

# Bakterilerde Üremenin Ölçülmesi <sup>1</sup>

**Prof. Dr. Mustafa ARDA**

01. Genel Bilgiler
02. Bakterilerin Sayılması
  - 02.01 Direkt Metotlar
  - 02.02. İndirekt Metotlar
  - 02.03. Kültür Metodu

## 01. Genel Bilgiler

Bakteriler uygun sıvı ve katı ortamlarda kolayca üreyebilirler. Sıvı besi yerlerine ekilen bir tek koloni, uygun bir besiyeri, sıcaklık ve inkubasyon süresinden sonra üreyerek bir bulanıklık meydana getirir. Diğer bir ifade ile üremenin varlığı kültürün bulanık bir hal almasıyla anlaşılabilir. Ancak, bazı etkenler (mikoplasma, Leptospiralar) gözle zor görülebilen bir bulanıklık oluştururlar. Bazı bakteriler de cansız sıvı ve katı besi yerlerinde üremezler (rickettsia, chlamydia). Bir kısım mikroorganizmalar da çok uzun sürede üreyebilirler (Mikobakteriler gibi). Katı ortamlarda gözle görülebilecek büyüklükte koloniler meydana gelir. Bunlar üremenin varlığını gösteren durumlardır.

Ancak, gerek sıvı ve gerekse katı besiyerlerinde mikroorganizmalar arasında, bazıları üremeyebilir ve bir kısmı da ölü olabilir. Sıvı ve katı besi yerlerinde üreyen mikropların sayısını belirlemek için birçok yöntemler kullanılabilir. Bunların başlıcaları aşağıda özet halinde belirtilmiştir.

## 02. Bakterilerin Sayılması

Bir ortam içinde mikroorganizmaların üredikleri, ancak, sayılarında meydana gelen artma ile anlaşılır. Bu da sayımla belli olur. Bakterilerin çoğalmalarını ölçmek için birçok metotlar vardır. Bunlar arasında en çok kullanılanları şöyle özetlenebilir:

### 02.01 Direkt Metotlar

1. Bakteri sayımı: Mikroorganizmaları, aynen kan sayımında olduğu gibi, doğrudan doğruya sayabilmek için hemocytometerler (Petroff-Hauser tipi) kullanılmaktadır. Yalnız bu usulde, hareketli mikropları veya çok yoğun bakterileri saymada güçlükler meydana gelmektedir. Aynı zamanda canlılar ile ölmüşleri ayırmak ta olanak dışıdır. Teknik, kan sayımı gibidir.

2. Froti sayımı (Breed metodu): Mikrop kültüründen veya mikrobu sayılacak materyalden 0.01 cc alınarak bir lam üzerinde 1 cm<sup>2</sup> 'lik bir sahaya iyice yayılır ve kuruduktan sonra tespit edilir. Uygun bir boya ile boyandıktan sonra immersiyonla mikroskop altında sayım uygulanır. Mikroplar sayılırken lam üzerindeki bütün saha sayılmaz, sadece 10-15 mikroskop

---

<sup>1</sup> "[Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı. Prof. Dr. Mustafa Arda. Medisan Yayın Serisi no 46. 2000. Medisan Yayınevi, Ankara](#)" adlı kitabın 29. bölümüdür.

alanındaki mikroplar sayılarak ortalaması alınır ve orijinal materyaldeki mikrop adedi hesap edilir. Örneğin: Genel olarak immersiyon sisteminin mikroskop alanının çapı 0.16 mm dir. Alanı ise  $\pi r^2 = 3.14 \times 0.08^2 = 0.02 \text{ mm}^2$  'dir. Lam üzerindeki  $1 \text{ cm}^2 (= 100 \text{ mm}^2)$  de, mikroskop sahasından  $100 / 0.02 = 5000$  adet bulunmaktadır. Sayılan alanlardaki ortalama mikrop sayısı 10 ise, 0.01 cc 'de  $5000 \times 10 = 5 \times 10^4$  mikrop ve 1 cc 'de ise  $5 \times 10^6$  mikroorganizma bulunacaktır.

3. Karşılaştırma usulü: Normal bir kanın  $1 \text{ mm}^3$ 'ünde  $5 \times 10^6$  kadar alyuvar bulunur. Mikroorganizma miktarı sayılacak sıvıdan 0.1 cc alınarak aynı miktarda kanla karıştırılır ve buradan bir öze dolusu lâma yayılarak kurutulur, tespit edilir ve boyanır. Mikroskopta 10-15 sahada bulunan alyuvarlar ve mikrop sayısı kaydedilir. Örneğin: Sayılan mikroskop alanlarında, ortalama olarak, 10 alyuvar ve 2 mikrop bulunsun, buna göre numunenin  $1 \text{ mm}^3$  'ünde  $2/10 \times 5 \times 10^6$  mikrop ve 1 cc de ise  $2/10 \times 5 \times 10^9$  mikroorganizma vardır.

Direkt sayma metotlarında canlı ile ölü mikroplar ayırt edilmezler ve her ikisi birden sayıma iştirak ederler. Bazen de çeşitli maddeler bakteri gibi görüldüğünden sayım sonucuna etkileyebilirler.

4. Elektronik sayım: Son senelerde elektronik aletlerle yapılan sayımlarda birkaç saniyede sonuç alınabilmektedir. Alet, pahalı olduğu için henüz çok yaygın olarak kullanılmamaktadır.

## 02.02. İndirekt Metotlar

1. Total hacim tayini: Kültürlerden 10 veya 15 cc alınarak dipleri daralan ve ölçülü santrifüj tüplerine (Hopkins tüpü) konur ve kuvvetlice santrifüje edilir. Dipte toplanan sedimentin hacmi, milimetre küp, olarak okunur. Bu suretle muayyen bir süre sonra ne kadar miktarda (hacimde) mikrobun ürediği hesap edilir.

2. Türbidimetrik metot: Kültürlerde mikroplar üredikçe bulanıklık da artar. Sıvı besiyerlerindeki bulanıklığı tayin etmek için fotoelektrik türbidimetre (veya spektrofotometre) kullanılmaktadır. Bu aletin esası ışık üzerine kurulmuştur. Bir ortam ne kadar berrak olursa, o kadar fazla ve ne kadar bulanık olursa, o kadar az ışık geçirir. Bulanıklılık sayesinde de üremenin meydana gelip gelmediği ve derecesi öğrenilmektedir.

3. McFarland Standart tüpleri ile tayin: Bir ortamdaki mikropların sayısı yaklaşık olarak, McFarland standart tüplerinin bulanıklığı skalası yardımı ile tayin edilebilir. Fakat, her mikrop için bu metot uygulanamaz. Çünkü her mikroorganizmanın, standart bulanıklık tüplerine göre meydana getirdiği yoğunluktaki miktarları aynı değildir. Mc Farland standart tüpleri hazırlamak için  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ve  $\text{BaCl}_2$  'ün molar eriyiklerinden % 1 'lik çözeltiler hazırlanır ve Çizelge 1' de gösterilen oranlarda karıştırılır. Çizelge 2 'de bazı mikroorganizmaların tüp numaralarına göre ihtiva edebileceği mikrop sayısı ( $\times 10^6$ ) gösterilmektedir.

Bakteri nevilerine göre mikroorganizmaların sayısında da değişme olur. Diğer bir ifade ile her bakteri No.1 McFarland tüpünde yaklaşık,  $300 \times 10^6$  miktarında bulunmaz.

4. Kimyasal metot: Bu usulde, bakterilerdeki nitrogen, fosfor asiti, karbon, DNA, RNA ve diğer maddelerin miktarları ölçülerek üreme hakkında fikir elde edilir.

Çizelge 1

Tüp no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
%1 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0
%1 BaCl <sub>2</sub>	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Bakteri hücre Sayısı milyon/ml	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400	2700	3000

Çizelge 2 (Bakteri Hücre Sayısı; milyon / cc)

Tüp no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>S. pyogenes</i>	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400	2700	3000
<i>S. aureus</i>	400	800	1100	1500	1900	2300	2700	3000	3400	3800
<i>S. typhi</i>	500	900	1400	1800	2300	2700	3200	3600	4100	4600

5. Biyokimyasal metot: Mikroorganizmaların glukoz kullanması, amonyak asimilasyonu, asit teşkili, karbondioksit oluşturması, oksijen alması, v.s. metobolizma aktivitesi ölçülerek üreme tespit edilir.

6. Kuru ağırlık tayini: Bunda, bakteri kütesinin ağırlığı sabit kalıncaya kadar 120 °C 'de 3 'er saat bırakılır ve her seferinde ağırlık tespit edilir. Sabit bir ağırlık elde edilince kurutmaya son verilir.

### 02.03. Kültür Metodu

1. Dilusyonla sayma: Bu metot süt, toprak, kültür, vs. yerlerdeki mikropları saymada kullanılır. Sayımı yapılacak numunenin 10 cc lik sıvı besiyerinde 10 katlı dilusyonları (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>.....) hazırlanır. Uygun sıcaklıkta muayyen bir zaman inkubasyona konduktan sonra üreyen ve üremeyen tüpler kaydedilir ve orijinal kültürdeki (1 cc de) mikroorganizma miktarı tahmin edilir. Örn, inkubasyondan sonra, tüplerde 10<sup>-3</sup>, de üreme olsun, 10<sup>-4</sup>'de olmasın, buna göre orijinal kültürün 1 cc sinde yaklaşık olarak 1000 ile 10.000 arası mikroorganizma vardır denir. Örneğin: Dilusyonları 1 cc miktarlarında aktarılmak suretiyle yapılmış ise 10<sup>-3</sup>'de de üreme olduğuna göre, bu tüpte 1-9 tane mikrop isabet etti, buna karşılık üreme olmayan 10<sup>-4</sup> tüpüne hiç bir mikroorganizma girmedi demektir. Dilusyonlar hazırlanırken 10<sup>-3</sup> tüpüne 10 tane mikrop giremezdi. Çünkü eğer 10 mikrop girse bunun bir tanesi 10<sup>-4</sup>'e geçecekti veya geçmesi ihtimali olacaktı. Bunun sonunda da 10<sup>-4</sup> 'de üreme meydana gelecekti. Bu duruma göre orijinal kültürün 1 cc sinde 1-9 x 10<sup>3</sup> mikroorganizma vardır.

2. Roller tüp metodu: Bu teknikte özel küçük şişeler kullanılmaktadır. Bu şişelerin içinde belli miktarda ve 42-45 °C ye kadar ılıtılmış agar besiyeri vardır. Kültür (veya numune) bu şişelerdeki agar içinde 10 katlı olarak dilue edilir. Sonra her şişe özel döndürme aleti yerleştirilerek döndürülür. Böylece şişedeki agar kenarlarda katılaşır. Bundan sonra, şişeler etüve muayyen bir süre için yerleştirilir. Üreyen koloniler şişenin kenarlarında kolayca görülerek sayılır ve yukarıda belirtildiği şekilde hareket edilerek mikrop adedi bulunur.

3. Frost'un lam metodu: Mikrop ihtiva eden sıvının, içinde 42-45 °C ye kadar ılıtılmış agar besiyeri olan tüplerde, 10 katlı seri dilusyonları yapılır. Son dilusyondan 0.5 cc alınarak bir

lama yapılır. Etüvde 37 °C. de 6-8 saat tutulduktan sonra tespit edilerek uygun bir boya ile boyanır. Üreyen mikrop kolonileri mikroskop altında sayılır.

4. Sellüloz filtreleri ile sayım: Sellüloz asetattan yapılmış ince ve 1 cm<sup>2</sup> 'sinde takriben 50 milyon kadar, 0.5 mikron veya daha küçük çapta, deliklere sahip milipolar filtreler mikroorganizma saymada kullanılmaktadır. Bu filtreler sterilize edildikten sonra kendi özel aletine takılır ve içinde mikrop bulunan sıvı süzülür. Filtrasyon bittikten sonra, filtre steril bir pensle çıkarılır ve içinde sıvı besiyeri olan bir petri kutusuna konur. Uygun bir ısıda inkubasyona konduktan sonra, filtrelerin üzerinde üreyen koloniler sayılır.

Bu metotlarda sadece canlı mikroorganizmalar sayılır. Ölüler üremedikleri için sayımda herhangi bir değere sahip olamazlar. Dilusyonla yapılan sayımlarda önemli bir nokta, sulandırılmaların çok iyi yapılması ve mikropların kümeler halinde bulunmamasıdır. Bu teknikler için 24-48 saat (veya daha fazla) bir süreye ihtiyaç vardır.

5. Koloni sayımı: Mikrobiyolojide kültür, su, süt, peynir, v.s maddeler içinde bulunan mikroorganizma sayının bilinmesine çoğu zaman gereksinim duyulmakta ve bu işlem çeşitli yöntemlerle uygulanmaktadır. Mikrop sayısının doğruya yakın sayılması çok önemli bir sorundur. Bunun için de sayımın bazı kaidelere uyularak yapılması, sonucun doğru veya doğruya yakın çıkmasında büyük yararları bulunmaktadır. Bunlar da kısaca aşağıdaki tarzda özetlenebilirler:

Sayım yapılacak laboratuvarın tozsuz ve cereyansız olmasına ve aynı zamanda çok kalabalık olmamasına özen gösterilmelidir.

1. Sayımı yapılacak örneğin, bütün numuneyi temsil edecek nicelik ve nitelikte olması gereklidir ve şarttır.
2. Numunenin çok iyi karıştırılması, homojen bir hale getirilmesi, içindeki mikrop kümelerinin dağıtılması gereklidir. Çünkü mikrop sayma yönteminde, bir mikrobun bir koloni oluşturacağı görüşünden hareket edilmektedir.
3. Örnek alındıktan sonra uzun bir süre ve uygun olmayan koşullarda tutulmaması ve mümkün olduğu kadar hemen dilusyon ve ekim işlemine başlanması çok yerinde olur.
4. Sulandırma sıvısı steril olmalı, bakteristatik veya bakterisid etkiye sahip olmamalıdır.
5. Sulandırma sıvısı tam istenilen miktarlarda olmalı, fazla veya eksik olmamalıdır. Sıvı soğuk olmalıdır (+ 4 °C).
6. Sulandırmalar genellikle 10 katlı olarak yapılmalıdır. Gerekirse 5 veya 2 katı da yapılabilir.
7. Sulandırırken mikroorganizmaların sıvı içinde homojen olarak ve her alana eşit oranda dağılımının sağlanmasına özenle dikkat edilmelidir. Tüm sulandırma işlemleri en geç 15-20 dakikada tamamlanmalıdır.
8. Gerek orijinal suspansiyondan örnek alırken veya sulandırmalar yapılırken pipetlerin sadece uç kısımları değdirilmeli ve daha uzun bir kısmının değmesinden sakınılmalıdır.
9. Eğer mümkünse 1 cc lik ve uçları sağlam pipetler kullanılmalıdır.
10. Her sulandırma için ayrı bir pipet kullanılması ve bunların steril olduklarına dikkat edilmelidir.

11. Sulandırma miktarı tecrübeye dayanarak ve kültürlerdeki üreme durumuna bakarak ayarlanmalıdır. Eğer, *E. coli* 'nin 24 saatlik broth kültüründen sayım yapılacaksa, bu sulandırma  $10^{-7}$  'ye kadar uzanabilir.
12. Ekimlerde, mümkünse en son üç sulandırma kullanılmalı ve her bir dilusyondan en az 3 petri kutusuna ekim yapılmalıdır.
13. Petri kutularına genellikle 0.05 cc veya 0.1 cc ekilir. Eğer çalkalama kültürleri yapılacaksa 1 cc kadar inokulum kullanılabilir.
14. Petri kutularındaki besi yeri üzerine konan 0.1 cc lik inokulum, ucu L şeklinde kıvrılmış bir cam çubukla veya aynı tarzda hazırlanmış pastör pipeti ile, yüzeye iyice yayılır.
15. Petri kutularındaki besi yerleri mikroorganizmaları en iyi bir tarzda üretebilecek kalitede olmalı ve içinde herhangi bir inhibitör madde bulunmamalıdır.
16. Ekilen petri kutuları, sayımı yapılacak mikroorganizmanın fizyolojik karakterine göre uygun bir süre ve ısıda etüvde tutulurlar.
17. Sayım el sayıcısı kullanarak gözde yapılır. Ancak, bu tarz sayımda hatalar yapılabilir. Bunları önlemek için kontak kalemli ve elektrikle çalışan sayıcılar kullanılabilir gibi, bazı durumlarda elektronik sayıcılardan da yararlanılabilir.
18. Petri kutularında fazla kolonileri sayabilmede kolaylık elde etmek için, petri kutuları alt yüzden bir cam kalemlle 4 veya 8 eşit kısma ayrılmalıdır.
19. Sayımda mümkün olduğu kadar tarafsız davranılmalıdır.
20. Üreyen, 350'den fazla ve 10'dan (veya duruma göre 5'den) aşağıdaki sayıda olan koloniler genellikle hesaba katılmamaktadır. Ancak bu tarz işlem laboratuvarlar arasında bazı değişiklikler gösterebilirler. Diğer bir deyimle belirtilen bu mikrop koloni limitleri kesin değildir. Böyle, kısıtlamalar konmasının nedenleri arasında, a) Çapı 10 cm. olan orta boydaki petri kutularında sayılabilecek veya gözle görülebilecek koloni sayısı ancak 350 kadar olabilmektedir. Bundan fazla koloniler gözle fark edilemediği gibi, mikroplara isabet eden beslenme alanı da çok daralmakta ve birçok mikrop ta gelişip üreyememekte ve dolayısıyla de koloni oluşturamamaktadır. Böyle mikropların oluşturdukları koloniler gözle zor ayırt edilebilir bir durumdadır. b) Petri kutularında çok az sayıda üreyen mikroplar (eğer koloniler belirgin karakterde değilse), agarın içinde bulunan kontaminatlardan veya havadan düşen mikroplardan ileri gelme olasılığı bulunabilir. Ancak, iyi yetiştirilmiş teknik eleman farklı özellik gösteren kolonileri tanıyabilir. Bu nedenle de az sayıda olan koloniler de hesaplama dâhil edilirler.
21. Aynı dilusyondan ekilen 3 petri kutusundaki mikrop kolonileri her dilüsyon için az çok birbirine yakın sayıda olmalı ve en fazla birbirinin iki katını aşmamalıdır. Aksi halde, ya fazla miktarda ekim yapılmıştır veya pipet sıvıya fazla daldırılmış ve pipetin dış kenarlarında da agarın sathına mikrop geçmiştir veya dilüsyonlar hazırlandıktan sonra iyice karıştırılarak homojen hale getirilmemiştir.
22. Petri kutularına ekim yapılmadan önce, kullanılacak dilüsyonlar tekrar iyice karıştırılmalıdır.
23. Petri kutularının birinde proteus üremiş ise o petri kutusu hesaba katılmamalıdır.
24. Sayıma iştirak ettirilen 3 ayrı dilüsyona ait petri kutularından birinde anormal sayıda (beklenenden çok fazla veya az) koloni varsa o petri kutusu hesaba katılmaz. Eğer böyle anormal durumlar fazla ise, o takdirde ya sayımda ve ekimlerde bir hata yapılmıştır. İşlem tekrar edilmelidir.

25. Son 3 dilusyondan 3 er petri kutusuna yapılan ekimlerde üreyen koloniler sayılarak her dilusyon için ortalama bulunur ve buradan, orijinalindeki ortalama mikrop sayısı hesaplanır.

26. Orijinal kültürdeki mikroorganizma sayısını hesaplamada aşağıdaki formülden yararlanılır:

$$N = (1/v) \times X \times D$$

Burada:

N = Orijinal suspansiyondaki mikrop sayısı,

V = Petri kutularına ekilen inokulum miktarı (0.1 cc veya 0.05 cc)

X= Ortalama mikrop sayısı

D = Dilusyonun ters logaritması.

Yukarıda yapılan açıklamalara dayanılarak bir kültürdeki mikroorganizma sayısının hesaplanması kısaca şöyledir.

*E. coli* 'nin 18 saatlik broth kültüründen  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  ve  $10^{-9}$  dilusyonlarının her birinden 3 er petri kutusuna 0.1 cc miktarlarında ekimler yapılıyor ve bunlar 24 saat 37 °C 'de inkube edildikten sonra üreyen koloniler sayılıyor ve aşağıdaki sonuçlar alınıyor:

Dilusyonlar	1. Petri	2. Petri	3. Petri	Toplam Koloni	Ortalama Koloni
$10^{-7}$	340	280	300	920	307
$10^{-8}$	40	50	45	135	45
$10^{-9}$	4	7	10	21	7

Yukarıdaki bulgulara göre,

$10^{-7}$  de 0.1 cc de ortalama 307 mikrop bulunursa, orijinal suspansiyonun 1 cc 'sinde, ortalama  $(1/0,1) \times 307 \times 10^7 = 10 \times 307 \times 10^7 = 30.7 \times 10^9$  mikrop/cc vardır.

Diğer dilusyonlar içinde aynı tarzda işlem yapılırsa,  $10^{-8}$  de 0.1 cc ortalama 45 koloni bulunursa, orijinalin 1 cc sinde, ortalama  $(1/0,1) \times 45 \times 10^8 = 10 \times 45 \times 10^8 = 4.5 \times 10^9$  mikrop/cc vardır.

Ve diğer sulandırmaya göre yapılan hesaplamada da aynı suspansiyonun içinde bulunması gereken ortalama mikrop sayısı  $70 \times 10^9$  kadar olacaktır. Üç ayrı dilusyona göre yapılan hesaplamada aynı kültürün orijinalinde bulunması gereken ortalama koloni sayıları arasında az çok farklar bulunmaktadır. Bu ayrımları normal kabul etmek gerekir ve bunlar sayım hatalarından veya ekimlerden ileri gelmektedirler. Bu ortalamaların da ortalaması alınırsa,  $[(30.7 + 4.5 + 70) \times 10^9] / 3 = 48.5 \times 10^9$  mikrop / cc vardır.

Yukarıdaki hesaplama yöntemine göre, *E. coli* kültüründe 1 cc de ortalama  $48.5 \times 10^9$  (48.500.000.000) mikroorganizma bulunmaktadır.

Buna benzer fakat daha az kullanılan diğer bir sayma yöntemi de şöyledir: Aynı örnekten yararlanılarak hesaplamalar yapılırsa,

$10^{-7}$  de 0.1 cc de 307 ortalama koloni (mikrop) var.

$10^{-8}$  de 0.1 cc de 45 ortalama koloni (mikrop) var

$10^{-9}$  da 0.1 cc de 7 ortalama koloni (mikrop) var

Bu bulgular aşağıdaki tarzda da düzenlenebilir.

$10^{-7}$  de 0.1 cc de 307 ortalama koloni (mikrop) var

$10^{-7}$  de 0.01 cc de 45 ortalama koloni (mikrop) var

$10^{-7}$  de 0.001. cc de 7 ortalama koloni (mikrop) var ve toplam olarak

$10^{-7}$  de 0.111 cc de 359 ortalama mikrop bulunur. Buradan,  $10^{-7}$  nin 0.111 ml sinde ortalama 359 mikrop bulunursa, orijinalin 1 cc sinde, formüle göre:  $(1/0.111) \times 359 \times 10^7 = 9 \times 359 \times 10^7 = 32.31 \times 10^9$  mikrop / cc bulunacaktır. Görüldüğü gibi, ilk sayma yönteminde ortalama  $48.5 \times 10^9$  mikrop / cc bulunmasına karşın ikinci yöntemde  $32.31 \times 10^9$  mikrop/cc olarak hesaplanmıştır. Ancak, birinci sayma yöntemi, laboratuvarlar tarafından çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kültürde bulunan mikroorganizmaların % 95 güven sınırları içinde alabileceği en az ve en fazla limitlerin bulunması sayımda bilinmesi gereken en önemli noktalardan biridir. Bu güven sınırların tespiti birçok yönlerden yararlar sağlamaktadır. Bunu bulmak için bazı ufak istatistiki hesaplamalara gereksinme vardır. Yine aynı *E. coli* örneği esas alınırsa,

Dilasyonlar	1. Petri	2. Petri	3. Petri	Toplam Koloni
-7	340	280	300	920
-8	40	50	45	135
-9	4	7	10	21

Bulgular aşağıdaki tarzda düzenlenebilir:

$10^{-7}$  de 0.3 cc de toplam 920 koloni (mikrop) var

$10^{-7}$  de 0.3 cc de toplam 1350 koloni (mikrop) var

$10^{-7}$  de 0.3 cc de toplam 2100 koloni (mikrop) var ve "toplam olarak  $10^{-7}$  de 0.9 cc de toplam 4370 koloni (mikrop) var" bulunacaktır.

$10^{-7}$  de 1 cc içinde ortalama  $4370 / 0.9 = 4855.5$  mikrop vardır.  $10^{-7}$  de 1 cc de bulunan ortalama mikrop sayısının standart hatası (Sh)

$$Sh = \sqrt{4370/0,9} = \sqrt{4855,5} = \pm 69.7$$

Buna göre,  $10^{-7}$  de 1 cc de bulunan mikrop sayısının standart hatası  $\pm 69,7$ 'dür. Güven sınırlarını hesaplamada (% 95), standart hatanın 2 katı ( $2 \times 69.7$ ), ortalama mikrop sayısına bir defa eklenir ve bir defa da çıkarılır. Buna göre %95 güven sınırları ile  $4855.5 + 2(69.7) = 4494.4$  ve  $4855.5 - 2(69.7) = 4716.1$  olarak hesaplanmaktadır. Bir diğer deyiş ile, örneğin 1 cc sinde en fazla  $4994.4 \times 10^7$  ve en az  $4716.1 \times 10^7$  mikrop /cc olacaktır.

Mikrop sayma yönteminden yararlanılarak iki besi yeri arasında üreme kabiliyeti bakımından farkın olup olmadığı veya iki besiyerinin istatistiki yönden aynı veya ayrı olduğunun tespiti yapılabilmektedir. Örn. *E. coli* 'ye ait katı besi yerinden alınan iki koloni, bileşimleri ayrı karakterde iki sıvı ortama ekiliyor ve 24 saat  $37^\circ\text{C}$  de inkube edildikten sonra, her iki buyyon kültüründe  $10^{-8}$  e kadar 10 katlı sulandırmalar yapılıyor. Bu son dilusyonlardan 10 ar petri kutusundaki kanlı agara veya serumlu agara 0.1 cc miktarlarında ekimler yapılır iyice yayıldıktan sonra 20 petri kuru 37  $^\circ\text{C}$  de 24 saat inkube ediliyor ve üreyen koloniler sayılıyor ve aşağıdaki sonuçlar elde ediliyor: (Hesaplama, Poisson dağılımına göre % 95 güven sınırları esas alınarak yapılmıştır).

Besiyerleri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Toplam mikrop sayısı
I	23	32	30	43	20	18	37	37	44	21	305
II	88	49	57	67	60	72	70	80	65	46	653

### I. Besiyerine ait değerler

$$\begin{aligned} \text{Toplam mikrop sayısı (N)} &= 30.5 \\ \text{Ortalama mikrop sayısı } (\bar{x}) &= 30.5 \\ \text{Standard hata (Sh)} &= \sqrt{305/10} \\ &= 17.46/10 \\ &= \pm 1.75 \end{aligned}$$

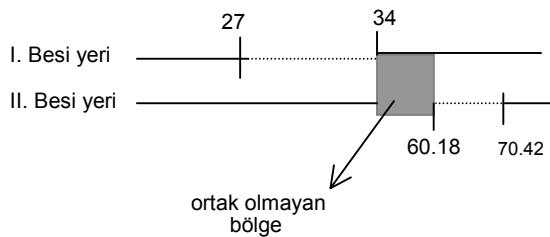
Standart hatanın iki katı ( $2 \times 1.75 = 3.50$ ) ortalama mikrop sayısına bir defa eklenir ve bir defa da çıkarılır. Bu suretle,  $10^{-8}$  dilusyonlarında 0.1 cc içinde bulunabilecek en yüksek ve en az mikrop sayısı bulunur. Yukarıda verilen örneğe göre bu değerler 34 ve 27 olarak bulunur ve elde edilen sonuçlara, göre I. besi yerinin  $10^{-8}$  dilusyonunda 0.1 cc içinde en fazla 34 ve en az da 27 mikroorganizma bulunacaktır. Buna göre orijinal kültürün 1 cc sinde, en fazla  $(1/0.1) \times 34 \times 10^8 = 340 \times 10^8 = 34 \times 10^9$  mikrop/cc ve en az  $(1/0.1) \times 27 \times 10^8 = 270 \times 10^8 = 27 \times 10^9$  mikrop/cc bulunacaktır. Bu duruma göre, I. besi yerinin 1 cc sinde, % 95 güvenle, en fazla  $34 \times 10^8$  ve en az da  $27 \times 10^9$  mikrop bulunacak ve bu sınırların dışında bulunma olasılığı % 5'den aşağıdadır.

### II. Besi yerine ait değerler

$$\begin{aligned} \text{Toplam mikrop sayısı (N)} &= 653 \\ \text{Ortalama mikrop sayısı } (\bar{x}) &= 65.3 \\ \text{Standard hata (Sh)} &= \sqrt{653/10} \\ &= 25.55/10 \\ &= \pm 2.56 \end{aligned}$$

Standart hatanın iki katı  $2 \times 2.56 = 5.12$ 'dir. Bu duruma göre, ikinci besiyerinin  $10^{-8}$  dilusyonunun 0.1 cc sinde bulunması gereken mikrop sayısı 70.42 ve 60.18, buna göre orijinal kültürün 1 cc 'sinde bulunan mikrop sayısı da en fazla  $(1/0.1) \times 70.42 \times 10^8 = 704.2 \times 10^8 = 70.42 \times 10^9$  mikrop, en az  $(1/0.1) \times 60.18 \times 10^8 = 601.8 \times 10^8 = 60.18 \times 10^8$  mikrop bulunacaktır.

Bu iki besi yerine ait bulunan alt ve üst limit değerler bir çizelge üzerinde karşılaştırılırsa:



Yukarıdaki karşılaştırmaya göre, birinci besiyerinin en yüksek mikrop sayısı ile ikinci besi yerinin en az mikrop sayıları arasında birbirini üzerine çakışmayan bölge bulunmaktadır. Diğer bir deyimle, birinci besiyerinde bulunan mikrop sayısı, birçok kez sayılsa bile, ikincinin en az



sınırına ulaşamayacaktır. Aralarında ortak bölge olmadığı için iki besi yerinin de ortak yanları yoktur. Bu nedenle ikinci besiyeri, birinciden daha fazla üreme kapasitesine sahiptir ve aralarında bu fark istatistiki bakımdan önemlidir.

Yukarıda yapılan basit bir karşılaştırma, eğer t-önemlilik testi ile de mukayese edilirse, sonuç yine aynı çıkmaktadır. Şöyle ki, bunu uygulamak için bazı istatistiki yöntemlerden yararlanılacaktır:

1. İki ortalama mikrop sayısı arasındaki fark

(D)

$$D = 65.3 - 30.5 = 34.8$$

2. Bu farkın standart hatası (Sh)

$$Sh = \sqrt{65.3 + 30.5} = 9.78$$

3. Önemlilik testi (t-testi)

$$t = D/Sh = 34.8/9.78 = 3.6$$

İki ortalama arasında fark (34.8), bu farkın standart hatasının iki katından büyük ( $34.8 > 2 \times 9.78$ ) olduğundan, % 95 güven eşliğinde, her iki mikrop sayıları arasında fark vardır ve bu fark istatistiki olarak önemlidir. Ayrıca, hesapla bulunan  $t = 3.6$  değeri, t-tablosunda ve 18 serbestlik derecesindeki  $t = 2$  değerinden büyüktür ( $3.6 > 2$ ). Bu nedenle de iki besi yeri arasında fark bulunmakta ve birinci besi yeri ikinciden daha az üretme kapasitesine sahip olmaktadır.

## Örnek 2

Besiyerleri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Toplam mikrop sayısı
I	50	47	51	48	43	40	55	50	44	45	473
II	41	38	50	44	62	60	58	48	50	57	508

I. Besi yerine ait değerler:

Toplam mikrop sayısı (N) = 473

Ortalama mikrop sayısı ( $\bar{X}$ ) = 47.3

$$\text{Standart hata (Sh)} = \frac{\sqrt{473}}{10} = \frac{21.74}{10} \pm 2.17$$

Üst limit  $47.3 + 4.34 = 51.64 \times 10^8$  mikrop/cc.

Alt limit  $47.3 - 4.34 = 43.00 \times 10^8$  mikrop/cc.

II. Besi yerine ait değerler:

Toplam mikrop sayısı (N) = 508

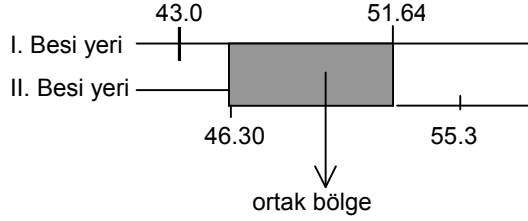
Ortalama mikrop sayısı ( $\bar{x}$ ) = 50.8

$$\text{Standart hata (Sh)} = \frac{\sqrt{508}}{10} = \frac{22.53}{10} = \pm 2.25$$

Üst limit  $50.8 + 4.50 = 55.3 \times 10^8$  mikrop /cc.

Alt limit  $50.8 - 4.50 = 46.30 \times 10^8$  mikrop /cc.

Bu iki besi yerine ait alt üst limitlerin bir çizelge üzerinde karşılaştırması



Aralarında ortak bölge bulunduğu için, koloni sayıları arasında önemli fark yoktur. Sayımlar birçok kez tekrarlanırsa, I. besi yerine ait değerler II. besi yerine ait değerler arasında (veya tersi) rastlamak, % 95 olasılıkla, mümkün bulunmaktadır.

1. İki ortalama mikrop sayısı arasındaki fark (D)

$$D = 50.8 - 47.3 = 3.5$$

2. Farkın standart hatası (Sh)

$$Sh = \sqrt{\frac{50.8 + 47.3}{473}} = \sqrt{98.1} = 9.9$$
$$t = \frac{3.5}{9.9} = 0.35$$

İki ortalama mikrop sayısı arasındaki fark (3,5), bu farkın standart hatasının 2 katından ( $2 \times 9.9 = 19.8$ ) küçük olduğundan ( $3.5 < 19.8$ ), % 95 güven eşliğinde, bu iki koloni sayısı arasında ve dolayısıyla de iki sıvı besi yeri arasında istatistiki yönden önemli bir ayrım yoktur. İkisi de aynı üretme potansiyeline sahiptir.

Her iki örnekte de % 95 güven sınırları esas aldığı için standart hatanın iki katı hesaplamaya dahil edilmiştir. Bu karşılaştırma t-testine göre yapılırsa hesapla bulunan  $t = 0.35$  değeri, t-tablosunda ve 18 serbestlik derecesindeki  $t = 2$  değerinden küçük olduğundan ( $0.35 < 2$ ), bu iki besi yeri arasında istatistiki yönden ve % 95 güven eşliğinde fark yoktur.