

GAZ OLUŞUM SÜRESİNİN BELİRLENMESİ İLE GIDALARIN HIZLI MİKROBİYOLOJİK ANALİZİ

Musa Kılavuz¹, A. Kadir Halkman^{*2}

¹ Pınar Süt Mamulleri Sanayii A. Ş., Pınarbaşı, İzmir

² Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı Ankara

Geliş tarihi / Received: 03.06.2009

Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 11.11.2009

Kabul tarihi / Accepted: 15.11.2009

Özet

Bu çalışmada, Durham tüpü esaslı olarak geliştirilen prototip bir sistemle salça, ketçap, mayonez ve pizza sosunda laktobasil, maya ve koliform bakteri analizi yapılmıştır. Bu amaçla, yapay olarak kontamine edilen gıdalarda Durham tüpünde gaz oluşum süresi belirlenmiş ve bu değerler standart analizde Petri kutusunda koloni oluşum süreleri ile kıyaslanarak eşik değerler hesaplanmıştır. Ayrıca kontaminasyon düzeyi ile gaz oluşumunun gözlemlendiği süre arasındaki regresyon formülleri de hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre analiz edilen gıdalardaki bozulma etkeni mikroorganizmaların eşik değerleri, 3.94-7.21 log kob/g olarak belirlenmiştir. Buna göre eşik değeri açısından en zayıf sonucun alındığı salça/ laktobasil ilişkisinde (7.21 log kob/g) dahi; 48 saatlik inkübasyon sonunda standart mikrobiyolojik analizle belirlenme şansı sadece %0.002 olan 1 kg salçada 0.2 kob kontaminasyonun bu prototip yöntemle belirlenebileceği hesaplanmıştır. Bu prototip yöntem, Durham tüpündeki modifikasyonlar ve/ veya gazın belirlenmesinde fotosel sistemleri gibi entegrasyonlarla geliştirilmeye açık olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hızlı yöntemler, laktobasil, maya, koliform, Durham tüpü, gaz oluşum süresi

DETERMINATION OF GAS PRODUCTION TIME FOR RAPID MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF FOODS

Abstract

In this study, lactobacilli, yeast and coliform bacteria analyses were conducted for tomato paste, ketchup, mayonnaise and pizza sauce, by a prototype system which was developed using Durham tube. For this purpose, gas production time in Durham tube for intentionally contaminated foodstuffs were determined and comparing these values with the colony formation times in Petri dishes during standard analysis, the threshold values were calculated. Furthermore, formulas for regression between the level of contamination and gas formation time were also calculated.

Results showed that threshold values for spoilage bacteria in the analyzed foodstuffs were between 3.94 and 7.21 log cfu/g. As regards the threshold value, the weakest result was obtained for tomato paste-lactobacilli relation (7.21 log cfu/g). Despite this result, it was identified that 0.2 cfu contamination in 1 kg tomato paste can be determined using this prototype, although probability of its determination at the end of a 48 hours of incubation using standard microbiological methods is 0.002%. It is suggested that this prototype method can be further developed through modifications in the Durham tube and/or integration with other systems such as photocell systems used for identification of gas production.

Keywords: Rapid methods, lactobacilli, yeast, coliform bacteria, Durham tube, gas production time

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author ;

✉ halkman@eng.ankara.edu.tr, ☎ (+90) 312 596 1460, 📠 (+90) 312 317 8711

GİRİŞ

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde, uzun analiz süresi en önemli sorunlar arasındadır. Her ne kadar koliform grup bakteriler gibi hızlı gelişen mikroorganizmalar sıvı ve katı besiyerlerinde 16 saat içinde belirlenebilirse de, küflerin analizi 4-5 gün sürmektedir. Buna bağlı olarak, hızlı analiz yöntemlerinin geliştirilmesi konusunda pek çok çalışma yapılmaktadır (1-4). Son olarak, pek çok genetik ve immunokimya esaslı analizlerde önemli gelişmeler sağlanmıştır (5, 6).

Diğer taraftan, gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaların sayımında sıklıkla hatalı sonuç alınabilmektedir. Tipik bir örnek olmak üzere; 1 kg domates salçasında sadece 1 adet laktobasil canlı kaldı ise, işletme laboratuvarının 24 saatlik analiz sonunda bunu belirleme olasılığı sadece %0.01'dir. Şöyle ki; 10^{-1} seyreltiden Petri kutusuna 1 mL aktarıldığında bu 1 adet canlı bakterinin Petri kutusuna geçme olasılığı %0.01'dir. Diğer bir ifade ile işletme laboratuvarı %99.99 olasılıkla tehlikeyi fark etmeyerek ürüne "temiz" raporu verecek ancak, birkaç gün sonra ürün bozulacaktır.

Her ne kadar, hızlı genetik ve immunokimya vb. esaslı yeni metotlar sürekli olarak gelişmekte ve gıda sanayisine sunulmakla birlikte, klasik yöntemler de sanayide ağırlıklı olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, gıda sanayisinde kullanılmak üzere klasik analiz esaslı, duyarlı ve daha hızlı bir analiz yönteminin geliştirilmesidir.

Gıdaların mikrobiyolojik analizinde kullanılan farklı yöntemler vardır. Metabolizmaya dayalı analizlerde mikroorganizmanın metabolizma ürünleri belirlenir. Süt endüstrisinde çiğ sütün mikrobiyolojik kalitesinin hızlı olarak belirlenmesinde kullanılan metilen mavisi ve resazurin indirgeme testleri, empedans/ kondüktansa dayalı analizler, metabolizmaya dayalı testlerin tipik örnekleridir. Empedans/ kondüktans esaslı testlerde farklı besiyerleri kullanılarak farklı grup mikroorganizmalar belirlenebilmektedir (4, 7, 8).

Genel olarak gıdalarda bulunan istenmeyen mikroorganizmalar, gelişirken gaz (esas olarak CO_2) oluştururlar. Besiyerinde, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan bu gazın belirlenmesi var/ yok testlerinde kullanılabilirliği gibi, besiyerinde gaz oluşum süresi ise dolaylı olarak başlangıçtaki mikroorganizma sayısı ile ilişkilidir. Elma suyu konsantrelerinde *Alicyclobacillus* spp. analizinde kul-

lanılmak üzere gaz oluşumu esaslı bir yöntem geliştirilmiştir. Vida kapaklı cam tüpte selektif besiyeri vardır. İçeride ayrıca gaz geçirgen bir tüpte NaOH çözeltisi ve pH indikatörü olarak bromothymol blue bulunur. Analiz edilecek örnek; tüpe ilave edilip, kapağı sıkıca kapatılır ve inkübasyona bırakılır. Oluşan CO_2 gaz geçirgen tüpteki NaOH ile birleşir, pH düşer ve renk değişir (9). Belirli bir inkübasyon süresi sonunda içteki tüpte renk değişimi olup/ olmaması var/yok sonucu olarak değerlendirilebileceği gibi, renk değişim süresinin belirlenmesi ile materyaldeki başlangıç yükü tahmin edilebilir.

Gaz oluşumunun belirlenmesi, gıda mikrobiyolojisinde sıklıkla kullanılan bir uygulamadır. Bu konuda oldukça eski tarihli kaynaklara rastlanabileceği gibi (10) günümüzde içinde Durham tüpü olan sıvı besiyerleri pazarlanmaktadır (11-13). Koliform grup bakterilerin EMS yöntemi ile sayılmasında Durham tüpünde gaz birikmesi tipik bir pozitif sonuçtur. *Salmonella* ve pek çok diğer bakterinin identifikasyonunda da gaz oluşumunun belirlenmesi, önemli testler arasındadır. Litmus Milk besiyerinde *Clostridium perfringens*'in "Gazlı Pıhtı" ile belirlenmesi, klasik gıda analizlerinden birisi olarak hâlâ kullanılmaktadır. Empedans/ kondüktans esaslı testlerde elektrotlar doğrudan besiyerine daldırılabilirliği gibi, oluşan CO_2 'in NaOH ile reaksiyona sokulup, dolaylı yöntemle elektriksel geçirgenliğin belirlendiği uygulamalar da vardır (8, 14-18).

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Salça, ketçap, mayonez ve pizza sosu Ankara'daki perakende mağazalardan; *Lactobacillus* sp., maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve koliform grup bakterisi (*Escherichia coli*) Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi Kültür Koleksiyonu'ndan sağlanmıştır.

Yöntem

Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi

Tüm mikroorganizmalar ayrı ayrı olmak üzere bir gece boyunca (~18 h) aktifleştirilmiş ve uygun besiyerlerinde analiz edilmiştir.

Besiyerleri

Laktobasil için MRS Broth/ Agar, (Merck); maya için Sabouraud Dextrose Broth/ Agar, (Merck); koliform bakteri için Lauryl Sulfate Broth/ VRB Agar, (Merck) besiyerleri kullanılmıştır. VRB Agar dışındaki besiyerleri otoklavda 121 °C'da 15 dakika süre ile sterilize edilmiş, VRB Agar ise mikrodalga fırında kaynama görülünceye kadar ısı işlem uygulanarak hazırlanmıştır (7).

Tüpler

Denemelerde kullanılan iki çeşit tüpten büyük olanın (deney tüpü) çapı 3 cm, yüksekliği 15 cm'dir. Bu büyük tüplerin içerisine yerleştirilen ve gaz oluşumunu görmek için misina ile beraber kullanılan özel Durham tüplerinin çapı 1 cm, yüksekliği 10 cm'dir. Bu tüplerin açık ağzının 0.5 cm yukarısında misina bağlamak amacı ile 3 mm çapında delik açılmış ve buraya misina bağlanmış, inokülasyondan sonra misina hafifçe yukarı çekilerek Durham tüpünün besiyeri seviyesinin 1 cm kadar yukarisına çıkması sağlanmıştır. Böylece özellikle salça ve ketçap gibi renkli materyal ile çalışılırken gaz çıkışı izlenebilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Soldaki tüp: Otoklav sonrası Durham tüpü, deney tüpünün içindedir. Ortadaki tüp: Gıda ve mikroorganizma ilavesinden sonra misina ile çekilerek Durham tüpü, besiyeri seviyesinden yaklaşık 1 cm kadar yukarı çekilir. Sağdaki tüp: İnkübasyon sonunda Durham tüpünde gazın görülmesi.

Deney tüplerine Durham tüpü ve besiyeri ilavesinden sonra Durham tüplerinde kalan hava elle çıkartılmış, sonra 121 °C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır.

Tüplere gıda örneği ve test mikroorganizmaları eklendikten sonra misina çekilerek Durham tüpünün besiyeri seviyesinden 1 cm kadar dışarı çıkması sağlanmıştır. Böylece, salça ve ketçap gibi renkli gıdalarda gaz oluşumu kolaylıkla belirlenebilmiştir.

Gıdanın kontaminasyonu

45 mL broth içeren tüplere 5 g gıda ve sonra mikroorganizma ilave edilmiştir. Aktif kültürlerin 10^8 kob/mL canlı hücre içerdiği varsayılmış, ardışık seyreltmeler standart yöntemlerle yapılmıştır. 10^{-8} 'e kadar yapılan seyreltmelerden her tüpe 1'er mL ekim yapılmış, orijinal kültürdeki sayı standart kültürel yöntem ile belirlenmiş, tüplere aktarılan sayı bu değer üzerinden hesaplanarak elde edilmiş ve çizelgelere bu gerçek değerler işlenmiştir.

Gaz oluşum süresinin belirlenmesi

İnkübasyona bırakılan tüpler, 48 saat boyunca sürekli izlenerek gaz oluşum süreleri belirlenmiş ve çizelgelere dakika olarak işlenmiştir.

Koloni oluşum süresinin belirlenmesi

Aktifleştirilmiş kültürden, standart kültürel sayım yöntemine göre, uygun katı besiyerlerine ekim yapılmıştır. İnkübasyon boyunca Petri kutuları sürekli izlenerek, kolonilerin çıplak gözle fark edildiği süreler belirlenmiştir.

Gaz oluşumu görülen tüplerdeki mikroorganizma sayısının belirlenmesi

Gaz oluşumu görüldüğü anda standart kültürel sayım yöntemi ile ekim yapılmış ve sonuçlar çizelgelere kob/mL olarak işlenmiştir.

İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizlerde "Minitab 15 Statistical Software English" paket programı kullanılarak "Anova One-Way ve 2-sample t" testi ile sınırlı bir istatistik analiz uygulanmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

İzleyen çizelgelerde, mikroorganizmaların 4 farklı gıdada başlangıç sayıları ve bu sayıya karşı gelen gözle görülebilir gaz oluşturma süreleri ile, gaz görüldüğü andaki canlı hücre sayılarının (sayı/gaz) basit aritmetik ortalamaları (\pm SD), tüplerdeki başlangıç sayısına karşılık gelen gözle görülebilir gaz oluşturma süresinin regresyon formülü (y) ve bu 2 değer için korelasyon katsayıları (R^2) verilmiştir. Saf kültürden yapılan ekimlerde gözle görülebilir koloni oluşturma süreleri (koloni oluşumu) gıdadan bağımsız olarak elde edildiği için, tüm gıda gruplarında ortalama değer verilmiştir.

Konu ile doğrudan ilgili kaynak yetersizliği nedeni ile tartışma, ağırlıklı olarak elde edilen verilerin kendi içinde yorumlanması şeklinde yapılmıştır.

Çalışmada elde edilen değerlerden;

- Tüplerdeki canlı hücre sayısı tümüyle kabul edilişe bağlıdır. Bir diğer deyiş ile inokülümde (gıdanın kontaminasyonunda) kullanılan aktif kültürdeki canlı hücre sayısının seyreltilmiş tüm tüplere orantılı bir seyreltme ile geçtiği kabul edilmiştir.
- Tüplerde gaz oluşum süresinin belirlenmesi gözleme dayalı bir sonuçtur ve tümüyle 6-48 saat arasında sürekli olarak ve olabildiğince 30'ar dakikalık aralıklarla gözle izlemeye dayanmaktadır.

- Koloni oluşum süresi de tümüyle gözleme dayalı bir sonuçtur ve tüplerde gaz görülmesi izlenirken, bunun paralelinde Petri kutuları da sürekli izlenerek koloni oluşum süresi belirlenmiştir.
- Doğal olarak en yoğun kontaminasyonda gaz görüldüğü anda, tüpteki canlı hücre sayısı da ölçülmüş bir değer olmakla beraber, gazın görüldüğü an gözleme dayalı olduğu için bu değer de bir anlamda subjektiftir.
- Dolayısı ile regresyon formüllerinin ($y = ax+b$) ve korelasyon katsayılarının da (R^2) bu gözleme dayalı/ kabul edilişe bağlı olarak hesaplandığı açıktır.

Bunlara bağlı olarak bu çalışmada elde edilen sonuçların kısıtlı istatistiksel bir yorumu yapılmış, sonuçlar sadece bulgu olarak verilmiştir.

Lactobacillus sp. Analizi

Laktobasile ilişkin sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Laktobasil analizinde gaz oluşum süresi açısından gıda grupları ve tekrürler arasında ilginç farklılıklar görülmüştür. Ketçapta en yoğun inokülümde $SD \pm 0$ iken, en düşük inokülümde bu değer ± 433 dakika olarak saptanmıştır. Yoğun inokülüme bağlı olarak kısa gaz oluşum süresinde daha düşük standart sapmalar beklenmekle beraber, tersine gözlemler de olmuştur. Örneğin pizza sosunda en yoğun kontaminasyondaki standart sapma değeri oldukça yüksektir.

Çizelge 1. Laktobasilde gaz analizi

Salça (n= 3)		Ketçap (n= 2)		Mayonez (n= 2)		Pizza Sosu (n= 2)	
Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)	Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)	Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)	Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)
8.01 \pm 0.10	757 \pm 29	8.71 \pm 0.78	535 \pm 0	8.02 \pm 0.07	485 \pm 7	8.16 \pm 0.00	619 \pm 151
7.01 \pm 0.10	838 \pm 67	7.71 \pm 0.78	800 \pm 198	7.02 \pm 0.07	619 \pm 33	7.16 \pm 0.00	697 \pm 132
6.01 \pm 0.10	1111 \pm 32	6.71 \pm 0.78	896 \pm 228	6.02 \pm 0.07	740 \pm 11	6.16 \pm 0.00	828 \pm 159
5.01 \pm 0.10	1196 \pm 18	5.71 \pm 0.78	1050 \pm 85	5.02 \pm 0.07	803 \pm 32	5.16 \pm 0.00	924 \pm 80
4.01 \pm 0.10	1340 \pm 25	4.71 \pm 0.78	1202 \pm 121	4.02 \pm 0.07	972 \pm 47	4.16 \pm 0.00	1064 \pm 76
3.01 \pm 0.10	1507 \pm 65	3.71 \pm 0.78	1473 \pm 124	3.02 \pm 0.07	1069 \pm 40	3.16 \pm 0.00	1278 \pm 117
2.01 \pm 0.10	1563 \pm 46	2.71 \pm 0.78	1854 \pm 433	2.02 \pm 0.07	1241 \pm 43	2.16 \pm 0.00	1480 \pm 42
1.01 \pm 0.10	1617 \pm 17	1.71 \pm 0.78	1914 \pm 433	1.02 \pm 0.07	1209 \pm 6	1.16 \pm 0.00	1525 [*]
Sayı/gaz (log kob/mL): 8.78 \pm 0.25 y= -0.0069x+13.172 R ² = 0.9783	Sayı/gaz (log kob/mL): 8.97 \pm 0.24 y= -0.0049x+11.123 R ² = 0.9733	Sayı/gaz (log kob/mL): 9.25 \pm 0.18 y= -0.0082x+11.933 R ² = 0.9911	Sayı/gaz (log kob/mL): 8.84 \pm 0.05 y= -0.007x+12.031 R ² = 0.9799	Koloni oluşumu (dakika; n= 9): 864 \pm 132			

*: Tek tekrür sonucu

Her 4 gıdada da, laktobasilin başlangıç inokülüm değerleri arasında istatistiksel açıdan fark yoktur ($P>0.05$).

Her ne kadar Çizelge 1'e göre laktobasil için en kısa süreli gaz oluşumu mayonezde görülmüş, bunu sırası ile ketçap, pizza sosu ve salça izlemişse de, yapılan istatistik analizde ketçap, mayonez ve pizza sosunda gaz oluşumu açısından bir fark yoktur ($P>0.05$), salça ise uzun gaz oluşum süresi ile diğerlerinden farklıdır ($P<0.05$).

Bu çalışmanın yapılmasına esas olan teori, yoğun kontaminasyonda gaz oluşum süresinin, katı besiyerinde koloni oluşum süresinden daha kısa olacaktır. Nitekim bu teoriyi doğrulayan sonuçlar elde edilmiştir. Çizelge 1'deki salça kolonundaki regresyon formülünde x yerine 864 yazıldığında elde edilen sonuç 7.21'dir. Bunun anlamı; salçada başlangıç kontaminasyon düzeyi 7.21 log kob/g ise, koloni oluşum süresi ve gaz oluşum süresi eşittir. Daha yüksek kontaminasyonlarda gaz oluşum süresi, daha düşük kontaminasyonlarda ise koloni oluşum süresi kontaminasyonun belirlenmesinde avantajlı olacaktır. Bu eşik değerleri, ketçapta 6.89 log kob/g, mayonezde 4.85 log kob/g ve pizza sosunda 5.98 log kob/g olarak hesaplanmıştır.

Heterofermantatif laktobasillerin uygun substrat olan ortamlarda gaz oluşturması, basit tanımlama testlerinde (11, 12) kullanılmaktadır. Heterofermantatif laktobasillerin gaz oluşturma süreleri üzerinde yapılmış bir araştırmada (10), Tomato Ju-

ice Broth'a %0.5 ve %2.5 glikoz ilavesinin ve tüpün üstünün sıvı parafın ya da su agar ile kaplanması'nın etkisi araştırılmıştır. Bulgulara göre glikoz ilavesi ve kaplama gaz oluşum süresini kısaltmış, ayrıca glikoz yerine maltoz ilavesi ile daha fazla hacimlerde gaz elde edilmiştir. Ketçap formülünde yoğun olarak salça bulunmakla birlikte, ilaveten şeker de bulunması salçaya oranla ketçapta gaz oluşum süresinin kısalmasını açıklayabilmektedir.

4 farklı gıdada elde edilen kontaminasyon düzeyi ve gaz oluşum süresi arasında hesaplanan korelasyon katsayısı (R^2) değerlerinin 0.9733-0.9911 arasında olması oldukça yüksek bir ilişkiyi göstermektedir. Gaz görüldüğü andaki laktobasil sayısı gıdalara göre farklılık göstermemiştir ($P>0.05$).

Maya Analizi

Mayaya ilişkin sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir.

4 farklı gıdada mayanın başlangıç inokülümleri ve gaz oluşum süreleri arasında fark görülmemiştir ($P>0.05$). Gaz görüldüğü anda tüpteki maya sayısı açısından ise pizza sosu diğerlerinden farklıdır ($P<0.05$).

Gaz oluşturma süresi/ koloni oluşturma süresi açısından yapılan değerlendirmede eşik değerler; salçada 6.39 log kob/g, ketçapta 5.86 log kob/g, mayonezde 3.96 log kob/g ve pizza sosunda 5.79 log kob/g bulunmuştur.

Çizelge 2. Mayada gaz analizi

Salça (n= 2)		Ketçap (n= 2)		Mayonez (n= 2)		Pizza sosu (n= 2)	
Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)	Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)	Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)	Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)
6.63±0.08	814±144	7.16±0.14	565±99	5.82±0.28	531±8	7.24±0.24	663±11
5.63±0.08	1165±18	6.16±0.14	799±20	4.82±0.28	800±88	6.24±0.24	741±1
4.57*	1263*	5.16±0.14	1040±0	3.82±0.28	946±30	5.24±0.24	900±113
3.63±0.08	1694±375	4.16±0.14	1295±78	2.82±0.28	1064±19	4.24±0.24	1130±74
2.63±0.08	1795±226	3.16±0.14	1533±102	1.82±0.28	1171±6	3.24±0.24	1387±83
1.63±0.08	2224±25	2.16±0.14	1581±18	0.82±0.28	1242±14	2.24±0.24	1517±81
0.63±0.08	2509±24	1.16±0.14	1900±116	-0.15±0.28	1438±9	1.24±0.24	1741±141
Sayı/gaz (log kob/mL): 6.90±0.07		Sayı/gaz (log kob/mL): 7.23±0.17		Sayı/gaz (log kob/mL): 7.02±0.04		Sayı/gaz (log kob/mL): 7.38±0.07	
y= -0.0035x+9.4125		y= -0.0046x+9.8303		y= -0.0071x+10.089		y= -0.0052x+10.281	
R ² = 0.9429		R ² = 0.9863		R ² = 0.9677		R ² = 0.9858	
Koloni oluşumu (dakika; n=8): 863±58							

*: Tek tekerrür sonucu

4 farklı gıdada elde edilen kontaminasyon düzeyi ve gaz oluşum süresi arasında hesaplanan korelasyon katsayısı (R^2) değerlerinin 0.9429-0.9863 arasında olması oldukça yüksek bir ilişkiyi göstermektedir.

Koliform Grup Bakteri (*E. coli*) Analizi

Koliform grup bakteriye ilişkin sonuçlar Çizelge 3'te verilmiştir.

Denemelerde kullanılan 4 gıda için; başlangıç inokülümü, gaz oluşum süreleri, gaz görüldüğü anda tüpteki hücre sayısı ve koloni oluşturma süreleri açısından fark görülmemiştir ($P>0.05$).

Gaz oluşturma süresi/ koloni oluşturma süresi açısından yapılan değerlendirmede eşik değerler; salçada 6.78 log kob/g, ketçapta 4.60 log kob/g, mayonezde 3.94 log kob/g ve pizza sosunda 4.80 log kob/g bulunmuştur.

Dört farklı gıdada elde edilen kontaminasyon düzeyi ve gaz oluşum süresi arasında hesaplanan korelasyon katsayısı (R^2) değerlerinin 0.9334-0.9918 arasında olması oldukça yüksek bir ilişkiyi göstermektedir.

Gıda/ Mikroorganizma Etkileşimi

Çizelge 1, 2 ve 3'ün ve bunlara ilişkin istatistiksel analizler beraberce incelendiğinde bu çalışmanın asıl amacı olan gaz görülme süresi açısından sa-

dece salçada laktobasilin gaz oluşturma süresinin farklı (daha uzun) olduğu görülmektedir.

Denemelerde kullanılan 3 mikroorganizmanın 4 farklı gıdadaki gaz oluşturma süreleri bir bütün olarak incelendiğinde mikroorganizmalar arasında gaz oluşturma süresi açısından fark bulunmuştur ($P<0.05$) ve sıralamanın koliform grup bakteri< laktobasil< maya şeklinde olduğu belirlenmiştir.

Ketçap ve pizza sosunda laktobasil, maya ve koliform bakterinin gaz oluşturma süreleri açısından bir fark gözlenmemiştir ($P>0.05$). Salça ve mayonezde ise durum farklıdır. Bu gıdalarda koliform grup bakterinin laktobasil ve mayadan gaz oluşturma süresi açısından farklı olduğu sonucu ortaya çıkmıştır ($P<0.05$). Koliform grup bakterilerin en kısa, mayaların ise en uzun gaz oluşum süresi gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, mikroorganizmalar açısından da gıdaların besin içeriklerinin farklı olması ve mikroorganizmaların farklı metabolik yollar kullanmaları şeklinde açıklanabilir.

Mikroorganizmaların koloni oluşturma süreleri incelendiğinde koliform grup bakterinin diğer iki mikroorganizmadan farklı (daha kısa; $P<0.05$) ancak laktobasil ve maya arasında fark olmadığı belirlenmiştir ($P>0.05$).

SONUÇ

- Bu çalışmada elde edilen ve bu yayın ile sunulan değerler tümüyle, gözleme dayalı olarak Durham

Çizelge 3. Koliform grup bakteride gaz analizi

Salça (n= 7)		Ketçap (n= 2)		Mayonez (n= 2)		Pizza sosu (n= 2)	
Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)	Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)	Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)	Sayı (log kob/g)	Süre (dakika)
8.52±0.26*	413±90*	7.80±0.50	286±141	8.02±0.22	300±14	8.36±0.01	362±7
7.57±0.25	457±103	6.80±0.50	334±160	7.02±0.22	353±22	7.36±0.01	392±8
6.57±0.25	508±104	5.80±0.50	442±181	6.02±0.22	404±25	6.36±0.01	434±4
5.57±0.25	565±96	4.80±0.50	510±170	5.02±0.22	454±40	5.36±0.01	462±8
4.57±0.25	629±56	3.80±0.50	538±151	4.02±0.22	483±52	4.36±0.01	494±4
3.57±0.25	715±99	2.80±0.50	607±86	3.02±0.22	522±80	3.36±0.01	526±10
2.57±0.25	832±168	1.80±0.50	681±18	2.02±0.22	590±69	2.36±0.01	640±33
1.57±0.25	890±183	0.80±0.50	752±50	1.02±0.22	651±69	1.36±0.01	650±1
Sayı/gaz (log kob/mL): 8.40±0.45		Sayı/gaz (log kob/mL): 7.77±1.09		Sayı/gaz (log kob/mL): 8.33±0.13		Sayı/gaz (log kob/mL): 8.87±0.13	
y= -0.0128x+13.144		y= -0.0151x+12.107		y= -0.0207x+14.23		y= -0.0225x+15.985	
R ² = 0.9839		R ² = 0.9902		R ² = 0.9918		R ² = 0.9334	
Koloni oluşumu (dakika; n=13): 497±73							

*5 tekrerr sonuc

tüpünde gazın görüldüğü süre ve koloni oluşumunun fark edildiği sürenin belirlenmesi üzerine kurulmuştur. Bir diğer deyiş ile gaz oluşum süresinin belirlenmesi, kolonilerin gözle fark edilmesi kişisel deneyime bağlıdır.

- Her ne kadar elde edilen eşik değerlerin en düşükleri mayonezde koliform (3.94 log kob/g) ve yine mayonezde maya (3.96 log kob/g) ve en büyüğü salçada laktobasil (7.21 log kob/g) olarak hesaplanmışsa da; standart mikrobiyolojik analizlerle kıyaslandığında bu prototip uygulamanın ihmal edilemez başka üstünlükleri de vardır:
- Empedans/ kondüktansa dayalı analizler ile kıyaslanmayacak kadar düşük maliyete sahiptir. Nitekim Türkiye’de bu prototip sistemi rutin olarak kullanan gıda işletmeleri vardır.
- Eşik değeri en yüksek olan salça/ laktobasil ilişkisi incelenirse; 1 kob/kg olan kontaminasyonun standart analizlerle belirlenme olasılığı (10^{-1} seyrelti; dökme yöntemi) sadece %0.01’dir. Çizelge 1’de elde edilen $y = -0.0069x + 13.172$ regresyon formülü kullanılarak “y” yerine 1 kob/kg = 0.001; log eşdeğeri olan -3 yazıldığında elde edilen sonuç 2343 dakika yani ~39 saat olacaktır.
- Devamında; aynı en zayıf eşik değer kullanıldığında 48 saat inkübasyon için elde edilen değer -6.7 olup, bunun matematiksel ifadesi 1 kg salçada 0.2 kob laktobasil kontaminasyonunun bu prototip sistem ile belirlenebileceğidir. Oysa bunun standart mikrobiyolojik analizlerle (MRS Agarda 10^{-1} seyreltiden 1 mL ekim ve 24-48 saat inkübasyon) belirlenme şansı sadece %0.002’dir.
- Bu prototip sistem, Durham tüpünde gaz toplanmasını, toplanan bu gazın gözlemleneceği tepe noktasına daha hızlı çıkmasını sağlamak için tabanda (Durham tüpü ağzında) optimum düzeyde bir açıklık, uygun hızda etkin çalkalama sistemi, Durham tüpünün tepesinde gazın gözle görülmesi için optimum bir daralma ve ayrıca basit fotosel sistemleri ile gazın belirlenmesi ile bilgisayara bağlı alarm sistemlerinin tasarımına açıktır.

KAYNAKLAR

1. Kılavuz M. 2007. Gıdaların Hızlı Mikrobiyolojik Analizinde Gaz Oluşum Süresinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 47 s.
2. Notermans S, Beumer R, Rombouts F. 1997. Conventional versus Rapid and Automated Methods. In, *Food Microbiology; Fundamentals and Frontiers*. MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville (Eds). American Society for Microbiology, Washington D.C. 697-709 pp3. Raugel PJ. 1999. *Rapid Food Analysis and Hygiene Monitoring*. Springer-Verlag, Berlin. 921 p.
4. Turantaş F, Ünlütürk A. 2003. Hızlı Mikrobiyolojik Yöntemler. Gıda Mikrobiyolojisi. Eds. A. Ünlütürk, F. Turantaş. 3. baskı. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri. İzmir, 606 s.
5. Anon 2009. Rapid methods for food safety. <http://www.rapidmethod.com/newmethods.html> (Erişim; 11 Mayıs 2009)
6. Anon 2009. Food safety information website. <http://foodhaccp.com/> (Erişim; 12 Mayıs 2009)
7. Halkman K (ed). 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed. AK Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 s.
8. Wawerla M, Stolle A, Schalch B, Eisgruber H. 1999. Impedance microbiology: Applications in food hygiene. *J Food Prot* 62(12):1488-1496.
9. Anon 2009. MicroBio Corporation. <http://www.microbio.co.jp/products/Eng%20sensimedia.html> (Erişim; 10 Mayıs 2009)
10. Hayward C. 1957. Detection of Gas Production from Glucose by Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. *J Gen Microbiol* 16: 9-15
11. Anon 2009. Criterionlactobacilli MRS Broth <http://www.hardydiagnostics.com/catalog2/hugo/CRITN-LactobacilliMRSBroth.html> (Erişim; 11 Mayıs 2009)
12. Anon 2009. de Man- Rogosa- Sharpe-medium with Durham tube (MRS) <http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showbio.asp?articleid=29> (Erişim; Mayıs 2009)
13. Fung DYC, Miller RD. 1970. Rapid Procedure for the Detection of Acid and Gas Production by Bacterial Cultures. *Appl Microbiol* 20(3): 527-528
14. Bell C, Neaves P, Williams AP. 2005. *Food Microbiology and Laboratory Practice*. Blackwell Science. Oxford, 324 s.
15. Feng P. 2001. Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens. In; *Bacteriological Analytical Manual Online*. Appendix 1. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109652.htm> (Erişim; 10 Mayıs 2009)
16. Fung DYC. 1997. Overview of Rapid Methods Microbiological Analysis. In; *Food Microbiological Analysis; New Technologies*. Eds. ML Tortorello, SM Gendel. IFT Basic Symposium Series no 12. Marcel Dekker Inc, New York, 360 pp.
17. MacFaddin JF. 2000. *Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd Ed. Lippicott Williams&Wilkins, Philadelphia, 912 pp.
18. Rule P. 1997. Measurement of Microbial Growth by Impedance. In; *Food Microbiological Analysis; New Technologies*. Eds. ML Tortorello, SM Gendel. IFT Basic Symposium Series no 12. Marcel Dekker Inc, New York, 360 pp.