

ELEKTRİK İMPEDANS YÖNTEMİ VE GIDA MİKROBİYOLOJİSİNDEKİ UYGULAMALARI

IMPEDANCE METHOD AND APPLICATIONS IN FOOD MICROBIOLOGY

Fulya TURANTAŞ

Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksekokulu, Bornova-İZMİR

ÖZET: Elektrik impedans yöntemi özellikle son yıllarda gıda mikrobiyolojisinde kalitatif ve kantitatif analizlerde kullanımı yaygınlaşmaya başlayan yeni bir yöntemdir. Bu yöntem klasik yöntemlere kıyasla çok daha hızlı, pratik, ekonomik bir yöntem olduğu gibi aynı zamanda daha az işgücü gerektirmektedir. Yöntemin prensibi besi ortamında mikrobiyal aktivite sonucu bazı metabolitlerin üretilmesine ve ortamın kimyasal bileşiminde meydana gelen bu değişimin elektrik impedansı etkilemesine dayanmaktadır.

SUMMARY: The impedance method is a rapid automated method for determining bacteriological contamination level. In recent years this method for estimation of microorganisms have been used widely in food microbiology because it requires minimal sample preparation and low running costs, provide continuous automatic monitoring, and produce relatively rapid results. The principle of this method based on monitoring changes in the electrical properties of a medium as a result of microbial growth.

GİRİŞ

Elektrik impedans yöntemi ilk kez en basit şekliyle 1890 yıllarında kullanılmış, 1910 yıllarında da enzim, kan ve serum örnekleri üzerinde bu yöntemle bazı çalışmalar yapılmıştır. Elektrik impedans yöntemi kullanılarak mikroorganizma sayısının tahminlenmesi ilk kez 1975 yıllarına rastlamaktadır. Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda klinik üre örneklerinde elektrik impedans yöntemi kullanılarak mikroorganizma sayısı belirlenmiştir. (WHEELER ve GOLDSCHMIDT, 1975).

Gıda sanayiinde de üretimin olabildiğince basit, hızlı, doğru, tekrarlanabilir ve ekonomik yöntemlerle kontrol edilmesi gereği sonucu elektrik impedans yöntemi üzerinde yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. İlk kez 1980'li yılların başlarında gıda mikrobiyolojisi alanında başlayan çalışmalar henüz elektrik impedans yöntemini standart yöntemlerle kıyaslama ve kalibre etme aşamasındadır (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985).

ELEKTRİK İMPEDANS YÖNTEMİNİN PRENSİBİ

Elektrik impedans yönteminde mikrobiyal aktivite sonucu besi ortamının elektrik impedansında meydana gelen değişimler besiyeri ve gıda örneğinin bulunduğu modüllere yerleştirilen paslanmaz çelik elektrotlarla ölçülür. Besi ortamında mikrobiyal aktivite sonucu bazı metabolitler üretilmekte ve ortamın kimyasal bileşiminde meydana gelen bu değişim elektrik impedansı etkilemektedir. Mikrobiyal gelişme sırasında büyük moleküller daha küçük ve aktif moleküllere dönüşmekte, ortamdaki mikrobiyal gelişme belirli bir noktaya geldiğinde ise mikroorganizmaların ürettiği metabolitler nedeniyle ortamın elektrik impedansı belli bir değere ulaşmaktadır. İşte elektrik impedans yöntemi mikrobiyal gelişme sonucu elektrik impedansta meydana gelen değişimin ölçülebilir seviyeye ulaştığı noktayı saptama prensibine dayalı bir yöntemdir. Elektriksel değişimin ölçülebildiği bu nokta mikroorganizma sayısının saptanabilir düzeye ulaştığı dönüm noktasıdır (Şekil 1). Bu nokta baktometre tarafından saptama süresi (IDT= Impedance Detection Time) olarak kaydedilmektedir. IDT mikroorganizmaların bulunduğu ortamdaki üreme kinetiğinin ve başlangıçtaki mikroorganizma sayısının bir fonksiyonudur (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985; EASTER ve GIBSON, 1989). Şekil 2'de ise başlangıçtaki mikroorganizma sayısı ile IDT arasındaki ilişki görülmektedir.

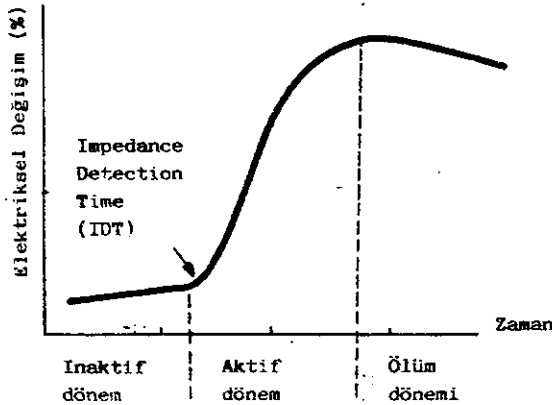
İMPEDANSIN BİLEŞENLERİ

İmpedans iletkenlik (conductance) ve kapasitans (capacitance) olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. Elektrik impedans yönteminde kullanılan besiyeri ve ilgili mikroorganizma ya da mikroorganizma gruplarına bağlı olarak toplam impedans ya da impedansın iki bileşeninden biri ölçülebilir. İmpedans ile iletkenlik ve kapasitans arasındaki ilişki aşağıdaki matematiksel eşitlikle ifade edilir (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985).

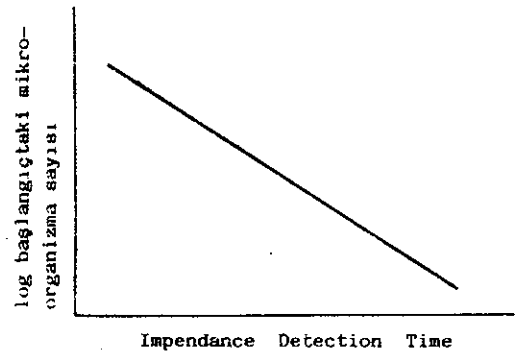
Elektrik impedans ölçümünde kullanılan bazı cihazlarda sisteme entegre edilen kompüterlerle toplam impedans, iletkenlik ve kapasitans ayrı ayrı saptanabilmekte ve kullanılan gıda ve besiyeri kombinasyonunda bu üç sinyalden en uygun olanı seçilerek sonuç alınabilmektedir. Nutrient Broth ve Plate Count Agar gibi iletkenliği düşük besiyerlerinde bakteriyel aktivite sonucu metabolik ürünlerin oluşması ile iletkenlikte saptanabilir düzeyde bir değişim söz konusu olmaktadır. Ancak kapasitansta meydana gelen değişimin iletkenlikte meydana gelen değişiminden büyük olduğu durumlarda mikrobiyal gelişmenin ölçütü olarak kapasitans kullanılır. Bazı mikroorganizmalar örneğin mayalar yükü fazla olan iyonlar üretmedikleri gibi genellikle iyonize olmayan metabolitler üreterek iletkenlikte minimum (değişim % 2), kapasitansta ise yüksek değişime (değişim % 20) neden olurlar. Bu nedenle elektrik impedans yönteminde maya gelişmesinin bir ölçütü olarak ya kapasitans ya da indirekt iletkenlik ölçümü kullanılmalıdır. Maya gelişmesinin söz konusu olduğu meyve suyu, domates salçası ve yoğurt gibi ürünlerde genellikle son yıllarda geliştirilen indirekt iletkenlik ölçümünde paslanmaz çelik elektrotlar mikrobiyal besi ortamına değil, ikinci bir kısımdaki alkali bir çözeltiye daldırılmaktadır. Bu yöntemde gelişme ortamında mikroorganizmalar tarafından üretilen CO₂ gazı elektrotların daldırıldığı alkali çözelti ile reaksiyona girmekte ve belirli bir süre sonra çözeltinin rezistansında ölçülebilir bir değişim meydana gelmektedir (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985).

$$Z = \sqrt{(1/G)^2 + \left(\frac{1}{2\pi fC}\right)^2}$$

Z= İmpedans G= İletkenlik
C= Kapasitans f= frekans



Şekil 1. Tipik Elektriksel iletkenlik eğrisi (EASTER ve GIBSON, 1989).



Şekil 2. Mikroorganizma sayısının logaritması ile impedance detection time arasındaki ilişki (EASTER ve GIBSON, 1989).

IMPEDANCE DETECTION TIME'İ (IDT) ETKİLEYEN FAKTÖRLER

IDT'nın impedans yönteminde kullanılan besiyeri, inkübasyon sıcaklığı ve elektrot tipi gibi fiziksel koşullardan ve mikrobiyal metabolizma, mikroorganizmaların başlangıçtaki konsantrasyonu ve jenerasyon süresi gibi bazı mikrobiyal faktörlerden etkilendiği saptanmıştır (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985).

Mikroorganizmaların jenerasyon süresi sıcaklıktan etkilenmekte dolayısıyla IDT da sıcaklıkla değişmektedir. Ayrıca impedansın bileşenleri iletkenlik ve kapasitans sıcaklığa bağımlı bileşenlerdir. Nitekim sıcaklıktaki 1°C'lik bir artış kapasitans % 0,9'luk, iletkenlikte ise % 1,8'lik bir artışa neden olmaktadır (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985). Ayrıca besiyerinin seyreltilme oranı ve konsantrasyonu elektrik impedans yönteminde elde edilen sonucu direkt olarak etkilemektedir. Seyreltik besiyeri kullanımı durumunda ortamın iyonik yükü az olacağı için yüksek elektriksel sinyaller alınabilmekte ancak besiyeri belirli bir değerden daha fazla seyreltilcek olursa ortamda besin ögesi azlığı nedeniyle mikrobiyal aktivite yavaşlayacağı için çok zayıf sinyaller alınmaktadır. IDT'ı etkileyen fiziksel faktörlerin bir diğeri ise elektrot tipi ve elektrotların yerleşim konfigürasyonudur. FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN (1985) yaptıkları çalışmalarında inokülasyon tüpünün dip kısmına yerleştirilen elektrot sisteminde, saptama süresinin tüpün üst kısmına yerleştirilen elektrot sistemine kıyasla daha kısa olduğunu belirlemişlerdir.

IDT'ı etkileyen diğer bir faktör başlangıçtaki mikroorganizma sayısıdır. Başlangıçtaki mikroorganizma sayısı ne kadar yüksekse IDT noktasının o kadar kısa sürede elde edildiği bildirilmektedir. Yine benzer şekilde mikroorganizmanın jenerasyon süresi ne kadar kısaysa mikroorganizmaların kısa sürede hızlı çoğalmasından dolayı IDI noktasına daha kısa sürede ulaşılacağı açıktır.

ÖLÇÜM CİHAZLARI

Elektrik impedans yönteminde kullanılan ve elektriksel değişimi ölçmek amacıyla üretilmiş iki tip cihaz mevcuttur. Bunlardan birincisi baktometre (Bactomatic Inc. Princetown, New Jersey) diğeri ise Malthus (Malthus Instruments, Crawley, Sussex) ölçüm cihazıdır (CONNOLY ve ARK., 1988; EASTER ve GIBSON, 1989).

Baktometre kompütür, printer ve inokülasyon kabini olmak üzere üç ayrı bölümden oluşmakta ve aynı anda 128 örnekte toplam impedans, kapasitans ve iletkenlik olmak üzere üç elektriksel değişimi de ölçebilmektedir. Malthus ölçüm cihazı ise iletkenlikteki değişimi ölçme prensibine dayalı bir cihaz olup, örnekler bu cihazda cam test tüpü ya da şişelere inoküle edilmektedir (CONNOLY ve ARK., 1988; EASTER ve GIBSON, 1989). Çizelge 1'de Baktometre ve Malthus ölçüm cihazları arasındaki farklar verilmiştir.

Çizelge 1. Baktometre ve Malthus ölçüm cihazları arasındaki farklar (EASTER ve GIBSON, 1989).

Özellik	Baktometre	Malthus
Sinyal	İmpedans (Z) İletkenlik (G) Kapasitans (C)	İletkenlik (G)
Frekans (KHz) (v)	2 (0,04)	10 (1)
Elektrot İnokülasyon	Paslanmaz çelik Her biri 16 kuyucuk içeren steril plastik modüllere yapılı.	Platin uçlu seramik Cam test tüpü veya şişelere yapılır.
İnokülüm Kapasitesi (ml)	2	2-10 ve 100
İnkübatör	Hava	Su banyosu
Sıcaklık kontrolü (°C)	+0,1	+0,002

ELEKTRİK İMPEDANS YÖNTEMİNİN AVANTAJLARI

Elektrik impedans yönteminin klasik yöntemlere kıyasla pek çok avantajı mevcuttur:

a- Elektrik impedans yöntemi standart plak sayım yöntemlerine kıyasla çok daha hızlı bir

yöntemdir. Mililitresinde 10^1 - 10^2 düzeyinde maya içeren bir örnekte klasik yöntemlerle sayım yapılması durumunda sonuç alınabilmesi için 5 günlük bir inkübasyon süresine ihtiyaç duyulurken elektrik impedans yönteminde 24-35 saatte sonuç alınabilmektedir. Ayrıca maya sayısının 10^4 /ml düzeyine çıkması durumunda ise bu süre bir kaç saate kadar inebilmektedir. Bakteriyel analizlerde de sonuca ulaşabilmek için 1-2 günlük inkübasyon süresine ihtiyaç varken elektrik impedans yöntemi uygulandığında bir kaç saatte sonuç alınabilmektedir (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985; FIRSTENBERG-EDEN, 1986).

b- Elektrik impedans yöntemi klasik sayım yöntemlerine kıyasla çok daha ekonomik bir yöntemdir. Bu yöntemde örnek klasik yöntemlere kıyasla çok daha az sayıda ön işleme tabi tutulmakta ve daha az besiyeri kullanılmaktadır (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985; FIRSTENBERG-EDEN, 1986).

c- Elektrik impedans cihazları kompütüre bağlı, kullanımı kolay ve pratik cihazlardır. Bir laboratuvar teknisyeni tarafından dahi kullanılabilir pratikliğe sahip bu yöntemde denemeyi yapan kişinin hata yapma olasılığı da minimuma indirilmektedir (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985; FIRSTENBERG-EDEN, 1986).

d- Elektrik impedans yöntemi ile aynı anda çok fazla sayıda örnek analize alınabilmektedir (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985; FIRSTENBERG-EDEN, 1986).

ELEKTRİK İMPEDANS YÖNTEMİNİN KULLANIM ALANLARI

Elektrik impedans yöntemi değişik amaçlarla kullanılabilir. İşletmeye gelen hammaddenin kalitesinin saptanmasında, işleme sırasında mikrobiyolojik kontrollerin yapılmasında, son ürünün mikrobiyolojik kontrolü ve raf ömrünün saptanmasında, işletmede uygulanan sanitasyonun değerlendirilmesinde kullanılabilir.

Bu güne kadar elektrik impedans yöntemi ile ilgili yapılan çalışmalarda bazı patojen mikroorganizmaların analizinde değişik seçici besiyerleri kullanılmış ve avantajlı olanların rutin kullanıma geçirilmesi amaçlanmıştır. BULLOCK ve FRODSHAM (1989) şekerlemelerde Salmonella ile ilgili yaptıkları çalışmalarında yağsız sütte ön zenginleştirme işleminin ardından Lysine-iron-cystine-neutral red broth (LICNR broth) kullanarak elektrik impedans yöntemini uygulamışlardır. Klasik yöntemle kıyasla 3 gün gibi daha kısa bir sürede daha sağlıklı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Yine deneme aşamasında olan besiyerlerinden biri PRENTICE ve NEAVES (1987)'nin *Staphylococcus aureus*'un saptanması amacıyla geliştirdikleri besiyeridir. Araştırmacılar süt tozunda yaptıkları çalışmalarında besiyerinin su aktivitesini düşürmek amacıyla gliserol ve NaCl ilave etmişler sonuçta iletkenlikte zayıf, buna karşın kapasitansta yüksek sinyaller elde ettiklerini bildirmişlerdir. Neaves ve arkadaşları ise süt tozunda fekal streptokokları saptamak amacıyla yaptıkları denemelerinde iletkenlik ölçümlerinden sağlıklı sonuçlar almışlardır (EASTER ve GIBSON, 1989).

Pek çok gıdada bozulmaya neden olan maya ve küflerle de ilgili elektrik impedans denemeleri yapılmaktadır. Ancak son yıllarda özellikle meyve sularında, yoğurtta ve şekerli tatlılarda maya sayımı ve bira sanayiinde sorun yaratan yabancı mayaların elektrik impedans yöntemi ile saptanması üzerine pek çok çalışma yapılmıştır (FIRSTENBERG-EDEN ve EDEN, 1985; CONNOLY ve ARK., 1988; HENSCHKE ve THOMAS, 1988).

Yine toplam canlı ve koliform bakteri sayımında yaygın olarak kullanılan elektrik impedans yöntemi özellikle süt ve süt ürünlerinde toplam canlı sayısının saptanmasında uzun süredir yapılan pek çok çalışma sonucunda rutin analizlere girebilecek düzeye ulaşmıştır (FIRSTENBERG-EDEN ve KLEIN, 1983; FIRSTENBERG-EDEN ve TRIÇARICO, 1983; BOSSUYT ve WAES, 1983; BISHOP ve ARK., 1984; FIRSTENBERG-EDEN, 1984; FIRSTENBERG-EDEN ve ARK., 1984; KAHN ve FIRSTENBERG-EDEN, 1987; NIEUWENHOF ve HOOLWERF, 1987; SENYK ve ARK., 1988; BYRNE ve ARK., 1989).

Bu nedenle elektrik impedans yöntemi bozulmaya neden olan mikroorganizmalar, indikatör mikroorganizmalar ve *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia enterocolitica* gibi kısa sürede saptanması gereken patojenlerin analizlerinde yakın gelecekte rutin olarak kullanılabilir klasik yöntemlere kıyasla çok daha pratik, hızlı ve kolay bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

- BISHOP, J.R.; WHITE, C.H. ve FIRSTENBERG-EDEN, R. 1984. Rapid impedimetric method for determining the potential shelf-life of pasteurized whole milk. *J. Food Prot.* 47: 471-475.
- BOUSSUYT, R.G. ve WAES, G.M. 1983. Impedance measurement to detect post-pasteurization contamination of pasteurized milk. *J. Food Prot.* 46: 622-624.
- BULLOCK, R.D. ve FRODSHAM, D. 1989. Rapid impedance detection of salmonellas in confectionery using modified LICNR broth. *J. of App. Bact.* 66: 385-391.
- BYRNE, R.D.; BISHOP, J.R. ve BOLING, J.W. 1989. Estimation of Potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing a selective preliminary Incubation. *J. of Food Protec.* 52: 805-807.
- CONOLLY, P., LEWIS, S.J. ve CORRY, J.E.L. 1988. A medium for the detection of yeasts using a conductimetric method. *International J. of Food Microbiol.* 7: 31-40.
- EASTER, M.C. ve GIBSON, D.M. 1989. Detection of microorganisms by electrical measurements (eds. M.R. Adams ve C.F.A. Hope.) *Rapid Methods in Food Microbiology* Vol. 26. Elsevier, Tokyo, 329 sayfa.
- FIRSTENBERG-EDEN, R. 1984. Collaborative study of the impedance method for examining raw milk samples. *J. Food Prot.* 47: 707-712.
- FIRSTENBERG-EDEN, R. 1986. Electrical impedance for determining microbial quality of foods (eds. M.D. Pierson ve N.J. Stern) *Foodborne Microorganisms and Their Toxin: Developing Methodology.* Marcel Dekker, Inc. New York.
- FIRSTENBERG-EDEN, R. ve KLEIN, C.S. 1983. Evaluation of a rapid impedimetric procedure for the quantitative estimation of coliforms. *J. of Food Sci.* 48: 1307-1311.
- FIRSTENBERG-EDEN, R. ve TRICARICO, K.K. 1983. Impedimetric determination of total, mesophilic and psychrotrophic counts in raw milk. *J. Food Sci.* 48: 1750-1754.
- FIRSTENBERG-EDEN, R. ve EDEN, G. 1985. *Impedance Microbiology.* Research Studies Press Ltd. England. 167 sayfa.
- FIRSTENBERG-EDEN, R.; VAN SISE, M.L.; ZINDULIS, J. ve KAHN, P. 1984. Indimetric estimation of coliforms in dairy products. *J. of Food Sci.* 49: 1449-1452.
- FIRSTENBERG-EDEN, R. ve ZINDULIS, J. 1984. Electrochemical changes in media due to microbial growth. *J. Microbiol. Methods.* 2: 103-115.
- HENSCHKE, P.A. ve THOMAS, D.S. 1988. Detection of wine-spoiling yeasts by electronic methods. *J. of App. Bact.* 64: 123-133.
- KAHN, P. ve FIRSTENBERG-EDEN, R. 1987. Prediction of shelf-life of pasteurized milk and other fluid dairy products in 48 hours. *J. Dairy Sci.* 70: 1544-1550.
- NIEUWENHOF, F.F.J. ve HOOLWERF, J.D. 1987. Impedance measurement as an alternative to the plate count method for estimating the total count of bacteria in raw milk. *J. Food Prot.* 50: 665-668.
- PRENTICE, G.A. ve NEAVES, P. 1987. V. International Symposium on Rapid Method and Automation in Microbiology and Immunology, Florence. 395 sayfa
- SENYK, G.F.; GOODALL, C.; KOZLOWSKI, S.M.; BANDLER, D.K. 1988. Selection of tests for monitoring the Bacteriological Quality of Refrigerated Raw Milk Samples. *J. Food Prot.* 71: 613-619.
- WHEELER, T.G. ve GOLDSCHMIDT, M.C. 1975. Determination of bacterial cell concentration by electrical measurements. *J. Clin. Microbiol.* 1: 25-29.