

CANLI HÜCRE SAYIMI / YAYMA VE DÖKME PLAK YÖNTEMLERİ**ANLAM ve ÖNEMİ:****MİKROBİYAL ÇOĞALMANIN ÖLÇÜMÜ****Hücre sayısındaki değişimlerin ölçüm yöntemleri**

- Doğrudan sayım → Doğrudan mikroskopik sayım veya flow-sitometri ile sayım
- **Canlı hücre sayımı** → **Katı besi yeri üzerinde oluşan kolonilerin sayımı (Yayma plak ve dökme plak teknikleri)**
- Bulanıklık ölçümü → Hücre kültürlerinin OD ölçümleri

Hücresel bileşenlerin miktarındaki değişimin ölçüm yöntemleri (Dolaylı Ölçüm Yöntemleri)

- Proteinler, nükleik asitler vs gibi hücresel yapılar
- Hücre/biyokütlenin kuru ağırlığı (mg UAKM/ L)

CANLI HÜCRE SAYIMI (CHS)**NEDİR ve NEDEN uygulanır?**

Numunedeki **toplam canlı hücre sayısının** belirlenmesi uygun bir **agar besiyerinde koloni oluşturabilme** (*CHS = plaka sayımı*)

agar besiyerindeki koloni sayısı = original örnekteki canlı organizma sayısı

CHS → Numunedeki **canlı hücre sayısının yüksek hassasiyetle gerçeğe en yakın tahmini** ve "**canlı hücre sayımı**" ile **kantitatif** ve **kalitatif** sonuç eldesi

Canlı Hücre Sayımının Temel Kabulü

"1 canlı hücre 1 koloni oluşturur"

İlave Bilgi**Seyreltme Suyu (Peptonlu Su veya İzotonik Su)**

Uygun pH'da tamponlanmıştır ve mikrobiyal çoğalma için gerekli elementleri içerir.

<u>Kültüre Alma ve İnkübasyon</u>	<u>Besiyeri</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Süre</u>
• Toplam Bakteri Sayımı	PCA	37°C	2 gün
• Koliform Sayımı	EMB	37°C	1 gün
• Maya ve Küf Sayımı	MEA	25°C	sırasıyla 3 ve 5 gün)

PCA: Plate Count Agar; EMB: Eosin Methylene Blue Agar; MEA: Malt Extract Agar

Agar

Kırmızı algden elde edilen bir polisakkarittir.

Katılaştırmak için sıvı besiyerine eklenir (ilk olarak Robert Koch tarafından yapılmıştır)

- Çoğu mikroorganizma tarafından biyolojik olarak parçalanamaz
- **≥+45°C** sıcaklıkta **sıvı** formdadır (otoklavlamadan sonra) ve **soğurken katılaşmaya** başlar.
- **+37°C'de katı** olması önemlidir → insan vücut sıcaklığı → kültüre alınacak ve sayılacak olan çoğu **insan patojeni** için **optimum sıcaklıktır**

Kullanılan Malzeme / Ekipman / Enstrüman Listesi

(Çoğaltma besiyeri için kimyasallar ve seyreltme suyu hazırlığı, çoğaltma besiyeri reçeteleri, pepton, sodyum klorür, tartım kapları, hassas terazi, tartım kaşığı, distile su, pH metre ve çözeltileri, erlen, pamuk, otoklav → önceki lab haftası YAPILMIŞTIR)

Su banyosu ≥+45°C, sıvılaştırılmış agarlı çoğaltma besiyeri, numune, seyreltme suyu, steril cam pipetler (ya da otomatik pipet ve pipet uçları), Bunzen beki, kapaklı numune tüpleri, vorteks, petri plakaları, cam kalemi, steril cam çubuk (drigalski spatulası), inkübatör

DENEYSEL PROSEDÜR:**Çoğaltma besiyerinin hazırlanması**

- Reçetesi kullanılarak kimyasallar tartılır, agar ilave edilir, distile suda karıştırılır, pH ayarlanır
- Otoklavda sterilize edilir (@121°C; >1 atm; ≥15 dak)
- Petrilere dökene kadar ≥+45°C 'de (su banyosunda) sıvı formda bekletilir

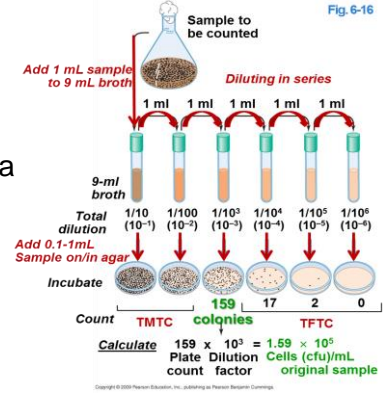
Seyreltme Çözeltisinin (Peptonlu Su) hazırlanması

- Pepton (1.0 g/L) ve sodyum klorür (8,5 g/L) tartılır ve distile suda çözülür.
- Otoklavda sterilize edilir (@121°C; >1 atm; ≥15 dak)

Seri Seyreltme (seri halde üç farklı seyreltme hazırlayınız)

Aseptik çalışma ve steril pipetler kullanımı (ya da otomatik pipet, pipet uçları);

1. **9 mL seyreltme suyu** numune tüplerine ilave edin
2. **1 mL iyi karıştırılmış orijinal numuneyi** ilk tüpteki **9 mL seyreltme suyuna** ilave edin → **1/10 seyreltme (10⁻¹)**
3. **vorteks** ile 1inci seyreltmeyi karıştırın
4. **1inci seyreltmeden 1 mL'yi** ikinci tüpteki **9 mL seyreltme suyuna** ilave edin → **1/100 seyreltme (10⁻²)**
5. **vorteks** ile 2inci seyreltmeyi karıştırın
6. **2inci seyreltmeden 1 mL'yi** üçüncü tüpteki **9 mL seyreltme suyuna** ilave edin → **1/1000 seyreltme (10⁻³)**

**DÖKME PLAK Yöntemi**

Aseptik çalışılır; ekime en düşük seyreltme ile başlanır, her seyreltme için çift ekim yapılır (toplam ≥6 plak)

1. **Pipet ile 1 mL seyrelmiş numunedan steril boş petri plakanın içine dökülür.**
2. **Yaklaşık 15 mL ılık agar besiyeri (~45-50°C)** petrideki numunenin üstüne dökülür. *Numunedeki mikroorganizmaların kısa süreli +45°C sıcaklığa dayanabilir olmaları gerekir (→ hatalı sonuca neden olabilir)*
3. Numune ile sıvı agar tezgah üzerinde 3 kere **yavaşça gezdirerek (∞ çizerek) karıştırılır.**
4. Agarın **katılaşması** için oda sıcaklığında **beklenir.**
5. **Optimum sıcaklıkta optimum süre inkübe edilir.**
6. Tekil koloniler **sayılır ve kob/mL hesaplanır.**

Yüzeyde → zorunlu aeroblar

Ağarın içinde → fakültatif m.o.

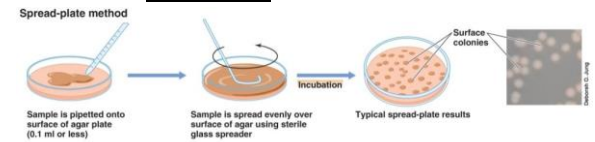
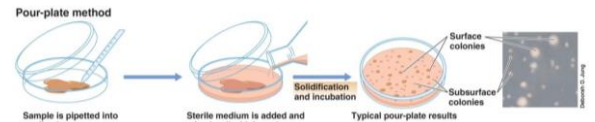
Tabanda → anaeroblar

YAYMA PLAK Yöntemi

Aseptik çalışılır; ekime en düşük seyreltme ile başlanır, her seyreltme için çift ekim yapılır (toplam ≥6 plak)

1. **Sıcak (~45-50°C) sterilize agar besiyeri** petrinin içine **dökülür.**
2. Agar **soğuyup katılaşıncaya kadar beklenir.**
3. **Katılaşmış agar besiyerinin üzerine pipet ile 0.1 mL seyreltilmiş numunedan konulur.**
4. Numune **steril cam çubuk (drigalski spatula)** kullanılarak agarın **yüzeyine yayılır.**
7. **Optimum sıcaklıkta optimum süre inkübe edilir.**
5. Tekil koloniler **sayılır ve kob/mL hesaplanır.**

Yüzeyde → **Aeroblar** (+belki fakültatif m.o.)



$$\text{Toplam canlı hücre sayısı/mL numune} = \text{Koloni Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \text{kob /mL}$$

KAYNAKLAR:

- Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V. and Clark D.P. (2009). "**Brock Biology of Microorganisms**", 12th edn., Pearson Education Inc., Glenview IL, USA, ISBN: 978-0321-53615-0. [Mustafa Inan Main Library: QR41.2 .B76 2009] / (Chpt06, pp-153-156)
- Leboffe, M.J. and Pierce B.E. (1996). "**A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory**", 3rd edn., Morton Publishing Co, Colorado, USA, ISBN: 9780895826565. [Mustafa Inan Main Library: QR54 .L43 2005], p83.