

07.02. En Muhtemel Sayı Yöntemi

07.02.01 Genel Bilgiler

Sıvı besiyeri kullanılan sayım yöntemi denildiğinde, "En Muhtemel Sayı; EMS (Most Probable Number; MPN)" yöntemi anlaşılır. Bu yöntem, eski kaynaklarda "Kuvvetle Muhtemel Sayı; KMS" olarak da anılır. Yöntemin esası, ardışık 3 seyreltiden 3'er adet sıvı besiyerine 1'er mL ekim, inkübasyon sonunda tüplerin pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmesi ile elde edilecek kodun, istatistik yöntemlerle elde edilmiş çizelgeden okunmasıdır.

Yöntemin "En Muhtemel Sayı" olarak adlandırılma nedeni; yukarıda da belirtildiği gibi, örnekteki mikroorganizma sayısının istatistiksel olasılık hesapları ile elde edilmiş çizelgelerden yararlanılarak hesaplanmasıdır. Ekimi yapılan tüpe en az 1 adet canlı hücre geçer ise bu tüp inkübasyon sonunda pozitif sonuç, aksine olarak tüpe 1 adet bile canlı hücre geçmez ise inkübasyon sonunda bu tüp negatif sonuç verir. Bu yöntemin uygulanışı basit olarak ardışık 3 seyreltiden 3'er adet 10 mL besiyerine 1'er mL ekim yapılması olarak tanımlanabilir.

EMS yöntemi, tüp seyreltme yöntemi ile yarı kantitatif sayımın modifiye edilmiş şeklidir. Tüp seyreltme yöntemi "titre belirlemek" için halen günlük uygulamada kullanılmakta olup, 07.04. Bölümde verilmiştir. Basit olarak, standart şekilde seyreltmeler yapılır, her seyreltmeden uygun bir sıvı besiyerine 1'er mL aktarılır. Seyreltmede, giderek azalan sayı nedeniyle ardışık seyreltilerden artık birisinden ve bundan daha seyreltik olan seyreltilerden besiyeri tüplerine 1 adet dahi canlı hücre geçmeyecektir. İnkübasyon sonunda tüpler (+) ya da (-) olarak değerlendirilir.

İçinde 1.000/mL canlı hücre olan bir çözeltiliden yapılan standart seyreltmeler ve ardından sıvı besiyeri olan tüplere 1'er mL ekim ve inkübasyon sonunda, tüpler aşağıdaki gibi değerlendirilir.

Şekil 12. Tüp Seyreltme Yöntemi

0^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1.000/mL	100/mL	10/mL	1/mL	0,1/mL	0,01/mL
↓	↓	↓	↓	↓	↓
U	U	U	U	U	U
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

Bu örnekte 10^{-3} seyreltiden alınan 1 mL ile besiyerine 1 canlı hücre geçtiği için bu tüp pozitif sonuç vermiştir. Oysa 10^{-4} seyreltinin 1 mL'sinde 0,1 canlı hücre vardır. Bunun anlamı; 1 mL'de 1 canlı hücre olma olasılığı %10'dur ve dolayısıyla %90 olasılıkla bu tüpten yapılan ekim (-) sonuç verecektir. 10^{-5} seyreltiden yapılan ekimde ise %99 olasılıkla (-) ve ancak %1 olasılıkla (+) sonuç alınır.

Yarı kantitatif değerlendirme kuralları çerçevesinde böyle bir sonuç alınırsa sonuç "örnekte 10^3 /mL ile 10^4 /mL arasında mikroorganizma var" şeklinde verilir ve bu örnek için bu sonuç doğrudur.

Aslında, örneğin 1 mL'sinde 800 canlı hücre olduğu varsayılır ise 10^{-1} seyreltide mL'de 80; 10^{-2} seyreltide mL'de 8 ve 10^{-3} seyreltide mL'de 0,8 adet bakteri olacaktır. mL'de 0,8 adet bakteri olmasının anlamı 1 mL'de 1 adet bakteri bulunma olasılığının %80 olmasıdır. Buna göre bu tüpten yapılan ekim %80 olasılıkla (+) ve %20 olasılıkla (-) sonuç verecektir. Benzer şekilde 10^{-4} seyreltiden yapılan ekimde %8 olasılıkla (+) ve %92 olasılıkla (-) sonuç alınır. Daha sıklıkla beklenildiği gibi 10^{-3} seyrelti pozitif ve 10^{-4} seyrelti negatif sonuç verirse, analiz edilen örnekte 1.000 ile 10.000/mL arasında bakteri olduğuna karar verilir, oysa sadece 800 adet/mL bakteri vardır. Bu nedenle sonuçlar, yarı kantitatif yaklaşımla verilmez.

Aynı örnekte her seyreltiden 10'ar besiyerine ekim yapılırsa; basit olasılık hesaplarına göre 10^{-3} seyreltiden yapılan ekimde 8 (+) ve 2 (-) sonuç alınacaktır. 10^{-4} seyreltiden ise muhtemelen 1 (+) ve 9 (-) sonuç elde edilir.

EMS yönteminin esası da budur. Her seyreltiden birden fazla tüpe ekim yapılır ve inkübasyon sonunda tüpler ayrı ayrı değerlendirilip, elde edilen kod aracılığı ile örnekteki sayı "tahmin edilerek" verilir.

Her seyreltiden 3, 5 ya da 10'ar tüpe ekim yapılarak elde edilecek (+) ve (-) sonuçlara göre geliştirilmiş istatistik esaslı çizelgeler bulunmakla birlikte, en yaygın olarak kullanılan 3'er tüpe ekimdir ve bu kitapta verilen de bu uygulama şeklindedir. Kuşkusuz, her seyreltiden 5'er tüpe ekim yapıyorsa, değerlendirmede bu ekim şekline özgü çizelge kullanılmalıdır.

Yukarıda verilen örnek bu kez EMS ekim yöntemine göre aşağıda yinelenmiştir.

Şekil 13. EMS Yönteminde Kod Kavramı

10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
800/mL	80/mL	8/mL	0,8/mL	0,08/mL	0,008/mL
↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓
U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U
+ + +	+ + +	+ + +	+ - +	- - -	- - -
3'te 3 (+)	3'te 3 (+)	3'te 3 (+)	3'te 2 (+)	3'te 0 (+)	3'te 0 (+)
3	3	3	2	0	0

Her seyreltiden 3'er tüpe ekim yapıldığına göre bu 3 tüpün kaç adedinde (+) sonuç alındığı sayılır ve bu şekilde kod elde edilir. Kod, ardışık 3 seyreltinin (+) değerleridir. Diğer bir deyiş ile eğer 10^0 ; 10^{-1} ve 10^{-2} serisi alınırsa kod 3 3 3 ve eğer 10^{-3} ; 10^{-4} ve 10^{-5} serisi alınırsa bu kez kod 2 0 0 olmaktadır.

Yöntemde ardışık 3 seyreltiden elde edilen kod kullanılacağına göre, hangi ardışık 3 seyreltiden ekim yapılacağı kararlaştırılmalıdır. Örnekteki mikroorganizma yükü hakkında bir bilgi yoksa ya da daha güvenli bir sonuç elde etmek istenirse, ardışık 4 seyreltiden ekim yapılır, sonuçlar alındıktan sonra hangi ardışık 3 seyreltinin EMS çizelgesinde kullanılacağı belirli bir kural çerçevesinde seçilir. Bu konu 07.02.02. EMS yönteminin uygulanması bölümünde açıklanmıştır.

EMS yönteminde sıvı besiyeri olan tüplerin mutlaka 10 mL olması kural değil, genel bir benimseyiştir. *Staph. aureus* 'un EMS yöntemi ile sayımında kullanılan Giolitti-Cantoni Broth 19 mL olarak hazırlanır (bakınız 18.03. Bölüm). Tersine, standart analizde pek çok laboratuvarında besiyerleri 9 mL olarak hazırlanmaktadır. 9 mL kabul edilebilir bir değerdir, ancak daha az miktarda besiyeri kullanılması halinde sahte negatif sonuçlar alınabilir.

En yaygın kullanılan EMS çizelgesi aşağıda verilmiştir (Çizelge 06). Bundan başka EMS çizelgeleri olduğu da unutulmamalıdır.

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

Çizelge 06'da normal olarak $4^3 = 64$ adet olasılık verilmesi gerekirken, bazı sayım sonuçları verilmemiştir. Normal olarak en az konsantre olan seyreltiden (örneğin 10^{-3}) 3 tüpten 3 pozitif sonuç elde edildi ise, bundan 10 kez daha fazla örnek ve dolayısı ile 10 kez daha fazla sayıda mikroorganizma içeren 10^{-2} seyreltiden yapılan 3 tüpün 3'ünde de pozitif sonuç alınması beklenir. Benzer şekilde 10^{-1} seyreltiden 3 tüpe yapılan ekimde de 3 pozitif sonuç alınmalıdır.

Dolayısıyla, 0-0-3 ya da 1-0-3 gibi bir sonuç almır ise böyle bir durumun istatistik olarak çok küçük bir olasılıkla gerçekleşebileceği ve deney sırasında çok büyük bir olasılıkla hata yapılmış olduğu açıktır.

Örneğin, 2-0-2 ve 3-1-2 gibi sonuçların laboratuvar analizleri sırasında hata yapılmadan elde edilme olasılığı %0,1 kadardır. Böyle bir sonuç doğru olarak elde edilse bile aynı örnekten aynı sonucun tekrar elde edilmesi, diğer bir deyiş ile bu sonucun "yeniden elde edilebilirliği (tekrarlanabilirliği)" çok düşük bir olasılıktır. 0-0-2 ve 1-1-3 gibi sonuçların hatasız elde edilme olasılığı ise hemen hemen hiç yoktur. Bu nedenle, bu gibi sonuçları gösteren kodlar standart çizelgelerde verilmemektedir. Bununla birlikte, aynı partiden yapılan 10 ekim sonucunda da 2-2-2 gibi bir sonuç alınır, ancak bu koşulda kategorinin 3 olarak kabul edilebileceği şekilde EMS çizelgeleri de bulunmaktadır. Burada partiden sadece 1 örnek alınması halindeki sonuçların yer aldığı çizelge verilmiştir.

Çizelgedeki kategoriler aşağıdaki şekilde açıklanabilir.

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

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

-Kategori 3: Üründeki mikroorganizma sayısı hesaplanan sayıya eşit olduğunda, bu kombinasyon ile elde edilen sonuç, elde edilebilecek kombinasyonlar içinde kategori 2'den daha az bir olasılıkla elde edilebilir. Ancak, bu kategoride en az olasılıkla (güvenlik sınırı değerleri) elde edilebilecek bir sayım sonucundan daha düşük bir olasılıkla sonuç elde etme olasılığı en fazla %0,1'dir. Bu kategorideki kodlar ise kayda değer ölçüde güvenilmez olduğu için tercihen deney tekrarlanmalı ya da mutlaka üst yetkilinin onayı ile değerlendirilmelidir.

Çizelgede 1; 0,1; 0,01 olarak verilen ekimler sırasıyla 10^0 ; 10^{-1} ; 10^{-2} seyreltilerden 1'er mL ekim yapılması anlamındadır. Katı gıdanın 10^{-1} seyreltisinden 10 mL ekim, 10^0 seyreltiden 1 gram ekim anlamındadır.

Bu şekilde yapılan ekim sonucu, 2-1-0 değeri elde edildi ise gıdada 1,50 adet/g (mL) canlı ve aktif mikroorganizma olduğu, bu sayımın %95 güvenlik sınırlarında 0,40 ile 3,80 arasında olabileceği, güvenlik sınırı olarak %99 seçilirse gıdadaki sayımın 0,20 ile 5,20 arasında olabileceği anlaşılır.

Sıvı bir gıdada sırasıyla 10^{-1} - $0,1$ mL ekim yapıldı ve 2-1-0 sonucu elde edildi ise, yukarıdaki örnekte verilen tüm değerler 10 mL için geçerlidir. Diğer bir 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 (mL) örnekte $1,50 / 0,01 = 150$ adet mikroorganizma bulunmaktadır. Güvenlik sınırları da bu örneklere paralel olarak değişir. İkinci örnekte %95 sınırdaki değerler 40 ve 380 EMS olarak alınır. Buradaki 1,50 değeri, orijinale göre 10^2 kez seyreltilmiş olan 10^{-2} seyreltideki tüpün 1 mL'sindeki sayıdır.

Katı gıdada ise en düşük olarak 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} seyreltilerden 1'er mL ekim yapılabilir. Bununla beraber, gerekirse katı gıda standart 10 g + 90 mL şeklinde homojenize edilir, 10^{-1} seyreltiden 10 mL hacim alındığında, orijinal örnekte 1 gram alınmış gibi olur. Bu uygulamada, 10 mL homojenizat (ya da sıvı örneğin kendisi) eklenecek besiyerinin çift kuvvette hazırlanmış olması gerektiği de asla unutulmamalıdır (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

Farklı literatürde, EMS konusunda yine her seyreltiden 3'er besiyerine ekim yapılması halinde farklı EMS değerlerine rastlanabilir. Yaygın olarak rastlanan bir diğer EMS çizelgesinde 1; 0,1; 0,01 mL ekim yerine 0,1; 0,01; 0,001 mL ekim yapılması koşulundaki sonuçlar verilir. Buna göre örneğin, 3 1 0 kodu karşılığında 4,30 değeri yerine 43,0 değeri verilir.

Yukarıdaki (şekil 13) örneğe göre 3 2 0 kodu elde edilmiştir ve çizelge 06'da bu değer karşısında 9,30 EMS vardır. Ardışık 3 seyreltinin en derişiği 10^{-2} olduğuna göre bu seyreltinin mL'sinde en muhtemel (olası) olarak 9,30 canlı hücre olduğu anlaşılır. Bu ise, orijinal örnekte 930 hücre/mL anlamına gelir. 10^{-3} seyreltideki 3 tüpün 2 adedi değil de 1 adedi pozitif sonuç vermiş olsa idi bu kez 3 1 0 kodu karşılığı olarak 4,30 ve buradan 430 hücre/mL sonuç elde edilecekti.

Bu durumda, yukarıdaki örnekte 800 hücre/mL olan sayı için; çok muhtemel olarak ya 930 ya da 430 sonucu elde edilecektir. Uygulanan yöntemin "En Muhtemel Sayı" olarak adlandırılmasının nedeni de zaten budur.

07.02.02. EMS Yönteminin Uygulanışı

Yöntemin uygulanışı aşağıda özet olarak verilmiştir. Ayrıca şekil 14'te yöntemin uygulanışı şematik olarak gösterilmiştir.

-Günlük gıda kontrolünde 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. Daha fazla seyreltme gerekiyorsa, bunun yerine yayma ya da dökme yöntemi tercih edilmelidir.

-Durham tüpü olan besiyerlerinde ekim öncesi gaz kontrolü yapılmalı, gaz olan tüplere ekim yapılmamalıdır. Durham tüpü olan besiyerleri herhangi bir aşamada tüp karıştırıcı kullanılarak karıştırılmaz.

-Her seyreltiden 3 besiyeri tüpüne ekim yapılır. Tüplerde standart olarak 10 mL sıvı besiyeri bulunurken, amaca uygun olarak 19 mL olarak da hazırlanabilir. Standart ekimde seyreltilerden 1'er mL ekim yapılmakla beraber, özel uygulamalarda ilk seyreltiden 10'ar mL ekim yapılabilir. Bazı uygulamalarda her seyreltiden 5'er tüpe ekim yapılır. Bunların değerlendirme çizelgeleri farklıdır.

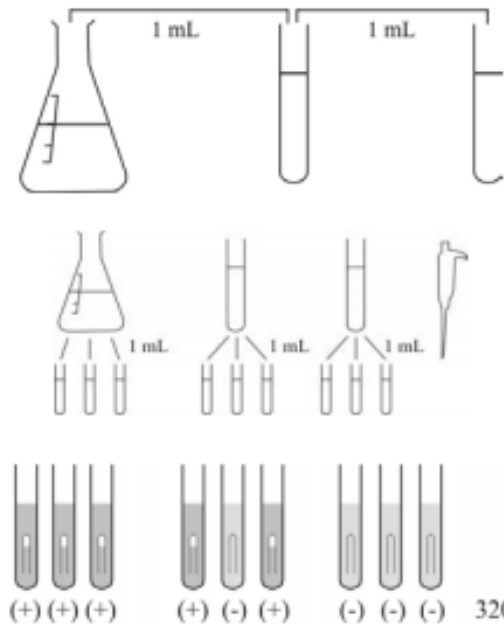
-10:90 mL şeklinde yapılan ilk seyreltme Tamponlanmış Peptonlu Su gibi bir besiyerinde yapılmış ve diğer tüplerde de besiyeri olarak yine Tamponlanmış Peptonlu Su kullanılıyor ise ilk seyreltiden steril 3 boş tüpe 10'ar mL aktarılabilir. Bu koşulda katı örnekten ilk üç tüpe doğrudan 1 gram aktarılmış gibi olur.

-Bazı çalışmalarda canlandırma işlemi uygulanır. Bu amaçla örneğin, toplam Enterobacteriaceae sayımında Tamponlanmış Peptonlu Su besiyerine ekim yapılır, buradan EE Broth besiyerine ekim yapılır ve en son olarak da bu besiyerindeki pozitif tüplerden VRBD Agar besiyerine sürme yapılır.

-Gerekirse tüplerin üzerine sıvı parafin, agar vb. maddeler ilave edilebilir.

-İnkübasyon sonunda tüpler değerlendirilir (bakınız; 07.02.03. Bölüm). Elde edilen kod ile standart EMS çizelgesinden yararlanılarak örnekteki sayı hesaplanır. Sayım sonunda kullanılan tüm malzeme sterilize edilerek yıkanır ya da atılır.

Şekil 14. EMS Yönteminin Uygulanışı



Gıda örneği 1:9 oranında homojenize edilip (10⁻¹), bundan standart yöntemle devam edilerek 10⁻² ve 10⁻³ seyreltiler elde edilir. Seyreltmede süt ürünleri için ¼ Ringer çözeltisi, diğer gıdalarda Maximum Recovery Diluent kullanılır.

Her seyreltiden 3'er adet sıvı besiyerine ayrı ayrı 1'er mL aktarılır. Gıdada beklenen ya da hedef alınan sayıya göre ilk seyreltiden çift kuvvette hazırlanmış besiyerlerine 10'ar mL ekim yapılabilir.

İnkübasyondan sonra bütün tüpler (+) ya da (-) olarak değerlendirilir. Bu, basitçe bulanıklık ve/veya gaz oluşumu ile yapılabileceği gibi, muhtemel pozitif tüplerden sıvı ya da katı besiyerlerine ekim yapılabilir.

Daha güvenli sonuçlar elde etmek isteniyorsa 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} olmak üzere ardışık 4 seyreltiden ekim yapıp, sonuçlara göre EMS çizelgesinde kullanılacak ardışık 3 seyrelti seçilir. Burada izlenmesi gereken kural aşağıda verilmiştir:

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

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

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

07.02.03. Tüplerin Değerlendirme Kuralları

EMS yönteminde her tüpün pozitif ya da negatif olarak değerlendirilmesi esastır. Buna göre tüplerin değerlendirilmesi, kullanılan besiyeri ve analiz yöntemine göre birbirinden çok farklı şekillerde yapılır. Bu amaçla ilgili talimatlar ayrıntılı olarak hazırlanmalı ve bunlara tam olarak uyulmalıdır. Aşağıda değerlendirme kuralları üzerinde bazı örnekler verilmiştir:

-Nutrient Broth'ta toplam bakteri analizinde tüpte bulanıklık pozitif sonuçtur.

-Koliform grubu bakteri analizinde Durham tüplerinde bulanıklık ve gaz oluşması pozitif sonuçtur (bakınız; 03.03.04. Bölüm).

-*E. coli* analizinde MUG'lu besiyerindeki Durham tüplerinde bulanıklık ve gaz oluşması ile uzun dalga boylu UV lambası ile floresan ışımaya pozitif sonuçtur.

-*S. aureus* analizinde siyahlaşma olan tüplerden Baird-Parker Agar besiyerine ekim yapılır, tipik kolonilerin görüldüğü Petri kutularının ekim yapılmış olduğu tüpler pozitif olarak değerlendirilir.

-Ozmozofilik-ozmotolerant maya analizinde agar tabakasının yukarı itilmesi gaz oluşumunun göstergesidir. Bu şekildeki tüpler pozitif olarak değerlendirilir.

Aşağıda tüplerin değerlendirilmesi için bir örnek verilmiştir. Bu örnekten izleneceği gibi ardışık 4 seyreltiden ekim yapılmış, koliform grup için 3 3 2 1 şeklinde muhtemel pozitif sonuç elde edilmiş, sadece pozitif sonuç veren tüplere doğrulama testi yapılmış ve bu kez 3 3 1 1 şeklinde sonuç elde edilmiştir. Doğrulanmış koliform tüplerinde ise *E. coli* varlığı araştırılmıştır.

Şekil 15. Sıvı bir gıdada *E. coli* 'nin IMViC testleri ile belirlenmesi

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

*: Bir önceki basamakta negatif sonuç olduğu için ekime gerek yoktur.

Doğrulanmış koliform sayısı dikkate alındığında 10^0 serisinden başlanırsa 3 3 1 kodu karşılığı sonuç 46 EMS/mL iken, 10^{-1} seyreltiden elde edilecek sonuç 3 1 1 kodu karşılığı 75 EMS/mL'dir. Çizelge 06'ya göre gerek 3 3 1 gerek 3 1 1 kodu "1" kategorisi ile değerlendirilse de ardışık seride seçim kuralına göre 3 3 1 değil, 3 1 1 serisi esas alınır ve sonuç 75 EMS/mL olarak verilir. Benzer durum *E. coli* için de geçerlidir ve 2 1 0 kodu karşılığı olarak sonuç 1,50 EMS/mL olarak verilir.

07.02.04. EMS Yönteminde Sonuçların Verilmesi

Standart EMS çizelgesinden sonuç hesaplandıktan sonra sıvı gıdalarda (örneğin 0,36) EMS/mL, katı gıdalarda (örneğin 23,0) EMS/g olarak verilir. Ekim yapılan seyreltilere göre EMS çizelgesinin kullanılışı yukarıda açıklanmıştır. Ekimi yapılan tüplerdeki pozitif sayılara göre elde edilen kodların karşılığı aşağıdaki örneklerde verilmiştir. Hesaplamalarda standart 1-0,1-0,01 mL EMS çizelgesi kullanılmıştır.

EMS yönteminde standart olarak 1:9 seyrelti kullanılmaktadır. Bununla birlikte, unda rop sporu sayımında olduğu gibi ilk seyreltme 1:19 oranında yapılabilir, ancak diğerleri mutlaka standart 1:9 oranında yapılmalıdır. Bu şekilde yapılan bir seyreltme ve ekimden sonra 3 1 0 kodu elde edilirse bunun çizelgedeki karşılığı 4,30'dur ve 1-0,1-0,01 mL ekim için bu değer verilmiştir. Buna göre 1:19 olarak hazırlanan ilk seyreltide 4,30 EMS/mL sayım sonucu elde edilir, bu değer 20 ile çarpılarak örnekteki sayı 86,0 EMS/g olarak verilir. Diğer bir deyiş ile burada 1:19 olarak yapılan ilk seyreltme sanki orijinal (10^0) örnek gibi düşünülmektedir. Bundan 1:9 standart seyreltmeler yapıldıktan sonra standart yöntemle seyreltilerden (10^0 ; 10^{-1} ve 10^{-2}) 1'er mL ekim yapılmış ve 4,30 EMS/mL sayım sonucu elde edilmiştir. Burada orijinal olarak kabul edilen tüp (bir anlamda un homojenizati), gerçekte orijinal örneğin 20 kez seyreltilmiş şekli olduğu için, 4,30 değeri 20 ile çarpılarak gerçek sonuç bulunmaktadır.

Aşağıda (çizelge 07) EMS yönteminde sonuçların verilmesine ilişkin örnekler verilmiştir.

Çizelge 07. EMS Sonuç Örnekleri

İlk seyrelti ve ekim	Kod	Sonuç
10^0 ; standart	000	<0,3 EMS/mL
10^0 ; standart	200	0,92 EMS/mL
10^0 ; standart	333	>110 EMS/mL
10^0 ; ilk seyreltiden 10'ar mL	200	0,092 EMS/mL
10^{-1} ; standart	000	<3,0 EMS/g
10^{-1} ; standart	200	9,20 EMS/g
10^{-1} ; standart	333	>1100 EMS/g
10^{-1} ; ilk seyreltiden 10'ar mL	200	0,92 EMS/g