

Mikroskopik Sayım Yöntemleri ¹

Velittin GÜRGÜN, A. Kadir HALKMAN

01. Genel Bilgiler
02. Thoma Lamı ile Sayım
03. Petroff - Hausser Lamı ile Sayım
04. Breed Yöntemi
 - 04.01. Mikroskop görüş sahası alanının hesaplanması
 - 04.02. Sayımın yapılması
 - 04.03. Mikroskop Faktörünün Hesaplanması
05. Howard Lamı ile Küflü Saha Sayımı
06. Fluoresant Mikroskopi Yöntemleri

01. Genel Bilgiler

Mikroorganizma sayımı yapılacak olan materyalin, mikroskop altında incelenmesi prensibine dayanır. Bu amaçla çok sayıda sayım tekniği ve bu tekniklere uygun ekipmanlar geliştirilmiştir. Direk mikroskopik sayım yöntemleri canlı ve ölü tüm mikroorganizmaların sayılması gibi önemli bir dezavantaja sahip olmakla beraber pek çok üstün yönleri de vardır. Bunlar şöyle sıralanabilir.

- 10 dakika gibi çok kısa bir süre içinde sonuç alınır,
- Maliyet, kültürel sayıma göre çok düşüktür,
- Yapılışı kolaydır,
- Sürekli preparat halinde uzun süre saklanabilir,
- Mikroorganizma cinsi hakkında çok kısa sürede fikir sahibi olunur (kok, çubuk bakteri, maya vs)
- Süt gibi bazı materyallerin laboratuvara getirilmesi sırasında, içlerindeki bakteriler çoğalabilir. Bunu önlemek için, kültürel sayımı yapılacak materyal, ancak soğutulabilir. Buna karşın direk mikroskopik sayım yöntemi kullanılacak ise materyal içine uygun bir antibakteriyel madde ilavesiyle bu sorun ortadan kaldırılabilir.

En yaygın olarak kullanılan direk mikroskopik sayım yöntemleri arasında, özel lamlarla yapılan sayımlar ve Breed Yöntemi vardır. Bunlara ek olarak Howard lamı ile küflü saha sayım yöntemlerinde konu ile ilgili olduğu için bu bölümde açıklanmıştır.

02. Thoma Lamı ile Sayım

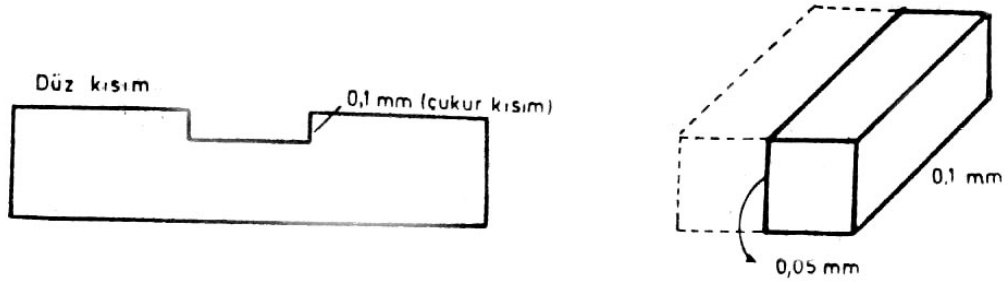
Mikrobiyolojide maya sayımında, tıpta sperm ve kan sayımında kullanılan ve Thoma lamı adı verilen özel bir lam ile yapılan, sayımdır. Thoma lamında bakteri sayılması oldukça güç olup, önerilen bir yöntem değildir.

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.

Thoma lamının esası, $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılmasıdır. Thoma lamının yandan görünüşü şekilde verilmiştir.

Şekilde görüldüğü gibi lamın çukur bir kısmı vardır. Kültür, bu kısım üzerine aktarılıp, lamel kapatıldığında bu çukurda $0,1 \text{ mm}$ yüksekliğinde bir sıvı kalır. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir. Lamel konduktan sonra üzerine bastırılarak lamın çukuru dışında kalan düz kısmı ile lamel arasında bir sıvı katmanının kalması önlenir. Böylece çukur alan içinde tam olarak $0,1 \text{ mm}$ yüksekliğinde sıvı bulunması sağlanmış olur.

Thoma lamında 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapılır. Şekilde bir küçük kare gösterilmiştir.



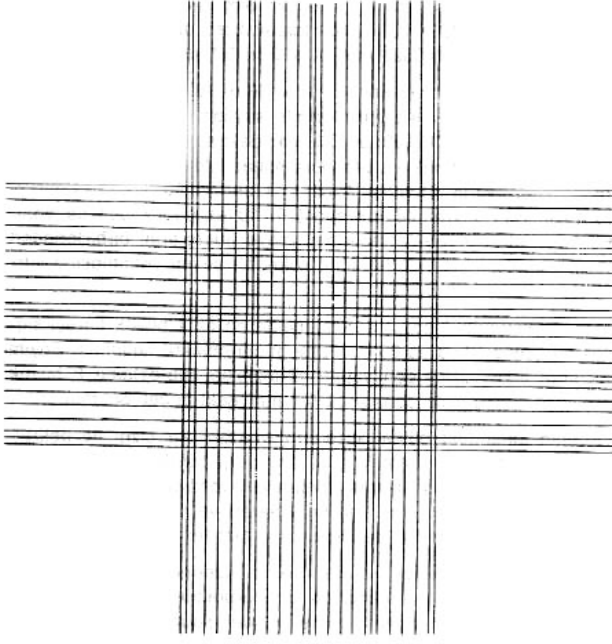
Şekilde görüldüğü gibi, küçük kare olarak belirtilen gerçekte bir kare prizmadır. Derinlik boyutu, şekilde verilen çukurun derinliğini göstermekte olup, $1/10 = 0,1 \text{ mm}$ dir. 1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi $= 0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,00025 \text{ mm}^3 = 1/4.000 \text{ mm}^3$ 'dür. Bir sayım alanında $16 \times 25 = 400$ küçük kare olduğuna göre toplam sayım hacmi $= 0,00025 \text{ mm}^3 \times 400 = 0,1 \text{ mm}^3$ 'dür.

Thoma lamında sayım sonucu $A \times SF \times 10.000$ formülü ile hesaplanır. Burada $A = 16$ büyük karede sayılan maya adedi, SF ise seyreltme faktörüdür. 10.000 ise $0,1 \text{ mm}^3$ 'deki sayım sonucunu 1 ml 'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir ($1 \text{ ml} = 1 \text{ cc} = 1 \text{ cm}^3 = 10.000 \times 0,1 \text{ mm}^3$). Maya sayımında seyreltme (dilüsyon) % 10'luk asetik asit ile yapılır. Bu konsantrasyondaki asetik asit maya hücrelerini birbirlerinden ayırarak kümeleşmeyi önlediği için, kolay bir sayım yapılmasına yardımcı olur.

Thoma lamında 1 görüş sahası içinde en az 1 büyük kareyi sığdırmak amacıyla 10 ya da 20 büyütme güçlü objektif kullanılır. Sayım büyük kare esası üzerinden yapılır. Genellikle çaprazlama 8 büyük kare sayılıp sonuç 2 ile çarpılarak $0,1 \text{ mm}^3$ 'deki değer bulunur.

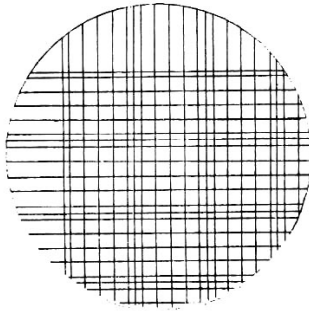
Thoma lamındaki büyük karelerin sınırları ara çizgi ile belirtilmiştir. Çoğu kere karıştırıldığı gibi, ara çizgi büyük karelerin sınırı değil, büyük karenin sınırlarını belirleyen yardımcı çizgidir. Şekilde Thoma lamının sayım yapılan kareleri verilmiştir. Diğer şekilde ise büyük karelerin sınırını belirleyen ara çizgiler görülmektedir.

Thoma lamında büyük karelerin sınırı üzerinde olan hücrelerin nasıl sayılacağı çoğu kez tartışılan bir durumdur. Bu gibi hallerde, hücrenin ne kadarının büyük kare içinde olduğuna dikkat edilir.



Direk mikroskopik sayım yöntemlerinde canlı ve ölü hücrelerin beraberce sayılmasının bir sakınca olduğu yukarıda belirtilmiş idi. Bununla beraber bazı basit, ancak etkin yöntemlerle canlı ve ölü hücreler ayrılabilir. Bu konuda en iyi örnek, metilen mavisi boyası ile maya hücrelerinin boyanması, daha sonra direk sayım lamlarına alınmasıdır.

Bu amaçla maya hücrelerinin bulunduğu tüpe 1 kaç damla metilen mavisi boyası damlatılır. Ölü hücreler metilen mavisi ile boyanır, ancak canlı olanlar boyanmaz. Bu şekilde, sadece maviye boyanmamış hücreleri sayarak canlı maya sayısı elde edilir.



Basit ışık mikroskoplarında boyanmamış mikroorganizmaların görülmesi ve dolayısı ile bunların sayılması çoğu kere (özelikle deneyimsizler için) sorun çıkarabilmektedir. İyi bir ışık ayarı ile bu sorun önemli ölçüde giderilmekle beraber, yine bazı boyaların kullanılması ile sıvı kültürde mikroorganizma boyanması sağlanabilir.

03. Petroff - Hausser Lamı ile Sayım

Thoma lamı 1/10 (0,1) mm derinliği ile bakteri sayımında uygun değildir. Bunun başlıca nedeni sabit bir netlik derinliğinde bakterilerin tümünün görülemeyeceğidir. Bu durumda bir sayım sahasında gerçek bakteri sayısının belirlenebilmesi için, sürekli olarak netlik taraması yapılması gerekir. Petroff - Hausser lamının en büyük özelliği, sayım yapılacak lamın derinliğinin 1/50 (0,02) mm olmasıdır. Bir diğer deyiş ile, Petroff - Hausser lamı, Thoma lamından 5 kez daha incedir. Dolayısı ile bir netlik derinliğinde tüm bakteriler net bir şekilde görülebilir.

Petroff - Hausser lamının Thoma lamından diğer farkı 25 büyük kare, her büyük karede 16 küçük kare bulunmasıdır. Her bir küçük karenin hacmi = $0,05 \times 0,05 \times 0,02 = 0,00005 \text{ mm}^3 = 1/2000 \text{ mm}^3$, buradan 400 küçük karenin hacmi = $0,00005 \text{ mm}^3 \times 400 = 0,02 \text{ mm}^3 = 0,00002 \text{ ml} = 2 \times 10^{-5} \text{ ml}$ olur. Böylece Petroff - Hausser sayım lamında toplam alanda sayılan bakteri sayısını 1 ml standart hacim birimine çevirmek için, $1/2 \times 10^{-5} = 5 \times 10^4$ faktörü ile çarpmak gerekir. Bir diğer deyiş ile 1 ml'deki bakteri sayısı $A \times SF \times 50.000$ formülü ile

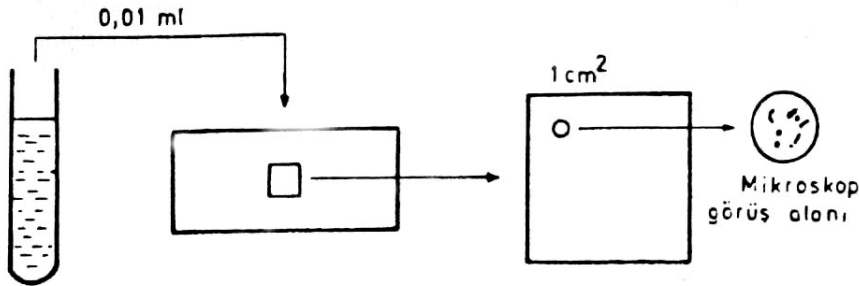
bulunur. Konstant, Thoma lamında 10.000, Petroff - Housser lamında ise 50.000'dir. Aradaki 5 misli fark Petroff - Hausser laminın Thoma lamından 5 misli daha ince olmasından ileri gelmektedir.

Hareketli bakterilerin özel lamlar kullanılarak yapılan sayımında önce bakterilerin hareketlerinin önlenmesi gerekir. Aksi halde aynı bakteri 1'den fazla kez sayılabilir. Bu nedenle hareketli bakteriler lama aktarılmadan önce kültürün viskozitesinin artırılması gerekir. % 0,1 agar, %30 gliserin, % 4 polyvinil alkol çözeltilerinden bakteri kültürüne bir kaç damla damlatılması bakterilerin hareketini engeller. Aynı şekilde kültür süspansiyonu içine % 1'lik merthiolate veya formalin katılması bakterileri öldüreceğinden hareket önlenmiş olur.

04. Breed Yöntemi

Genellikle bakteri sayımında kullanılan bu yöntemin esası; belli bir hacmin (genellikle 0,01 ml) 1 cm² alan üzerine yayılması ve sayımın bu alanda yapılmasıdır (Şekil 3.5). 0,01 ml 'yi doğru bir şekilde pipetlemek klasik cam pipetlerle mümkün olamamaktadır. Özel yapılmış mikropipetler bu amaçla en doğru ölçümü verirler. Bunun dışında yüzeyde sayım yöntemleri kısmında belirtildiği şekilde, Pastör pipeti de kullanılabilir. Ancak, Pastör pipeti kullanıldığında hesaplamalarda değişiklik olacağı gözden uzak tutulmamalıdır.

Breed yönteminde önce mikroskop görüş sahasının alanı bulunur. 1 mikroskop görüş sahasında bulunan bakteri sayısının 1 cm³, dolayısı ile 0,01 ml'de ne olacağı orantı yolu ile hesaplanır. En son olarak sonuç 100 ile çarpılarak 1 ml'deki standart sayım sonucu elde edilir.



Şekilde görüldüğü gibi 0,01 ml kültür çözeltisi 1 cm² alan üzerinde yayılıp, kurutulmuş ve preparat boyanmıştır. 1 mikroskop görüş sahasında (S) 3 adet bakteri sayıldığında;

S cm² de 3 bakteri varsa

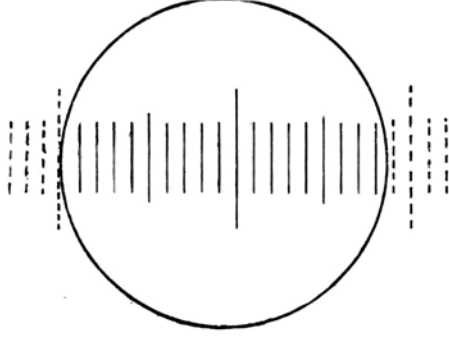
1 cm² de x adet bakteri olacaktır. Buradan,

$x = 1 \times 3 / S$ adet/cm² sonucu elde edilir.

04.01. Mikroskop görüş sahası alanının hesaplanması

Objektif mikrometre adı verilen ve 10 µm aralıklarla çizilmiş çizgileri bulunan özel bir lam yardımı ile yapılır. Bunun için, objektif mikrometre mikroskop tablasına yerleştirilir ve sedir (immersion) yağı damlatıldıktan sonra 100'lük objektif kullanılarak mikrometre çizgileri bulunur. Çizgilerin ortasından geçirilen hayali bir eksen görüş sahasının çapına denkleştirilir ve çap objektif mikrometre aralıkları cinsinden ölçülür. Ölçümün kolay olmasını sağlamak

için 10 çizgide bir olan uzun çizgi, görüş sahasına teğet getirilir. Örneğin şekilde verilen mikroskop görüş sahası çapında 18 adet tam aralık bulunmaktadır. Son çizginin sağında kalan aralığın ise 0,7 aralık olduğu tahmin edilmektedir. Dolayısı ile bu mikroskop görüş sahasının çapı; $18,7 \text{ aralık} \times 10 \text{ } \mu\text{m} = 187 \text{ } \mu\text{m}$ dir.



Objektif mikrometre ile görüş sahası çapı ölçüldükten sonra görüş sahası alanı hesaplanır. Örneğimizde $\text{çap} = 187 \text{ } \mu\text{m}$, $\text{alan} = \pi r^2 = 3,14 \times 93,5^2 = 27.465 \text{ } \mu\text{m}^2$ 'dir. Görüş sahası alanı bir kez hesaplanıp kaydedildikten sonra;

- a) objektif değiştirilmezse,
- b) Oküler değiştirilmezse,
- c) mikroskopun tüp boyu değiştirilmezse tekrar ölçülmesine, gerek kalmaz, aynı alan her sayım için kullanılır.

Bunun yanında 10 büyütme güçlü oküler, 100 büyütme güçlü objektif ve standart 160 mm tüp boyu kullanılsa dahi her mikroskopta farklı bir görüş sahası elde edilebileceği unutulmamalıdır.

04.02. Sayımın yapılması

Yukarıda da belirtildiği gibi, Breed yöntemi bakteri sayımında ve özellikle sütlerde bakteri sayısının bulunmasında kullanılmaktadır. Sütte bakteri sayısının bulunması için kullanılan yöntem aşağıda açıklanmıştır.

a) 0,01 ml süt örneği temiz bir lam üzerine aktarılır. 0,01 ml'ye ayarlı özel mikropipet, kullanılmıyor ise pipetlemeye özen gösterilmelidir. Bu amaçla normal 0,1'lik pipet sıfırlandıktan sonra pipetin ucunda sıvı kalmamasına özen gösterilmelidir.

b) 1 cm² 'lik bir kâğıt yapıştırılmış bir başka lam, sütün aktarıldığı lamın altına konularak 1 cm² 'lik alan belirlenir, aşı iğnesi kullanılarak 0,1 ml süt 1 cm² alana tam olarak yayılır ve kuruması beklenir.

c) Bu şekilde hazırlanan lam, içinde ksilol bulunan bir behere çaldırılıp 60 saniye beklenir. Ksilol sütteki yağı eritir, ayrıca bakterilerin suyunu çekerek lama yapışmalarını sağlar. Bir diğer deyiş ile fiksasyon (tespit) ksilol ile yapılmış olur.

d) Lam, bu kez içinde % 76'lık alkol bulunan bir başka behere 60 saniye süre ile daldırılır. Alkol, ksilol'un temizlenmesi, lamdan uzaklaştırılması için kullanılır.

e) Lam, su ile yıkanarak alkol uzaklaştırılır. Yıkama sırasında suyun yüksek basınç ile süt üzerine gelmesinden kaçınılmalıdır. Aksi halde, ince bir film tabakası şeklinde olan süt, yüksek su basıncı ile tabaka halinde lam üzerinden kalkabilir.

f) Metilen mavisi ile 30 saniye boyanır. Boyama fazla olursa yine alkole daldırılıp dekolore edilir, yani renk açılır.

g) Yine su ile yavaşça yıkanıp kurutulur. Sedir yağı damlatılıp, 100'lük objektif ile sayım yapılır.

Sayım sırasında en çok yapılan hatalar; zincir şeklinde görülen bakterilerde zinciri oluşturan her bakterinin ayrı ayrı sayılması ve hiç bakteri olmayan sahaların dikkate alınmamasıdır.

Sayımda zincir oluşturan bakteri (streptokok, streptobasil) zincirlerinde her zincir 1 olarak sayılır. Zincirdeki bakteri sayısı önemli değildir. İster kısa ister uzun zincir olsun her zincir 1 adet olarak sayılmalıdır. Şekilde verilen görüş sahasındaki bakteri sayısı 5 olarak değerlendirilmiştir.



Zincirlerin 1 adet olarak sayılmasının nedeni, kültürel sayım ile bir özdeşleştirmedir (zinciri oluşturan bakteriler canlı olup kültürel sayıma alınsa idi, bu zincir 1 tek koloni oluşturacaktı).

Breed sayım yönteminde sadece 1 saha sayılıp sonuç hesaplanmaz, bakteri sayısına göre değişmek üzere pek çok sahada sayım yapıp ortalama alınır.

Bu farklı sahaların sayımı sırasında bakteri görülmeyen sahalar 0 adet olarak değerlendirilmelidir. Çizelgede bakteri yüküne ve mikroskop faktörüne göre sayılması gereken saha adedi verilmiştir.

Çizelge. Breed yönteminde sayılması gereken saha adedi

Bakteri Sayısı/ml	Mikroskop Faktörü			
	3000	4000	5000	6000
30.000 - 300.000	30	40	50	60
300.000 - 3.000.000	20	20	20	30
>3.000.000	10	10	10	20

Breed yönteminde 1 ml 'deki bakteri sayısı; $A \times MF \times 100$ formülü ile bulunur. A; farklı sahalarda yapılan sayımların ortalaması, MF; mikroskop faktörü, 100 ise 0,01 ml 'deki sayının 1 ml 'ye çevrilmesi için kullanılan bir değişmezdir.

04.03. Mikroskop Faktörünün Hesaplanması

Mikroskop sahasının alanı hesaplandıktan sonra, 1 cm² 'lik alan içinde kaç adet görüş sahası bulunduğu, yani mikroskop faktörü hesaplanır. Yukarıdaki örnekte görüş sahasının alanı 27465 µm² olarak bulunmuş idi. Mikroskop faktörü 1 cm² alan içindeki görüş sahası adedidir. Buna göre verilen örnek için $1 \text{ cm}^2 / 27465 \text{ µm}^2 = 3641$ adet mikroskop görüş sahası vardır (1 cm² = 10⁸ µm²)

Mikroskop faktörü (1 cm² alan içinde kaç adet görüş sahası olduğu) standart 10 büyütmeli oküler, 100 büyütmeli objektif ve 160 mm tüp boyu kullanıldığında genellikle 2500-5500 arasında hesaplanır. Bu sınırların çok dışında bir değer elde edildi ise, hesaplamalar gözden geçirilmelidir.

Sayımı yapılacak süt içindeki muhtemel bakteri sayısına göre değişmek üzere, farklı mikroskop görüş alanlarında (sahalarda) yapılan sayım ortalamasının 1,2 bakteri/saha olduğunu varsayalım. Buna göre 1 cm² alan içinde yukarıda verilen örnekte 3641 adet mikroskop görüş sahası olduğuna göre 1 ml 'deki bakteri sayısı : $1,2 \times 3641 \times 100 = 4,4 \times 10^5$ adet/ml 'dir.

Bu aşamaya kadar verilen örnekler 0,01 ml süt örneğinin sayımı için verilmiştir. Yukarıda, Pastör pipeti ile de belli bir miktar sütün lamı üzerine aktarılabilmesine değinilmiş idi. Aşağıda Pastör pipeti için bir örnek verilmiştir.

20 saha ortalaması = 1,4 adet.

Mikroskop faktörü = 3678

Pastör pipetinde 1 damla hacmi = 0,0023 ml

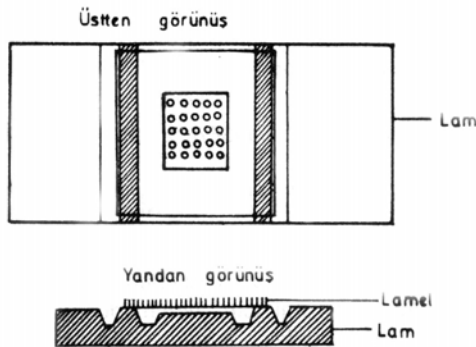
1 ml içindeki damla sayısı = $1/0,0023 = 435$

1 ml 'deki bakteri sayısı = $1,4 \times 3678 \times 435 = 2,2 \times 10^6$ adet/ml.

05. Howard Lamı ile Küflü Saha Sayımı

Domates ve diğer meyve ürünlerinde bulunan küf filamentlerinin sayısı, bu ürünlerin elde edilmesi sırasında küflü parçaların da üretime dâhil edildiğini gösterdiği için, hammaddenin kalitesi hakkında önemli ipuçları vermektedir. Aynı şekilde tereyağında küfe rastlanması da küflü krema kullanıldığını kanıtlar. Bu kısımda sadece domates ürünlerindeki küflü alanların incelenmesi anlatılacaktır.

Domates suyu orijinal haliyle incelenemediği halde, salça gibi koyulaştırılmış ürünlerinin steril destile su ile seyreltilmeleri gerekir. Seyreltme oranı, eğer daldırmalı refraktometre kullanılıyorsa 20 °C 'da 45,0 - 48,7 olacak şekilde, refraktif indeks olarak yine 20 °C 'da 1,3447 - 1,3460 değerleri arasında olmalıdır. Bu taktirde kuru madde oranı % 8-9 olur.



Bu şekilde hazırlanan preparat, görüş alanı 1,5 mm² olacak şekilde ayarlı bir mikroskop ile incelenir. Tam bu şekilde ayarlı bir mikroskop ile yapılan her bir gözlemde, 0,15 mm³'lük bir örnek hacmi incelenebilmektedir. Bu amaçla 90-125 X bir büyütme kullanılır (10 X oküler ve 10 X objektif ile 100 X büyütme elde edilir). Eğer küf filamentleri fark edilemiyor ise 200 X büyütme kadar çıkılabilir.

Sayım işleminde şekilde görülen Howard lamı ve lameli kullanılmaktadır. Howard lamı, üzerine lamel kapatıldığında arasında Newton halkası oluşacak şekilde temiz olmalıdır. Lam üzerine bir cam baget yardımı ile örnek konulup, üzeri özel lamel ile kapatılır. Materyalin lam sayım yüzeyinde uniform bir şekilde dağılmasına ve sayım alanını dolduracak kadar örnek alınmasına dikkat edilmelidir. Materyal yeknesak dağılım göstermiyorsa veya lam ile lamel arasında Newton halkası oluşmamışsa veya örnek çukurdan dışarı ve lamel üzerine taşmışsa bu preparat kullanılmaz, yenisi hazırlanır. Newton halkası, iki cam eğer çok temizse birbirini üzerine konulduğunda renkli halkalar oluşması halidir.

Alan ayarlaması tüp boyu değiştirilerek yapılır, ancak bu her mikroskopta mümkün olmadığı için alan belirlemesi, lam üzerine konulan ve 1,5 mm²'lik yuvarlak alanları işaretlenmiş özel bir lamel yardımı ile gerçekleştirilebilir.

İncelenecek örneği temsil edecek şekilde hazırlanan iki veya daha fazla örnekte en az 25'er saha sayılıp pozitif saha sayısı tespit edilir. Eğer saha içinde üçten daha fazla filament varsa

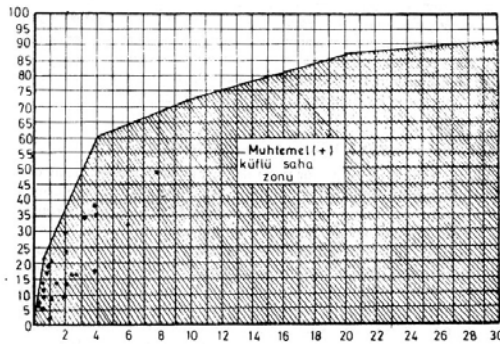
veya üçten daha az sayıdaki filamentlerin toplam uzunluğu görüş sahası çapının 1/6'sından daha fazla ise, bu görüş sahası (+) olarak değerlendirilir.

Ketçap inceleneceğinde bu ürün % 0,5'lik, sodyum –karboksimetil -selüloz, % 3-5'lik pektin veya % 1'lik algin çözeltilerinden biri ile 1:1 oranında seyreltilerek stabilize edilir.

Sayım sonucu elde edilen pozitif saha sayısından yararlanılarak yüzde pozitif saha sayısı hesaplanabilir. Buna göre;

$$\text{Pozitif saha sayısı} = (\text{Pozitif sahalar sayısı} \times 100) / \text{Sayılan toplam saha sayısı}$$

Howard lamı ile bulunan değer, ürünlerdeki küf miktarını doğrudan göstermez. Örneğin, % 20 pozitif saha hiç bir şekilde üründe % 20 oranında küf olduğunu değil, Howard lamı ile yapılan sayım sonucuna göre % 20 oranında küflü saha olduğunu belirtir. Bununla beraber yüzde küflü saha oranı, üretim sırasında kullanılan hammaddede hangi oranda küflü domates olduğu hakkında bir ön bilgi verebilir.



Şekle göre, örneğin Howard lamında % 60 (+) saha görüldü ise hammaddede ağırlığa göre en az % 4 küflü domates kullanıldığı anlaşılır. Bir diğer yaklaşımla, ağırlığa göre % 4 küflü domates içeren hammaddeden işlenen üründe Howard yöntemi ile en çok % 60 (+) saha elde edilebilir.

06. Fluoresant Mikroskopî Yöntemleri

Kısa dalgalı ışınlar maruz bırakılan çeşitli maddeler uzun dalgalı fluoresans ışığı yayarlar. Bu özellik, mikroskopik analizlerde kullanılmaktadır. Fluoresant mikroskopunda basit ışık mikroskopundan farklı olarak; yüksek basınçlı cıva lambası ile elde edilen kuvvetli bir ışık kaynağı, (örneğin, 200 W HBO - 200, Osram lambası), kaynaktan çıkan ışınlar için iyi geçirgen bir kondensör, iz halinde bile kırmızı ışık geçmesine izin vermeyen, sadece 420 nm dalga boyunda mavi ışığın geçmesine izin veren kondensör önüne yerleştirilen kaynak filtresi ve oküler önüne yerleştirilen, kaynaktan çıkan fazla ışınları elimine edecek bir koruma filtresi bulunmaktadır.

İmmersiyon yağı hem objektif ile preperat arasına, hem de preperat ile kondensör arasına konulmalıdır. İmmersiyon yağı, fiksasyon ve diğer hazırlık materyali fluoresandan arındırılmış olmalıdır.

Canlı boyama denemelerinde acridin orange, coriphosphin, rhodamin B, primulin ve fluoressin - diasetat gibi fluoresans boyaları (fluorochrome) kullanılmakta olup bunlar canlı hücrelere zarar vermeyecek kadar düşük konsantrasyonlarda (<% 0,005) kullanılmalıdır. Acridin orange boyası, ölü hücrelerde canlılardan daha fazla depolandığı için ölü ve canlı hücrelerin ayrımında kullanılabilir. Akridin oranj katyonları düşük konsantrasyonlarda yeşil, yüksek konsantrasyonlarda açık kırmızı fluoresans verir.

Bir su örneğinin floresant mikroskobu ile incelenmesi, aşağıda belirtilen 4 basamakla mümkün olur:

- 1) Su örneği, önceden membran filtreden geçirilmiş son konsantrasyonu % 38'lik formaldehit çözeltisinden % 5 oranında hazırlanmış formalin çözeltisi ile fikse edilir, bu şekilde hazırlanan örnekten 0,5-3,0 ml alınıp NaHCO₃ ile tamponlanmış ve pH'sı 8,3 olan membran filtreden geçirilmiş acridin orange çözeltisi (son konsantrasyonu 5 -10 mg/l) ile 3-5 dakika süre ile boyanır.
- 2) Boyanmış örnek 0,2 - 0,45 µm gözenekli siyah bir membran filtreden geçirilir ve 5 ml steril filtreden geçirilmiş örnek suyu ile veya deniz suyunun incelenmesinde olduğu gibi destile su ile yıkanır.
- 3) Islak örnek filtresinin iki tarafına da floresans içermeyen bir immersiyon yağı damlatılarak lam üzerine konulup onun üzeri de lamelle kapatılır.
- 4) Bu şekilde hazırlanan preparat basit ışık kondenseri, 200 W'lık ışık kaynağı, KG-1, K 480 ve 2 adet KP 490 filtrelerinden oluşan kaynak filtre sistemi ve TK510 veya K 515 tipi koruma filtresi kullanılarak incelenir. Her bir mm²'de 200-2000 adet bakteri bulunan preparatlar bu şekilde sayılabilirler.

Floresant mikroskop tekniğinin kullanıldığı bir diğer alan küf sayımıdır. Howard sayım yöntemine alternatif olarak, direk epifloresant filtre tekniği, biyoluminesens (ATP ölçümü) tekniği ve kitin ölçüm tekniği gibi yöntemler de geliştirilmiş olmakla beraber, bunlardan kitin ölçüm deneyi 8 saat gibi oldukça uzun bir süre aldığı, ATP ölçüm tekniği ise ısı işlemi uygulanmamış ürünler ile uygulanmışlar arasında farklı sonuç verdiği için, yaygın bir kullanım alanı bulamamışlardır.

Buna karşın direk epifloresant filtre (DEFT) tekniği ısı işlem görmüş ve görmemiş domates konsantrelerindeki küf, maya ve bakteri sayımları için uygun bulunmuştur. Bu yöntemle bulunan değerler, Howard küf sayım yöntemi ile elde edilenlerden daha hassas ve analiz hatalarını daha fazla ortadan kaldırıci niteliktedir. Öte yandan bu yöntemle, küflere ilave olarak maya ve bakteri gibi diğer bozulma etmenlerinin de aynı anda sayılması mümkündür.

DEFT yönteminde örnek içindeki mikroorganizmaları elde etmek ve konsantrasyonunu artırmak amacıyla membran filtrasyonu uygulanır, filtre üzerinde kalan mikroorganizmaları incelemek üzere floresant boyaması yapıp, epifloresant mikroskobunda sayım gerçekleştirilir.

Küf, maya ve bakteri sayımında sırasıyla 10 X, 40 X ve 100 X objektifler kullanılır. Floresans veren mikroorganizmaların hepsi sayılıp ortalama değerler elde edilir ve buradan 1 ml örnekteki sayı Breed yönteminde ve membran filtre yönteminde olduğu gibi hesaplanır. Boyamalarda yaygın olarak fluorescein isothiocyanate boyası kullanılır.