

Damlatma ve Yayma Kültürel Sayım Yöntemlerinin Kıyaslanması Üzerinde Bir Araştırma

Doç. Dr. A. Kadir HALKMAN —

A.Ü. Ziraat Fakültesi; T. Mikr. Brm. — ANKARA

Dr. Zübeyde ÖNER —

A.O.Ç. Süt Fabrikası — ANKARA

ÖZET :

Bu çalışmada 6 adet saf laktik asit bakterisinde yayma, damlatma ve en muhtemel sayı yöntemleri ile, 7 adet kaşar peyniri örneğinde yayma ve damlatma yöntemleri ile toplam streptokok, toplam laktobasil, toplam mesofil aerob, maya-küf ve basil sayılmıştır. Saf laktik asit bakterilerinin sayımında EMS yöntemi katı besiyerinde yapılan sayımlara göre çok farklı değerler vermiştir. Laktik asit bakterilerinin sayımında ve kaşar peynirlerinde yapılan mikroorganizma sayımlarında damlatma ve yayma yöntemleri arasında yüksek benzerlik bulunmuştur. Maliyet unsuru dikkate alınarak rutin testlerde damlatma yönteminin yayma yöntemi yerini alması önerilebilir. Bununla beraber damlatma yöntemindeki sakıncaların gözönüne alınması gerekir.

SUMMARY :

A Research on Comparing of Dropping and Spreading Cultural Counting Techniques

Microbial counts was determined by dropping, spreading and most probable number (MPN) for 6 commercial lactic acid bacteria. MPN was not suitable counting technique. Total streptococci, total lactobacil, total mesophile aerobic bacteria, yeast-fungi and bacilli was counted by dropping and spreading technique at 7 different kashar cheeses. There were high correlation coefficients between dropping and spreading techniques among different counting media. Dropping technique is advisable when counting expenditures compared. Some disadvantages of dropping technique must not be neglected.

1. GİRİŞ

Gıdalardaki rutin mikrobiyolojik kontrollerin dışında mikrobiyel endüstride de kullanılan mikroorganizmaların ve/veya ortamda bulunan diğer mikroorganizmaların sayılarının

bilinmesi gereklidir. Kullanılması gerekenden az ya da çok miktarda veya 1'den fazla mikroorganizmanın kullanıldığı kültürlerde de hatalı oranlarda mikroorganizma kullanılması pek çok ekonomik kayba neden olabilmektedir.

Bir diğer deyiş ile mikroorganizmaların bulunduğu, onların dahil olduğu çalışma ve araştırmalarda materyalin başlangıçta ve/veya sonuçta bulundurduğu mikroorganizmaların sayısı bilinmelidir. Bu amaçla pek çok sayım tekniği geliştirilmiştir.

Sayım yöntemleri ve teknikleri üzerinde; analizi yapılacak materyal, sayımı yapılacak mikroorganizma cinsi ve türü, mikroorganizmanın materyalde bulunması beklenen sayısı, sayım için gerekli süre, sayım maliyeti, sonuçların güvenilirlik oranı gibi çok sayıda faktör etkilidir. Dolayısıyla sayım yöntemi seçiminde bu gibi faktörler dikkate alınmalıdır (1, 2).

Ağustos 1989 fiyatları ile 1 Petri kutusuna dökülen katı besiyeri içindeki sadece agar maliyetinin 100 TL kadar olması, kuşkusuz araştırmalarda ve/veya rutin mikrobiyolojik kontrollerde maliyet unsuru, yukarıda değinilen sayım yöntemi seçimine etken faktörler arasında öne geçirmektedir.

Kültürel sayımda dökme, yayma, damlatma, dönen tüp yöntemi, lam üzerinde sayım gibi katı besiyeri kullanılan yöntemler ve En Muhtemel Sayı (EMS) gibi sıvı besiyeri kullanılan yöntemler ilk akla gelenlerdir. Bu yöntemlerin kendilerine göre avantajlı ve dezavantajlı yönleri çeşitli yayınlarda açıklanmıştır (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Bu çalışmada önce 6 ticari saf laktik asit bakterisinin farklı besiyerlerinde damlatma ve yayma kültürel sayım yöntemleri, EMS yöntemiyle sayımı kıyaslanmış, sonra 7 farklı kaşar peyniri örneğinde 5 farklı grup mikroorganizmanın damlatma ve yayma kültürel sayım yöntemleri ile sayımları kıyaslanmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal . Chr. Hansen firması ürünü *Streptococcus thermophilus*, *S. faecalis*, *S. cremoris*, *S. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, ile Whisby firması ürünü *L. bulgaricus* saf ticari laktik asit bakterileri olarak, ayrıca TÜBİTAK - TOAG - TARMİK - 12 nolu proje çerçevesinde üretilen kaşar peynirleri bu çalışmada materyal olarak kullanılmıştır. Ticari laktik asit bakterilerinin sayım sonuçları katı besiyerinde 48 saat inkübasyon sonunda oluşan kolonilerin sayılması, EMS yönteminde ise sıvı besiyerinde 18, 24, 30, 48 saat inkübasyon sonunda (+) sonuç veren tiplerin sayılması ve EMS tabiolarından sayım sonucunun alınması ile yapılmıştır. Kaşar peynirlerinde yapılan mikroorganizma sayım sonuçları ise bakterilerde 48 saat, maya-küf de 5 gün sonunda kolonilerin sayılması ile alınmıştır.

2.2. Yöntem

Ticari laktik asit bakterileri % 10 (W/V) skimmilk ortamında aktifleştirilmişler, fizyolojik tuzlu su ile dilüsyonları yapıldıktan sonra çeşitli katı besiyerlerine damlatma ve yayma yöntemleri ile sayım için aktarılmışlar, bu arada EMS sayım yöntemi için % 10 (W/V) skimmilk ortamlarına aşılanmışlardır. Dilüsyonlardan; yayma yöntemi için 0,1 ml, damlatma yöntemi için 0,01 ml, EMS yöntemi için 1 ml pipetlenmiştir. Damlatma yöntemi için Petri kutusu 6 eşit parçaya bölünmüş, her parçaya 0,01 ml damlatılmıştır. EMS yönteminde her dilüsyon için 5 tüp kullanılmıştır.

6 ticari laktik asit bakterisinin damlatma ve yayma kültürel sayımında kullanılan katı besiyerleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. 6 Ticari laktik asit bakterisinin sayımında kullanılan besiyerleri

Bakteriler	Kullanılan Besiyerleri
<i>S. thermophilus</i>	APT Agar (7), LAPT Agar (8), M 17 Agar (9)
<i>S. faecalis</i>	APT Agar LAPT Agar M 17 Agar
<i>S. lactis</i>	APT Agar LAPT Agar M 17 Agar HC Agar (10)
<i>S. cremoris</i>	APT Agar LAPT Agar M 17 Agar
<i>L. bulgaricus</i>	APT Agar MRS Agar (11) LAPT Agar
<i>L. helveticus</i>	APT Agar MRS Agar LAPT Agar

Kaşar peynirlerinde yapılan sayımlar için peynirlerden aseptik koşullar altında 10'ar gr tartılmış % 2 sodyum sitratlı su ile havanda ezilerek ilk dilüsyonları yapılmış, diğer dilüs-

yonlar fizyolojik tuzlu su ile yapılmıştır. 5 grup mikroorganizma sayımı için kullanılan besiyerleri Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Kaşar peynirlerinde sayımı yapılan mikroorganizmalar ve kullanılan besiyerleri

Bakteri Grubu	Kullanılan Besiyeri
Toplam mezofil aerob bakteri	Plate Count Agar (POA) (12)
Basil	Glukoz Agar (GA) (13)
Maya - Küf	Potato Dekstrose Agar (PDA) (12)
Toplam Laktobasil	DeMann Rogosa Sharp Agar (MRSA) (11)
Toplam laktik streptokok	Slanetz Bartley Agar (SBA) (13)

Bütün çalışmalar 2 tekerrür, 2 paralel olarak yürütülmüştür.

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

3.1. Ticari Laktik Asit Bakterilerinin Sayımı

6 Ticari laktik asit bakterisinin çeşitli besiyerlerindeki sayım sonuçları Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3'de izleneceği gibi streptokokların katı besiyerlerinde gerek sayım yöntemi gerek kullanılan besiyerleri arasında kayda değer farklılıklar görülmemektedir. Sonuçlar arasında görülen arasında görülen farklılıklar muhtemelen deneme hatasından kaynaklanmaktadır. Tekerrürler ve paraleller arasında sayım sonuçlarının dağılımı bunu göstermiştir. Bu aşamada istatistik analiz yapmaya gerek duyulmamıştır. Laktobasiller de ise besiyerinin etkisi açık bir şekilde görülmektedir. Laktoba-

sil sayımı ve izolasyonu için en fazla önerilen besiyerleri arasında adı geçen MRS Agar besiyerinde diğer besiyerlerine oranla *L. bulgaricus*'da 100, *L. helveticus*'da 10.000 kez daha az sayım sonucu alınmıştır. Bu durum ticari bakterilerinin muhtemelen oksotrof mutant oimalarından kaynaklanmaktadır.

EMS sayım sonuçlarında ise inkübasyon süresinin sayım sonucu üzerindeki etkisi açık bir şekilde görülmektedir. Bu aşamada sadece araştırma bulgularının verilmesi ile yetinilecek ve yorum yapılmayacak, daha sonraki çalışmalarda konu üzerinde durulacaktır.

Çizelge 3. Ticari Laktik Asit Bakterilerinin Sayım Sonuçları

Bakteri	Besiyeri	Katı Besiyerinde Yapılan Sayım		En Muhtemel Sayım Yöntemi			
		Yayma Yöntemi	Damlatma Yöntemi	18 Saat	24 Saat	30 Saat	48 Saat
<i>S. thermophilus</i>	APT Agar	2,6x10 ⁷	2,7x10 ⁷				
	LAPT Agar	2,3x10 ⁷	2,0x10 ⁷	1,6x10 ⁸	3,5x10 ⁸	5,4x10 ⁸	5,4x10 ⁸
	M 17 Agar	6,4x10 ⁷	3,8x10 ⁷				
<i>S. faecalis</i>	APT Agar	2,0x10 ⁸	4,9x10 ⁸				
	LAPT Agar	5,0x10 ⁸	4,0x10 ⁸	2,4x10 ⁴	3,5x10 ⁸	5,4x10 ⁸	2,4x10 ⁹
	M 17 Agar	4,5x10 ⁸	8,3x10 ⁸				
<i>S. lactis</i>	APT Agar	1,5x10 ⁹	1,3x10 ⁹				
	LAPT Agar	1,6x10 ⁹	1,3x10 ⁹				
	M 17 Agar	1,7x10 ⁹	1,4x10 ⁹	9,4x10 ⁷	1,1x10 ⁸	2,3x10 ⁸	2,4x10 ⁹
	HC Agar	2,7x10 ⁹	9,6x10 ⁹				
<i>S. cremoris</i>	APT Agar	3,9x10 ⁸	4,0x10 ⁸				
	LAPT Agar	1,0x10 ⁹	7,6x10 ⁸	2,0x10 ⁷	2,0x10 ⁷	1,3x10 ⁸	1,3x10 ⁸
	M 17 Agar	8,4x10 ⁸	6,1x10 ⁸				
<i>L. bulgaricus</i>	APT Agar	5,5x10 ⁸	4,6x10 ⁸				
	LAPT Agar	7,5x10 ⁸	1,3x10 ⁸	—	3,5x10 ⁸	4,6x10 ⁸	4,6x10 ⁸
	MRS Agar	6,3x10 ⁶	5,7x10 ⁶				
<i>L. helveticus</i>	APT Agar	5,0x10 ⁸	5,8x10 ⁸				
	LAPT Agar	4,9x10 ⁸	3,6x10 ⁸	—	9,4x10 ³	1,8x10 ⁷	2,4x10 ⁹
	MRS Agar	3,0x10 ⁴	1,9x10 ⁴				

3.2. Kaşar Peynirlerinde Mikrobiyolojik Sayım Sonuçları

Çizelge 4'de 7 farklı kaşar peyniri örneğindeki mikrobiyolojik sayım sonuçları verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi damlatma ve yayma yöntemleri arasında sayım sonuçları açısından büyük benzerlik görülmektedir. Çizelgede (r) ile gösterilen değerler denemede kullanılan 5 besiyerinde damlatma ve yayma değerleri ile elde edilen sayım sonuçları logaritmaları arasındaki korelasyon katsayısıdır. En yüksek korelasyon katsayısı +0,999 ile MRSA besiyerinde, en düşük değer ise +0,953 ile GA besiyerinde elde edilmiştir. Kuşkusuz en düşük r değeri olan +0,953 bile çok yüksek bir korelasyon katsayısıdır.

Genel olarak damlatma yöntemi ile alınan sayım sonuçları yayma yöntemindekilerden biraz daha düşüktür. Bunun sebebi damlatma yönteminde yaklaşık 3 cm çapında yapılan sayımda bazı kolonilerin sayım sırasında gözden kaçırılmış olmasıdır. Nitekim basillerin sayıldığı GA

besiyerinde yaklaşık 3 mm çaplı koloni oluşturulan basillerin sayılması oldukça zor olmuştur

PDA besiyerinde ise 0,01 ml olarak yapılan damlatmalarda, damla besiyerinde üzerinde 5-6 mm çaplı bir daire şeklinde yayıldığından sayım oldukça güç yapılmıştır. Bu sorunun giderilmesi amacıyla yapılan 0,1 ml damlatma işlemi iyi sonuç vermiştir. Ayrıca bu şekilde maya ve küf sayısı $< 10^3$ /ml olan örneklerde sayım sonucu alınabilmektedir.

4. SONUÇ

Gerek saf kültür gerek kaşar peynirinden yapılan mikrobiyolojik sayımlarda damlatma yöntemi rahatlıkla yayma yöntemi yerine kullanılabilir. Aynı besiyeri içinde 6, hatta 8-12 damla üzerinde sayım yapılabilmesi 6-12 misli daha az besiyeri kullanılmasını sağlamaktadır. Bu ise aynı oranda daha az masraf oluşturmaktadır. Ayrıca yayma işleminde kullanılan Drigalski spatülünden gelebilecek bulaşmalar bu yöntemde söz konusu değildir.

Peynirler	Sayım Yöntemi	Kaşar Peyniri Örnekleri							
		1	2	3	4	5	6	7	r
SB	D	$1,7 \times 10^7$	$1,9 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$5,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	+ 0,998
	Y	$1,7 \times 10^7$	$2,4 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$	$8,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	
MRS	D	$1,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$	$8,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	+ 0,999
	Y	$1,4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	$7,6 \times 10^8$	$4,2 \times 10^7$	$7,9 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	
PCA	D	$3,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	+ 0,971
	Y	$5,4 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$7,3 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	
PDA	D	$2,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^6$	+ 0,994
	Y	$2,7 \times 10^4$	$6,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$	$3,1 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$	$3,1 \times 10^6$	
GA	D	$4,0 \times 10^4$	$1,9 \times 10^6$	$3,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^6$	+ 0,953
	Y	$2,0 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	$3,1 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^6$	

Bunun yanında damlatma yönteminde bazı dezavantajların belirtilmesinde yarar vardır.

— 10^{-1} dilusyondan yapılan 0,01 ml ekim sonucunda 1 tek koloni elde edilse sayım so-

nucu 10^3 /ml'dir. Ancak bu damlada koloni elde edilemez ise sonuç $< 10^3$ /ml olarak verilir. Oysa yayma yönteminde 10^{-1} dilusyondan 0,1 ml ekim yapılacağı için petri kutusunda koloni elde

edilemezse sonuç $< 10^2$ /ml olarak verilebilir. Hatta besiyerinin özelliğine, pipetlenen sıvıyı emme durumuna göre 10^{-1} dilusyonundan 1 ml dahi ekim yapılabilir. Bu gibi hallerde 10^{-1} /ml ve daha fazla sayıda mikroorganizma içeren örneklerde sayımlar yayma yöntemi ile elde edilebilir. Oysa bu çalışmada sadece damlatılan sıvının yayılmasına izin vermediği için PDA besiyerinde 0,1 ml kullanılabilmiş, diğerlerinde 0,01 ml ekim yapılmıştır. Bir diğer deyişle damlatma yöntemi 10^3 /ml'den daha az mikroorganizma içeren örneklerde uygun değildir.

— Besiyerinin damlayı emmesi için yeterli bir kurulukta olması gerekir. Bunun için bu çalışmada besiyerleri 48 saat önceden hazırlanmıştır. Eğer besiyeri ıslak olursa damla aşırı miktarda yayılmakta, çok kuru olursa bu kez damla derhal emildiğinden yeterli büyüklükte damla elde edilememektedir.

— Besiyeri mutlak suretle düz bir düzey üzerinde petri kutularına dökülmeli, ayrıca petri kutularının taban içleri de düzgün olmalı, damlatma işlemi yine düz bir yüzey üzerinde

yapılmalıdır. Aksi halde damla düzgün değil eğri bir şekilde besiyeri üzerinde yayılmaktadır.

— 0,01 ml ile çalışılacağına göre ayarlı mikropipet bulundurulması gerekmektedir. Normal cam pipetler veya Pastör pipetleri ile çalışmak sayım sonuçlarının güvenilirliği açısından sakıncalıdır. Ayarlı mikropipet ise Ekim 1989 fiyatı ile 600.000.— TL. kadardır. Kuşkusuz bu başlangıçta bir masraf unsuru olarak görülüyor. Sa da besiyerinden sağlanacak tasarruf ile çok kısa bir süre için de kendini amorti edecektir.

— 10 cm çaplı petri kutusunda alışlagelmiş sayıma göre 2-3 cm çaplı bir alanda sayım yapmak başlangıçta araştırmacılara zor gelmektedir.

— Basillerde olduğu gibi yayılmış kolonilerin sayılması zor olmaktadır.

Bu çalışmanın amacı rutin mikrobiyolojik sayım yapan laboratuvarlarda sayım maliyetini düşürmek için bir yol göstermektir. Kuşkusuz araştırmacılar kendi çalışma koşulları altında bu yöntemi rutin testlerde kullanmak için öncelikle halen kullandıkları yayma ya da dökme yöntemi ile kıyaslamalıdır.

LİTERATÜR

1. GÜRGÜN, V., A. K. HALKMAN, 1988 Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 7. San Matbaası, Ankara 146 s.
2. ARDA, M. 1978. Genel Bakteriyoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları no: 342, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 521 s.
3. CASTLOW, R. N. 1981. Growth. «Alınmıştır; Manual of Methods for Bacteriology, Ed. P. Gerhardt» American Society for Microbiology, Washington DC, 524. s.
4. KÖŞKER, O., L. ÇAKMAKÇI. 1985. Genel Mikrobiyoloji. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları no: 955, Ankara, 138 s.
5. PAMİR, M. H. 1985. Fermantasyon Teknolojisi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları no: 936, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 328 s.
6. POSTGATE, J.R. 1969. Viable Counts and Viability. «Alınmıştır, Methods in Microbiology, Vol 1, Eds J. R. Norris ve D. W. Gibbons». Academic Press, London, New York, 712 s.
7. ANONYMOUS, 1984. Difco Manual. 10th Ed. Difco laboratories, Detroit, Michigan, 1155 s.
8. PERAL DE PORTILLO, M. C., M. J. AMOROSO, G. OLIVER. 1988. Culture Medium for the differentia enumeration of lactic acid bacteria in yoğurt. Milchwissenschaft 43 (8) 490 - 491.
9. ÖNER, Z. 1986. Peynir ve Peyniraltı Suyunda Bulunan Laktik Streptokokların Özgül Fajlarının Aranması ve Konakçılar Belli Bazı Laktik Fajlara Karşı Özgüllüklerinin Saptanması. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi T. Mikrobiyolojisi Birimi Doktora Tezi, basılmamış.
10. HARVEY, R. T. E. B. COLLINS. 1961. Role of citrotase in aretoine formation by *Streptococcus diaretylactis* and *Leucomostac citrorarum*. J. Bact. 82: 954 - 959.
11. DeMAN, J.C., M. ROGOSA, M.E. SHARPE. 1960. A medium for the Cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bact. 23 (1) 130-135.
12. ANONYMOUS. 1973. International Standards and Standard Methods of Sampling and Analysis for Milk Products. FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, Roma, 127 s.
13. ERGÜLLÜ, E. 1980. Beyaz Peynirin Olgunlaşması sırasında Mikrofloranın Özellikle Gaz Yapan Bakterilerin Değişimi Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik tezi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, İzmir, basılmamış.