

Membran Filtrasyon Yöntemi ¹

Velittin GÜRGÜN, A. Kadir HALKMAN

01. Genel Bilgiler

Bu yöntem, hem toplam bakteri sayısının hem de canlı bakteri sayısının belirlenmesine uygundur. Aynı zamanda, nispeten oldukça az sayıda bakteri içeren oligotrof sular ve kaynak sularının bakteriyolojik analizi için de kullanılabilir.

Belli hacimdeki bir bakteri süspansiyonunun, alanı belli bir filtre yüzeyinden süzülmesi, bu yöntemin prensibini oluşturur. Bu mikroorganizmaların sayısı, filtre yüzeyinin doğrudan mikroskopla incelenmesiyle belirlenebileceği gibi (toplam mikroorganizma sayısı), filtrenin, uygun bir besiyeri yüzeyine konulup inkübasyonundan sonra oluşan kolonilerin sayımı ile de belirlenebilir (gelişme yeteneğinde olan canlı mikroorganizmaların sayımı).

Filtre yüzeyindeki mikroorganizmaların doğrudan sayımında, aynı Thoma lamı ile sayımda olduğu gibi, uygun sayıdaki mikroorganizma popülasyonunun filtre yüzeyine homojen bir şekilde dağılması önemlidir. Filtre edilecek sıvının miktarını, içerdiği yaklaşık mikroorganizma sayısı ve filtre büyüklüğü belirler. Direk sayım yöntemi sırasında filtre yüzeyindeki bakteri yoğunluğunun, her bir mm² için 1.000-3.000 hücre arasında olması uygundur. Eğer filtre edilecek sıvının bakteri yoğunluğu çok daha fazla ise, materyal önce steril su ile seyreltilmelidir. Seyreltme oranına karar vermek için, aşağıda verilen yaklaşık değerler bir çıkış noktası olarak kabul edilebilir: Distrof sular (örneğin dağlarda bulunan dereler) 1 hücre/10 ml, park havuzu suyu 1.000 hücre/ml, lağım suyu 10⁷ hücre/ml.

Uygun tarzda seyreltilen örnek, emilmek suretiyle filtre edildikten sonra, örneğin konulduğu haznenin kenarları steril su ile yıkanarak, bu suyun da filtreden süzülmesi sağlanır. Eğer örnek çok seyreltikse, yani çok az sayıda bakteri içeriyorsa, daha fazla miktarda örnek filtreden geçirilir. Su analizleri için, filtre çapı 50 mm, etkili filtrasyon alanı 12 cm² ve gözenek büyüklüğü 0,3-0,6 µm olan filtreler uygundur. Bu amaçla Sartorius ve Millipore firmalarının üretmiş olduğu filtreler kullanılabilir.

Filtre diskleri, kullanılmadan önce 20 dakika süre ile kaynar su içinde tutulurlar. Eğer su örnekleri, kir parçacıkları ile yoğun bir şekilde bulaşmışlarsa, kaba parçalar önceden sudan ayrılır. Örnek alındıktan analize kadar geçen süre içinde bakteri gelişimini önlemek amacıyla, örnek içine son konsantrasyonlar % 1-2 olacak şekilde formaldehit çözeltisi veya % 0,5 olacak şekilde osmiyum oksit (OSO₄) ilave edilir. Bu işlem sadece toplam bakteri sayımında uygulanabilir. Filtrasyon işleminden sonra filtre, 20 dakika süre ile 50-60 °C'lık kurutma dolabında veya birkaç saat oda sıcaklığında kurutulur. Bundan sonra filtre, filtrasyon aleti üzerinde boyanır. Bunun için, filtrasyonun gerçekleştirildiği alet üzerindeki alt musluk kapanır ve üzerine 1:10 oranında seyreltilmiş alkali metilen mavisi veya Giemsa çözeltisinden damla damla verilir. Bu amaçla kullanılan boya çözeltisindeki boya parçacıklarının sayımı güçleştirmemeleri için, boya çözeltisi önceden filtre edilir. Örneğin ve boyanın özelliğine bağlı olarak 10-30 dakika sonra boya aktılır ve destile su ile yıkanır. Boyama işlemi,

¹ "[Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri; 2. Baskı. Prof. Dr. Velittin Gürgün, Doç. Dr. Kadir Halkman. 1990. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 7. Ankara](#)" adlı kitabın bölümüdür.

kurutulmuş filtrenin boya emdirilmiş bir kaç kat kromatografi kâğıdı üzerine yatırılmasıyla da gerçekleştirilebilir. Boyama işlemi bittikten sonra filtre diski bu sefer destile su emdirilmiş kromatografi kâğıdı üzerine yatırılır veya yine filtrasyon aleti üzerinde yıkanabilir. Buna benzer başka boyama yöntemleri de geliştirilmiştir. Boyama ve yıkama işleminden sonra filtreler kurutulup yaklaşık 5 x 10 mm boyutlarında küçük parçacıklar halinde kesilir; immersiyeon yağı veya gliserin ile transparent (saydam) hale getirilir ve bir lamel üzerine konularak 800-1.000 büyütme ile mikroskopta incelenir. Sayımda her bir alandaki ortalama hücre sayısı, toplam filtre alanı ve filtrat hacminden yararlanılarak orijinal örneğin 1 ml 'indeki toplam hücre sayısı hesaplanır.

Selüloz ester membran filtrelerinde basit ışık mikroskobu ile yapılan direk sayımlar için diakrom boyama yöntemleri.

| Boya çözeltisi ve Boyama süresi (Oda sıcaklığında) | Destile su ile yıkama |
|---|-----------------------|
| % 1 eritrosin içeren % 5'lik fenol çözeltisi 20 – 30 dakika | + |
| % 3 eritrosin içeren % 5'lik fenol çözeltisi 12 – 24 saat (65 °C 'da 20 dakika) | + |
| % 3 eritrosin içeren % 5'lik fenol çözeltisi 30 dakika | + |
| % 5 eritrosin içeren % 5'lik fenol çözeltisi 2 – 3 saat | + |
| % 0,5 eritrosin içeren % 96'lık alkol 1 – 2 dakika | + |
| % 0,5 metilen mavisi içeren % 10'luk alkol 1 – 3 dakika | – |
| % 0,1'lik asidik fuksin çözeltisi (suda, pH = 3,0). Bu yöntem seyreltilmiş ve % 1 pikrat ile tespit edilmiş örneklere uygulanır. 1 dakika | – |
| % 10'luk HNO ₃ ile ön muamele 2 dakika % 0,1'lik asidik fuksin ile muamele 3 dakika | – |
| % 0,02 metilen mavisi (pH = 6,5) ile muamele 2 dakika | – |
| Fuksin ile ön boyama + % 0,01'lik viktorya mavisi (pH = 10.0) 2 – 5 dakika | – |

Toplam mikroorganizma sayımı yönteminde, örnek içindeki bakterilerin dispersiyonunu sağlamak amacıyla, örnek içine 10 ml % 10'luk Tween - 80 (Poly-hydroxyethylen- sorbitan- monooleat) katılabilir. Aynı su örneğinde yapılan tekerrürlü sayımlar, ortam alkali hale getirilince birbirine benzer sonuç verdiği için, su örneğinin pH'sı NaHCO₃ tamponu ile 8,5 - 9,0'a ayarlanır. Diğer yandan, hücrelerin filtre yüzeyindeki dayanıklılıklarını artırabilmek amacı ile pikrik asit (% 1 + 0,85 NaCl) veya çok hassas yapıdaki mikroorganizmaları korumak amacıyla, glutaraldehit gibi bazı fiksasyon maddelerinin kullanılması da önerilmektedir.

Basit ışık mikroskobu ile sadece, su içindeki sediment tarafından tutulmayan serbest hücreleri saymak mümkündür. Sedimente yerleşmiş bakterileri, 1 g ıslak sedimentin 25 ml filtre edilmiş 0,0004 N NaOH ile 20 dakika çalkalanarak dispersiyonundan sonra saymak mümkün olur. Benzer şekilde, 0,5 ml çamur üzerine 50-100 ml 0,005 N KOH ilavesi de mümkündür. Eğer sediment kireçlenmişse yani sertleşmişse bu, önce % 2'lik HCl ile çözülür, sonra nötralize edilir. Dispersiyon maddesi olarak Na₄P₂O₇, (NaPO₃)₆ veya bunun Na₂CO₃

ile hazırlanmış tampon çözeltisi de kullanılabilir. Bu örnekler filtre edilmeden önce, içindeki büyük parçacıkların çökmesi amacıyla 1 -4 dakika bekletilir.

Canlı hücrelerin sayımı amacıyla materyalin oldukça yüksek oranda seyreltilmesi gerekir. Seyreltme işlemi, çapı 50 mm olan filtre yüzeyinde toplam 50 -100 hücreden fazla bulunmayacak şekilde yapılmalıdır. Materyal içinde bulunan mikroorganizmaların filtre yüzeyine homojen bir şekilde dağılmalarını sağlamak amacıyla, en az 10 - 20 ml örneğin filtreden geçirilip, filtrasyon haznesinin iç duvarlarının da bir o kadar steril tampon veya besiyeri çözeltisi ile yıkanması gerekir. Filtrasyon aletinin filtresi ile birlikte otoklavda (120 °C 'da 10 dakika) veya metal kısımlarının alevle, filtrenin de kaynatılarak sterilize edilmeleri gerekir. Filtrasyon işleminden sonra filtre, steril bir pens ile alınıp, içinde uygun bir agarlı besiyeri bulunan Petri kutusuna filtre yüzeyi üstte kalacak şekilde konur. Uygun bir inkübasyon sıcaklığı ve süresi sonucunda gelişen koloniler, bir koloni sayıcısı yardımıyla sayılır. Burada, yalnızca seçilen kültürel koşullarda gelişme yeteneğinde olan bakterilerin koloni oluşturabilecekleri açıktır. Kültürel koşulların değiştirilmesiyle anaerob veya fototrof bakterilerin de sayımları mümkündür.

Materyalin filtrasyonundan sonra filtrenin steril destile su ile yıkanması, bazı hallerde çok fazla miktarda suyun kullanılmasını gerektirebilir. Şöyle ki, incelenecek örneğin, suda çözünen ancak mikroorganizma gelişmesini olumlu veya olumsuz yönde etkileyecek unsurlar içermesi halinde, bu unsurların filtrasyon sırasında destile su ile yıkanarak uzaklaştırılması gerekebilir. Eğer incelenecek örnek içinde bakteri gelişmesini olumsuz yönde etkileyebilecek sodyum benzoat gibi bir antibakteriyel madde varsa, bu yöntemle sodyum benzoatın büyük oranda filtre yüzeyinden uzaklaştırılması ve dolayısıyla filtre yüzeyinde kalan bakterilerin gelişmesinin engellenmesi önlenebilir.

Bunun gibi, koliform grubu mikroorganizmaların aranması sırasında, eğer örnek laktoz dışında başka bir karbohidrat içeriyorsa, koliform grubun belirlenmesinde ana prensip laktozlu besiyerindeki üremenin gözlenmesi olduğu için, filtrasyondan sonra filtre yüzeyinde herhangi bir karbon kaynağının kalmasını ve daha sonraki inkübasyon sırasında bu karbon kaynağından yararlanarak koliform dışındaki mikroorganizmaların da gelişmesini önlemek amacıyla, filtre bol su ile yıkanarak bu karbon kaynağının uzaklaştırılması gerekir.