

Mikroorganizma Sayımı¹

A. Kadir HALKMAN, Kamuran AYHAN
Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

01. Mikroorganizma Sayımının Temel İlkeleri
02. Amaca Uygun Besiyeri / Analiz Yöntemi Seçimi
03. Kültürel Sayım Yöntemleri
 - 03.01. Koloni Sayımı
 - 03.01.01. Dökme Yöntemi
 - 03.01.02. Yayma Yöntemi
 - 03.01.03. Damlatma Yöntemi
 - 03.01.04. Petri film
 - 03.02. Koloni Sayısının Hesaplanması
 - 03.03. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi
 - 03.04. Spiral Plak Yöntemi
 - 03.05. Yüzeiden Yapılan Sayımlar
 - 03.06. Havadan Örnek Alma
04. Membran Filtrasyon Tekniği
05. Metabolizmaya Dayalı Sayımlar
06. Mikroskopik Sayımlar
 - 06.01. Thoma Lamı ile Sayım
 - 06.02. Breed Yöntemi
 - 06.03. Howard Lamı ile Küflü Saha Sayımı

01. Mikroorganizma Sayımının Temel İlkeleri

Gıda maddelerinde mikroorganizma sayısı üzerindeki yasal kısıtlamalar, başta gıda çeşidi, mikroorganizma türü ve yasa koyucu ülkenin gelişmişlik durumu olmak üzere çok sayıda faktör tarafından etkilenmektedir. Bu yasal düzenlemelerin dışında öncelikle gıda ticaretinde giderek artan rekabet koşulları da gıda üreticilerinin daha hijyenik özelliklere sahip ürünleri üretmelerini bir anlamda zorlamaktadır. Dolayısı ile gıdalarda mikroorganizma sayısının doğru bir şekilde belirlenmesi gerekir.

Bir gıda örneğinde mikroorganizma sayısının belirlenmesi çoğu kez uzun bir analiz süresini gerektirmektedir. Bu süre, standart kültürel yöntemlerde sayılan mikroorganizma türüne ve uygulanan yöntemle göre değişmek üzere 1-10 gün arasında olabilmektedir. Bu uzun analiz süresine alternatif olarak getirilen hızlı yöntemler ise yüksek analiz maliyeti ve/veya hatalı sonuç alınabilme olasılıkları ve/veya analizin zorluğu gibi dezavantajları getirebilmektedir.

Standart kültürel analiz yöntemlerinin uzun süre almasının başlıca nedeni mikroorganizmanın katı besiyerinde gelişerek koloni oluşturması veya sıvı besiyerinde gelişmesi için belirli bir generasyona gerek duyulmasıdır. Mikroorganizmalarda türlere, kullanılan besiyeri bileşimine ve inkübasyon koşullarına göre değişen generasyon süresi farklılıkları, sayımın bazı koşullarda identifikasyon ile desteklenme zorunluğu gibi faktörlerle beraber yukarıda da belirtildiği gibi sayım işlemi (veya var/yok testi) 10 güne kadar uzayabilmektedir.

¹ Kaynak : **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2000. Genişletilmiş 2. Baskı; Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, Ankara 522 s 06. Bölüm**

Mikroorganizmaların standart kültürel yöntemlerle sayımında genellikle seyreltme işlemi uygulanır ve sayım sonuçları bir anlamda istatistik kurallara göre "kabul edilen bir değer" olarak verilir. Gıdanın özellikleri, sayılacak mikroorganizma türü, gıdada bulunan (ya da bulunmasına izin verilen) sayısı ve analiz yöntemi gibi faktörler gerçek sayıdan sapmaları etkileyen önemli faktörler arasındadır. Her ne kadar standart kültürel yöntemlerle yapılan mikrobiyolojik analizlerde birçok olumsuzluk varsa da bugün için gerek yasal kontrol kuruluşları tarafından yapılan analizlerde gerek işletmelerdeki otokontrol amaçlı analizlerde yaygın olarak kullanılan ve kabul edilen sayım yöntemleri standart kültürel analizlerdir. Bununla beraber hızlı olarak tanımlanan yöntemler gıda endüstrisi işletmelerinde giderek daha fazla kabul görmektedir. Ayrıca önceleri uluslararası analiz kuruluşları tarafından tam olarak benimsenmeyen bazı hızlı analiz yöntemleri bugün standart kültürel analiz olarak kabul edilmektedir.

Genel olarak uluslararası kontrol kuruluşları tarafından önerilen standart kültürel analizler rutin gıda kontrollerinde uygulanamayacak kadar uzun süre almaktadır. Örneğin bir gıda maddesinde *E. coli* aranması Uluslararası Standartlar Organizasyonu (International Standard Organisation ; ISO)' na göre 10 gün, ABD Gıda ve Müstahzar İdaresi (Food and Drug Administration ; FDA)' ya göre 11 gün sürmektedir ve gıda endüstrisinde yapılacak otokontrollerde bu denli uzun analiz süresi kabul edilemez. Kamu kontrol kuruluşlarında dahi bu denli uzun süren analizler genellikle uygulanmamaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken husus, gıda işletmelerinin özellikle ISO 9000 serisi uygulamalarında, kendileri için doğruluğu kabul edilmiş ve uygun sürelerde sonuçların alınabileceği analiz yöntemlerini kendileri için standart analiz yöntemi olarak kullanmalarıdır. Bu çerçevede örneğin, *E. coli* analizinin sadece 24 saat sürdüğü pek çok analiz yöntemi başarılı bir şekilde uygulanmaktadır.

02. Amaca Uygun Besiyeri / Analiz Yöntemi Seçimi

Mikrobiyolojik analizlerin en önemli aşamalarından birisi uygulanacak analiz yöntemine göre kullanılacak besiyerlerinin seçilmesidir. Besiyerleri sıvı/katı/yarı katı veya genel amaçlı/selektif (tam selektif veya ayırt edici) özellikte olabilir. Sadece *E. coli* analizi için farklı ticari kuruluşlar tarafından pazarlanan aynı veya çok benzer formülasyonda onlarca besiyeri vardır. Gıda işletmelerinin gerek marka gerek besiyeri seçmeleri bu bakımdan zor olabilmektedir. Aşağıda belirtilen noktalara dikkat edilmesi halinde bu zorluk en aza indirilebilir.

-Aynı isimli besiyerini üreten ve pazarlayan çok sayıda ticari marka vardır. Bunlar içinde Türkiye' de yaygın ve etkin pazarlama ağı olmayan "yüksek kaliteli" besiyerleri olduğu gibi Türkiye' de yaygın ve etkin pazarlama ağı olan "kalitesi şüpheli" markalar da vardır. Bu konuda yapılması gereken sadece dikkatli olmaktır.

-Aynı mikroorganizmanın sayılmasına / aranmasına yönelik olmak üzere ve sürekli olarak daha çabuk, daha güvenilir, daha kolay sonuç verdiği belirtilen yeni besiyerleri pazara çıkmaktadır. Bu konuda yapılması gereken literatür bilgisi ve katalog bilgileri inandırıcı ise eski yöntem/besiyeri ile makul bir süre paralel çalışmak ve uygulamada tatmin olunduktan sonra besiyerini değiştirmektir. ISO 9000 serisi belgeye sahip kuruluşlarda talimatname değişikliği sanıldığından çok daha kolaydır.

-Laboratuvar personelinin alışkanlıkları önemlidir. Yeni bir yöntem ve/veya besiyeri alışılmışın yerine kayda değer bir üstünlük getirmiyor ise eskiyi değiştirmek gereksizdir. Ancak,

tersine durumlarda, alışılmış üzerinde ısrar etmek sadece çağın gerisinde kalmak için direnmekten başka bir şey değildir.

-Besiyeri seçiminde marka seçmek yukarıda belirtilen koşullara göre yapılabilir. Ancak seçimde her şeyden önce kullanılacak besiyeri ve/veya yöntemin analiz edilecek materyal, analiz edilecek mikroorganizma, ihraç ürünlerinde müşterinin talebi, işletme koşulları ile doğrudan ilişkili olduğu unutulmamalı ve seçimde aşağıdaki teknik ayrıntılara da dikkat edilmelidir.

-Basit bileşimli ve içinde inhibitör olmayan besiyerlerinde çok sayıda mikroorganizma gelişir. Örneğin toplam aerob mezofil bakteri sayımında kullanılan "Plate Count Agar" besiyerinde 25-28 °C aerob inkübasyon koşullarında 48 saat süre içinde gelişebilen tüm mikroorganizmalar sayılır. Bir başka deyiş ile bu besiyerinde amaca uygun olarak çok sayıda bakteri türü gelişir. Ancak analiz edilecek gıdalar, klinik örnekler, çevresel örnekler, sular için kullanılacak tek bir genel besiyeri olmadığı gibi sadece tüm gıdalar için kullanılacak bir genel besiyeri de yoktur. Örneğin süt ve ürünleri için toplam aerob mezofil bakteri sayımı için "Plate Count Agar" besiyerine doğal ortam sağlayıcı olarak süttozu ilave edilir iken aynı amaçla deniz ürünlerinin analizinde bu besiyerine deniz suyu ilave edilir. Benzer şekilde toplam maya küf sayımı analiz edilecek gıdalara göre farklılık gösterir.

-Besiyerlerinin selektivitesi arttıkça hedef mikroorganizmanın gelişmesi de buna paralel olarak azalır. Bu nedenle mikrobiyoloji laboratuvarında tercih edilmesi gereken selektif değil diferansiyel (ayrıt edici) besiyerleridir. Diferansiyel besiyerleri hedef mikroorganizmayı aynı besiyerinde gelişebilen refakatçi flora içinde başta koloni rengi olmak üzere farklı kılan bir özellik ile ayrıt edebilme özelliği gösterir. Bu tip besiyerlerinde hedef mikroorganizma rahatlıkla gelişebilir iken bu kez de aranacak / sayılacak mikroorganizma ile aynı ortamda bulunan ve bu besiyerinde gelişebilen refakatçi floranın hedef mikroorganizmayı baskılaması sorunu ortaya çıkar ve bu sorun agarlı besiyerlerinde daha fazla önemli olur. Bu durumda analiz edilecek gıdada hedef mikroorganizma yanında aynı besiyerinde gelişebilecek refakatçi floranın varlığına göre besiyeri seçimi önemli olmaktadır ve bu özellik öncelikle gıda çeşidine ve ürünün işleme teknolojisine göre değişir.

-Hedef mikroorganizmanın aranacak veya sayılacak olması, eğer sayılacak ise beklenen veya kabul edilen sayısı yöntem ve/veya besiyeri seçiminde doğrudan bağlayıcıdır.

-Rutin gıda kontrolü ile belirli bir araştırmaya yönelik çalışmalarda kullanılacak analiz yöntemi ve/veya besiyeri farklılık gösterir.

-Prensip olarak aynı materyal kullanılmak kaydı ile aranacak / sayılacak mikroorganizmayı en yüksek sayıda gösteren analiz yöntemi ve/veya besiyerinin daha doğru sonuç verdiği kabul edilir.

03. Kültürel Sayım Yöntemleri

03.01. Koloni Sayımı

Bu yöntemlerin prensibi mikroorganizmanın katı besiyerinde koloni oluşturması, bu kolonilerin sayılarak örnekteki mikroorganizma sayısının hesaplanmasıdır. Dökme, yayma ve damlatma olarak 3 şekilde uygulanır.

03.01.01. Dökme Yöntemi

Dökme yönteminde 1 ml örnek steril Petri kutusuna pipetlenir, üzerine 45 °C 'a kadar soğutulmuş agarlı besiyerinden yaklaşık 15 ml dökülür, besiyeri ile örnek karıştırılır, besiyeri katılaştıktan sonra petri kutuları inkübasyona bırakılır. Bu yöntemin avantajı ekim yapılacak tüpten 1 ml pipetlendiği için yayma yöntemine göre 10 misli daha az mikroorganizma içeren örneklerde sayım yapılabilmesidir. Dezavantajları ise sıcak dökülen besiyerinin mikroorganizmaya zarar verme olasılığının yüksek olması, besiyerinin petrilere ekim yapıncaya kadar erimiş halde (50 °C su banyosunda) tutulması ve bunun besiyeri üzerine olumsuz etkisi, herhangi bir ekim hatasında yedek besiyeri kullanımındaki sıkıntılar, mikroorganizmaların petri kutusunun tabanına veya besiyeri yüzeyine yakın olmalarına bağlı olarak oksijenden farklı düzeyde faydalanmaları ve dolayısı ile farklı düzeyde gelişmeleridir.

03.01.02. Yayma Yöntemi

Yayma yönteminin esası, önceden petri kutularına dökülüp katılaştırılmış (hatta bu şekilde stoklanmış) ve belirli bir düzeyde kurutulmuş besiyerleri üzerine 0,1 ml örnek aktarılacak drigalski spatülü denilen kıvrık bir cam baget ile bu miktarın besiyeri yüzeyine yayılmasıdır. Yukarıda dökme yöntemi için verilen tüm dezavantajlar bu yöntemde avantaj, avantaj olarak verilen ise dezavantajdır. Bu yöntemin uygulanmasında dikkat edilmesi gereken hususlar drigalski spatülünün sterilize edildiği alkol çözeltisinin (%70 v/v) sürekli olarak yenilenme ve kontrol gerekliliği, alkol ile drigalski spatülünün temas süresinin 5-10 dakikadan az olmaması gerektiği ve buna göre yeterli sayıda spatül bulundurulması, alkolden çıkarılan spatülün bunzen beki alevinden geçirilme nedeninin ısı ile sterilizasyon değil sadece alkolü uzaklaştırmak olduğunun unutulmaması, beherdeki alkolün alev almasının önlenmesidir. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında en yaygın olarak kullanılan ve kullanımı önerilen yöntem budur.

03.01.03. Damlatma Yöntemi

Damlatma yönteminde ise 0,01 (ya da 0,05 ; besiyeri uygun ise 0,1) ml örnek Petri kutusunda önceden dökülmüş, katılaştırılmış ve belirli bir düzeyde kurutulmuş besiyeri üzerine damlatılır, yayma yapılmadan besiyerinin damlayı emmesi beklenir. Dolayısı ile koloniler sadece yaklaşık 2-3 cm kadar çapı olan bir alanda yoğun ve bu nedenle küçük olarak gelişir. Bu yöntemin rutin gıda kontrolünde kullanımı yaygın değildir. Bir petri kutusunun tabanının 2; 3; 4; hatta 6' ya bölünerek her bölmede farklı örnek ve/veya seyreltiden ekim yapılması, buna göre laboratuvarında besiyeri ve petri kutusundan tasarruf sağlanması bu yöntemin en büyük avantajıdır. Bu yöntem sayımdan ziyade titre belirleme (yarı kantitatif sayım) amacıyla kullanılabilir. Örneğin bir gıda maddesinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının 100.000 adet/g olmasına ilgili tüzük ve/veya standarda göre izin veriliyor ise ve işletme için sadece bu değerinin altında kalmak önemli ise 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltilerden 0,01 ml damlatma yöntemi ekim yapılır. İnkübasyondan sonra 10^{-2} seyreltidede bir kaç koloni var, ancak 10^{-3} seyreltidede gelişme yok ise sayım sonucu 10000 adet/g 'dan fazla ancak 100.000 adet/g 'dan daha az olarak verilebilir. Ancak istatistik yaklaşım altında bu sonucun sadece bir ön bilgi olduğu, eğer 10^{-2} seyreltidede de koloni gelişimi olmaz ise ilgili tüzük ve/veya standarda uyulduğu söylenebilir. Oluşan kolonilerin büyüteç ile sayılarak daha doğru sayım sonucu alınması mümkündür.

03.01.04. Petri film

Besiyeri bir film tabakası halinde plastik bir destek tabakasına bir film tabakası halinde dökülmüş, kurutulmuş ve bu şekilde kullanıma hazır steril preparat haline getirilmiştir. Analiz aşamasında üstteki korutucu tabaka kaldırılarak 1 ml örnek 5 cm çaplı bu alana aktarılır, koruyucu tabaka kapatılır ve özel bir aparatla bu hacmin tüm alana yeknesak olarak dağılması sağlanır. Standart inkübasyon sonunda koloniler sayılarak işlem bitirilir. Petri film yönteminin en büyük üstünlükleri laboratuvarında besiyeri hazırlamaya gerek kalmaması, cam petrielerde olduğu gibi yıkama zorluğunun olmaması, 1 ml örnek aktarıldığı için analiz duyarlılığının standart yayma yönteminden 10 misli fazla olması, inkübatörde standart petri kutuları ile kıyaslanmayacak kadar az yer kaplaması ve gerektiğinde bunların kurutulup saklanabilmesidir. Farklı mikroorganizma grupları için (toplam aerobik mezofilik bakteri, koliform grup, maya - küf vb.) farklı besiyerleri sağlanabilmektedir.

03.02. Koloni Sayısının Hesaplanması

Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın inkübasyon bitiminde petri kutularında sayım vakit geçirmeden yapılmalıdır. Önceleri 30-300 arasındaki koloni içeren seyreltilerdeki ekimler dikkate alınır iken, son zamanlarda ardışık iki seyreltiden yapılan ekim sonuçlarından hareketle ve ağırlıklı aritmetik ortalama ile örnekteki sayı hesaplanmaktadır. Bu hesaplamada kullanılan formül; $N = C / [V(n_1 + 0,1 X n_2) X d]$ şeklindedir ve 15-300 arasındaki koloni sayımları dikkate alınmaktadır.

N = Gıda örneğinin 1 g ya da 1 ml'sinde mikroorganizma sayısı

C = Sayımı yapılan tüm petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V = Sayımı yapılan petri kutularına aktarılan hacim (ml)

n_1 = İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

n_2 = İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

d = Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranıdır.

Yeni terminolojide sayım sonucunda elde edilen sayı "adet/g" olarak değil kob/g olarak verilmektedir. Kullanılan besiyerinde canlı olduğu halde gelişip koloni oluşturamayan mikroorganizmalar bulunabilir. Bunların sayılmadığını ve sadece koloni oluşturanların sayıldığını belirtmek için "Koloni Oluşturan Birim ; kob) deyiminin (Colony Forming Unit ; cfu) kullanımı daha doğrudur.

Örnek 1: Dökme kültürel sayım yöntemi uygulanmış ve her seyreltiden 2 petri kutusuna ekim yapılmıştır. 10^{-2} seyreltide 190 ve 163, 10^{-3} seyreltide 25 ve 16 adet koloni elde edilmiştir.

$$C = 190 + 163 + 25 + 16 = 394$$

V = 1 (dökme kültürel sayım için petri kutularına 1'er ml pipetlenmiştir)

$n_1 = 2$ (10^{-2} seyreltiden ekim yapılan 2 petri değerlendirmeye alınmıştır)

$n_2 = 2$ (10^{-3} seyreltiden ekim yapılan 2 petri değerlendirmeye alınmıştır)

d = 10^{-2} (ardışık 2 seyreltinin daha konsantre olanın seyreltme oranıdır)

$N = C / [V(n_1 + 0,1 X n_2) X d] = 394 / [(2 + 0,1 X 2) X 10^{-2}] = 394 / (2,2 X 0,01) = 17909$. Bu değer virgülden sonra 1 desimal ile gösterilmeli ve sonuç $1,8 \times 10^4$ kob/g (sıvı ise ml) olarak verilmelidir.

Örnek 2: Yukarıdaki örnek yayma kültürel sayım yöntemi ile yapılmış, ve petri kutularında aynı sayılarda koloni elde edilmiş olsa idi sadece $V=0,1$ ml olur ve sayım sonucu $1,8 \times 10^5$ kob/g olarak hesaplanır.

Örnek 3: Bir sıvı gıdada yayma yöntemi kullanılmış ve orijinal örnekten (10^0 seyrelti) 280, 310, 10^{-1} seyreltiden ise 12 ve 16 adet koloni elde edilmiştir.

$$C = 280 + 16 = 296 \text{ (300' den fazla ve 15' den az koloniler dikkate alınmamaktadır)}$$

$$V = 0,1$$

$$n_1 = 1 \text{ (2 petriden 1 adedi sayım için değerlendirilmiştir)}$$

$$n_2 = 1 \text{ (2 petriden 1 adedi sayım için değerlendirilmiştir)}$$

$$d = 10^0 = 1 \text{ (orijinal örnek kullanılmıştır).}$$

$$N = 296 / [0,1(1 + 0,1 \times 1) \times 1] = 296/0,11 = 2690 = 2,7 \times 10^3 \text{ kob/ml}$$

Örnek 4: Bir katı gıdadan dökme yöntemiyle yapılan sayımda 10^{-1} seyreltiden 5 ve 8, 10^{-2} seyreltiden 0 ve 0 sonuç alındı ise 5 ve 8 değerleri 15' den az olduğu için değerlendirme yapılmamalıdır. Ancak sayımın yapılabileceği başka bir değer de yoktur. Bu nedenle sonuç $N = (5+8) / [1(2 + 0,1 \times 0) \times 0,1] = 13/0,2 = 65$ kob/g olarak değerlendirilir ve şüpheli sonuç olarak belirtilir.

Örnek 5: Bir katı gıdadan 10^{-1} ve 10^{-2} seyreltilerden dökme yöntem ile analiz yapılmış ve 4 petride de koloni sayılamamıştır. İlk dilüsyondan (10^{-1}) petri kutularında 1 ml ekim yapıp 0 sonuç alındığına göre "örnekte 10 kob/g 'dan daha az mikroorganizma" vardır şeklinde sonuç verilir. Buradaki mantık eğer 10^{-1} seyreltiden yapılan ekimlerde 1 petri kutusunda 1 koloni olsa idi 4. örneğe göre sonuç $V = 1 / [1(1 + 0,1 \times 0) \times 0,1] = 10$ kob/g olarak verilecek idi. Ancak burada sonuç bu değerden daha azdır. Dolayısıyla sonuç >10 kob/g olarak verilir. Bu gösterim, "analiz yapılan yöntemin duyarlılığı 1 gramda 10 'dan daha az olan mikroorganizmaları belirlemeye yetmemektedir. Burada da 1 gram gıdada 10 'dan daha az sayıda koloni oluşturan mikroorganizma vardır" anlamına gelir.

Damlatma yöntemi ile yapılan sayım sonuçlarında sayma gerekiyor ise yukarıda verilen formül ve örneklere uygun olarak 5-50 adet arasındaki koloniler dikkate alınır. Damlatma yönteminde 0,01 ml yerine 0,05 ml, hatta 0,1 ml hacimler kullanılabilir. Bu durumda formülde V olarak sırası ile 0,01 ; 0,05 ve 0,1 kullanılmalıdır.

Sayım sonuçları örnekteki gerçek sayıyı vermeyebilir. Petri kutularında elde edilen koloni sayıları azaldıkça hata olasılığı artmakta tersine olarak petri kutularındaki sayı arttıkça hata olasılığı da azalmaktadır. Ancak petri kutularında 300' den fazla sayıda koloni oluştuğunda matematiksel olarak daha doğru sonuç alınmakla beraber bu kez sayım yapılırken hata oluşması ve bazı kolonilerin sayılmaması nedeni ile üst sınır olarak 300 değeri alınmaktadır. Örneğin bir sıvı gıdadan 2 petriye 1 'er ml ekim yapılsa ve sonuçlar 0 ve 1 olarak elde edilse sonuç 1 adet/ml olarak verilir. Oysa örneğin 1 ml' sinde gerçekte olan sayı %95 güvenlik sınırı dikkate alındığında 0 ile 3 arasında iken böyle bir sonuç alınabilir. Bir diğer deyiş ile gerçek sayıdan %97 daha az ile %457 daha çok sonuç alınabilir. 2 petri kutusunda toplam 30, ortalama 15 adet koloni sayıldı ise yine %95 güvenlik sınırı ile bu değerler gerçekte 10-21 adet arasında olabilir ve hata payı %32 daha az ve %43 daha çok şeklinde gösterilir.

Sayım sonucu ile bulunan değerlerin %95 güvenlik sınırları ile alabileceği değerlerin hesaplanmasında kullanılan formül; $\delta = [(C/B) + (1,92/B) \pm (1,96 \times \sqrt{C/B})] / d$ 'dir.

Bu formülde B olarak gösterilen değer $B = V(n_1 + 0,1 \times n_2)$ 'dir. 1,92 ve 1,96 değerleri istatistik sabitlerdir. Diğer birimler yukarıdaki formülde açıklanmıştır.

Yine yukarıda örnek 1' deki $1,8 \times 10^4$ adet/g değeri (dökme kültürel sayım; 10^{-2} seyreltide 190 ve 163; 10^{-3} seyreltide 25 ve 16 koloni) bu formüle göre;

$B = 1 \times (2 + 0,1 \times 2) = 2,2$ ve $C = 190 + 163 + 25 + 16 = 394$ olmak üzere;

$\delta = [(394/2,2) + (1,92/2,2) \pm (1,96 \times \sqrt{394 / 2,2})]/0,01 = (180 \pm 18)/0,01$ ve buradan

$\delta_1 = 19800 = 2,0 \times 10^4$; $\delta_2 = 16200 = 1,6 \times 10^4$ olarak bulunur.

Bir diğer deyiş ile ilk formül ile elde edilen $1,8 \times 10^4$ değeri %95 güvenlik sınırları içinde $2,0 \times 10^4$ ile $1,6 \times 10^4$ arasındaki bir değerdir ve yuvarlatma yapılmadan alınan $N = 17909$; $\delta_1 = 19764$ ve $\delta_2 = 16228$ değerleri kullanıldığında hata olasılığı; $[(19864/17909) - 1] \times 100 = + \%10,4$ ve $[(16228/17909) - 1] \times 100 = - \%9,4$ olarak bulunur.

Petri kutularından elde edilen koloni sayısı azaldıkça hata olasılığının arttığı yukarıda belirtilmiş idi. 15' den az kolonilerin sayılmama kuralı dikkate alınmadan ve yukarıdaki örneğe yakın olarak; dökme kültürel sayımda 10^{-3} seyreltiden 19 ve 16, 10^{-4} seyreltiden 3 ve 2 koloni elde edildi ise sonuç 18182 olarak alınacak, $\delta_1 = 24690$ ve $\delta_2 = 13420$ olarak hesaplanacak, hata sınırı ise $+\%35,8$ ile $-\%26$ olarak bulunacaktır.

Bir örnekte sayım için yarı selektif bir besiyeri kullanıldı ise aranan mikroorganizma sayısı belirli bir identifikasyon işleminden sonra yapılabilir. Örneğin koliformların sayımı için yaygın olarak kullanılan VRB Agar besiyerinde gelişen tipik koloniler koliform grup olarak sayıldıktan sonra bunların içinde kaç adet *E. coli* olduğu da belirlenebilir. Bu amaçla koliform grup bakterileri içinden koloni sayısına göre 5-20 arasında olmak üzere rast gele seçim yapıp bunlar izole edilip her biri ayrı ayrı tanımlanır. Bunlar içindeki *E. coli* sayısı toplam koliform grup bakterisi sayısı ile oranlanır, seyreltme faktörü dikkate alınarak analiz edilen örnekteki *E. coli* sayısı hesaplanır.

Örnek: Petri kutusunda toplam 60 adet tipik koliform bakteri kolonisi vardır. Bunlardan 15 adedi izole edilmiş, yapılan identifikasyon sonunda 15 koloninin 9 'unun *E. coli* olduğu belirlenmiştir. Buna göre 15 koloninin 9 'u *E. coli* ise 60 koloninin 36 adedi *E. coli* 'dir.

Örnek: PALCAM Agar besiyerinde 30 adet tipik *Listeria* kolonisi görülmüş, bunların 15 adedi izole edilmiş, identifikasyon sonunda bunların 3 'ünün *Listeria* olmadığı anlaşılmış, daha ileri çalışmalar yapılarak kalan 12 izolatin 4 adedi *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Buna göre 15 koloniden 12 'si *Listeria* olduğuna göre 30 koloninin 24 adedi *Listeria* olarak değerlendirilir. Sonuç bu şekilde verilebileceği gibi ileri çalışmalar ile bunların 4 adedi *L. monocytogenes* olarak saptandığına göre sonuç, 12 koloninin 4' ü *L. monocytogenes* ise 24 koloninin 8 adedi *L. monocytogenes* 'dir şeklinde verilir. Burada dikkat edilmesi gereken husus ikinci kısmın 30 değil doğrulanmış 24 koloni üzerinden hesaplanması gerektiğidir.

03.03. En Muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi

Yöntemin prensibi ardışık 3 seyreltiden sıvı besiyerlerine ekim yapıp inkübasyon sonunda gelişme olanları pozitif olarak değerlendirmek ve istatistik yöntemlerle elde edilmiş tablolardan yararlanılarak örnekteki sayıyı hesaplamaktır. Yöntemin "En Muhtemel Sayı (Most Probable Number; MPN) olarak adlandırılma nedeni yukarıda da belirtildiği gibi örnekteki

mikroorganizma sayısının istatistik şekilde elde edilmiş tablolardan yararlanılarak hesaplanmasıdır.

EMS yöntemi tüp dilüsyon yönteminin bir modifikasyonudur. Özellikle az sayıda (1 gramda 10' dan daha az) mikroorganizma içeren gıdaların mikrobiyel analizinde kullanılır. Yüksek sayıda mikroorganizma içeren gıdalarda EMS yöntemi ile sayım (eğer zorunluk yoksa) önerilmemektedir. Simetrik ve asimetrik olarak tanımlanan 2 ekim yönteminden genellikle kullanılan simetrik ekimdir. Simetrik ekimde ardışık seyreltilerden aynı sayıda besiyerine (çoğunlukla 3 'er tüp) ekim yapılırken, asimetrik olanda farklı seyreltilerden farklı sayıda tüplere ekim yapılır. Asimetrik ekim çok özel çalışmalarda ve nadiren kullanıldığından EMS yöntemi denildiğinde doğrudan simetrik ekim anlaşılır.

EMS yönteminde ardışık 3 seyreltiden 3 'er tüpe ekim yapılması gıda mikrobiyolojisinde en yaygın uygulamadır. Seyreltilerden 5 'er ya da 10 'ar tüpe ekim yapılması da söz konusudur. Her seyreltiden ekim yapılan besiyeri sayısı arttıkça daha doğru sonuç alınacağı açık olmakla ve güvenlik sınırları daralmakla beraber 3 tüp yöntemi ile yeterince tatminkar sonuçlar alınmaktadır. Ardışık 3 seyrelti yerine 4 hatta 5 seyreltiden ekim yapılması sayımda esas alınacak seyrelti serisinin seçilmesi açısından önemlidir ve bu konuda aşağıda ayrıntılı bilgi verilmektedir. Ardışık 4 ya da 5 seyreltiden ekim aynı tüplerin hem koliform grup mikroorganizma hem de *E. coli* sayımında kullanılmasında eğer koliform grup bakteri sayısı *E. coli* 'den çok fazla ise bir anlamda zorunluluktur.

Yöntemin uygulanışı basit olarak ardışık 3 seyreltiden 3 'er adet 10 ml besiyerine 1 'er ml ekim yapılması olarak tanımlanabilir. Gıda örneği sıvı ise orijinal örnekten (10⁰ seyrelti) ekime başlanılabilir, böylelikle yöntemin duyarlılığı 10 kez artırılmış olur. Katı gıdada ise en düşük olarak 10⁻¹ , 10⁻² , 10⁻³ seyreltilerden 1 'er ml ekim yapılabilir. Katı gıdada aranacak bakteri sayısı 10⁻¹ 'den yapılan ekimde dahi negatif sonuç alınacak kadar az ise ve sayım yapılması mutlak gerekli ise ;

- Eğer gıda toz veya granüler yapıda ise veya zarar vermeden basit bir şekilde toz veya granüler hale getirebiliyor ise (örneğin baharatlar, sade bisküvi, galeta vb.) aseptik olarak tartılan 1 'er g örnek doğrudan 10 'ar ml besiyerlerine aktarılır. Bir diğer deyiş ile sıvı gıdalarda olduğu gibi 10⁰ seyreltiden ekime başlanır, 10⁻¹ ve 10⁻² seyreltilerden de ekim yapılır.

- Eğer gıda yukarıdaki şekilde rahatlıkla 1 g olarak tartılamıyor ise standart 10 g + 90 ml şeklinde homojenize edilir, 10⁻¹ seyreltiden 10 ml hacim alındığında orijinal örnekten 1 g alınmış gibi olur. Burada dikkat edilmesi gereken husus 10 ml besiyerine 10 ml örnek aktarıldığında besiyerinin konsantrasyonunun yarı yarıya azalacağı, bunun önüne geçmek için başlangıçta bu besiyerlerinin çift kuvvette (2 misli konsantrasyonda) hazırlanmasıdır. Örneğin, koliform grup analizinde kullanılan LST Broth besiyeri normal olarak 35,5 g/l konsantrasyonda hazırlanır, 10 ml tüp içinde 0,355 g madde vardır. Çift kuvvetle hazırlanması gerektiğinde başlangıçta 71 g/l (0,71 g/10 ml) olarak hazırlanır, bunun üzerine 10 ml örnek konulduğunda LST konsantrasyonu 0,71 g/10 ml 'den = 0,355 g/10 ml standart değere iner. Kuşkusuz bu tip ekimler için yeteri büyüklükte tüp kullanılmalıdır. Bu işlem için daha doğru olarak 10 'ar ml hacimler, içlerinde 100 ' er ml standart besiyeri olan erlenlere aktarılmalıdır.

EMS yönteminde ardışık seyreltilerden 3 'er besiyeri tüpüne ekim yapıldıktan sonra tüpler aranacak mikroorganizma için optimum sıcaklıkta ve gereken sürede inkübe edilir, bu sürenin sonunda her seyreltide kaç tüpte pozitif sonuç alındığı kaydedilir. Örneğin sırasıyla 3 , 2 , 0

pozitif sonuç alındı ise EMS tablosundan bu değerin karşılığı olan 93 sayısı elde edilir ve seyreltme dikkate alınarak EMS hesaplanır. Aşağıda bu konuda ayrıntılı örnekler verilmiştir.

Tüplerin pozitif ya da negatif olduğunun değerlendirilmesi aranan mikroorganizma ve buna bağlı olarak kullanılan besiyerine göre çok değişir. Bu değerlendirme basit olarak besiyerinde bulanıklık olması, durham tüpünde gaz birikmesi, besiyerinde renk değişimi, pıhtılaşma, floresan oluşumu, tüpe inkübasyon öncesi ilave edilen katı parafin tabakasının yukarı itilmesi gibi çok basit olarak yapılabilir. Buna karşın klasik yöntemle *E. coli* aranmasında olduğu gibi gaz görülen tüplerden bir başka besiyerine ekim ve tekrar inkübasyon, bunlarda gelişen kültürlerin katı besiyerine sürülmesi, tipik kolonilere biyokimyasal testler uygulanması gibi uzun bir değerlendirme serisi ile de yapılabilir. Örneğin başlangıçta gaz oluşumu 3 ; 2 ; 0 olarak değerlendirilip, daha sonra pozitif olan toplam 5 tüpten tekrar yapılan ekimlerde sırası ile 2, 1, 0 sonuç alındı ise, bu kez pozitif veren toplam 3 tüpten katı besiyerine yapılan ekimler ve biyokimyasal testler sonucu 1, 0, 0 gibi bir sonuç alındı ise EMS tablosundan 1, 0, 0 karşılığı olarak 4 sayısı alınır.

EMS yöntemi uygun besiyeri kullanmak koşulu ile her mikroorganizmanın sayımı için kullanılabilir. Örneğin nutrient broth kullanılarak EMS yöntemi ile toplam mezofil aerob bakteri sayılabilir. Bu yöntem ile salmonella da sayılabilir. Standart olarak hazırlanan seyreltilerden klasik *E. coli* sayımı mantığı ile ancak *Salmonella* aranması için kullanılan besiyerleri kullanılarak *Salmonella* sayısı belirlenebilir. Burada dikkat edilmesi gereken husus 25 g gıda örneği ile yapılan testin sadece var/yok testi olduğu, oysa bu yöntemde standart olarak hazırlanan seyreltilerden ekimlerin yapılacağı şeklindedir.

EMS yönteminde değerlendirme amacı ile çok sayıda ve farklı yaklaşımlar ile tablolar hazırlanmıştır. Bunlardan en yaygın kullanılanı çizelge 1' de verilmiştir. Çizelgede normal olarak $3^4 = 72$ adet olasılık verilmesi gerekirken bazı sayım sonuçları verilmemiştir. Normal olarak en az konsantre olan seyreltiden (örneğin 10^{-3}) 3 tüpten 3 pozitif sonuç elde edildi ise bundan 10 kez daha fazla örnek ve dolayısı ile 10 kez daha fazla sayıda mikroorganizma içermesi beklenen 10^{-2} seyreltiden yapılan 3 tüpün 3 'ünde de pozitif sonuç alınması beklenir. Benzer şekilde 10^{-1} seyreltiden 3 tüpe yapılan ekimde de 3 pozitif sonuç alınmalıdır. Ancak 0-0-3 ya da 1-0-3 gibi bir sonuç alınır ise böyle bir durumun istatistik olarak çok küçük bir olasılıkla gerçekleşebileceği ve deney sırasında çok büyük bir olasılıkla hata yapılmış olduğu açıktır. Örneğin 2-0-2 ; 3-2-1 gibi sonuçların laboratuvar analizleri sırasında hata yapılmadan elde edilme olasılığı %0,1 kadardır. 0-0-2 ; 1-1-3 gibi sonuçların hatasız elde edilme olasılığı ise yoktur. Çizelgede pozitif tüpler ; 1-0,1-0,01 olarak verilen ekimler sırasıyla 10^0 ; 10^{-1} ; 10^{-2} seyreltilerden sırasıyla 1 'er ml ekim yapılması anlamındadır. Yukarıda da belirtildiği gibi katı gıdanın 10^{-1} seyreltisinden 10 ml ekim, 10^0 seyreltiden 1 ml ekim anlamındadır. Bu şekilde yapılan ekim sonucunda örneğin 2-1-0 sonucu elde edildi ise gıdanın 1 ml' sinde (ya da 1 gramında) 1,50 adet mikroorganizma olduğu, bu sayının %95 güvenlik sınırlarında 0,40 ile 3,80 arasında olabileceği, güvenlik sınırı olarak %99 seçilirse gıdadaki sayının 0,20 ile 5,20 arasında olabileceği anlaşılır.

Sıvı bir gıdada sırasıyla 10 - 1 - 0,1 ml ekim yapıldı ve yine 2-1-0 sonucu elde edildi ise yukarıdaki örnekte verilen tüm değerler 10 ml için geçerlidir, bir diğer deyişle gıdanın 1 ml' sinde $1,50/10 = 0,15$ adet mikroorganizma bulunmaktadır. Tersine olarak sırasıyla 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} seyreltilerden yapılan ekimlerde yine 2-1-0 sonucu alındı ise 1 g (ya da 1 ml) örnekte $1,50/0,01 = 150$ adet mikroorganizma bulunmaktadır. Güvenlik sınırları da bu örneklere paralel olarak alınmalıdır.

Çizelge 1. EMS Çizelgesi Adet/g ; Adet/ml (Partiden 1 örnek alınması)

Pozitif Tüpler			Sayı ve Kategori	% 95 Güvenlik Sınırı	%99 Güvenlik Sınırı			
1 ml	0,1 ml	0,01 ml	EMS	Kategori	Alt	Üst	Alt	Üst
0	0	0	< 0,30	-	0,00	0,94	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,10	3	0,40	3,50	0,20	4,60
1	2	0	1,10	2	0,40	3,50	0,20	4,60
1	2	1	1,50	3	0,50	3,80	0,20	5,20
1	3	0	1,60	3	0,50	3,80	0,2	5,20
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,40	2	0,40	3,50	0,20	4,60
2	1	0	1,50	1	0,40	3,80	0,20	5,20
2	1	1	2,00	2	0,50	3,80	0,20	5,20
2	2	0	2,10	1	0,50	4,00	0,20	5,60
2	2	1	2,80	3	0,90	9,40	0,50	14,20
2	3	0	2,90	3	0,90	9,40	0,50	14,20
3	0	0	2,30	1	0,50	9,40	0,30	14,20
3	0	1	3,80	2	0,90	10,40	0,50	15,70
3	0	2	6,40	3	1,60	18,10	1,00	25,00
3	1	0	4,30	1	0,90	18,10	0,50	25,00
3	1	1	7,50	1	1,70	19,90	1,10	27,00
3	1	2	12,00	3	3,00	36,00	2,00	44,00
3	2	0	9,30	1	1,80	36,00	1,20	43,00
3	2	1	15,00	1	3,00	38,00	2,00	52,00
3	2	2	21,00	2	3,00	40,00	2,00	56,00
3	2	3	29,00	3	9,00	99,00	5,00	152,00
3	3	0	24,00	1	4,00	99,00	3,00	152,00
3	3	1	46,00	1	9,00	198,00	5,00	283,00
3	3	2	110,00	1	20,00	400,00	10,00	570,00
3	3	3	>110,00					

Farklı literatürde EMS konusunda yine her seyreltiden 3 'er besiyerine ekilmesi halinde farklı EMS değerleri, farklı kategoriler ve farklı güvenlik sınırı değerlerine rastlanabilir.

Çizelge 1'deki kategoriler aşağıdaki şekilde açıklanabilir.

-Kategori 1: Üründeki mikroorganizma sayısı hesaplanan sayıya eşit olduğunda bu kombinasyon ile elde edilen sonuç elde edilebilecek kombinasyonlar içinde en yüksek olasılığa sahip olanlardan birisidir. Bu kategoride en az olasılıkla (güvenlik sınırı değerleri) elde edilebilecek bir sayım sonucundan daha düşük bir olasılıkla sonuç elde etme olasılığı en fazla %5 'dir.

-Kategori 2: Üründeki mikroorganizma sayısı hesaplanan sayıya eşit olduğunda bu kombinasyon ile elde edilen sonuç elde edilebilecek kombinasyonlar içinde kategori 1'den daha az bir olasılıkla elde edilebilir. Ancak bu kategoride en az olasılıkla (güvenlik sınırı değerleri) elde edilebilecek bir sayım sonucundan daha düşük bir olasılıkla sonuç elde etme olasılığı en fazla %1 'dir.

-Kategori 3: Üründeki mikroorganizma sayısı hesaplanan sayıya eşit olduğunda bu kombinasyon ile elde edilen sonuç elde edilebilecek kombinasyonlar içinde kategori 2'den daha az bir olasılıkla elde edilebilir. Ancak bu kategoride en az olasılıkla (güvenlik sınırı değerleri) elde edilebilecek bir sayım sonucundan daha düşük bir olasılıkla sonuç elde etme olasılığı en fazla %0,1 'dir.

EMS yöntemi ile analize başlanılmadan önce kabul edilebilir kategori seçilmelidir. Örneğin kategori 2 başlangıçta kabul edildi ise sonucun 1 ve 2 nolu kategoriye girmesi halinde sonuç değerlendirmeye alınmalı, ancak örneğin 3-2-3 gibi 3. kategoriye giren bir sonuç alındı ise değerlendirme yapılmamalıdır. Kuşkusuz hedeflenen kategori 1 olmalıdır.

Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarında rutin analizlerde sıvı ya da katı örnek olsun 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltilerden ekim yapılması yeterlidir. Rutin analizde istenmeyen mikroorganizmaların sayımı için (koliform grup, *E. coli*, *Staphylococcus*, *Listeria* vb.) bu ekim sonucunun duyarlılığı yeterlidir. İşletme daha duyarlı sonuçlar elde etmek istiyorsa 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} olmak üzere ardışık 4 seyreltiden ekim yapıp sonuçlara göre EMS tablosunda kullanılacak 3 ardışık seyreltiyi seçebilir. Bu seçimde izlenmesi gereken kural aşağıda verilmiştir.

-Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 1' den fazla 3 pozitif sonuç varsa daha az konsantr olan seyrelti ile başlayan seri dikkate alınmalıdır. Örneğin gıda da 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} olmak üzere ardışık 4 seyreltiden 3' er tüpe yapılan ekimlerde sırası ile 3-3-2-1 şeklinde sonuç alındı ise 3-2-1 serisi dikkate alınmalıdır.

-Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 1 adet 3 pozitif sonuç varsa 3 pozitif alınan seri ile başlanılmalıdır. Örneğin sırasıyla 3-2-1-0 şeklindeki bir seride değerlendirilecek olan 3-2-1'dir.

-Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 0 adet 3 pozitif sonuç varsa sondaki seri dikkate alınmalıdır. Örneğin 2-1-1-0 serisinde 1-1-0 serisi kullanılmalıdır. Ancak birden çok 3 negatif sonuç varsa (örneğin 2-1-0-0) bu kez 2-1-0 serisi kullanılmalıdır.

EMS yöntemi ile tüm bakteri ve maya sayımları yapılabilir. Küfler ise sıvı besiyerlerinde rahat gelişemedikleri için EMS yöntemi ile sayılamazlar. Aşağıda farklı örnekler ile EMS yönteminin kullanılması anlatılmıştır.

Örnek 1: MUG yöntemi ile *E. coli* sayımı

10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	Seyreltmeler
U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	Her seyreltmeden 3' er tüpe ekim
+ + +	+ + +	- + +	+ - -	- - -	Koliform grup bakteriler için pozitif sonuçlar
- + +	+ - -	- - -	- - -	- - -	<i>E. coli</i> için pozitif sonuçlar

MUG, *E. coli* için spesifik bir enzim olup bu bakterinin belirlenmesinde kullanılır ve koliform grup bakteriler için kullanılan selektif besiyerlerine ilave edilerek bu besiyerlerine diferansiyel bir özellik kazandırır. Dolayısı ile bu katkının kullanıldığı tüm besiyerlerinde koliform bakteriler de *E. coli* yanında gelişirler. Bir diğer deyiş ile *E. coli* sayımı amaçlanırken *E. coli* dışındaki koliform grup bakteriler de sayılmış olur. Yukarıda açıklanan seyreltme seçimine göre koliform grup bakteriler için 3-3-2-1-0 serisinden 3-2-1 olan 3 adedi (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} seyreltilerden yapılan ekimler) dikkate alınır. Bu değer karşılığı çizelge 1' e göre 15 'tir. Ancak, değerlendirmeye 10^0 değil, 10^{-1} seyrelti ile başlandığına göre analiz edilen örnekte 10 misli daha fazla sayıda koliform grup bakteri vardır, sonuç buna göre 150 olarak verilir. Bu yöntemde koliform grup bakteriler sadece durham tüplerindeki gaz oluşumuna göre belirlenmektedir. Koliform grup bakteri sayısı pozitif tüplerden başka besiyerine ekim yapılarak da doğrulanabilir (bknz. örnek 3). MUG reaksiyonu ise basit olarak koliform grup bakterilerin pozitif olarak değerlendirildiği tüplerde floresan ışığa ile belirlenir. Yukarıdaki örneğe göre 2-1-0-0-0 şeklindeki pozitif sonuçlardan 2-1-0 şeklinde olan seri (10^0 ; 10^{-1} ; 10^{-2} seyreltilerden yapılan ekimler) dikkate alınır ve çizelge 1 'den sonuç 1,5 olarak bulunur.

Örnek 2 : Fekal koliform grup bakteri ve *E. coli* sayımı

10^0			10^{-1}			10^{-2}			10^{-3}			10^{-4}			Seyreltmeler
U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	Her seyreltmeden 3' er tüpe ekim
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	Koliform grup bakteriler için pozitif sonuçlar
-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Fekal koliform bakteriler için pozitif sonuçlar
-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. coli</i> için pozitif sonuçlar

Fekal koliform grup bakteriler dışkı kökenli oldukları için *E. coli* 'de olduğu gibi gıda maddelerinde istenmeyen bakteriler arasındadır. Fekal koliform olarak tanımlanan bakterilerin büyük çoğunluğunu *E. coli* oluşturduğu için ve fekal koliform grup bakterilerin analizinde sahte negatif veya sahte pozitif sonuçlar sıklıkla alınabilirse de bazı laboratuvarlar bu testi istemektirler. Yöntemin esası, koliform grup bakteri analizinde pozitif sonuç veren tüplerden (örnek 1 deki 3-3-2-1-0 serisinden pozitif sonuç veren toplam 9 tüpten) fekal koliform grup tayini için EC besiyerine ekim yapılması ve 45 °C' daki su banyosunda 48 saat inkübasyona bırakılmasıdır. Bu şekilde elde edilen 2-2-1-0-0 serisinden 2-1-0 olanın karşılığı olarak 15 sayısı hesaplanır. Analize yine 45 °C' da Tryptone Water besiyerinde *E. coli* analizi ile devam edilir ve 2-1-0-0-0 sonuçlarından 2-1-0 için sonuç 1,5 olarak hesaplanır. Bu analiz yöntemi günümüzde ISO/TSE tarafından gösterilen standart *E. coli* analiz yöntemidir.

Halen FDA tarafından kullanılmakta olan analiz yöntemine göre önce koliform grup bakterilerin muhtemel sayısı hesaplanır, buradan ikinci besiyerine ekim yapılarak koliformların kesin sayısı bulunur. Bu örneğe göre koliformların muhtemel sayısı 3-2-1 serisi için 150 iken doğrulanmış sayı 3-1-1 karşılığı olarak 75 'dir. Doğrulanmış koliform pozitif olan tüplerden önce EMB Agar besiyerine sürme yapılır. Burada metalik parlak yeşil koloniler muhtemel *E. coli* olarak değerlendirilir ve her petriden en az 5 adet tipik *E. coli* izolatu alınır ve her izolata ayrı ayrı IMViC testleri uygulanır. İzolatlardan bir tanesi dahi *E. coli* olarak doğrulanırsa o izolatan alındığı petri kutusunun ve dolayısıyla o petri kutusuna sürme yapılan tüp pozitif olarak değerlendirilir. Buradaki örneğe göre 2-1-0 kodu için 1,5 olarak bulunur. Burada verilen örnek

ile *Salmonella* (bkz. örnek 5), *Listeria* vb. identifikasyon gerektiren patojenlerin de EMS yöntemi ile sayımı yapılabilir.

Örnek 3 : *E. coli* 'nin IMViC testleri ile belirlenmesi

10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Seyreltmeler
U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	Her seyreltmeden 3' er tüpe ekim
+ + +	+ + +	- + +	+ - -	- - -	Koliform grup bakteriler için muhtemel pozitif sonuçlar
+ + +	+ + +	- + -	+ - -	- - -	Koliform grup bakteriler için doğrulanmış sonuçlar
O O O	O O O	O O O			EMB Agar ve IMViC Testleri
- + +	+ - -	- - -	- - -	- - -	<i>E. coli</i> için pozitif sonuçlar

Örnek 4 : Toplam mezofil aerob bakteri sayımı

10 ⁺¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	Seyreltmeler
U U U	U U U	U U U	U U U	Her seyreltmeden 3' er tüpe ekim
+ - -	- + -	- - -	- - -	Toplam mezofil aerob bakteri sayımı

Rutin gıda kontrollerinde toplam aerob mezofil bakteri Plate Count Agar gibi genel bir besiyerinde sayılır. Eğer asitli alkolsüz meşrubatlar gibi bir örnekte bu grup bakteriler sayılacak ise en makul yöntem aşağıda belirtildiği gibi membran filtrasyon sistemidir. Bu olanak yoksa Nutrient Broth, Tryptic Soya Pepton Broth gibi bir genel besiyerine inokülasyon ve 28-30 °C' da 48 saat inkübasyon sonunda gelişme görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilir. Buradaki örnekte 1-1-0-0 şeklinde pozitif sonuç veren seriden bir adet 0 sonuç olması kuralına göre 1-1-0 kodu alınır ve sonuç tablodan 0,74 olarak bulunur. Ancak örnekte görüldüğü gibi bu sonuç ekimler 10⁺¹ ; 10⁰ ; 10⁻¹ şeklinde bir ekimden elde edilmiştir. 10⁺¹ seyreltmeden ekim bir seyreltme değil, tam tersine bir konsantrale hale getirmedir ve buradaki örnekte 10⁰ seyreltmeden örneğin kendisinden çift kuvvette hazırlanmış 10 ml besiyerine 10 ml ekim yapıldığı anlaşılmaktadır. Dolayısı ile 0,74 değeri 10 ml örnekte bulunan değerdir. Buna göre sonuç 7,4 adet/100 ml EMS olarak verilir. İnoküle edilen tüplerin inkübasyon koşulları değiştirilerek toplam psikrofil aerob bakteriler, ya da toplam mezofil anaerob bakteriler sayılabilir.

Örnek 3 'de verilen mantık altında *Salmonella* sayılabilir. Rutin gıda kontrollerinde *Salmonella* 25 g (ya da ml) gıdada sadece aranırken (bkz. bölüm 13) özel amaçlı çalışmalarda bu sayım EMS yöntemi ile yapılabilir. Tamponlanmış peptonlu besiyerinde inkübasyon sonunda 3-3-3-2-0 şeklinde bakteri gelişmesi olmuştur. Bunların tümünden 2 farklı selektif zenginleştirme besiyerine ekim yapılmış, inkübasyondan sonra bu 2 selektif besiyerinden 2' şer adet olmak üzere toplam 11 X 4 = 44 adet selektif katı besiyerine ekim yapılmıştır. İki selektif zenginleştirme besiyerinden ekim yapılan 4 agarlı besiyerinin her birinden en az 5 'er tipik koloni izole edilir ve bunlara ayrı ayrı biyokimyasal ve serolojik testler uygulanır. 4 petriden elde edilen 20 koloniden bir adedi dahi pozitif sonuç verirse sonuçta o izolatan geldiği

tamponlanmış peptonlu su tüpü pozitif olarak değerlendirilir. Buradaki örneğe göre 2-0-0 serisi için *Salmonella* sayısı 0,92 adet/ml EMS olarak bulunur.

Örnek 5. *Salmonella* sayılması

10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Seyreltmeler
U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	Her seyreltmeden 3' er tüpe ekim
+ + +	+ + +	+ + +	+ + -	- - -	Tamponlanmış Peptonlu Suda pozitif sonuç (bakteri gelişmesi)
U U U	U U U	U U U	U U		Selektif besiyerlerine ekim
U U U	U U U	U U U	U U		
O O O	O O O	O O O	O O		Biyokimyasal ve serolojik testler
O O O	O O O	O O O	O O		
O O O	O O O	O O O	O O		
O O O	O O O	O O O	O O		
- + +	+ - -	- - -	- - -	- - -	<i>Salmonella</i> için pozitif sonuçlar

Eğer kullanılan selektif zenginleştirme besiyerlerinde bakteriyel gelişme olup olmadığı rahatlıkla anlaşılıyor ise gelişme olmayan tüplerden selektif katı besiyerlerine ekim yapılması gereksiz olur idi. Bununla beraber aynı önzenginleştirme tüpünden 2 ayrı selektif zenginleştirme besiyerine ekim yapıp bunlardan birinde bakteriyel gelişme olmayıp diğerinde gelişme var ise ve bu gelişme olan tüpten selektif katı besiyerlerine yapılan ekimlerde oluşan kolonilerden birisi dahi *Salmonella* olarak tanımlanır ise yine bu izolatanın geldiği önzenginleştirme tüpü pozitif olarak değerlendirilir.

Listeria sayılması da burada gösterilen aynı mantık altında yapılır. Bu yöntemde ön zenginleştirmeden sonra tam ve yarı konsantr Fraser Broth tüplerinden 24 ve 48 saat inkübasyondan sonra selektif katı besiyerlerine ekim yapılır ve *Salmonella* 'da olduğu gibi izole edilen koloniler tanımlanır. EMS yönteminin esasına göre ilk ekim yapılan önzenginleştirme tüpünün pozitif ya da negatif olmasına ve seyreltilere göre *Listeria* da sayılabilir.

03.04. Spiral Plak Yöntemi

Spiral plak yöntemi uygun katı besiyeri içeren petri kutularına spiral şeklinde (Arşimet spirali) bir eksen etrafında dönen sistemde sıvı inokülümün dağıtıcı bir kol ile merkezden kenarlara doğru seyrelerek ekim yapılmasıdır. Cihaza tutturulmuş olan özel şırınga örnek hacmini 10000:1 'e kadar azaltarak dağıtmakta olup besiyerinin her bölmesine bırakılan sıvı miktarı bellidir. Uygun sıcaklıkta inkübasyon sonucunda koloni gelişiminin merkezde daha yüksek yoğunlukta olmak üzere kenarlara doğru azalarak meydana geldiği gözlenir. Yöntemde sayım, manuel olarak sisteme ait bir grid (şablon) kullanılarak veya lazerle çalışan elektronik sayıcılarla yapılır. Kolonilerin gerçek yoğunluğuna bağlı olarak bir veya daha fazla alanda görünen koloniler sayılır. Spiral plak sisteminde sadece örnek sisteme verilmekte, cihaz örneği otomatik olarak analize almakta ve sonraki örnek için sistemi sterilize etmektedir. Her ne kadar spiral plak analizinde kullanılan cihaz yüksek maliyet ile elde edilmekte ise de, analiz işlemleri sırasında başta besiyeri ve seyreltme tüplerinden tasarruf edilmekte, ayrıca pipet gibi laboratuvar malzemesi kullanılmamakta, böylece analiz giderleri kayda değer ölçüde azalmaktadır.

Spiral plak tekniği süt ve süt ürünleri başta olmak üzere çeşitli gıda maddelerinde bakteri, maya ve kf analizlerinde AOAC (Association of Analytical Chemists) tarafından önerilen bir yöntemdir.

Yöntem çok sayıda araştırıcı tarafından kullanılmış olup canlı organizmaların sayıldığı diğer yöntemlerle de kıyaslanmıştır. Yapılan çalışmalarda spiral plak yönteminin bu 3 farklı yöntemle (yayma, dökme, damlatma) elde edilen sonuçları kıyaslandığında yöntemler arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı ($p < 0,05$) saptanmıştır. Spiral plak yönteminin daha az agar ve petri kullanımı, 50-60 plak/saat kadar örneğin hazırlanma olasılığı ve aletin kullanımı için çok az eğitimin gerekli olması avantajları arasındadır. Ancak gıda partiküllerinin iğne ucunu tıkayabilmesi nedeniyle sıvı gıdalar için daha uygun olduğu söylenebilir. Cihazın fiyatının yüksek olmasına karşın çok fazla sayıda analiz yapılan laboratuvarlarda kuşkusuz büyük kolaylık sağladığı yadsınamaz.

03.05. Yüzeyden Yapılan Sayımlar

Çalışma tezgahları ve gövde et gibi çok farklı materyalde yüzeyden alınacak örneklerde çeşitli mikroorganizmaların sayımı yapılmaktadır. Daha önceleri standart bir alan steril bir şekilde işaretlenerek buradan sürtme (swab) yöntemi ile örnek alınmakta, bu sürtme çubukları örnek olarak kabul edilmekte, buradan standart seyreltme ile ekim yapılmakta iken bugün "dip slide" adı verilen ve pek çok ticari firma tarafından pazarlanan hazır besiyerleri bu amaçla kullanılmaktadır. Bu hazır besiyerleri, alanı belirli bir plastik levha üzerinde genellikle n ve arkada farklı agarlı besiyerlerini hafif dışa doğru bombeli bir şekilde bulunduran, böylelikle aynı örnekte aynı sıcaklıkta inkübe edilecek 2 farklı mikroorganizmayı (rneğin toplam aerobik mezofilik bakteri ve maya-küf ya da 35 °C' da inkübe edilmek kaydı ile toplam aerobik mezofilik bakteri ve koliformlar vb.) beraberce kontrol edebilecek sistemlerdir. Bu sistem, daha önceden kullanılmakta olan agar sucuk yönteminin geliştirilmiş bir şeklidir. Agar-sucuk yönteminde istenilen agarlı besiyeri salam gibi hazırlanmış olarak sentetik bir kılıf içinde sterilize edilmekte, steril koşullar altında salam gibi kesilen katı besiyerleri katı yüzeye deydirdikten sonra bunlar steril petri kutularında inkübasyona bırakılmaktadır. Yöntem çok pratik görülmekle beraber dışarıdan gelebilecek kontaminasyonlara kayda değer ölçüde açıktır. Oysa dip slide besiyerlerinde kontaminasyon olanağı, asgari düzeyde mikrobiyoloji deneyimine sahip kişiler için dahi hemen hemen yoktur. Dip slide besiyerlerinin bulunduğu plastik levhanın bir çentik ile bükülebilir olması besiyerinin yüzeye daha iyi temas etmesini sağlamaktadır.

03.06. Havadan rnek Alma

Çeşitli gıda işletmelerinde havada bulunan mikroorganizma sayısının bilinmesi ve buna bağlı olarak önlem alınması gerekmektedir. Havada bulunan mikroorganizma sayısını belirlemede en pratik gibi görülen yöntem, çalışma ortamına amaca uygun besiyeri dökülmüş bir petri kutusunun kapağının belirli bir süre açık bırakılması ise de, bu uygulamada belirli bir süre içinde işletme havasındaki sirkülasyona bağlı olarak farklı sayım sonuçları elde edilebilmesi gibi kayda değer bir dezavantajı vardır.

İşletme havasından özel bir vakum cihazına bağlı ve ayarlanabilir belirli bir hacimde örnek olarak bunu doğrudan sistemin önüne yerleştirilmiş ve amaca uygun bir besiyeri olan petri kutusuna temasını sağlayan havadan örnek alma cihazlarının kullanımı giderek daha yaygınlaşmaktadır.

04. Membran Filtrasyon Tekniği

Membran filtrasyon yöntemi su (içme, işletme, kullanma), meşrubat gibi sıvı gıdaların ve şeker, tuz gibi suda tam olarak çözölen katı gıdaların analizinde ve özellikle gıdada aranan mikroorganizma sayısı 10 ml 'de 1 ve daha az gibi standart EMS yöntemi ile belirlenemeyecek kadar az ise uygulanabilecek hemen hemen tek yöntemdir. Her ne kadar EMS yöntemi ile teorik olarak 3 adet 10'ar litre besiyerine 1'er litre, 3 adet 1'er litre besiyerine 100' er ml ve 3 adet 100' er ml besiyerine 10' ar ml ekim gibi uygulamalar ile EMS yönteminin duyarlığı artırılabilirse de bu tip uygulamaların rutin gıda kontrollerinde yeri yoktur.

05. Metabolizmaya Dayalı Sayımlar

Mikrobiyel aktivitenin ölçölmesine dayanan pek çok sistem içinde gıdaların rutin kontrolünde yaygın olarak kullanılan yöntem elektriki impedans ölçümüdür.

Mikrobiyel gelişimin elektriki impedans ile ölçümü kavramı 1899 yılında G.N. Stewart tarafından geliştirilmiş olmakla birlikte 1970'li yıllara kadar bu amaçla kullanılmamıştır.

İmpedans; bir elektrik devresinde doğru akıma karşı oluşan gerçek elektriki dirence benzer olarak, değişen akıma gösterilen saptanabilir dirençtir. Mikroorganizmalar besiyerinde geliştiklerinde, düşük iletkenliğe sahip substratları daha yüksek iletkenliğe sahip ürönlere metabolize ederler, böylece ortamın elektriki impedansını düşürürler. Bir diğer deyişle mikrobiyel gelişme sonucu elektriki impedansda meydana gelen değişimin ölçülebilir seviyeye ulaştığı noktayı saptama prensibidir. Elektriksel değişimin ölçülebildiği bu nokta, mikroorganizmanın saptanabilecek düzeye ulaştığı dönüm noktasıdır. Sıvı kültürlerin impedansı ölçöldüğünde, türler ve suşlar için kurveler oluşturulabilir ve spesifik gelişme inhibitörlerinin kullanımı ile karışık kültürler tanımlanabilir. Tekniğin, 10-100 hücre kadar düşük düzeydeki mikroorganizma sayısını belirleyebildiği gösterilmiştir. 10^5 - 10^6 /ml düzeyindeki hücre popölasyonu 3-5 saatte, 10^4 - 10^5 /ml düzeyindeki hücre popölasyonu ise 5-7 saatte belirlenebilir. Verilen süreler 10^6 - 10^7 hücre/ml eşiğine ulaşmak için gereklidir.

06. Mikroskopik Sayımlar

Bu sayım yöntemleri mikroorganizma sayımı yapılacak olan materyalin mikroskop altında incelenmesi prensibine dayanmaktadır. 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 birlikte bu yöntemlerin başta sayım süresi ve maliyet olmak üzere pek çok üstün yanı da bulunmaktadır. Bu yöntemlerde canlı ve ölü hücreler beraberce sayıldığından bunlar ya starter kültür gibi canlı hücre sayısının yüksek olduğu örneklerde ya da çiğ süt gibi sayılan tüm hücreler ölü dahi olsa bu sayının sütün kalitesi hakkında fikir vermesi amacıyla kullanılır. En yaygın kullanılan direk mikroskopik sayım yöntemleri aşığıda verilmiştir

06.01. Thoma Lamı ile Sayım

Özellikle maya, tıpta sperm ve kan sayımında kullanılan ve thoma lamı (hemositometre) adı verilen özel bir lam ile yapılan sayımdır. Bu lam ile bakteri sayımı oldukça güçtür ve ancak

özel durumlarda, mikroskop deneyimi olan uzmanlarca gerçekleştirilebildiği için genellikle önerilmemektedir. Thoma lamının esası, $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılmasıdır. Thoma lamının üzerinde çukur bir kısım vardır. Kültür buraya aktarılır üzerine lamel kapatıldığında bu çukurda $0,1 \text{ mm}$ yüksekliğinde bir sıvı kalır. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir. Thoma lamında 16 büyük kare, her bir büyük karede ise 25 adet küçük kare olmak üzere toplam 400 adet küçük kare bulunmaktadır. Sayım bu karelerde yapılır. Bir küçük karenin kenarları $1/20 \text{ mm}$ ($0,05 \text{ mm}$) olup derinliği $1/10 \text{ mm}$ ($0,1 \text{ mm}$) dir. Buna göre; bir küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi = $0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,00025 \text{ mm}^3 = 1/4000 \text{ mm}^3$ 'dür. Bir sayım alanında $16 \times 25 = 400$ küçük kare olduğuna göre toplam sayım alanının hacmi = $400 \times 0,00025 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ mm}^3$ olmaktadır.

Thoma lamında sayım sonucu $A \times SF \times 10000$ formülü ile hesaplanır. Burada $A=16$ büyük karede sayılan maya adedi, SF ise seyreltme faktörüdür. 10000 ise $0,1 \text{ mm}^3$ 'deki sayım sonucunu 1 ml 'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir ($1 \text{ ml} = 1 \text{ cc} = 1 \text{ cm}^3 = 10000 \times 0,1 \text{ mm}^3$). Sayımda genellikle büyük karelerin tümü dikkate alınmaz ve genellikle çaprazlama 8 büyük kare sayılıp sonuç 2 ile çarpılır. Maya sayımında seyreltme %10' luk asetik asit ile yapılır. Böylece asetik asit maya hücrelerinin kümeleşmesini önlemiş ve kolayca sayılmalarına olanak sağlamış olur.

Thoma lamında büyük kare sınırları ara çizgi olarak adlandırılan ve her 5 küçük kareyi ortasından bölen bir çizgi ile belirlenir. Ara çizgi ile 25 küçük kareden oluşan büyük kare alanı belirlenmesi zor olursa pratik olarak ara çizgiler arasında kalan 16 küçük kare bir büyük kare olarak nitelendirilebilir. Ancak bu şekilde toplam $25 \times 16 = 400$ küçük yerine $16 \times 16 = 256$ küçük karede sayım yapıldığı için yukarıdaki formül ile bulunan sonuç $400/256 = 1,5625$ ile çarpılarak 1 ml 'deki sayı bulunur.

Mikroskopta sayım için 10 veya 20 büyütme güçlü objektif kullanılır. Direk mikroskopik sayımlarda canlı ve cansız tüm hücrelerin sayımı söz konusu olduğundan bazı yöntemlerle bu iki hücrenin birbirinden ayrılması sağlanabilir. Bu konuda en iyi örnek metilen mavisi boyası ile maya hücrelerinin boyanmasıdır. Sadece ölü hücreler metilen mavisi ile boyanır, böylece maviye boyanmamış hücreler sayılarak canlı maya sayısı elde edilir.

06.02. Breed Yöntemi

Genellikle bakteri sayımında kullanılan bu yöntem belli bir hacimdeki örneğin belirli bir alan üzerine yayılması ve sayımın bu alanda yapılması esasına dayanır. Standart kullanımda hacim $0,01 \text{ ml}$ ve alan 1 cm^2 'dir.

Bu yöntem ile daha çok çiğ süt ve bazı süt ürünlerindeki canlı ve ölü bakteri sayısı belirlenmektedir. Temiz bir lam üzerine işaretlenmiş 1 cm^2 alana pipet/ Pastör pipeti veya mikropipet ile $0,01 \text{ ml}$ sıvı örnek aktarılarak yayılır. Pastör pipeti kullanıldığında hesaplamalarda değişiklik olacağı unutulmamalıdır.

Breed yönteminde önce mikroskop görüş sahasının alanı bulunur. 1 mikroskop sahasında bulunan bakteri sayısının 1 cm^2 , dolayısıyla $0,01 \text{ ml}$ 'de ne olacağı orantı yolu ile hesaplanır. En son olarak sonuç 100 ile çarpılarak 1 ml 'deki standart sayım sonucu belirlenir.

Objektif mikrometre adı verilen ve $10 \mu\text{m}$ aralıklarla çizilmiş çizgileri bulunan özel bir lam yardımı ile mikroskop görüş sahasının alanı hesaplanır. Bu amaçla 100 büyütme güçlü

objektif kullanılarak mikrometrenin çizgileri bulunur. Çizgilerin ortasından geçirilen hayali bir eksen görüş sahasının çapına denkleştirilir ve çap objektif mikrometre aralıkları cinsinden ölçülür. Objektif mikrometre ile görüş sahası belirlendikten sonra görüş sahası alanı hesaplanır. Örneğin; çap=187 µm olarak ölçüldü ise alan = $\pi r^2 = 3,14 \times (93,5)^2 = 27465 \mu\text{m}^2$ 'dir. Görüş sahası alanının objektif ve/veya mikroskop tüp boyu ve/veya oküler değiştirilmedikçe tekrar ölçülüp hesaplanmasına gerek yoktur.

Mikroskop görüş alanı ise mikroskop faktörünün hesaplanmasında kullanılır. Mikroskop faktörü, 1 cm² 'lik alan içinde kaç adet görüş sahası olduğudur. Yukarıda verilen örnekte mikroskop faktörü 1 cm² alan içindeki görüş sahasının alanı 27465 µm² olarak hesaplanmıştı. Buna göre; verilen örnek için 1 cm²/27465 µm² =3641 adet görüş sahası vardır (1 cm²= 10⁸µm²).

Mikroskop faktörü, standart 10 büyütme oküler, 100 büyütme objektif ve 160 mm tüp boyu kullanıldığında genellikle 2500-5500 arasındadır. Bu sınırlar dışında bir değer bulduysa hesaplamaların tekrar kontrol edilmesi gerekir.

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

Örnek: 20 farklı sahada ortalama olarak 1,2 bakteri sayıldı ve MF yukarıdaki örneğe göre 3641 olarak hesaplandı ise ;

1 ml 'deki bakteri sayısı = 1,2 X 3641 X 100 = 436920 = 4,4x10⁵ adet/ml 'dir.

Lam üzerine örnek aktarımda Pastör pipeti kullanıldığında Pastör pipeti damla hacmi ölçülür ve buna göre formül değiştirilir. Örneğin Pastör pipetinde 1 damla hacmi 0,0023 ml ise 1 ml içindeki damla sayısı = 1/0,0023 = 435 adettir ve formül bu kez A X MF X 435 olarak kullanılır.

06.03. Howard Lamı ile Küflü Saha Sayımı

Bu sayım yöntemi domates ve diğer meyve ürünlerinde küf misellerini saymaya yönelik olup bu gibi ürünlerin elde edilmesi sırasında kullanılan hammadde hakkında bilgi vermektedir. Yöntemin esası 25 görüş alanı içinde küf pozitif olan sahaların belirlenmesidir. Buna göre sonuç % küflü saha olarak verilir.