

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

LABORATUVAR HİZMETLERİ

DİLÜSYON HAZIRLAMA

Ankara, 2015

- Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
- Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.
- **PARA İLE SATILMAZ.**

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR	ii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. DİLÜSYON SIVISI (SEYRELTME ÇÖZELTİSİ) HAZIRLAMA	3
1.1. Dilüsyonun (Seyreltmenin) Tanımı ve Önemi	3
1.2. Dilüsyon Sıvıları.....	5
1.2.1. Fizyolojik Tuzlu Su (Serum Fizyolojik-FTS).....	6
1.2.2. Peptonlu Su (% 0,1).....	6
1.2.3. Tamponlanmış Peptonlu Su.....	7
1.2.4. Peptonlu Fizyolojik Tuzlu Su (MRD- Maximum Recovery Diluents).....	8
1.2.5. ¼ Kuvvetinde Ringer Çözeltisi.....	8
1.2.6. % 15'lik Sodyum Klorür Çözeltisi	9
1.2.7. % 20'lik Glikoz Çözeltisi	9
1.2.8. Özel Seyreltme Çözeltileri.....	10
1.3. Dilüsyon Çözeltisi Hazırlarken Dikkat Edilecek Noktalar.....	10
1.4. Sterilizasyona Hazırlık	11
UYGULAMA FAALİYETİ.....	13
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	16
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	19
2. ANALİZ NUMUNESİ HAZIRLAMA	19
2.1. Analiz Numunesinin Hazırlanması Sırasında Alınacak Önlemler	20
2.2. Numunenin Laboratuvara Kabulü	20
2.3. Ambalajın Açılması.....	21
2.4. Analiz Numunelerinin Tartılması.....	22
2.5. Homojenizasyon İşlemi ve Kullanılan Araçlar	23
2.5.1. Manyetik Karıştırıcı ve Tüp Karıştırıcı	24
2.5.2. Döner Bıçaklı Karıştırıcı (Blender)	25
2.5.3. Peristaltik Tip Karıştırıcı (Stomacher).....	26
UYGULAMA FAALİYETİ.....	28
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	30
ÖĞRENME FAALİYETİ-3	33
3. DİLÜSYON SERİLERİ HAZIRLAMA	33
3.1. Desimal (Ondalık) Dilüsyon Serilerinin Hazırlanması	34
3.1.1. Sıvı Numuneden Dilüsyon Serisi Hazırlama	34
3.1.2. Katı Numuneden Dilüsyon Serisi Hazırlama.....	36
3.2. Dilüsyon Serileri Hazırlanırken Dikkat Edilecek Noktalar.....	39
UYGULAMA FAALİYETİ.....	40
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	41
MODÜL DEĞERLENDİRME	43
CEVAP ANAHTARLARI	45
KAYNAKÇA	47

AÇIKLAMALAR

ALAN	Laboratuvar Hizmetleri
DAL	Alan Ortak
MODÜLÜN ADI	Dilüsyon Serileri Hazırlama
MODÜLÜN SÜRESİ	40/25
MODÜLÜN AMACI	1. Bireye/öğrenciye numunenin özelliği ve tekniğine uygun dilüsyon serileri hazırlamaya yönelik bilgi ve becerileri kazandırmaktır.
MODÜLÜN ÖĞRENİM KAZANIMLARI	1. Numunenin özelliğine ve tekniğine uygun olarak dilüsyon sıvısı hazırlayabileceksiniz 2. Mikrobiyolojik analizler için numunenin özelliğine uygun teknikleri kullanarak numune hazırlayabileceksiniz. 3. Analiz numunesinden çalışma amacına uygun olarak dilüsyon serileri hazırlayabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Ortam: Laboratuvar Donanım: 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, kayıt fişleri, termometre, alkol, bunzen beki ya da laminar flow kabin, kesici bir alet, blender, stomacher, manyetik karıştırıcı, tüp karıştırıcısı (vorteks), analiz numunesi
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	Modül içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen ölçme araçları ile kendinizi değerlendireceksiniz. Öğretmen modülün sonunda ölçme aracı (çoktan seçmeli test, doğru-yanlış testi, boşluk doldurma, eşleştirme vb.) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığınız bilgi ve becerileri ölçerek sizi değerlendirecektir.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Mikroorganizmaların yaşamımızda önemli bir yere sahip olması, hangi amaçla yapılıyor olursa olsun, mikrobiyolojik çalışmaların önemini artırmaktadır. Toprak, su, bitki, hayvan, gıda vb. birçok materyalden kaynaklanan enfeksiyonları önlemek, halk sağlığını korumak, mikroorganizmaların ürünlerde bozulma yapmasını önleyerek ürün kalitesini iyileştirmek amacıyla mikrobiyolojik analizlerin yapılması zorunludur.

Yaşamımızda böyle önemli bir yere sahip olan mikrobiyolojik analizlerin gerekli özen ve titizlikle yapılması, sonuçların doğru elde edilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu anlamda analiz hazırlıklarından örneklerin alınması ve analizlerin sonuçlandırılmasına kadar her aşamada son derece dikkatli olunmalıdır.

Mikrobiyolojik analizlerin önemli aşamalarından biri de uygun şekilde dilüsyon çözeltilerinin, analiz numunesinin ve dilüsyon serilerinin hazırlanmasıdır. Bu konunun iyi öğrenilmesi ve gerekli titizlikle uygulanması elde edilen sonuçların güvenilirliğini artıracaktır.

Bu modülü tamamladığınızda; mikrobiyolojik analizler için laboratuvara gelen örneklerden analiz numuneleri ve gerekli dilüsyon çözeltilerini hazırlayabilecek, analiz örneğinin seyreltme işlemlerini yapabileceksiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-1

ÖĞRENME KAZANIMI

Numunenin özelliğine ve 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 orjinal 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 çözeltide ölçülen madde konsantrasyonu 5000 ile çarpıldığında, orijinal solüsyondaki madde konsantrasyonu bulunmuş olur.

- **Dilüsyon oranı:** Seyreltilmiş çözeltideki çözünen madde miktarının, konsantre çözeltideki çözünen madde miktarına oranına **dilüsyon (seyreltme) 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 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.

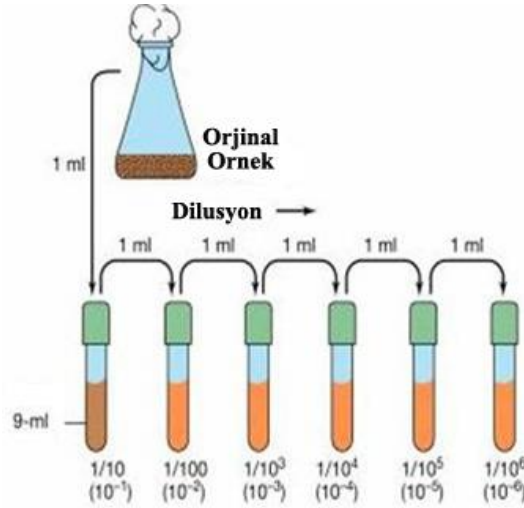
$$DO = (1 / 25) \times (5 / (5 + 20)) = (1 / 25) \times (5 / 25) = 1 / 125$$

$$DF = 125$$

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 belirleyebilmektir (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 (dilüent=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 ögesi 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, osmotik basınçtaki büyük değişim bakteri hücrelerinde hasarlara, hatta ölümlere neden olabilir. Bu durumda da yanlış sonuçlar alınacağı açıktır.

Buna göre, dilüsyon sıvılarının seçiminde, incelenecek örnekteki osmotik basınç ile bu örneğin dilüe edileceği dilüsyon sıvısındaki osmotik 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 (KH_2PO_4 , Na_2HPO_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 KH_2PO_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 çözüldürülür.
- pH'ı uygun bir çözelti 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 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 (CaCl₂),
- 0.05 g/l sodyum hidrojen karbonat (NaHCO₃),
- 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 dağıtılıp, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.
- **Anaeroblar için Seyreltme Çözeltisi:** Anaerob mikroorganizmaların (yalnızca O_2 'siz ortamda yaşayabilen) analizinde kullanılan ve bileşiminde ortamdaki O_2 'i bağlayan maddeler bulunan seyreltme çözeltisidir. Bu amaçla Pepton from Casein % 0,1 ; Cystein chloride monohydrate % 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

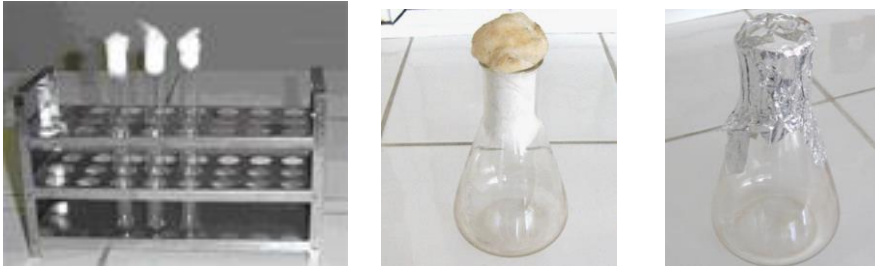
- Dilüsyon sıvıları, ekim öncesinde hazırlanmalı ve sterilize edilmelidir.
- Sonuçların kesinliğini arttırmak amacıyla, seyreltilerin hazırlanmasında susuz temel bileşenlerin veya susuz ticarî hazır bileşimlerin kullanılması tavsiye edilir. Üretici firmaların talimatlarına uyulmalıdır.
- Aksi belirtilmedikçe, 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
- Terazî
- 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">➤ Hazırlanacak miktara göre pepton, sodyum klorür, disodyumhidrojen fosfat, potasyum ve dihidrojen fosfat miktarlarını hesaplayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Laboratuvar kıyafetlerinizi giyiniz.➤ Ellerinizi her çalışma öncesinde yıkayınız ve dezenfekte ediniz.➤ Çalışma ortamınızın temiz olmasına dikkat ediniz.➤ Hesaplamalarınızı kontrol ediniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Hesaplanan miktarlarda bileşenleri tartınız. 	<ul style="list-style-type: none">➤ Gerekli kimyasalları tezgâh üzerine çıkarınız.➤ Spatülü ve tartım kabını hazırlayınız.➤ Hassas teraziyi önceden ayarlayınız.➤ Tartım kabının darasını almayı unutmayınız.

<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tartılan bileşenleri 500 ml'lik balon jojeye aktarınız. ➤ Balon jojeye bir miktar saf su ekleyiniz. ➤ Bileşenlerin çözünmesini sağlayınız.  <ul style="list-style-type: none"> ➤ Bileşenlerin tamamı çözüldükten sonra balon jojenin ölçü çizgisine kadar saf su ile doldurunuz. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bileşenlerin tamamen çözünmesine dikkat ediniz. ➤ Balonjojeye saf su eklerken ölçü çizgisine yaklaşıldığında daha dikkatli olunuz. ➤ Sıvı okuma kurallarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Çözeltinin pH'ını ölçüp 7,0'a ayarlayınız 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Önceden pH metreyi kalibre etmeyi unutmayınız.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hazırlanan çözültiden tüplere 9'ar ml, erlene 90 ml koyunuz. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sıvı okuma kurallarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tüp ve erlenmayerlerin ağızlarını pamuklayıp folyolayınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tüp ve erlenmayerin ağzını modülde anlatıldığı gibi pamuklayıp alüminyum folyo ile sarınız.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Tüp ve erlenlerin üzerine gerekli bilgileri yazınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Asetat kalemi kullanınız.

<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>

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki sorularda doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi mikrobiyolojik analizlerde seyreltme işleminin amacıdır?
A) Mikroorganizmanın üremesi için ortam hazırlamak
B) Mikroorganizma sayısını artırmak
C) Petri kutusunda sayılabilecek düzeyde koloni oluşturmak
D) Örnek orijinalliğini korumak
2. 10^{-4} lük dilüsyondaki mikroorganizma sayısı, orijinal örneğe göre kaç defa seyreltilmiştir?
A) 4 defa
B) 1000 defa
C) 40 defa
D) 10000 defa
3. Deniz suyunda mikrobiyolojik analiz yapılacağı zaman hangi dilüsyon sıvısı kullanılmalıdır?
A) Fizyolojik su
B) Peptonlu fizyolojik su
C) Saf su
D) Peptonlu su
4. Tamponlanmış peptonlu su, seyreltme amacıyla kullanılacaksa hangi konsantrasyonda hazırlanmalıdır?
A) 5 g/l
B) 8,5 g/l
C) 9,5 g/l
D) 25,5 g/l
5. Süt ürünlerinin mikrobiyolojik analizinde, seyreltme sıvısı olarak aşağıdakilerden hangisi kullanılır?
A) $\frac{1}{4}$ kuvvetinde ringer çözeltisi
B) Peptonlu fizyolojik su
C) % 15'lik NaCl çözeltisi
D) Hiçbiri
6. 500 ml FTS çözeltisi hazırlamak için kaç g NaCl tartılmalıdır?
A) 2.125 g
B) 8.5 g
C) 4.25 g
D) 1.00 g

7. Aşağıdakilerden hangisi tampon olarak kullanılan maddelerden değildir?
- A) Damıtık su
 - B) Sitratarlar
 - C) Karbonatlar
 - D) Fosfatlar
8. Osmotolerant (osmatik basınca dayanıklı) mikroorganizmalarla çalışılırken hangi dilüsyon çözeltisi kullanılmaktadır?
- A) % 15'lik NaCl çözeltisi
 - B) % 20'lik glikoz çözeltisi
 - C) % 2'lik sodyum sitrat çözeltisi
 - D) Tween 80

DEĞERLENDİRME

Yukarıdaki teste verdiğiniz cevapları, modülün sonundaki cevap anahtarı ile karşılaştırınız. Eksik konularınız varsa bu eksikliğin neden kaynaklandığını düşünerek arkadaşlarınızla tartışınız. Öğretmeninize danışarak tekrar bilgi konularına dönüp eksiklerinizi gideriniz. Eksikliklerinizi tamamladıktan sonra uygulamalı teste geçiniz.

UYGULAMALI TEST

250 ml fizyolojik tuzlu su hazırlayınız. Yaptığınız uygulamayı kontrol listesine göre değerlendirerek, eksik veya hatalı gördüğünüz davranışları tamamlama yoluna gidiniz

Değerlendirme Ölçütleri	Evet	Hayır
1. Laboratuvar kıyafetlerinizi giydiniz mi?		
2. Ellerinizi yıkayıp dezenfekte ettiniz mi?		
3. Gerekli malzemeleri belirleyip yeterli miktarlarda bulunduğunu kontrol ettiniz mi?		
4. 250 ml fizyolojik tuzlu su için gerekli miktarı hesapladınız mı?		
5. Hesaplanan miktarı tarttınız mı?		
6. Tartılan tuzu 250 ml'lik balonjojeye aktardınız mı?		
7. Balonjojeye bir miktar saf su ekleyerek tuzun çözünmesini sağladınız mı?		
8. Balonjojenin ölçü çizgisine kadar saf su eklediniz mi?		
9. Pipet yardımıyla tüplere 9'ar ml, erlene 90 ml FTS dağıttınız mı?		
10. Tüp ve erlenlerin ağızlarını pamuklayıp folyoladınız mı?		
11. Tüp ve erlenlerin üzerine gerekli bilgileri cam kalemle yazdınız mı?		
12. Tüpleri tüplüklere yerleştirdikten sonra erlenleri ve tüplükleri otoklav sepetine yerleştirdiniz mi?		
13. Otoklav sepetini otoklava yerleştirdiniz mi?		
14. Uygun sıcaklık ve sürede sterilizasyon yaptınız mı?		
15. Laboratuvarın son kontrollerini yaptınız mı?		
16. Önlüğünüzü çıkarıp yerine astınız mı?		

DEĞERLENDİRME

Değerlendirme ölçütlerine göre, **Hayır** cevabınız varsa öğretmeninize danışarak modülün ilgili konularını tekrar ederek eksikliklerinizi gideriniz. Tüm cevaplarınız **Evet** ise diğer öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

ÖĞRENME KAZANIMI

Mikrobiyolojik analizler için numunenin özelliğine uygun teknikleri kullanarak 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	
Tarih :	
Saat :	
Numune :	
Parti Nu. :	
Miktar :	
Sıcaklık :	
Açıklama :	

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 yapılarak 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 uğraşılmamalıdır. 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
0,25 g örnek için

90 ml seyreltme sıvısı gerekirse
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'luk 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 kütleye 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 çözeltilsinin kalan kısmı eklenerek homojenizasyon işlemi tamamlanmaktadır.
- *Clostridium* gibi anaerob bakterilerle yapılacak analizlerin homojenizasyonunda blender kullanılmamalıdır; çünkü blender kullanımı sırasında oluşan anafor, 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 çözeltilisi 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 içerisinde 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 bölmesi 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.
- Etlerin renk indirgenme testlerini 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 testlerini yaparken, homojenizasyon için stomacher kullanılmamalıdır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamakları ve önerileri dikkate alarak, laboratuvara getirilen toprak örneğinden 10 gram alıp mikrobiyolojik analiz için analiz numunesi hazırlayınız.

Kullanılacak araç ve gereçler:

- Kayıt fişleri
- Termometre
- Terazi
- Alkol
- Bunzen beki ya da laminar flow kabin
- Steril tartım kapları
- Steril dilüsyon sıvısı
- Cam yazar
- Spatül
- Pamuk
- Kesici bir alet
- Blender
- Stomacher
- Manyetik karıştırıcı
- Analiz numunesi

İşlem Basamakları	Öneriler																
<p>➤ Laboratuvara gelen toprak numunesinin kabul kaydını tutunuz.</p> <table border="1"><thead><tr><th colspan="2">..... LABORATUVARI NUMUNE KABUL FORMU</th></tr></thead><tbody><tr><td>Tarih</td><td>:</td></tr><tr><td>Saat</td><td>:</td></tr><tr><td>Numune</td><td>:</td></tr><tr><td>Parti Nu.</td><td>:</td></tr><tr><td>Miktar</td><td>:</td></tr><tr><td>Sıcaklık</td><td>:</td></tr><tr><td>Açıklama</td><td>:</td></tr></tbody></table> LABORATUVARI NUMUNE KABUL FORMU		Tarih	:	Saat	:	Numune	:	Parti Nu.	:	Miktar	:	Sıcaklık	:	Açıklama	:	<p>➤ Laboratuvara gelen toprak numunelerinin ayırıp kabul kaydını ayrı ayrı tutunuz</p>
..... LABORATUVARI NUMUNE KABUL FORMU																	
Tarih	:																
Saat	:																
Numune	:																
Parti Nu.	:																
Miktar	:																
Sıcaklık	:																
Açıklama	:																
<p>➤ Analiz öncesi hazırlıklarınızı yapınız.</p>	<p>➤ İlgili modülündeki bilgilerinizi hatırlayınız.</p>																
<p>➤ Aseptik çalışma ortamı hazırlayınız.</p>	<p>➤ Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon-1 modülündeki bilgilerinizi hatırlayınız.</p>																
<p>➤ Analiz numunesinin bulunduğu ambalajın çevresini dezenfekte ederek açınız.</p>	<p>➤ Dezenfeksiyondan sonra dezenfektan maddeyi uzaklaştırmayı unutmayınız.</p>																

➤ 10 gram toprak numunesini steril bir erlene tartınız.	➤ Tartım sırasında tam 10,000 gram almaya özen gösteriniz. ➤ Aseptik ortamda çalışmaya dikkat ediniz. ➤ Kullandığınız malzemelerin steril olması gerektiğini unutmayınız.
➤ 90 ml miktarda dilüsyon sıvısı ekleyiniz.	➤ Dilüsyon çözeltisini daha önce hazırlamayı ve sterilize etmeyi unutmayınız.
➤ Numuneyi homojenize ediniz.	➤ Uygun karıştırıcıyı kullanınız.
➤ Araç gereçlerinizi temizleyiniz.	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki sorularda doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi örneklerin alınması sırasında dikkat edilmesi gereken genel kurallardan değildir?
A) Kontaminasyon engellenmelidir.
B) Tüm mikrobiyolojik örnekler derin dondurucuda saklanarak laboratuvara ulaştırılmalıdır.
C) Örnekler antibiyotik tedavisinden önce alınmalıdır.
D) Hastalığın özelliğine göre örnek alınmalıdır.
2. Mikrobiyolojik analiz çalışmasında 1/10'luk dilüsyon hazırlarken 10 g örnek yerine 10,15 g tartılmışsa kullanılması gereken seyreltme çözeltisi miktarı ne olur?
A) 90,00 ml
B) 90,35 ml
C) 91,35 ml
D) 92,35 ml
3. Aşağıdaki bakterilerden hangisinin aranması ve sayımı için kullanılacak örneğin homojenize edilmesinde blender kullanılmamalıdır?
A) Anaerob bakteri
B) Lipolitik bakteri
C) Halofilik bakteri
D) Aerob bakteri
4. Topraklarda mikrobiyolojik analiz yapılacağı zaman homojenizasyon işlemi sırasında aşağıdakilerden hangisi kullanılmalıdır?
A) Tween 80
B) Ringer çözeltisi
C) Fizyolojik tuzlu su
D) Peptonlu su
5. Kademeli homojenizasyon ne amaçla uygulanmaktadır?
A) Numunenin aşırı ısınmasını önlemek için
B) Bakterilerin oksijenle temasını azaltmak için
C) Yetersiz parçalanmayı önlemek için
D) Gram negatif bakterileri osmotik şoktan korumak için
6. Aşağıdakilerden hangisi mikrobiyolojik analiz örneğinin stomacherle homojenize edilmesinin avantajlarından biri değildir?
A) Örnekteki mikroorganizmalar, dilüsyon sıvısı içinde serbest hâle geçer.
B) Isınma problemi olmaz, homojenizasyon işlemi kısa sürede yapılır.
C) Her örnek için cihazın temizlik ve dezenfeksiyonunu gerektirir.
D) Steril özel torbalar kullanıldığından önceden sterilizasyona gerek yoktur.

7. Genellikle mikrobiyolojik sayım analizi için katı örneklerden kaç g tartılması yeterli olmaktadır?
- A) 10 g
 - B) 15 g
 - C) 25 g
 - D) 40 g
8. Bir tüp içindeki sıvı örneğin karıştırılmasında aşağıdakilerden hangisi kullanılır?
- A) Blender
 - B) Stomacher
 - C) Manyetik karıştırıcı
 - D) Vorteks

DEĞERLENDİRME

Yukarıdaki teste verdiğiniz cevapları, modülün sonundaki cevap anahtarı ile karşılaştırınız. Eksik konularınız varsa bu eksikliğin neden kaynaklandığını arkadaşlarınızla tartışınız. Öğretmeninize danışarak ya da bilgi konularına dönerek eksiklerinizi gideriniz. Eksikliklerinizi tamamladıktan sonra uygulamalı teste geçiniz.

UYGULAMALI TEST

Laboratuvara gelen yaprak örneğinden analiz numunesi hazırlayınız. Yaptığınız uygulamayı kontrol listesine göre değerlendirerek, eksik veya hatalı gördüğünüz davranışları tamamlama yoluna gidiniz.

Değerlendirme Ölçütleri	Evet	Hayır
1. Laboratuvara gelen numunelerin kabul kaydını tuttunuz mu?		
2. Analiz öncesi hazırlıklarınızı yaptınız mı?		
3. Aseptik çalışma ortamı hazırladınız mı?		
4. Analiz numunesinin bulunduğu ambalajın çevresini dezenfekte ederek açtınız mı?		
5. Analiz numunesini steril bir kaba tartınız mı?		
6. Uygun miktarda dilüsyon sıvısı eklediniz mi?		
7. Numuneyi homojenize ettiniz mi?		
8. Araç ve gereçlerinizi temizlediniz mi?		

DEĞERLENDİRME

Değerlendirme ölçütlerine göre, **Hayır** cevabınız varsa öğretmeninize danışarak modülün ilgili konularını tekrar ederek eksikliklerinizi gideriniz. Tüm cevaplarınız **Evet** ise diğer öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-3

ÖĞRENME KAZANIMI

Analiz numunesinden çalışma amacına uygun olarak 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 çözeltilisi ilave edilirse; toplam miktar 100 ml olur. Seyreltme sıvısı steril olduğundan, bu çözeltiliden 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’inde 0,01A bakteri vardır. Bu durumda 10^{-2} şeklinde gösterilmektedir:

10 ml’de	“0,1A” sayısı kadar bakteri varsa
1 ml’inde	“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 ondalıklı 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’inde $1/10$ 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.

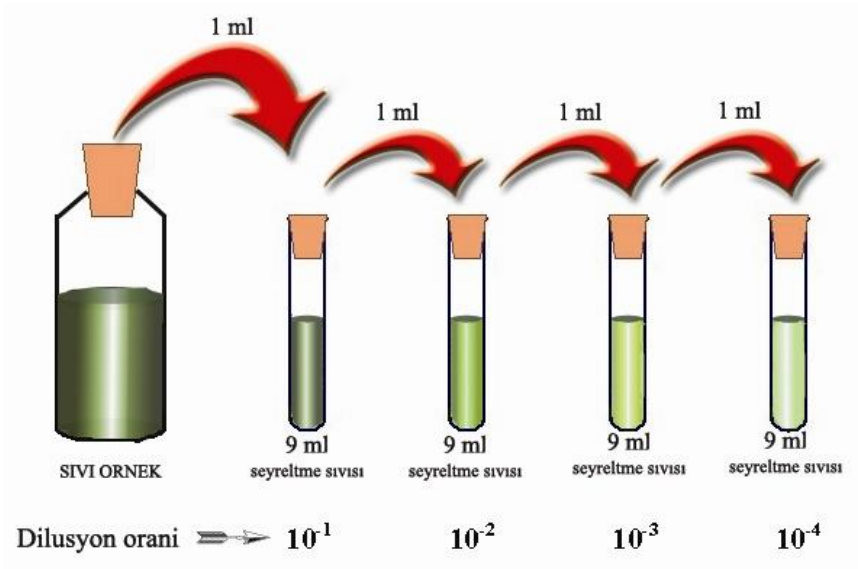
- **2. dilüsyon (1/100):** 1. tüpteki çözülden 1ml alınıp içinde 9 ml steril seyreltme çözeltisi bulunan başka bir tüpe aktarılır.

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 çözülden 1ml alınıp içinde 9 ml steril seyreltme çözültisi bulunan 3. tüpe aktarılır.

Böylece 3. tüpteki mikroorganizma sayısı; 2. tüpe göre 10, orijinal numuneye göre 1000 defa seyrelmiş olur. 3. tüpteki çözülti 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 çözülti orijinal sıvı örneğe göre 100 defa seyreltiğinden (1/100) bu durum 10^{-2} olarak ifade edilir. Bu 1. dilüsyondur.

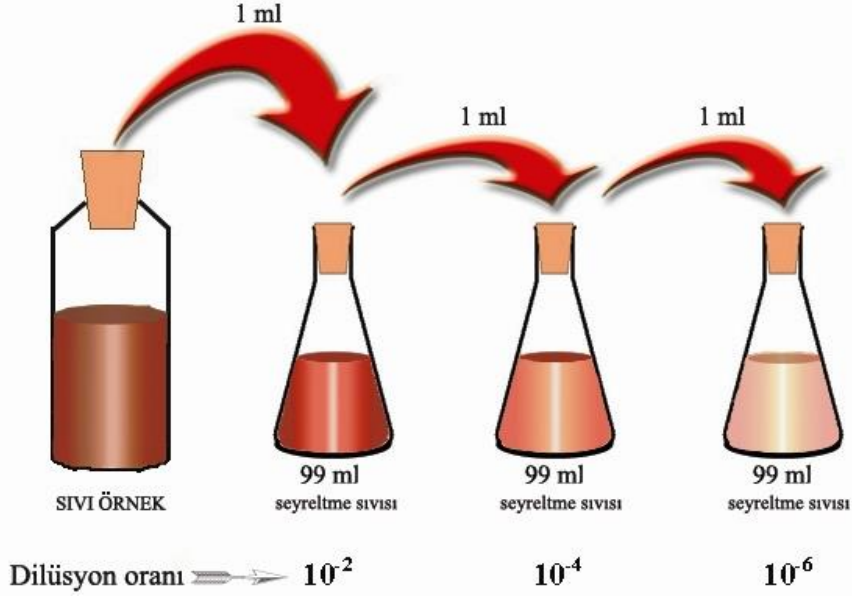
- **2. dilüsyon (1/10000):** 1. erlendeki çözültiden 1ml alınıp içinde 99 ml steril seyreltme çözültisi bulunan başka bir erlene aktarılır.

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

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

Böylece 3. erlendeki mikroorganizma sayısı; 2. tüpe göre 100, orijinal numuneye göre 1000000 defa seyrelmiş olur. 3. erlendeki çözülti 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 çözültisi ile homojenize edilmektedir. Yine 11 g numunenin 99 ml seyreltme çözültisinde 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:

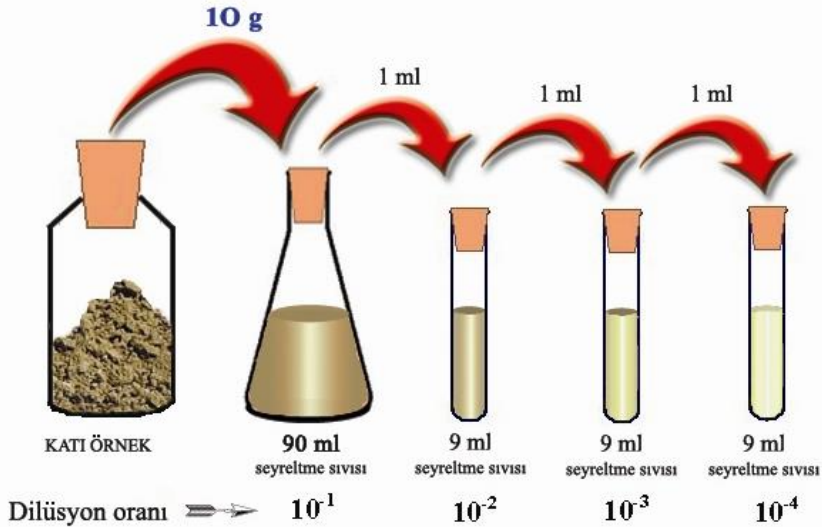
- **1. dilüsyon (1/10):** 10 g örnek 90 ml seyreltme çözeltisi ile homojenize edilir.

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

- **2. dilüsyon (1/100):** Bu çözeltiden 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 çözeltiden 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.

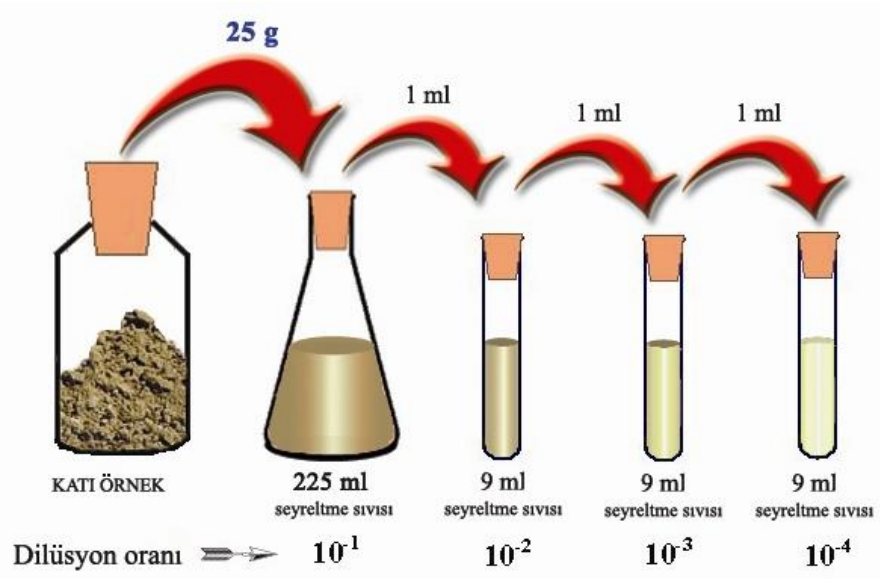
10 g örnek için
25 g örnek için

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 10⁻¹dir.

- 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

- Aktarılabak 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.

Kullanılacak 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.	➤ Kullanacağınız malzemeleri önceden sterilize ediniz. ➤ Aseptik ortam hazırlamayı unutmayınız. ➤ Her aktarmada yeni bir steril pipet kullanınız. ➤ Mikrobiyolojik analizlerdeki aktarma teknikleri kurallarına uyunuz. ➤ Titiz ve dikkatli çalışınız.
➤ 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.	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıda verilen bilgiler doğru ise boş bırakılan yere (D) yanlış ise (Y) yazınız.

1. () Seyreltme oranı standart olarak 1/100 oranında yapılmaktadır.
2. () *Salmonella*, *Listeria* analizlerinde 25 g örnek 225 ml seyreltme çözeltisi ile homojenize edilmektedir.
3. () 10 g örnek kullanıldığı zaman seyreltme çözeltisi miktarı 99 ml olmaktadır.
4. () Dilüsyon serileri hazırlarken, her aktarmada ayrı bir steril pipetin kullanılması zorunlu değildir.
5. () Seyreltme işlemi bittikten sonra 15 dakika içinde ekim işlemi bitirilmelidir.

DEĞERLENDİRME

Yukarıdaki teste verdiğiniz cevapları, modülün sonundaki cevap anahtarı ile karşılaştırınız. Eksik konularınız varsa bu eksikliğin neden kaynaklandığını arkadaşlarınızla tartışınız. Öğretmeninize danışarak ya da bilgi konularına dönerek eksiklerinizi gideriniz. Eksiklerinizi tamamladıktan sonra uygulamalı teste geçiniz.

UYGULAMALI TEST

Sıvı bir örnekten 10-3lük dilüsyon serileri hazırlayınız. Yaptığınız uygulamayı kontrol listesine göre değerlendirerek, eksik veya hatalı gördüğünüz davranışları tamamlama yoluna gidiniz.

Değerlendirme Ölçütleri	Evet	Hayır
1. Laboratuvar kıyafetlerinizi giydiniz mi?		
2. Ellerinizi yıkayıp dezenfekte ettiniz mi?		
3. Aseptik ortam hazırladınız mı?		
4. İçerisinde dilüsyon sıvısı bulunan 3 adet steril tüp aldınız mı?		
5. Üzerlerine gerekli bilgileri yazdınız mı?		
6. Sıvı örneği homojenize ettiniz mi?		
7. Sıvı numuneden steril bir pipetle 1 ml çekerek birinci tüpe aktardınız mı?		
8. Tüpü elde veya tüp karıştırıcı ile karıştırdınız mı?		
9. 1/10 oranında seyreltilmiş 10-1lik dilüsyondan yeni steril bir pipetle 1 ml çekerek ikinci tüpe boşalttınız mı?		
10. Tüpü elde veya tüp karıştırıcı ile karıştırdınız mı?		
11. Hazırlanmış olan 10-2lik dilüsyondan yeni steril bir pipetle 1 ml çekerek üçüncü tüpe boşalttınız mı?		
12. Üçüncü tüpü de elde veya tüp karıştırıcı ile karıştırdınız mı?		
13. Böylece 10-3lük dilüsyonu hazırlamış oldunuz mu?		

DEĞERLENDİRME

Değerlendirme ölçütlerine göre Hayır cevabınız varsa öğretmenize danışarak modülün ilgili konularını tekrar ederek eksiklerinizi gideriniz. Tüm cevaplarınız Evet ise modül değerlendirmesine geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

- 1/5'lük dilüsyondan 2,5 ml alınıp 7,5 ml'lik dilüsyon sıvısıyla homojenize edilerek hazırlanan dilüsyonun dilüsyon oranı kaçtır?
A) 1/4
B) 1/20
C) 1/15
D) 1/10
- Yüksek şeker konsantrasyonuna sahip numunelerde dilüsyon sıvısı olarak aşağıdakilerden hangisi kullanılır?
A) Ringer çözeltisi
B) Saf su
C) % 20 glikoz çözeltisi
D) FTS
- Toprak numunesinde mikrobiyolojik analiz yapılacaksa dilüsyon sıvısı olarak aşağıdakilerden hangisi kullanılmalıdır?
A) FTS
B) Su
C) %10 asetik asit
D) Tween 80
- 2,5 ml numune alınıp 27,5 ml'lik dilüsyon sıvısıyla homojenize edilerek hazırlanan dilüsyonun dilüsyon faktörü kaçtır?
A) 12
B) 11
C) 30
D) 20
- Aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır?
A) Saf su besin öğelerince zengin gıdaların dilüsyonlarında kullanılmalıdır.
B) Numunenin osmatik basıncı ile bu kullanılacak dilüsyon sıvısının osmatik basıncı birbirine yakın olmalıdır.
C) Homojenizasyon işlemi sırasında numune oda sıcaklığında olmalıdır.
D) Analiz sırasında dilüsyon manyetik karıştırıcı ile karıştırılacaksa, dilüsyon sıvısının içerisine manyet (balık vb.) ilave edilmelidir.

Aşağıda verilen bilgiler doğru ise boş bırakılan yere doğru ise (D) yanlış ise (Y) yazınız.

6. () Anaerop mikroorganizma çalışmalarında homojenizasyon işleminde blender kullanılmamalıdır.
7. () Analiz için gelen numuneler 3 gün içinde analize alınmalıdır.
8. () Kapalı ambalaj açılmadan önce açılacak olan kısım ve çevresi %70'lik alkol veya uygun bir kimyasalla silinip dezenfekte edilmelidir.
9. () Dilüsyon hazırlama mikrobiyolojik açıdan incelenecek numune içindeki mikroorganizma sayısının belli oranlarda sulandırılarak daha aza indirilmesini amaçlayan bir işlemdir.
10. () Vorteks karıştırıcı özel torbası içerisine konan numune ile dilüsyon sıvısını pedallarıyla ezerek (döverek) homojenize eden ve örnekteki mikroorganizmaların dilüsyon sıvısı içinde serbest hâle geçirilmesini sağlayan araçlardır.

DEĞERLENDİRME

Yapılan değerlendirme sonunda cevaplarınızı bir daha gözden geçiriniz. Kendinizi yeterli görmüyorsanız modülü tekrar ediniz. Bütün cevaplarınız doğru ise modülü tamamladınız, tebrik ederiz. Öğretmeniniz size çeşitli ölçme araçları uygulayacaktır. Öğretmeninizle iletişime geçiniz.

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ-1'İN CEVAP ANAHTARI

1	C
2	D
3	C
4	D
5	A
6	C
7	A
8	B

ÖĞRENME FAALİYETİ-2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	B
2	C
3	A
4	A
5	D
6	C
7	A
8	D

ÖĞRENME FAALİYETİ-3'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	Y
2	D
3	Y
4	Y
5	D

MODÜL DEĞERLENDİRMENİN CEVAP ANAHTARI

1	B
2	C
3	D
4	A
5	A
6	D
7	Y
8	D
9	D
10	Y

KAYNAKÇA

- AKGÜN Sadi, Belgin SARİMEHMETOĞLU, Haluk ÇELİK, Tansel ŞİRELİ, 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
- 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 Süspansiyonların 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.