

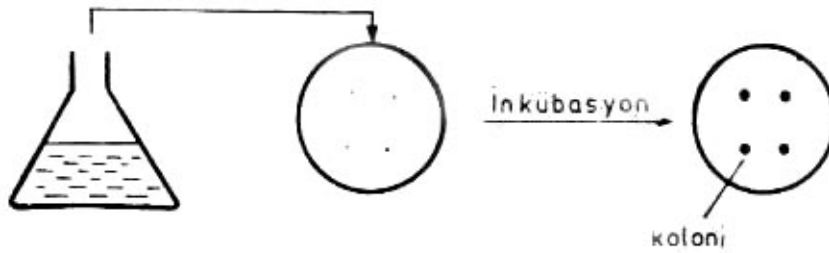
Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler ¹

Velittin GÜRGÜN, A. Kadir HALKMAN

01. Genel Bilgiler
02. Dilüsyon (Seyreltme)
 - 02.01. Seyreltmede 1: 9 Oranı
 - 02.02. Dilüsyonda Kullanılan Çözeltiler
03. Besiyerine Ekim ve İnkübasyon
04. Koloni Sayımı ve Değerlendirme
 - 04.01. Petri Kutularının Yazımı
 - 04.02. Ekim Yapılacak Dilüsyonların Seçilmesi
 - 04.03. Sayım Sırasında Karşılaşılabilecek Özel Durumlar
05. Dökme Kültürel Sayım Yöntemi
06. Yüzeyde Kültürel Sayım Yöntemleri
 - 06.01. Yayma Kültürel Sayım Yöntemi
 - 06.02. Damlatma (Damla Kültür) Yöntemi
07. Spor Sayımı
08. Anaerob Bakterilerin Sayımı
09. Bakteriyofaj Sayımı
 - 09.01. Çift Tabaka Ekim Yöntemi
 - 09.02. Rutin Test Dilüsyonu (RTD) Yöntemi

01. Genel Bilgiler

Katı (agarlı) besiyerinde sayım, canlı hücrelerin koloni oluşturması ve bu kolonilerin sayılarak «her canlı hücre 1 koloni oluşturur» prensibi ile materyaldeki canlı hücre sayısının hesaplanması esasına dayanır. Bu amaçla sayım yapılacak materyalden belirli bir miktar alınır ve besiyerine aktarılır. Koloni oluşması için gerekli inkübasyon süresinin sonunda Petri kutusundaki koloniler sayılarak materyaldeki canlı hücre sayısı hesaplanır. Ölü hücreler üreyip koloni meydana getiremeyeceği için bu yöntemde sadece canlı hücreler sayılır. Yöntemin prensibi aşağıdaki şekilde açıklanmıştır.



Sayım sonuçları standartlığın sağlanması amacıyla sıvı materyaldeadet/ml, katı materyaldeadet/g şeklinde verilmelidir. Şekilde materyalden 1 ml alınıp Petri kutusundaki besiyeri ile karıştırılmış, inkübasyondan sonra Petri kutusunda oluşan koloniler sayılmıştır. Petri kutusunda oluşan koloniler sayılmıştır. Petri kutusunda 40 koloni sayılırsa doğrudan

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

doğruya sayım sonucu 40 adet/ml şeklinde verilir. Pek çok literatürde katı besiyerinde yapılan sayım sonuçları «koloni oluşturan birim (colony forming unit: cfu)» olarak verilir. Bunun nedeni sayımı yapılan materyalde canlılığını sürdüren ancak gelişme ve çoğalma yeteneğini yitirmiş, dolayısı ile koloni oluşturamayacak hücrelerin de bulunabilmesidir. Koloni oluşturan birim deyimini ile bu tip hücrelerin sayılmadığı/sayılamadığı belirtilmektedir.

İleride yüzeyde kültürel sayım yöntemleri kısmında anlatılacağı gibi, bazı hallerde materyalden 0,1 ml 'nin Petri kutusuna aktarılması gerekir. İnkübasyondan sonra Petri kutusunda yine 40 koloni sayılırsa, bu sadece 0,1 ml materyaldeki sayıyı belirtir. Dolayısı ile;

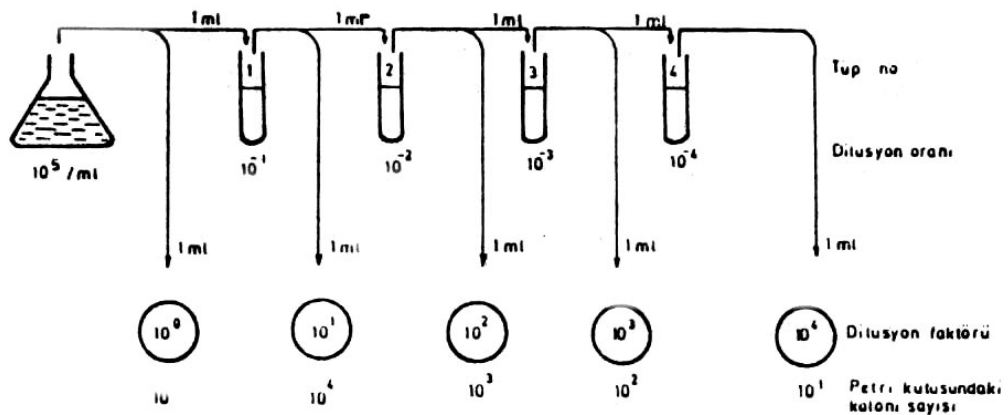
0,1 ml materyalde 40 canlı hücre varsa
1 ml materyalde x canlı hücre vardır

$x = (40 \times 1) / 0,1 = 400$; 400 adet/ml canlı hücre olduğu sonucuna varılır.

02. Dilüsyon (Seyreltme)

İstatistiksel bir kural olarak dökme ve yayma kültürel sayım yöntemlerinde bir Petri kutusundaki koloni sayısının 30 -300, damla kültür yönteminde ise her damlada 10 -30 arasında bulunması gerekir. 1 g yoğurda 10^8 adet canlı bakteri olduğu varsayılırsa, 1 g yoğurdu doğrudan Petri kutusuna alınması halinde 10^8 sayıda koloni oluşacaktır. Bu kadar fazla sayıda koloninin Petri kutusunda sayılması olanaksızdır. Bu gibi canlı mikroorganizma sayısı yüksek olan örneklerde sayım, dilüsyon (seyreltme) tekniği ile yapılır.

Dilüsyon tekniğinin esası, materyaldeki hücre sayısını bir seri seyreltme yaparak kademeli bir şekilde azaltmaktır. Bu amaçla genellikle 1:9 (10 misli) oranında seyreltme yapılır. Şekilde yöntemin prensibi basit olarak gösterilmiştir.



Materyalin 1 ml sinde 50.000 canlı hücre olduğunu varsayalım. İçinde 9 ml steril fizyolojik tuzlu su (FTS: % 0,85 NaCl içeren destile su) bulunan 1 nolu tüpe materyalden 1 ml aktarılır. Bu tüp içindeki FTS, steril olduğu için canlı hücre sayısı 0 'dır. 1 ml materyal aktarıldığında 1 nolu tüpteki toplam hacim $9 + 1 = 10$ ml olur. Materyalin her 1 ml' sinde 50.000 canlı hücre olduğuna göre bu tüp içinde 50.000 canlı hücre olacaktır.

Aktarım sonunda 1 nolu tüpteki 10 ml içinde 50.000 canlı hücre, bir diğer deyiş ile bu tüpteki her 1 ml içinde $50.000 / 10 = 5.000$ adet canlı hücre bulunacaktır. Görüldüğü gibi 1 nolu tüpteki canlı hücre sayısı materyale göre 10 kez azalmıştır. 1 nolu tüpün her 1 ml'inde 5.000 adet canlı hücre bulunduğuna göre bu tüpten içinde yine steril 9 ml FTS bulunan 2 nolu tüpe 1 ml aktarıldığında, bu kez 2 nolu tüp içinde $9 + 1 = 10$ ml; $5.000 \text{ adet} / 10 \text{ ml} = 500 \text{ adet} / \text{ml}$ canlı hücre olacaktır. 2 nolu tüpten 3 nolu tüpe yine 1 ml aktarıldığında, 3 nolu tüpte $500 \text{ adet} / 10 \text{ ml} = 50 \text{ adet} / \text{ml}$ canlı hücre bulunacaktır.

Bu şekilde 1 nolu tüp, materyale göre 10 kez; 2 nolu tüp 1 nolu tüpe göre 10 kez, materyale göre 100 kez; 3 nolu tüp ise materyale göre 1000 kez daha az sayıda canlı hücre içerecektir.

Burada tüp numarası 10 üssü olarak materyale göre seyreltme oranını göstermektedir. (Örneğin 2 nolu tüpteki canlı hücre sayısı materyale göre 10^2 kez seyrelmiştir, yani azalmıştır).

Görüleceği gibi, dilüsyon tekniği ile bir seri tüp kullanarak tüplerdeki canlı hücre sayısı giderek 10'ar misli seyreltilmekte ve yukarıdaki örnekte 3 nolu tüpte sayılabilecek kadar azalmaktadır. Nitekim 3 nolu tüpten dökme kültürel sayım yöntemi ile 1 ml alındığında, Petri kutusunda inkübasyon sonunda 50 koloni oluşması beklenir. Benzer şekilde 1 nolu tüpten yapılan 1 ml ekim sonunda 5.000, 2 nolu tüpten 500, 4 nolu tüpten 5 koloni oluşması beklenir. Bir diğer deyiş ile dilüsyonun amacı Petri kutusunda 30 -300 arasında koloni elde edilecek şekilde ekimin yapılmasıdır.

02.01. Seyreltmede 1: 9 Oranı

Hesaplamalarda kolaylığın ve standartlığın sağlanması amacı ile dilüsyon genellikle 1:9 oranı ile yapılır. Bu, 1 birim örnek + 9 ml FTS (veya başka bir steril dilüsyon çözeltisi) demektir. Toplam 10 birim hacmin 1 birimi materyalden (ya da 1 önceki dilüsyon tüpünden) gelmektedir. 1:9 oranında dilüsyon, materyaldeki sayının, 10 'un katları şeklinde azalmasını sağlar.

Bazı analizlerde belirli bir miktar (10 ml, 25 g vb) orijinal materyal kullanılması gereklidir. Özellikle kullanılan örneğin temsil gücünü artırmak amacı ile fazla miktarda materyal alınır. Bu gibi hallerde yine 1: 9 oranı korunur.

Örnekler

-Katı materyal 25 g'dır. İlk dilüsyonu (10^{-1}) yapmak için ne kadar FTS kullanılmalıdır?

Çözüm:

1 g için	9 g FTS kullanılırsa
25 g için	x=225 g FTS kullanılır

$225 + 25 = 250$ g toplam ağırlık içinde 25 g orijinal materyalden gelmiştir. Bir diğer deyiş ile örnek, $25/250 = 1/10$ kez seyreltilmiştir.

-Analize alınacak olan sıvı materyal 5 ml 'dir. İlk dilüsyon için (10^{-1}) ne kadar FTS gereklidir?

Çözüm: $5 \times 9 = 45$ ml

$45 + 5 = 50$ ml hacim içinde, 5 ml materyalden gelmiştir. Materyal $5/50 = 1/10$ kez seyreltilmiştir.

Bazı durumlarda laboratuvara analiz için gelen materyal çok az miktarda olabilir. Aşağıda bu hallerde izlenecek yöntemle ilgili örnekler verilmiştir.

-Katı materyal 0,2 g 'dır. İlk dilüsyon için ne kadar FTS gerekir?

Çözüm: $0,2 \times 9 = 1,8$ ml

10^{-1} dilüsyonu yapmak için 0,2 g materyal 1,8 g (1,8 ml) FTS ile karıştırılır, sonra bundan 1 ml alınarak 9 ml FTS bulunan 2 nolu tüpe, buradan 3 nolu tüpe aktarılarak dilüsyon devam ettirilir. Analiz sonucu yine adet/g olarak verilir.

-Sıvı materyal 0,1 ml 'dir. İlk dilüsyon için ne kadar FTS gerekir?

Çözüm: Burada eğer sadece 10^{-1} dilüsyondan ekim yapılacaksa doğrudan doğruya $0,1 \times 9 = 0,9$ ml FTS orijinal örneğe ilave edilip Petri kutusuna aktarılır. Ancak 10^{-1} dilüsyon değil de materyaldeki mikroorganizma yüküne göre 10^{-3} , 10^{-4} gibi yüksek dilüsyonlu tüplerden ekim yapılacak ise bu defa 0,1 ml üzerine 9,9 ml FTS ilave edilerek doğrudan 10^{-2} dilüsyon yapılmış olur. Alt dilüsyon, üst dilüsyon, düşük dilüsyon, yüksek dilüsyon kavramları çoğu kez karıştırılabilmektedir. 10^{-4} dilüsyona göre 10^{-3} düşük (alt) dilüsyon, 10^{-5} ise yüksek (üst) dilüsyondur.

02.02. Dilüsyonda Kullanılan Çözeltiler

Dilüsyon sırasında kullanılan çözeltinin canlı mikroorganizma sayısını azaltacak ya da artıracak kimyasal maddeleri içermemesi gerekir. Bu düşünce altında, dilüsyonda kullanılması için ilk akla gelen çözelti destile sudur. Bununla beraber, destile su ozmotik basınç farklılığı nedeni ile canlı hücrelerin ölmesine yol açabilir.

Dilüsyonda en yaygın olarak kullanılan çözelti % 0,85 NaCl içeren fizyolojik tuzlu sudur. FTS 'nin ozmotik basıncı mikroorganizmaların ozmotik basıncına eşit ya da çok yakındır. % 0,85 NaCl yerine % 0,9 oranı ile de FTS hazırlanabilir.

FTS 'nin dışında % 0,1 'lik peptonlu su, % 2 'lik sodyum sitratlı su, ringer çözeltisi, tamponlanmış fosfat çözeltisi de kullanılabilir. Bunlardan peptonlu su, oda sıcaklığında uzun sürede mikroorganizmaların gelişmesine neden olabilir. Bu nedenle, dilüsyonda peptonlu su kullanıldığında ilk dilüsyon ile Petri kutularına ekim arasında 20 dakikadan fazla süre geçmemesi gerekir.

03. Besiyerine Ekim ve İnkübasyon

Dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra besiyerine ekim yapılır. Eğer materyaldeki mikroorganizma yükü tahmin edilebiliyorsa, tüm dilüsyonlardan ekim yapmaya gerek yoktur.

Aşağıda, besiyerine ekim ve İnkübasyon sırasında dikkat edilmesi gereken genel hususlar belirtilmiş olup, yöntemlere göre besiyeri hazırlığı ile ilgili gerekli bilgiler kendi kısımlarında verilmiştir.

-Standart 9 cm çaplı Petri kutusu için yaklaşık 15 ml besiyeri hesaplanır. Besiyeri miktarı sayım için önemli değildir. Sadece iyi bir koloni gelişmesi için yaklaşık 15 ml besiyeri gereklidir.

-Petri kutularına dökülecek olan besiyeri fazla miktarda hazırlanacak olursa, dökme işi hem rahat yapılamaz, hem kontaminasyon (bulaşma) olasılığı artar. Bu nedenle 1 litre besiyeri gerekli ise, bunun 4 adet 250 ml şeklinde hazırlanması önerilir. Bu şekilde otoklavda sterilizasyon da daha güvenli olur.

-Düşük sayıda bakteri içeren gıda maddelerinde kuşkusuz düşük dilüsyonlar kullanılacaktır. Bazı gıda maddelerinin düşük dilüsyonlarından ekim yapıldığında, Petri kutusuna bir miktar gıda maddesi de geçeceğinden bu, daha sonra oluşan koloniler ile karıştırılabilir. Bu sorun çoğu kez 100 ml agarlı besiyerine 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC)'in % 0,5 'lik (w/v) çözeltisinden 1 ml katılması ile giderilebilir. Pek çok bakteri, TTC içeren agarlı besiyerinde kırmızı pigmentli koloni oluşturur. TTC 'nin olumlu etkisi önceden kontrol edilmelidir. TTC çözeltisi, filtrasyon tekniği ile sterilize edilir ve Petri kutularına dökülmek üzere 45 °C 'a kadar soğutulmuş agarlı besiyeri üzerine ilave edilir. TTC yüksek sıcaklıkta ve ışıpta bozulur.

-İnkübasyon sırasında ortamın aşırı nemli veya aşırı kuru olmasından kaçınılmalıdır. Bu amaçla Petri kutuları inkübatöre hava sirkülasyonu sağlanacak şekilde yerleştirilmeli, 6'dan fazla Petri kutusu üst üste konulmamalıdır.

-Ekimi yapılacak dilüsyonlar seçildikten sonra sayım sonuçlarının güvenilirliğini artırmak için aynı tüpten 2 ya da tercihen 3 Petri kutusuna ekim yapılır (2 paralelli, 3 paralelli ekimler). Sayım sonuçları paralel ekim sonuçları ortalaması olarak verilir.

-Mikroorganizmalar FTS içinde 30 dakikadan fazla bırakılmamalı, ekim işlemi elden geldiği kadar çabuk olarak tamamlanmalıdır. Bu süre çoğu kez 20 hatta 10 dakika olarak önerilmektedir.

-Bazı besiyerlerinin bileşiminde CaCO_3 bulunur. CaCO_3 suda erimediğinden, döküm anında dağılmayı sağlamak için, besiyerini sürekli karıştırmak gerekir. Bu işlem besiyeri bulunan kapta el ile yapılırsa hava kabarcıkları oluşabilir ve Petri kutusuna geçen bu kabarcıklar sayımın iyi yapılamamasına yol açabilir. Bu nedenle, bileşiminde CaCO_3 bulunan besiyerinin içine sterilizasyon öncesi üzeri teflonla kaplanmış bir mıknaş atılıp dökümden hemen önce manyetik karıştırıcı ile yavaşça karıştırılmalı, CaCO_3 besiyeri içine homojen bir şekilde dağıldığında döküm yapılmalıdır. Yine bu tip besiyerleri kullanılacağına, Petri kutuları dökümden önce soğutularak çabuk katılaşma (donma) sağlanacağından besiyeri içinde bulunan CaCO_3 da yeknesak bir şekilde dağılır. Bir diğer deyiş ile besiyeri Petri kutusuna döküldüğünde CaCO_3 dibe çökmeden hızlı bir katılaşma sağlanmalıdır.

-Ekim bitirildikten sonra vakit kaybetmeden Petri kutuları inkübasyona bırakılmalıdır. İnkübatöre Petri kutuları, kapakları alta gelecek şekilde yerleştirilir. Bunun amacı, oluşan su buharlarının yoğunlaşınca besiyeri üzerine değil kapağa damlamasının sağlanmasıdır. Aksi halde (kondens suyunun besiyeri üzerine damlaması halinde) olduğundan fazla sayıda ve/veya büyük koloni oluşarak sayım hataları ortaya çıkabilir.

-İnkübasyon süresi sayımın sağlıklı yapılmasında en önemli faktörlerden birisidir. Gereğinden uzun ya da kısa inkübasyon süreleri sayımda yanıltıcı sonuçların alınmasına yol açabilir. İnkübasyon bittiğinde Petri kutularında oluşan kolonilerin hemen sayılması önerilir.

Bununla beraber herhangi bir nedenle koloniler hemen sayılamıyorsa Petri kutuları en çok 24 saat süre ile buzdolabında (+ 4 °C) depolanabilir.

04. Koloni Sayımı ve Değerlendirme

Yukarıda dilüsyona neden gerek duyulduğu ve işlemin nasıl yapıldığı anlatılmıştır. Bu kısımda ise, farklı dilüsyon tüplerinden elde edilen koloni sayılarının değerlendirilmesi irdelenecektir.

3 nolu dilüsyon tüpünden (materyale göre 10^3 kez seyreltilmiş olan tüpten) Petri kutusuna 1 ml aktardığımızı ve İnkübasyon sonunda 50 koloni oluştuğunu varsayalım. 50 koloni, 3 nolu tüpün 1 ml'indeki canlı hücre sayısını göstermektedir. 3 nolu tüp, materyale göre 1000 kez seyreltilmiş olduğundan materyaldeki canlı hücre sayısı $50 \times 1000 = 50.000$ adet/ml (veya katı materyal ise 50.000 adet/g) 'dir.

Eğer 3 nolu tüpten 1 ml yerine Petri kutusuna 0,1 ml pipetlense ve inkübasyon sonunda yine 50 koloni sayılsaydı, bu kez hesap yöntemi farklı olacaktır. 50 koloni, 3 nolu tüpün 0,1 ml'indeki sayıyı göstermektedir. Dolayısı ile materyalde $50 \times 10 \times 1000 = 500.000$ adet/ml canlı hücre var demektir. Sonuç, $5,0 \times 10^5$ /ml olarak verilir. Sayım sonuçlarının standart olarak verilmesi $A, b \times 10^c$ şeklinde olur. Burada A = birler basamağındaki sayı, b = virgülden sonraki ilk rakam (1. ondalık hane) ve c = 10 'un kuvvetini gösterir. Örneğin 500.000 sayısı $5,0 \times 10^5$, 687.000 sayısı $6,9 \times 10^5$, 41.300 sayısı $4,1 \times 10^4$ şeklinde verilmelidir.

Seyreltilmiş tüplerden yapılan ekim sonuçlarına göre materyaldeki canlı hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\text{Sayı/ml} = (\text{Koloni Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü}) / \text{Dilüsyon tüpünden Petri kutusuna aktarılan hacim(ml)}$$

$$\text{Seyreltme Faktörü} = 1 / \text{Seyreltme oranı}$$

Örnek

Dilüsyon oranı 10^{-4} olan tüpten Petri kutusuna 0,02 ml pipetlenmiş, inkübasyon sonunda toplam 45 koloni sayılmıştır. Materyalin 1 ml'inde kaç adet canlı hücre vardır? Dilüsyon (seyreltme) oranı ve dilüsyon faktörü kavram olarak karıştırılabilmektedir. Dilüsyon oranı dilüsyon yapılmış tüpte materyale oranla kaç kez seyreltme yapıldığını gösterir. Örneğimizde materyale göre tüpte 10.000 kere daha az canlı hücre vardır. Şu halde tüpteki sayı materyalin on binde biri kadardır. Bunun matematik ifadesi $1/10.000$ yani 10^{-4} 'dır. Dilüsyon faktörü ise yukarıda belirtildiği gibi $1/\text{dilüsyon oranı}$ dır. Yani, $1/10^{-4} = 10^4$ 'dür.

Çözüm: $\text{Seyreltme Faktörü} = 1/10^{-4} = 10^4$
 $\text{ml deki sayı} = 45 \times 10^4 / 0,02 = 22.500.000 \text{ adet/ml}$
 $= 2,3 \times 10^7 / \text{ml}$

04.01. Petri Kutularının Yazımı

Kural olarak Petri kutularının kapağına; «dilüsyon faktörü/Petri kutusuna pipetlenen hacim» formülü ile hesaplanan tek bir faktör yazılır. İnkübasyon sonunda Petri kutusunda sayılacak olan koloni adedi bu faktör ile çarpılarak materyaldeki canlı mikroorganizma sayısı doğrudan hesaplanır. Bu yazım şekli ekim ve sayım işlerinin farklı kişiler tarafından yapılabildiği yoğun laboratuvarlarda karışıklığın önlenmesi için etkin bir yoldur.

Örnek

4 nolu dilüsyon tüpünden Petri kutusuna 1 ml pipetlendiyse, kutu Kapağına sadece 10^4 yazılır. Sayım sırasında elde edilen koloni miktarı doğrudan bu değer ile çarpılır. Ancak 4 nolu dilüsyon tüpünden Petri kutusuna 0,1 ml pipetlendiyse, bu kez kapağa $10^4/0,1$ eşdeğeri olarak 10^5 yazılır. Böylelikle, kolonilerin sayımını yapan kişi koloni sayısını 10^5 ile çarparak materyaldeki canlı hücre sayısını (ml' de ya da g' da) bulabilir.

04.02. Ekim Yapılacak Dilüsyonların Seçilmesi

Dilüsyonların yapılmasından sonra, Petri kutularına ekim sırasında, materyalin mikroorganizma yükü hakkında eğer yaklaşık bir bilgimiz varsa, tüm dilüsyonlardan değil sadece 3 dilüsyondan ekim yapılır. Dökme ve yayma kültürel sayım yöntemlerinde 3 dilüsyonun seçiminde Petri kutusunda 30-300 arasında koloni elde edilebilecek dilüsyon hesaplanır, bunun bir alt ve bir üst dilüsyonları ile birlikte 3 dilüsyondan ekim yapılır. Tüplerden Petri kutusuna pipetlenen hacim, dilüsyonun seçiminde önemlidir. Her 2 yöntemde de Petri kutusunda 100 koloni oluşması esas alınır.

Örnek

Bir gıda maddesinde 10^6 adet/ml düzeyinde bakteri olduğu tahmin edilmektedir. Dilüsyon yapıldıktan sonra Petri kutularına 1 ml (dökme yöntemi ile kültürel sayım) ve 0,1 ml (yayma yöntemi ile kültürel sayım) pipetlenmesi durumlarında ekim yapılacak dilüsyon tüplerini seçin.

Çözüm: Tüplerden Petri kutularına 1 ml aktarılması halinde 4 nolu tüpten (materyale göre 10^4 kez seyreltilmiş olan tüpten) ekim yapıldığında Petri kutusunda 100 koloni oluşması beklenir. Böylelikle $100 \times 10^4 = 10^6/\text{ml}$ materyaldeki sayıyı verir. Ancak $10^6/\text{ml}$ bir tahmin olduğuna göre sadece 4. tüpten ekim yapılırsa 30 -300 arasında koloni elde edilemeyebilir. Dolayısı ile 3, 4 ve 5 nolu tüplerden ekim yapılır. Tüplerden 0,1 er ml pipetlenmesi durumunda ise 2, 3 ve 4 nolu tüplerden ekim yapılır. Çünkü 3 nolu tüpten 0,1 ml pipetlendiğinde 100 koloni beklenmektedir. Dolayısı ile ekimde 2, 3 ve 4 nolu tüpler kullanılır.

Damla kültür yönteminde damlanın kapladığı alan yaklaşık 3 cm^2 olduğu için her damlada 10-30 arası koloni oluşacak şekilde dilüsyon yapılır.

04.03. Sayım Sırasında Karşılaşılabilecek Özel Durumlar

Petri kutularında sağlıklı sayım sonuçlarının alınabilmesi için 30 -300 arasında koloni bulunmasının istatistiksel bir kural olduğu, aynı dilüsyondan en az 2 Petri kutusuna paralel

ekim yapmak gerektiği yukarıda belirtilmiş idi. Bununla beraber bazı hallerde, bu kuralların dışına çıkılabilir. Çizelgede sayım sırasında karşılaşılabilecek özel durumlarla ilgili örnekler verilmiştir.

A) Tek paralelli (her dilüsyondan 1 Petri kutusuna) ekim

Kodu	10 ⁻² Dilüsyonda	10 ⁻³ Dilüsyonda	Sonuç (adet/ml)
a	230	16	2,3 X 10 ⁴
b	380	41	4,1 X 10 ⁴
c	260	36	3,1 X 10 ⁴
d	156	43	1,6 X 10 ⁴
e	325	23	3,3 X 10 ⁴
f	360	29	2,9 X 10 ⁴
g	150	140	-
h	60	186	-
i	20	3	2,0 X 10 ³

B) İki paralelli (her dilüsyondan 2 Petri kutusuna) ekim

Kodu	10 ⁻² Dilüsyonda	10 ⁻³ Dilüsyonda	Sonuç (adet/ml)
j	173 ; 206	18 ; 16	1,98 X 10 ⁴
k	410 ; 480	36 ; 39	3,8 X 10 ⁴
l	280 ; 294	34 ; 37	3,2 X 10 ⁴
m	280 ; 294	65 ; 69	2,9 X 10 ⁴
n	0 ; 0	0 ; 0	<10 ²
o	86 ; 77	94 ; 65	-

Çizelgenin (a, b, j, k) satırlarında 30-300 arasında koloni sayım örnekleri verilmiştir.

Ardışık iki dilüsyonda Petri kutularında 30 -300 sınırına yakın değerler bulunabilir. Bu gibi durumlarda aritmetik ortalama alınır. Örneğin (c) satırında ise 10⁻² dilüsyonda 260, 10⁻³ dilüsyonda 36 koloni sayılmıştır. Sayım sonucu 260X10² ve 36X10³ değerlerinin ortalaması olan 3,1X10⁴ adet/ml şeklinde verilir, (l) örneği için de benzer durum söz konusudur. Sayım sonucu 280X10² + 294X10² + 34X10³ + 37X10³ değerlerinin aritmetik ortalaması olan 3,2X10⁴ adet/ml 'dir.

Bununla beraber, düşük dilüsyondaki 1 ya da 2 Petri kutusundaki değerlerin ortalaması, yüksek dilüsyonda elde edilen değer yarisından daha az ise, doğrudan doğruya düşük dilüsyondaki değer kullanılır. Örneğin, (d) satırında 10⁻² dilüsyonda 156 koloni materyalde 15.600 adet/ml 'yi gösterir. 10⁻³ deki değer ise 43.000 adet/ml 'yi gösterir. 15.600 (düşük dilüsyondaki sonuç) 43.000'in yarisından daha az olduğu için, sayım sonucu 15.600 = 1,6X10⁴ şeklinde verilir. Aynı durum (m) satırı için de geçerlidir.

Çizelgenin (e, f) satırlarında olduğu gibi düşük dilüsyondaki değer 300'den fazla, buna karşın yüksek dilüsyondaki değer 30'dan az ise, 30 -300 değerlerine yakın sonuç veren dilüsyon kullanılır.

Ardışık iki dilüsyonda elde edilen 2 değer de 30'un altında ise, düşük dilüsyonda elde edilen sonuç kullanılır (i). Petri kutularında hiç bir koloni yoksa sonuç 0 adet/ml olarak değil, (n) satırında olduğu gibi düşük dilüsyon faktöründen daha az olarak verilir.

Çizelgenin (g, h, o) satırlarında elde edilen değerler hiç bir şekilde kullanılamaz. Bu gibi hallerde kontaminasyon ya da dilüsyon hatası olduğuna karar verilip deney tekrarlanır.

300'den fazla kolonilerin sayılması

Petri kutusunda sayılması gereken koloni 300'den fazla sayıdaysa, ortalama olarak 1 cm^2 alan içinde 10'dan daha az koloni varsa ve standart 9 cm çaplı Petri kutuları kullanılıyorsa; 13 adet 1 cm^2 lik alanda sayım yapıp sonuç 5 ile çarpılır. 13 adet karenin belirlenmesinde; $7 \times 1 \text{ cm}^2$ alan ile bunu dik kesen $7 \times 1 \text{ cm}^2$ alan çizilir. 2 alanın birbirini kestiği 1 cm^2 alan 1 defa sayılacağı için toplam sayım alanı 13 cm^2 olur. Buradaki koloniler tercihen büyüteç altında sayılır. 9 cm çaplı Petri kutusunun alanı 65 cm^2 olduğundan, 13 cm^2 de bulunan değer 5 ile çarpılır. Bazı koloni sayım cihazlarında 13 adet 1 cm^2 alan özel olarak belirtilmiştir.

1 cm^2 alan içinde 10'dan daha fazla koloni varsa, temsili 4 adet 1 cm^2 alan seçilir, sayım yapıp ortalaması alınır, 1 cm^2 deki koloni sayısı ortalaması 65 ile çarpılır.

Eğer 1 cm^2 alan içinde 100'den daha fazla sayıda koloni varsa, bunlar sayılmaz. Sonuç $65 \times 100 \times$ dilüsyon faktörü/ml' den daha fazla şeklinde belirtilir.

Yayılan kolonilerin sayılması

Katı besiyerlerinde bazı mikroorganizmalar (örneğin bazı basiller) çok geniş -yayılmış - koloniler meydana getirerek diğer mikroorganizmaların gelişmesini ve koloni oluşturmalarını engellerler.

Prencip olarak, yayılmış kolonilerin kapladığı alan Petri kutusunun yarısından fazla değil ise ve diğer koloniler besiyeri üzerinde düzenli bir dağılım göstermişlerse, yayılma olmayan sahalarda temsili alanlar seçilerek sayım sonucu hesaplanır.

Yayılmış olan kolonilerin sayılması zorunlu ise, aşağıda açıklanan yayılma tiplerinin dikkate alınması gerekir.

Birinci tip yayılmada koloniler zincir şeklindedir. Bu koloniler birbirlerinden kesin olarak değil, besiyeri ile sayımı yapılacak materyalin karıştırılması sırasında birbirinden kısmen ayrılmış bir bakteri yığını şeklinde görülürler. Bu tip zincirler 1 koloni olarak sayılır. Besiyerinde birbirinden bağımsız 1 'den fazla koloni zinciri varsa, bu zincirlerin her biri 1 adet koloni olarak sayılır.

İkinci tip yayılmış koloniler su -film tabakası halinde Petri kutusunun tabanı ile besiyeri arasında, üçüncü tip yayılmış koloniler ise, yine su -film tabakası halinde Petri kutusunun kenarlarında ve/veya besiyeri yüzeyinde gelişirler. Son iki koloni tipi çok yayılıcı biçimde gelişirler. Bunun nedeni, yayılma kaynağı olan bakterinin koloni oluşturduğu bölgede nem birikmesidir. Dilüsyon sıvısının besiyerine yeknesak dağıldığı hallerde bu tip koloniler nadiren meydana gelir. Bir diğer deyiş ile, 2. ve 3. tip koloni oluşmasının başlıca nedeni, dilüsyon sıvısının besiyeri içinde yeknesak dağılmamasıdır. Bunun dışında, inkübasyon sırasında kondens suyunun yayılmış koloni oluşmasındaki olası sakıncalarına yukarıda değinilmiş idi.

05. Dökme Kültürel Sayım Yöntemi

Bu yöntemde steril Petri kutularına önce örnekten 1 ml aktarılır, bunun üzerine 45 °C 'a kadar soğutulmuş besiyerinden yaklaşık 15 ml dökülür ve karıştırılır. Agarlı besiyeri donduktan (katılaştıktan) sonra inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan kolonilerin sayılması ile, örnekteki canlı mikroorganizma sayısı belirlenir.

Dökme sırasında agarlı besiyerinin 45 °C altında donacağı unutulmamalıdır. Besiyeri çok sıcak iken kültür üzerine dökülecek olursa, bu kez mikroorganizmalar zarar görebilir. Bu nedenle dökme sıcaklığının iyi bir şekilde ayarlanması gerekir.

Besiyeri, kültürün üzerine döküldükten sonra düz bir yerde 3 kez 8 çizerek, besiyeri ile kültürün homojen bir şekilde karışması sağlanmalıdır. 45 °C' da dökülen ve Petri kutusu ile temas sonunda hızla soğuyan besiyeri katılaşmadan önce, karıştırma işi tamamlanmalıdır.

06. Yüzeyde Kültürel Sayım Yöntemleri

Yüzeyde kültürel sayım yöntemlerinin dökme kültürel sayım yönteminden farkı, bu yöntemlerde (yayma ve damlatma yöntemleri) Petri kutusuna önce besiyerinin dökülmesi, besiyeri donduktan sonra kültürün besiyeri üzerine pipetlenmesidir.

Yüzeyde sayım yöntemlerinin dökme kültürel sayıma göre bazı üstünlükleri vardır. Bunlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

-Yüzeyde sayım yöntemleri, dökme yöntemine göre daha fazla otomatize edilebilir. Bu şekilde sayım maliyeti azalırken, yöntem çabuk ve kolay bir şekilde uygulanabilir.

-Yüzeyde sayım yönteminde besiyerinin Petri kutusuna dökülmesi sırasında, hava kabarcıkları oluşursa bunlar, inokülasyon öncesi bunzen beki alevi ile ortadan kaldırılabilir. Oysa bu uygulama Petri kutusuna önce içinde mikroorganizma bulunan kültürün aktarıldığı dökme yönteminde önerilmez.

-Dökme yönteminde sıcaklığa duyarlı olan mikroorganizmalar, döküm sıcaklığı yüksek olursa zarar görebilirler. Tersine olarak döküm sıcaklığı düşük olursa, besiyeri ile kültürün iyi bir şekilde karışması sağlanamaz. Bu sakıncalar yüzeyde sayım yöntemlerinde yoktur.

-Mutlak aerob mikroorganizmalar dökme yönteminde yüzeyin altında da kalabilirler ve bunlar inkübasyonda iyi bir gelişme gösteremeyebilirlerken, yüzeyde gelişenleri daha çabuk ve büyük koloni oluşturarak sayımda yanılmalara neden olabilirler.

-Yüzeyde sayım yöntemleri içinde yer alan yayma yöntemi ile elde edilen koloniler, elektronik koloni sayaçlarında daha doğru bir şekilde sayılabilirler.

-Tüm bu üstünlüklerine karşın yüzeyde sayım yöntemlerinin de bazı sakıncaları vardır. Örneğin yayma kültürel sayımda kullanılan cam çubuğun (Drigalski spatülü) üzerinde bir miktar mikroorganizma kalır, bu ise daha az sayıda sayım sonucu verir. Bununla beraber cam yüzünün silikon ile kaplanması bu sorunu belli ölçüde ortadan kaldırmaya yardımcı olur. Çünkü silikon, mikroorganizmaları cam kadar çok absorbe etmez.

Yüzeyde sayım yöntemleri için hazırlanan besiyeri içeren Petri kutuları, önce 37 °C inkübatörde 24 saat süreyle tutularak, besiyeri yüzeyinin bir miktar kurumması sağlanır. Besiyeri Petri kutularına döküldüğü anda yüzey ıslak olur. Bu şekilde ekim yapılırsa, besiyerinin kültürü emmesi güçleşir; ayrıca pipet ucu besiyerine degecek olursa, moleküllerin

birbirini itmesi nedeni ile gereğinden daha az hacimde sıvı pipetlenmiş olur. Tersine, besiyeri yüzeyi aşırı kuruyacak olursa, sıvıyı aniden emeceği için, sağlıklı bir yayma gerçekleşmez; ayrıca benzer şekilde pipet ucu besiyerine değecek olursa, moleküllerin birbirini çekmesi nedeni ile fazla miktarda sıvı pipetlenmiş olur. Petri kutularının yukarıda belirtildiği gibi kurutulması bu sorunu belli ölçüde ortadan kaldırır; aynı zamanda Petri kutularındaki besiyerlerinin steril olup olmadıkları da kontrol edilmiş olur.

06.01. Yayma Kültürel Sayım Yöntemi

Bu yöntemde Petri kutusu içinde bulunan besiyeri üzerine 0,1 ml kültür pipetlenir ve Drigalski spatülü ile kültür besiyeri üzerine yayılır. Drigalski spatülü ince bir cam bagetin özel bir şekilde kıvrılması ile elde edilir.



Drigalski spatülünün tamamı cam olabileceği gibi tutma yeri metal, yayma yeri cam veya silikon kaplı camdan da yapılabilir. Ticari olarak hazırlanmış değişik modellerde spatüller de mevcuttur.

Kültürel sayım yöntemlerinde kullanılan tüm malzeme (Petri kutuları, dilüsyon çözeltileri, besiyerleri, pipetler) gibi Drigalski spatülleri de steril olarak kullanılmalıdır. Kuşkusuz en ideali, yeterli sayıda spatülün alüminyum folyalara sarılarak etüvde sterilize edilmesidir. Ancak bu durum sağlanamazsa, spatüller etil alkol içinde tutularak sterilize edilebilir.

Spatül üzerinde kalan alkol, besiyerine aktarılan mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etki yapabilir. Bu nedenle bu alkolün spatül üzerinden uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla spatül alevden geçirilir, alev alkolü yakarak uzaklaştırır, ancak mikroorganizmaya zararlı olabilecek kadar ısıtmaz. Güvenlik olarak spatül, besiyeri üzerinde kültür aktarılmamış bir yerde gezdirilerek soğutulur, daha sonra kültür yayılır. Zamanla alkolün konsantrasyonunun düşmesi sonunda, alkol içinde bazı mikroorganizmaların (örneğin spor yapan basiller) canlılıklarını sürdürebilecekleri ve bunların spatül üzerinde kalarak alev etkisinden kurtulup besiyeri yüzeyine bulaşabilecekleri gözden uzak tutulmamalı, dolayısı ile her yayma için steril bir spatül kullanılamıyorsa, alkol sterilizasyonuna baş vurulmalı, ancak alkolün temiz ve yeterli konsantrasyonda olduğu kontrol edilmelidir.

06.02. Damlatma (Damla Kültür) Yöntemi

Mikrobiyolojide kullanılan besiyerlerinin pahalı olmasından dolayı, sayım maliyetini düşürmek amacı güden bir yöntemdir. Bu yöntemin esası Petri kutusundaki besiyeri üzerine 1'den fazla sayıda örneğin aktarılmasıdır. Bu amaçla besiyeri dökülüp katılaşma olduktan sonra, yayma kültür yönteminde olduğu gibi Petri kutuları 37 °C 'da 24 saat süre ile tutularak hem yüzey kuruması sağlanır, hem de sterilite kontrolü yapılır. Petri kutusunun altı dıştan eşit olarak 6 ya da 8'e bölünür ve her bölme numaralandırılır. Daha sonra her bölmeye özel mikro pipet ile 0,02 ml pipetlenir. İnkübasyon sonunda 2 -3 cm çaplı (3 -7 cm² alanlı) bölgelere yayılmış olan koloniler sayılır.

Damlatma yönteminde Pastör pipeti adı verilen özel bir pipet de kullanılabilir. Pastör pipeti çok ince uçlu derecesiz bir pipettir. Kapiler özellik nedeni ile, aynı ölçüde küçük damlalar elde etmek mümkündür. Bu pipet kullanılacağına önce damla hacmi ölçülmelidir. Bu amaçla genellikle 20 damlanın ağırlığı hassas terazide tartılır ve buradan 1 damlanın ağırlığı hesaplanır. Dilüsyonda kullanılan FTS ya da diğer dilüsyon sıvılarının özgül ağırlığı 1'e çok yakın olduğundan, 1 cc = 1 g olduğu kabul edilir ve 1 damlanın ağırlığı bu yaklaşım ile hacim olarak alınabilir.

Örnek

10^{-2} dilüsyondan yapılan ekimlerde 2 sayım alanında sırasıyla 13, 15 koloni sayılmıştır. Pastör pipetinde 1 damla ağırlığı 0,0043 g' dır. Orijinal materyaldeki canlı hücre sayısı nedir?

Çözüm: $(13 + 15) \times 10^2 / 2 \times 0,0043 = 3,3 \times 10^5 / \text{ml}$

Aynı hacimli damlalar elde etmek amacı ile pipetler dik tutulmalı, besiyeri yüzeyine çarpan damlaların etrafa sıçramaması için, pipet ucu ile besiyeri yüzeyi arasındaki mesafenin 1 -2 cm arasında olmasına dikkat edilmelidir. Her Pastör pipetinden elde edilecek damla hacimleri farklı olacağından, Petri kutusuna pipet numarası da yazılmalı veya koloni sayımı ve değerlendirme kısmında anlatıldığı gibi kullanımdan hemen sonra, hacim ve dilüsyona bağlı faktör hesaplanıp Petri kutusu üzerine kaydedilmelidir.

07. Spor Sayımı

Bazı hallerde, sadece bakteri sporlarının sayımı gerekebilir. Sporlar da, vejetatif hücreler gibi, agarlı besiyerlerinde kültürel sayım yöntemleri ile sayılırlar. Ancak önce, kültürdeki vejetatif hücrelerin öldürülmesi gereklidir. Bu amaçla spor sayımı yapılacak materyal 80°C 'da 1 dakika tutulur. Bu sırada, tercihen su banyosundaki suyun sıcaklığını rahatlıkla iletecek ince kenarlı tüp kullanılmalıdır. 80°C 'da 1 dakikalık sıcaklık uygulaması, ortamda bulunan vejetatif hücreleri öldürürken, sporların çimlenmesini teşvik eder. Bundan sonra bilinen dilüsyon ve ekim yapılır.

08. Anaerob Bakterilerin Sayımı

Anaerob bakteriler havasız (oksijensiz) ortamlarda gelişen bakterilerdir. Bu tip bakterilerin kültürel yöntemle sayılabilmesi için, gelişme ortamında (inkübasyon ortamında) hava bulunmamalıdır.

Anaerobların sayımında havanın ortamdan uzaklaştırılması için çeşitli sistemler bulunmaktadır. Bu amaçla özel inkübatörler ve/veya ekipmanlar geliştirilmiştir.

Ortamdan havanın uzaklaştırılmasında vakum ve gaz uygulaması en çok kullanılan sistemlerdir. Bu amaçla özel yapılmış inkübatör kullanılıyorsa, Petri kutuları inkübatöre yerleştirildikten sonra inkübatördeki hava, vakum pompası ile boşaltılır ve inkübatör gaz ile doldurulur. Bu uygulamalara elverişli bir inkübatör yoksa, özel olarak yapılmış anaerobik kavanozlar kullanılmalıdır. Ticari olarak geliştirilmiş çok değişik modellerde anaerobik kavanozlar mevcuttur.

Anaerob ortamın sağlanmasında kuşkusuz en uygun sistemler özel inkübatör veya kavanozların kullanılmasıdır. Her iki sistem de mevcut değilse, ancak ağız tam olarak kapatılabilen büyük bir kavanoz bulunuyorsa, basit, ancak etkin bir yöntem ile de anaerob ortam sağlanabilir. Bu yöntemde Petri kutuları, tüpler vs kavanoza yerleştirildikten sonra, kavanoz içinde mum yakılır ve kavanozun kapağı örtülür. Mum, kavanozdaki oksijeni tüketerek yanar, oksijen bittiğinde ise söner. Bu yöntem kavanozdaki oksijeni tam olarak tüketmese de, en basit ve en ucuz yöntemdir. Mum yerine özel kavanozlara yerleştirilmiş elektrikli sistemler de vardır.

Anaerob ortamların sağlanmasında kullanılan gazların % 10 oranında hidrojen içermesi önerilmektedir. Bu amaçla en yaygın kullanılan karışımlar; % 5 CO₂ + azot içinde % 10 H₂ veya sadece azot içinde %10 H₂ 'dir. Anaerob bakteri gelişimi için CO₂ kullanılması gerekli ise CO₂ 'in % 5'lik limiti geçmemesine özen göstermek gerekir, çünkü besiyeri pH 'sının düşmesine neden olabilir. Anaerob ortam sağlanmasında kullanılan gazların hazırlanması için özel cihazlar geliştirilmiştir. Benzer şekilde bu gazlar ticari olarak da pazarlanmaktadır.

Mutlak anaerob olmayan fakültatif anaeroblar ile mikroaerofil mikroorganizmaların geliştirilmesi ve dolayısı ile sayımları için daha basit teknikler de vardır. Bu teknikler aşağıda kısaca açıklanmıştır.

Dökme veya yayma yöntemi ile Petri kutularına ekim yapıldıktan sonra, besiyeri yüzeyi 2 mm kalınlıkta % 0,1 steril agar çözeltisi ile (su içinde) örtülür. Petri kutuları yayma yöntemi ile hazırlanmışa, besiyerinin seyreltilmiş materyali emmesi için yeterince beklenmelidir.

Mikroorganizma, sayımdan ziyade geliştirilmek amacı ile (ya da test edilecek materyalde var -yok şeklinde aranıyorsa) tüplerde sıvı besiyerinde üretiliyorsa, vidalı kapaklı tüpler ağızına kadar doldurulup kapakları kapatılır. Bu teknik özellikle gaz yapmayan fotosentetik bakteriler için önerilir.

Bakteriler tüp içinde katı veya sıvı besiyerinde üretiliyorsa, inokülasyondan sonra besiyeri üzeri steril % 0,1 agar çözeltisi veya steril vaspar (% 50 vazelin + % 50 parafin) ile örtülebilir.

Mutlak anaeroblar Petri kutusunda geliştirilmek istendiğinde ve anaerobik inkübatör mevcut değil ise Petri kutuları vakuma dayanıklı kavanoz içine konur. Kavanoz içine ayrıca anaerobikliği kontrol etmeye yarayan indikatör çözelti içeren bir beher de konulur. 2 -3 sefer vakum yapıp azot ilave edilerek, kavanoz içindeki oksijen ortamdan uzaklaştırılır. Ortamda oksijenin kalması ve/veya sızıntı sonucu oksijen girmesi halinde, aktif haldeki indikatörün sarı rengi oksidasyon sonucu maviye döner. Bu taktirde, kavanozun sızdırmazlığı kontrol edilip, kavanoz hiç açılmadan ışık ile indikatör aktive edilir. Böylece, kavanoz içinde az miktarda oksijen varsa bu, aktifleştirilmiş indikatör ile absorbe edilebilir. İndikatörün hazırlanışı ekte verilmiştir.

09. Bakteriyofaj Sayımı

Bakteriyofajlar (fajlar) bakterilerin zorunlu parazitleri olup, sadece canlı bakteri hücreleri içinde çoğalabilen virüsler olarak tanımlanabilirler. Bazı hallerde fajlar, bakteri içinde hızla çoğalarak bakteriyi parçalarlar (lize ederler), buna karşın bazı hallerde ise, uzun süre bakteri içinde yaşamlarını sürdürürler fakat çoğalmazlar.

Fajlar, süt ürünleri ve inokulant endüstrisi için büyük sorundur. Peynir, tereyağı, yoğurt gibi ürünler starter kültürlerinin süte ilavesi ile elde edilir. Bu starter bakterilerinin bir kısmı bakteriyofajlara duyarlı, bir kısmı ise dirençlidir. Duyarlı olan suşlar toprak, ahır havası, saman ve hatta sütte doğal olarak bulunabilen fajların saldırısına uğradıklarında, starter görevlerini yerine getiremeyecek şekilde zarar görürler.

Fajlar bakterilere saldırarak onları parçaladıklarında; sıvı besiyerinin bakteri çoğalmasından kaynaklanan bulanıklığı kaybolur, katı besiyerinde ise koloniler oluşmaz, besiyeri rengi faj saldırısına uğramış bölgelerde açık kalır. Bu tip bölgelere plak (Plaque) adı verilir. Bir süspansiyondaki faj sayısı, plak oluşturan birim (Titre) ile ifade edilir. Faj titresi; çift tabaka ekim yöntemi ve rutin test dilüsyonu yöntemi olmak üzere 2 şekilde belirlenir. Bir süspansiyonda çok sayıda faj bulunabilir, ancak bunların hepsi incelenen bakteriyi parçalama özelliği göstermeyebilir. Dolayısı ile sadece bakterileri lize edenler sayıldığı için toplam faj değil, plak oluşturan birim (plaque forming unit = pfu) sayılmakta ve o şekilde ifade edilmektedir. Toplam faj sayısı ise sadece elektron mikroskopla belirlenebilir.

09.01. Çift Tabaka Ekim Yöntemi

Bu yöntem aşağıda kısaca açıklanmıştır.

-Uygun bir çözelti (tamponlanmış fosfat çözeltisi, FTS, laktik bakteriyofajlar için M 17 sıvı besiyeri vb) içinde faj süspansiyonunun dilüsyonu yapılır.

-Alt katmanı oluşturmak üzere steril Petri kutularına konakçı bakteri için seçilen agarlı besiyerinden 15 ml dökülür.

-% 0.45 -0,7 agar içeren aynı besiyerinden 2,5 -3 ml tüplere dağıtılıp sterilize edilir, 46 °C 'daki su banyosunda soğutulur. Bu şekilde hazırlanan besiyeri üzerine konakçı bakterinin aktif kültüründen 0,1 -0,5 'er ml ile faj dilüsyonlarından 0,1'er ml pipetlenir, karıştırılır ve katılaşmış olan alt katman üzerine dökülür.

-İnkübasyondan sonra oluşan plaklar sayılır ve faj titresi hesaplanır. Örneğin; 10^{-5} dilüsyondan yapılan ekim sonunda 20 plak sayıldıysa, titre; $2,0 \times 10^7$ olarak bulunur.

Laktik fajların sayımında dilüsyonlar 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} şeklinde yapılmaktadır. İnkübasyon sonunda, 10^{-6} dilüsyondan yapılan ekimde sayılamayacak kadar çok ve/veya iç içe girmiş plaklar varsa ve 10^{-8} dilüsyondan yapılan ekimde hiç plak yoksa, 10^{-7} dilüsyonda faj olduğu tahmin edilir ve 0,1 ml örnek alındığı için titre 10^{-8} olarak verilir.

Fajların meydana getirdiği plaklar birbirlerine karışabilir ve kesin sayı saptanamayabilir. Bu nedenle bakterilerin kültürel sayımında kullanılan 30-300 koloni/ Petri kutusu sınırlaması faj plakları sayımında bağlayıcı değildir.

09.02. Rutin Test Dilüsyonu (RTD) Yöntemi

Bu yöntemin esası damla kültür yöntemine benzemektedir. Petri kutularına ince bir katman halinde katı besiyeri dökülüp, bu katılaşmaktan sonra üzerine konakçı bakterinin aktif kültüründen yayılır. Besiyerinin, kültürü emmesi ve yüzeyinin yeterince kurumamasından sonra, standart dilüsyonu yapılmış faj süspansiyonu, mikro pipet ya da Pastör pipeti ile damlatılır. Titre, inkübasyon sonunda oluşan plak sayısı, dilüsyon faktörü ve damla hacmi dikkate alınarak hesaplanır. Bu yöntemde bir Petri kutusuna 6 -7 farklı dilüsyondan ekim yapılabilir.