

**T.C.  
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

**LABORATUVAR HİZMETLERİ**

**KÜLTÜREL SAYIM**

**Ankara, 2015**

- Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
- Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.
- **PARA İLE SATILMAZ.**

# İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR .....	iii
GİRİŞ .....	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1 .....	3
1. DÖKME PLAK YÖNTEMİYLE SAYIM .....	3
1.1. Kültürel Sayım Yöntemleri .....	3
1.1.1. Dökme Plak Yöntemi .....	4
1.1.2. Yüzeğe Yayma Yöntemi.....	5
1.1.3. Çift Tabakalı Dökme Plak Yöntemi .....	5
1.1.4. Membran Filtre Yöntemi .....	6
1.1.5. EMS Yöntemi .....	7
1.2. Kültürel Sayımlarda Kullanılan Araç Gereçler .....	7
1.3. Dökme Plak Yönteminin Yapılışı .....	8
1.4. Kültürel Sayımlarda Dikkat Edilecek Hususlar ve Sonuçların Hesaplanması.....	11
UYGULAMA FAALİYETİ .....	14
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME .....	16
ÖĞRENME FAALİYETİ-2 .....	18
2. YÜZEĞE YAYMA YÖNTEMİYLE SAYIM .....	18
2.1. Prensibi .....	18
2.2. Yapılışı.....	19
UYGULAMA FAALİYETİ .....	22
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME .....	24
ÖĞRENME FAALİYETİ-3 .....	25
3. EMS YÖNTEMİYLE SAYIM.....	25
3.1. Prensibi .....	25
3.2. Yapılışı.....	26
UYGULAMA FAALİYETİ .....	30
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME .....	31
MODÜL DEĞERLENDİRME .....	32
CEVAP ANAHTARLARI.....	33
KAYNAKÇA .....	34

# AÇIKLAMALAR

<b>ALAN</b>	<b>Laboratuvar Hizmetleri</b>
<b>DAL</b>	<b>Gıda, Tarım ve Hayvan Sağlığı Laboratuvarı</b>
<b>MODÜLÜN ADI</b>	<b>Kültürel Sayım</b>
<b>MODÜLÜN SÜRESİ</b>	40/24
<b>MODÜLÜN AMACI</b>	Bireye / öğrenciye numunenin özelliğine ve tekniğine uygun olarak kültürel sayım yöntemleri ile canlı mikroorganizma sayımı yapma işlemlerine yönelik bilgi ve becerileri kazandırmaktır.
<b>MODÜLÜN ÖĞRENME KAZANIMLARI</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. ISO 4833 veya FDA/BAM 2001 kriterlerine uygun olarak dökme plak yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz.</li><li>2. Numunenin özelliğine ve tekniğine uygun olarak yüzeye yayma yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz.</li><li>3. Numunenin özelliğine ve tekniğine uygun olarak EMS yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz.</li></ol>
<b>EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI</b>	<p><b>Ortam:</b> Mikrobiyoloji laboratuvar ortamı, kütüphane, <i>internet</i>, bireysel öğrenme ortamları vb.</p> <p><b>Donanım:</b> Blender / stomacher / mikser, hassas terazi, etüv, bek / steril kabin, su banyosu, koloni sayıcı, tartım kapları, spatül, pipet, petri kutusu, erlen, deney tüpü, durham tüpü, cam yazar kalem, öze, drigalski özesi, sentetik besiyeri karışımları, stok agarlı besiyerleri, dilüsyon sıvısı, distile su</p>
<b>ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME</b>	Modül içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen ölçme araçları ile kendinizi değerlendireceksiniz.

# GİRİŞ

## **Sevgili Öğrenci,**

Mikrobiyolojinin tüm dallarında (gıda, tarım, tıp, endüstriyel gibi) numunede bulunan mikroorganizmanın türü yanında miktarı da önem arz etmektedir. Mikroorganizma sayısı (miktarı) belirlenirken genel olarak numunede bulunan mikroorganizmaların canlı olanlarının sayısı anlaşılır ve bu işlem kültürel sayım yöntemleri ile belirlenir.

Bugüne kadar birçok mikrobiyolojik sayım yöntemi geliştirilmiştir. Amaca, incelenen numunenin özelliğine ve laboratuvar imkânlarına göre bu yöntemlerden birisi seçilerek uygulanmaktadır.

Bu modül kültürel sayım yöntemleri ile ilgili bilgi ve becerileri kazanmanızda sizlere yardımcı olacaktır.



# ÖĞRENME FAALİYETİ-1

## ÖĞRENME KAZANIMI

Gerekli ortam sağlandığında, ISO 4833 veya FDA/BAM 2001 kriterlerine uygun olarak dökme plak yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz.

## ARAŞTIRMA

- Kültürel sayım yöntemlerini kıyaslayınız.
- Bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarını araştırınız.
- Dökme plak yönteminin kullanım amaçlarını araştırınız.

## 1. DÖKME PLAK YÖNTEMİYLE SAYIM

Mikrobiyolojinin tüm dallarında (gıda, tarım, tıp, endüstriyel gibi) numunede bulunan mikroorganizmanın türü yanında miktarı da önem göstermektedir. Mikroorganizma sayısı (miktarı) belirlenirken genel olarak numunede bulunan mikroorganizmaların canlı olanlarının sayısı anlaşılır ve bu işlem kültürel sayım yöntemleri ile belirlenir. Bazı durumlarda (örneğin gıda mikrobiyolojisinde ham madde kalitesini belirlemek için) ise numunede bulunan canlı ve ölü mikroorganizmaların beraberce belirlenmesi gerekmektedir. Bu durumlarda ise mikroskopik sayım yöntemleri önerilmektedir.

### 1.1. Kültürel Sayım Yöntemleri

Bugüne kadar birçok mikrobiyolojik sayım yöntemi geliştirilmiştir. Amaca, incelenen numunenin özelliğine ve laboratuvar imkânlarına göre bu yöntemlerden birisi seçilerek uygulanmaktadır.

Ancak geliştirilen sayım yöntemlerinin hiçbirisi, numunedeki mikroorganizma sayısını tam ve kesin olarak belirlemeye imkân sağlayamamaktadır. Her yöntemin diğer yöntemlere göre bazı avantajları olduğu gibi diğer bazı yönlerden ise dezavantajları olabilmektedir. Örneğin bazı yöntemlerde sonuç almak için uzun süre gerekirken bazılarında kısa sürede sonuç alınabilmektedir.

Kültürel sayım yöntemleri kendi içerisinde direkt ve indirekt (dolaylı) sayım olmak üzere iki grup altında değerlendirilebilmektedir.

Direkt sayım yöntemlerinde, canlı hücrelerin koloni oluşturması ve bu kolonilerin sayılarak “Her canlı hücre 1 koloni oluşturur.” prensibi ile materyaldeki canlı hücre sayısının hesaplanması esasına dayanır. Bu amaçla sayım yapılacak numuneden belirli bir miktar alınır ve besiyerine aktarılır. Koloni oluşması için gerekli inkübasyon süresinin sonunda petri kutusundaki koloniler sayılarak materyaldeki canlı hücre sayısı hesaplanır. Ölü hücreler

üreyip koloni meydana getiremeyeceği için bu yöntemde sadece canlı hücreler sayılır. Bu grup içerisinde dökme plak, yüzeye yayma ve membran filtre yöntemleri sayılabilir. Bu sayımlarda sonuçlar "sadece koloni oluşturanlar"ın sayıldığını göstermek üzere "koloni oluşturan birim; kob (colony forming unit; cfu)" olarak verilmektedir ve sayım sonuçları, incelenen örneğin sıvı, katı veya yüzey olmasına göre kob/ml, kob/g veya kob/cm<sup>2</sup> şeklinde belirtilmektedir.

İndirekt sayım yöntemlerinde ise canlı hücrelerin üremeleri sonucu ortamda meydana getirdikleri değişikliklerin (bulanıklık, renk vb.) veya oluşturdukları bazı ürünlerin (gaz vb.) gözlemlenmesine bağlı olarak mikroorganizma sayılarının belirlenmesi veya tahmin edilmesine yönelik yöntemlerdir. EMS yöntemi bu gruba iyi bir örnektir.

Kültürel sayım yöntemleri gıda güvenirliliğini belirlemede kullanılan en basit ve yaygın analiz yöntemlerinden biridir ve gıdadaki mikroorganizma sayısının kabul edilebilir sınırlarda olup olmadığı konusunda fikir vermektedir. Sayım sonuçları mevcut standart, tüzük, yönetmelik, vb. kaynaklarda belirtilen limitlerle karşılaştırılarak incelenen numunenin mikrobiyolojik kalitesi hakkında karar verilebilir.

Tek başına hiçbir besiyeri ve inkübasyon koşulu mevcut mikroorganizmaların tamamının gelişebileceği bir ortam oluşturamamaktadır. Toplam canlı sayım herhangi bir mikroorganizma grubu belirtilmediyse genellikle toplam bakteri sayısını ifade etmektedir. Uygulanan inkübasyon derecesine göre analiz ismi toplam mezofilik (35±1 °C'de 48 ± 2 saat, süt ve süt ürünlerinde ise 32±1 °C'de 48 ± 2 saat), toplam psikrofilik, toplam termofilik bakteri sayımı olarak ifade edilir.

Toplam bakteri sayımlarında genel amaçlı besiyerleri (PCA gibi) kullanılır. Herhangi bir mikroorganizma türü sayılacaksa o türe uygun selektif (seçici) besiyerleri kullanılmalıdır. Bu besiyerleri sayımı yapılmak istenilen türün üremesine uygun fakat diğer mikroorganizmaların üremesini engelleyen inhibitör maddeler içerir. Örneğin DPY ile *koliiform* bakteri sayımı yapılacaksa Violet Red Bile Agar (VRBA) besiyeri kullanılmalıdır.

### **1.1.1. Dökme Plak Yöntemi**

İncelemeye alınan örnekteki canlı mikroorganizmaları veya bunların sporlarını saymayı amaçlayan bir yöntemdir. Kültür yaparak gerçekleştirilen bu sayımda, inkübasyon aerobik koşullarda yapılmışsa canlı aerobik mikroorganizma sayısından; anaerobik koşullarda gerçekleştirilmişse canlı anaerobik mikroorganizma sayısından söz edilir. Dökme plak yöntemiyle bakteri, maya ve küfler ile sporlarını saymak mümkündür.

Bu yöntemde steril petri kutularına numune ve / veya uygun seyreltilerinden birer ml aktarılır, üzerine 45 °C'ye kadar soğutulmuş agarlı besiyerinden yaklaşık on beşer ml dökülür ve karıştırılır. Besiyeri katılaştıktan sonra inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan kolonilerin sayılması ile örnekteki canlı mikroorganizma sayısı belirlenir.



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

Besiyeri, numunenin üzerine döküldükten sonra düz bir zeminde 3 kez 8 çizdirilerek besiyeri ile kültürün homojen bir şekilde karışması sağlanmalıdır. 45-50 °C'de dökülen ve petri kutusu ile temas sonunda hızla soğuyan besiyeri katılmasından önce karıştırma işlemi tamamlanmış olmalıdır.

Bu yöntemin dezavantajları olarak;

- Sıcak dökülen besiyerinin mikroorganizmaya zarar verme olasılığının yüksek olması,
- Besiyerinin petrilere ekim yapıncaya kadar erimiş hâlde (50 °C su banyosunda) tutulması ve bunun besiyeri üzerine olumsuz etkileri,
- 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 gelişmeleri

sayılabilir. Yöntemin avantajı ise numuneden 1 ml ekim yapıldığı için yayma yöntemine göre 10 kat daha az mikroorganizma içeren numunelerde sayım yapılabilmesidir.

### 1.1.2. Yüzeye Yayma Yöntemi

Yayma yönteminde tekniğine uygun olarak petri kutularında hazırlanmış ve belirli düzeyde yüzeyi kurutulmuş agarlı besiyerleri üzerine 0,1-0,25 ml numune ve / veya uygun seyreltilerinden aktarılarak tüm yüzeye eşit şekilde yayılır. İnkübasyon işlemine tabi tutularak koloniler sayılır. Bu yöntem bu modülün ikinci öğrenme faaliyetinde ayrıntılı şekilde anlatılacaktır.

### 1.1.3. Çift Tabakalı Dökme Plak Yöntemi

Bu yöntemde hafif bir anaerob ortam sağlamak veya kolonilerin yayılmasını önlemek gibi amaçlarla ekimi yapılmış agar plaklarının üzerine usulüne uygun olarak hazırlanmış ve 45-50 °C'ye soğutulmuş steril agarlı besiyerinden 5 ml plağın bütün yüzeyini kaplayacak şekilde ikinci bir besiyeri katmanı dökülür.

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

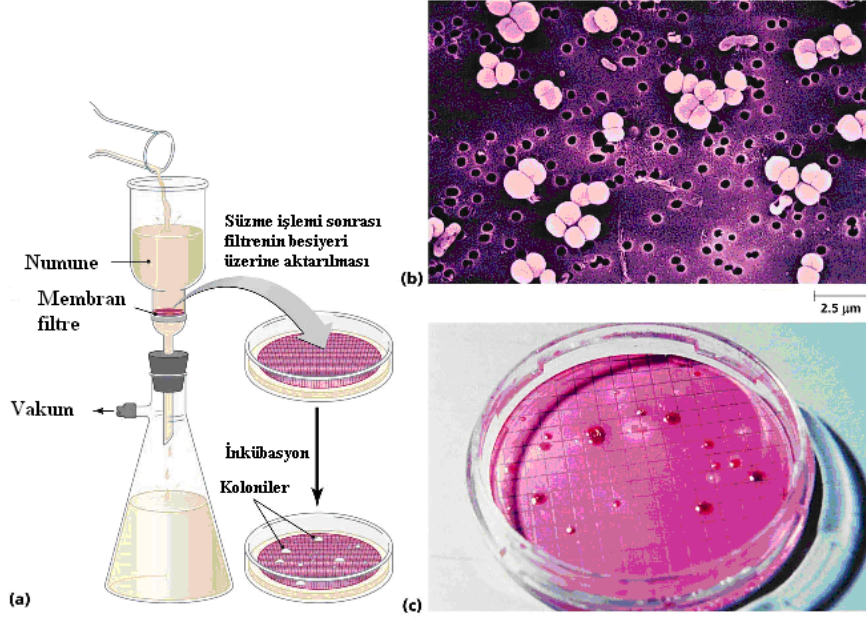
Genel olarak ikinci kat olarak aynı besiyeri kullanılmakta fakat bazı özel çalışmalarda farklı besiyeri de kullanılabilir. Örneğin *koliform* grubu bakteriler, her iki katta da VRBA kullanıldığı çift tabakalı dökme plak yöntemiyle sayılabilir. Bu uygulamalarda dikkat edilmesi gereken husus ikinci kat besiyerinin 5 ml olarak dökülmesi ve bunun tüm petri yüzeyini kaplamasıdır. Bu işlem ancak el alışkanlığı ile sağlanabilir.

Çift tabakalı dökme plak yöntemi hem yüzeye yayma hem de dökme plak yöntemlerinde uygulanabilmektedir. Yüzeye yayma yönteminde, çözelti besiyerine

aktarıldıktan yaklaşık 10 dakika sonra (besiyeri numuneyi yeteri kadar emdikten sonra), dökme yönteminde ise agarlı besiyeri tam olarak katılaştıktan sonra, su banyosunda 45-50 °C'de tutulan besiyerinden 5 ml kadar ikinci kat olarak dökülür. İlave edilen bu kısım tam olarak katılaştıktan sonra inkübasyona alınır.

#### 1.1.4. Membran Filtre Yöntemi

Belli hacimdeki sıvı numune veya dilüsyonunun, alanı belli bir filtre yüzeyinden süzülmesi, bu yöntemin prensibini oluşturur. Bu yöntem ile hem toplam (canlı + cansız) bakteri sayısı hem de sadece canlı bakteri sayısının belirlenmesi mümkündür. Süzme işlemi (Şekil 1.1.a) sonrası filtre yüzeyinin doğrudan mikroskopta incelenmesiyle (Şekil 1.1.b) toplam bakteri sayısı belirlenebilir veya filtre, uygun bir besiyeri yüzeyine yerleştirilip inkübasyona bırakılır ve oluşan kolonilerin (Şekil 1.1.c) sayımı ile de canlı bakteri sayısı belirlenir.

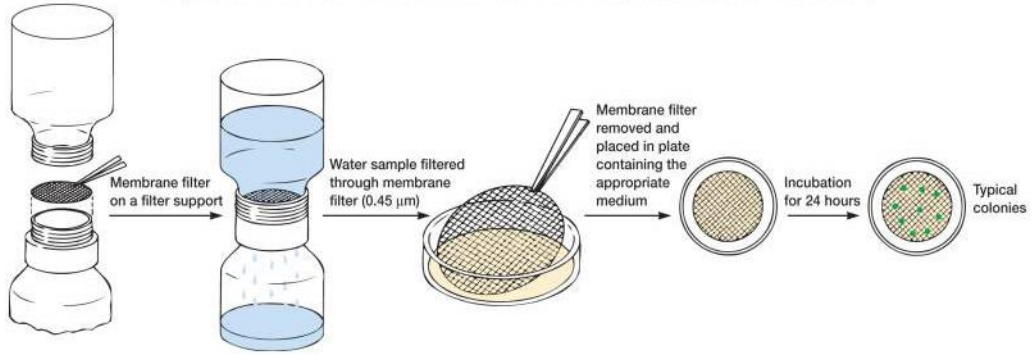


Şekil 1.1: Membran filtre yöntemi

Bu yöntemde bakterilerin geçmesine izin vermeyecek ancak bunların içinde bulunduğu su veya dilüenti geçirecek gözenek çaplarına sahip özel membran filtreler kullanılmaktadır.

Sıvı numune veya dilüsyonunun belli bir hacmi aseptik koşullarda filtreden geçirilmektedir. Bu amaçla, steril membran filtre filtrasyon düzeneğine yerleştirilir ve numune veya dilüsyonu filtreden geçirilir. Filtrenin gözenek çapları çok küçük olduğundan süzme işlemi hızlandırmak amacıyla bir vakum pompası veya su trompu yardımı ile negatif basınç veya enjektör yardımıyla pozitif basınç oluşturulmalıdır. Yoksa süzme işlemi çok uzun zaman alır.

Daha sonra membran filtre steril bir pens ile kenarından tutularak petri kutusundaki uygun agarlı bir besiyerinin yüzeyine aktarılır. Filtrenin besiyeri yüzeyine tam teması sağlandıktan sonra petri kutuları ters çevrilmeden etüve yerleştirilerek inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda yüzeyde oluşan koloniler sayılarak sonuç hesaplanır.



**Şekil 1.2: Membran filtre yöntemi işlem sırası**

Sayımları kolaylaştırabilmek amacıyla, membranlara inkübasyonu takiben boyama işlemi uygulanabilir veya membran belirli ayıraçlarla muamele edilebilir (örneğin fekal *E. coli* sayımlarında Kovac's ayırıcı gibi).

Membran boyama işlemleri ile ya membran (örneğin malaşit yeşili ile boyama) ya da membran yüzeyinde gelişen koloniler (örneğin metilen mavisi ile boyama) boyanır. Böylece membran ile koloni renkleri arasındaki kontrastlık artmakta ve sayımlar kolaylaşmaktadır.

Membran filtrasyon yöntemi su (içme, işletme, kullanma), meşrubat gibi sıvı gıdaların veya şeker, tuz gibi suda tam olarak çözülebilen katı gıdaların analizinde ve özellikle çok az miktarda bakteri içerenlerde tavsiye edilen bir yöntemdir.

### 1.1.5. EMS Yöntemi

Yöntemin prensibi ardışık 3 seyreltiden sıvı besiyerlerine ekim yapıp inkübasyon sonunda gelişme olanları pozitif olarak değerlendirmek ve istatistiksel 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 istatistiki şekilde elde edilmiş tablolardan yararlanılarak hesaplanmasıdır. EMS yöntemi tüp dilüsyon yönteminin bir modifikasyonudur. Bu yöntem bu modülün üçüncü öğrenme faaliyetinde ayrıntılı şekilde anlatılacaktır.

## 1.2. Kültürel Sayımlarda Kullanılan Araç Gereçler

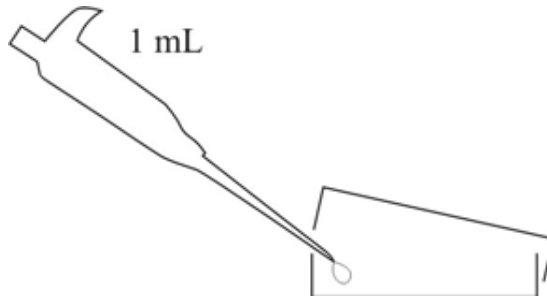
- Otoklav
- Kuru hava sterilizatörü
- İnkübatör
- Su banyosu
- Stomacher veya blender

- Koloni sayıcı
- Bunzen bek
- Tüp karıştırıcı
- Steril drigalski, özeler
- Cam veya plastik steril petriler
- Steril pipetler
- Deney tüpleri, tüp taşıyıcıları
- Erlen, beher
- Besiyerleri
- Saf su

### 1.3. Dökme Plak Yönteminin Yapılışı

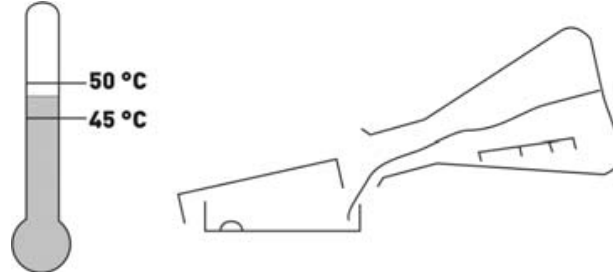
Dökme plak yöntemi petri kutuları ve agarlı besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilir ve genel olarak aşağıdaki şekilde bir yol izlenir:

- İncelenecek numune homojenize edilir.
- Numunenin uygun dilüsyon serisi hazırlanır. Sayımı yapılacak numunenin mililitresinde ya da gramında binlerce hatta milyonlarca mikroorganizma bulunabilir. Bu durum dikkate alınarak genellikle incelenecek numunenin seri dilüsyonları hazırlanır.
- Ekim yapılacak dilüsyonlar belirlenir. Hazırlanan dilüsyonların tümünden ayrı ayrı ekimler yapılabilir. Ancak genelde  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  ya da  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  olacak şekilde bir seçim yapılarak ekimler için yalnızca bu dilüsyonlar kullanılır. Bu seçimde, sayımı yapan kişinin deneyimi ile örnekteki mikroorganizma yükünü kabaca tahmin edebilmek önemlidir.
- Steril petri kutularına; incelenecek örnek, dilüsyon oranı, tarih, besiyeri gibi ayrıntılar yazılır. Her bir dilüsyon için en az iki petri kutusu hazırlanır (paralel çalışma).
- En büyük dilüsyondan başlayarak ekim için seçilen her bir dilüsyondan steril bir pipetle birer ml steril ve boş iki petri kutusuna aktarılır.



**Şekil 1.3: Dökme plak yönteminde steril ve boş petri kutusuna aktarma işlemi**

- Vakit geçirmeden, her bir petriye on beşer ml  $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş uygun steril agarlı bir besiyeri dökülür.



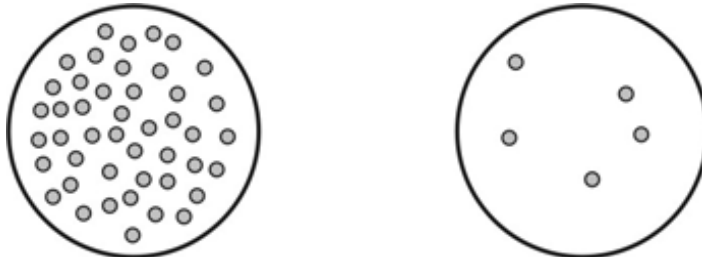
**Şekil 1.4: Dökme plak yönteminde besiyeri dökme işlemi**

- Besiyeri döküldükten hemen sonra düzgün bir zeminde ve dikkatli bir şekilde 8 çizdirilerek petri kutusuna aktarılmış numune ile besiyerinin tam olarak karışması sağlanır. Besiyerinin düzgün bir zeminde kendi hâlinde katılaşması sağlanır.



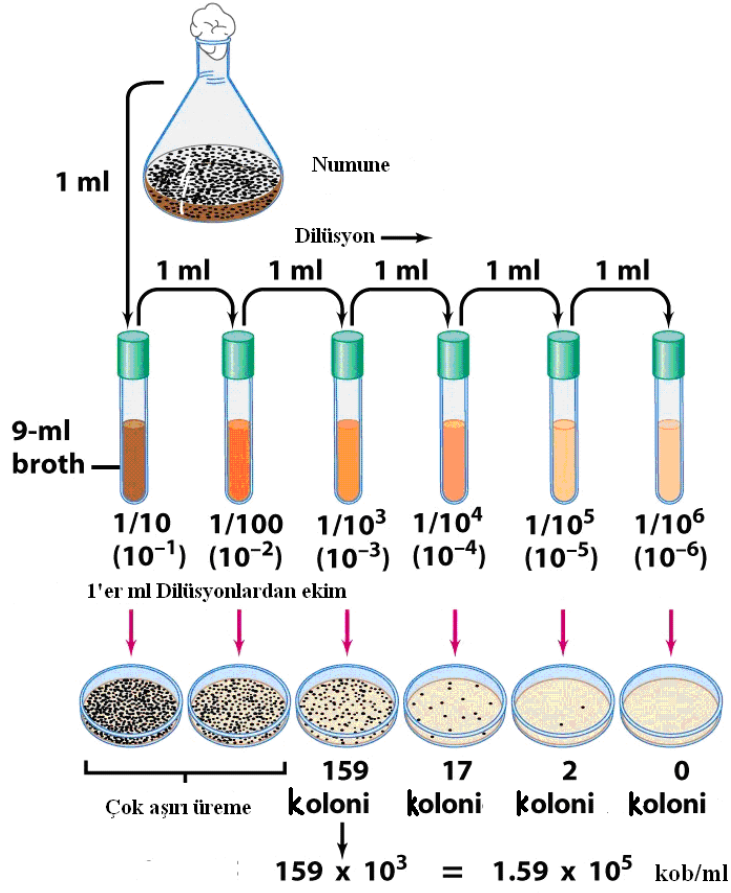
**Şekil 1.5: Dökme plak yönteminde numune ile besiyerinin karıştırılması işlemi**

- Aynı besiyerinden sterilite kontrolü için, steril iki tane boş petri kutusuna ayrı ayrı dökülür ve agarın katılaşması beklenir,
- Petri kutuları ters çevrilerek inkübatöre yerleştirilir. Amaca uygun sıcaklık ve sürede inkübasyon yapılır (örneğin 35 °C'de 48 saat gibi).
- İnkübasyon sonunda petri kutuları sayıma alınır. Sayım, koloni adedi az ise direkt olarak yapılır. Eğer koloni sayısı çok ve koloniler küçük ise sayımlar bir koloni sayıcıda, işaretli karelerde yapılır. Genel olarak yüzeyde gelişen koloniler daha büyük, agar içinde gelişenler ise daha küçüktür.



**Şekil 1.6: Dökme plak yönteminde inkübasyon sonrası oluşan koloniler**

- Analizden sonra ekim yapılmış tüm malzeme otoklavda sterilize edilir ya da uygun bir kimyasal madde ile dezenfekte edilir. Daha sonra bu malzemeler yıkanır ya da atılır.



Şekil 1.7: Dökme plak yöntemi ile sayım

Aşağıda özet olarak dökme plak yöntemiyle toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı işlem basamakları verilmiştir.

- 25 g numune usulüne göre alınır.
- 225 ml ringer veya peptonlu su içerisinde çözündürülerek 10<sup>-1</sup>lik ilk dilüsyon hazırlanır.
- Numunede beklenen mikrobiyal yüke göre uygun dilüsyonlar (10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>...) hazırlanır.
- Her bir dilüsyondan iki steril petri kutusuna birer ml aktarılır ve üzerine 45 °C'ye soğutulmuş plate count agar ilave edilir.
- 35 °C'de 48 saat inkübasyon (48 saatte üreme olmazsa petrilere 24 saat daha inkübasyona tabi tutulur.)
- Oluşan koloniler sayılarak hesaplama yapılır.

## 1.4. Kültürel Sayımlarda Dikkat Edilecek Hususlar ve Sonuçların Hesaplanması

Dökme plak yönteminde mikroorganizmalar tüm besiyeri kütesine dağılır ve buna bağlı olarak tabana yakın ve yüzeye yakın olan mikroorganizmalar oksijenden yararlanma farkı nedeni ile farklı büyüklükte ve morfolojide koloni oluşturur. Oysa yayma yönteminde tüm mikroorganizmalar yüzeyde olduğu için aynı şekilde oksijenden yararlanarak aynı büyüklükte ve morfolojide koloni oluşturur. Bu açıdan değerlendirildiğinde yayma yöntemi avantajlıdır.

Dökme plak yönteminde agarlı besiyeri çok sıcak olursa termal şok nedeni ile mikroorganizmaya zarar verebilir. Çok soğuk olursa dökme sırasında besiyeri katılaşıp ve iyi bir karıştırma sağlanamayabilir. Besiyeri sıcaklığı optimum olsa bile besiyeri ile çözeltinin homojen karışmasını sağlamak el deneyimi gerektirir. Yayma yönteminde bu gibi sorunlar yoktur, cam çubuk ile daha homojen bir dağılım sağlanır.

Yayma yönteminde, besiyeri petri kutusuna döküldükten sonra bir süre yüzeyin kurumaması beklenmelidir. Oysa dökme yönteminde böyle bir sorun yoktur. Dolayısıyla acil ekimlerde stokta önceden dökülmüş hazır besiyeri yoksa ve bu nedenle yeterince kurumamış besiyeri kullanılırsa kolonilerde yayılma oluşabilir. Yayma yönteminde, stok petri kutularının organizasyonu kolaylıkla sağlanabilir. Dökme plak yönteminde ise besiyeri sterilize edildikten sonra erlende katılaştırılıp stoklanır ise yeniden eritmek gerekir. Bu işlem, besiyerine zarar verebilir. Ayrıca her besiyeri bu şekilde yeniden eritilemez.

Yayma yönteminde kullanılan cam (bazen metal) çubuğun sterilizasyonu alkol ile yapılmaktadır. Alkol, konsantrasyon düşmesi sonucu sterilizasyon etkisini göstermez ve kontaminasyona neden olabilir. Dökme yönteminde alkolden ya da drigalski spatülünden gelebilecek bir kontaminasyon riski yoktur. Buna karşı disposal steril plastik drigalski spatülü kullanılabilir.

Petri kutusuna dökme yönteminde 1 ml, yayma yönteminde 0,1 ml örnek aktarıldığı için dökme plak yöntemi yayma yönteminden 10 misli daha duyarlıdır.

### ➤ Sonuçların hesaplanması

İnkübasyon sonunda petri kutularında sayım hızla yapılmalıdır. Herhangi bir nedenle inkübasyon sonrasında sayım yapılamayacak ise petri kutuları +4 °C'de en fazla 24 saat bekletilebilir. Daha uzun süre ile bekletilmiş petri kutularında sayım yapılma zorunluluğu varsa elde edilecek sonuçlar güvenilir değildir ve analiz raporlarında bu durum açıkça belirtilmelidir.

Ardışık iki seyreltiden yapılan ekim sonuçlarının ağırlıklı aritmetik ortalaması alınarak numunedeki mikroorganizma sayısı hesaplanır. Bu hesaplamada kullanılan formül;

$$N = C / [V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$$
 şeklindedir.

Burada;

N = Gıda örneğinin 1 gram 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<sub>1</sub>= İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

n<sub>2</sub>= İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

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

Bu formülde, 15–300 arasındaki koloni sayımları dikkate alınmaktadır. Farklı kaynaklarda 15–250, 25–250 vb. farklı sınırlara da rastlanmaktadır. Ayrıca sayımı yapılacak mikroorganizmaya göre bu değer değişebilmektedir.

Örneğin FDA, süt ve ürünleri için PCA besiyerinde yapılan sayımlarında 25–250, VRBA besiyerinde yapılan sayımlarında 1–154 sınırlarını esas almaktadır. Maya–küf sayımlarında ise 15–150 olan petri kutuları dikkate alınmaktadır.

### Örnek problem

Sıvı bir örnekte aerobik bakteri sayısı belirlenmek isteniyor. Dökme plak yöntemine göre çalışılarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-5</sup> dilüsyonların da koloni sayısı >300 olarak bulunmuştur.

Dilüsyon	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>
1. Paralel	212	23	3	1
2. Paralel	226	25	3	0

Bu verilere göre numunenin 1 ml'sinde bulunan canlı mikroorganizma sayısını hesaplayınız.

Çözüm

10<sup>-6</sup> ve 10<sup>-7</sup> dilüsyonundaki koloni sayısı 15-300 arasında olduğundan hesaplama bu plaklar üzerinden yapılır (Ancak diğer dilüsyonlarla da kontrol gereklidir.).

$$C = 212+226+23+25 = 486$$

V = 1 (DPY ile sayım yapıldığı için petri kutularına birer ml aktarılır.)

n<sub>1</sub>= 2 (10<sup>-6</sup> seyreltiden ekim yapılan 2 petri değerlendirmeye alınmıştır.)

n<sub>2</sub>= 2 (10<sup>-7</sup> seyreltiden ekim yapılan 2 petri değerlendirmeye alınmıştır.)

d = 10<sup>-6</sup> (Ardışık 2 seyreltinin daha konsantre olanın seyreltme oranıdır.)

$$N = C / [V(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$$

$$N = 486 / [(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-6}]$$

$$N = 486 / (2,2 \times 0,000001)$$

$$N = 220909090 \text{ kob/ml} = 2,2 \times 10^8 \text{ kob/ml}$$

Bu değer virgülden sonra 1 desimal ile gösterilmeli ve sonuç 2,2X10<sup>8</sup> kob/ml olarak verilmelidir.



### Örnek problem

Dökme kültürel sayım yöntemi uygulanmış ve her seyreltiden 2 petri kutusuna ekim yapılmıştır.  $10^{-3}$  seyreltide 199 ve 163,  $10^{-4}$  seyreltide 21 ve 17 adet koloni elde edilmiştir (Katı numune ile çalışılmıştır.). Bu verilere göre numunenin 1 gramında bulunan canlı mikroorganizma sayısını hesaplayınız.

### Çözüm

$$C = 199+163+21+17= 400$$

$V = 1$  (Dökme kültürel sayım için petri kutularına birer ml pipetlenmiştir.)

$n_1 = 2$  ( $10^{-3}$  seyreltiden ekim yapılan 2 petri değerlendirmeye alınmıştır.)

$n_2 = 2$  ( $10^{-4}$  seyreltiden ekim yapılan 2 petri değerlendirmeye alınmıştır.)

$d = 10^{-3}$  (Ardışık 2 seyreltinin daha konsantr olanın seyreltme oranıdır.)

$$N = C / [V(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d]$$

$$N = 400 / [(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-3}]$$

$$N = 400 / (2,2 \times 0,001)$$

$$N = 181818$$

Bu değer virgülden sonra 1 desimal ile gösterilmeli ve sonuç  $1,8 \times 10^5$  kob/g (sıvı ise ml) olarak verilmelidir.

### Örnek

Yukarıdaki örnek yüzeye yayma yöntemi ile yapılmış ve petri kutularında aynı sayılarda koloni elde edilmiş olsa idi sadece  $V=0,1$  ml olur ve sayım sonucu  $1,8 \times 10^6$  kob/g olarak hesaplanır.

### Örnek

Bir sıvı gıdada yüzeye yayma yöntemi kullanılmış ve orijinal örnekten ( $10^0$  seyrelti) 280, 260,  $10^{-1}$  seyreltiden ise 21 ve 16 adet koloni elde edilmiştir.

$$C = 280+260+21+16= 577$$

$$V = 0,1$$

$n_1 = 2$  ( $10^0$  seyreltiden ekim yapılan 2 petri değerlendirmeye alınmıştır.)

$n_2 = 2$  ( $10^{-1}$  seyreltiden ekim yapılan 2 petri değerlendirmeye alınmıştır.)

$d = 10^0 = 1$  (Orijinal örnek kullanılmıştır.)

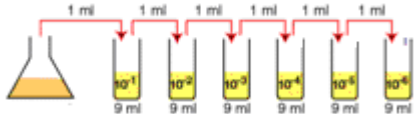
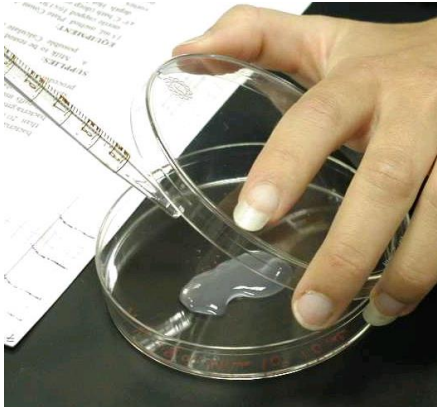
$$N = 577 / [0,1(2 + 0,1 \times 2) \times 1] = 577/0,22 = 2623 = 2,6 \times 10^3 \text{ kob/ml}$$

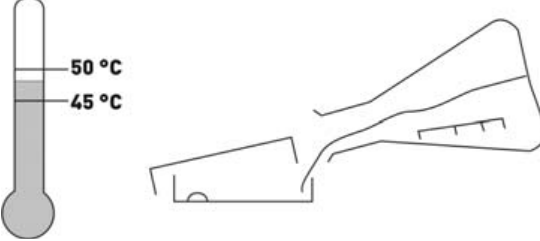


## UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak dökme plak yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapınız.

### Uygulamada kullanılan araç gereçler

Blender/stomacher/mikser, etüv, su banyosu, koloni sayıcı, hassas terazi, tartım kapları, spatül, pipet, bek, petri kutusu, erlen, cam yazar kalem, stok agarlı besiyerleri, dilüsyon sıvısı, distile su.

İşlem Basamakları	Öneriler
<p>➤ Araç gereçleri sterilize ediniz.</p>	<p>➤ Sterilize edeceğiniz araç gerecin özelliklerine göre uygun sterilizasyon yöntemi seçiniz.</p>
<p>➤ Dilüsyon sıvısı hazırlayınız.</p>	<p>➤ Numunenin özelliğine göre uygun dilüsyon sıvısı seçiniz.</p>
<p>➤ Mikrobiyolojik analizler için numuneyi analize hazırlayınız.</p>	<p>➤ Numunenin özelliğine göre uygun araç gereçleri kullanınız.</p>
<p>➤ Analiz numunesinden dilüsyon serileri hazırlayınız.</p> 	<p>➤ Dilüsyon serileri hazırlama modülünden faydalanınız.</p>
<p>➤ Ekim yapılacak dilüsyonları belirleyiniz.</p>	<p>➤ Numunenin tahmini mikrobiyolojik yüküne göre seçim yapınız.</p>
<p>➤ Petri kutularına cam yazar kalemle numune, dilüsyon, tarih bilgilerini yazınız.</p>	<p>➤ Bilgileri eksiksiz ve okunaklı yazınız.</p>
<p>➤ Ekim yapılacak dilüsyonlardan birer ml alarak boş steril petri kutularına aktarınız.</p> 	<p>➤ Aseptik teknikle steril pipet kullanarak aktarma işlemini yapınız.</p>

<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Stok agarlı besiyerini ısıtarak eritiniz.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Isıtma işleminde su banyosu kullanabilirsiniz.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Agarlı besiyerini 45–50 °C'ye kadar soğutunuz.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Besiyerini çalkalayınız ve avuç içinizle sıcaklığını kontrol ediniz. Sıcaklığı hissediyorsanız ve elinizi yakmıyorsa uygun sıcaklığa gelmiş demektir.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Numune ve dilüsyonlardan konulmuş petri kutularına soğutulmuş agarlı besiyerlerinden 15–20 ml ekleyiniz.</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Aseptik ortamda göz kararı dökünüz.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Masa üzerinde dairesel hareketlerle veya 8 çizdirerek karışmasını sağlayınız.</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ani hareket ettirmeyiniz ve kapağa bulaştırmayınız.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Katılaşınca kadar bekletiniz.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Katılaştığından emin olunuz.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Etüvde inkübasyon yapınız.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ İnkübasyon sıcaklığı ve süresini sayımını yapmak istediğiniz mikroorganizmaya göre belirleyiniz.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Kolonileri sayınız.</li> </ul> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Koloni adedi az ise direkt olarak eğer koloni sayısı çok veya koloniler küçük ise koloni sayıcıda, işaretli karelerde sayım işlemi yapınız.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Numunenin mikroorganizma yükünü hesaplayınız.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hesaplama işlemlerini kontrol ediniz.</li> </ul>

## ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Dökme plak yöntemi ile sıvı numune ile çalışılmış ve koloni sayıcıda toplam işaretli karelerdeki bakteri sayısını 50 olarak bulunmuştur. Bu durumda numunenin mikroorganizma yükü aşağıdakilerden hangisi ile ifade edilir.  
A) 50 kob/ml  
B) 50 kob/gr  
C) 500 kob/ml  
D) 250 kob/ml
2. Dökme plak yöntemiyle kültürel sayımda aşağıdaki mikroorganizmalardan hangisi sayılamaz?  
A) Bakteriler  
B) Küfler  
C) Mayalar  
D) Virüsler
3. Yüze yayma yönteminde yayma işleminden sonra petri kutularının bekletilmesinde amaç aşağıdakilerden hangisidir?  
A) Besiyerinin iyice katılaşması  
B) Besiyerinin inokulumu absorblaması  
C) Homojen dağılım sağlanması  
D) Besiyerinin soğuması
4. 1 ml numune veya dilüsyonu steril petri kutusuna aktarılır, üzerine 45-50 °C'ye kadar soğutulmuş agarlı besiyerinden yaklaşık 15-20 ml dökülür, besiyeri ile örnek karıştırılır, besiyeri katılaştıktan sonra petri kutuları inkübasyona bırakılır. Bu işlemler hangi sayım yöntemine aittir?  
A) EMS yöntemi  
B) Dökme plak yöntemi  
C) Yüze yayma yöntemi  
D) Hepsi
5. Önceden petri kutularına dökülüp katılaştırılmış (hatta bu şekilde stoklanmış) ve belirli bir düzeyde kurutulmuş besiyerleri üzerine 0,1 ml numune aktarılarak drigalski spatülü denilen kıvrık bir cam baget ile bu miktarın besiyeri yüzeyine yayılır... Bu işlemler hangi sayım yöntemine aittir?  
A) EMS yöntemi  
B) Dökme plak yöntemi  
C) Yüze yayma yöntemi  
D) Hepsi

6. Yöntemin prensibi ardışık 3 seyreltiden sıvı besiyerlerine ekim yapıp inkübasyon sonunda gelişme olanları pozitif olarak değerlendirmek ve istatistiksel yöntemlerle elde edilmiş tablolardan yararlanılarak örnekteki mikroorganizma sayısını hesaplamaktır. Bu prensip hangi sayım yöntemine aittir?  
A) EMS yöntemi  
B) Dökme plak yöntemi  
C) Yüzeğe yayma yöntemi  
D) Hepsi
7. Besiyerlerinde yüzey kurutma işlemi hangi sayım yönteminde gereklidir?  
A) EMS yöntemi  
B) Dökme plak yöntemi  
C) Yüzeğe yayma yöntemi  
D) Hepsi
8. Dökme plak yöntemine göre çalışılarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Bu durumda numunenin 1 ml'inde bulunan bakteri sayısını aşağıdakilerden hangisidir.

Dilüsyon oranı	1:100	1:1000
Koloni sayısı	232 - 244	33 - 28

- A)  $2,4 \times 10^4$   
B) 24  
C) 2440  
D)  $2 \times 10^5$

## DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarı ile karşılaştırınız. Doğru cevap sayınızı belirleyerek kendinizi değerlendiriniz. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt yaşadığınız sorularla ilgili konuları faaliyete dönerek tekrar inceleyiniz.

# ÖĞRENME FAALİYETİ-2

## ÖĞRENME KAZANIMI

Gerekli ortam sağlandığında numunenin özelliğine ve tekniğine uygun olarak yüzeye yayma yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz.

## ARAŞTIRMA

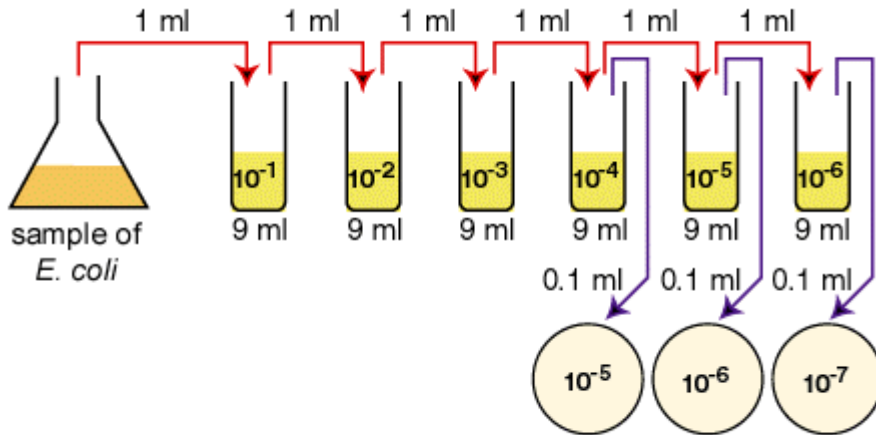
- Yüzeye yayma yönteminin kullanım amaçlarını araştırınız.

## 2. YÜZEYE YAYMA YÖNTEMİYLE SAYIM

### 2.1. Prensibi

Yayma yönteminin esası, önceden petri kutularına dökülüp katılaştırılmış (hatta bu şekilde stoklanmış) ve belirli bir düzeyde kurutulmuş besiyerleri üzerine 0,1 ml numune ya da uygun seyreltisinden aktarılarak drigalski spatülü ile besiyeri yüzeyine yayılması ve inkübasyon sonrası kolonilerin sayılmasıdır.

Yayma yönteminde 0,1 ml aktarılmasının nedeni, besiyerinin daha fazla hacmi emmemesi değil sadece hesap kolaylığıdır. Böylece 0,1 ml aktarılma sonunda koloni sayısı basit olarak 10 ile çarpılarak seyreltme çözeltilisinin 1 ml'sindeki sayı bulunup seyreltme faktörü ile çarpılarak orijinal örnekteki sayı hesaplanır. Gerek görüldüğü takdirde 0,25 – 0,5 ml'lik ekimlerde yapılabilir.



Şekil 2.1: Yüzeye yayma yöntemi ile sayım

Yüze yayma yönteminin dökme plak yöntemine göre bazı üstünlükleri ve sakıncalı tarafları bulunmaktadır. Her şeyden önce bu yöntemin uygulanışı dökme plak yöntemine göre daha çabuk ve kolaydır. Bu yöntemde petri kutusuna agarlı besiyeri dökülürken oluşabilecek hava kabarcıkları döküm sırasında alevle veya ekim öncesi steril bir iğne öze ile ortadan kaldırılabılır.

Dökme plak yönteminde sıcaklığa duyarlı mikroorganizmalar (özellikle psikrotroflar) besiyeri sıcaklığı yüksek olursa zarar görebilir. Zorunlu aerobik mikroorganizmalar, dökme plak yönteminde, agar içinde iyi bir gelişme olanağı bulamayabilir.

Bütün bunlara karşılık, yayma yönteminde kullanılan drigalski özesinde bir miktar mikroorganizma öze sığışıp kalabilir ve bu nedenle de düşük sayım sonuçları elde edilebilir (Cam üzerinin silikon ile kaplanmasıyla bu sorunun belli ölçüde üstesinden gelinebileceği bildirilmektedir. Silikon mikroorganizmaları cam kadar absorbe etmemektedir.).

Yüze yayma yönteminin bir diğer dezavantajı ise zorunlu aerobik bazı bakterilerin agar yüzeyinde çok çabuk gelişerek hemen yanındaki bakteri kolonilerini kaplayabilmesidir. Bu durum sayımları zorlaştırabilmekte ve yanıltıcı sonuçların alınmasına neden olabilmektedir.

Yayma yönteminde numunedeki mikroorganizma sayısı bu yöntemin kullanılabilceği kadar yüksek ise dökme yöntemine göre tercih edilmelidir. Bu konuda, analiz edilecek numunedeki mikroorganizma sayısı bağlayıcı olmakla beraber laboratuvarın tercihleri de önemlidir.

Bu yöntemin uygulanmasında dikkat edilmesi gereken husus drigalski spatülünün steril olmasıdır. Drigalski spatülü tek kullanımlık ise ambalajının yırtılmamış olduğuna dikkat edilmelidir. Diğerlerinde ise kullanılmadan önce 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 olduğu unutulmamalıdır.

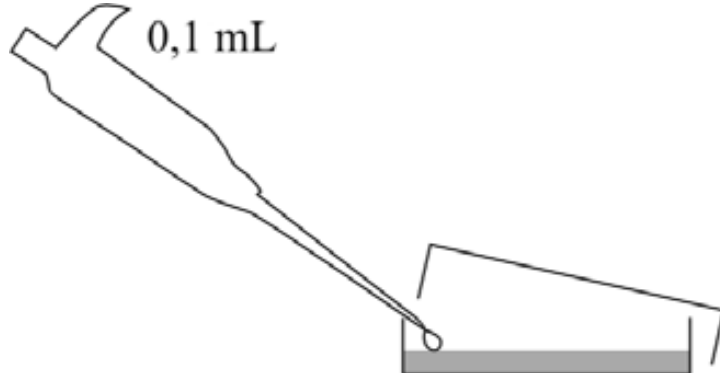
## 2.2. Yapılışı

Yüze yayma yönteminde aşağıdaki şekilde bir yol izlenebilir:

- İncelenecek numune homojenize edilir.
- Numunenin uygun dilüsyon serisi hazırlanır. Sayımı yapılacak numunenin mililitresinde ya da gramında binlerce hatta milyonlarca mikroorganizma bulunabilir. Bu durum dikkate alınarak genellikle incelenecek numunenin seri dilüsyonları hazırlanır.
- Ekim yapılacak dilüsyonlar belirlenir. Hazırlanan dilüsyonların tümünden ayrı ayrı ekimler yapılabilir. Ancak genelde ya  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  ya da  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  olacak şekilde bir seçim yapılarak ekimler için yalnızca bu dilüsyonlar

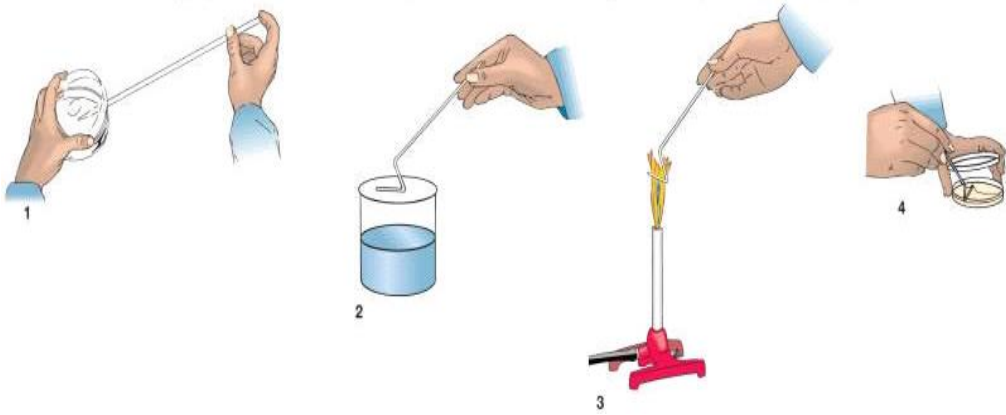
kullanılır. Bu seçimde, sayımı yapan kişinin deneyimi ile örnekteki mikroorganizma yükünü kabaca tahmin edebilmek önemlidir,

- Usulüne uygun olarak hazırlanmış ve yüzey kurutma işlemi yapılmış petri plakları alınır. Yüze yayma yönteminde agar yüzeyinin kuru olması çok önemlidir.
- Steril petri plaklarına; incelenecek numune, dilüsyon oranı, tarih, besiyeri gibi ayrıntılar yazılır. Her bir dilüsyon için en az iki petri kutusu hazırlanır (paralel çalışma).
- En büyük dilüsyondan başlayarak ekim için seçilen her bir dilüsyondan steril bir pipetle 0,1 ml steril iki petri plaklarına aktarılır.



**Şekil 2.2: Yüze yayma yönteminde numune aktarma işlemi**

- Aktarılan numune veya dilüsyonu steril drigalski özesi ile yayılır. Drigalski özesinin agara temas ettirilen kısmı genel olarak 4,5 veya 9 cm'dir (Petri kutusunun yarıçapı veya çapı). Bu özeler daha önceden alüminyum folyalara veya uygun bir kâğıda sarılarak kuru sıcak havada sterilize edilebilir. Ancak böyle bir olanak yoksa öze kullanımdan hemen önce alkole daldırılır ve daha sonra bunzen beki alevinden geçirilir ve alkolün yanıp uzaklaşması sağlanır. Böylesi bir yol izlendiğinde; öze ekim öncesinde besiyerinin boş kısmına değiştirilerek soğutulur. Ekimler yine en az paralel olacak şekilde iki ayrı petri kutusunda gerçekleştirilir.



**Şekil 2.3: Yüze yayma yönteminde yayma işlemi**



- Ekim yapılan petri plakları 10–15 dakika bekletilir. Bekletmenin amacı, besiyerinin numuneyi tamamen emebilmesi içindir.
- Petri kutuları ters çevrilerek, inkübatörde belirlenen sıcaklık derecesinde ve yöntemin gerektirdiği sürede inkübasyon işlemi (örneğin 35 C’de 48 saat gibi) yapılır.
- İnkübasyon sonunda petri kutuları sayıma alınır. Sayım, koloni adedi az ise direkt, koloni sayısı çok ise koloni sayıcıda, işaretli karelerde yapılır.
- Analizden sonra ekim yapılmış tüm malzeme otoklavda sterilize edilir ya da uygun bir kimyasal madde ile dezenfekte edilir. Daha sonra bu malzemeler yıkanır ya da atılır.

Aşağıda özet olarak yayma plak yöntemiyle maya ve küf sayımı işlem basamakları verilmiştir.

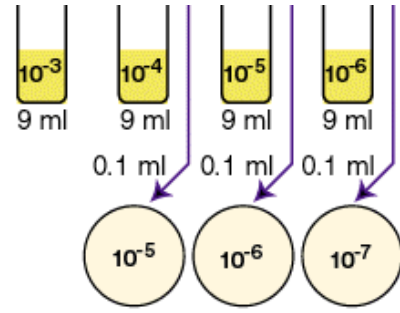

- 25 g numune usulüne göre alınır.
- 225 ml ringer veya peptonlu su içerisinde çözündürülerek  $10^{-1}$ ’lik ilk dilüsyon hazırlanır.
- Numunede beklenen mikrobiyal yüke göre uygun dilüsyonlar ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ...) hazırlanır.
- Önceden dökülüp kurutulmuş PDA içeren petri plaklarına her bir dilüsyondan 0,5'er ml paralelli olarak ekim yapılır ve drigalski özesi ile iyice yayılır.
- 37 °C'de 5-7 gün inkübasyona tabi tutulur.
- Oluşan maya ve küf kolonileri sayılarak sonuçlar maya sayısı ve küf sayısı olarak ayrı ayrı verilir.

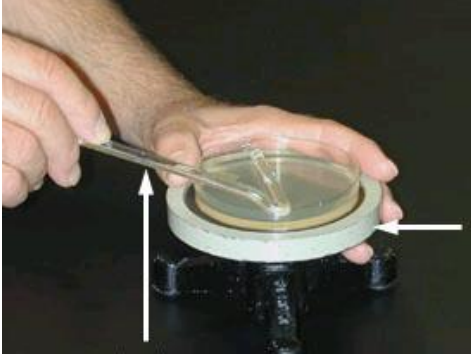
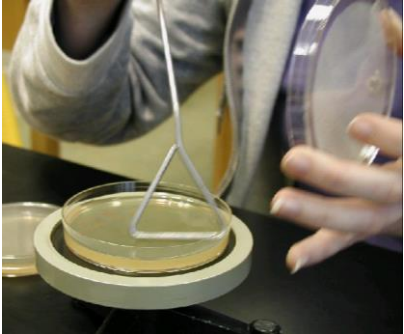
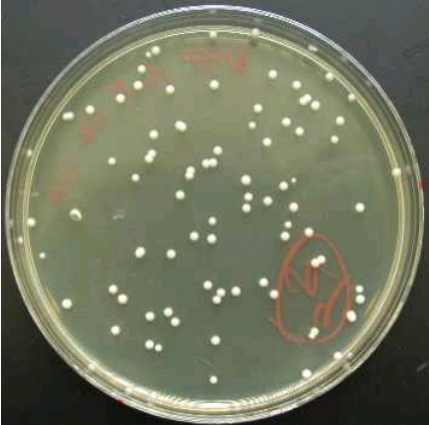
## UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak yüzeye yayma yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapınız.

### Uygulamada kullanılan araç gereçler

Blender/stomacher/mikser, etüv, su banyosu, koloni sayıcısı, hassas terazi, bek/steril kabin, tartım kapları, spatül, pipet, petri kutusu, öze, drigalski özesi, erlen, cam yazar kalem, sentetik besiyerleri, dilüsyon sıvısı, distile su.

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Agarlı besiyeri hazırlayınız.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Çalışma amacınıza uygun agarlı besiyeri seçiniz.</li><li>➤ Besiyeri hazırlama kurallarına uyunuz.</li><li>➤ Besiyeri modülünden faydalanınız.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Araç gereçleri sterilize ediniz.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Sterilize edeceğiniz araç gerecin özelliklerine göre uygun sterilizasyon yöntemi seçiniz.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Dilüsyon sıvısı hazırlayınız.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Numunenin özelliğine göre uygun dilüsyon sıvısı seçiniz.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Mikrobiyolojik analizler için numuneyi analize hazırlayınız.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Numunenin özelliğine göre uygun araç gereçleri kullanınız.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Analiz numunesinden dilüsyonları hazırlayınız.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Dilüsyon serileri hazırlama modülünden faydalanınız.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Ekim yapılacak dilüsyonları belirleyiniz.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Numunenin tahmini mikrobiyolojik yüküne göre seçim yapınız.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Petri kutularına cam yazar kalemle numune, dilüsyon, tarih bilgilerini yazınız.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Bilgileri eksiksiz ve okunaklı yazınız.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Petri kutusundaki agarlı besiyerine 0,1–0,25 ml numune veya dilüsyonlardan aktarınız.</li></ul> 	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Aseptik teknikle steril pipet kullanarak aktarma işlemi yapınız.</li></ul> 

<p>➤ Aktarılan numune ve dilüsyonları agarlı besiyeri yüzeyine yayınız.</p> 	<p>➤ Yayma işleminde steril drigalski özesi kullanınız.</p> 
<p>➤ 10–15 dakika bekletiniz.</p>	<p>➤ Numunenin besiyeri tarafından emildiğinden emin olunuz.</p>
<p>➤ Etüvde inkübasyon yapınız.</p>	<p>➤ İnkübasyon sıcaklığı ve süresini sayımını yapmak istediğiniz mikroorganizmaya göre belirleyiniz.</p>
<p>➤ Kolonileri ya koloni sayıcısında ya da gözle sayınız.</p> 	<p>➤ Koloni adedi az ise direkt olarak eğer koloni sayısı çok veya koloniler küçük ise koloni sayıcıda, işaretli karelerde sayım işlemini yapınız.</p>
<p>➤ Numunenin mikroorganizma yükünü hesaplayınız.</p>	<p>➤ Hesaplama işlemlerini kontrol ediniz.</p>

## ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümlelerde boş bırakılan yerlere tablodan uygun kelimeleri seçerek doldurunuz.

dezenfekte	dilüsyon serileri	otoklav	0,1
drigalski	direkt	koloni sayıcı	

1. Yayma yönteminin esası, önceden petri kutularına dökülüp katılaştırılmış (hatta bu şekilde stoklanmış) ve belirli bir düzeyde kurutulmuş besiyerleri üzerine ..... ml numune ya da uygun seyreltisinden aktarılarak ..... spatülü ile besiyeri yüzeyine yayılması ve inkübasyon sonrası kolonilerin sayılmasıdır.
2. Sayımı yapılacak numunenin mililitresinde ya da gramında binlerce hatta milyonlarca mikroorganizma bulunabilir. Bu durum dikkate alınarak genellikle incelenecek numunenin ..... hazırlanır.
3. İnkübasyon sonunda petri kutuları sayıma alınır. Sayım, koloni adedi az ise ....., koloni sayısı çok ise ..... işaretli karelerde yapılır.
4. Analizden sonra, ekim yapılmış tüm malzeme ..... sterilize edilir ya da uygun bir kimyasal madde ile ..... edilir. Daha sonra bu malzemeler yıkanır ya da atılır.

## DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

# ÖĞRENME FAALİYETİ-3

## ÖĞRENME KAZANIMI

Gerekli ortam sağlandığında numunenin özelliğine ve tekniğine uygun olarak EMS yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapabileceksiniz.

## ARAŞTIRMA

- EMS yönteminin kullanım amaçlarını araştırınız.

## 3. EMS YÖNTEMİYLE SAYIM

### 3.1. Prensibi

İstatistiksel olarak hazırlanmış EMS tablolarına dayalı bir sayım yöntemidir. Bu yöntem “kuvvetle muhtemel sayı” veya ‘çoklu tüp’ yöntemi olarak da adlandırılabilir.

Yöntemin prensibi ardışık üç seyreltiden sıvı besiyerlerine ekim yapıp inkübasyon sonunda gelişme olanları veya gaz oluşturanları pozitif olarak değerlendirmek ve istatistik yöntemlerle elde edilmiş tablolardan yararlanılarak numunenin mikroorganizma yükünü hesaplamaktır.

Yöntemin "en muhtemel sayı (Most Probable Number-MPN) olarak adlandırılma nedeni yukarıda da belirtildiği gibi örnekteki mikroorganizma sayısının istatistiksel olarak elde edilmiş tablolardan yararlanılarak hesaplanmasıdır. EMS yönteminde değerlendirme amacı ile çok sayıda ve farklı yaklaşımlar ile tablolar hazırlanmıştır.

EMS yöntemi istatistiksel tablolara dayalı bir tahmin yöntemidir. Bu nedenle, EMS yöntemi birçok olumlu yönüne karşılık, bazı olumsuzlukları da beraberinde taşımaktadır. Diğer taraftan bu yöntem, incelenen örnekteki canlı mikroorganizmaların sayımına dönük kültürel bir sayım yöntemidir.

EMS yöntemi uygun besiyeri kullanmak koşulu ile tüm bakteri ve maya sayımları için kullanılabilir. Küfler ise sıvı besiyerlerinde rahat gelişemedikleri için EMS yöntemi ile sayılamaz. 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 olduğudur (Oysa bu yöntemde standart olarak hazırlanan seyreltilerden ekimlerin yapılacağı şeklindedir.).

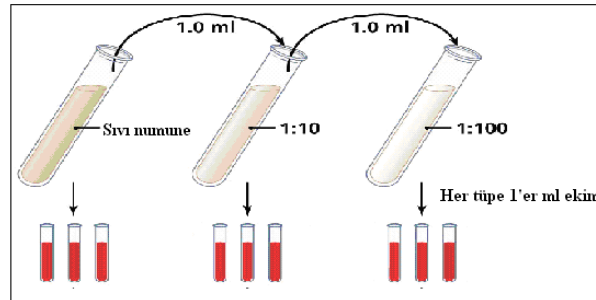
## 3.2. Yapılışı

EMS yönteminde ardışık üç seyreltiden birer ml veya tek seyreltiden farklı hacimlerde (10-1-0,1 ml gibi) uygun sıvı besiyerlerine ekim yapılabilir. Numune sıvı ise ilk seyrelti olarak numune ( $10^0$ ) kullanılabilir. Ekimde kullanılacak tüp sayısı değerlendirmede kullanılacak EMS tablosuna uygun olarak belirlenir. Genellikle üç veya beş tüp serisi kullanılmaktadır. Tüp serisi demek her bir seyreltiden ekilecek tüp sayısını ifade etmektedir yani her bir dilüsyon veya farklı hacimden üçer tüpe ekim yapılıyorsa bu üç tüp serisi anlamına gelmektedir.

Ekim miktarı fazla (10 ml veya daha fazla) ise kullanılacak besiyeri çift güçlü besiyeri şeklinde hazırlanabilir. Çift güçlü besiyeri demek besiyeri hacmini artırmadan içindeki besin elementleri miktarını iki katına çıkarmak demektir. Örneğin, koliform grup analizinde kullanılan LST broth besiyeri normalde 35,5 g/l konsantrasyonda hazırlanırken bu besiyerinin çift güçlüsünün hazırlanması gerektiğinde 71 g/l olarak hazırlanır. Bu tip ekimler için yeteri büyüklükte tüp kullanılmalıdır.

Besiyerlerine 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.

Tüplerin pozitif ya da negatif olduğunun değerlendirilmesi aranan mikroorganizma ve buna bağlı olarak kullanılan besiyerine göre 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 olabilir.



Şekil 3.1: EMS yöntemi

Yöntemin uygulanışı basit olarak ardışık 3 seyreltiden üçer adet 10 ml besiyerine birer ml ekim yapılması olarak tanımlanabilir. Gıda örneği sıvı ise orijinal örnekten ( $10^0$  seyrelti) ekime başlanabilir, böylelikle yöntemin duyarlılığı 10 kez artırılmış olur. Katı gıdada ise en düşük olarak  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  seyreltilerden birer ml ekim yapılabilir.

İlk aşamada incelenecek örneğin 3 adet seri dilüsyonu hazırlanır. Her bir dilüsyondan; üçer adet (3 tüp tekniği) veya beşer adet (5 tüp tekniği) olmak üzere, tüpteki sıvı besiyerine ekimler yapılabilir.

İnkübasyonu takiben, her bir dilüsyondaki pozitif tüp sayısı (mikroorganizma üremesi veya gelişimi gözlenen tüp sayısı) belirlenir. Daha sonra mevcut EMS tablosunda bu pozitif tüp sayısına, karşılık gelen mikroorganizma sayısı bulunur.

Bu sayı, çalışılan dilüsyonlar da dikkate alınarak sonuç olarak kaydedilir. Sonuçlar, kullanılan EMS tablosuna göre sayı/ml veya sayı/100 ml şeklinde verilebilir.

EMS yönteminde değerlendirme amacı ile çok sayıda ve farklı yaklaşımlar ile tablolar hazırlanmıştır. Aşağıda 3 tüp serisine göre hazırlanmış örnek bir tablo verilmiştir.

1 ml	0,1 ml	0,01 ml	EMS		1 ml	0,1 ml	0,01 ml	EMS
0	0	0	< 0,30		3	1	0	4,30
0	1	0	0,30		3	1	1	7,50
0	2	0	0,62		3	1	2	12,00
1	0	0	0,36		3	2	0	9,30
					3	2	1	15,00
1	1	0	0,74					
1	1	1	1,10		3	2	2	21,00
1	2	0	1,10		3	2	3	29,00
1	2	1	1,50		3	3	0	24,00
1	3	0	1,60		3	3	1	46,00
					3	3	2	110,00
2	0	0	0,92		3	3	3	>110,00
2	0	1	1,40					
2	1	0	1,50					
2	1	1	2,00					
2	2	0	2,10					
2	2	1	2,80					
2	3	0	2,90					
3	0	0	2,30					
3	0	1	3,80					
3	0	2	6,40					

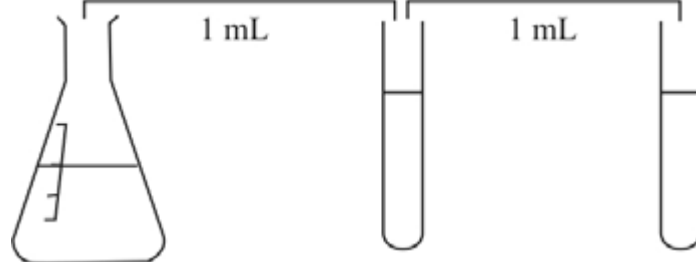
**Tablo 3.1 : 3 tüp serisine göre hazırlanmış örnek**

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.

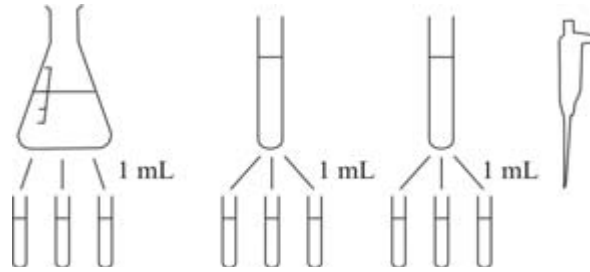
Yöntemin uygulanışı üç tüp serisine göre aşağıda özet olarak verilmiştir.

- Sayımı yapılacak mikroorganizmanın ve numunenin özelliklerine göre uygun besiyeri seçilerek usulüne uygun olarak hazırlanır. Besiyeri sıvı olmalı ve tüplerde hazırlanmalıdır. Gaz oluşumuna göre değerlendirilecekse tüplerin içerisine durham tüpünün ağzı aşağıya gelecek şekilde konularak besiyeri hazırlanmalıdır.



Şekil 3.2: Ardışık üç seyreltinin hazırlanması

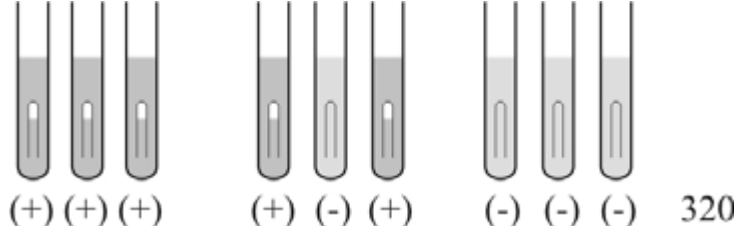
- Rutin uygulamalarda genellikle ardışık 3 seyreltiden ekim yeterlidir. Bu amaçla katı gıdalarda  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$  seyreltiler, sıvı gıdalarda ise beklenen sayıya göre ya  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$  ya da  $10^0$ ,  $10^{-1}$  ve  $10^{-2}$  seyreltiler kullanılır.
- Durham tüpü olan besiyerlerinde ekim öncesi gaz kontrolü yapılmalı, gaz olan tüplere ekim yapılmamalıdır. Durham tüpü olan besiyerleri herhangi bir aşamada tüp karıştırıcı kullanılarak karıştırılmamalıdır.



Şekil 3.3: EMS yönteminde ekim işlemi

- Her seyreltiden 3 besiyeri tüpüne ekim yapılır. Standart çalışmalarda tüplerde onar ml sıvı besiyeri bulunur. Standart ekimde seyreltilerden birer ml ekim yapılmakla beraber, özel uygulamalarda ilk seyreltiden onar ml ekim yapılabilir. onar ml ekim yapılacaksa besiyeri çift güçlü (kuvvetli) olarak hazırlanmış olmalıdır.
- Ekimden sonra besiyerleri inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sıcaklığı ve süresi sayımı yapılmak istenilen mikroorganizmaya göre belirlenir.





**Şekil 3.4: EMS yönteminde inkübasyon sonrası değerlendirme**

- İnkübasyon sonunda tüpler değerlendirilir. Değerlendirme bütün tüplerde (+) ya da (-) olarak yapılır. Bu, basitçe yapılan çalışmaya bağlı olarak bulanıklık ve/veya gaz oluşumu ile yapılır. Elde edilen sonuçlar EMS çizelgesinden yararlanılarak numunedeki mikroorganizma sayısı hesaplanır.
- Sayım sonunda kullanılan tüm malzeme sterilize edilerek yıkanır ya da atılır.

## UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamaklarını ve önerileri dikkate alarak EMS yöntemiyle mikroorganizma sayımı yapınız.

### Uygulamada kullanılan araç gereçler

Blender/stomacher/mikser, etüv, su banyosu, hassas terazi, bek/steril kabin, tartım kapları, spatül, pipet, petri kutusu, deney tüpü, durham tüpü, erlen, cam yazar kalem, besiyerleri, dilüsyon sıvısı, distile su.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Araç gereçleri sterilize ediniz.	➤ Sayım işlemlerinde kullanılacak araç gereçlerin steril olması gerektiğini unutmayınız.
➤ Dilüsyon sıvısı hazırlayınız.	➤ Numunenin özelliğine uygun dilüsyon sıvısı seçiniz. Örneğin süt ürünleri için ¼ ringer çözeltisi, diğer gıdalarda maximum recovery diluent kullanılması tavsiye edilir.
➤ Mikrobiyolojik analizler için numuneyi analize hazırlayınız.	➤ Aseptik çalışma kurallarına uyunuz.
➤ Sıvı besiyerini durham tüplü deney tüplerinde hazırlayınız.	➤ Tüplerin içerisine durham tüplerini ağzı aşağıya gelecek şekilde koyarak hazırlayınız.
➤ Numune katı veya mikroorganizma yükü çok ise dilüsyonlarını hazırlayınız.	➤ Desimal sisteme göre ardışık üç dilüsyon serisi hazırlayınız.
➤ Numuneden ve/veya dilüsyonlardan ekim yapınız.	➤ EMS yönteminde ardışık üç seyreltiden birer ml veya tek seyreltiden farklı hacimlerde (10-1-0,1 ml gibi) ekim yapılabildiğini göz önünde bulundurunuz.
➤ İnkübasyon yapınız.	➤ İnkübasyon sıcaklığı ve süresini sayımını yapmak istediğiniz mikroorganizmaya göre belirleyiniz.
➤ Durham tüplerini kontrol ederek gaz oluşunları belirleyiniz.	➤ Gaz oluşan tüpleri (+), gaz oluşmayanları (-) olarak değerlendiriniz.
➤ Gaz oluşan tüp sayılarını EMS tablosundan karşılaştırarak EMS sayısını belirleyiniz.	➤ Kullandığınız EMS tablosunun çalıştığı tüp serisine uygun olduğundan emin olunuz.
➤ Numunenin mikroorganizma yükünü hesaplayınız.	➤ Hesaplama işlemlerini kontrol ediniz.

## ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümlelerde boş bırakılan yerleri uygun kelimelerle doldurunuz.

1. EMS Yöntemi ile coliform bakteri aranması çalışmasında tüplerin pozitif olarak değerlendirilmesi nasıl yapılır?  
A) Durham tüplerinde gaz oluşumu  
B) Besiyerinde renk değişimi  
C) Bulanıklık  
D) Hepsi
2. EMS yöntemiyle sayımda aşağıdaki mikroorganizmalardan hangisi sayılamaz?  
A) Bakteriler  
B) Küfler  
C) Mayalar  
D) Hepsi
3. EMS yöntemi ile ilgili aşağıdaki ifadelerden hangisi yanlıştır.  
A) Numune sıvı ise ekimde ilk seyrelti olarak kullanılabilir.  
B) Ekim miktarı fazla ise besiyeri çift güçlü besiyeri şeklinde hazırlanabilir.  
C) Kullanılacak besiyeri mutlaka sıvı besiyeri olmalıdır.  
D) EMS yöntemiyle maya sayımı yapılamaz.
4. Aşağıdaki ifadelerden hangisi çift güçlü besiyerini tarif etmektedir?  
A) Besiyeri hacmini ve besin maddesi miktarının iki katına çıkarılması  
B) Besiyerine iki kat numunenin eklenmesi  
C) Besiyeri hacmini artırmadan besin maddesi miktarının iki katına çıkarılması  
D) Hazırlanan besiyerinin yarısının alınması
5. Aşağıdakilerden hangisi EMS yönteminde pozitif sonucun göstergesi olamaz?  
A) Bulanıklık oluşması  
B) Durham tüpünde gaz birikmesi  
C) Kolonilerin oluşması  
D) Renk değişimi

## DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise “Modül Değerlendirme”ye geçiniz.

# MODÜL DEĞERLENDİRME

Bu faaliyet kapsamında aşağıda listelenen davranışlardan kazandığınız beceriler için **Evet**, kazanamadığınız beceriler için **Hayır** kutucuğuna (X) işareti koyarak kendinizi değerlendiriniz.

Değerlendirme Ölçütleri	Evet	Hayır
1. Laboratuvar kıyafetinizi giyip çalışma öncesi hazırlıklarınızı yaptınız mı?		
2. Gerekli malzemeleri belirleyip temin ettiniz mi?		
3. Aseptik çalışma ortamı için gerekli tedbirleri aldınız mı?		
4. Steril edilecek malzemeleri belirledikten sonra sterilizasyon hazırlıklarını yapıp steril ettiniz mi?		
5. Gerekli besiyerlerini ve dilüsyon sıvısını usulüne uygun olarak hazırladınız mı?		
6. Analiz numunesini hazırladınız mı?		
7. Dilüsyon serisini hazırladınız mı?		
8. Petri kutularına cam yazar kalemle numune, dilüsyon, tarih bilgilerini yazdınız mı?		
9. Ekim yapılacak dilüsyonlardan birer ml alarak boş steril petri kutularına aktardınız mı?		
10. Agarlı besiyerini 45–50 °C'ye kadar soğuttunuz mu?		
11. Numune ve dilüsyonlardan konulmuş petri kutularına soğutulmuş agarlı besiyerlerinden 15–20 ml eklediniz mi?		
12. Masa üzerinde dairesel hareketlerle veya 8 çizdirerek karışmasını sağladınız mı?		
13. Katılaşıncaya kadar beklettiniz mi?		
14. Etüvde inkübasyon yaptınız mı?		
15. Kolonileri saydınız mı?		
16. Numunenin mikroorganizma yükünü hesapladınız mı?		
17. Durham tüplü besiyerlerinde ekim öncesi gaz kontrolü yaptınız mı?		
18. Ardışık üç seyreltiden 3 besiyeri tüpüne ekim yaptınız mı?		
19. İnkübasyon işlemi yaptınız mı?		
20. İnkübasyon sonunda tüpleri değerlendirdiniz mi?		
21. Elde edilen sonuçları EMS çizelgesinden yararlanılarak numunedeki mikroorganizma sayısını belirlediniz mi?		
22. Sayım sonunda kullanılan tüm malzemeleri sterilize ettiniz mi?		

## DEĞERLENDİRME

Değerlendirme sonunda “**Hayır**” şeklindeki cevaplarınızı bir daha gözden geçiriniz. Kendinizi yeterli görmüyorsanız öğrenme faaliyetini tekrar ediniz. Bütün cevaplarınız “**Evet**” ise bir sonraki modüle geçmek için öğretmeninize başvurunuz.

# CEVAP ANAHTARLARI

## ÖĞRENME FAALİYETİ-1'İN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	D
3	B
4	B
5	C
6	A
7	C
8	A

## ÖĞRENME FAALİYETİ-2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	0,1
2	Drigalski
3	Dilüsyon serileri
4	Direkt
5	Koloni sayıcı
6	Otoklav
7	Dezenfekte

## ÖĞRENME FAALİYETİ-3'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	A
2	B
3	D
4	C
5	C

## KAYNAKÇA

- AKŞİT, Filiz, Yurdanur AKGÜN, Nuri KİRAZ, **Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji**, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, Eskişehir, 1995.
- ARDA, Mustafa, **Temel Mikrobiyoloji**, Medisan Yayınları, Ankara, 2000.
- DURLU-ÖZKAYA, Fügen, **Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları**, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, Ankara, 2000.
- Gürgün Velittin, Kadir Halkman, **Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri**, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 1990.
- TEMİZ, Ayhan, **Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri**, Şafak Yayınları, Ankara, 1994.
- <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab4/105dil.html>