

## 2.4 Başlangıç Süspansiyonu ve İlave Dilüsyonlar

Laboratuvarın ve analize alınacak alt örneğin kontaminasyon riskini azaltmak amacı ile dehidre toz ürünlerin başlangıç süspansiyonu ayrı bir odada veya koruyucu kabin içinde hazırlanmalıdır. Patojen mikroorganizma içermesi muhtemel örneklerin başlangıç süspansiyonu biyogüvenlik kabini içinde hazırlanmalıdır. Örneklerin ambalajları açılmadan önce, ambalajın açılacağı kısım %70' lik etil alkol ile silinmeli ve alkolün buharlaşması için bir süre beklenmelidir. Steril ürünlerin paketleri açılmadan önce paketin açılacağı kısım en az 10 d süreyle 100-200 mg/L serbest klor çözeltisine daldırılmalıdır. Örneklerin ambalajlarının açılmasında ve analiz için kullanılacak alt örneğin alınmasında kullanılan makas, bıçak ve pens benzeri tüm ekipman steril olmalıdır. Kullanılmış ekipman uygun nitelikte kaplara alınmalıdır. Küçük boyutlu ve korozyona dayanıklı ekipman çalışma esnasında kullanıldıktan sonra içinde yeni hazırlanmış dezenfektan solüsyonu olan kaplara alınabilir.

### 2.4.1 Analiz alt örneği

Analiz alt örneğinin alınmasında en önemli husus, örneğin bütünü temsil etmesidir. Bu nedenle örnek mümkün olduğunca homojen hale getirilmelidir. Sıvı örnekler, analiz alt örneği alınmadan önce çalkalanarak homojenize edilmelidirler. Sert ve kuru örnekler steril blender kapları içinde homojenize edilebilir. Ancak homojenizasyon süresi **2,5 dakikayı** aşmamalıdır. Bazı sert ve kuru örneklerin öğütülmesi ve kıyılması gerekebilir, bu durumda öğütme ve kıyım işlemi örneğin sıcaklığının kayda değer oranda artmasına engel olarak **1 dakika** içinde gerçekleştirilmelidir. Farklı tipte bileşenlerden oluşan heterojen yapıdaki örneklerin (Ör., yaş pasta; kek ve krema) analiz alt örneği tüm bileşenleri temsil etmelidir. Heterojen yapıdaki örnekler için, alternatif olarak örneğin tamamı homojenize edildikten sonra analiz alt örneğinin alınabilir. Bu durumda yukarıda verilen homojenizasyon süreleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Yumurta örneklerinin yalnızca içeriğinin analiz edileceği durumlarda kabuk isopropanol alkol ile silinmeli ve kontamine olmadan kurutulmalıdır. Sonrasında yumurta kabuğu steril eldiven kullanılarak kırılarak yumurta içeriği steril bir kap içine alınmalıdır.

Başlangıç süspansiyonu takip edilen metot ile aksi belirtilmedikçe **en az 10 g** veya **10 mL** analiz alt örneği ile hazırlanmalıdır. Analiz alt örneği uygun dilüent içinde 1/10 oranında homojenize edilmelidir. Polisakkaritler gibi oldukça hidrofilik ve su içinde şişen örneklerin başlangıç süspansiyonu 1/10 yerine 1/20 veya 1/100 oranında hazırlanabilir. Baharatlar gibi bazı gıda örneklerinin sahip oldukları antimikrobiyal etkinliğin azaltılması için başlangıç süspansiyonlarının 1/10 yerine 1/100 veya 1/1000 oranında hazırlanması tavsiye edilmektedir. Yumurta beyazı analiz edileceği takdirde örnekte doğal olarak bulunan lizozimin antibakteriyel etkisini azaltmak için 1/40 dilüsyon oranı tercih edilebilir.

### 2.4.2 Dilüentler

Gıda mikrobiyolojisinde birçok kaynakta genel amaçlı tavsiye edilen dilüent **%0,1** oranında pepton ve **%0,85** oranında NaCl içeren ve **Peptone Salt Diluent** veya **Maximum Recovery Diluent** olarak isimlendirilen dilüenttir. ISO standartlarında Maximum Recovery Diluent' e ilave olarak **Buffered Peptone Water** genel amaçlı dilüent olarak tanımlanmıştır. FDA Bacteriological Analytical Manual' de ise genel amaçlı dilüent olarak **Butterfield's phosphate-buffered water** tanımlanmıştır. Bu üç dilüent gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında genel amaçlı dilüent olarak kullanılabilir. Bazı kaynaklarda peynir ve fermente süt örneklerinin başlangıç süspansiyonunun hazırlanmasında pH' sı 7,5' e ayarlanmış Dipotasyum hidrojen fosfat solüsyonunun (20g/L) dilüent olarak kullanılması tavsiye edilmektedir.

Mikroorganizmaların termal şoka maruz kalmaması için dilüentler başlangıç süspansiyonunun hazırlanmasından önce oda sıcaklığına getirilmelidir. Bununla birlikte yağ oranı yüksek örneklerin homojenizasyonunu kolaylaştırmak için dilüent 45°C' a kadar ısıtılabilir.

Asidik gıda örneklerinin başlangıç süspansiyonları pH indikatörü içeren bir dilüent içinde hazırlanmalı ve pH 0,1 veya 1 N steril NaOH ile nötral değerlere getirilmelidir. Bu amaçla otoklav öncesinde 1 L dilüente 0,1 mL Bromocresol purple alkolik solüsyonu (%0,04) ilave edilebilir.

Yüksek yağ içeren gıda örneklerinin başlangıç süspansiyonları emülsifikasyonu arttırmak amacıyla Tween 80 içeren dilüentler içinde hazırlanabilir. Bu amaçla otoklav öncesinde 1 L dilüente örnekteki yağ oranına bağlı olarak 1g-10 g arasında (Örneğin yağ oranı %40 olan bir örnek için 4g) Tween 80 ilave edilebilir.

### 2.4.3 Başlangıç Süspansiyonunun Homojenizasyonu

Başlangıç süspansiyonunun homojenizasyonu ve mikroorganizmaların analiz alt örneğinden dilüent içinde serbest kalması amacıyla 1970' li yılların ortalarına kadar Waring tip mekanik blenderler kullanılmaktaydı. Sonraki yıllarda blenderlerin yerini plastik bir torba içindeki başlangıç süspansiyonun iki pedalın güçlü vuruşları ile homojenize edilmesi prensibine dayalı **Stomacher** cihazları almıştır. Bu cihazların blenderlere nazaran avantajları homojenizasyon esnasında sıcaklık artışına neden olmamaları, steril ve tek kullanımlık plastik torbaları sayesinde kullanım kolaylığı sağlamaları ve homojenize edilen örneğin plastik torba içinde muhafaza ve inkübe edilebilmesidir. Stomacher ile homojenizasyon süresinin **3** dakikayı aşması önerilmemektedir.

Başlangıç süspansiyonunun homojenizasyonu için bir diğer alternatif ise **Pulsifier** isimli cihazdır. Pulsifier oluşturduğu yüksek seviyede türbülans sayesinde mikroorganizmaların analiz alt örneğinden serbest kalmasını sağlamaktadır. Pulsifier'in Stomacher' e nazaran sert gıdaların homojenizasyonunda plastik torba delinme riskinin olmaması, daha berrak bir süspansiyon elde edilmesi ve homojenizasyon için gerekli sürenin kısa olması gibi avantajları vardır.

### 2.4.5 İlave Ondalık Dilüsyonlar

Örnekteki beklenen hedef mikroorganizma sayısına bağlı olarak ilave ondalık dilüsyonların hazırlanması gerekebilir. 1/100' lük dilüsyon başlangıç süspansiyonundan alınan 1 mL' nin tüpte bulunan 9 mL dilüent içinde vorteks yardımı ile **5-10** saniye homojenize edilmesi ile hazırlanır. Aynı şekilde 1/100' lük dilüsyon kullanılarak 1/1000' lik dilüsyon hazırlanabilir ve aynı işlem tekrar edilerek dilüsyon oranı arttırılabilir. Dilüsyonların hazırlanmasında steril pipet kullanılmalı ve pipet başlangıç süspansiyonu içine 1 cm' den daha fazla daldırılmamalıdır. Pipet ve steril dilüentin temasından kaçınılmalıdır.

Başlangıç süspansiyonunun hazırlanması ve besiyerine inokülasyonu arasında geçen süre **45** dakikayı, başlangıç süspansiyonunun hazırlanması ve ileri ondalık dilüsyonların hazırlanması arasındaki geçen süre ise **30** dakikayı aşmamalıdır.



- ✓ Kolay temizlenir
- ✓ Hafif
- ✓ Bakım gerektirmez
- ✓ Sert gıdaların homojenizasyonunda torba delinme riski yok
- ✓ Filtreli torbaya ihtiyaç bırakmayan homojenizasyon teknolojisi

