



KOLİFORM ORGANİZMALARIN SAYILARININ TAYİNİ ÇOKLU TÜP FERMANTASYON METODU



EN MUHTEMEL SAYI METODU (EMS)

[MOST PROBABLE NUMBER METHOD (MPN)]

Koliform grubu organizmalar sadece insanların sindirim sisteminde değil aynı zamanda kümes ve çiftlik hayvanları ile kedi ve köpek gibi sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında da bulunurlar. Bu sebeple bir akarsu veya gölde yüksek koliform konsantrasyonuna rastlanması, insanlardan değil, hayvanlardan ileriye gelen bir kirlenmenin de işareti olabilmektedir. Hayvan ve insan kaynaklı kirlenmeyi birbirinden ayırmak için koliform ve streptokok grubu mikroorganizmaların sayıları arasındaki oranın insan ve hayvanlarda önemli şekilde farklı olmasından faydalanılmaktadır. Evcil hayvanlarda (fokal koliform/fokal streptokok) oranı 1,0'dan küçük olduğu halde insanlarda bu oran 4,0'dan büyüktür.

Koliform organizmalar su numunesi içerisinde uniform olarak dağılmış olmadıklarından bunların belirli bir hacim içerisine isabet eden sayılarını bulmak bir istatistik ve ihtimal işi olmaktadır. Az sayıda deney yapmak, dolayısıyla az bir numune kısmı ile çalışmak yanlış sonuçlar verebilir. Bu durum özellikle fermantasyon tüpleriyle çalışıldığında ortaya çıkmaktadır. Şöyle ki; burada kullanılan tüpe aşılana (ekilen) numune kısmı oldukça küçük olup bu tekniğin prensibi, numuneyi seyreltmek suretiyle fevkalade küçük kısımlara ayırmaktır. Numune hacmi ne kadar küçükse içindeki bakteri ihtiva etme ihtimali o derece azdır. Fermantasyon tüplerine aktarılan numune içerisinde bakteri mevcutsa, inkübasyon şartları altında besiyerinde çoğalarak küçük tüplerin içerisinde gaz toplanmasına sebep olur.

Çoklu tüp (Şekil 1) yöntemi kullanılarak içme suları, içme suyu kalitesinin dışındaki sular, tuzlu veya acı sular çamurlu sular ve hatta sedimentlerdeki koli miktarı tespit edilebilmektedir.



Çizelge 1. Çoklu tüpte laktoz broth

ÇOKLU TÜP FERMANTASYON DENEYİ

Malzemeler

1. Aseptik ortam malzemeleri (bunsen beki alevi ve dezenfektan madde)
2. Laktoz Broth besiyeri - LB
3. Brilliant Green besiyeri (Agar besiyeri) - BGB
4. 250 ml'lik bakteriyolojik balonlar
5. Mikrobiyolojik steril cam tüpler (15 adet – 1 grup çalışma için)
6. Durham tüpleri
7. Petri kutuları
8. Spor
9. Pipetler (10ml ve 1 ml)
10. Steril distile su

Cihazlar

1. Otoklav
2. Etüv
3. İnkübatör
4. Mikroskop
5. Koloni sayacı

Deney Adımları:

TSE ve ISO Standartlarına göre analiz yapılmakta olup çoklu tüp fermantasyon tekniği 3 temel adımda gerçekleştirilir. Bunlar:

- A. Tahmin Deneyi
- B. Doğrulama Deneyi
- C. Tamamlama Testi

şeklindedir.

A. Tahmin Deneyi

1. Cam tüpler (3*5=15 adet – tek grup için) otoklavda steril edilir
2. Laktoz broth (LB) besiyeri hazırlanır
3. LB besiyeri, her bir steril deney tüpüne 10 ml hacimde dağıtılır
4. Besiyerli cam tüplerin içerisine Durham Tüpleri ters konumda yerleştirilip otoklavda 120 derece ve 1 atm basınçta 15 dk süreyle steril edilir. Bu esnada cam tüplerin içerisindeki besiyeri hem steril edilir hem de durhaim tüpleri içerisindeki hava dışarı çıkarak sıvı besiyeri içerisine rahatça dalmaları sağlanır

5. Sterilizasyon esnasında diğer bir taraftan, koli tayini yapılacak numune evsel atıksu ise öncelikle 10^{-3} kat seyreltilip sonrasında bu numuneden
 - 1 ml alınıp 10 ml ye tamamlanır (10^{-4} seyreltme oranı), bu numuneden
 - 1 ml alınıp 10 ml ye tamamlanır (10^{-5} seyreltme oranı), bu numuneden
 - 1 ml alınıp 10 ml ye tamamlanır (10^{-6} seyreltme oranı)
6. Hazırlanan herbir numune konsantrasyonu (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}), içerisinde besiyeri ve durhaim tüpleri bulunan steril edilmiş her 5 tübe bir konsantrasyon gelecek şekilde toplam 15 tübe aseptik şartlarda dikkatli bir şekilde ekim yapılır
7. Şayet numune çok sayıda koli ihtiva ediyorsa seyreltme oranları arttırılabilir. Ek olarak; içme suyu numunesinde koli tayini yapılacaksa seyreltme yapmaya gerek yoktur
8. Ekim yapılan tüpler 35 derecede 24+24 saat süreyle inkübatörde bekletilir
9. 48 saat sonunda durhaim tüplerinde gaz teşekkülü mevcut mu gözlemlenir. Gaz teşekkülü pozitif sonuçtur ve numunede koliform bakterilerin mevcut olduğunun tahmini bir göstergesidir. Pozitif sonuç alınan tüpler ilgili Çizelge 1’de (+) olarak işaretlenir
10. Negatif sonuç, mikrobiyal bir çoğalmanın olmadığını ya da üremenin gazsız olduğunu gösterir. Bu durumda koli grubu bakteriler yoktur ve sonuç negatif (-) olarak ilgili Çizelge 1’de işaretlenir

Tahmin deneyi bitmiştir. Burada alınan pozitif sonuç, koliformların mevcut olduğunu kesin olarak göstermez. Doğrulma deneyi ile analize devam edilmelidir.

B. Doğrulama Deneyi

1. Brilliant Gren (BGB) besiyeri hazırlanır (koliform bakterilerin ortam şartlarına dayanımı, farklı bir besiyeri kullanılarak test edilir)
2. Hazırlanan BGB, 15 adet farklı cam tübe 10 ml hacimde dağıtılır
3. Cam tüplerin içerisine durhaim tüpleri yerleştirilip otoklavda steril edilir
4. Tahmin deneyinde kullanılan ve sadece pozitif sonuç veren tüplerden steril bir öze yardımıyla numuneler alınıp BGB’li steril tüplere ekim yapılır (sıvıdan sıvıya ekim). Burada benzer oranlı tüpler benzer oranlı tüplere ekilmelidir
5. Ekim yapılan tüpler 35 derecede 24+24 saat süreyle inkübatörde bekletilir
6. İnkübasyon sonrasında durhaim tüplerinde gaz teşekkülü gözlemlenir. Burada gaz çıkışı varsa, bunların koli grubu bakteriler olduğuna karar verilir ve sonuçlar (+) ya da (-) olarak ilgili çizelgede işaretlenir (Çizelge 1).

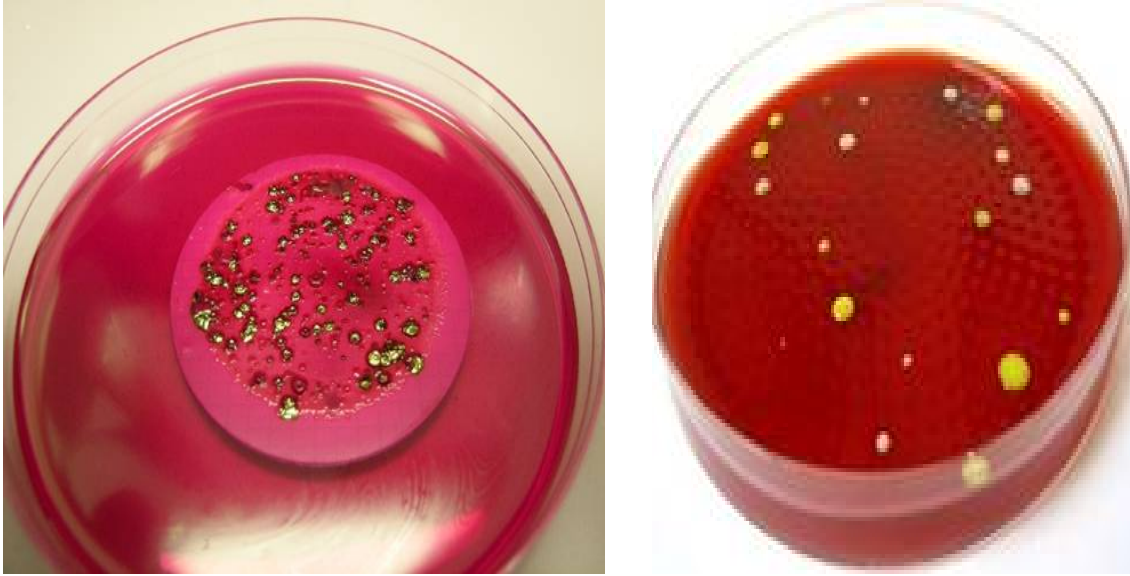
Doğrulama deneyi bitmiştir. Burada alınan pozitif sonuç, koliformların mevcut olduğunun kesin kanıtı olup fekal orijinli olup olmadığının kesin kanıtı değildir (Bunun için tamamlama testi yapılmalıdır)

Çizelge 1. Çoklu tüp fermentasyon yönteminde deney sonuçlarının kaydedilmesi (Örnek Tablo)

ZAMAN (Saat)	LAKTOZLU SIVI BESİYERİ (TAHMİN DENEYİ)												EMS 100ml
	10 ml					1 ml				0,1 ml			
24 ± 2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
48 ± 2						+	+	+	-	-	-	-	-
BGB'li SIVI BESİYERİ (DOĞRULAMA DENEYİ)													
24 ± 2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
48 ± 2						+	+	+	-	-	-	-	-
Kombinasyon	5					3				0			80

C. Tamamlama Deneyi

1. Doğrulama deneyinin alternatifi olup fekal orijinli koliyi bulmak amacıyla yapılır
2. Katı besiyeri (LES ENDO agarlı) kullanılır, bakteri sadece ekildiği yerde ürer ve koloni teşkil eder (Şekil 2)
3. Tahmin deneyinde pozitif sonuç veren tüplerdeki numuneler, çizgi ekimle petri kutularına ekilir (sıvıdan katıya ekim)
4. 44.5 derecede 24+24 saat inkübasyon yapılır
5. Petri kutusunda sarı, yeşil ve kırmızımtırak parlak metalik renkli koloniler *E.coli* olarak tespit edilir.



Şekil 2. Koliform organizmaların ENDO besi ortamında gelişimi

HESAPLAMA

Çoklu tüp yönteminde, aynı hacimde numune ihtiva eden çeşitli fermantasyon tüpleri kullanılarak yapılan doğrulama deneyleri sonucunda elde edilen pozitif sonuçlar doğrultusunda belirlenen değerler istatistiksel açıdan tespit edilerek standart metotta Çizelgeler halinde verilmiştir (Çizelge 2. Çizelge 3. Çizelge 4 ve Çizelge 5). Bu yöntemle verilen sonuç, kantitatif olmayıp çalışılan numune hacmi ve gaz veren tüp sayısına bağlı olarak geliştirilen birer olasılık hesaplarıdır. Su numunelerindeki toplam koliform sayıları EMS olarak ilgili olasılık Çizelgelerinde okunup sonuçlar, cfu/100 ml şeklinde rapor edilmektedir.

Çizelge 2. 5 adet 10 ml’lik ekimler sonucu elde edilen pozitif sonuçlara göre EMS değerleri

POZİTİF TÜP SAYISI	EMS Adet/100 ml
0	<2.2
1	2.2
2	5.1
3	9.2
4	16.0
5	>16.0

Çizelge 3. 10 adet 10 ml'lik ekimler sonucu elde edilen pozitif sonuçlara göre EMS değerleri

POZİTİF TÜP SAYISI	EMS Adet/100 ml
0	<1.1
1	1.1
2	2.2
3	3.6
4	5.1
5	6.9
6	9.2
7	12.0
8	16.1
9	23.0
10	>23.0

Çizelge 4. Her seyreltme için (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) 5 tüpe ekim yapılması durumunda pozitif sonuçlara göre EMS değerleri

Pozitif Kombinasyon	EMS Adet/ 100 ml	Pozitif Kombinasyon	EMS Adet/ 100 ml	Pozitif Kombinasyon	EMS Adet/ 100 ml
0-0-0	<2	3-2-0	14	5-2-0	50
0-0-1	2	3-2-1	17	5-2-1	70
0-1-0	2	4-0-0	13	5-2-2	90
1-0-0	2	4-0-1	17	5-3-0	80
1-0-1	4	4-1-0	17	5-3-1	110
1-1-0	4	4-1-1	21	5-3-2	140
1-1-1	6	4-1-2	26	5-3-3	170
1-2-0	6	4-2-0	22	5-4-0	130
2-0-0	4	4-2-1	26	5-4-1	170
2-0-1	7	4-3-0	27	5-4-2	220
2-1-0	7	4-3-1	33	5-4-3	280
2-1-1	9	4-4-0	34	5-4-4	350
2-2-0	9	5-0-0	23	5-5-0	240
2-3-0	12	5-0-1	30	5-5-1	300
3-0-0	8	5-0-2	40	5-5-2	500
3-0-1	11	5-1-0	30	5-5-3	900
3-1-0	11	5-1-1	50	5-5-4	1600
3-1-1	14	5-1-2	60	5-5-5	>1600

Çizelge 5. 100 ml numune başına koliform bakterilerinin en muhtemel sayısı

Pozitif tüp sayısı				Pozitif tüp sayısı				Pozitif tüp sayısı				Pozitif tüp sayısı				Pozitif tüp sayısı				Pozitif tüp sayısı			
1	0.1	EMS		10	1	0.1	EMS	10	1	0.1	EMS	10	1	0.1	EMS	10	1	0.1	EMS	10	1	0.1	EMS
mL	mL	(MPN)		mL	mL	mL	(MPN)	mL	mL	mL	(MPN)	mL	mL	mL	(MPN)	mL	mL	mL	(MPN)	mL	mL	mL	(MPN)
0	0			1	0	0	2.0	2	0	0	4.5	3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	1	1.8		1	0	1	4.0	2	0	1	6.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	2	3.6		1	0	2	6.0	2	0	2	9.1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	3	5.4		1	0	3	8.0	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	4	7.2		1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	5	9.0		1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
1	0	1.8		1	1	0	4.0	2	1	0	6.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
1	1	3.6		1	1	1	6.1	2	1	1	9.2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
1	2	5.5		1	1	2	8.1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
1	3	7.3		1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
1	4	9.1		1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	36	5	1	4	110
1	5	11		1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
2	0	3.7		1	2	0	6.1	2	2	0	9.3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
2	1	5.5		1	2	1	8.2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
2	2	7.4		1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
2	3	9.2		1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
2	4	11		1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
2	5	13		1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
3	0	5.6		1	3	0	8.3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
3	1	7.4		1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
3	2	9.3		1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
3	3	11		1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
3	4	13		1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
3	5	15		1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
4	0	7.5		1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
4	1	9.4		1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
4	2	11		1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
4	3	13		1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
4	4	15		1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
4	5	17		1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
5	0	9.4		1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
5	1	11		1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
5	2	13		1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
5	3	15		1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
5	4	17		1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
5	5	19		1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81				