

MİKROBİYOLOJİK VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİNDE UYGUN TRANSFORMASYON YÖNTEMİNİN SEÇİMİ

CHOICE OF THE SUITABLE TRANSFORMATION FOR THE STATISTICAL ANALYSIS OF MICROBIOLOGICAL DATA

Zahide KOCABAŞ¹ Sabiha ODABAŞI² Metin ATAMER²

¹Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı, ANKARA

²Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, ANKARA

ÖZET: Mikrobiyolojik verilerin analizinde yararlanılan transformasyon yöntemleri üzerinde durulmuştur. En uygun transformasyon yönteminin seçimi örnek bir olay üzerinde açıklanmıştır. Varyans analizinin ön koşullarını yerine getirmeyen verilerin analizi ile güvenilir olmayan ve pratik açıdan yorumlanması zor, yanıltıcı sonuçlar elde edileceği gösterilmiştir.

ABSTRACT: This paper deals with transformations that are required when the assumptions of analysis of variance technique are violated. The necessity of the choice of suitable transformation in the analysis of microbiological data was explained using a real case. It was shown that when the data where the assumptions of ANOVA are infringed were directly analysed, the results to be obtained would be unreliable and very difficult to explain in reality.

GİRİŞ

Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesinde, deneme planı ve istatistik yöntem seçimi, üzerinde durulması gereken konulardır. Ancak gıda ile ilgili birçok çalışmada deneme planı ve istatistiksel yöntemin hatalı olduğu görülmektedir. Özellikle mikrobiyolojik sonuçların değerlendirilmesinde çoğunlukla yanlışlık yapılmaktadır. Başlıca yanlışlık ise, normal dağılım göstermeyen ve sayılarak elde edilen mikrobiyolojik sonuçların basit varyans analizi tekniği kullanılarak doğrudan değerlendirilmesidir. Çünkü sayılarak elde edilen veriler, varyans analizi tekniğinin uygulanabilmesi için gerekli olan ön koşulları yerine getirmemektedir. Nitekim, bazı çalışmalarda bu konunun dikkate alınmamasından ötürü, aralarında çok büyük farklılıklar bulunan mikrobiyolojik sayımlara ilişkin sonuçlar "farklılıklar istatistiksel açıdan önemsizdir" şeklinde yorumlanmaktadır. İlave-ten, hatalı istatistiksel yöntem nedeniyle teknolojik açıdan açıklanması mümkün olmayan sonuçlara ulaşan araştırmacı, mikrobiyolojik verilerin istatistik analizinden kaçınmaktadır. Özetle, mikrobiyolojik verilerin değerlendirilmesinde varyans analizinin uygulanabilmesi için ön koşulların varlığı ve uygun transformasyon yönteminin seçimi önem kazanmaktadır. Bu nedenlerden ötürü, çalışmamızda varyans analizi tekniği için ön koşullar, transformasyonlar ve uygun transformasyon yönteminin seçimi açıklanmıştır. İlave-ten, transforme edilmiş ve edilmemiş verilerin varyans analizi sonuçları karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır. İstatistik analizlerde, tarafımızca gerçekleştirilen bir çalışmaya ait psikrofilik mikroorganizma sayıları esas alınmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada, Laktoperoksidaz/tiyosiyanat/hidrojenperoksit (LP) sistemi aktive edilerek 30°C'de ve Kontrol olarak da 4°C'de 8 saat bekletilen sütler ile bu sütlerden üretilen teleme materyal olarak kullanılmıştır.

Psikrofilik mikroorganizma sayımları Kontrol (K) ve LP sistemi aktive edilmiş örneklerde (A ve B) 8. saatte, telemde ise haşlama asitliğine ulaştığı dönemde gerçekleştirilmiştir. Deneme dört farklı zamanda tekrarlanmıştır. İstatistik analizler tesadüf blokları deneme tertibine göre yürütülmüştür (DÜZGÜNEŞ ve ark., 1987). Sonuçlar (mikroorganizma sayıları) önce doğrudan, izleyen aşamada da transformasyondan sonra varyans analizi tekniği kullanılarak analiz edilmiştir (SOKAL ve ROHLF, 1981; DÜZGÜNEŞ ve ark., 1987). Ayrıca, farklı transformasyon yöntemlerinin uygunluğu da irdelenmiştir.

Psikrofilik mikroorganizma sayıları DILIELLO (1982)'ya göre belirlenmiştir.

DENEME PLANLAMASI ve ÖN KOŞULLAR

Bir deneme, araştırılan faktörlerin ve seviyelerinin incelenen özellik(ler) üzerinde farklılık yaratıp, yaratmadığını belirlemek amacıyla yönelik ise, verilerin analizinde yararlanılacak istatistik yöntem varyans analizi tekniğidir. Ancak güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için, varyans analiz tekniğinin ön koşullarının yerine getirilmesi gerekmektedir. Eğer gerekli ön koşullar yerine getirilmemişse, elde edilecek sonuçlar güvenilir olmayacağı gibi yanıltıcı da olacaktır. Varyans analizinin gerektirdiği ön koşullar aşağıda verilmektedir.

1. Muamele Gruplarındaki Gözlemlerin Birbirinden Bağımsız Olması:

Muamele gruplarındaki gözlemlerin bağımsızlığı koşulu deneme kurulurken yerine getirilmelidir. Örneğin, bir kalıp peynir veya bir kap yoğurttan birden fazla sayıda örnek hazırlanarak analizlerin yapılması durumunda bu gözlemler birbirinden bağımsız değildir. Bunlar birbirinin paralelidir. Bağımsız gözlem, ayrı kalıplardan veya kaplardan elde edilen sonuçlardır. Deneme kapsamına birden fazla sayıda kalıp/kap alınarak, incelenecek olan özelliğe ait ölçümler belirlenir. Böylece herhangi bir özelliğe ait veriler bağımsız ünitelerden elde edilir. Eğer deneme planlanırken gözlemlerin bağımsızlığı ön koşulu yerine getirilmemişse, sonuçların istatistiksel açıdan değerlendirilmesi mümkün değildir.

2. Verilerin Normal Dağılım Göstermesi:

Ölçme, tartma veya analiz sonuçları sürekli verilerdir ve tarif aralığında her değeri alabilirler. Verilerin elde edildiği deney üniteleri homojen ise aralarındaki farklılık tesadüften ileri gelir. Bu tip veriler normal dağılım gösterirler. Normal dağılım ortalama etrafında simetrik ve çan eğrisi şeklindedir. Normal dağılımın eğrilik katsayısı 0 ve diklik katsayısı 3'tür. Normal dağılımın parametreleri ortalama ve standart sapmadır (dolayısıyla varyans). Verilerin dağılımı normalden sapıyorsa bunlar binomiyal veya Poisson dağılımı gösterebilirler. Binomiyal ve Poisson dağılımları kesikli, yani saymak yolu ile elde edilen verilerin gösterildiği dağılımlardır. Saymak yolu ile elde edilen veriler tarif aralığında her değeri alamazlar. Örneğin bir petri kutusunda mikroorganizma sayımı yapıldığında elde edilen veri ya 100 veya 101'dir fakat 100.5 mikroorganizma sayıdı denemez. Binomiyal dağılımda ortalama ve varyans arasında doğrusal bir ilişki vardır, yani dağılımın ortalaması arttıkça varyansı da artar. Poisson dağılımında ise ortalama ve varyans birbirine eşittir. Verilerin elde edildiği grupların ortalamaları ve varyansları arasında bir ilişki gözleniyorsa, dağılım Binomiyal veya Poisson'dur. Böyle bir ilişkinin olmadığı durumlarda ise normal dağılımdan sapmalar eğrilik ve diklik katsayısına ait hipotez kontrolleri yapılarak araştırılır.

Denemede dikkate alınan muamele gruplarındaki verilerin normallikten sapmalarının hipotez kontrollerinde yapılacak 1. tip hata (geçerli olan bir hipotezin yapılan kontrol sonucunda belirli bir ihtimal sınırına, genellikle %5 veya %1, göre ret edilmesi) ihtimali üzerine etkileri, gruplardaki gözlem sayısına da büyük ölçüde bağlıdır. Gruplardaki gözlem sayısı azaldıkça bu konuda daha dikkatli olunması gerekir.

3. Grup Ortalamaları ve Varyanslarının Bağımsız Olması:

Deneme sonucunda elde edilen veriler normal dağılım gösteriyorsa, grupların ortalama ve varyansları arasında bir ilişki yoktur, yani birbirinden bağımsızdır. Binomiyal ve Poisson dağılımlarında ise yukarıda da belirtildiği gibi grupların ortalamaları ve varyansları birbirinden bağımsız değildir, ya birbirine eşittir (Poisson dağılımı) yada ortalama arttıkça varyans da artmaktadır (Binomiyal dağılım). Genelde verilerin normal dağılımı olmuş olmasında, ortalama ve varyansların bağımsızlığı koşulu da yerine getirilmiş olur.

4. Grup Varyanslarının Homojen Olması:

Varyans analizi tekniğinde hesaplanan hata varyansı, toplanmış varyanstır (Pooled Variance) (yani grup varyanslarının tartılı ortalamasıdır). Bu populasyon varyansının tahminidir. Toplanmış varyansın hesaplanabilmesi için grup varyanslarının homojen olması yani grup varyansları arasındaki farklılığın, tesadüften

ileri gelebilecek farklılıklar kadar olması gerekir. Örneğin bir denemede 3 muamele grubu varsa ve bu gruplar için hesaplan varyanslar 200, 25 ve 30 olabilir. Araştırmacı homojenlik kontrolünde, varyansların homojen olmadığı kararına varmışsa, bu durumda varyans analizi tekniği kullanılarak alınacak sonuçlar güvenilir olmayacaktır. Çünkü 200 varyansa sahip muamele grubu varyans analizinde hesaplanacak hatayı artıracaktır.

Grup varyansların homojen olmayışının, başlangıçta karşılaştırılan %5'lik I. tip hata ihtimalinin %5.9'a (WINER, 1971) ve hatta gruplardaki gözlem sayılarının eşit olmaması durumunda ise %22'ye kadar yükselbileceği belirtilmektedir (DÜZGÜNEŞ ve ark. 1987).

5. Muamele Etkilerinin Eklenebilir Olması:

Analizler yapılırken söz konusu faktörlere ait esas etkilerin eklenebilir olması gerekir, yani bir gözlem faktör hallerinin etkileri ile buna ait hatanın birbirlerine eklenmeleri ile oluşur (SOKAL ve ROHLF, 1981; DÜZGÜNEŞ ve ark., 1987). Örneğin bir denemede bir faktörün 3 ($i=1,2,3$) farklı seviyesi deniyor ise bu durumda olması gereken model;

$$Y_{ij} = \text{Populasyon ortalaması } (\mu) + i. \text{ muamelenin etkisi } (\alpha_i) + \text{hata } (e_{ij})$$

Eğer denemeden elde veriler için geçerli olan model çarpımsal bir model ise, yani $Y_{ij} = \mu \alpha_i e_{ij}$ şeklinde ise bu eşitliğin logaritması alınarak (yani logaritmik transformasyon kullanılarak) $\log Y_{ij} = \log (\mu) + \log (\alpha_i) + \log(e_{ij})$ şeklinde eklenebilirlik ön koşulu sağlanmış olur.

TRANSFORMASYONLAR

Varyans analizi tekniğinin gerektirdiği koşulların yerine getirilmemiş olması durumunda verilerin elde ediliş şekillerine ve özelliklerine göre yaygın olarak kullanılan transformasyonlar: karekök (square root), logaritmik ve açı transformasyonlarıdır.

Karekök Transformasyon: Eğer veriler sayılarak elde edilmiş ise (örn. mikroorganizma sayısı) çoğunlukla karekök transformasyon kullanılır.

Bu transformasyon uygulanırken, verilerin karekökleri alınır. Eğer veriler sıfır değerini içeriyor ve deney ünitelerinden 10'dan daha az sayım yapılmış ise veriye 1 veya 0.5 eklendikten sonra karekökleri alınır (SNECEDOR ve COCHRAN, 1980; SOKAL ve ROHLF, 1981; DÜZGÜNEŞ ve ark., 1987).

Logaritmik Transformasyon: Grup ortalamaları ile varyansları arasında pozitif bir korelasyonun bulunması halinde varyans analizi uygulanmadan önce veriler logaritmik transformasyon ile transforme edilmektedirler. Bu transformasyon: grup varyansları ve ortalamaları arasındaki ilişkinin ortadan kalkmasını, dağılım sağa eğik ise dağılımın normalleşmesini, eklenebilirlik şartının yerine getirilmesine olanak verir (SOKAL ve ROHLF, 1981; DÜZGÜNEŞ ve ark., 1987).

Açı Transformasyon: Sayılarak elde edilen veriler oran olarak ifade edilmişler ise, bu tip verilere açı transformasyonu uygulanır. Açı transformasyonu gerçekte ters sinüs veya arc sinüs transformasyonudur (SNECEDOR ve COCHRAN, 1980; SOKAL ve ROHLF, 1981; DÜZGÜNEŞ ve ark., 1987).

Transformasyon kullanımının gerektiği durumlarda karşılaşılan başlıca problem hangi transformasyonun tercih edileceğidir. Bu gibi durumlarda transformasyon yöntemlerinden bazıları denendikten sonra, bunlardan en iyi şekilde ön koşulları yerine getiren transformasyon kullanılabilir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Denemeden elde edilen psikrofilik mikroorganizma sayılarının muamele grupları için ortalama, standart sapma ve değişim genişlikleri Çizelge 1'de verilmiştir.

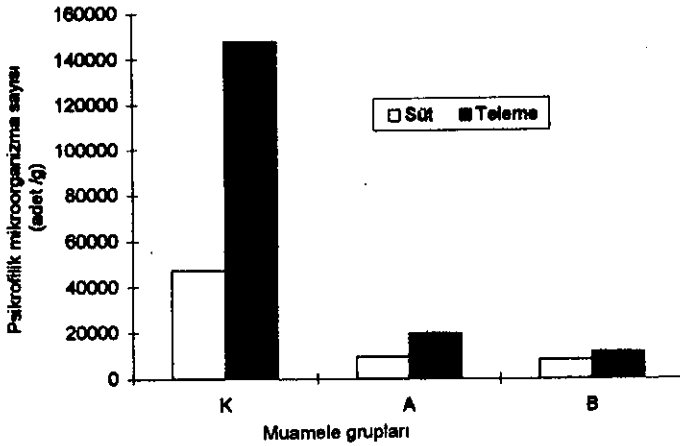
Çizelge 1. Sütte ve telemde psikrofilik mikroorganizma sayılarının muamele gruplarına göre ortalama, gruplarına göre ortalama, standart sapma ve değişim genişlikleri.

	Muamele	Ortalama	S.Sapma	Değiş. Gen.
Süt	K	47 213	48 744	91 700
	A	9 536	10 762	19 245
	B	8 112	9 269	16 752
Teleme	K	147490	163 711	287 740
	A	19314	21 582	38 085
	B	11203	12 447	22 150

K: 4°C'de 8 saat bekletilen süt (Kontrol)

A: 20/20 ppm SCN/H₂O₂ ilave edilerek 30°C'de 8 saat bekletilen süt

B: 60/60 ppm SCN/H₂O₂ ilave edilerek 30°C'de 8 saat bekletilen süt



Şekil 1. Sütte ve telemde muamele gruplarına göre saptanan ortalama psikrofilik mikroorganizma sayıları

sayımlar için $C=0.977$, $P<0.01$). Gerek sütte gerekse telemde, kontrol grubundaki varyansın diğer gruplarda saptanan varyanstan çok büyük olması varyans analizinde hesaplanan hata kareler ortalamasının artmasına ve hipotezin kabul edilmesine sebep olmuştur. Bu durumda araştırmacının güvenilir sonuçlara ulaşabilmesi için verilerini transforme etmesi gerekir. Dolayısıyla mikroorganizma sayılarına karekök transformasyonu uygulanmıştır.

Karekök transformasyonu uygulandıktan sonra psikrofilik mikroorganizma sayılarının muamele grupları için ortalama, standart sapma ve değişim genişlikleri Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Süt ve telem için karekök transformasyonu kullanılarak transforme edilmiş psikrofilik mikroorganizma sayılarının muamele gruplarına göre ortalama, standart sapma ve değişim genişlikleri.

	Muamele	Ortalama	S.Sapma	Değişim Genişliği
Süt	K	180.9	139.1	275.8
	A	75.4	71.6	131.5
	B	68.3	67.8	122.7
Teleme	K	305	269	486
	A	109.8	98.4	175.8
	B	84.4	73.7	131.3

sayısı üzerine etki bakımından istatistik olarak önemli bir farklılığın olduğunu göstermiştir (Sütteki psikrofilik mikroorganizma sayıları için $F(2,6)=9.40$, $P<0.05$, hata kareler ortalaması=1691; telemdeki psikrofilik mikroorganizma sayımı için $F(2,6)=5.17$, $P<0.05$, hata kareler ortalaması=11316).

Sütte ve telemde saptanan mikroorganizma sayıları muamele gruplarına göre Şekil 1'de verilmektedir. Şekil 1'de gösterildiği gibi kontrol grubundaki mikroorganizma sayısı diğer muamele gruplarından çok fazladır. Bu grafiğe bakıldığı zaman araştırmacının beklentisi muamele grupları arasındaki farklılığın istatistik olarak da önemli bulunmasıdır.

Sonuçlara varyans analizi uygulandığında psikrofilik mikroorganizma sayısı üzerine muamele grupları etkisinin önemsiz olduğu diğer bir deyişle muamele grupları arasında psikrofilik mikroorganizma sayıları bakımından farklılığın olmadığı belirlenmektedir (Sütteki psikrofilik mikroorganizma sayıları için $F(2,6)=3.92$, $P>0.05$; telemdeki psikrofilik mikroorganizma sayımı için $F(2,6)=3.25$, $P>0.05$). Fakat bu dikkate alınmaması gereken yanıltıcı bir sonuçtur. Çünkü Çizelge 1'de görüldüğü üzere muamele gruplarının ortalamaları ve standart sapma (dolayısıyla değişim genişliği) arasında bir ilişki söz konusudur. Yani grup ortalamaları arttıkça varyanslar da artmaktadır. Ayrıca Cochran testi (DÜZGÜNEŞ ve ark., 1993) kullanılarak kontrol edildiği zaman varyansların homojen olmadığı saptanmıştır (sütteki sayımlar için $C=0.922$, $P<0.01$; telemdeki

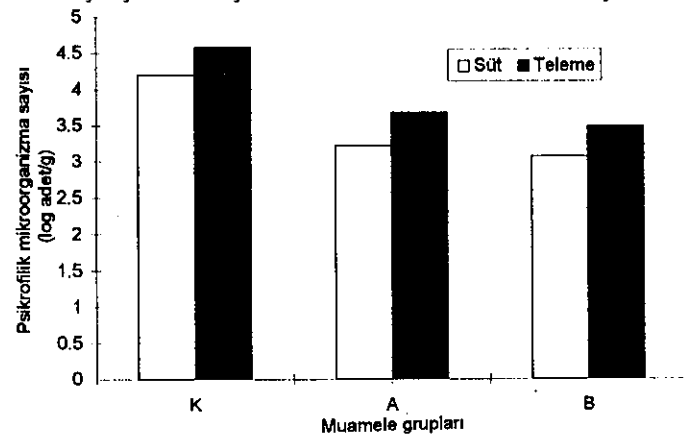
Süt örneklerinde mikroorganizma sayılarına karekök transformasyonu uygulandıktan sonra, Cochran testi ile varyansların homojenlik kontrolü yapılmıştır. Sonuçta, anılan test yardımıyla varyansların homojen olduğu görülmüştür ($C=0.666$, $P>0.05$). Ancak telemdeki sayımlar için bu ön koşulun sağlanmadığını göstermiştir ($C:0.827$, $P<0.05$). Karekök transformasyonu sütte yapılan sayımlar için varyansların homojenliği ön koşulunu yerine getirmiş olmasına karşın, ortalama ve varyans arasındaki ilişkiyi ortadan kaldırmıştır (Çizelge 2). Buna rağmen karekök transformasyonu kullanılarak transforme edilmiş değerler analiz edildiği zaman muamele gruplarının mikroorganizma

Araştırmacı sayımlarına karekök transformasyonu uygulayacağını düşünerek, bu transformasyonu kullanıp analizlerini yaptığı zaman, halen tam güvenilir sonuçlar elde etmiş değildir. Fakat transformasyondan sonra veriler tam olmamakla birlikte varyans analizi tekniğinin kullanılabilmesine daha uygun hale geldiği için, bu durumda hata, orijinal verilerin analizindeki hataya göre daha azdır. Transformasyonlar kullanılırken en önemli husus araştırmacının ön koşulları sağlayan en uygun transformasyon yöntemini seçmesi gerekliliğidir. Dolayısıyla, karekök transformasyonu varyans analizi için gerekli koşulları sağlamadığı için logaritmik transformasyon kullanılmıştır. Logaritmik transformasyon uygulandıktan sonra psikrofilik mikroorganizma sayılarının muamele grupları için ortalama, standart sapma ve değişim genişlikleri Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. Süt ve teleme için logaritmik transformasyon kullanılarak transformeedilmiş psikrofilik mikroorganizma sayılarının muamele gruplarına göre ortalama, standart sapma ve değişim genişlikleri.

	Muamele	Ortalama	S.Sapma	Değişim Genişliği
Süt	K	4.196	0.976	2.063
	A	3.220	1.266	2.546
	B	3.068	1.331	2.544
Teleme	K	4.576	1.043	2.022
	A	3.675	1.052	1.967
	B	3.484	0.993	1.808

muamelesi=0.0691; telemedeki psikrofilik mikroorganizma sayısı için $F(2,6) = 247.96$, $P < 0.01$, hata kareler ortalaması=0.0055). Logaritmik transformasyondan sonra sütte ve telemede, muamele grupları için ortalama mikroorganizma sayıları Şekil 2'de gösterilmiştir. Hangi muamele grupları arasındaki farklılığın önemli olduğunu araştırmak üzere yapılan DUNCAN testi sonuçları Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılığın istatistik olarak önemli olmasına rağmen 20 ppm ve 60 ppm SCN/H_2O_2 uygulaması arasında mikroorganizma sayısı üzerine etki bakımından önemli bir farklılığın olmadığını göstermiştir ($P < 0.01$, ortalamalar arası farklılıkların karşılaştırılması için standart hata sütteki analizler için 0.1314, telemedeki analizler için 0.03708).



Şekil 2. Sütte ve telemede muamele gruplarına göre gözlenen ortalama psikrofilik mikroorganizma sayıları (logaritmik) (Ortalamalar arası farklılıkların karşılaştırılması için standart hata sütteki analizler için 0.1314, telemedeki analizler için 0.03708)

KAYNAKLAR

- DILIELLO, L. R., 1982. Method in Food. Dairy Microbiology. The Avi Publishing Company. Westport. 141.
- DÜZGÜNEŞ, O., KESİCİ, T., KAVUNCU, O. ve GÜRBÜZ, F. (1987). Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik Metotları-II). Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları: 1021; Ders Kitabı: 295.
- DÜZGÜNEŞ, O., KESİCİ, T., KAVUNCU, O. ve GÜRBÜZ, F. (1993). İstatistik Metotları. İkinci Baskı. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları: 1291; Ders Kitabı: 369.
- WINER, B. J. (1971). Statistical principles in Experimental Design. Second Edition. McGraw-Hill, Inc., USA.
- SNEDECOR, G. W. and COCHRAN, W. G. (1980). Statistical Methods. The Iowa State Univ. Press. USA.
- SOKAL, R.R. and ROHLF, F. J. (1981). Biometry. W. H. Freeman ana Co. San Francisco, USA.

Çizelge 3'de de görülebileceği gibi logaritmik transformasyon grup ortalamaları ve varyansları arasındaki pozitif ilişkiyi ortadan kaldırmıştır. Yani standart sapma ortalamaya bağımlı olarak artmamaktadır. Ayrıca mikroorganizmaların logaritmik değerleri esas alınarak varyansların homojenlik kontrolü yapıldığı zaman anılan koşulun yerine getirildiği de belirlenmiştir (sütteki sayımlar için $C=0.409$, $P>0.05$; telemedeki sayımlar için $C=0.348$, $P>0.05$). Logaritmik transformasyondan sonra verilerin analizinden elde edilen sonuçlar, muamele gruplarının mikroorganizma sayısı etkisinin istatistik olarak önemli olduğunu göstermiştir (sütteki psikrofilik mikroorganizma sayıları için $F(2,6) = 21.69$, $P < 0.01$, hata kareler ortalaması=0.0691; telemedeki psikrofilik mikroorganizma sayısı için $F(2,6) = 247.96$, $P < 0.01$, hata kareler ortalaması=0.0055).

Bulunan sonuçlar mikrobiyolojik verilerin analizinde varyans analizinin ön şartlarının yerine getirilmiş olmasının önemini göstermiştir. Bu şartların yerine getirilmediği durumlarda yapılan analizler yorumlanması güç ve güvenilir olmayan sonuçların bulunmasına sebep olacaktır.

Mikrobiyolojik verilerin analizinde dikkatli olunması gereken diğer bir nokta ise uygun transformasyon yönteminin seçimidir. Literatürde saymak sureti ile elde edilen veriler için karekök transformasyonun kullanılacağı belirtilmiştir. Fakat bu transformasyon ön şartların yerine getirilmesi için uygun bir transformasyon yöntemi değil ise diğerleri denenmelidir. Yukarıda verilen sonuçlar logaritmik transformasyonun uygunluğunu göstermektedir.