

AGAR WELL DİFÜZYON YÖNTEMİNDE STANDARDİZASYON ÇALIŞMASI

Mehmet Ayta¹, Erman Oryaşın¹, Gamze Başbülbül^{1,2}, Bülent Bozdoğan^{1,3}
¹REDPROM Araştırma Merkezi, ²Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, ³Tıp Fakültesi Tıbbi
Mikrobiyoloji AD, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, AYDIN

Öz

Antibiyotik duyarlılık testleri hastalık etkeni mikroorganizmalara karşı kullanılacak antibiyotiklerin belirlenmesinde önemlidir. Antibiyogram testlerinde farklı kuruluşlar tarafından standardizasyon çalışması yapılmasına karşın *agar well* testleri için standardizasyon çalışmasının yapılmadığı görülmüş ve bu çalışmada disk difüzyon testiyle karşılaştırmalı standardizasyon çalışması yapılması amaçlanmıştır. Testler 0,5 McFarland bulanıklıkta bakteri süspansiyonu ile 3 farklı kalınlıkta (4, 6, 8 mm) Mueller Hinton agar besiyeri ve 3 farklı çapta kuyucuk (4, 6, 8 mm) kullanılarak üç tekrarlı olacak şekilde yürütülmüştür. *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* DH10B bakterileri için sırasıyla eritromisin (15 µg) ve kloramfenikol (10 µg) antibiyotikleri kullanılmıştır. Tüm petriler 16-18 saat, 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disklerin ve kuyucukların etraflarında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür. Antibiyotik duyarlılık testinde kullanılan *agar well* yöntemi için yaptığımız standardizasyon çalışmasında en uygun Mueller Hinton Agar besiyeri kalınlığı ve kuyucuk çapı saptanmıştır. Agar kalınlığı ne olursa olsun, disk difüzyon zon çapıyla *agar well* kuyucuk zon çapının 8 mm kuyucukla eşleştiği görülmüştür. Agar kalınlığı arttıkça inhibisyon zonu artmaktadır. Disk difüzyon testinde standart 4 mm kalınlığındaki besiyeri olduğu için bu kalınlıktaki besiyerinde disk difüzyon sonucuna uyan inhibisyon zonu oluşturan kuyucuk çapı 8 mm olarak saptanmıştır. Standart ölçüm için 4 mm agar kalınlığı ve 8 mm kuyucuk çapı olmalıdır.

Çalışmamız *agar well* difüzyon konusundaki ilk standardizasyon çalışmasıdır. Diğer laboratuvarların benzer standardizasyon çalışmaları yapmaları halinde *agar well* difüzyon yöntemini tüm dünyada geçerli olabilecek bir standarda kavuşturabiliriz.

Anahtar Kelimeler: *Agar well*, Standardizasyon, Besiyeri kalınlığı, Kuyucuk çapı

STANDARDIZATION STUDY FOR AGAR WELL DIFFUSION METHOD

Extended Abstract

Antibiotic sensitivity tests are important to determine antibiotics that can be used against disease-causing microorganisms. Although different standardization studies for disk diffusion and MIC tests were established by several organizations, no standardization study was done for *agar well* diffusion method. Standardization for disk diffusion method, antibiogram, was done first by World Health Organization (WHO). Today many organizations including, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) in Europe, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) in USA, and Standardization of Antibiotic Sensitivity Tests (ADTS) group of Turkish Microbiology Society (TMC) in Turkey developed their own standardization methods. TMC advises the use of EUCAST protocols for studies in Turkey.

The aim of the present study was standardization of *agar well* diffusion method. Disk diffusion method from EUCAST was used as a reference method to compare results of *agar well* diffusion test. For both disk diffusion method as well as *agar well* diffusion test 0.5 McFarland bacterial suspension and Mueller Hinton Agar (MHA) media were used. For *agar well* diffusion test 3 different thicknesses, 4 mm, 6 mm and 8 mm, of MH agar was used. Also three different well diameter, 4 mm, 6 mm and 8 mm were tested. All tests were performed as three repetitions. Two antibiotics were used for disk diffusion tests and *agar well* diffusion tests. The concentration of erythromycin and chloramphenicol were 15 µg and 10 µg, respectively. A Gram positive and a Gram negative strain were used for susceptibility tests, *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli*

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author):

Mehmet AYTAR; Redprom Araştırma Merkezi, Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi Aydın-Türkiye.
E-mail: maytar90@gmail.com

Geliş (Received) : 27.08.2019
Kabul (Accepted) : 12.12.2019
Basım (Published) : 31.12.2019

DH10B strains, respectively. All of plates were incubated at 37°C for 16-18 hours. At the end of incubation, the inhibition zones around wells were measured.

The inhibition zones of *S. aureus* ATCC 25923 with erythromycin disk were 29, 30 and 31 mm on 4, 6 and 8 mm agar, respectively. *Agar well* diffusion with 4, 6 and 8 mm MHA media, erythromycin inhibition zones were 21, 25 and 29 mm, 22, 26 and 30 mm, and 23, 27 and 31 mm, respectively. The inhibition zones of *E. coli* DH10B with chloramphenicol disk were 25, 26 and 27 mm on 4, 6 and 8 mm agar, respectively. *Agar well* diffusion with 4, 6 and 8 mm MHA media, chloramphenicol inhibition zones were 5, 6 and 7 mm, 15, 16 and 17 mm, and 25, 26 and 27 mm, respectively. It was observed that the disk diffusion inhibition zones were in accordance with the results of 8 mm *agar well* zone, in every MH agar thicknesses. As the standard for disk diffusion test the MHA thickness is 4 mm, the *agar well* diameter for this thickness is 8 mm. So for standardization of *agar well* diffusion tests, the MHA thickness should be 4 mm and the diameter should be 8 mm.

A standardization method for *agar well* diffusion test is necessary to compare results obtained elsewhere. Our study is the first study for standardization of *agar well* diffusion test. Standardization assays should be done by other laboratories to determine a worldwide usable and comparable *agar well* diffusion method.

Keywords: Agarwell, Standardization, Media thickness, Well diameter

1. Giriş

Mikroorganizmaların antimikrobiallere hassasiyetlerini belirlemek için farklı antibiyotik duyarlılık testleri yapılmaktadır. Bu testler arasında antibiyotik emdirilmiş kağıtlar kullanılarak yapılan antibiyogram, antibiyotik içeren sıvı besiyeri kullanan mikro veya makrodilüsyon testleri yanında farklı agar besiyeri kullanan agardilüsyon yöntemi sayılabilir (Courvalin, 2006). Antibakteriyel aktivite tayininde kullanılan *in vitro* testler ilk antibiyotiğin kullanımı kadar eskidir (Sümerkan, 1996). Antibiyogram yöntemi olan Kirby-Bauer testi 70 yıllık bir geçmişi olmasına rağmen hala kullanılmaktadır. Antibiyogram yönteminin standardizasyonu ise ilk kez Dünya Sağlık Örgütü tarafından Bauer ve arkadaşlarının çalışmasının sonucuna göre yapılmıştır (Bauer vd., 1966; WHO, Second Edition). Standardizasyon çalışmaları farklı laboratuvarlarda veya ülkelerde yapılan test sonuçlarının karşılaştırılabilir olmasını sağlamaktadır. Bu amaçla dünya çapında klavuz olarak kullanılan en önemli standardizasyon yayınları Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından yıllık olarak yayımlanmaktadır. Bunlardan National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), yeni adıyla CLSI'nin kriterleri uzun yıllar boyunca ülkemizde antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yorumlanmasında kullanılmıştır. Ancak 2015 yılından itibaren Avrupa Birliği'ne üye birçok ülkede kullanılmaya başlanan EUCAST kriterleri ülkemizdeki tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında TMC-Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Çalışma Grubunun (ADTS) çalışmaları sayesinde kullanıma geçmiştir. (Milletli-Sezgin vd. 2019; Gür, 2016). Her iki standardizasyon kuruluşunda da *agar well* difüzyon yöntemi ile alakalı herhangi bir standardizasyon yapılmamıştır. Bu çalışmada *agar well* difüzyon yönteminin standardize edilmesine yönelik çalışmalar yapılmış ve agar disk difüzyon yöntemi referans olarak kullanılmıştır.

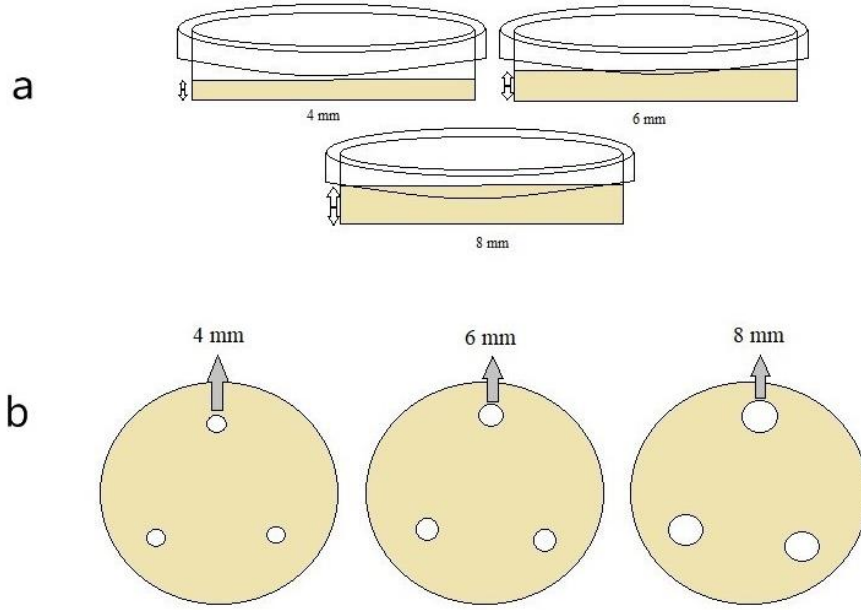
2. Materyal ve Metot

2.1 Kullanılan Suşlar

Antimikrobiyal aktivite standardizasyonu için çalışmamızda iki suş kullanılmıştır. Bunlar, *Escherichia coli* DH10B ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşlarıdır.

2.2 Agar Besiyeri Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılacak bakterileri stoktan canlandırma yapmak için Tryptic Soy Agar (TSA) besiyeri kullanılmıştır. *Agar well* difüzyon yöntemi ve disk difüzyon yöntemi için Mueller Hinton agar (MHA) kullanılmıştır. Petrilere besiyeri dökmek için sterilize edilmiş dipenser kullanılmıştır. İstenilen agar kalınlığını elde etmek için kalınlık değişkenine bağlı olarak $\pi r^2 h$ silindir hacim formülü kullanılmıştır. EUCAST tarafından, disk difüzyon testi için kabul edilen standart besiyeri kalınlığı 4 mm'dir (EUCAST, 2019). Disk difüzyon yöntemi için 4 mm kalınlığında MH agar kullanılmış, ancak agar kalınlığına göre inhibisyon zon çapı değişimini gözlemek için 6 ve 8 mm kalınlığında MH besiyerinde de disk difüzyon deneyi yapılmıştır. *Agar well* difüzyon deneyi için 3 farklı kalınlıkta besiyeri (4, 6, 8 mm) ve 3 farklı çapta kuyucuk (4, 6, 8mm) (Şekil 1) kullanılarak üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.



Şekil 1. a) Besiyeri kalınlıkları b) Kuyucuk çapı büyüklükleri

2.3 Agar well Difüzyon Yöntemi İçin Kuyucukların Hazırlanması ve İnokülasyon

Agarda istenilen çapta delik oluşturmak için agar delici (corkborer) kullanılmış ve her kullanışta alkol içine batırılıp çıkarıldıktan sonra ateşe yakılarak sterilize edilmiştir. Sterilize edilmiş agar delici ile istenilen boyutlardaki kuyular açılmıştır. Bakteri solüsyonu hazırlamak için süspansiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla gecelik kültürden 0.5 McFarland bakteri solüsyonu hazırlanmış ve eküvyon ile agar petrilere yayma ekim yapılmıştır (Gür, 2016; EUCAST, 2019).

2.4 Antibiyotiklerin Hazırlanması

S. aureus ATCC 25923 ve *E. coli* DH10B bakterilerine karşı sırasıyla eritromisin 15 µg ve kloramfenikol 10 µg antibiyotikleri uygulanmıştır. Disk difüzyon yöntemi için antibiyotik emdirilmiş ticari diskler kullanılmıştır. Bununla eş zamanlı olarak yapılan agar well difüzyon yöntemi için de kuyucuğun hacmine uygun miktarda distile suda uygun konsantrasyonda hazırlanmış antibiyotikler kullanılmıştır. Toplam volüm kuyucuklar için farklı olsa da ($\pi r^2 h$) toplam antibiyotik konsantrasyonu eşit tutulmuş, eritromisin için 15 µg, kloramfenikol için 10 µg antibiyotik kullanılmıştır. Kuyulara konulan antibiyotik solüsyonlarını besiyerlerinin emmesi için 30 dk beklenmiştir. Hazırlanan plaklar 16-18 saat boyunca 37°C'ye ayarlı etüvde inkübe edilmiştir (Balouiri vd., 2016; EUCAST, 2019).

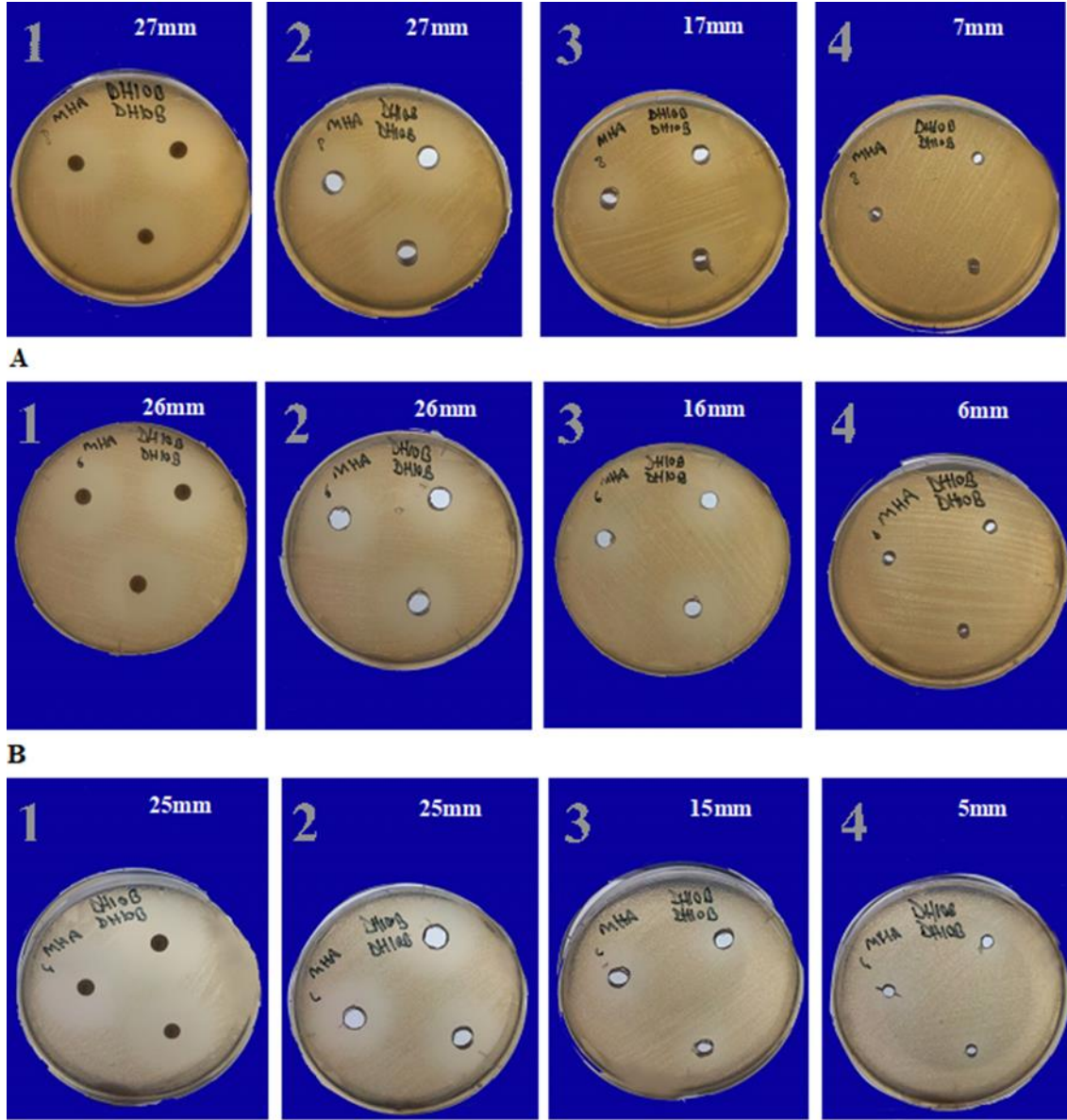
3. Bulgular ve Tartışma

Agar well difüzyon yöntemi için genel kullanılabilir standartlar oluşturulmamıştır. Bu araştırmada 3 farklı kalınlıktaki MH besiyerinde (4, 6 ve 8 mm) ve 3 farklı çapta kuyucukların (4, 6 ve 8 mm) kullanıldığı standardizasyon çalışması yapılmıştır.

Çalışmada agar well difüzyon testi sonuçlarını karşılaştırabilmek için EUCAST direktifleri doğrultusunda disk difüzyon testi yapılmıştır. Bu sonuçlar referans alınarak agar well difüzyon testi sonucu oluşan inhibisyon zonları, disk difüzyon zonları ile karşılaştırılmıştır. (Tablo 1, Şekil 2 ve 3)

S. aureus ATCC 25923 için 15µg eritromisin ile 4mm yükseklikteki MH besiyerinde, diskin oluşturduğu zon çapı 29 mm, 4 mm'lik kuyucukta oluşan zon çapı 21 mm, 6 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 25 mm, 8 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 29 mm bulunmuştur.

Aynı suş için 6 mm yükseklikteki MH besiyerinde, diskin oluşturduğu zon çapı 30 mm, 4 mm'lik kuyucukta oluşan zon çapı 22 mm, 6 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 26 mm, 8 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 30 mm bulunmuştur.



C

Şekil 2. *E. coli* DH10B ile disk difüzyon ve agar well yöntemleri kullanılarak 10µg kloramfenikolle farklı kalınlıktaki besiyerlerinde disk ve farklı çaplardaki kuyucuklarla oluşan inhibisyon zonları görülmektedir. 8mm (A), 6 mm (B) ve 4 mm (C) kalınlığında besiyerindeki disk (1. resim), 8 mm (2. resim), 6 mm (3. resim), 4mm (4. resim) çapında kuyularla oluşan zon çapları görülmektedir.

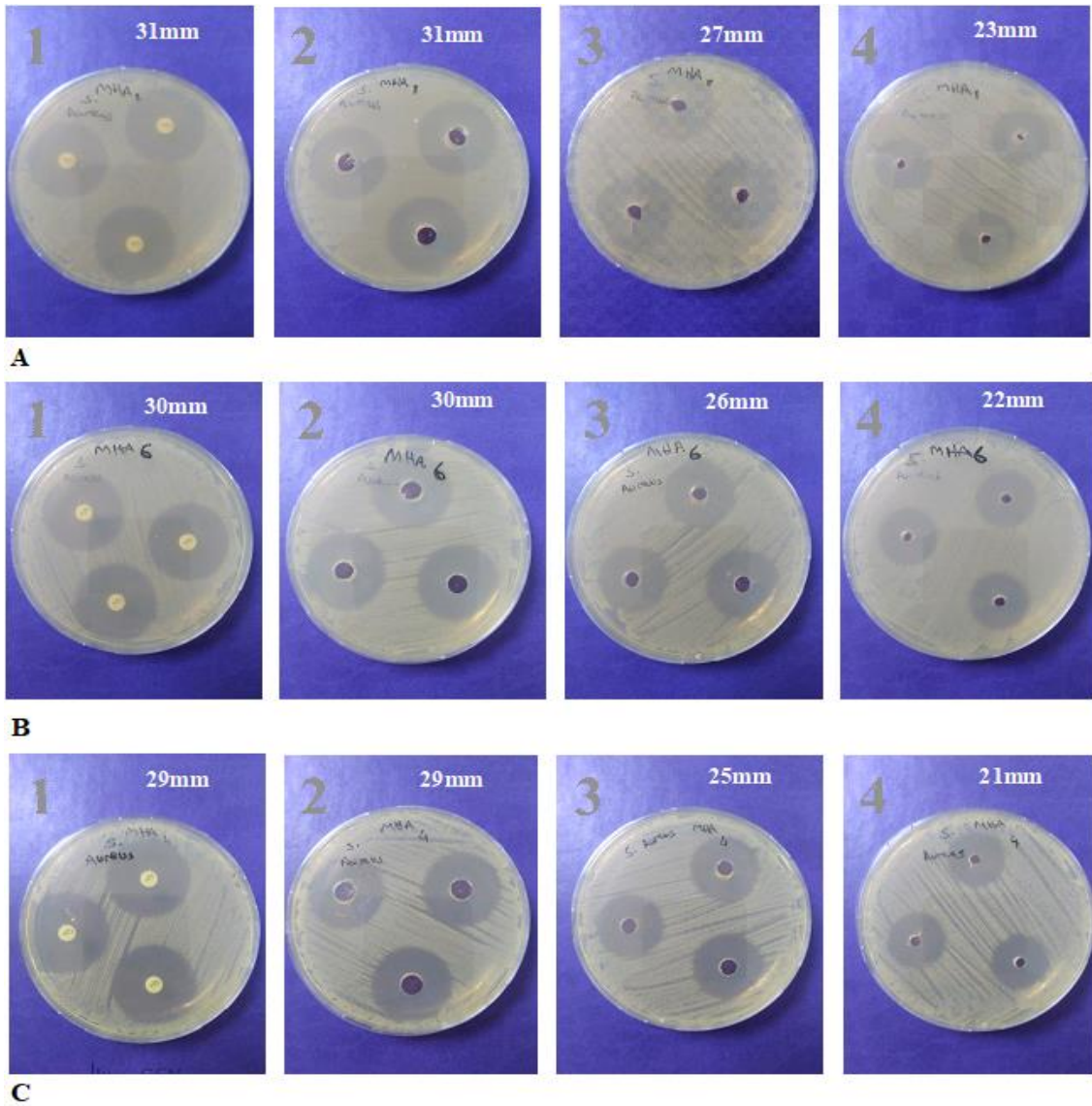
Besi yeri kalınlığı 8 mm olduğunda, diskin oluşturduğu zon çapı 31 mm, 4 mm'lik kuyucukta oluşan zon çapı 23 mm, 6 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 27 mm, 8 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 31mm bulunmuştur. Kuyucuk çapı küçüldükçe inhibisyon zon çapının küçüldüğü gözlenmiştir.

E. coli DH10B için kloramfenikol 10 µg ile 4mm'lik standart besiyerinde, disk'in oluşturduğu zon çapı 25 mm, 4 mm'lik kuyucukta oluşan zon çapı 5 mm, 6 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 15 mm, 8 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 25 mm bulunmuştur.

Besiyeri kalınlığı 6mm olduğunda, disk'in oluşturduğu zon çapı 26 mm, 4 mm'lik kuyucukta oluşan zon çapı 6 mm, 6 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 16 mm, 8 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 26 mm bulunmuştur.

8mm'lik kalınlığa sahip besiyerinde, disk'in oluşturduğu zon çapı 27 mm, 4 mm'lik kuyucukta oluşan zon çapı 7 mm, 6 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 17 mm, 8 mm'lik kuyucuğun oluşturduğu zon çapı 27 mm bulunmuştur.

Çalışmamızda *E. coli* DH10B ve *S. aureus* ATCC 25923 için belirlenen standart disk difüzyon inhibisyon zon çapı ile *agar well* difüzyon inhibisyon zon çapının, agar kalınlığı ne olursa olsun 8 mm kuyucukla eşleştiği görülmüştür (Tablo 1). Şekil 2 ve 3'de de görüleceği gibi agar kalınlığı arttıkça inhibisyon zonu artmaktadır. Disk difüzyon testinde standart 4 mm kalınlığındaki besiyeri olduğu için bu kalınlıktaki besiyerinde disk difüzyon sonucuna uyan inhibisyon zonu oluşturan kuyucuk çapı 8 mm olarak saptanmıştır.



Şekil 3. *S. aureus* ATCC 25923 ile disk difüzyon ve *agar well* yöntemleri kullanılarak 15 µg eritromisinle farklı kalınlıktaki besiyerlerinde disk ve farklı çaplardaki kuyucuklarla oluşan inhibisyon zonları görülmektedir. 8mm (A), 6 mm (B) ve 4 mm (C) kalınlığında besiyerindeki disk (1. resim), 8 mm (2. resim), 6 mm (3. resim), 4mm (4. resim) çapında kuyularla oluşan zon çapları görülmektedir.

Tablo 1. Besiyeri kalınlığına ve kuyucuk çapı büyüklüğüne göre oluşan inhibisyon zon çapları

Bakteri Adı	Kuyucuk Çapları	İnhibisyon Zon Çapları		
<i>E. Coli</i> DH10B Koramenikol 10µg	Disk	25	26	27
	4mm	5	6	7
	6mm	15	16	17
	8mm	25	26	27
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 Eritromisin 1µg	Disk	29	30	31
	4mm	21	22	23
	6mm	25	26	27
	8mm	29	30	31
		4mm	6mm	8mm
Besiyeri kalınlığı				

Agar well difüzyon yöntemiyle yapılan çok çalışma olmasına rağmen herhangi bir standardizasyon yapılmamıştır.

Literatür taraması yaptığımızda *agar well* difüzyonu için farklı çalışmalarda farklı yöntemler kullanıldığı görülmüştür. Devillers ve arkadaşları bakteri ve funguslarda kimyasal toksisite değerlendirmesi için *agar well* difüzyon yöntemi kullanmışlardır. Dispenser ile 25ml steril besiyeri 90 mm çaplı petrilere dökülmüştür. Test suşlarının süspansiyonları agar üzerine ekilmiştir. Ardından 6 mm'lik kuyulara p-benzoquinone farklı konsantrasyonlarda 200 µl dökülmüş ve 24°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Deney üç tekrarlı yapılmıştır (Devillers vd., 1989). Başka bir çalışmada, doğal bir raf ömrü uzatıcı bakteriyosin olan nisin'in antimikrobiyal aktivitesine *agar well* difüzyon yöntemiyle bakılmıştır. 20'şer ml bakteri spesifik farklı besiyerleri petrilere dökülmüştür. Katılaştıktan sonra 6.8 mm çapında açılan kuyulara 50'şer µl nisin standartı konmuştur. Petriler önce +3°C'de 24 saat ön inkübasyon yapılarak veya yapılmadan 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Rogers ve Montville, 1991). İnsan hücre kültürü için toksik olmayan konsantrasyonlardaki çeşitli antimikrobiyallerin bakteri duyarlılığının *agar well* difüzyon yöntemi ile değerlendirilmesi yapılmıştır. Teknik uygulanırken 6 mm kuyular açılmış ve bunlar 100µl antimikrobiyal solüsyonlar ile doldurulmuştur. 35°C'de gecelik inkübe edilmiştir. 0.5 McFarland bakteri solüsyonları 150 mm Mueller Hinton Agar petrilere ekilmiştir (Holder ve Boyce, 1994). Yanık yara enfeksiyonlarının topik ajanlara karşı duyarlılıklarını ölçmek için *agar well* difüzyon tekniği kullanılmıştır. Standart 150 mm MHA içeren petrilere 6mm kuyular açılmış ve topik antimikrobiyal ajanla doldurulmuştur. Bakteri süspansiyonları 0.5 McFarland olarak hazırlanmıştır. 37°C'de 22-24 saat inkübe edilmiştir (Vu vd., 2002). Antifungal duyarlılık testi için *agar well* difüzyon metodu kullanılmıştır. Bu metotta 90 mm petrilere 20 ml besiyeri dökülmüştür. 0.5 McFarland bakteri solüsyonları kullanılmıştır. Kuyular 4 mm'lik çaplarda açılmış her kuyu 20'şer µl antifungal ajanla doldurulmuştur. Petriler 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Magaldi vd., 2004). Bitkilerden salgılanan reçinemsi bir madde olan *Bulgarian propolis*'in %30'luk etanolik ekstraktı, *agar well* difüzyon yöntemi ile 94 *Helicobacter pylori* suşuna karşı uygulanmıştır. Mueller-Hinton agar (%5 koyun kanlı) kullanılmıştır. Burada kullanılan *agar well* difüzyon yönteminde 7 mm çapında kuyular farklı konsantrasyonlarda 30, 60, 90 µl (sırasıyla her kuyuya 9, 18, 27 mg gelecek şekilde) propolis ekstraktı ile doldurulmuş ve 35°C'de 72 saat inkübasyon sonrası zon çapları ölçülmüştür (Boyanova vd., 2005). Bazı endodontik ilaçların antimikrobiyal aktivitelerine *agar well* difüzyon yöntemi ile bakılmıştır. Yöntemde, 90 mm çapında petriler, 4 mm derinliğinde Mueller Hinton Agara 6 mm çapında kuyu açılmıştır. Kullanılan mikroorganizmaya göre 0.5 veya 1.0 McFarland standart kullanılmıştır. Her kuyuya 50µl test ilacı konmuştur. 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir (Athanasiadis vd., 2009). *Listeria monocytogenes*'in hemolitik aktivitesini değerlendirmek için *agar well* difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Yöntemde, MHBA ve MHBAAC+Ca⁺² besiyerlerine 6mm çapında kuyular açılmış ve her süspansiyondan 20µl konmuştur. 37°C'de inkübe edilmiştir. 6-24-48 saat aryla ölçümler yapılmıştır. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır (Ruiz vd., 2009). İğnesiz arılardan elde edilen balların antimikrobiyal aktivitesine bakılmıştır. 20 ml Mueller-Hinton agar içeren petrilere 8 mm çapında kuyu açılmıştır. Kuyu 100µl %50'lik bal solüsyonu ile doldurulmuştur. %25'lik bal solüsyonu ile inhibisyon zonu görülmemiştir. 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Boorn vd., 2010). Farklı konsantrasyonlardaki bitki yaprak ekstraktı solventlerinin Gram

negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri *agar well* difüzyon yöntemiyle ölçülmüştür. 20ml Mueller Hinton Agar petrilere dökülmüştür. Kuyular açıldıktan sonra 100 µl ham yaprak ekstraktı ile doldurulmuştur. Petriler 37°C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir (Aadesariya vd., 2017). Gümüş nanopartiküllerinin ve %2'lik klorhekzidinyolukonatın yalnız ve birlikte kullanıldığındaki antimikrobiyal etkisinin değerlendirilmesi *agar well* difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu yöntemde 6 mm çapında kuyular 20 µl solüsyon ile doldurulmuştur. 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Charannya vd., 2018).

Yukarıdaki çalışmalarda da görüldüğü gibi *agar well* yöntemi ile ilgili herhangi bir standardizasyon bulunmamaktadır. Farklı yerlerde birbirinden bağımsız olarak yapılan çalışmaların referans alabileceği, sonuçlarının güvenilebileceği bir standartlaşmaya ihtiyaç vardır. Besiyeri kalınlığı ne olursa olsun disk difüzyon yöntemi ile *agar well* difüzyon yöntemi arasındaki uyumun yalnızca kuyucuk çapının 8 mm olması durumunda uyumlu olduğu gözlenmiştir.

4. Sonuç

Antibiyotik duyarlılık testinde kullanılan *agar well* yöntemi için yaptığımız standardizasyon çalışmasında en uygun Mueller Hinton besiyeri kalınlığı ve kuyucuk çapı saptanmıştır. Buna göre agar kalınlığı ne olursa olsun 8 mm kuyucukla eşleştiği görülmüştür ve agar kalınlığı arttıkça inhibisyon zonu artmaktadır. Disk difüzyon testinde standart 4 mm kalınlığındaki besiyeri olduğu için bu kalınlıktaki besiyerinde disk difüzyon sonucuna uyan inhibisyon zonu oluşturan kuyucuk çapı 8 mm olarak saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Athanassiadis B., Abbott P. V., George N., & Walsh L. J., (2009). An in vitro study of the antimicrobial activity of some endodontic medicaments and their bases using an *agar well* diffusion assay. *Australian dental journal*, 54(2), 141-146.
2. Aadesariya M. K., Gauni B. M., Duggirala S. M., Ram V. R., & Vyas S. J. (2017). Antibacterial activity of different solvent leaves extracts of *abutilon pannosum* and *grewia tenax* against different type of gram positive and gram negative bacteria by *agar well* diffusion method. *World Journal of Pharmaceutical Research*, Volume 6, Issue 16, 1259-1274.
3. Boorn K. L., Khor Y. Y., Sweetman E., Tan F., Heard T. A., & Hammer K. A. (2010). Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbon aria* determined by agar diffusion, agardilution, broth microdilution and time-kill methodology. *Journal of applied microbiology*, 108(5), 1534-1543.
4. Boyanova L., Gergova G., Nikolov R., Derejian S., Lazarova E., Katsarov N., & Krastev Z., (2005). Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agardiluti on and disc diffusion methods. *Journal of medical microbiology*, 54(5), 481-483.
5. Balouiri M., Sadiki M., & Ibsouda S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
6. Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., & Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4-ts), 493-496.
7. Courvalin P. (2006) Antibiyogram. Antibiyogramme 2. Baskı.
8. Charannya S., Duraivel D., Padminee K., Poorni S., Nishanthine C., & Srinivasan M. R. (2018). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of silver nanoparticles and 2% chlorhexidine gluconate when used alone and in combination assessed using agar diffusion method: An In vitro study. *Contemporary clinical dentistry*, 9(Suppl 2), S204.
9. Devillers J., Steiman R. & Seigle-Murandi F. (1989). The usefulness of the agar-well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi. *Chemosphere*, 19(10-11), 1693-1700.
10. EUCAST (2019) Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 7.0 (January 2019)
11. Gür D. (2016), Antibiyotik Duyarlılık Testleri, EUCAST: Uygulama, Yorum ve Uzman Kurallar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, Cilt/Volume 46.
12. Holder I. A. & Boyce S. T. (1994). *Agar well* diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns*, 20(5), 426-429.
13. Milletli-Sezgin F., Sevim E., & Sevim A. (2019). Enterokok Suşlarında Antibiyotik Duyarlılığı: CLSI ve EUCAST Disk Difüzyon Klinik Sınır Değer Yorumlarının Karşılaştırılması. *Klinik Dergisi*, 32(1), 35-9.

14. **Magaldi S., Mata-Essayag S., De Capriles C. H., Perez C., Colella M. T., Olaizola C. & Ontiveros Y. (2004).** Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International journal of infectious diseases*, 8(1), 39-45.
15. **Rogers A. M. & Montville T. J. (1991).** Improved agar diffusion assay for nisin quantification. *Food Biotechnology*, 5(2), 161-168.
16. **Ruiz M. V., Silva P. G. & Laciari A. L. (2009).** Comparison of microplate, agar drop and well diffusion plate methods for evaluating hemolytic activity of *Listeria monocytogenes*. *African Journal of Microbiology Research*, 3(6), 319-324.
17. **Sümerkan B. (1996).** Antibiyotik Duyarlılık Testleri ve Standardizasyon. *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(1), 24-30.
18. **World Health Organization. Expert Committee on Antibiotics & World Health Organization. (1961).** Standardization of methods for conducting microbic sensitivity tests: second report of the Expert Committee on Antibiotics [meeting held in Geneva from 11 to 16 July 1960]. World Health Organization.
19. **Vu H., McCoy L. F., Carino E., Washington J., Dang T., Villareal C., Rosenblatt J., Maness C., Goodheart R. & Heggors J. P. (2002).** Burn wound infection susceptibilities to topical agents: The Nathan's agar well diffusion technique. *P AND T*, 27(8), 390-397.