Standarda Dayalı Sayım Yöntemleri [1]

Velittin GÜRGÜN, A. Kadir HALKMAN

01. Genel Bilgiler
02. Optik Yoğunluk Tayini ile Sayım
03. Kuru Madde Tayini ile Sayım
04. Protein Miktarı Tayini ile Sayım
05. McFarland Yöntemiyle Sayım
06. Standarda Dayalı Diğer Yöntemler

01. Genel Bilgiler

Standarda dayalı sayım yöntemleri, indirek sayım yöntemleri arasında yer alır. Canlı hücre sayısına bağlı kıyaslamalı sayı belirleme yöntemleri bir standart kurveye dayandırılır. Buna göre, aynı hücre süspansiyonundan canlı hücre sayımı ile birlikte optik yoğunluk, kuru madde veya protein tayinleri yapılır ve elde edilen sonuçlar canlı hücre sayısına karşı bir kurvede gösterilir. Daha sonra, aynı mikroorganizmanın üretildiği bir ortamdaki canlı hücre sayısı, kurvede yer alan diğer parametrelerden birinin belirlenmesi ile saptanır.

Standarda dayalı sayım yöntemleri ile mikroorganizma sayısının belirlenmesi oldukça süratli yöntemlerdir ve en doğru sonuç protein tayini ile alınır. Bunu sırası ile kurumadde tayini ve optik yoğunluk yöntemleri izler.

Kıyaslamalı yöntemler olarak da tarif edilen bu yöntemler, genellikle mikroorganizmaların logaritmik gelişme dönemleri içinde bulunduğu devrelerde kullanılır. Gelişme kurvesinin logaritmik gelişme dönemleri içinde bulunan mikroorganizmalar hızlı bir çoğalma içindedirler, hücre ölümleri yeni hücre oluşum hızı ile kıyaslandığında son derece azdır. Dolayısı ile bu dönemde elde edilen parametre değerleri canlı hücre sayısını oldukça doğru bir şekilde yansıtır.

02. Optik Yoğunluk Tayini ile Sayım

Optik yoğunluğun fotometrik olarak ölçülmesi, homojen hücre süspansiyonlarında mümkün olur ve bu amaçla turbidometri ve nefelometri olmak üzere iki yöntem kullanılır. Turbidometride, mo-nokromatik bir ışığın bir hücre süspansiyonundan geçerken uğradığı yoğunluk kaybının ölçülmesi söz konusu olduğu halde (toplam ekstinksiyon); nefelometride ışığın süspansiyon içinden geçerken parçacıklara çarparak kırılma açısının ölçülmesi, esası teşkil eder. Hücre yoğunluğu ölçülmesinde, toplam ekstinksiyon değerinin ölçülmesine yarayan turbidometri için gerekli olan basit yapılı spektrofotometreler her laboratuvarda bulunabileceği için burada turbidometrik yöntem anlatılacaktır.

---

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

Turbidometri

Lambert - Beer kanununa göre, bir hücre süspansiyonundan geçen ışığın yoğunluğu (l) giriştekine (l_0) göre azalır ($l = l_0 . e^{-\Sigma} . c . d$). Optik yoğunluğun bir ölçüsü olan ekstinksiyon (O_D = Optik Density) hücre süspansiyonundaki biyomas (hücre) konsantrasyonu (c) ile doğrudan orantılıdır.

$O_D = \log l_0 / l = (\Sigma \text{ X } d \text{ X } c) / 2{,}303 = k_{OD} \text{ X } c$

Σ =Bulanıklık katsayısı; d = Küvetin kalınlığı (cm) dir.

Ortalama hücre boyutları sabit kaldığı sürece optik yoğunluğun alt sınırlarında (< 0,3 E) optik yoğunluk değerleri ile hücre yoğunluğu (hücre sayısı/ml) arasında lineer bir ilişki vardır. 1 ml 'deki kuru ağırlık veya hücre sayısı ile optik yoğunluk arasındaki düzeltme faktörü her mikroorganizmaya göre değişen bir değerdir.

$$1 / k_{OD} = (2{,}303) / (\Sigma d)$$

Yuvarlak şekilli hücrelerin birim kuru ağırlığa karşılık gelen optik yoğunluk değerleri genellikle çubuk şeklinde olanlardan daha fazladır.

Kullanılan ışığın dalga boyu arttıkça (= 350 -λ 880 nm arası kullanılabilir) ölçümün hassasiyeti ters orantılı olarak azalır. Buna karşın kısa dalga boyunda yapılan ölçümlerde ise çeşitli besiyeri ortamlarının kendinden kaynaklanan ekstinksiyonları dolayısıyla deney hassasiyeti her zaman sağlanamaz. Bu nedenle, fototrof bakteriler gibi renkli pigmentleri olan bakterilerin optik yoğunlukları ölçülürken 650 nm gibi yüksek bir dalga boyu kullanıldığı halde, *E. coli* gibi pigment içermeyen bakterilerin optik yoğunluğu ölçülürken 545 nm gibi daha düşük bir dalga boyu seçilir. Eğer bakteriler çok hareketli ise ekstinksiyon değerindeki dalgalanmalar durulmayabilir. Bu durumda bakteri kültürü içine önceden 1-3 damla formaldehit veya % 1' lik merthiolate çözeltisinden ilave edilerek bakteriler öldürülür ve stabilite önceden sağlanır.

Örnek, küvet içine konduktan sonra hava kabarcığı içerip içermediği kontrol edilmeli, eğer hava kabarcığı varsa bu bertaraf edilmelidir. Küvetin doldurulmasından sonra ölçüm değerleri genellikle değişkenlik göstermeye başlar ve 1 - 2 dakika süre ile dalgalanmadan kaynaklanan bu kırılma farklılaşması sürer ve sonra stabilleşir. Ancak bundan sonra sabit bir ekstinksiyon değeri ölçülmesi mümkün olur.

Optik yoğunluk ölçümünde kullanılan küvetin kalınlığı da önemli olup standart olarak 1 cm kalınlığındaki küvetler kullanılmaktadır. Hücre yoğunluğunun az olması halinde (< 10^7 adet/ml) 2 cm kalınlığındaki küvetler veya yoğunluğun fazla olması halinde 0,5 cm kalınlığındaki küvetler kullanılabilir. Ancak 2 cm 'lik küvet kullanılması halinde elde edilen OD değerlerinin 2 'ye bölünmesi ve 0,5 cm 'lik küvet kullanılması halinde 2 ile çarpılması gerekir. Optik yoğunluk ölçümlerinde OS veya 103 tipi cam küvetlerin kullanılması yeterli olup ölçüm öncesi kullanılan küvetlerin optik soğurmaları arasında bir fark olup olmadığı kontrol edilir ve şahit çözelti (çoğu kez aşılanmamış besiyeri) için kullanılan küvet sabit tutulup, diğer küvetlerin bundan sapışları, kullanılan şahit çözelti her iki küvete de konularak saptanır ve küvet faktörleri hesaplanarak örnek ölçümleri sonucuna dâhil edilir.

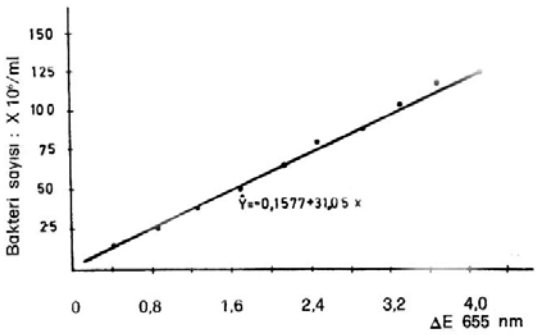
Küvet temizliği de çok önemli olup, küvetlerin ışık geçme doğrultusundaki camın iç ve dış yüzeyleri mutlak şekilde temiz olmalı, besiyeri artığı, yağ ve su lekesi ile parmak izi lekesi bulunmamalıdır. Aksi takdirde ölçümde büyük hatalar ortaya çıkabilir.

Optik yoğunluğa dayalı yöntemlerle hücre sayısının belirlenmesinde pek çok hata kaynağı vardır ve bu nedenle protein ve kuru madde tayinine dayalı yöntemlere göre daha az doğru sonuçlar alınır. Üreme koşullarının optimumdan sapması ölçüsünde, hücre içinde ışık kırılmasına neden olabilecek poli - hidroksi bütirik asit (PHBA), volutin ve vakuol gibi hücre sayısına bağlı olmayan yapılar oluşabilir ve sonuçta hücre sayısı artmadığı halde, absorbans miktarında bir artış olabilir. Diğer yandan optik yoğunluğun ölçülebileceği besiyerinin bileşimi ve rengi de standart olmalıdır. Besiyeri bileşimine giren öğelerden herhangi birinin az ya da çok olması ve sterilizasyon normlarının değişmesi gibi etkenler optik yoğunluğun farklı değerlerde ölçülmesine neden olabilmektedir.

Tüm bu ve buna benzer sakıncalarına rağmen fotometrik yöntemler, gelişen bilim ve teknoloji yaklaşımları altında üzerinde en çok çalışılan, yeni cihazlar geliştirilerek en doğru sonuca varılmayı hedefleyen yöntemler arasındadır. Fotometrik yöntem, diğer standarda dayalı yöntemlere göre daha kolay ve çok kısa bir sürede sonuç vermesi gibi önemli üstünlüklere sahiptir.

Aşağıda fotometrik yöntemin uygulanışına ilişkin bir örnek verilmiştir. Standart kurvenin hazırlanması amacıyla bakteri besiyerine aşılanmış, belirli zaman aralıkları ile ekstinksiyonları ölçülmüş, aynı anda kültürel sayım yapılmış, böylece çeşitli ekstinksiyon değerlerine karşı gelen canlı hücre sayıları belirlenmiş, tüm değerler milimetrik kâğıda işlendikten sonra standart kurve çizilmiştir. Standart kurvenin çiziminde istatistik hesaplamalar ile elde edilen regresyon doğrusu kullanılmıştır.

Kurvenin dışında, regresyon doğrusu çiziminde kullanılan formül de, belirli bir ekstinksiyon değerine karşı gelen mikroorganizma sayımında kullanılabilir. Diğer standarda dayalı yöntemlerde olduğu gibi, fotometrik yöntemlerde de amaç, canlı hücre sayısının kesin olarak belirlenmesi değil, çoğu kez logaritmik gelişme devresinin belirli bir anında bakteri sayısı hakkında fikir sahibi olmaktır.



Standart kurve bu şekilde elde edildikten sonra aynı koşullarda üretilen popülasyonlar için kullanılabilir. Bu amaçla kültürün sadece ekstinksiyon değeri ölçülüp, kurveden buna karşı gelen mikroorganizma sayısı belirlenir.

Buna göre, belli bir mikroorganizmanın sayıya dayalı hazırlanan üreme eğrisinden, logaritmik dönemdeki sayısı saptanıp, buna karşılık gelen ekstinksiyon değeri standart kurveden bulunarak, daha sonraki üretim denemelerinde sadece ekstinksiyon değerinin ölçülmesiyle logaritmik üretim devresine gelinip gelinmediği kolayca anlaşılabilir.

03. Kuru Madde Tayini ile Sayım

Mikroorganizmalarda kuru madde tayini genellikle membran filtre ile yapılmakta olup çoğu kez sıvı besiyerinde üretilmiş kültürlere uygulanır. Bununla beraber, agarlı besiyeri

yüzeyinde geliştirilmiş kolonilerin destile su ile yıkanması ve bunların filtreden geçirilmeleri de mümkündür. Santrifüj ile sıvı besiyerinden hücrelerin ayrılması yöntemiyle kuru madde tayini, membran filtre yöntemine göre daha az uygulanmaktadır. Çünkü bu yöntemle besiyerinden gelen tuzlar vs de kuru maddeye dâhil olabilir. Yıkama işlemi uygulandığında ise, bunu takip eden santrifüj sırasında belli bir hücre kaybı söz konusu olabilir.

Kuru madde tayininde en önemli basamaklardan biri filtrenin hazırlanmasıdır. Bu amaçla kullanılacak 0,45-0,6 p,m gözenekli membran filtre üzerinden destile su geçirildikten sonra, 80 °C 'da 12 saat süre ile tutulur. Desikatörde 6 saat süreyle soğutulduktan sonra, hassas terazide 0,1 mg hassasiyetle tartılır ve yine desikatöre alınır. Bu işlem filtre sabit ağırlığa gelinceye kadar tekrarlanır ve filtreler desikatörde muhafaza edilir. Bu şekilde kuru ağırlığı belirlenmiş olan filtre kuru madde tayininde kullanılabilir. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak 10-20 ml hücre süspansiyonu filtreden geçirilir. Daha sonra aynı filtrenin üzerinden en az hücre süspansiyonu kadar destile su geçirilir ve filtre temiz ve kuru bir cam kap içinde 80 °C'da 12 saat süre ile kurutulur. Desikatörde 6 saat tutulduktan sonra 0,1 mg hassaslık ile tartılır ve sabit ağırlığa gelinceye kadar bu işlem tekrarlanır. Buradan birim hacim materyal içindeki kuru madde miktarı hesaplanır.

Farklı hücre yoğunluğundaki süspansiyonların canlı hücre sayılarının belirlenmesi ve kuru madde tayinlerinin yapılması ile elde edilen standart kurve, daha sonraki çalışmalarda kullanılır.

Kuru madde tayini yukarıda anlatıldığı şekli ile en azından uzun süreli bir çalışmayı gerektirdiği için, yaygın olarak kullanılamamaktadır. Bununla beraber, çalışmalarda kullanılacak mikroorganizma süspansiyonuna bağlı olmak kaydı ile daha yüksek sıcaklık derecelerinde ve daha kısa süreli kurutma, vakum altında kurutma, liyofilizasyon tekniği ile kurutma gibi yöntemlerle daha kısa sürede sonuç alınabilir. Kuşkusuz en kısa kurutma ve dolayısı ile kurumadde tayini elektronik hassas terazi entegrasyonlu infrared lambalı sistem ile yapılmaktadır.

Kurumadde kolorimetrik olarak da tayin edilebilir. Bu yöntem biyolojik materyaldeki karbon miktarının belirlenmesi için kullanılır. Bu işlemde, 1 ml destile su ya da uygun bir inorganik tampon çözelti içinde 0,2-2 mg ağırlığında kuru materyal olacak şekilde örnek alınıp, % 2'lik potasyum dikromat çözeltisinden (sülfirik asit içinde) 2 ml ilave edilir ve 100 °C'da 30 dakika süre ile ısıtılır. Karışım soğutulur ve destile su ile 5 ml'ye tamamlanır. Bu şekilde hazırlanan çözeltinin absorbansı 580 nm'de şahit çözeltiye karşı okunur. Kuru ağırlığı bilinen materyalden bu yöntemle elde edilen standart kurveden, testi yapılan materyalin kuru madde içeriği saptanır.

04. Protein Miktarı Tayini ile Sayım

Mikroorganizmaların içerdiği protein miktarını tayin etmek amacıyla birçok yöntem geliştirilmiş olmakla beraber, bunlardan en çok kullanılanı ucuz ve çabuk olması dolayısıyla Stickland (1951) yöntemi olup. Aşağıda bu yöntem verilmiştir.

Mikroorganizmanın gelişme durumuna göre bir mikroorganizma kültüründen 10-30 ml'lik kesin bir hacim bir santrifüj tüpüne alınır ve 4.000-5.000 devirde 10-15 dakika süreyle santrifüj edilir, santrifüj sonrası üstte kalan serum kısmı atılır ve altta kalan pelet 6,6 ml destile su içinde çözülür. Çözelti üzerine 1,2 ml % 20'lik NaOH ilave edilip, 5 dakika süre ile

100 °C civarında (su banyosu veya elektrikli ısıtıcıda) kaynatılır. Bu süre sonunda santrifüj tüpü soğuk su ile soğutulur ve üzerine 0,2 ml % 25'lik $CuSO_4.5H_2O$ çözeltisinden ilave edilir ve iyice karıştırılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip, santrifüj edilir (3.000 dev/dak). Santrifüj sonucunda tüp üzerinde kalan kısmın absorbansı 545 nm'de, aynı anda örneksiz olarak hazırlanan kontrole karşı ölçülür.

Belli bir bakteri suşunun içerdiği protein miktarına karşılık gelen canlı hücre sayısını belirlemek amacı ile, önceden farklı yaştaki, aynı bakteri süspansiyonlarından her iki parametreye ait değerlerin saptanması gerekir. Elde edilen bu değerlerle çizilen kurve, daha sonraki üretimlerde protein değerinin canlı hücre sayısı olarak hesaplanmasında, standart kurve olarak kullanılabilir. Örneklerle elde edilen absorbans değerlerinden doğrudan doğruya aynı örneklerde saptanan canlı hücre sayısı ile bir standart kurve elde edilebileceği gibi, bu değerlere karşılık gelen protein miktarı önce sığır serum albumini ile aynı yöntemle elde edilen standart protein kurvesinden saptanıp, canlı hücre sayısı ile elde edilecek standart kurve, bununla da çizilebilir.

05. McFarland Yöntemiyle Sayım

Baryum klorür ile sülfürik asit karıştırılınca meydana gelen baryum sülfat, ortamda opak renkli bir bulanıklık oluşturmaktadır. Çok kompleks yapıda olmayan bir besiyerinde üretilen bakteriler de (örneğin *Rhizobium*) aynı renkte bir bulanıklık meydana getirmektedirler. Baryum klorür ile sülfürik asit oranlarının değiştirilmesiyle farklı bulanıklıkta çözeltiler oluşmakta olup, bunlara karşılık gelen bakteri sayısı da, bulunaklığın artması ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

McFarland Standardı.

Tüp no	%1 $BaCl_2$ (ml)	%1 H_2SO_4 (ml)	Bulanıklığa karşılık gelen bakteri sayısı (X 10^6 / ml)
1	0,1	9,9	300
2	0,2	9,8	600
3	0,3	9,7	900
4	0,4	9,6	1.200
5	0,5	9,5	1.500
6	0,6	9,4	1.800
7	0,7	9,3	2.100
8	0,8	9,2	2.400
9	0,9	9,1	2.700
10	1,0	9,0	3.000

Temiz bir tüp içine, çizelgede verilen oranlarda % 1'lik H_2SO_4 ve % 1'lik $BaCl_2$ 'ün suda hazırlanmış çözeltilerinden katılıp iyice karıştırılır ve buharlaşmayı önlemek amacıyla tüplerin ağzı sıkı bir şekilde kapatılır. Birbirini takip eden iki tüp arasında 300 x 10^5 adet bakterinin oluşturacağı kadar bir bulanıklık farkı vardır. Eğer elde edilmek istenen sayı bundan daha hassas sınırlar arasında ise, o zaman baryum klorür ve sülfürik asidin % 0,1'lik çözeltileri çizelgede verilen oranlar ile karıştırılır. Ya da %1 'lik baryum klorürden çizelgede olduğu gibi daha hassas ilaveler yapılır. Bu durumda tüplerdeki %1 'lik sülfürik asit hacmi = 10 ml - baryum klorür hacmi ile hesaplanmalıdır. Örneğin, kültür süspansiyonunda bulunan sayı 4 ve 5 nolu tüp arasında bir bulanıklık gösteriyorsa, o zaman baryum klorür miktarının

0,4-0,5 ml arasında değiştiği 10 tüplük bir seri daha hazırlanır. Bu takdirde elde edilen seriye ait bakteri sayısı da çizelgedeki gibi değişecektir.

Çizelge McFarland standardı (1/10).

$BaCl_2$ miktarı ml/10 ml	Bakteri sayısı (10^6)	$BaCl_2$ miktarı ml/10 ml	Bakteri sayısı (10^6)
0,40	1200	0.46	1380
0,41	1230	0,47	1410
0,42	1260	0,48	1440
0,43	1290	0,49	1470
0,44	1320	0,50	1500
0.45	1350		

Bulanıklığı veren McFarland çözeltileri ile bakteri yoğunluğunun Kıyaslanmasında besiyerinden gelecek etkiyi kaldırmak amacı ile bakteri süspansiyonu santrifüj edilip 1 -3 sefer steril filtreden geçirilmiş fizyolojik tuzlu su ile yıkanır ve orijinal bakteri süspansiyonu hacmine getirilerek spektrofotometrede (545 veya 650 nm) ya da çıplak göz ile kıyaslaması yapılır.

06. Standarda Dayalı Diğer Yöntemler

Özel olarak hazırlanmış santrifüj tüpleri kullanılarak, santrifüjlenmiş hücre kültüründe oluşan sedimentin boyu ölçülebilir. Bu yöntem kan hücreleri ve kısmen maya gibi büyük hacimli hücreler ve/veya süspansiyonda fazla sayıda hücre bulunması halinde başarılı olabilir. Ancak düşük konsantrasyonlardaki bakteri hücreleri için önerilmemektedir.

Yaş ağırlık tayini ile de hücre sayısı belirlenebilir. Bu yöntemde hücre kültürü santrifüjlenip elde edilen sediment uygun bir tampon çözelti ile yıkanır ve yeniden santrifüjlenir. Bu şekilde elde edilen sediment tartılır ve önceden hazırlanmış bir standart kurve yardımıyla orijinal süspansiyondaki hücre sayısı belirlenebilir.