

KOLONİ SAYIMI

1. KÜLTÜREL SAYIM YÖNTEMLERİ

1.1. Amacı

Bir örnekte hangi tip mikroorganizmaların bulunduğu bilinmesi (çeşit,grup,cins,tür vb) yani mikroorganizmaların örnekten izole edilmesi ve tanımlanması çoğu zaman önem taşımaktadır.Bunun yanı sıra, örneğe ait bazı mikrobiyolojik problemlerin çözümünde,örnekteki mikroorganizma sayısı da önemlidir. Sayım sonuçları, incelenen örneğin mikrobiyolojik kalite yönünden değerlendirilmesinde büyük önem taşır.

Bugüne kadar pek çok mikrobiyolojik sayım yöntemi geliştirilmiştir. Kültürel sayım yöntemleri;

- Ø Amaca,
- Ø İncelenen örneğin özelliğine,
- Ø Eldeki olanaklara göre seçilerek uygulanır.

Kültürel sayım yöntemlerinin amacı; su, toprak, hava ve her türlü gıda maddesindeki mikroorganizma sayısını tespit etmektir.

Sayım sonuçları, incelenen örneğin sıvı, katı veya yüzey olmasına göre genel olarak sayı/ml, sayı/g veya sayı/cm² olarak verilmelidir. Katı besiyerlerinde koloni sayımına dönük sayım yöntemlerinde ise sonuçlar, çoğunlukla sayı yerine kob/ml, kob/g veya kob/cm² şeklinde belirtilmelidir (kob: koloni oluşturan birim-colony forming unit :cfu).

Sayım sonuçları mevcut yasa, standart, tüzük, yönetmelik vb. kaynaklarda belirtilen limitlerle karşılaştırılarak incelenen örneğin mikrobiyolojik kalitesi hakkında karara varılabilir.

1.2. Kültürel Sayım Yöntemleri

Bu yöntemlerin ilkesi; mikroorganizmanın katı besi yerinde koloni oluşturması ve bu kolonilerin sayılarak “her canlı hücre bir koloni oluşturur” prensibi ile örnekteki canlı hücre sayısının hesaplanmasıdır.

Bu amaçla;

- Ø İlk aşamada sayımı yapılacak örnek ekime hazırlanır.
- Ø Daha sonra örneğin uygun seri dilüsyonları yapılır.
- Ø Uygun agarlı besiyerine ekimleri gerçekleştirilir.
- Ø Koloni oluşturması için gerekli inkübasyona bırakılır.
- Ø İnkübasyon süresinin sonunda petri kutusundaki koloniler sayılır.
- Ø Toplam koloni sayısı dilüsyon faktörü ile çarpılarak örnekteki canlı hücre sayısı bulunur.
- Ø Sonuçta incelenen örneğin özelliğine göre kob/ml, kob/g veya kob/cm² olarak verilir.

1.2.1. Dökme Plak Yöntemiyle Kültürel Sayım

İncelemeye alınan örnekteki canlı mikroorganizmaları veya bunların sporlarını saymayı amaçlayan bir yöntemdir. Bu yöntemle bakteri, maya ve küflerle sporlarını saymak mümkündür.

Kullanılan Materyal

- Ø Otoklav
- Ø Etüv (220⁰C’ye kadar ayarlanabilir)
- Ø Su banyosu
- Ø Stomacher veya blender
- Ø Bunzen beki
- Ø Steril pens
- Ø Tüp karıştırıcı
- Ø Steril drigalski, özeler
- Ø Cam veya plastik steril petriler
- Ø Steril pipetler
- Ø Deney tüpleri, tüp taşıyıcıları
- Ø Erlen, beher
- Ø Plate Count Agar(PCA),Eosin Methylen Blue Agar(EMB)
- Ø Distile su
- Ø Örnek gıda maddesi



Resim 1.1:Ekim öncesi hazırlık

Aşamaları

- 10 g gıda maddesi tartılır ve 90 ml fizyolojik su içine konur. Bu karışım stomacher veya blenderde homojenize edilir. Bu dilüsyon -1 dilüsyonudur.
- 10^{-1} dilüsyonundan 1ml alınır ve içinde 9ml fizyolojik su bulunan deney tüpüne aktarılır. Bu 10^{-2} dilüsyonudur.
- 10^{-2} dilüsyonundan 1ml alınarak 9 ml fizyolojik su bulunan deney tüpüne aktarılır. Bu 10^{-3} dilüsyonudur.
- Üzerlerine seyreltim değerleri yazılmış petri kutularına 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dilüsyonlarından 1'er ml konulur. Petrilerin üzerindeki numaralar seyreltim numaraları ile aynı olmalıdır.
- Katı besiyeri sıcak su banyosunda eritilir, 45°C 'a kadar soğutulur. Her petriye 10-15 ml besiyeri dökülür.
- Agar katılaşmadan hemen, petri kutularına düz bir yüzey üzerinde üç kez sekiz hareketi çizdirilerek ya da kutulara saat yönünde 3, daha sonra da aksi yönde 3 defa döndürme hareketi yaptırılarak örnek ile besiyerinin homojen karışımı sağlanır.
- Kapağı kapatılan petri kutusu, besiyeri katılaşmaya kadar bekletilir.
- Aynı besiyeri sterilit kontrolü için steril iki tane boş petri kutusuna ayrı ayrı dökülür ve agarın katılaşması beklenir.
- Kapakta yoğunlaşan su damlacıklarının besiyeri üzerine damlamasını önlemek için petri kapları kapakları alta gelecek şekilde ters çevrilerek önerilen sıcaklıkta ve sürede inkübe edilir. Örneğin 22°C 'ta 24-48 saat gibi.

- j) İnkübasyon bitiminde 30 ile 300 (bazı kaynaklara göre 50- 500) arasında koloni içeren seyreltimlerin petrileri seçilir ve sayılır. Örneğin gram veya mililitresindeki mikroorganizma sayısı '' kob/gr: koloni oluşturan birim/gram'' olarak belirlenir.30'dan az 300'den fazla sayıda oluşmuş petriler dikkate alınmaz.Ancak yaklaşık sayı belirtilmesinde petri kutuları dörde veya sekize bölünerek bir değerlendirme yapılır.
- k) Toplam bakteri sayımında, farklı sıcaklık gereksinimleri olan bakteriler için;

5 -7°C'de7 – 10 gün
20 °C'de3 – 5 gün
37 °C'de.....48 saat
45 °C'de.....2 – 3 gün
55 °C'de.....48 saat inkübasyon önerilmektedir.

- 1) Analiz sonrası mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm petriler otoklavlanır ve yıkanır/atılır.

Seyreltim ve ekim işlemlerinin 15- 30 dakika içinde tamamlanmasına özen gösterilmelidir.

1.2.2. Çift Tabakalı Dökme Plak Yöntemiyle Kültürel Sayım

Ortamda sporlu bakterilerin bulunmasından şüphelenildiğinde, besiyeri üzerine ikinci bir kat besiyeri dökülerek bu grup bakterilerin neden olabileceği olumsuzluklar da ortadan kaldırılabilir.

İkinci kat besiyeri ekim yapılan birinci kat besiyerinin üstünü kaplamak ve fakültatif anaerop mikroorganizmaların gelişebileceği anaerop koşulları yaratabilmek için kullanılmaktadır.

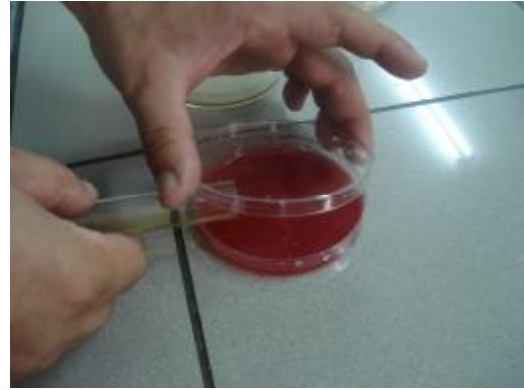
Çoğunlukla birinci ve ikinci kat besiyerleri aynıdır. Örneğin koliform grubu bakteriler, her iki katta da Violet Red Bile Agar'ın kullanıldığı çift tabakalı dökme plak yöntemiyle sayılabilir.

Aşamaları:

- Hazır tek katlı besiyeri üzerine 1ml/g numune konur. Yüzeye iyice yayılır.
- Sonra kuruması beklenir veya etüve konularak (üst kapak hafif yana kaymış şekilde) kurutulur.
- 45°C'ye kadar soğutulmuş (yanağımızı yakmayacak şekilde) tüp içerisindeki aynı veya farklı besiyeri yavaşça hava kabarcığı oluşmayacak şekilde besiyeri üzerine dökülür.



Resim 1.2: Örneğin konulması



Resim 1.3: İkinci besiyerinin dökülmesi

- d) Sekiz çizilerek petriye iyice yayılır ve donmaya bırakılır.
- e) 37 °C 'de 24 – 48 saat inkübasyona alınır.



Resim 1.4: İnkübasyon Resim



Resim 1.5: Çift tabakalı dökme plakta oluşan koloniler

- f) İnkübasyon bitiminde petride oluşan koloniler sayılır.
- g) Kullanılan bütün malzemeler otoklavlanır, yıkanır/atılır.

1.2.3. Yüzeye Yayma Yöntemiyle Kültürel Sayım

Dökme plak yöntemine göre uygulanması daha kolay bir yöntemdir. Petri kutusuna agarlı besiyeri dökülürken oluşabilecek hava kabarcıkları ekim öncesi steril bir iğne öze ile ortadan kaldırılabilir. Besiyerleri petri kutularına önceden dökülmüş ve hazır halde olduğu için sıcaklıktan mikroorganizmalar zarar görmemektedir.

Bu yöntemin uygulanmasında dikkat edilmesi gereken noktalar;

- Drigalski özesinin sterilize edildiği alkol çözeltisi sürekli olarak yenilenmeli ve kontrol edilmelidir.
- Alkol ile drigalski özesinin temas süresi 5 – 10 dakikadan az olmamalıdır.
- Her yayma işlemi için yerli sayıda drigalski özesi bulundurulmalıdır.
- Alkolden çıkarılan özenin bek alevinden geçirilme nedeninin ısı ile sterilizasyon değil, sadece alkolü uzaklaştırmak olduğu unutulmamalıdır.
- Beherdeki alkolün alev almasının önlenmesine dikkat edilmelidir.

Yüzeye yayma yönteminin dezavantajı, zorunlu aerobik bazı bakterilerin agar yüzeyinde çok çabuk gelişerek hemen yanındaki bakteri kolonilerini kaplayabilmesidir. Bu durum sayımları zorlaştırmakta ve yanıltıcı sonuçların alınmasına neden olmaktadır.

Aşamaları

- Erimiş steril agarlı besiyeri (42 – 45°C) , steril petrilere 15 – 20 m dökülür. Katılaşması ve yüzeyin kuruması sağlanır.
- İncelenecek dilüsyondan veya sıvı örnekten 1 – 0.1ml alınarak petrilere ekim yapılır.



Resim 1.6: Örnek koyma



Resim 1.7: Drigalski özesi ile yayma

- Steril drigalski özeleri ile besiyeri üzerinde homojen dağılım sağlanır. Ekimler yine en az paralel olacak şekilde iki ayrı petri kutusunda yapılır.

- d) Yayma işleminden sonra petri kutuları 10 – 15 dakika bekletilir ve daha sonra inkübasyona alınır. Bekletmede amaç besiyerinin inokulumu absorblamasının sağlanmasıdır.
- e) İnkübasyon 37°C'ta 24 veya 48 saattir. Sayım dökme plak yönteminde olduğu gibi yapılır. Mikroorganizma sayılarının belirlenmesinde ekimler 0,1'er ml yapılırsa, bulunan değerler seyreltim faktörü yanında 10 ile çarpılarak örneğin gram veya mililitresindeki mikroorganizma sayısı olarak belirtilir(kob/gr).
- f) Analizden sonra ekim yapılmış tüm malzeme otoklavda sterilize edilir. Daha sonra bu malzeme yıkanır veya atılır.

1.2.4. Koloni Sayımı ve Koloni Sayıcısının Kullanımı

İnkübasyon sonunda petri kutularında sayım hızla yapılmalıdır. Herhangi bir nedenle inkübasyon sonrasında sayım yapılamayacaksa petri kutuları +4°C'ta en fazla 24 saat depolanabilir.

Her koloniye bir tek mikroorganizma oluşturur. Koloni sayımı için 30 – 300 arasında koloni gelişen plaklar tercih edilir. Aynı dilüsyondan ekim yapılan 2 – 3 plakta sayım yapılarak ortalaması alınır.

Elde edilen ortalama canlı sayı ait olduğu dilüsyonun 1cm³'ündeki canlı hücre sayısını verir. Petri plaklarında gelişmiş bütün kolonilerin sayılması gerekir.

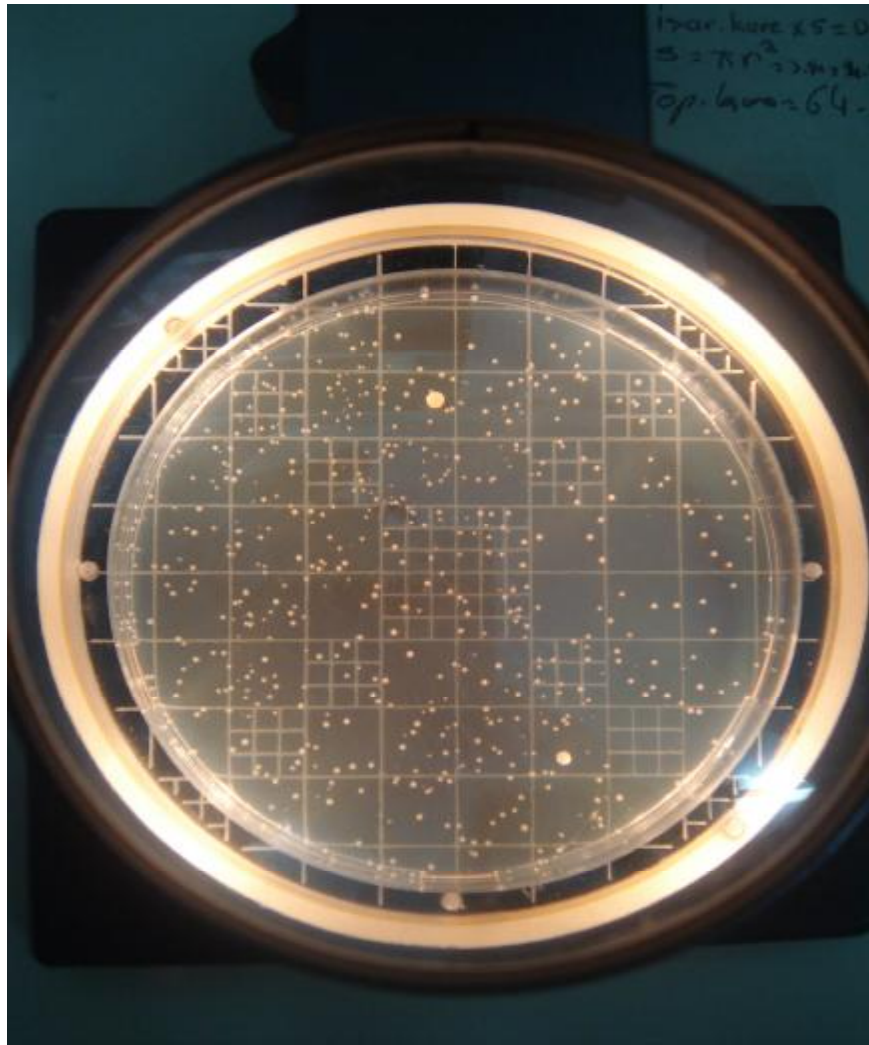


Resim 1.8: Koloni sayıcısı

Koloni sayıcısı alttan aydınlatmalı, karelere bölünmüş tablası ve büyütecisi olan bir araçtır ve şu şekilde kullanılır;

- Koloni sayıcısının kareler bölünmüş tablasına petri kutusu yerleştirilir.
- Aydınlatma düğmesi açılır.
- Büyütecisi ile incelenerek tüm koloniler sayılır.

Koloni sayıcısındaki işaretli kareler toplam kareler alanının 1/5'ine eşittir. Bu nedenle işaretli karelerde sayılan koloni adedi 5 ile çarpılır.



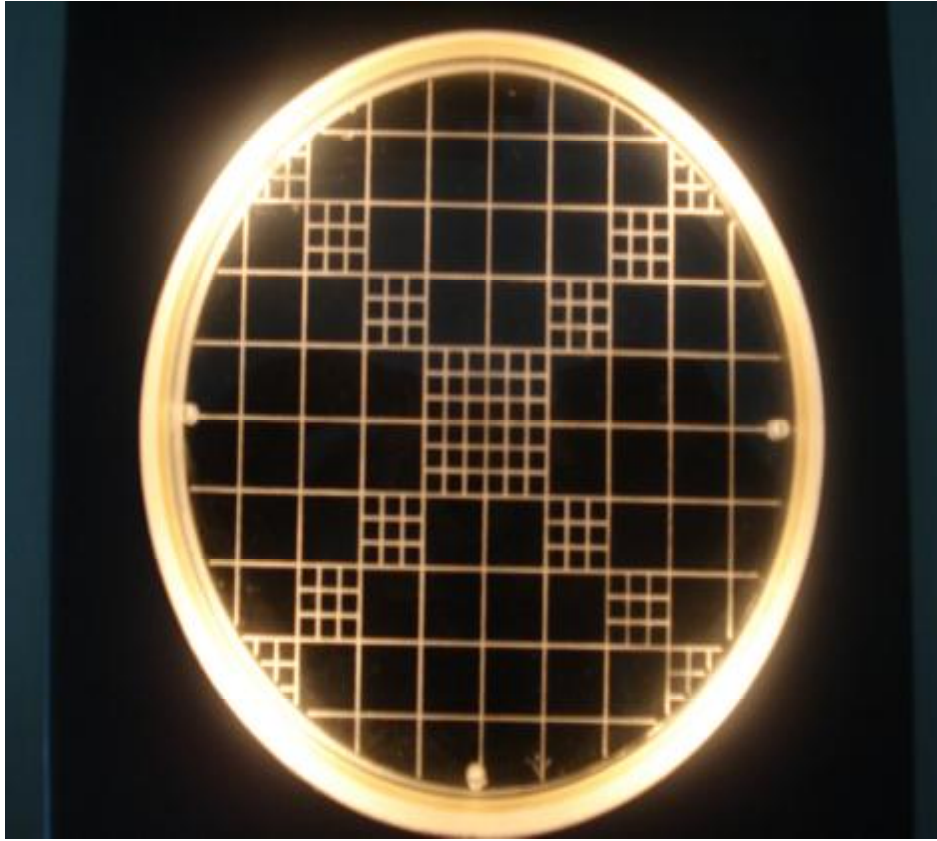
Resim 1.9: Kolonilerin görünümü

Örnek:

Toplam işaretli karelerdeki bakteri sayısı 42 bulunmuştur. Bu sayıyı 5 ile çarparsak

$42 \times 5 = 210$ koloni bulunmuştur.

Bir petri kutusunun ve koloni sayıcısının panosunun daire çapı 9 cm'dir. Alanı ise 64 cm^2 'dir. Bu durumda koloni sayıcısı pano alanında 64 kare vardır.



Resim 1.10: Koloni sayıcısındaki işaretli kareler

Koloni sayımında şu noktaların göz önünde tutulması gerekir;

- Koloni sayımında, eğer koloni sayıcısı yoksa kolaylık elde etmek için petri kutuları alt yüzden bir cama yazar kalemle 4 veya 8 eşit kısma ayrılarak sayılabilir. Bulunan sayı 4 veya 8'le çarpılır.
- Üreyen 350'den fazla ve 10'dan veya 5'den aşağıda olan koloniler genellikle hesaba katılmamaktadır.

- c) Aynı dilüsyondan paralel olarak ekilen petri kutularındaki mikrop kolonileri her dilüsyon için az çok birbirine yakın sayıda olmalı ve en fazla birbirinin iki katını aşmamalıdır. Aksi halde ya fazla miktarda ekim yapılmıştır veya pipet sıvıya fazla daldırılmış ve pipetin dış kenarlarında da agar yüzeyine mikrop geçmiştir.
- d) Petri kutularına ekim yapılmadan önce kullanılacak dilüsyonlar tekrar iyice karıştırılmalıdır.
- e) Sayıma katılan 3 ayrı dilüsyona ait petri kutularından birinde anormal sayıda (çok fazla ya da az) koloni varsa o petri kutusu hesaba katılmaz. Böyle durumlar görülüyorsa ya sayımda ya da ekimlerde hata yapılmıştır. İşlem tekrar edilmelidir.
- f) Son üç dilüsyondan 3'er petri kutusuna yapılan ekimlerde üreyen koloniler sayılarak her dilüsyon için ortalama bulunur ve buradan, orijinalindeki ortalama mikrop sayısı hesaplanır.

1.2.5. Koloni Sayısını Hesaplama

Katı besiyerinde yapılan sayım sonuçlarının verilmesinde koloni oluşturan birim esas alınır. Koloni sayısı hesaplandıktan sonra sonuç, **katı gıdalarda kob/g** (örnek: $3,5 \times 10^2$ veya 350kob/g), **sıvı gıdalarda ise kob/ml** (örnek: $3,2 \times 10^1$ veya 32kob/ml) olarak verilir. Sonuçlar iki şekilde hesaplanabilir;

$$1) \text{ kob/g (ml) } = \text{ İki paralel plağın ortalaması } \times \text{ Dilüsyon faktörü}$$

Örnek; sıvı bir gıda örneğinde aerobik bakteri sayısı belirlenmek isteniyor. 10^{-1} , 10^{-5} dilüsyonlarında koloni sayısı >300 olarak bulunmuştur.

Dilüsyon	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Birinci Paralel	300	240	38	20
İkinci Paralel	250	202	52	24
Toplam	550	442	90	44
Ortalama	275	221	45	22

Tablo 1.1: Sıvı gıda örneğinde toplam ve ortalama koloni sayıları

10^{-2} dilüsyonundaki koloni sayısı yaklaşık 30 – 300 arasında olduğundan hesaplamalar bu plaklar üzerinden yapılır. $\text{kob/ml} = \text{İki paralel plağın ortalaması} \times \text{Dilüsyon faktörü}$

$$= 275 \times 10^2$$

$$= 27,500 \text{ olarak hesaplanır.}$$

$$2.) \text{ kob/g (ml) } = \text{ Koloni sayıcısındaki işaretli karelerdeki sayım sonucu } \times 5 \times \text{ Dilüsyon faktörü}$$

Örnek; koloni sayıcısıyla işaretli karelerde 45 adet koloni sayılmıştır. Dilüsyon faktörü ise

10^{-2} 'dir. Buna göre sonuç; $\text{kob/g (ml)} = 45 \times 5 \times 10^2 = 22,500$ olarak hesaplanır.

NOT: Dilüsyon faktörü = $1/\text{Seyreltme oranıdır}$. Örneğin; $1/10^{-4} = 10^4$ gibi.

1.2.6. Membran Filtre Yöntemi

Membran filtrasyon;

- Ø Su (içme, işletme ve kullanma),
- Ø Meşrubat gibi sıvı gıdalar,
- Ø Şeker, tuz gibi suda tam olarak çözülen katı gıdaların analizlerinde,
- Ø Ve özellikle gıdada aranılan mikroorganizma sayısının 10 ml'de 1 veya daha az olduğu durumlarda kullanılan bir yöntemdir.

Membran filtrasyonda kullanılan filtreler çok ince, çok gözenekli, selüloz asetat, selüloz nitrat veya selüloz ester karışımlarıdır.

Membran filtrelerin gözenek büyüklükleri 10 nm ile 8 m m arasında değişmektedir. Mikrobiyolojik analizlerin çoğunluğunda 0,3 – 0,7 m m gözenekli filtreler kullanılmaktadır.

Membran filtreler sayımı kolaylaştırmak amacıyla kare şeklinde alanlar (çizgiler) basılı olarak hazırlanmıştır.

Bu yöntem, hem toplam bakteri sayısının hem de canlı bakteri sayısının belirlenmesine uygundur.

Yöntemin prensibi;

- Ø Belirli hacimdeki bir sıvı (ya da homojenize edilmiş katı) gıda örneğindeki mikroorganizmaları, gözenek çapları belli bir membran filtre üzerinde tutmak,
- Ø Bu filtreyi aseptik koşullarda uygun bir standart katı besiyeri veya besiyeri emdirilmiş absorbant ped üzerine yerleştirerek koloni oluşturmasını sağlamak ,
- Ø Oluşan kolonileri sayarak gıdadaki mikroorganizma sayısını bulmaktır.

Kullanılan Materyal

- Ø Membran Filtre Seti (Nuçe erleni, conta görevini yapan tıpa, filtre arasındaki poroz kısım, membran filtre, örnek haznesi)
- Ø Steril filtre kâğıdı
- Ø Hazır katı besiyerleri
- Ø Vakum pompası
- Ø Öze

- Ø Distile su
- Ø Bek
- Ø Pens
- Ø Steril pipetler
- Ø Erlen

Aşamaları

- a) Membran filtre setinin tüm parçaları 1210C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir ve kullanılmaya hazır duruma getirilir.



Resim 1.11: Membran filtre düzeneği

- b) Düzenek kurulduktan sonra piyasada kullanıma hazır olarak bulunan steril membran filtre kağıtları hazırlanır. Membran filtreler gözenek çapları kullanım amacına uygun olarak seçilir.

Örnek; Bakteriler için.....0,45 m m

Küfler ve mayalar için.....0,65 m m

Mikrokoklar için.....0,20 m m çapında gözenekli filtreler kullanılır.

- c) Piyasada hazır olarak bulunan 5cm çapındaki plastik petriler içerisindeki hazır besiyerleri, 3,5ml destile suyla plastik pipet veya vakum tabancayla ıslatılır.



Resim 1.12: Besiyerlerinin ıslatılması

- d) Membran filtre steril bir pensle alınarak filtre altındaki poroz kısmına yerleştirilir.



Resim 1.13: Filtrenin yerleştirilmesi.

- e) Örnek haznesi bunun üzerine konur ve kilitlenir.



Resim 1.14: Örnek haznesinin yerleştirilmesi

f) 100 ml numune, örnek haznesine konur.



Resim 1.15: Örneğin filtre edilmesi

- g) Vakum pompasıyla vakumlanır ve örnek haznesi kaldırılır.



Resim 1.16: Örneğin vakumlanması

- h) Steril pensle filtre alınarak hazır besiyerinin üzerine, arada hava boşluğu kalmayacak ve kareli kısım üstte kalacak şekilde yerleştirilir.



Resim 1.17: Filtrenin besiyerine yerleştirilmesi

- i) 37 °C'ta 48 saat inkübe edilir.
- j) İnkübasyon sonunda filtre üzerinde oluşan koloniler sayılır. Böylece 100ml'deki bakteri sayısı tespit edilir.



Resim 1.18: Oluşan kolonilerin sayımı

- k) Değerlendirme sonrası mikroorganizma gelişmesi olmayanlar da dahil olmak üzere inkübatörden çıkan tüm malzeme sterilize edildikten sonra yıkanır/atılır.



Resim 1.19: Membran filtrasyon sonrası oluşan koloniler

Sonuçların Verilmesi

Membran filtreden fiilen geçirilen miktar esas alınarak sonuçlar kob/ml veya kob/g olarak verilir. Örnek;

- Ø 100 ml su örneği filtre edilmiş ve sonuçta 24 koloni sayılmış ise sonuç 24 kob/100 ml olarak verilir.
- Ø 5 g şeker 45 ml steril seyreltme çözeltisinde eritilmiş, buradan alınan 5 ml filtreden geçirilmiş ve 17 koloni sayılmış ise filtrasyon öncesinde 10^{-1} seyreltme yapılmış demektir. Bu çözeltinin her mililitresinde 0,1 gr ve 5 ml’de ise 0,5g şeker vardır.
- Ø 17 koloni 0,5 g’ dan elde edildiğine göre sonuç; $17 / 0,5 = 34$ kob/g olarak verilir.
- Ø 100 ml su örneği filtre edilmiş ve koloni gelişmesi görülmemişse sonuç <1 kob/100ml olarak verilir.

1.2.7. En muhtemel Sayı (EMS) Yöntemi

Sıvı besiyeri kullanılan sayım yöntemi denildiğinde “En Muhtemel Sayı-EMS” yöntemi anlaşılır.

Yöntemin esası;

- Ø Ardışık 3 seyreltiden 3’er adet sıvı besiyerine 1’er ml ekim yapılması
- Ø İnkübasyon sonunda tüplerin pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmesi
- Ø Değerlendirme sonunda elde edilecek kodun, istatistik yöntemlerle elde edilmiş çizelgeden okunmasıdır.

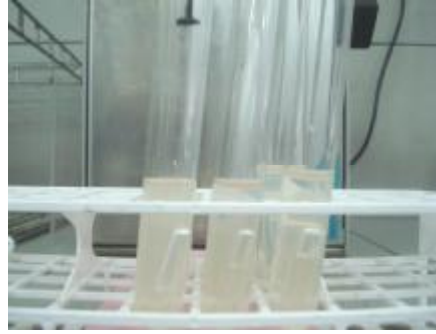


Resim 1.20: Ardışık seyreltme ve ekim

Yöntemin “En Muhtemel Sayı” olarak adlandırılma nedeni örnekteki mikroorganizma sayısının istatistiksel olasılık hesapları ile elde edilmiş çizelgelerden yararlanılarak hesaplanmasıdır.

Tüplerin pozitif veya negatif olmasının değerlendirilmesi, aranan mikroorganizma ve buna bağlı olarak kullanılan besiyerine göre değişir. Bu değerlendirme basit olarak besiyerinde;

- Ø Bulanıklık olması,
- Ø Durham tüpünde gaz oluşumu,
- Ø Besiyerinde renk değişimi,
- Ø Pıhtılaşma,
- Ø Floresan oluşumu gibi çok basit olarak yapılabilir.



Resim 1.21: Tüplerde pozitif gelişme

EMS yönteminde ardışık 3 seyreltiden 3'er tüpe ekim yapılması gıda mikrobiyolojisinde en yaygın uygulamadır. Seyreltilerden 5'er veya 10'ar tüpe de ekim yapılabilir. Her seyreltiden ekim yapılan besiyeri sayısı arttıkça daha doğru sonuç alınacağı açık olmakla ve güvenlik sınırları daralmakla birlikte 3 tüp yöntemi ile yeterli sonuçlar alınmaktadır. Gıda örneği sıvı ise orijinal örnekten (10^0 seyrelti) ekime başlanabilir. Böylelikle yöntemin duyarlılığı 10 kez artırılmış olur.

Katı gıdada ise en düşük olarak 10-1; 10-2; 10-3 seyreltilerinden 1'er ml ekim yapılabilir. Ayrıca, gerekirse katı gıda standart 10gr + 90ml şeklinde homojenize edilir. 10-1 seyreltiden 10ml hacim alındığında orijinal örnekten 1gr alınmış gibi olur. Burada dikkat edilmesi gereken nokta 10ml besiyerine 10ml örnek aktarıldığında besiyerinin konsantrasyonunun yarı yarıya azalacağı, bunun önüne geçmek için başlangıçta bu besiyerlerinin çift güçlü (orijinal besiyerinin iki misli konsantrasyonunda) hazırlanmasıdır.

Örnek; koliform grup analizinde kullanılan LST Broth besiyeri normal olarak 35,5 gr/L konsantrasyonda hazırlanır. 10ml tüp içinde 0.355g madde vardır.

Çift güçlü hazırlanması gerektiğinde başlangıçta 71g/L (0,719g/10ml) olarak hazırlanır. Bunun üzerine 10ml örnek konulduğunda LST konsantrasyonu 0,71g/10ml'den = 0,355g/10ml standart değere iner.

Bu tip ekimler için yeterli 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.

Tablo 1.2: EMS çizelgesi EMS/g ; EMS/mL (partiden 1 örnek alınması)

Pozitif tüp ler			Sayı ve kategori	
1 mL	0,1 mL	0,01 mL	EMS	Kategori
0	0	0	< 0,30	-
0	1	0	0,30	2
0	2	0	0,62	3
1	0	0	0,36	1
1	1	0	0,74	1
1	1	1	1,10	3
1	2	0	1,10	2
1	2	1	1,50	3
1	3	0	1,60	3
2	0	0	0,92	1
2	0	1	1,40	2
2	1	0	1,50	1
2	1	1	2,00	2
2	2	0	2,10	1
2	2	1	2,80	3
2	3	0	2,90	3
3	0	0	2,30	1
3	0	1	3,80	2
3	0	2	6,40	3
3	1	0	4,30	1
3	1	1	7,50	1
3	1	2	12,00	3
3	2	0	9,30	1
3	2	1	15,00	1
3	2	2	21,00	2
3	2	3	29,00	3
3	3	0	24,00	1
3	3	1	46,00	1
3	3	2	110,00	1
3	3	3	>110,00	

Tablo 1.2: EMS çizelgesi EMS/g ; EMS/mL (partiden 1 örnek alınması)

Bu şekilde yapılan ekim sonucunda örneğin 2 – 1 – 0 sonucu elde edildiyse, gıdanın 1ml'sinde ya da 1gramında 1.50 adet mikroorganizma olduğu anlaşılır.

Sıvı bir gıdada sırasıyla 10. 1, 0.1 ml ekim yapıldı ve 2 – 1 – 0 sonucu elde edildiyse yukarıdaki örnekte verilen tüm değerler 10ml için geçerlidir. Diğer bir deyişle gıdanın 1ml'sinde $1.50 / 10 = 0.15$ adet mikroorganizma bulunmaktadır.

Tersine olarak sırasıyla 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} seyreltelerinden yapılan ekimlerde yine 2 – 1 – 0 sonucu alındıysa 1gr ya da 1ml örnekte $1.50 / 0.01 = 150$ adet mikroorganizma bulunmaktadır.

EMS yönteminde sonuçlar standart EMS tablosundan (Tablo 1.2.)sonuç hesaplandıktan sonra sıvı gıdalarda EMS/ml, katı gıdalarda EMS/gr olarak verilir.

Yöntemin uygulanışında daha duyarlı sonuç elde etmek amacıyla ardışık 4 seyreltiden ekim yapıp sonuçlar alındıktan sonra hangi ardışık 3 seyreltinin EMS tablosunda kullanılacağı belirli bir kural çerçevesinde seçilebilir.Bu seçimde izlenmesi gereken kurallar şunlardır;

- Ø Ardışık 4 seyreltiden yapılan ekimlerde 1'den fazla 3 pozitif sonuç varsa daha az konsantr olan seyrelti ile başlayan seri dikkate alınmalıdır.

Örneğin gıdada 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} olmak üzere ardışık dört seyreltiden 3'er tüpe yapılan ekimlerde sırasıyla 3 – 3 – 2 – 1 şeklinde sonuç alındıysa 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 seride değerlendirilecek olan 3 – 2 – 1'dir.

- Ø 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 1'den çok 3 negatif sonuç varsa (örneğin; 2 – 1 – 0 – 0) bu kez 2 – 1 – 0 serisi kullanılmalıdır.

EMS yönteminde değerlendirme amacıyla çok sayıda ve farklı yaklaşımlar ile hazırlanmış tablolar vardır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı Tablo 1.2' de verilmiştir.

Tablo 1.2'de, kategori bölümünde 1, 2 ve 3 olarak gösterilen 3 kategori vardır. Bu kategoriler sonuçların bir anlamda güvenliğini göstermektedir.

1 nu'lu kategori ile elde edilen kodlar güvenli olup laboratuvar tarafından doğrudan değerlendirilir.

2 nu'lu kategoride elde edilen kodlar daha az güvenilirdir. Bu şekilde elde edilen kodlar üst yetkiliye danışılarak değerlendirilmelidir.

3 nu'lu kodlar ise kayda değer ölçüde güvenilirmez olup deney tekrarlanmalı ya da mutlaka üst yetkilinin onayı ile değerlendirilmelidir.

1.2.7.1. Sulara EMS Yönteminin Uygulanışı

1. Basamak tahmin deneyi;
 - a.) Orijinal su örneğinden 10, 1, 0,1ml alınarak içerisinde durham tüpleri ve 10ml steril LSTB besiyeri bulunana üçer tüpe inokülasyon yapılır. Bu ekim yöntemi uygulandığında 10ml su örneğinin inoküle edildiği tüplerdeki LSTB besiyerleri çift güçlü hazırlanır.
 - b.) Sonra hafif çalkalanarak 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda pozitif gaz tüpleri belirlenir ve EMS tablosu kullanılarak suyun mililitresindeki olası toplam koliform sayısı hesaplanır.
2. Basamak doğrulama deneyi;
 - a.) Gaz oluşmuş tüm tüplerden, durham tüplü Brillant Gren Bile (%2) Broth besiyerine, tüp hafifçe eğilerek özenin içini bir zar gibi kaplayacak şekilde örnek alınarak inokülasyon yapılır.
 - b.) 37°C'ta 48 saat inkübasyon süresi sonunda durham tüpleri içinde gaz oluşmuş pozitif tüpler ayrılır. EMS tablosu kullanılarak suyun mililitresindeki toplam koliform sayısı saptanır.

Örnek ; 1. tüpte gaz var (+)

2. tüpte gaz yok (-)

3. tüpte gaz yok (-)

Bu sonuçlar EMS tablosundan kontrol edildiğinde sonuç;100cc'deki koliform bakteri sayısı 23'tür.

1. Tüp (10 CC.)	2. Tüp (1 CC.)	3. Tüp (0,1 CC.)	100 cc'deki Koliform Bakteri Sayısı
+	+	+	240'dan fazla
+	+	-	240
+	-	+	95
+	-	-	23
-	+	+	19
-	+	-	9
-	-	+	9
-	-	-	0

Tablo 1. 3. İçme ve kullanma sularında EMS tablosu

- c.) Analiz sonunda mikroorganizma ile temas eden her malzeme sterilize edilerek yıkanır veya atılır.

1.2.7.2. Gıdalarda EMS Yönteminin Uygulanışı

- İçlerinde durham tüpleri ve 9ml sulandırma sıvısı bulunan ağzı kapalı tüpler spora sırasıyla dizilir.
- Bu üç tüpün arkasına 9 adet yine durham tüpü konulmuş tüpler 3'er 3'er dizilir.
- Birinci sıradaki tüplerden ilkin 1ml + gıda örneği konur.(9+1 = 10ml yaptı.)Buradan 1ml alınır ikinci tüpe aktarılır.Buradan 1ml üçüncü tüpe aktarılır ve 1ml dışarı atılır.Böylece gıda numunesi 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} oranında seyreltilmiş olur.
- Birinci ana tüpten 1ml alınır. Hemen arkasındaki birinci tüpe aktarılır.Ana tüpten tekrar 1ml alınır ve yine birinci sıradaki ikinci tüpe aktarılır.Son olarak birinci ana tüpten 1ml daha alınarak üçüncü tüpe aktarılır.
- İkinci ve üçüncü ana tüpler için de aynı işlem tekrarlanır.
- 37°C'ta 48 saat inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonunda durham tüpleri değerlendirilir.Gaz oluşumu ve bulanıklık vb. varsa sonuç pozitifdir.

Örnek:

Birinci sırada; 1. tüp = (+) İkinci sırada; 1.tüp = (+) Üçüncü sırada; 1. tüp = (+)
2. tüp = (+) 2. tüp = (+) 2. tüp = (-)
3. tüp = (+) 3. tüp = (-) 3. tüp = (-)
Birinci sıra toplamı = 3 İkinci sıra toplamı = 2 Üçüncü sıra toplamı = 1
Bunları kodlayacak olursak ; 3 + 2 + 1 = 321 kodunu oluşturur.EMS tablosundan (Tablo 1.2.) bakarsak 321 = 15 EMS /ml veya EMS/g olur.

Örnek:

Birinci tüpte iki (+)
İkinci tüpte bir (+)
Üçüncü tüpte bir (+) ise , kod 211 = 2 EMS/ gr (ml) Yani gıdanın 2 gramında mikroorganizma bulunduğunu belirtir.

- Analiz sonunda mikroorganizma ile temas eden her malzeme sterilize edilerek yıkanır/atılır.
- EMS yönteminin uygulanmasının sonucunda çıkan değerler raporda şu şekilde belirtilir.

Örneğin;

Yöntem sularda uygulanmışsa sonuç 100 ml'deki koliform bakteri sayısı 95 EMS/ml veya 240 EMS/ml ya da 240'dan fazla şeklinde yazılır.

Gıdalarda ise EMS sayısı, 16 EMS/g (mL) veya 64 EMS /g (mL) ya da 2400'den fazla koliform bakteri sayısı şeklinde verilir.

2. DİREKT MİKROSKOBİK SAYIM YÖNTEMLERİ

2.1. Amacı

Bu sayım yöntemleri mikroorganizma sayımı yapılacak olan örneğin mikroskop altında incelenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu amaçla üretilmiş özel lamalar (Thoma lamı, Howard lamı vb) veya belli bir hazırlık yapılan normal lamalar (Breed yöntemi) ya da Membran filtreler kullanılmaktadır.

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.

Direkt mikroskopik sayım yöntemleri canlı ve ölü tüm mikroorganizmaların sayılması gibi önemli bir dezavantaja sahip olmakla beraber pek çok üstün yönleri de vardır. Bunlar şöyle sıralanabilir;

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

- Ø Thoma lamı ile maya sayımında metilen mavisi çözeltisi uygulanarak yapılan basit preparatta canlı (renksiz) ve ölü (mavi renkli) hücreler ayrı ayrı sayılabilmekte ise de bu uygulama yalnızca ekmek mayası üretiminde ve şarap, bira yapımında kullanılmaktadır.

2.2. Howard Lamı ile Küflü Saha Sayımı ve Hesaplamaları

Howard küf sayımı domates suyu, salça, ketçap gibi domates ürünlerinin ve diğer meyve ürünlerinin üretiminde kullanılan ham maddenin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi ve işletmede sanitasyon uygulamalarının etkinliğinin saptanması amacıyla uygulanan mikroskopik bir sayım yöntemidir.

Analiz 25 görüş sahası olan özel bir lamda yapılır.

Amaç; incelenen görüş sahasının küf miselleri açısından (+) veya (-) olarak değerlendirilmesi ve buna göre analiz edilen örnekte küflü saha oranının belirlenmesidir. Sonuçlar ” % küflü saha ” olarak verilir.

Analiz sonrasında bulunan küf filamentlerinin sayısı, bu ürünlerin elde edilmesi sırasında küflü parçaların da üretime dâhil edildiğini gösterir. Aynı şekilde tereyağında küfe rastlanması da küflü krema kullanıldığını kanıtlar.

Sayım işleminde şekil 2.1’de görülen Howard lamı ve lameli kullanılmaktadır. Howard lamı, üzerine lamel kapatıldığında arasında Newton halkası oluşacak şekilde temiz olmalıdır. İşlem şu şekilde yapılmalıdır:

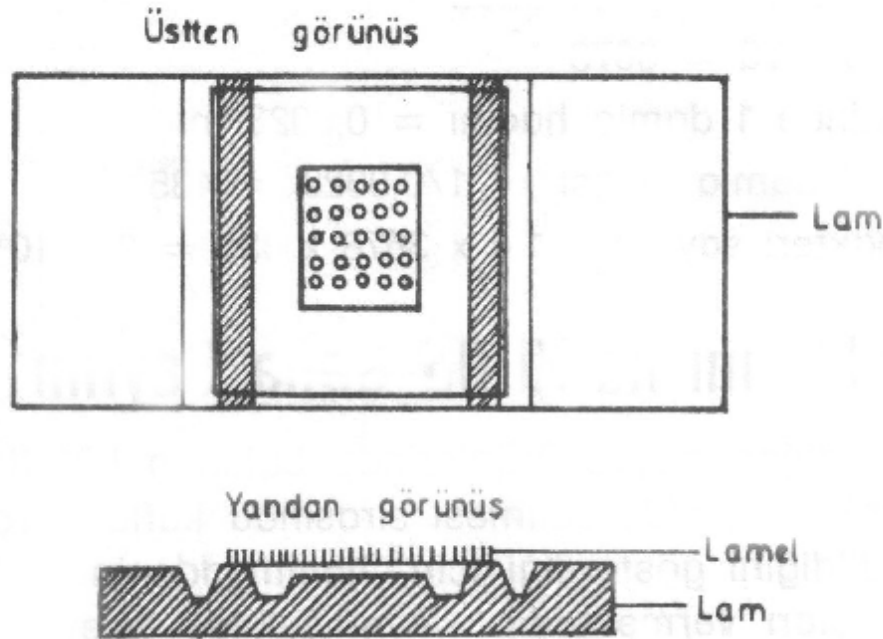
- Domates suyu orijinal haliyle incelenemediği halde, salça gibi koyulaştırılmış ürünlerinin steril distile su ile seyreltilmeleri gerekir. Seyreltme oranı, refraktometre değeri 20 °C 'da 45.0 – 48.7 veya refraktif indeks 20 °C 'da 1.3447 - 1.3460 değerleri arasında olmalıdır. Böylece kuru madde oranı % 8-9 olur.
- Lam üzerine seyreltilen örnekten bir damla konulup, üzeri özel Howard lameli ile kapatılır. Örneğin lam sayım yüzeyinde uniform bir şekilde dağılmasına ve sayım alanını dolduracak kadar örnek alınmasına dikkat edilmelidir. Örnek yeknesak dağılım göstermiyorsa lam ile lamel arasında Newton halkası oluşmamışsa veya örnek çukurdan dışarı ve lamel üzerine taşmışsa bu preparat kullanılmaz, yenisi hazırlanır. (Newton halkası, iki cam eğer çok temizse birbiri üzerine konulduğunda renkli halkalar oluşması halidir)
- Bu şekilde hazırlanan preparat, görüş alanı 1.5 mm² olacak şekilde ayarlı bir mikroskop ile incelenir. Ayarlı bir mikroskop ile yapılan her bir gözlemde, 0.15 mm³lük bir örnek hacmi incelenebilmektedir. Bu amaçla 90-125 X bir büyütme kullanılır (10 X oküler ve 10 X objektif ile 100 X büyütme elde edilir). Eğer küf filamentleri fark edilemiyor ise 200 X büyütmeye kadar çıkılabilir. Alan ayarlaması tüp boyu değiştirilerek yapılır, ancak bu her mikroskopta mümkün olmadığı için alan belirlenmesi, lam üzerine konulan ve

1.5 mm²lik yuvarlak alanları işaretlenmiş özel bir lamel yardımı ile gerçekleştirilebilir.

- d) İncelenecek örneği temsil edecek şekilde hazırlanan iki veya daha fazla örnekte en az 25'er saha sayılıp pozitif saha sayısı tespit edilir. Eğer saha içinde üçten daha fazla filament varsa veya üçten daha az sayıdaki filamentlerin toplam uzunluğu görüş sahası çapının 1/6'sından daha fazla ise bu görüş sahası (+) olarak değerlendirilir.
- e) Sayım sonucu elde edilen pozitif saha sayısından yararlanılarak yüzde pozitif saha sayısı hesaplanabilir. Buna göre;

Pozitif saha sayısı = (Pozitif sahalar sayısı X 100) / Sayılan toplam saha sayısı Howard lamı ile bulunan değer, üründeki küf miktarını doğrudan göstermez. Örneğin % 20 pozitif saha hiç bir şekilde üründe % 20 oranında küf olduğunu değil, Howard lamı ile yapılan sayım sonucuna göre % 20 oranında küflü saha olduğunu belirtir. Bununla beraber yüzde küflü saha oranı, üretim sırasında kullanılan ham maddede hangi oranda küflü domates olduğu hakkında bir ön bilgi verebilir.

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



Şekil 2.1: Howard Lamı ve Lameli

Sayım yapılırken şu noktalara dikkat edilmelidir:

1. İki veya daha fazla preparatta Howard lamı üzerindeki 25'er saha sayılıp, küf flamenti açısından pozitif veya negatif olarak değerlendirilmelidir.
2. Howard küflü saha sayımında en büyük zorluk, hammaddeden gelen dokular ile küf hiflerinin birbirinden ayrılmasıdır. Bu ayrımın doğru bir şekilde yapılabilmesi için de şu kurallara dikkat edilmelidir;
 - a) Küf flamentleri tüp şeklinde bir yapıya sahiptir ve mikroskop altında hifler düzgün, birbirine paralel duvarlar şeklinde gözlenir. Fakat domates dokularının çapları sabit değildir ve daralıp genişleyen değişken bir yapıya sahiptir.
 - b) Küf flamentlerinin birçoğu septalı olmasına karşın domates dokularında septa gözlenmez.
 - c) Küf flamentlerinin uç kısımları küt, domates dokularının uç kısımları ise sivridir.
 - d) Küf hiflerinde keskin açılarla dallanmış yapılar gözlenirken, domates flamentleri düzgün bir yapıya sahiptir.
 - e) Küf hifleri mikroskopta genellikle net görüntü verirken, domates dokularının aynı netlikte gözlemlenmesi mümkün değildir.
 - f) Küf hifleri mikroskopta granüllü bir görüntü verir. Domates dokuları ise saydamdır.
3. Eğer saha içinde üçten fazla sayıda küf flamenti varsa o alan pozitif olarak kabul edilir.
4. Bir sahada üçten fazla sayıda küf flamenti varsa veya üçten daha az sayıdaki flamentlerin toplam uzunluğu görüş sahası çapının 1/6'sından daha fazla ise bu görüş sahası da pozitif olarak kabul edilir. Değilse negatiftir.

2.3. Thoma Lamı ile Mikroskopik Sayım

Özellikle mikrobiyolojide maya ve tıpta kan ve sperm sayımlarında kullanılan ve Thoma lamı (hemositometre) adı verilen özel bir lamla yapılan sayımdır. Thoma lamında bakteri sayılması oldukça güç olup önerilen bir yöntem değildir.

2.3.1. Aşamaları

- a) Sayım için 18 – 24 saatlik bir maya kültürü hazırlanır.
- b) % 10'luk asetik asit veya 1/9'luk sülfirik asit çözeltisi kullanılarak kültürün uygun dilüsyonları hazırlanır (örneğin ; 0.5ml kültür + 4.5 ml dilüsyon çözeltisi şeklinde).Bu işlem aynı zamanda hücre kümeleşmelerini de birbirinden ayırır, böylece de sayım kolaylaşır.

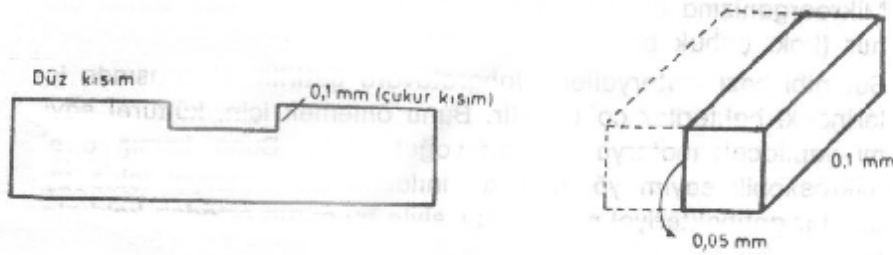
Maya hücrelerini daha kolay sayabilmek ve canlı ile ölü maya hücrelerini birbirinden ayırmak amacıyla, dilüsyon öncesinde, kültüre birkaç damla % 1'lik metilen mavisi damlatılabilir. Bu durumda ölü hücreler metilen mavisi ile boyanır, canlı hücreler boyanmaz. Yalnızca boyanmamış hücreler sayılarak canlı maya sayımı gerçekleştirilebilir. Ancak bu yöntemin, deneyimli kişilerce uygulanması ve mikroskop ışık ayarının çok iyi olması gibi bazı zorunlulukları da vardır.

- Birkaç öze dolusu örnek, Thoma laminasının iki sayım bölgesine ayrı ayrı aktarılır. Burada sıvının lamel üzerine taşmayacak miktarda olmasına dikkat edilmelidir.
- Bunun üzerine özel lamel kapatılır. Lamelin üzerine yavaşça bastırılarak incelenecek örneğin lamdaki sayım hacmine homojen dağılımı sağlanır.
- Preparat mikroskop tablasına yerleştirilerek sayıma geçilir. Önce 10X veya 20X objektif ile toplam görüş sahası bulunur. Daha sonra 40X objektif ile küçük karelerdeki hücreler sayılır.
- Genel olarak çapraz 8 büyük karede sayımlar gerçekleştirilir ve ortalaması alınır. Bulunan değer 2 ile çarpılarak bütün büyük karelerdeki maya sayısı bulunur. Daha sonra formül ile toplam maya sayısı/ml değeri hesaplanır.

2.3.2. Hesaplamalar ve Dikkat Edilecek Noktalar

Thoma laminasının esası, 0.1 mm^3 hacimde sayım yapılmasıdır. Thoma laminasının yandan görünüşü şekil 2.2'de verilmiştir.

Şekilde görüldüğü gibi laminanın çukur bir kısmı vardır. Kültür, bu kısım üzerine aktarılıp, lamel kapatıldığında bu çukurda 0.1 mm yüksekliğinde bir sıvı kalır. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir. Lamel konduktan sonra üzerine bastırılarak laminanın çukuru dışında kalan düz kısmı ile lamel arasında bir sıvı katmanının kalması önlenir. Böylece çukur alan içinde tam olarak 0.1 mm yüksekliğinde sıvı bulunması sağlanmış olur.



Şekil 2.2: Thoma laminasının yandan görünümü

Thoma lamında 16 büyük kare, her büyük karede 25 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapılır. Şekil 2.3'te bir küçük kare gösterilmiştir. Yani bir sayım sahasında $16 \times 25 = 400$ küçük kare bulunmaktadır. Bir küçük karenin kenarı $1/20 \text{ mm}$ (0.05 mm) olup, derinliği $1/10 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}$ 'dir. Bu durumda bir küçük karenin hacmi;

$$V_{\text{küçük kare}} = 1/10 \times 1/20 \times 1/20 = 1/4.000 \text{ mm}^3 \text{ür.}$$

Bir sayım alanında $16 \times 25 = 400$ küçük kare olduğuna göre

$$V_{\text{Toplam sayım hacmi}} = 400 \times 1 / 4000 = 0.1 \text{ mm}^3 \text{ tür.}$$

Sonuçlar cm^3 (ml) olarak verileceği için sayım sonucu 10,000 ile çarpılır (10×1000).

Sayımında, genellikle büyük karelerin tümü dikkate alınmaz ve yalnızca çarpaz 8 büyük karede sayım yapılır. Sayımlar en az beş kere tekrarlanmalıdır. Sayımların ortalaması alınır ve sonuç 2 ile çarpılarak 0.1 mm^3 teki değer bulunur (16 kare olduğu için). Sayım yapılırken şu noktalara dikkat edilmelidir;

- Ø Sayıma alınan küçük karelerin üst ve sağ taraflarındaki kare çizgilerine teğet veya çizgileri kesen hücreler sayıma alınır.
- Ø Küçük karelerin alt ve sol taraflarındaki kare çizgilerine teğet veya çizgileri kesen hücreler sayıma alınmaz.

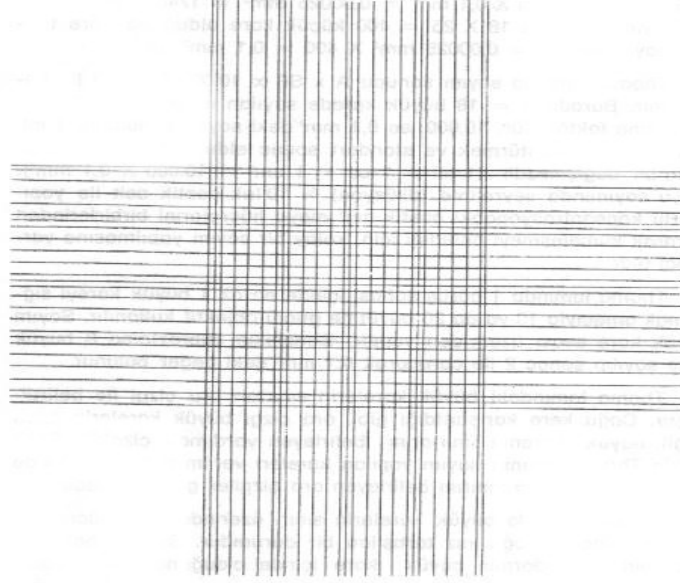
Toplam hücre sayısı (canlı ve ölü) şu formüle göre hesaplanır;

$\text{Toplam hücre sayısı} = 16 \text{ büyük karedeki hücre sayısı} \times 10,000 \times \text{dilüsyon faktörü (ortalama)}$

Maya sayımında seyreltme (dilüsyon) % 10'luk asetik asit ile yapılır. Bu konsantrasyondaki asetik asit maya hücrelerini birbirlerinden ayırarak kümeleşmeyi önlediği için, kolay bir sayım yapılmasına yardımcı olur.

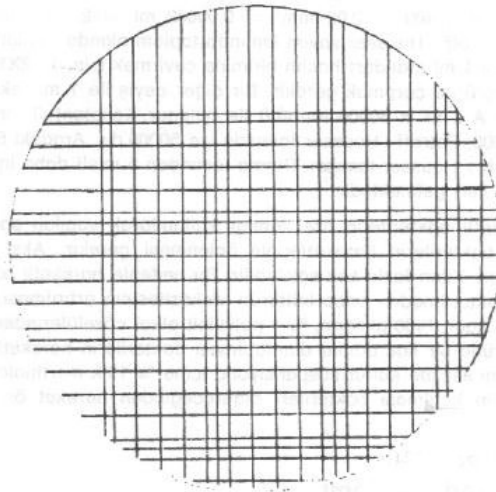
Thoma lamında 1 görüş sahası içinde en az 1 büyük kareyi sığdırmak amacıyla 10 ya da 20 büyütme güçlü objektif kullanılır.

Thoma lamındaki büyük karelerin sınırları ara çizgi ile belirtilmiştir. Çoğu kere karıştırıldığı gibi, ara çizgi büyük karelerin sınırı değil, büyük karenin sınırlarını belirleyen yardımcı çizgidir. Şekil 2.3'te Thoma lamının sayım yapılan kareleri verilmiştir.



Şekil 2.3: Thoma lamının sayım yapılan kareleri (Toplam görüş sahası 100 X)

Şekil 2.4'te ise büyük karelerin sınırını belirleyen ara çizgiler görülmektedir.



Şekil 2.4: Thoma lamında büyük karelerin sınırını belirleyen ara çizgiler

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

Direkt mikroskopik sayım yöntemlerinde canlı ve ölü hücrelerin beraberce sayılmasında, bazı basit ancak etkin yöntemlerle canlı ve ölü hücreler ayrılabilir. Bu konuda en iyi örnek, metilen mavisi boyası ile maya hücrelerinin boyanması, daha sonra direkt sayım lamlarına alınmasıdır.

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

2.4. Breed Yöntemi

Breed yöntemiyle sıvı örneklerdeki bakteri ve mayaların mikroskopik sayımları gerçekleştirilebilmektedir. Daha çok çiğ süt ve bazı süt ürünlerindeki toplam bakteri sayısını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Yöntem gereğince canlı ve ölü bakteriler beraberce sayılır. Her ne kadar gıda sanayisini ilgilendiren canlı bakteri sayısı ise de Breed yöntemiyle elde edilen değerin düşük ya da yüksek olarak elde edilmesi sütün kalitesi hakkında oldukça iyi bir fikir verir.

Breed yönteminin esası; belli bir hacmin (genellikle 0,01 ml) 1 cm² alan üzerine yayılması, kurutulması ve boyandıktan sonra mikroskopla incelenerek sayımın bu alanda yapılmasıdır.

Normal bir lam üzerine işaretlenmiş 1cm²lik alana 0.1ml'lik bir pipetle 0.01ml sıvı örnek aktararak yayılır. Lamın alt yüzeyine 1x1 cm boyutlarında ve milimetrik karelere ayrılmış bir kâğıt yapıştırılarak 1cm²lik alan yaratılabilir.

Preparat kurutulur ve tespit işlemi yapılır. Daha sonra preparat boyanarak mikroskopta immersiyon objektifi ile sayımlara geçilir.

Sayım yapılan görüş sahalarındaki ortalama sayı, mikroskop faktörü, dilüsyon faktörü ve 100 faktörü (0,01ml örnek yayıldığı için) dikkate alınarak 1 ml örnekteki toplam bakteri sayısı hesaplanır.

2.5. Direkt Epifluoressant Filtre Tekniği

Fluoressant boyaların ve özel bir mikroskopun kullanıldığı hızlı bir membran filtre yöntemidir. Yaklaşık 20 – 25 dakikada sonuç vermektedir.

Bu yöntemle sıvılardaki, özellikle sütlerdeki toplam bakteri sayısı belirlenebilmektedir. Katı gıdalar ise homojenize edildikten sonra 5^m m naylon filtrelerden geçirilir.

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

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

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

2.6. Kültürel Sayım Yöntemlerine Göre Avantajları ve Dezavantajları

Bu sayım yöntemlerinin kültürel sayım yöntemlerine göre bazı avantajları vardır.Bunlar;

1. Çok çabuk sonuç alınır.
2. Uygulanmaları basittir.
3. Sayım yapılırken mikroorganizmaların hücre morfolojileri de belirlenebilir.
4. Floresan yönünden incelemeler yapılmasına olanak sağlar.

Direkt mikroskopik sayım yöntemlerinin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar ise;

1. Çalışanın gözünü zorlar ve yorar.
2. Hem canlı hem de ölü hücreler sayıma alınır.
3. İncelenen örnekteki partiküller hücrelerle karıştırılabilir
4. Mikroorganizmalar, preparat üzerinde her zaman yeknesak (uniform) dağılmayabilir, hücre kümeleşmeleri görülebilir.
5. Boyama yapıldığında bazı hücreler tam olarak boyanmayabilir, dolayısıyla da sayılamazlar.
6. Bu yöntemlerden elde edilen sayım sonuçları diğer sayım sonuçlarından her zaman yüksektir. Fakat bu yöntemlerin çabuk sonuç vermesi nedeniyle pek çok durumda tercih edilebilir.