

# Sıvı Besiyeri Kullanılan Yöntemler <sup>1</sup>

Velittin GÜRGÜN, A. Kadir HALKMAN

01. Genel Bilgiler
02. Tüp Dilüsyonu Yöntemi
03. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi
  - 03.01. EMS Yönteminde Dilüsyon Kavramı
  - 03.02. Diğer EMS Tabloları
  - 03.03. EMS Yönteminin Doğruluğu ve Güvenilirliği
  - 03.04. EMS Yönteminin Kullanıldığı Yerler
  - 03.05. Materyalden 10 ml ya da 100 ml 'lik Kısmın Kullanılması
  - 03.06. Pozitif Tüplerin Değerlendirilmesi

## 01. Genel Bilgiler

Katı besiyerinde 1 canlı hücrenin 1 koloni oluşturması esası ile yapılan kültürel sayımlar, tüm sayım yöntemleri içinde kuşkusuz en güvenilir olanlarıdır. Bununla birlikte bazı özel durumlarda sıvı besiyerinde kültürel sayım yapmak gerekebilir. Bu bölümde, sıvı besiyerinin kullanıldığı tüp dilüsyonu ve en muhtemel sayı yöntemleri açıklanacaktır. Bunlardan tüp dilüsyonu yöntemi yaygın olarak kullanılan bir yöntem değildir. Ancak, gerek bazı mikrobiyoloji kitaplarında bu yöntemin de bulunması, gerek kavranılması çoğu kez daha zor olan en muhtemel sayı yönteminin esası olması nedenleri ile tüp dilüsyonu yöntemine yer verilmiştir.

## 02. Tüp Dilüsyonu Yöntemi

Sayımı yapılacak olan mikroorganizmanın dilüsyonu, uygun bir dilüsyon çözeltilisinde yapılır. Dilüsyonlardan sıvı besiyerine 1' er ml ilave edilir, inkübasyon sonunda mikroorganizma üremesi görülen (+) tüpler değerlendirilerek materyaldeki canlı hücre sayısı tahmin edilir.

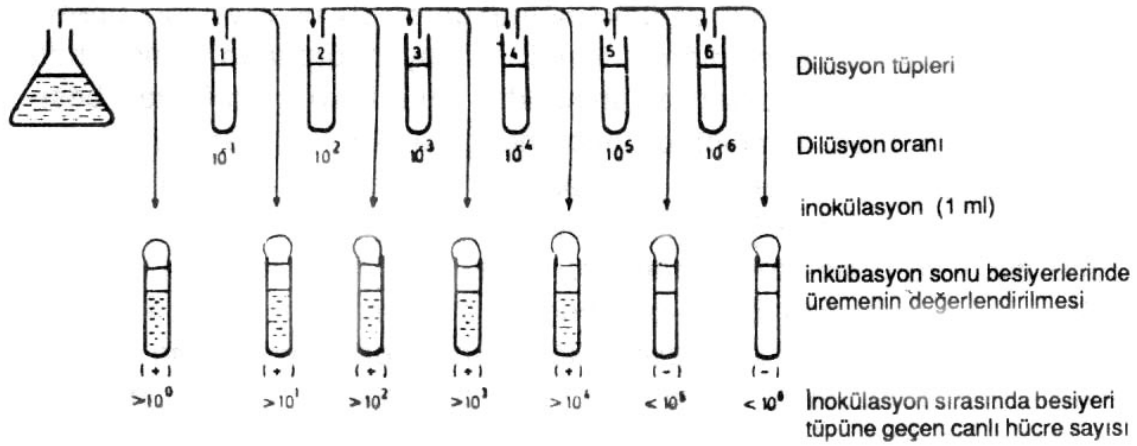
### Örnek

Bir gıda maddesinin  $10^{-6}$ 'ya kadar dilüsyonu FTS içinde yapılmış, uygun sıvı besiyerlerine 1' er ml pipetlenmiş inkübasyon sonunda 1. ; 2. ; 3. ve 4. dilüsyon tüplerinden yapılan ekimlerde (+), 5. ve 6. tüplerden yapılan ekimlerde ise (-) sonuç alınmıştır. Gıda maddesindeki mikroorganizma sayısı nedir?

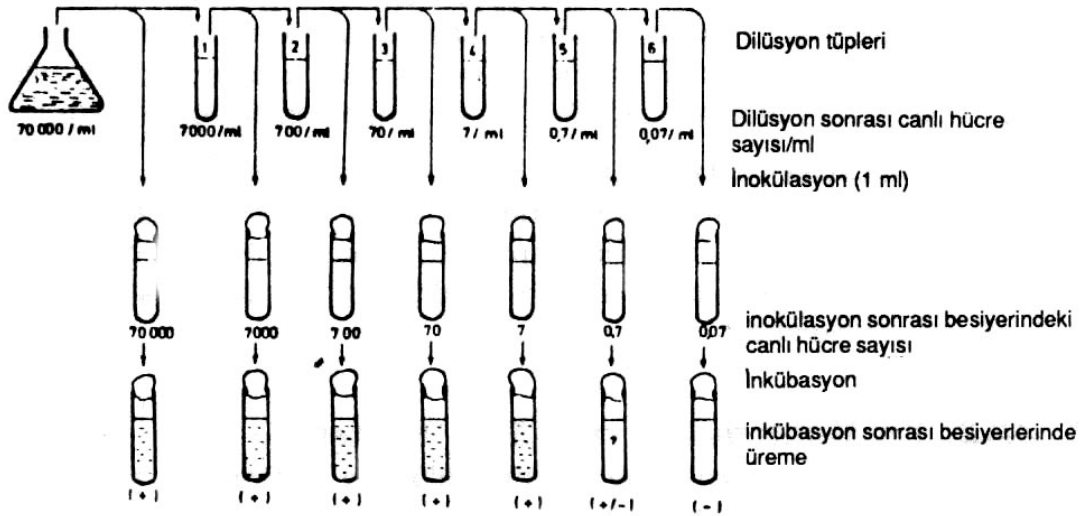
Çözüm: Aşağıdaki şekilde yukarıda verilen örnek gösterilmiştir.

4 nolu dilüsyon tüpünden yapılan ekimde, besiyerine en az 1 adet canlı hücre geçtiği için, inkübasyon sonunda bu tüpte üreme görülmüştür. Şu halde orijinal materyalin her ml 'sinde  $10^4$  adetten daha fazla canlı hücre vardır. Ancak, 5 nolu dilüsyondan ( $10^{-5}$  dilüsyondan) besiyerine 1 tek canlı hücre dahi geçmemiştir. Şu halde materyalde  $10^5$  adet/ml' den daha az sayıda canlı hücre vardır. Dolayısı ile, üremenin görüldüğü en son dilüsyon ile görülmediği dilüsyon arasında olmak üzere bu örnek için materyalde  $10^4$ - $10^5$  adet/ml arasında canlı hücre olduğu tahmin edilmektedir.

<sup>1</sup> "[Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri; 2. Baskı. Prof. Dr. Velittin Gürgün, Doç. Dr. Kadir Halkman. 1990. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 7. Ankara](#)" adlı kitaptan derlenmiştir.



Tüp dilüsyon yöntemi çoğu kere yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir. Aşağıdaki şekilde, içinde bilinen sayıda mikroorganizma olan bir materyalin tüp dilüsyon yöntemi ile değerlendirmesi verilmiştir. Örnekte, dilüsyonlar sırasında canlı hücrelerin dilüsyon çözeltilerine uniform olarak dağıldığı kabul edilmiştir. Böyle bir dağılımın (matematiksel olarak doğru olmakla beraber) uygulamada elde edilmesi beklenemez. Örnek, sadece yöntemin teorik yönünü açıklamak için bu şekilde düzenlenmiştir.



4. dilüsyondan yapılan ekim sonunda besiyeri bulunan tüpte 7 adet canlı hücre olacağı varsayıldığına göre, bu besiyerinde üreme olacaktır. Matematiksel olarak 5 nolu dilüsyon tüpünün tamamında (10 ml) 7 adet canlı bakteri bulunacaktır. Bu dilüsyon tüpünden besiyeri bulunan tüpe 1 ml aktarılacağına göre 5 nolu besiyeri tüpüne 0,7 canlı hücre geçecektir. 5 nolu besiyeri tüpüne geçen canlı bakteri sayısı kuşkusuz 0,7 değil ya 0 ya da 1 adet olacaktır. 5 nolu besiyeri tüpü ise 1 ve daha fazla canlı hücre bulunması halinde (+), 0 canlı hücre bulunması halinde (-) sonuç verecektir. 10 ml içinde 7 adet canlı hücre olan 5 nolu dilüsyon tüpünden 10 adet besiyerine 1'er ml aktardığımızı varsayalım. Yine matematiksel olarak, 10 adet besiyeri tüpünün en fazla 7 adedine 1'er adet canlı hücre geçecek, dolayısı ile bu 7 tüp inkübasyon sonunda (+) olarak değerlendirilirken, 3 adet besiyeri tüpü ise (-) sonuç verecektir. Bir diğer

değiş ile 5 nolu dilüsyon tüpünden 1 adet besiyeri tüpüne 1 ml aktarıldığında, % 70 olasılıkla (+), % 30 olasılıkla (-) sonuç alınacaktır.

Bu durumda materyalde 70.000 adet/ml canlı hücre varken tüp dilüsyonu yöntemi ile % 70 olasılıkla 5. besiyeri tüpünde (+) sonuç alınıp 6. besiyeri tüpünde (-) sonuç olmadığı için sonuç  $10^5$ - $10^6$  arasında (100.000-1.000.000) olarak verilecek, buna karşın % 30 olasılıkla doğru sonuç olan  $10^4$ - $10^5$  arasında sonuç alınacaktır.

Bu kez materyalde 20.000 adet/ml canlı hücre olduğunu varsayalım. Yukarıda açıklanan örnek dikkate alınır, bu materyal için % 20 olasılıkla  $10^5$ - $10^6$  arasında olmak üzere hatalı tahmin, % 80 olasılıkla  $10^4$ - $10^5$  arasında olmak üzere doğru tahmin yapılacaktır. Ancak materyaldeki canlı hücre sayısı 95.000 adet/ml ise % 95 olasılıkla, hatalı olarak sayı  $10^5$ - $10^6$  arasında tahmin edilecektir.

Tüp dilüsyon yöntemi bu gibi sakıncalarından ötürü yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bunun yerine dilüsyon tüplerinden daha fazla sayıda besiyeri tüpüne ekim yapılarak, sonucun daha doğru yaklaşımlarla istatistiksel olarak tahmin edildiği, en muhtemel sayı yöntemi kullanılmaktadır.

### **03. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi**

En muhtemel sayı yöntemi, tüp dilüsyon yönteminin geliştirilmiş şeklidir. Bu yöntemde, materyalden FTS ile standart 1 : 9 oranında dilüsyon yapılır. Dilüsyonlardan uygun sıvı besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra üreme sonuçları kontrol edilerek sayı hesaplanır.

Bir diğer deyiş ile tüp dilüsyon yönteminde her dilüsyon için 1 tüp kullanılırken, EMS yönteminde her dilüsyondan 1'den fazla sayıda ekim yapılır. Aynı dilüsyondan yapılan paralel ekim sayısı arttıkça, istatistiki olasılık kurallarına göre daha doğru sonuçlar alınır. Aynı dilüsyondan yapılan paralel ekim sayısı sonsuza ulaştığında ise sayım sonucu kesinleşir.

Çeşitli mikrobiyoloji kitaplarında farklı şekilde düzenlenmiş EMS tablolarına rastlanmaktadır. Tablolar arasındaki farklar ile tabloların kullanımına ilişkin, çoğu dipnot şeklinde verilen örnekler, uygulayıcıların hatalı yorumlarda bulunmasına yol açabilmektedir. Bu kitapta, en çok kullanılan 5 paralelli ekim için hazırlanmış EMS tablosu ile bu tablonun kullanımına ilişkin örnekler verilmiştir.

#### **03.01. EMS Yönteminde Dilüsyon Kavramı**

Çizelge 'de dilüsyonlar 10-1-0,1 ml olarak verilmiştir. Bu, ardışık 3 standart (1 : 9 oranında) dilüsyondan 5 'er adet sıvı besiyerine (5 paralelli ekim) 1' er ml ekim yapıldığı anlamına gelir. Aşağıdaki şekilden bu durum izlenebilir. Buna göre,  $10^{-4}$  dilüsyondan besiyerlerine 1' er ml ekim,  $10^{-5}$  dilüsyondan besiyerlerine 10'ar ml ekim ile aynı anlamı taşımaktadır. Çünkü  $10^{-4}$  dilüsyondaki canlı hücre sayısı  $10^{-5}$  dilüsyona göre 10 misli fazladır. Benzer şekilde  $10^{-6}$  dilüsyondan 5 'er besiyerine 1'er ml ekim ile  $10^{-5}$  dilüsyondan 5 'er besiyerine 0,1 'er ml ekim aynı anlamı taşımaktadır. Bir diğer deyiş ile  $10^{-6}$  'ya kadar dilüsyon yapıldığını ve  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-6}$  dilüsyonlardan 5 'er besiyerine 1 'er ml ekim yapılmasının planlandığını, ancak herhangi bir nedenle  $10^{-4}$  ve  $10^{-6}$  dilüsyonlardan ekim yapma olanağının kalmadığını varsayalım,  $10^{-5}$  dilüsyondan 5 adet besiyerine 10 'ar ml ekim yapılırsa,  $10^{-4}$  'den 1 'er ml ekim yapmış gibi, aynı şekilde yine  $10^{-5}$  dilüsyondan 5 besiyerine 0,1'er ml ekim yapılırsa,  $10^{-6}$  dilüsyondan 1 'er ml ekim yapmış gibi olunur. Böylece; ardışık 3 dilüsyondan 5 'er besiyerine 1 'er ml ekim yapmak ile, ardışık 3 dilüsyonun 2. sinden (yukarıda verilen örnekte  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-6}$

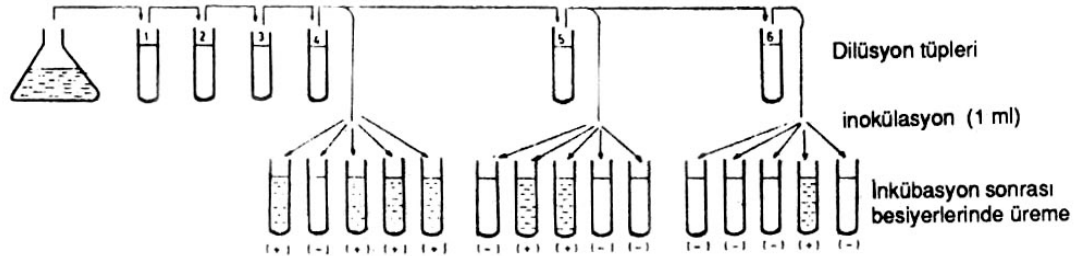
dilüsyonlar için  $10^{-5}$ ' den) 5 'er besiyerine sırasıyla 10, 1 ve 0,1 'er ml ekim yapmak aynı anlama gelecektir.

Standart EMS yönteminde ardışık 3 dilüsyondan 5'er besiyerine 1'er ml ekim yapılır. Çizelgede dilüsyonlar «10-1-0,1» ml olarak verilmiştir. Bu veriş şekli yukarıda açıklandığı gibi; hem ardışık 3 dilüsyondan 1'er ml, hem de tek dilüsyondan sırasıyla 10-1-0,1 ml inokülasyon yapılması halinde elde edilebilecek sonuçları göstermektedir.

Çizelge: Ardışık 3 dilüsyondan 5'er besiyerine 1 'er ml ekim ve inkübasyon sonunda (+) tüp sayısına göre (kod), materyalin 1 ml 'sinde en muhtemel sayı, % 95 güvenlik sınırları ile en az ve en çok sayılar tablosu.

| Dilüsyonlar |      |        | EMS   | % 95 Güvenlik Sınırları |        |
|-------------|------|--------|-------|-------------------------|--------|
| 10 ml       | 1 ml | 0,1 ml |       | En az                   | En çok |
| 0           | 0    | 0      | >0,02 | -                       | -      |
| 1           | 0    | 0      | 0,02  | <0,01                   | 0,13   |
| 1           | 1    | 0      | 0,04  | 0,01                    | 0,16   |
| 1           | 1    | 1      | 0,06  | 0,02                    | 0,19   |
| 2           | 0    | 0      | 0,04  | 0,01                    | 0,18   |
| 2           | 1    | 0      | 0,07  | 0,02                    | 0,21   |
| 2           | 1    | 1      | 0,09  | 0,03                    | 0,25   |
| 2           | 2    | 0      | 0,09  | 0,04                    | 0,25   |
| 2           | 2    | 1      | 0,12  | 0,05                    | 0,28   |
| 2           | 2    | 2      | 0,14  | 0,06                    | 0,32   |
| 3           | 0    | 0      | 0,08  | 0,03                    | 0,24   |
| 3           | 1    | 0      | 0,11  | 0,04                    | 0,29   |
| 3           | 1    | 1      | 0,14  | 0,06                    | 0,33   |
| 3           | 2    | 0      | 0,14  | 0,06                    | 0,33   |
| 3           | 2    | 1      | 0,17  | 0,08                    | 0,38   |
| 3           | 2    | 2      | 0,2   | 0,1                     | 0,42   |
| 3           | 3    | 0      | 0,17  | 0,08                    | 0,38   |
| 3           | 3    | 1      | 0,21  | 0,1                     | 0,43   |
| 4           | 0    | 0      | 0,13  | 0,05                    | 0,34   |
| 4           | 1    | 0      | 0,17  | 0,07                    | 0,4    |
| 4           | 1    | 1      | 0,21  | 0,1                     | 0,47   |
| 4           | 2    | 0      | 0,22  | 0,1                     | 0,48   |
| 4           | 2    | 1      | 0,26  | 0,13                    | 0,55   |
| 4           | 2    | 2      | 0,32  | 0,16                    | 0,63   |
| 4           | 3    | 0      | 0,27  | 0,13                    | 0,57   |
| 4           | 3    | 1      | 0,33  | 0,16                    | 0,65   |
| 4           | 3    | 2      | 0,39  | 0,02                    | 0,74   |
| 4           | 4    | 0      | 0,34  | 0,17                    | 0,67   |
| 4           | 4    | 1      | 0,4   | 0,21                    | 0,77   |
| 5           | 0    | 0      | 0,23  | 0,1                     | 0,56   |
| 5           | 1    | 0      | 0,33  | 0,15                    | 0,73   |
| 5           | 1    | 1      | 0,46  | 0,22                    | 0,96   |
| 5           | 2    | 0      | 0,49  | 0,24                    | 1,03   |

| Dilüsyonlar |      |        | EMS      | % 95 Güvenlik Sınırları |        |
|-------------|------|--------|----------|-------------------------|--------|
| 10 ml       | 1 ml | 0,1 ml |          | En az                   | En çok |
| 5           | 2    | 1      | 0,7      | 0,35                    | 1,4    |
| 5           | 2    | 2      | 0,94     | 0,49                    | 1,81   |
| 5           | 3    | 0      | 0,79     | 0,4                     | 1,58   |
| 5           | 3    | 1      | 1,09     | 0,57                    | 2,09   |
| 5           | 3    | 2      | 1,41     | 0,76                    | 2,61   |
| 5           | 3    | 3      | 1,75     | 0,97                    | 3,16   |
| 5           | 4    | 0      | 1,3      | 0,68                    | 2,5    |
| 5           | 4    | 1      | 1,72     | 0,93                    | 3,2    |
| 5           | 4    | 2      | 2,21     | 1,22                    | 3,99   |
| 5           | 4    | 3      | 2,78     | 1,58                    | 4,9    |
| 5           | 4    | 4      | 3,45     | 2,01                    | 5,95   |
| 5           | 5    | 0      | 2,4      | 1,29                    | 4,46   |
| 5           | 5    | 1      | 3,48     | 1,93                    | 6,28   |
| 5           | 5    | 2      | 5,42     | 3,08                    | 9,55   |
| 5           | 5    | 3      | 9,18     | 5,33                    | 15,81  |
| 5           | 5    | 4      | 16,09    | 9,53                    | 27,19  |
| 5           | 5    | 5      | > 160,00 | -                       | -      |



### Örnek

Bir materyalin  $10^{-6}$ 'ya kadar dilüsyonu hazırlanmış,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-6}$  dilüsyonlardan 5'er besiyerine 1'er ml ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda;  $10^{-4}$  dilüsyondan ekim yapılan 5 tüpün 4 adedinde  $10^{-5}$  dilüsyondan ekim yapılan 5 tüpün 2 adedinde ve  $10^{-6}$  dilüsyondan ekim yapılan 5 tüpün 1 adedinde (+) sonuç alınmıştır. Materyaldeki en muhtemel canlı hücre sayısı (gelişme yeteneğinde olan canlı hücre sayısı) nedir?

Çözüm : Sırasıyla 4, 2 ve 1 adet (+) sonuç alındığına göre çizelgeden 421 kodu için verilmiş olan EMS değeri 0,26 olarak bulunur. 0,26; ekim yapılan ardışık 3 dilüsyonun 2. sinde, ml'de bulunan en muhtemel canlı hücre sayısıdır. Burada ekim yapılan 3 dilüsyonun 2. si  $10^{-5}$  olduğuna göre, materyalin  $10^{-5}$  dilüsyonunda en muhtemel canlı hücre sayısı 0,26'dır. Buna göre, materyaldeki en muhtemel canlı hücre sayısı  $0,26 \times 10^5 = 2,6 \times 10^4$  adet/ml'dir. Çizelgenin % 95 güvenlik sınırları sütunlarına göre materyaldeki en düşük sayı  $1,3 \times 10^4$  adet/ml, en yüksek sayısı ise  $5,5 \times 10^4$  adet/ml'dir. Bir diğer deyiş ile, bu örnek için sayım sonucu «en muhtemel sayı yöntemi ile yapılan analiz sonunda % 95 olasılıkla, materyalde  $1,3 \times 10^4$  adet/ml

ile  $5,5 \times 10^4$  adet/ml gelişme yeteneğinde canlı hücre vardır, materyaldeki en muhtemel sayı  $2,6 \times 10^4$  adet/ml'dir» şeklinde verilmelidir.

#### Örnek

$10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ve  $10^{-4}$  dilüsyonlardan 5'er adet besiyerine 1'er ml ekim yapılmış ve inkübasyon sonunda sırasıyla 3, 1 ve 0 adet (+) tüp elde edilmiştir. Materyaldeki en muhtemel sayı nedir.

Çözüm : Çizelgeden 310 kodu için 0,11 değeri bulunur. Materyaldeki en muhtemel sayı  $0,11 \times 10^3 = 1,1 \times 10^2$  adet/ml dir.

#### Örnek

Bir sıvı gıda maddesinde çok az sayıda koliform grup bakteri tahmin edildiği için. dilüsyon yapılmaksızın doğrudan doğruya materyalden 5 erlene 100'er ml, 5 tüpe 10'ar ml ve 5 tüpe 1'er ml ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda 5 erlenin 3 adedinde, 10'ar ml aşıl原因 5 tüpün 2 adedinde ve 1'er ml aşıl原因 5 tüpün 1 adedinde (+) sonuç alınmıştır. Gıda maddesinin koliform yükü nedir?

Çözüm : Verilen örnekte olduğu gibi, standart 10-1-0,1 ml'lik dilüsyon serisi yerine, 100-10-1, veya 1-0,1-0,01 ml dilüsyon serileri de kullanılabilir. Burada kod 321, ve çizelgeden buna karşı gelen değer 0,17 dir. Ancak, 0,17; 10 ml için bulunan değerdir. Bu durumda gıda maddesindeki en muhtemel koliform sayısı 0,017 adet/ml ya da daha doğru olarak 1,7 adet/100 ml olarak belirtilir.

#### Örnek

Materyal laboratuvara çok az miktarda getirilmiştir. Materyalden doğrudan doğruya 5'er tüpe sırasıyla 1-0,1-0,01'er ml ekim yapılmış, inkübasyon sonunda sırasıyla 5, 4, 1 (+) sonuç elde edilmiştir. Materyaldeki canlı hücre sayısı nedir?

Çözüm : 541 kodu için çizelgeden bulunan değer 1,72 dir. 1,72 değeri; 0,1 ml materyal içindir. Dolayısı ile sonuç  $1,72 \times 10 = 1,7 \times 10^1$  adet/ml.'dir. Aynı sonuca bir başka yaklaşım ile de ulaşılabilir. Materyalden 0,1 ml ekim  $10^{-1}$  dilüsyondan 1 ml, 0,01 ml ekim  $10^{-2}$  dilüsyondan 1 ml ekim anlamına gelmektedir. Dolayısı ile, ardışık 3 dilüsyonun 2'si  $10^{-1}$  dir ve  $10^{-1}$  dilüsyonun 1 ml'sinde en muhtemel olarak 1,72 adet canlı hücre vardır. Bu durumda sonuç yine  $1,7 \times 10^1$  adet/ml olarak bulunur. Bu örnekte materyalin kendisi  $10^0$  dilüsyon anlamındadır.

### 03.02. Diğer EMS Tabloları

Çizelge ardışık 3 dilüsyondan 5'er besiyerine 1'er ml ekim yapılması halinde, inkübasyon sonucu elde edilecek (+) tüp sayılarına göre düzenlenmiş standart tablodur. Bunun dışında ardışık 3 dilüsyondan 3'er veya 10'ar besiyerine ekim, ardışık 2 dilüsyonun 1. sinden 2, 2. sinden 5 tüpe ekim gibi pek çok tablolar geliştirilmiştir. Bazı tablolar doğrudan doğruya 100 ml örnekteki sayıyı verirken, bazıları ise 1,0-0,1-0,01 ml ekim yapılması halinde materyalin 1 ml ya da 1 gramındaki EMS değerlerini verecek şekilde düzenlenmiştir. Bu tip tablolar verildiği literatüre göre değerlendirilmelidir.

Çizelgede 216 adet (6<sup>3</sup>) kod bulunması gerekirken sadece 50 kod verilmiştir. Bunun başlıca nedeni verilmemiş olan 166 kod için tekrar elde edilebilirlik olasılığının çok düşük olmasıdır. Bu durum aşağıda açıklanmıştır.

### 03.03. EMS Yönteminin Doğruluğu ve Güvenilirliği

Yukarıda ısrarla belirtildiği gibi, EMS tabloları ve dolayısı ile elde edilen sayım sonuçları istatistik hesaplamalar ile elde edilmiş değerlerdir. Aynı materyalden yapılacak 2 tekrarlı ekimlerde tekrarlar arasında farklılık olması yüksek oranlarda beklenir. Örneğin her 3 dilüsyondan da 10' ar tüpe ekim yapılsa, aynı kodun bir kez daha tekrarlanma şansı % 0,01 'e kadar düşebilmektedir. Bu gibi çok küçük olasılıklar özellikle düşük dilüsyonda küçük sayılı, daha yüksek dilüsyonlarda ise yüksek sayılı kodların elde edilmesinde geçerlidir. Örneğin 5'li seri ekimde 115, 124, 303, 311, 320, 035, 044, 053, 133, 142, 151, 240, 231 kodları birbirlerine yakın EMS değerleri verirler. Bu kodlardan 320 kodunun aynı materyalden tekrar elde edilme olasılığı en yüksek iken, 115, 124, 035 gibi kodların tekrar elde edilme olasılığı çok düşüktür. Bu gibi kodlar istatistiksel olarak aynı EMS değerlerini vermekle beraber, aynı kodun tekrar elde edilmesindeki çok düşük olasılıklar bu kodların güvenilirliğini azaltmaktadır. Dolayısı ile son yıllarda basılmış mikrobiyoloji kitaplarındaki EMS tablolarında ya 035 gibi kodlara hiç yer verilmemekte, ya da bu kodlara ilaveten tekrar elde edilebilme olasılıkları verilmekte ve araştırmacı bu konuda uyarılmaktadır. Bu kitapta çizelgede, 3 dilüsyondan 5'er tüpe ekim ile elde edilebilecek 216 farklı kod yerine, tekrar elde edilebilme olasılığı en yüksek olan 50 kod içeren EMS tablosu verilmesi uygun bulunmuştur.

### 03.04. EMS Yönteminin Kullanıldığı Yerler

Yukarıda anlatılan tüm sakıncalarına karşın EMS yöntemi, yaygın olarak kullanılmasını sağlayan üstünlüklere de sahiptir. Bunlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

-Bazı mikroorganizmaların katı besiyerinde üretilme olasılığı yoksa, ya da çok zayıfsa sıvı besiyeri, dolayısı ile EMS yöntemi kullanılır. Bunun dışında *Rhizobium* cinsine ait türlerin ayırımı ve sayımı için ileride ayrıntılarıyla açıklanacağı gibi, EMS yöntemi pratik olarak kullanılan en başarılı yöntemlerden biridir.

-Eğer sayım yapılacak örnekte agar yüzeyinde hızla gelişerek, asıl sayımı istenen hücrelerin gelişimini engelleyen mikroorganizmalar da varsa ve bu durum katı besiyerinde önlenemez iken sıvı besiyerinde önlenebiliyorsa, EMS yine avantajlıdır.

-EMS Yöntemi agarlı besiyeri yöntemlerine göre daha pratiktir. Tüplerin otomatik olarak doldurulduğu sistemler geliştirilmiş ve dolayısı ile EMS 'nin kolay bir yöntem olması sağlanmıştır.

-Yukarıda verilen örnekte olduğu gibi, bir materyalin 100 ml' sinde 2-3 adet gibi çok düşük sayılarda canlı hücre varsa, standart katı besiyeri yöntemi kullanılamaz. Bu gibi durumlarda, ya EMS yöntemi ya da membran filtre yöntemi kullanılma zorunluluğu vardır. Materyal membran filtreden geçirilemiyorsa, kullanılabilir tek pratik yöntem EMS 'dir. Ayrıca örnek, sıvı değil katı ise, membran filtre yöntemi zaten kullanılamaz.

### 03.05. Materyalden 10 ml ya da 100 ml 'lik Kısımın Kullanılması

Materyalin kendisinden ya da herhangi bir dilüsyonundan içinde 10 ml besiyeri bulunan bir tüpe 1, 0,1 ve 0,01 ml aktarılmasında herhangi bir sorun yoktur. Ancak, içinde 10 ml besiyeri

bulunan tüpe 10 ml materyal aktarılması zor, 100 ml materyal aktarılması ise olanaksızdır. Bu gibi durumlarda besiyeri özel olarak hazırlanır.

### **10 ml materyal kullanılması**

Standart deney tüpleri yerine 20 ml 'yi alacak daha büyük tüpler kullanılmalıdır. Burada en önemli husus, besiyerinin çift kuvvetli (double strenght) denilen şekilde hazırlanmasıdır. Bundan amaç, 10 ml materyal ilave edildiğinde standart besiyerinin 1 : 1 oranında seyrelerek zayıf bir üremeye neden olmamasıdır. Çifte kuvvetli besiyeri hazırlanırken besiyeri bileşimine giren maddeler 2 misli olarak tartılır. Örneğin, Nutrient Broth besiyeri hazırlanırken 1 litre için hazır toz besiyerinden 13 g tartılır. Bu şekilde 10 ml besiyeri içinde 0,13 g etkin madde (toz besiyeri) bulunur. Bunun üzerine 10 ml materyal ilave edildiğinde etkin madde konsantrasyonu yarı yarıya azalır ve sağlıklı değerlendirmeye uygun bir gelişme elde edilemeyebilir. Dolayısı ile bu seri için 13 g/litre yerine 26 g/litre hesabı ile besiyeri hazırlanır, tüplere dağıtılır. Tüpe 10 ml materyal konulunca konsantrasyon normal değerine düşer.

### **100 ml materyal kullanılması**

Aşağıda ayrıntılı olarak açıklanacak olan (+) tüplerin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlere göre, erlenmayer ya da tüp kullanılabilir. İster tüp, ister erlenmayer veya balon vs kullanılsın, 200 ml' lik hacmi rahat alacak boyutta seçilmelidir. Besiyeri yine çift kuvvetli olarak hazırlanıp 100' er ml dağıtılır. Üzerine 100 ml (ya da 100 g) materyal ilave edilir.

## **03.06. Pozitif Tüplerin Değerlendirilmesi**

İnoküle edilmiş bir besiyerinde inkübasyondan sonra üreme olup olmadığı, materyalin ve mikroorganizmanın özelliklerine göre farklı şekillerde belirlenir. Bunlardan en yaygın kullanılan yöntemler; bulanıklığın değerlendirilmesi, asit oluşumunun uygun bir indikatör ile gözlenmesi ve gaz oluşumunun belirlenmesidir.

### **Bulanıklığın değerlendirilmesi**

Başlangıçta berrak olan besiyeri, çoğu durumda mikroorganizma sayısının artışına paralel olarak bulanık bir görünüş alır. Kuşkusuz 10 ml besiyerine 10 ml materyal ya da 100 ml besiyerine 100 ml materyal katıldığında, materyalin özelliğine göre başlangıçta da bulanıklık oluşabilir. Bulanıklığın ölçülmesinde en emin yol fotometre kullanılmasıdır.

### **Asit oluşumunun değerlendirilmesi**

Pek çok mikroorganizma gelişme sonrası asit oluşturur. Asit oluşumu sonunda indikatör içeren besiyerinin rengi değişir (örneğin koliform grup MacConkey besiyerinde asit oluşturur ve besiyerinin rengi kırmızıdan sarıya dönüşür) veya besiyeri pıhtılaşabilir (laktik asit bakterilerinin çoğu sütte pıhtılaşma yapar). Asitlik doğrudan pH metre veya titrasyon ile ya da indikatörlerin yardımı ile belirlenebilir.

### **Gaz oluşumunun değerlendirilmesi**

Koliform grup bakterilerin belirlenmesinde çok kullanılan bir yöntemdir. Koliform bakteriler laktozu kullanarak gaz oluştururlar. Gaz oluşumunun belirlenebilmesi için, besiyeri bulunan tüpün içine Durham tüpü adı verilen küçük bir tüp ters olarak atılır ve besiyeri ile beraber sterilize edilir. Bakteri, besiyerinde gaz oluşturursa, oluşan gaz Durham tüpünün tepesinde



toplanır. Durham tüpünün kullanılmasında en sık yapılan 2 hata vardır. Bunlardan birincisi besiyeri hazırlanıp tüplere dağıtıldıktan sonra, Durham tüpü atıldığında, Durham tüpü içinde kalan havanın çıkarılmaya çalışılmasıdır. Oysa Durham tüpü içinde kalan hava, sterilizasyon sırasında kendiliğinden çıkar. İkinci hata ise, içinde Durham tüpü bulunan steril besiyerlerinin kontrol edilmeden inoküle edilmesidir. Her hangi bir nedenle Durham tüpü içinde hava kalabilir ya da besiyerlerinin eğilmesi, mekanik t p karıştırıcılarda yüksek hızda uzun süre karıştırılması gibi nedenlerle Durham tüpüne hava kabarcıkları girebilir. Bu gibi tüpler hem inokülasyondan, hem de inkübasyondan önce kontrol edilmeli, inkübasyon öncesi hava kabarcığı bulunan tüpler kullanılmamalıdır.