilmektedir. Piyasada tamponlanmış peptonlu suyun 500 g ve 5 kg'lık ambalajlarda toz formu satılmaktadır.

**Tamponlanmış peptonlu su seyreltme amacı ile kullanılacak ise mutlaka 25,5 g/L konsantrasyonda hazırlanmalıdır.**

➤ **Bileşimi;**

- 10,0 g/l pepton,
- 5,0 g/l NaCl (sodyum klorür),
- 9,0 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (disodyumhidrojen fosfat),
- 1,5 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (potasyum dihidrojen fosfat),
- 1000 ml su şeklindedir.

➤ **Hazırlanışı**

- Toz ya da tablet ticari tampon maddeden 25,5 g tartılır.
- Hazır karışım bulunmadığında, bileşenler istenen hacme göre hesaplanarak tartılır.
- Balonjojeye aktarılarak saf su içinde gerekirse su banyosunda ısıtılarak çözündürülür.
- pH'ı uygun bir çözelti ile  $25^\circ\text{C}$ 'de  $7,0 \pm 0,2$  olacak şekilde ayarlanır. Tüplere veya erlenmayerlere gerekli miktarlarda (9 ml, 90 ml vb.) dağıtılır.
- Sterilizasyona hazırlanır.
- Otoklavda  $121^\circ\text{C}$ 'de 15 dk. sterilize edilir.

#### **1.2.4. Peptonlu Fizyolojik Tuzlu Su (MRD- Maximum Recovery Diluents)**

Günümüzde TS 6235 ve ISO 6887'ye göre formülü serum fizyolojik (% 0,85) + pepton (% 0,1) olan bu çözelti FTS yerine oldukça fazla kullanılmaktadır.

1 litresinde 8,5 g tuz (NaCl) ve 1 g pepton bulunan ve pepton-tuz olarak da anılan bu seyreltme çözeltisinin toz formu piyasada 500 g'lık ambalajlarda ticari olarak satılmaktadır.

➤ **Bileşimi;**

- 1,0 g/l pepton,
- 8,5 g/l NaCl (sodyum klorür),
- 1000 ml su şeklindedir.

➤ **Hazırlanışı**

- Ticari toz formundan ISO 6887 'ye göre 9,5 g/l hesabı ile hazırlanmaktadır.
- Ticari toz formu bulunmadığı durumlarda bileşenler istenen hacme göre hesaplanarak tartılır.
- Bileşenler, su içerisinde, gerektiğinde ısıtıcı manyetik karıştırıcı üzerinde biraz ısıtılmak suretiyle çözündürülür.
- Uygun bir çözelti ile pH'ı 25°C'de  $7,0 \pm 0,2$  olacak şekilde ayarlanır.
- Tüplere veya erlenmayerlere gerekli miktarlarda (9 ml, 90 ml vb.) dağıtılır.
- Sterilizasyona hazırlanır.
- Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

Otoklav sonrasında oda sıcaklığında 1 ay süre ile kontamine edilmediği takdirde kullanılabilir.

### 1.2.5. ¼ Kuvvetinde Ringer Çözeltisi

Başta peynirler olmak üzere süt ürünlerinin mikrobiyolojik analizinde seyreltme sıvısı olarak ¼ kuvvetinde Ringer çözeltisi kullanılmalıdır. Süt ürünleri dışında Ringer kullanmak gerekli değildir. Bu çözeltinin de piyasada hazır ticari tabletleri bulunmaktadır.

➤ **Bileşimi;**

- 2.25 g/l sodyum klorür (NaCl),
- 0.105 g/l potasyum klorür (KCl),
- 0.06 g/l kalsiyum klorür, susuz (CaCl<sub>2</sub>),
- 0.05 g/l sodyum hidrojen karbonat (NaHCO<sub>3</sub>),
- 1000 ml su şeklindedir.

➤ **Hazırlanışı**

- Hazır ticari formundan 1 tablet alınıp 500 ml damıtık su içinde çözündürülür.
- Hazır tablet bulunmadığında, bileşenler istenen hacme göre hesaplanarak tartılır.
- pH'ı uygun bir çözelti ile 25°C'de  $6,9 \pm 0,2$  olacak şekilde ayarlanır.
- Tüplere veya erlenmayerlere gerekli miktarlarda (9 ml, 90 ml vb.) dağıtılır.
- Sterilizasyona hazırlanır.
- Otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilir.

### 1.2.6. % 15'lik Sodyum Klorür Çözeltisi

Bu çözelti, yüksek tuz konsantrasyonunu seven (halofilik), diğer bir ifadeyle gelişmesi için sodyum klorüre ihtiyaç duyan mikroorganizmaların teşhis ve sayımlarında dilüsyon sıvısı olarak kullanılmaktadır.

#### ➤ Hazırlanışı

- 150 g sodyum klorür üzerine damıtık sudan azar azar eklenerek 1000 ml'ye tamamlanır ve çözündürülür.
- Tüplere veya erlenmayerlere gerekli miktarlarda (9 ml, 90 ml vb.) dağıtılır.
- Sterilizasyona hazırlanır.
- Otoklavda 121°C'de 20 dk. sterilize edilir.

### 1.2.7. % 20'lik Glikoz Çözeltisi

Reçel, meyve suyu konsantresi gibi yüksek şekerli örneklerde, yüksek şeker konsantrasyonuna dayanıklı (osmotik basınca dayanıklı-osmotolerant) ya da yüksek şeker konsantrasyonunu seven (osmofilik) mikroorganizmalarla ilgili çalışmalarda kullanılan seyreltme çözeltisidir.

#### ➤ Hazırlanışı

- 200 g glikoz üzerine damıtık sudan azar azar eklenerek 1000 ml'ye tamamlanır ve çözündürülür.
- Tüplere veya erlenmayerlere gerekli miktarlarda (9 ml, 90 ml vb.) dağıtılır.
- Sterilizasyona hazırlanır.
- Otoklavda 115°C'de 20 dk. sterilize edilir.

### 1.2.8. Özel Seyreltme Çözeltileri

- **% 2'lik Sodyum Sitrat Çözeltisi:** TS 7895 EN ISO 8261'e göre peynirlerin homojenizasyonunda kullanılan seyreltme çözeltisidir. Bu amaçla 20 g/L konsantrasyonda olacak şekilde Trisodyum Sitrat dihidrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) distile su içinde 45 – 50°C arasındaki bir sıcaklıkta ısıtılarak çözülür. pH 'ı uygun bir çözelti ile 25°C'de  $7,5 \pm 0,2$  olacak şekilde ayarlanır. Amaca uygun erlen ve/ veya tüplere dağıtılp, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.
- **Anaeroblar için Seyreltme Çözeltisi:** Anaerob mikroorganizmaların (yalnızca  $\text{O}_2$ 'siz ortamda yaşayabilen) analizinde kullanılan ve bileşiminde ortamdaki  $\text{O}_2$ 'i bağlayan maddeler bulunan seyreltme çözeltisidir. Bu amaçla Pepton from Casein % 0,1 ; Cystein chloride monohydate % 0,05 ; Sodyum klorür % 0,85 olacak şekilde bileşenler distile su içinde gerekirse ısıtılarak eritilir ve uygun

kaplara (erlen ve/ veya tüpler) dağıtılarak otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edilir.

- **Tween 80:** Krema gibi yağ oranı yüksek gıdaların seyreltilmesinde kullanılan çözeltilerin içine sterilizasyon öncesi % 1 oranında katılır. Toprakla çalışıldığında bakterilerin toprak agregatlarına yapışmasını engelleme özelliğinden dolayı tercih edilir.

### 1.3. Dilüsyon Çözeltisi Hazırlarken Dikkat Edilecek Noktalar

- Dilüsyon sıvıları, ekim öncesinde hazırlanmalı ve sterilize edilmelidir.
- Sonuçların kesinliğini arttırmak amacıyla, seyreltilerin hazırlanmasında susuz temel bileşenlerin veya susuz ticari hazır bileşimlerin kullanılması tavsiye edilir. Üretici firmaların talimatlarına uyulmalıdır.
- Aksi belirtilmedikçe, sadece analitik saflıktaki reaktifler kullanılmalı, aksi belirtilmedikçe damıtık, mineralleri giderilmiş veya eş değer saflıkta su kullanılmalıdır.
- Besiyeri pH'ının gerekli olan her ayarlamasında, besiyeri hacmindeki, dolayısıyla bileşimindeki değişimi en aza indirmek amacıyla, sodyum hidroksit (NaOH) veya hidroklorik asitin (HCl) uygun molariteli çözeltileri kullanılmalı yani genel olarak besiyeri hacminin daha düşük olduğu durumlarda daha yüksek molariteli çözeltiler kullanılmalıdır.
- Dilüsyon sıvısının çeşidi incelenen örneğe veya mikroorganizma kültürünün özelliğine göre seçilmelidir. Eğer dilüsyon sıvısı analiz edilecek örneğe veya mikroorganizma kültürüne göre seçilmezse dilüsyon serileri hazırlama sırasında mikroorganizmalar canlılıklarını kaybedebilir; bu da hatalı sonuç bulunmasına neden olur.
- Dilüsyon sıvısı, incelenecek örneğin mikrobiyal yükünde bir değişikliğe neden olmamalıdır. Bu amaçla kullanılan seyreltme çözeltisinin osmotik basıncının incelenecek örneğin osmotik basıncına eş değer veya çok yakın olmasına dikkat edilmelidir.
- Tartımlar hassas terazide titizlikle yapılmalıdır.
- Su miktarı doğru olarak alınmalı ve katı maddelerin sıvı içerisinde tamamen çözünmesi sağlanmalıdır.
- Seyreltme çözeltileri, 6 ayda bir toksik maddelerin varlığı açısından kontrol edilmelidir.
- Seyreltme ve homojenizasyon amacıyla hazırlanan çözeltilere gerekirse manyet (balık; manyetik taş) ilave edilmelidir. Ancak homojenizasyon için stomacher ya da blender kullanılacak ise besiyerine manyet ilavesi yapılmaz.
- Dilüsyon sıvıları tercihen renkli ve mutlaka kapaklı kaplarda saklanmalıdır.
- Dilüsyon sıvısının adı ve hazırlandığı tarih, kap üzerinde açık bir şekilde yazılmalıdır.



- Hazırlanan dilüsyon sıvıları hemen kullanılmayacaksa, karanlıkta, 0 °C - 5 °C arasındaki bir sıcaklıkta, bir ayı geçmeyecek bir süreyle, hacminde ve bileşiminde herhangi bir değişikliğe yol açmayacak şartlarda muhafaza edilmelidir.
- Sterilize edilmiş dilüsyon sıvılarının kontamine edilmemesine özen gösterilmeli, kuşku duyulursa bu çözelti asla kullanılmamalıdır.

#### 1.4. Sterilizasyona Hazırlık

Dilüsyon sıvıları hazırlandıktan sonra genellikle tüplere (9 ml) ya da erlenlere (90 ml) aktarılmaktadır. Eğer analiz sırasında örnek ve dilüsyon sıvısı manyetik karıştırıcı ile karıştırılacaksa, dilüsyon sıvısının içerisine manyet (balık vb.) ilave edilmelidir.

Cam malzemenin sterilizasyonunda olduğu gibi seyreltme çözeltisi aktarılan erlen ve tüpler yağlı pamuk ile kapatıldıktan sonra alüminyum folyolarla sarılarak tüplüklere yerleştirilir (Resim 1.1/ bk.Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Modülü).



**Resim 1.1: Sterilizasyon için hazırlanmış tüp ve erlenler**

Tüpler asla cam behere konularak sterilize edilmemelidir; çünkü cam beherde tüpler arasında sıkışan hava ısıyı iletmez. Tüpler ideal olarak tel sepette, yoksa tabandan delinmiş boş konserve kutularında sterilize edilmelidir. Erlen ve tüplükler otoklav sepetine yerleştirildikten sonra otoklavda sterilize edilir (Resim 1.2 ve 1.3). Doğru çalışmayan, geç ısınan otoklav kullanılmamalıdır.



**Resim 1.2: Otoklav sepeti**








**Resim 1.3: Otoklav**

## UYGULAMA FAALİYETİ

- Aşağıdaki işlem basamakları ve önerileri dikkate alarak 500 ml tamponlanmış peptonlu su hazırlayınız.

**Kullanılan araç gereçler:** Pepton, sodyum klorür, disodyumhidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat spatül, tartım kabı, terazi, balon joje, saf su, pipet, deney tüpleri, erlen, su geçirmez yağlı pamuk, alüminyum folyo, tüplük, cam yazar, otoklav

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Hazırlanacak miktara göre pepton, sodyum klorür, disodyumhidrojen fosfat, potasyum ve dihidrojen fosfat miktarlarını hesaplayınız.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Laboratuvar kıyafetlerinizi giyiniz.</li><li>➤ Ellerinizi her çalışma öncesinde yıkayınız ve dezenfekte ediniz.</li><li>➤ Çalışma ortamınızın temiz olmasına dikkat ediniz.</li><li>➤ Hesaplamalarınızı kontrol ediniz.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Hesaplanan miktarlarda bileşenleri tartınız.</li></ul> 	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Gerekli kimyasalları tezgâh üzerine çıkarınız.</li><li>➤ Spatülü ve tartım kabını hazırlayınız.</li><li>➤ Hassas teraziyi önceden ayarlayınız.</li><li>➤ Tartım kabının darasını almayı unutmayınız.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tartılan bileşenleri 500 ml'lik balon jöjeye aktarınız.</li><li>➤ Balon jöjeye bir miktar saf su ekleyiniz.</li><li>➤ Bileşenlerin çözünmesini sağlayınız.</li></ul> 	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Bileşenlerin tamamen çözünmesine dikkat ediniz.</li><li>➤ Balonjöjeye saf su eklerken ölçü çizgisine yaklaşıldığında daha dikkatli olunuz.</li><li>➤ Sıvı okuma kurallarına uyunuz.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Bileşenlerin tamamı çözüldükten sonra balon jöjenin ölçü çizgisine kadar saf su ile doldurunuz.</li></ul>	

<p>➤ Çözeltinin pH'ını ölçüp 7,0'a ayarlayınız</p> 	<p>➤ Önceden pH metreyi kalibre etmeyi unutmayınız.</p>
<p>➤ Hazırlanan çözeltilerden tüplere 9'ar ml, erlene 90 ml koyunuz.</p> 	<p>➤ Sıvı okuma kurallarına uyunuz.</p>
<p>➤ Tüp ve erlenmayerlerin ağızlarını pamuklayıp folyolayınız.</p>	<p>➤ Tüp ve erlenmayerin ağızını modülde anlatıldığı gibi pamuklayıp alüminyum folyo ile sarınız.</p>
<p>➤ Tüp ve erlenlerin üzerine gerekli bilgileri yazınız.</p>	<p>➤ Asetat kalemi kullanınız.</p>
<p>➤ Tüp ve erlenleri otoklav sepetine ardından otoklava yerleştiriniz.</p> 	<p>➤ Dikkatli olunuz.</p>
<p>➤ Sterilizasyon yapınız.</p>	<p>➤ Uygun sterilizasyon sıcaklığı ve süresini seçiniz.  ➤ Çalışma ortamını, kullanılan araç ve gereçleri temizleyiniz.  ➤ Laboratuvar önlüğünüzü çıkarıp asınız.  ➤ Ellerinizi her çalışma sonrasında yıkayınız.  ➤ Laboratuvar son kontrollerinizi yapınız.</p>

## AMAÇ

Gerekli ortam sağlandığında, tekniğine uygun olarak mikrobiyolojik analizler için numune hazırlayabileceksiniz.

## ARAŞTIRMA

- Çevrenizdeki mikrobiyoloji laboratuvarlarını ziyaret ederek analiz numunesi hazırlanırken nelere dikkat edildiğini araştırınız.
- Analiz numunesi hazırlanırken ne gibi işlemler yapıldığını araştırınız.

## 2. ANALİZ NUMUNESİ HAZIRLAMA

Örneklerin alınması ve laboratuvara ulaştırılması sırasındaki yetersiz uygulamalar, mikrobiyolojik analizlerde hatalı sonuçlara neden olduğu gibi, hastalıkların yanlış tedavisine de neden olmaktadır. Bu nedenle örneklerin analize hazırlanmasından önce, örnek alınmasındaki bazı kuralların bilinmesi gerekmektedir.

Kaynak ne olursa olsun, bütün örneklerin alınmasında bazı genel kurallar bulunmaktadır. Bunlar:

- Steril koşullarda çalışılmalı, örneğin çevreye, çevreden de örneğe kontaminasyon engellenmelidir.
- Yeterli miktarda örnek alınmalı, az ya da çok fazla olmamalıdır.
- Örneğin özelliğine uygun yöntem ve malzemeler kullanılarak örnek alınmalıdır.
- Alınan örnek, uygun taşıma besiyeri içinde ya da uygun kaplarda derhal laboratuvara gönderilmelidir.
- Eğer laboratuvara hemen ulaştırılmıyorsa örneğin özelliğine göre saklanmalıdır. Örneğin, normal flora içeren örnekler buzdolabı sıcaklığında (+4°C'de), steril vücut sıvıları ise 37°C'de (idrar bu kuralın dışında) bekletilmelidir.
- Alınan örnek hastalık teşhisine yönelik ise:
  - Örnek, antibiyotiğe başlanmadan önce ve mümkün olduğunca erken alınmalıdır. Kontrol amacıyla antibiyotik kesildikten 48 saat sonra alınmalıdır.
  - Mikroorganizmaların en yoğun ve canlı olduğu bölgeden örnek alınmalıdır.
  - Hastalığın uygun zamanında alınmalıdır. Mesela tifoda birinci hafta kan kültürü, daha sonra dışkı kültürü yapılmalıdır.
  - Hastalığın özelliğine göre örnek alınmalıdır. İshalde dışkı, akciğer enfeksiyonunda balgam, tonsillitte boğaz örneği alınması gibi.
- Alınan her örnek için örnek kabının üzerine yapıştırılmak üzere bir etiket doldurulmalıdır. Bu etiketteki bilgiler, örneğin özelliğine göre değişmektedir.



Mikrobiyolojik analiz için alınan örneklerin mümkün olan en kısa süre içerisinde laboratuvara getirilmesi gerekmektedir. Örneklerin, içerdikleri mikroorganizma sayısını azaltacak ya da artıracak koşullardan tümüyle arındırılmış olarak laboratuvara getirilmesine dikkat edilmelidir. Alınan örneklerin laboratuvara getirilmesi, örnek özelliğine uygun olarak yapılmalıdır.

## 2.1. Analiz Numunesinin Hazırlanması Sırasında Alınacak Önlemler

- Analiz edilecek örneğin bulunduğu kap veya ambalaj açılırken homojenizasyon işlemi veya aktarma sırasında çevreden örneğe, örnekten de çevreye ve diğer örneklerle kontaminasyon önlenmeli (aseptik koşul), laboratuvarın kapı ve pencereleri kapalı tutularak hava akımı engellenmelidir.
- Ambalaj açılırken kullanılan makas, konserve veya şişe açacakları, bıçak vb. önceden kâğıt veya alüminyum folyoya sarılarak sterilize edilmiş olmalı veya steril, tek kullanımlık olanlar tercih edilmelidir.
- Ambalajın alkolle dezenfeksiyonunda dikkat edilecek en önemli nokta; alkolün örneğe karışmasının önlenmesidir; aksi durumda alkolün mikroorganizmalar üzerine olumsuz etkisi nedeniyle analiz sonucu hatalı olmaktadır.
- Örnekte normal olmayan koku, görünüş vb. varsa kaydedilip şahit örnek, buzdolabında saklanmalıdır.
- Elektrik kesintisi gibi durumlarda zorunlu olarak analiz hemen uygulanamayacaksa açılan ambalaj tekrar kapatılmaz. Bu durumda ambalaj içindeki örnek laboratuvardaki steril bir kaba aktarılarak kesinti sonuna kadar saklanmalıdır.

## 2.2. Numunenin Laboratuvara Kabulü

Öncelikle örnek, analizi yapılacak laboratuvar tarafından kabul edilmelidir. Bunun için laboratuvar personeli örneğin laboratuvara gerekli koşullarda getirilip getirilmediğini kontrol etmeli, eğer uygun koşullarda getirildiğinden emin olursa örneği analiz için kabul etmelidir. Aksi bir durum söz konusu ise ya analiz için kabul etmemeli ya da kabul formuna örnekle ilgili olumsuzlukları belirtmelidir (Tablo 2.1).

Laboratuvara getirilen ve analiz için kabul edilen örnek üzerinde laboratuvarın özelliğine göre örneğin laboratuvara kabul tarihi, kabul saati ve örnekle ilgili tüm bilgiler yazılmalıdır.

Aynı örnekte kimyasal analizler de yapılacaksa, öncelikle mikrobiyolojik analiz için analiz ve şahit örnekleri ayrılmalıdır. Laboratuvara kabul edilen örneğin paraleli, şahit olarak ürün özellikleri değişmeyecek şekilde saklanmalıdır. Analiz için gelen örnekler mümkün olan en kısa zamanda analize alınmalıdır.



..... LABORATUVARI NUMUNE KABUL FORMU	
<b>Tarih</b>	:
<b>Saat</b>	:
<b>Numune</b>	:
<b>Parti Nu.</b>	:
<b>Miktar</b>	:
<b>Sıcaklık</b>	:
<b>Açıklama</b>	:

**Tablo 2.1: Laboratuvar numune kabul formu örneği**

### 2.3. Ambalajın Açılması

Kapalı ambalaj içerisinde laboratuvara getirilen örneklerin analiz sırasında örneğin çevreden ve çevrenin örnekten kontaminasyonunun önlenmesi için laboratuvar kurallarına uyulmalıdır. Bu amaçla aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir:

- Öncelikle aseptik çalışma ortamı hazırlanmalıdır.
- Ambalajın açılması sırasında kullanılacak aletler (makas, bistüri vb.) önceden sterilize edilmiş olmalıdır.
- Eğer örnek sıvı veya yarı sıvı ise örnek kabı açılmadan önce iyice çalkalanmalıdır.
- Kapalı ambalaj açılmadan önce açılacak olan kısım ve çevresi %70'lik alkol veya uygun bir kimyasalla silinip dezenfekte edilmelidir.
  - Eğer ambalaj metal, cam gibi materyalden yapılmış ise alkolle silindikten sonra alevden geçirilmelidir.
  - Ambalaj plastik gibi alevden geçirilemeyecek bir malzemeden yapılmış ise alkolle silindikten sonra steril su ile silinerek alkol uzaklaştırılmalıdır.
  - Dezenfeksiyon amacıyla kullanılan alkol hiçbir şekilde örneğe karışmamalıdır; aksi halde analiz sonucu hatalı çıkar.

Sıvı örnekler doğrudan analize alınabildiği halde katı örnekler ön işlemlerden (ezme, parçalama gibi) geçirilmelidir.

## 2.4. Analiz Numunelerinin Tartılması

Katı örneklerde belirli bir ağırlığın tartılması aseptik koşullar altında yapılmalıdır. Bu amaçla en fazla dikey tip ekim kabininden (laminar flow kabin) yararlanılmaktadır.

Tartımın yapılacağı kap, önceden sterilize edilmiş, seyreltme sıvısını rahatlıkla alabilecek büyüklükte olmalıdır. Bu amaçla genellikle erlen ve beher gibi cam kaplardan yararlanılmaktadır. Ancak terazi üzerine gereksiz ağırlık konulmasının sakıncalı olması ve istenilen miktardan daha fazla örnek tartıldığında bunun geri alınmasındaki zorluklar nedeniyle, prensip olarak tartımlar erlen, beher gibi kaplara değil steril saat camı, petri kutusu veya alüminyum folyoya yapılıp tartılmış örnek daha sonra erlene veya blendere alınmalıdır; ancak pratikte 50 ml'lik beherler de sıkça kullanılmaktadır.

Tartımda kullanılan terazi 0,1 g duyarlılıkta olmalı ve tartımlar bu hassasiyetle yapılmalıdır Standart bir mikrobiyolojik sayım analizi için katı örneklerden 10 g örnek yeterlidir, fakat özel homojenizasyon gereksinimleri ve özel bakteri sayımları için farklı miktarlarda da örnek tartılabilmektedir.

Bazı örnekler önceden küçültülmüş olsa bile tam olarak 10,00 g tartılması zordur. İstenen ağırlığın tam olarak tartımını yapmak için kontaminasyon riskini artıracak kadar uğraşılmalıdır. Böyle durumlarda tartım hatası seyreltme sıvısı miktarının değiştirilmesiyle ortadan kaldırılabilir; ancak burada tartımın % 5'ten daha fazla olmamasına dikkat edilmelidir.

Genellikle mikrobiyolojik analizlerde 10 g örnek üzerine 90 ml seyreltme sıvısı konulmaktadır yani seyreltme oranı,  $10/10+90=10/100=1/10$ 'dur. Eğer 10 gramdan daha farklı bir miktarda tartım yapılmışsa seyreltme sıvısı miktarı şu şekilde hesaplanmaktadır:

- Örnek 10 g yerine 10.25 gram tartılmışsa;

$10,25 - 10 = 0,25$  g'lık bir fazla tartım söz konusudur.

10 g örnek için	90 ml seyreltme sıvısı gerekirse
0,25 g örnek için	X ml seyreltme sıvısı gerekir.

$$X = (0,25 \times 90) \div 10 = 2,25 \text{ ml}$$

seyreltme sıvısı gerekir.

- Bu durumda seyreltme sıvısı miktarı  $90+2,25=92,25$  ml olur yani 90 ml steril seyreltme sıvısı yerine 92,25 ml alınarak standart 1:10'lük oran elde edilebilir:

$$10,25 \div (92,25 + 10,25) = 10,25 \div 102,5 = 1/10$$

90 ml olarak hazırlanmış seyreltme sıvısının üzerine steril bir pipetle 2,25 ml daha steril (yedek) seyreltme sıvısı eklemek örneği tam olarak tartmaktan daha kolaydır; ancak unutulmamalıdır ki bu uygulama hedeflenen ağırlıktan daha fazla tartımlar için geçerlidir.

Tartılan örnek özelliğine göre içinde seyreltme sıvısı bulunan erlene, blendere veya stomacher torbalarına alınmalıdır.

## 2.5. Homojenizasyon İşlemi ve Kullanılan Araçlar

Mikrobiyolojik analizlerde homojenizasyon genellikle katı ve yarı katı numunelerin bir seyreltme sıvısı içinde eşit dağılımını sağlayan bir işlem olarak tanımlanmaktadır. Burada homojenlikten kasıt, gıdadaki mikroorganizmaların analiz yapılacak tüm kütleyle homojen olarak dağıtılmasıdır.

Mikroorganizmalar sıvı materyalde homojen ya da homojene oldukça yakın olarak dağılmışlardır. Basit bir karıştırma ile yeterli bir homojenizasyon sağlanabilir. Buna karşın, katı örneklerde mikroorganizmalar homojen dağılmadıkları için sayım öncesinde materyalin uygun bir sıvı içinde uygun bir yöntemle homojen hale getirilmesi gerekmektedir. Mikrobiyolojik analizlerde materyalin çoğu defa sıvı olması gerekir, buna göre katı örnekler sıvılaştırılmaktadır.

Dolayısıyla sıvı veya suda kolayca eriyen örnekler herhangi bir ön hazırlık yapılmadan doğrudan manyetik karıştırıcı ile mikrobiyolojik analize hazırlanabilmektedir; ancak diğer örneklerde blender veya stomacher ile parçalama ve homojenizasyon zorunlu olmaktadır.

Homojenizasyon işlemi genel olarak 1'e 9 şeklinde yapılmaktadır. Buna göre 1 kısım numune ile 9 kısım seyreltme sıvısı ile homojenize edilmektedir.

Numunenin özelliğine göre farklı homojenizasyon teknikleri kullanılmaktadır. Örneğin; numune şeker, tuz gibi suda kolay eriyebilen maddeler ise 10 g örnek doğrudan 90 ml uygun bir steril seyreltme sıvısı içinde eritilmektedir. Un gibi bir gıda maddesi ile çalışılıyorsa 1'e 9 oranı yeterli olmaz, homojenizasyon hesap kolaylığı açısından 1'e 19 seyreltme ile yapılır.

Suda kolay erimeyen katı materyal, blender ya da stomacher ile homojenize edilmektedir. Anaeroblar ile çalışılırken blender kullanılmamalıdır. Bu tip numuneler, içinde kum olan havanda ezilmelidir.

Toprakla çalışıldığında bakterilerin toprak agregatlarına yapışması nedeniyle homojenizasyon Tween 80 ya da seyreltik NaOH veya KOH ile yapılmaktadır.

### **Homojenizasyon işlemi sırasında dikkat edilmesi gereken hususlar şunlardır:**

- Homojenizasyon işlemi yapılırken parçalayıcı veya karıştırıcının hızı ve karıştırma süresi çok iyi ayarlanmalıdır.



- Parçalama veya karıştırma işleminin uzun sürmesi veya yüksek hızda yapılması mikroorganizma hücrelerinin merkezkaç kuvvetinin etkisiyle mekaniksel olarak ve ısınma nedeniyle zarar görmesine neden olmaktadır. Bu da hatalı sayım sonuçlarının ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.
  - Yetersiz parçalama veya düşük hızda karıştırma ise numunedeki tüm mikroorganizmaların sıvı faza geçirilememesine neden olmaktadır.
- Homojenizasyon işlemi sırasında numune oda sıcaklığında olmalıdır; çünkü homojenizasyon işlemi sırasında sıcaklık biraz artmaktadır. Eğer numuneye buzdolabından çıkartılıp çıkartılmaz homojenizasyon işlemi uygulanırsa, sıcaklık farkı nedeniyle ısıya duyarlı mikroorganizmalar zarar görecektir.
  - Numunenin oda sıcaklığına gelme süresini kısaltmak için dışarıdan ısı verilmemeli ve uzun süre oda sıcaklığında beklenilmemelidir.
  - Özellikle gram negatif bakterileri osmotik şoktan korumak için bazı numunelerde kademeli homojenizasyon uygulanmalıdır. Bunun için;
    - Steril bir erlene 10 g numune ve üzerine 10 ml seyreltme sıvısı konulmakta,
    - Karıştırılarak örneğin ıslanması sağlanmakta,
    - Daha sonra ise gerekli seyreltme çözeltisinin kalan kısmı eklenerek homojenizasyon işlemi tamamlanmaktadır.
  - *Clostridium* gibi anaerob bakterilerle yapılacak analizlerin homojenizasyonunda blender kullanılmamalıdır; çünkü blender kullanımı sırasında oluşan anaför, anaerob bakterilerin oksijen ile temas etmesine neden olmakta ve bu da anaerob bakteriler üzerinde öldürücü etki yaptığından sonucun hatalı çıkmasına neden olmaktadır. Bu durumda laboratuvar tipi rende, havan veya değirmenler kullanılmalıdır.

### 2.5.1. Manyetik Karıştırıcı ve Tüp Karıştırıcı

Şeker, tuz gibi seyreltme sıvısında kolay eriyebilen numunelerin homojenizasyonunda ve dilüsyon çözeltisi hazırlanırken manyetik karıştırıcılar kullanılmaktadır. Tüplerdeki sıvı numuneler ile dilüsyon sıvılarının iyice karışmasını sağlamak için ise, deney tüpü içeriğinin merkezden dışa doğru çevrilmesi prensibi ile çalışan tüp karıştırıcısı (vorteks) denilen karıştırıcılardan yararlanılmaktadır.



Resim 2.1: Manyetik karıştırıcı



Resim 2.2: Tüp karıştırıcısı (vortex)

### 2.5.2. Döner Bıçaklı Karıştırıcı (Blender)

Mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan blenderin gövde ve kapağının sterilizasyona uygun paslanmaz çelikten yapılmış olmasına dikkat edilmelidir.

Genellikle mutfak tipi blenderin kullanılması pek önerilmemektedir; ancak birçok laboratuvarında oldukça sık kullanıldığına rastlanmaktadır. Böyle durumlarda ise gövde ve kapağın sterilizasyonunda alkol veya uygun bir dezenfektan çözelti kullanılmalıdır. Sterilizasyondan sonra blender gövdesi, dezenfektan çözeltisini uzaklaştırmak amacıyla steril saf su ile yeterince çalkalanmalıdır; çünkü dezenfektan çözelti numunedeki mikroorganizmaları olumsuz etkilemekte ve bu da hatalı sonuçlara sebep olabilmektedir.

#### **Blender ile çalışılırken aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir:**

- Blenderin gövdesi ve kapağı analiz öncesinde mutlaka sterilize edilmiş olmalıdır.
- Analiz edilecek numune ve gerekli seyreltme çözeltisinin bir kısmı blender içerisinde homojenize edildikten sonra 250 ml'lik boş ve steril bir erlene aktarılmalı, seyreltme sıvısının geri kalan kısmı ile blender çalkalanıp erlene ilave edilmelidir.
- Blender başlangıçta düşük hızda çalıştırılmalı, daha sonra hız artırılarak 2 dakika maksimum hızda parçalama yapılmalıdır. Daha sonra 2-3 dakika oluşan köpüğün dağılması beklenmelidir.
- Blender dakikada 1500-2000 devir hızla çalıştırılmalı, homojenizasyon süresi en düşük hızda bile 2,5 dakikayı geçmemelidir.



Resim 2.3: Blender



### 2.5.3. Peristaltik Tip Karıştırıcı (Stomacher)

Mikrobiyolojik analizlerin birçok alanında kullanılan “Stomacher” lar özel torbalar içindeki numuneyi pedallarıyla ezerek homojenize eden ve örnekteki mikroorganizmaların dilüsyon sıvısı içinde serbest hâle geçirilmesini sağlayan araçlardır (Resim 2.4).



Resim 2.4: Stomacher

Makine içinde bulunan iki pedal, numune torbası üzerinde ileri geri hareket ederek nazikçe ama etkili bir biçimde dilüsyon sıvısı ile numuneyi iyice karıştırmaktadır. Bu işlem sırasında dilüsyon sıvısı örneğin dokuları içerisine nüfuz etmekte ve bu işlemin tekrarlanmasıyla analiz için uygun solüsyon oluşturulmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Stomacher'ın pedal hareketi

**Stomacher ile çalışırken aşağıdaki yol izlenir:**

- Mikrobiyolojik analizi yapılacak numune ve dilüsyon sıvısı özel steril torbaya aktarılır.
- Torba aygıttaki yerine yerleştirilir (Resim 2.5).
- Eğer gerekiyorsa karıştırma bölgesi ayarlanabilir pedallar sayesinde ayarlanır.
- Makinenin gerekli ayarları yapılır (Resim 2.6).
- Kapağı kapatılır ve karıştırma işlemine başlanır (Resim 2.7).
- Pedal hareketlerinin yardımı ile torba içerisindeki numune parçalanır ve dilüsyon sıvısı homojenize edilir (Resim 2.8).

Bazı makinelerde otomatik filtrasyon düzeneği bulunmaktadır. Buradaki filtre düzeneği bakterilerin geçmesine izin veren ancak partiküllerin ve lifli kısımların geçmesine izin vermeyen bir sisteme sahiptir. Stomacher özel torbaları; plastik, tek kullanımlık (disposable), 40–400 ml hacimli, otoklavda sterilize edilebilir özellikte torbalardır. Stomacherin özel torbasını delme riski olan örneklerin homojenize edilmesinde bu ekipman kullanılmamalıdır.



**Resim 2.5: İçinde numune ve dilüsyon sıvısı bulunan torbanın yerleştirilmesi**



**Resim 2.6: Makinenin ayarlarının yapılması**



**Resim 2.7: Kapağın kapatılması**



**Resim 2.8: Numunenin parçalanması**

**Stomacher ile homojenizasyonun avantajları şunlardır:**

- Özel steril torbalar kullanıldığından cam malzeme ve cihazın sterilizasyonuna ihtiyaç duyulmamaktadır.
- Her örnek için ayrı temizlik ve dezenfeksiyon gerektirmediğinden homojenizasyon işlemi kısa sürede yapılmaktadır.
- Blenderdeki gibi ısınma problemi olmaz.
- Etlere renk indirgenme testleri yaparken, homojenizasyon işlemi sırasında blender kullanılması ette bulunan bazı indirgen maddelerin dilüsyon sıvısına geçmesine sebep olmakta ve bu da test sonuçlarında hataya neden olmaktadır. Bunun için etlerin renk indirgenme testleri yaparken, homojenizasyon için stomacher kullanılmamalıdır.

## AMAÇ

Gerekli ortam sağlandığında, tekniğine uygun olarak analiz numunesinden dilüsyon serileri hazırlayabileceksiniz.

## ARAŞTIRMA

- Dilüsyon serilerinin hangi amaçlar için yapıldığını araştırınız.
- Çevrenizdeki mikrobiyoloji laboratuvarlarını ziyaret ederek dilüsyon serileri hazırlanırken nelere dikkat edildiğini ve ne gibi işlemler yapıldığını araştırınız.

## 3. DİLÜSYON SERİLERİ HAZIRLAMA

Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan dilüsyon serileri sabit konsantrasyondan bir alt düşük konsantrasyona ulaşmak için yapılan seri seyreltmelerdir. Seyreltme oranı genellikle 1/10 ve katları (desimal) oranında yapılır. Seyreltme faktörü dikkatli şekilde hesaplanmak şartıyla katı besiyerindeki sayımlarda 1/2, 1/4 oranında seyreltme de yapılabilir.□

Dilüsyon serileri hazırlama, diğer bir ifadeyle seyreltme tekniğini şu şekilde özetlemek mümkündür:

- Mikrobiyolojik analizi yapılacak örneğin 1 gramında “A” sayıda bakteri olduğunu düşünelim.
- Bu örnekten bir erlene 10 gram tartılırsa, erlende “10A” sayıda bakteri olur:

1 gram örnekte	“A” sayısı kadar bakteri varsa
10 gram örnekte	“10A” sayısı kadar bakteri olur.

- Erlendeki bu örnek üzerine 90 ml seyreltme çözeltisi ilave edilirse; toplam miktar 100 ml olur. Seyreltme sıvısı steril olduğundan, bu çözeltiden hiç bakteri gelmez yani 100 ml içerisindeki bakteri sayısı yine “10A” kadardır
- Dolayısıyla bunun 1 ml’inde bulunan bakteri sayısı  $10A / 100 = 0,1A$  olacaktır:

100 ml’de	“10A” sayısı kadar bakteri varsa
1 ml’inde	“0,1A” sayısı kadar bakteri olur.



Sonuç olarak erlendeki bu çözelti orijinal örneğe göre 10 kez seyreltilmiştir ve bu durum  $10^{-1}$  olarak ifade edilmektedir. Seyreltme işlemleri, bu çözülden 1 ml alınıp içinde 9 ml seyreltme sıvısı bulunan tüpe aktarım ile devam etmektedir (Toplam miktar 10 ml). Aynı şekilde tüpteki bakteri sayısı erlene göre 10, orijinal örneğe göre ise 100 kez seyreltilmiş demektir ve her ml'sinde 0,01A bakteri vardır. Bu durumda  $10^{-2}$  şeklinde gösterilmektedir:

10 ml'de	"0,1A" sayısı kadar bakteri varsa
1 ml'sinde	"0,01A" sayısı kadar bakteri olur.

### 3.1. Desimal (Ondalık) Dilüsyon Serilerinin Hazırlanması

Sayımda hesaplama kolaylığı sağladığından en çok kullanılan standart dilüsyon serisidir. 1/10 ( $10^{-1}$ ); 1/100 ( $10^{-2}$ ); 1/1000 ( $10^{-3}$ ); 1/10000 ( $10^{-4}$ )... şeklindeki dilüsyon serisine desimal (ondalık) dilüsyon serisi denilmektedir.

#### 3.1.1. Sıvı Numuneden Dilüsyon Serisi Hazırlama

Daha önce de belirtildiği gibi dilüsyon serileri, mikrobiyolojik sayımların daha kolay yapılabilmesi amacıyla hazırlanmaktadır; ancak sıvı numunelerde mikroorganizma sayısının çok az olduğu bir durum söz konusu ise diğer bir ifadeyle petri kutularında sayılabilecek kadar koloni gelişmesi bekleniyorsa hiç seyreltme yapılmadan da doğrudan ekim yapılabilir. Böyle bir durumda 1 ml örnekteki mikroorganizma miktarı bulunacağından dilüsyon faktörü 1 olur.

Sıvı örnekler, katı örneklerden farklı olarak bazı ön işlemlerden geçirilmeden doğrudan analize alınabilmektedir. Sıvı örneklerin ondalık dilüsyonlarını hazırlamak için aşağıdaki basamaklar izlenmektedir.

- Öncelikle ambalaj ya da örnek alma şişesindeki sıvı numune iyice karıştırılarak homojenize edilir.
- **1. dilüsyon (1/10):** Şişedeki sıvı numuneden 1 ml alınıp içerisinde 9 ml steril seyreltme sıvısı bulunan bir tüpe aktarılır.

Böylece tüpteki mikroorganizma sayısı orijinal numuneye göre 10 defa seyrelmiş olur ve tüpün her ml'sinde 1/10 oranında seyreltilmiş mikroorganizma bulunur. Tüpteki çözelti orijinal sıvı örneğe göre 10 defa seyreltiğinden (1/10) bu durum  $10^{-1}$  olarak ifade edilir. Bu 1. dilüsyondur.

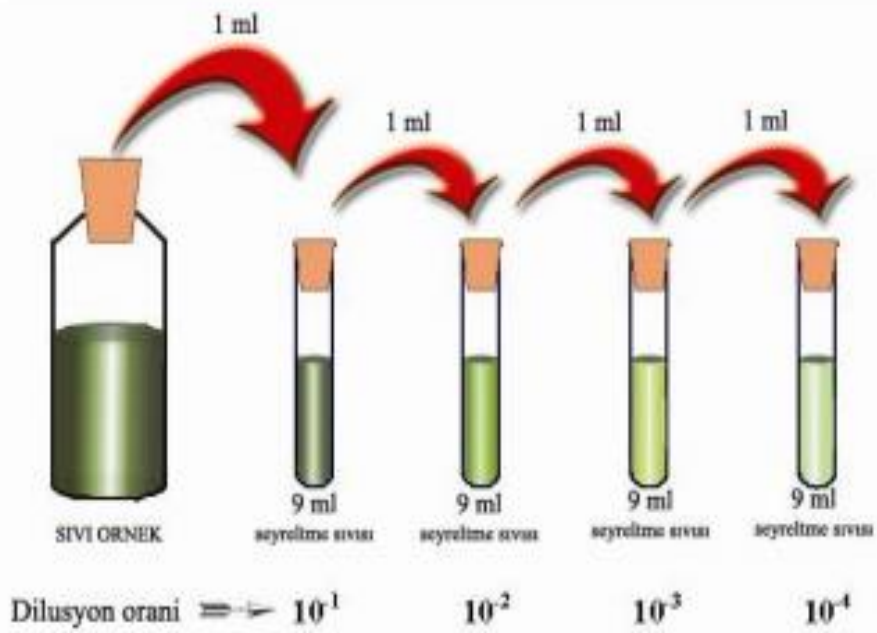
- **2. dilüsyon (1/100):** 1. tüpteki çözülden 1ml alınıp içinde 9 ml steril seyreltme çözeltisi bulunan başka bir tüpe aktarılır.

Böylece 2. tüpteki mikroorganizma sayısı; 1. tüpe göre 10, orijinal numuneye göre ise 100 defa seyrelmiş olur. 2. tüpteki çözelti orijinal örneğe göre 100 defa seyreltiğinden bu durum  $10^{-2}$  olarak ifade edilir.

- **3. dilüsyon (1/1000):** 2. tüpteki çözeltiliden 1ml alınıp içinde 9 ml steril seyreltme çözeltilisi bulunan 3. tüpe aktarılır.

Böylece 3. tüpteki mikroorganizma sayısı; 2. tüpe göre 10, orijinal numuneye göre 1000 defa seyrelmiş olur. 3. tüpteki çözeltili orijinal sıvı örneğe göre 1000 defa seyreltiğinden bu durum  $10^{-3}$  olarak ifade edilmektedir.

Bu işleme istenen seyreltme oranına kadar devam edilmektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Sıvı örnekten desimal dilüsyon serisi hazırlama

Daha hızlı bir şekilde seyreltmeye imkân veren diğer bir yöntemde ise 1 ml örnek 99 ml seyreltme sıvısı kullanılmaktadır.

- Ambalaj ya da örnek alma şişesindeki sıvı numune iyice karıştırılarak homojenize edilir.
- **1. dilüsyon (1/100):** Şişedeki sıvı numuneden 1 ml alınıp içerisinde 99 ml steril seyreltme sıvısı bulunan bir erlene aktarılır.

Böylece tüpteki mikroorganizma sayısı orijinal numuneye göre 100 defa seyrelmiş olur. Erleneki çözeltili orijinal sıvı örneğe göre 100 defa seyreltiğinden (1/100) bu durum  $10^{-2}$  olarak ifade edilir. Bu 1. dilüsyondur.

- **2. dilüsyon (1/10000):** 1. erlendeki çözeltiliden 1ml alınıp içinde 99 ml steril seyreltme çözeltilisi bulunan başka bir erlene aktarılır.

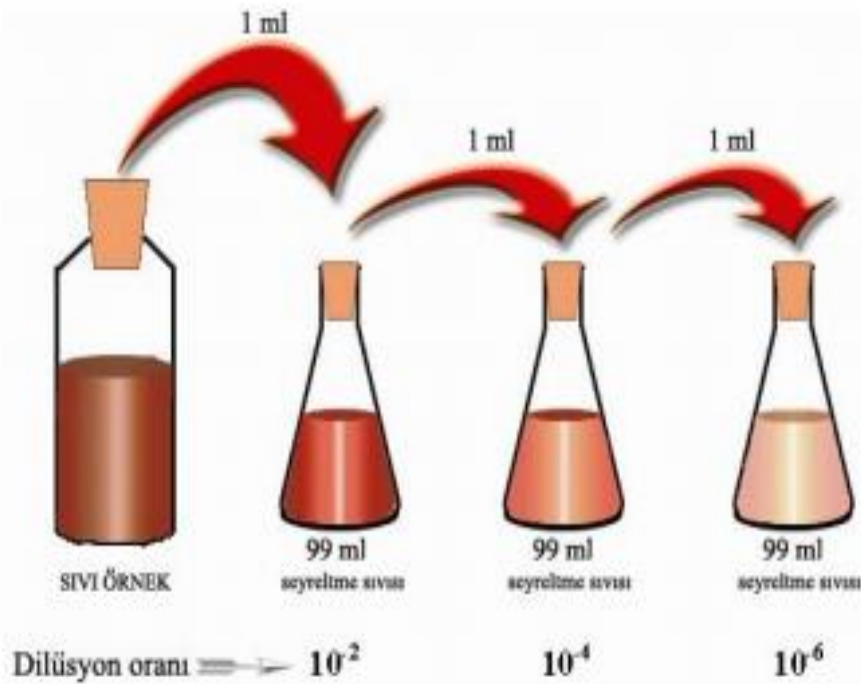


Böylece 2. erlendeki mikroorganizma sayısı; 1. erlene göre 100, orijinal numuneye göre ise 10000 defa seyrelmiş olur. 2. erlendeki çözelti orijinal örneğe göre 10000 defa seyreltiğinden bu durum  $10^{-4}$  olarak ifade edilir.

- **3. dilüsyon (1/1000000):** 2. erlendeki çözülden 1ml alınıp içinde 99 ml steril seyreltme çözeltisi bulunan 3. erlene aktarılır.

Böylece 3. erlendeki mikroorganizma sayısı; 2. tüpe göre 100, orijinal numuneye göre 1000000 defa seyrelmiş olur. 3. erlendeki çözelti orijinal sıvı örneğe göre 1000000 defa seyreltiğinden bu durum  $10^{-6}$  olarak ifade edilmektedir.

Bu işleme istenen seyreltme oranına kadar devam edilmektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Sıvı örnekten farklı bir desimal dilüsyon serisi hazırlama

### 3.1.2. Katı Numuneden Dilüsyon Serisi Hazırlama

Daha öncede belirtildiği gibi katı bir örnekten mikrobiyolojik analiz yapılacağı zaman örneğin analize alınmasından önce birtakım ön işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Bu konulardan bir önceki öğrenme faaliyetinde detaylıca bahsedilmiştir.

Sıvı örneklerde olduğu gibi burada da homojenizasyon ve sonraki seyreltmeler 1'e 9 şeklinde yapılmaktadır. Bu amaçla genellikle 10 g örnek 90 ml seyreltme sıvısı ile homojenize edilmektedir. Ancak *Salmonella*, *E. Coli* O157:H7 serotipi ve *Listeria* analizinde 25 g örnek 225 ml seyreltme çözeltisi ile homojenize edilmektedir. Yine 11 g numunenin 99 ml seyreltme çözeltisinde homojenize edilmesi de uygulanan bir yöntemdir.

### 3.1.2.1. Örnek Miktarı 10 gr Olduğunda Dilüsyon Serileri Hazırlama

Katı örneklerin ondalıklı dilüsyonlarını hazırlamak için aşağıdaki basamaklar izlenmektedir:

- **1. dilüsyon (1/10):** 10 g örnek 90 ml seyreltme çözeltisi ile homojenize edilir.

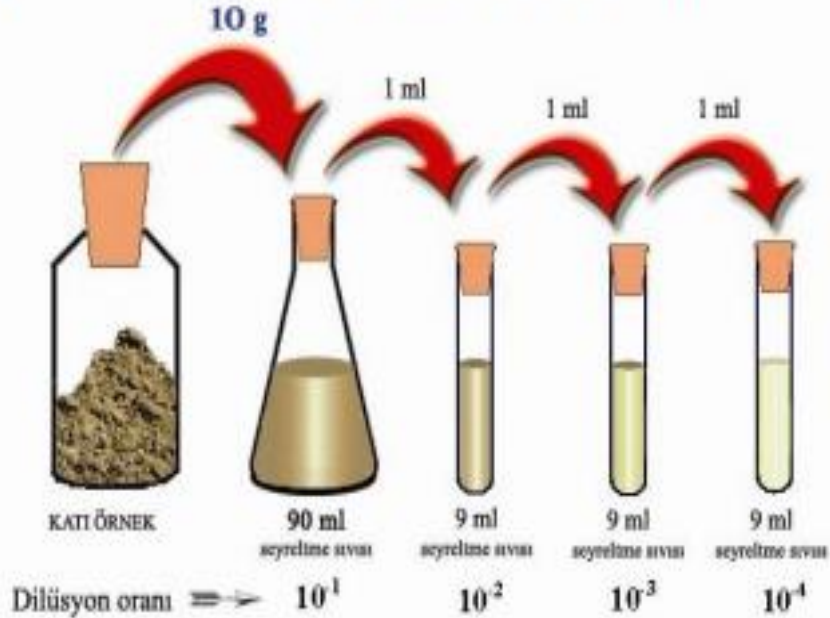
Yukarıda anlatıldığı gibi seyreltme oranı  $10/10+90=10/100= 1/10$  olur. Erlenindeki çözelti, orijinal örneğe göre 10 defa seyreltiğinden ve  $10^{-1}$  olarak ifade edilir. Bu, **1. dilüsyondur.**

- **2. dilüsyon (1/100):** Bu çözülden 1ml alınıp 9 ml seyreltme çözeltisi bulunan bir tüpe aktarıldığında tüpteki mikroorganizma sayısı erlene göre 10, orijinal örneğe göre ise 100 defa seyrelmiş olur. Tüpteki çözelti orijinal örneğe göre 100 defa seyreltiğinden bu durum  $10^{-2}$  olarak ifade edilir. Bu, **2. dilüsyondur.**

- **3. dilüsyon (1/1000):** 1. tüpteki çözülden 1ml alınıp içinde 9 ml steril seyreltme çözeltisi bulunan 2. tüpe aktarılır.

Böylece 2. tüpteki mikroorganizma sayısı; 1. tüpe göre 10, orijinal numuneye göre 1000 defa seyrelmiş olur. 2. tüpteki çözelti orijinal örneğe göre 1000 defa seyreltiğinden bu durum  $10^{-3}$  olarak ifade edilmektedir.

Bu işleme istenen seyreltme oranına kadar devam edilmektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Katı örnekten desimal dilüsyon serisi hazırlama

### 3.1.2.2. Örnek Miktarı 10 gr'dan Farklı Olduğunda Dilüsyon Serileri Hazırlama

- Analiz edilecek numune 10 g değil de 25 g tartılmışsa ilk seyreltme için basit bir orantı ile gereken seyreltme çözeltisi miktarı hesaplanır.

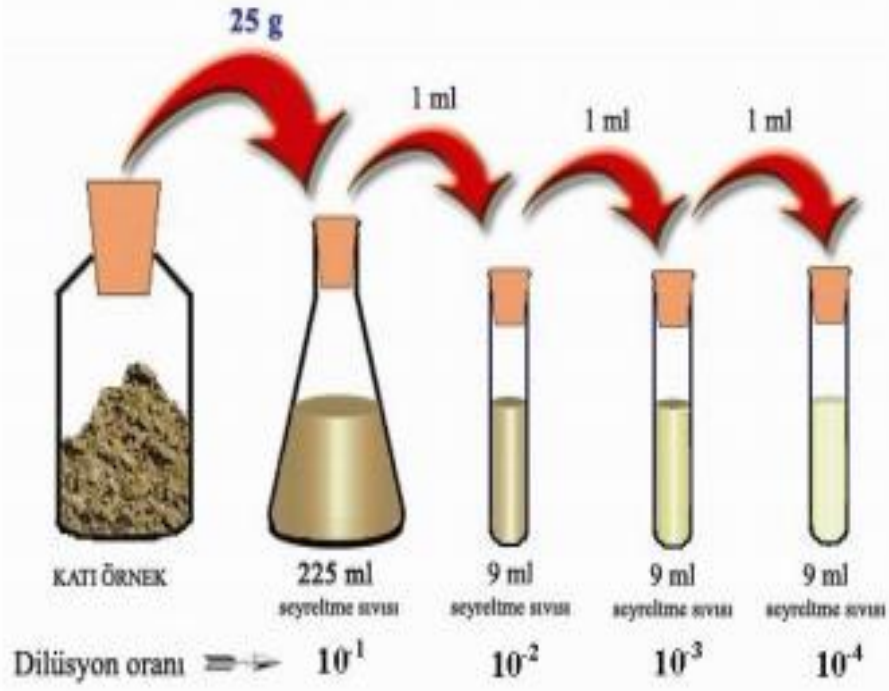
10 g örnek için  
25 g örnek için

90 ml seyreltme çözeltisi gerekirse  
X ml seyreltme çözeltisi gerekir.

$$X = (25 \times 90) \div 10 = 225 \text{ ml seyreltme çözeltisi gerekir.}$$

Yani 25 g gıda örneği 225 ml seyreltme çözeltisi ile homojenize edildiğinde seyreltme oranı 1/10 ( $10^{-1}$ ) olur. Yukarıda anlatıldığı gibi seyreltme faktörü de  $10^{-1}$  dir.

- Diğer işlemler, 10 g örneği tartarak dilüsyon hazırlama uygulamasındaki gibidir.



Şekil 3.4: Katı örnekten farklı tartımla desimal dilüsyon serisi hazırlama

### 3.2. Dilüsyon Serileri Hazırlanırken Dikkat Edilecek Noktalar

- Aktarılabacak örnek, aktarmadan hemen önce kuvvetli bir biçimde çalkalanarak homojen bir karışım sağlanmalıdır.
- Dilüsyon serileri hazırlarken dikkat edilecek en önemli konu, her aktarmada ayrı bir steril pipetin kullanılması gerekliliğidir.
- Karıştırma işleminden sonra steril pipetle tüpteki örnek 1-2 kere çekilerek bırakılmalı, bırakma anında kesinlikle üflenmemelidir.
- Dilüsyon işlemleri ile ekim arasında geçen süre kısa olmalıdır. Seyreltme işlemi bittikten sonra 15 dakika içinde ekim işlemi bitirilmelidir. Süre uzarsa koliform gibi hızlı çoğalan bakterilerin sayıları artabilir.
- Homojenizasyon işlemi ile ekim arasındaki süre en çok 30 dakika olmalıdır.
- Eğer ekim öncesinde mikroorganizmaların canlandırma işlemi yapılacaksa, bu süre geçerli değildir. Canlandırma işleminin ne kadar süre ile yapılacağı talimatta belirtilmelidir.
- Kuru gıdalarla, hardal, fındık ezmesi, krema gibi zor eriyen numunelerde erimeyi kolaylaştırmak için ilk seyreltmenin yapılacağı erlene sterilizasyon öncesi cam boncuk atılmalıdır.



## UYGULAMA FAALİYETİ

- Aşağıdaki işlem basamakları ve önerileri dikkate alarak katı bir örnekten hazırlanan homojenize analiz numunesinden desimal  $10^{-4}$ 'lük dilüsyon serisi hazırlayınız.

**Kullanılan araç ve gereçler:** İçerisinde dilüsyon sıvısı bulunan steril deney tüpleri, cam yazar, steril pipetler, tüplük, analiz numunesi, vorteks (tüp karıştırıcısı)

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ İçerisinde 9 ml dilüsyon sıvısı bulunan 3 adet steril tüp alınız.	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Kullanacağınız malzemeleri önceden sterilize ediniz.</li><li>➤ Aseptik ortam hazırlamayı unutmayınız.</li><li>➤ Her aktarmada yeni bir steril pipet kullanınız.</li><li>➤ Mikrobiyolojik analizlerdeki aktarma teknikleri kurallarına uyunuz.</li><li>➤ Titiz ve dikkatli çalışınız.</li></ul>
➤ Üzerlerine gerekli bilgileri yazınız.	
➤ 1/10 oranında seyreltilmiş $10^{-1}$ 'lik homojenize numuneyi alınız.	
➤ Hazırlanmış $10^{-1}$ 'lik homojenize numunedan steril bir pipetle 1 ml çekerek birinci tüpe aktarınız.	
➤ Tüpü elde veya tüp karıştırıcı ile karıştırınız.	
➤ Hazırlanmış olan $10^{-2}$ 'lik dilüsyondan yeni steril bir pipetle 1 ml çekerek ikinci tüpe boşaltınız.	
➤ İkinci tüpü de elde veya tüp karıştırıcı ile karıştırınız.	
➤ Hazırlanmış olan $10^{-3}$ 'lük dilüsyondan yeni steril bir pipetle 1 ml çekerek üçüncü tüpe boşaltınız.	
➤ Üçüncü tüpü de elde veya tüp karıştırıcı ile karıştırınız.	
➤ Böylece $10^{-4}$ 'lük dilüsyonu hazırlamış olunuz.	



## KAYNAKÇA

- AKGÜN Sadi, Belgin SARİMEHMETOĞLU, Haluk ÇELİK, Tansel ŞİRELLİ, Özlem KÜPLÜLÜ, **Mikrobiyolojik Muayeneler ve Ekim Yöntemleri**, Ankara Ü Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğrenci Uygulama Ders Notları, 1995.
- ALTINIŞIK Mustafa, **Su ve Çözeltiler: Çözelti Konsantrasyonları ve Çözeltilerin Hazırlanması**, ADÜTF Biyokimya Anabilim Dalı, 2007.
- ANONYMOUS, **Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları**, Ed: Prof. Dr. Kadir HALKMAN, Başak Matbaacılık Ltd. Ş, Ankara, 2005.
- HALKMAN Kadir, Mustafa AKÇELİK, **Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi 1.Temel İlkeler, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları** Kitabı sf 105-124, Ankara Ü. Zir. Fak. Gıda Müh. Böl. Mikrobiyoloji Birimi, Ankara, 1999.
- HALKMAN Kadir A. **Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi (04)**.Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi Yıl: 2007 Cilt: 05 Sayı: 03 Sayfa: 8–10 [www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070302.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070302.pdf)
- GÜRGÜN Velittin, A. Kadir HALKMAN. **Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, 2. Baskı**, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın Nu. 7, 1990.
- TS 6235 EN ISO 6887-1, **Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi – Deney Numunelerinin, Başlangıç Süspansiyonunun ve Ondalık Seyreltilerin Hazırlanması İçin Mikrobiyolojik Muayene - Bölüm 1: Başlangıç Süspansiyonu ve Ondalık Seyreltilerin Hazırlanması İçin Genel Kurallar**, Türk Standardları Enstitüsü, Ankara, 2001.
- TS 7895 EN ISO 8261. **Süt ve Süt Ürünleri - Mikrobiyolojik Muayene İçin Deney Numunelerinin, Başlangıç Süspansiyonlarının ve Ondalık Seyreltilerin Hazırlanması İçin Genel Kılavuz**, Türk Standardları Enstitüsü, Ankara, 2003.
- KANIŞKAN Nevin, Erol AÇIKKALP, Necmettin CANER, Alaâddin GÜVEN, **Asitler ve Bazlar**, Temel Kimya Kitabı s. 194 – 207, Ed: Prof. Dr. Lale ZOR, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları Nu. 672, Açık Öğretim Fakültesi Yayınları Nu.329, 1996.
- TEMİZ Ayhan, **Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri**, Şafak Yayınları, Ankara, 1994.
- <http://lisanskimya.balikesir.edu.tr/~n10319/labgenelbilgi.htm>