

05. Örnek Alma, Homojenizasyon ve Seyreltme ¹

05.01. Örnek Alma

- 05.01.01. Örnek Miktarı
- 05.01.02. 2 ve 3 Sınıflı Planlar
- 05.01.03. Örneğin Laboratuvara Getirilmesi ve Kabulü
- 05.01.04. Örneğin Açılması

05.02. Homojenizasyon

- 05.02.01. Homojenizatörler
- 05.02.02. Homojenizasyon ve Seyreltme Çözeltileri
- 05.02.03. Homojenizasyon ve Seyreltme İşlemi

05.01. Örnek Alma

Gıdalardan mikrobiyolojik analiz için örnek almak ve bunu "örnek alındığı andaki mikrobiyolojik kriterleri tümüyle koruyarak" laboratuvara getirmek oldukça zordur. Numunenin hangi miktarda ve kaç adet alınacağı, laboratuvara getirilmesi, açılması ve ekim için hazırlık gibi konular üzerinde titizlikle durulmalıdır.

05.01.01. Örnek Miktarı

Pek çok ulusal ve uluslararası standart, analiz edilecek gıda miktarını 10 g (mL) olarak verir. Bu değer sadece sayım yapılacak analizler için geçerlidir. Patojenler genellikle 25 gram gıdada var/yok testi ile analiz edilir.

Analize alınacak örnek miktarı doğrudan gıdanın çeşidi ile de ilgilidir. Pastörize sütte 10 mL örnek alınıp, bunun 1 mL'si koliform analizi için VRB Agar'a ekilebilir. Sucukta ise mutlaka homojenizasyon yapılmak zorundadır. Laboratuvar tipi standart bir blender kullanılıyor ise 10 gram sucuk + 90 mL homojenizasyon çözeltisi yeterli değildir, blender bu düşük miktarı homojenize edemez. Dolayısı ile yaygın kullanılan şekli ile 25 gram sucuk + 225 mL homojenizasyon çözeltisidir.

Standart bir analizde 10 g örnek yeterli olmakla birlikte, yukarıda belirtildiği gibi özel homojenizasyon gereksinimleri uyarınca, ilave her patojen testi için genellikle 25 g gıda maddesi gerekir. Buna göre toplam bakteri, koliform grup bakteriler, maya ve küf ile stafilokok için 10 g, *Salmonella* ve *Listeria* analizi için her birinden 25 g olmak üzere en az 60 g numunenin laboratuvara getirilmesi gerekir.

Bir örnekten kaç adet alınması gerektiği çoğu kez kavram karışıklığına neden olmaktadır. Gıda endüstrisinde yapılan günlük kontrollerde sadece 1 numune genellikle yeterlidir.

İşletme isterse her partiden 2, 3, 6 gibi dilediği sayıda örnek ile çalışabilir. Bununla beraber, kamu tarafından yapılan denetlemelerde 5 örnek ile çalışılma zorunluluğu vardır. Bunun nedeni, kamunun, analiz ettiği gıdayı, gıda yasalarına uyup uymadığı açısından

¹ www.mikrobiyoloji.org ana sayfasında görülen Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları; "Anonymous, 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa." adlı kitabın 05. bölümüdür.

denetlemesidir. Ulusal ve uluslararası pek çok gıda yasasında bu koşul açıkça belirtilir. Ulusal ya da uluslararası ticarete bu sayı farklı olarak alınabilir.

Alınan örnek sayısının ilgili partiyi temsil etmesi ayrı bir sorundur ve genellikle partinin ne kadar homojen olduğu ile de yakından ilişkilidir. Bir süt tankerinin altından ya da üstünden alınan örneklerde farklı mikroorganizma sayıları çıkması beklenebilir.

Tankerden örnek alımı öncesinde mutlak bir homojenizasyon beklenemez. Karkas örneklerinde toplam bakteri sayılması için örnek miktarı 10 gram olarak tanımlanıyorsa, karkasın yüzeyinden doğru ince bir şerit halinde alınan örnek ile dar bir et sondası ile gövdenin içine doğru girilip, alınan örnek arasında farklı sonuçlar bulunması doğaldır. Bu gibi homojen olmayan kütlelerden örnek alım yöntemi, ilgili talimatlarda açık bir şekilde belirtilmelidir.

Büyük ambalajlara (250 kg, 1 ton vb.) aseptik dolum yapılan salça, meyve suyu konsantresi gibi örneklerde, ticari değer açısından örnek alımı farklı bir şekilde yapılır. Bu uygulamada aynı dolum başlığından örnek torbası olarak tanımlanan 2–3 kg ambalajlara örnek alınır ve analiz bu ambalajda yapılır.

Bu gibi ayrıntılar nedeni ile, özellikle gıda işletmelerinde yapılacak analizlerde alınacak numunenin partiyi ne ölçüde temsil ettiği incelenmelidir ve olabildiğince rasgele örnek alınması sağlanmalıdır.

Örnek sayısı ile ilgili genel kurallar aşağıda özetlenmiştir:

- Çocuklar, yaşlılar, hamileler ve hastalar için hazırlanan gıdalardan daha fazla örnek alınmalıdır.
- Analizi sırasında homojenizasyon sorunu olan gıdalardan (örneğin fındık ezmesi) daha fazla sayıda numune alınmalıdır.
- Ambalaj boyutu küçüldükçe daha çok sayıda örnek alınmalıdır.
- Büyük ambalajlar ile dökme ve yığın ürünlerden kompozit örnekler hazırlanmalıdır.
- Çabuk bozulabilen gıdalardan daha çok örnek alınmalıdır.
- Salmonella*, *Listeria* vb. patojen riski yüksek olan gıdalardan daha çok örnek alınmalıdır.
- Alınacak örnek sayısı uygulanan teknolojiye bağlıdır. Basit teknoloji uygulayan işletmelerde modern olanlara göre daha çok numune alınması gerekir.
- Ürünün pazar payı ile doğru orantılı olarak örnek alınmalıdır.

05.01.02. 2 ve 3 Sınıflı Planlar

Genel olarak n, c, m ve M olarak tanımlanan değerler ile yapılan örnekleme planlarından 2 sınıflı olanda sadece n, c ve m değerleri dikkate alınır.

2 sınıflı planlama genellikle patojenlere yönelik olarak var/yok testlerinde kullanılır ve çoğunlukla 20, 30 gibi "n" değerleri ile ifade edilir.

3 sınıflı planlar, sayıma yönelik testlerde ve var/yok analizlerinde kullanılır. Günlük uygulamada özellikle kamu tarafından yapılan kontrollerde yaygın kullanılan plan budur.

Pek çok yerde analizi yapılan gıdada yasal olarak bulunmasına izin verilen mikroorganizma sınırı n, c, m, M ile gösterilir. Burada;

n: Analize alınacak örnek sayısı,

c: M değeri taşıyabilecek en fazla örnek sayısı,

m: (n – c) sayıdaki örnekte bulunabilecek en fazla değer,

M: c sayıdaki örnekte bulunabilecek en fazla değer olarak tanımlanır.

Aşağıda, bu konuda örnekler verilmiştir:

n= 5; c= 2; m= 5.000; M= 50.000 ise;

-5 (n) adet örnekten 2 adedinde (c) mikroorganizma sayısı en fazla 50.000 (M) olabilir.

-5 örnekten (n) geriye kalan 3 adedinde (n-c) mikroorganizma sayısı en fazla 5.000 (m) olabilir.

-5 örnekten (n) biri 50.000 değerini (M) geçerse parti reddedilir.

-5 örnekten 3 ya da daha fazlasında 5.000 (m) değeri geçilirse yine parti reddedilir. Çünkü, c= 2 olması gerekirken bu durumda 3 ya da daha fazla sonuç elde edilmiş olacaktır. Bu örnek genellikle toplam bakteri gibi genel kalite kriteri olan analizler için verilmiştir.

n= 5; c= 1; m= 0; M= 9 ise;

5 (n) adet örnekten sadece 1 (c) adedinde en fazla 9 (M) mikroorganizmaya izin verilir ancak diğer sayımlar 0 olmalıdır. Bu sayının herhangi bir ya da daha fazla örnekte 9'dan fazla olması ve/veya 2 ya da daha çok örnekte 1–9 arasında olması halinde parti reddedilir. Bu örnek genellikle koliformlar gibi hijyen indikatörü analizleri için verilmiştir.

n= 5; c= 0; m= 0; M= 0 ise;

5 adet (n) örneğin hiçbirinde aranan mikroorganizma bulunmamalıdır. Sayı önemli değildir, bir ya da daha fazla örnek pozitif olarak değerlendirilirse parti reddedilir. Bu örnek genellikle *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 serotipi gibi patojenlerin analizi için verilmiştir.

05.01.03. Örneğin Laboratuvara Getirilmesi ve Kabulü

İşletmeden alınan örnek, mümkün olan en kısa süre içinde ve örnekteki mikroorganizma sayısını artıracak ya da azaltacak koşullardan tümüyle arındırılmış olarak laboratuvara getirilmeli ve analize alınmalıdır.

Steril, kuru ve nem geçirmeyen ambalajlardakiler gibi mikrobiyel yönden stabil ürünlerde, taşıma sırasında soğutmaya gerek yoktur. Buna karşın işlem görmemiş, soğutulmuş, pastörize edilmiş, bozulmuş vb. gıdalar 0 °C ile +4 °C arasında, dondurulmuş ürünler ise –18 °C'da taşınmalı, bombaj yapmış (veya bombaj tehlikesi olanlar) olası patlamalara ve sızıntılara karşı ayrıca ambalajlanarak laboratuvara getirilmelidir.

İşletme içinde prosesin çeşitli aşamalarında alınacak örneklerin aseptik koşullar altında ve steril ambalajlara alınması deneyim gerektirir.

Öncelikle, laboratuvar tarafından analize alınmak üzere numune kabul edilmelidir. Bu kabul için laboratuvar personeli, numunenin laboratuvara gereken koşullarda getirilip getirilmediğini kontrol etmeli, eğer standart koşullarda getirildiğine emin olursa numuneyi analiz için kabul etmeli, aksi halde ya kabul etmemeli ya da kabul formuna bununla ilgili tüm olumsuzlukları yazmalıdır.

Gerek kamu kontrol kuruluşlarının gerek gıda endüstrisindeki bir otokontrol laboratuvarının gerek özel bir gıda analiz laboratuvarının analiz için getirilen numuneyi kabul etmeme hakkı vardır.

Laboratuvara gelen ve kabul edilen örnek için, laboratuvarın özelliğine göre kabul tarihi, kabul saati, ürün ile ilgili tüm bilgiler (üretim tarihi, ambalaj özellikleri, parti numarası, vardiya numarası, numunenin alındığı saat, gerekli ise örnek alım sıcaklığı, laboratuvara giriş sıcaklığı vb.) kayda alınmalıdır.

Bombaj yapmış ambalajlar açılırken laboratuvar kazasına karşı dikkatli olunmalı, açım sırasında personel zarar görmemelidir. Kalın bir torba içine konulan bombajlı örnek, torbaya el sokularak açılır. Bu şekilde, eğer patlama olursa laboratuvarın kontaminasyonu önlenmiş olur. Laboratuvarın bombaj nedeni ile önceden patlamış, sızıntı olmuş örneği kabul etmeme hakkı vardır ya da bu durum raporda belirtilir.

Sıcaklık ölçümü yapılacak ise önceden soğutulmuş termometre kullanılmalıdır. Önceden soğutma, elektronik ve dijital termometreler için gerekli değildir.

Dondurulmuş sıvı ürünler mikrobiyolojik veya somatik hücre analizi için kabul edilmez. Eğer kimyasal testler de yapılacak ise, öncelikle mikrobiyolojik analiz için alt örnekler ayrılmalıdır.

05.01.04. Örneğin Açılması

Analiz için gelen örnek mümkün olan en kısa süre içinde analize alınmalıdır. Analiz için bir süre beklemek zorunluluğu varsa;

- Mikrobiyolojik olarak stabil olan ürünler son kullanma tarihinden önce ve elden geldiği kadar çabuk olarak analize alınmalıdır.

- Taze ve soğutulmuş ürünler kabulden sonra 24 saat içinde analize alınmalıdır. Daha uzun bir depolama süresi kaçınılmaz ise, ürün derhal dondurulmalı ve -18 °C'ın altında depolanmalıdır. Dondurma işlemi ürünlerdeki mikrobiyel florayı etkileyeceği için, bu durum analiz raporunda açıkça belirtilmelidir. *Cl. perfringens* gibi bazı mikroorganizmalar dondurma işleminden çok fazla etkilenir. Buna göre, analiz öncesinde dondurulmuş taze ürünlerde *Cl. perfringens* analizi yapmanın gereği yoktur.

- Dondurulmuş ürünler +4 °C buzdolabı sıcaklığında çözündürülmelidir. Bu işlemde büyük porsiyonlar halindeki ürünlerin çözülmesinin küçük porsiyonlu olanlara göre daha uzun süre alacağı, çözündürme süresi içinde psikrofil bakterilerin gelişebileceği gözden uzak tutulmamalı, dolayısıyla gıda olanaklar ölçüsünde 50 gramdan fazla olmayacak porsiyonlar halinde dondurulmalıdır. Eğer örnek önceden tartılarak dondurulduysa, doğrudan homojenizasyon çözeltisine aktararak çözündürülebilir.

- Pastörize ve benzeri ürünler son kullanma tarihinden önce ve elden geldiği kadar çabuk analize alınmalıdır.

- Dondurulmuş ürün analiz amacıyla çözündürüldü ise analiz ertelenemez.

Laboratuvara gelen ve kabul edilen numunenin paraleli analiz bitinceye kadar ürün özellikleri değişmeyecek şekilde şahit olarak korunmalıdır.

Kapalı ambalaj (tüketici ambalajı veya laboratuvar analiz ambalajı) ile laboratuvara getirilen örnekler mikrobiyolojik analize alındığında, numunenin çevreden, çevrenin de numuneden kontamine olması önlenmelidir. Bu konuda standart laboratuvar kurallarına uyulmalıdır.

Kapalı ambalaj açılmadan önce, açılacak yer ve çevresi %76 (v/v) alkol ya da uygun bir diğer kimyasal ile dezenfekte edilmeli ve ambalaj uygun ise ayrıca alevden geçirilmelidir.

Alevden geçirilemeyecek (kâğıt vb.) ambalajlarda kimyasal dezenfeksiyondan sonra dezenfektan steril su ile silinerek uzaklaştırılmalı, dezenfektan hiçbir şekilde gıda örneğine karışmamalıdır. Aksi halde sahte negatif sonuç alınabilir. Açımında kullanılacak makas, konserve açacağı, şişe açacağı, bisturi vb. materyal önceden uygun bir ambalaja (kâğıt, mutfak tipi alüminyum folyo) sarılarak etüvde ya da otoklavda sterilize ya da dezenfekte edilmiş olmalıdır.

Analiz amacı ile ambalaj açıldıktan sonra analiz, elektrik kesintisi gibi zorunlu haller dışında ertelenmemelidir. Böyle bir zorunluluk halinde analizin ertelenmesi gerekiyorsa ambalaj tekrar kapatılmamalı, analize alınacak gıda, laboratuvarında her an bulunması gereken steril bir kaba aktararak korunmalıdır.

Sıvı örnekler doğrudan analize alınabilir. Katı gıdalar ise tartım, homojenizasyon vb. gibi ön işlemlerden geçmek zorundadır.

Katı örneklerde belirli bir ağırlığın (10 g, 25 g vb.) tartılması aseptik koşullar altında yapılmalıdır. Dikey tip ekim kabini içinde tartım yapılması en sağlıklı yöntemdir. Tartımın yapılacağı kap önceden sterilize edilmiş, seyreltme veya *Salmonella* 'da olduğu gibi ön zenginleştirme besiyerini rahatlıkla alabilecek boyutta olmalıdır.

Katı gıda maddesi tartım sırasında sorun çıkaracak büyüklükte ve nitelikte parçalardan oluşuyor ise, tartımdan önce uygun boyutlara parçalanmalıdır.

Terazi üzerine gereksiz ağırlık konulmasının sakıncalı olması ve eğer istenilen ağırlıktan daha fazla parça aktarıldı ise bunun geri alınmasındaki zorluk nedenleri ile, prensip olarak tartımlar erlen, beher gibi kaplara değil, steril saat camı, steril Petri kutusu, steril alüminyum folyo gibi materyalde yapıp, tartılmış örnek daha sonra içinde besiyeri olan erlene, blendere ya da stomachere alınmalıdır.

Tartım sırasında numunenin hedeflenen ağırlığa kesin olarak getirilmesini sağlamak amacı ile kontaminasyon riskini artıracak düzeyde uğraşmamalıdır. Bu konuda deneyim önemlidir. Bazı gıdaların (örneğin parça et) önceden küçültülmüş olsa da tam olarak 10,0 gram tartılması hayli zordur. Böyle durumlarda tartım hatası seyreltme sıvısı miktarının değiştirilmesi ile ortadan kaldırılır. Standart çalışmada 10 gram gıda üzerine 90 mL seyreltme sıvısı konulmalıdır. Tartım sonucunda gıda 10,5 gram olarak tartıldı ise, seyreltme sıvısı 90 mL yerine 94,5 mL olarak alınır ve yine standart 1:10 oranı elde edilir. 90 mL olarak hazırlanmış seyreltme sıvısının üzerine pipet ile 4,5 mL steril (yedek) seyreltme sıvısı eklemek, gıdayı tam olarak 10,0 gram olarak tartmaktan çok daha kolay ve hızlıdır. Ayrıca tartım sırasında kontaminasyon olasılığı azaltılmış olur.

Bu uygulamanın hedeflenen ağırlıkta daha fazla tartımlar için geçerli olduğu ve elden geldiğince %5'ten daha fazla tartım yapılmaması gerektiği unutulmamalıdır. *Salmonella* vb. mikroorganizmaların var/yok testlerinde 25 g yerine 26 g tartıldı ise, 225 mL ön zenginleştirme besiyeri kullanmak yerine 234 (= 225 + 9) mL besiyeri kullanmak zorunlu

koşul değildir. Çünkü burada yapılan, 25 g gıda + 225 mL besiyeri kullanımı bir seyreltme değil, genel olarak 1 gram gıda için 9 mL besiyeri kullanılmasıdır. Bu konuda $\pm\%5$ tolerans her zaman kabul edilir. Bu örnekteki sapma sadece $\%4$ 'tür.

Burada verilen genel kurallar ile bir sonraki bölümde verilen açıklamalar, başta ISO 7218, ISO 6887 ve FDA olmak üzere uluslararası kontrol kuruluşlarından derlenmiştir. Bunlardan, "ISO 7218 TS 7894 sayılı Gıda ve Hayvan Yemlerinin Mikrobiyolojisi- Mikrobiyolojik Muayeneler İçin Genel Kurallar" ve "ISO 6887 TS 6235 sayılı Gıda ve Hayvan Yemleri Mikrobiyolojisi- Deney Numunelerinin Başlangıç Süspansiyonunun ve Ondalık Seyreltilerinin Hazırlanması İçin Genel Kurallar" adlı yayınlar, Türk Standartları Enstitüsü'nden sağlanmalı ve Türkçe kaynak olarak laboratuvarında bulundurulmalıdır.

05.02. Homojenizasyon

Genellikle katı ve yarı katı gıdaların bir homojenizasyon çözeltisi içinde homojen hale getirilme işlemidir. Sıvı gıdalar zaten homojen bir dağılım gösterir. Burada homojenlikten kasıt, gıdadaki mikroorganizmaların analiz yapılacak tüm kütleye homojen olarak dağıtılmasıdır.

Homojenizasyon işlemi ister sayım, ister var/yok testleri amacıyla kullanılsın, genel olarak 1:9 oranında yapılır. Buna göre 1 kısım gıda 9 kısım çözelti ile homojenize edilir. Var/yok testlerinde ise, 1 kısım gıda 9 kısım besiyeri ile homojenizasyon işlemine alınır. Sayım yapılacak ise 1:9 oranında homojenizasyon, aynı zamanda 10^{-1} seyreltme olarak da kullanılır. Bu nedenle homojenizasyonda gıda ve homojenizasyon çözeltisinin miktarına özen gösterilmelidir.

Seyreltme işlemi ise genellikle katı besiyerinde koloni sayımı ve EMS yöntemi ile sayım gibi analizlerde uygulanmaktadır (bakınız; 06. ve 07. Bölüm). Basit bir örnek ile, analiz edilecek katı gıdada 10^5 kob/g düzeyinde toplam bakteri tahmin ediliyorsa (ya da standart bu sayıya izin veriyorsa) homojenizasyon ile 10^{-1} seyrelti elde edilir. Buradan bir Petri kutusuna 1 mL aktarılıp, üzerine agarlı besiyeri dökülürse inkübasyon sonunda 10.000 koloni oluşacaktır ve 9 cm çaplı Petri kutusunda bunun sayılması mümkün değildir. Yayma yöntemi ile sayımda ise, Petri kutusuna 0,1 mL homojenizat (10^{-1} seyrelti) aktarıldığında oluşacak koloni sayısı 1.000 adettir ve bu, halen sayılamayacak kadar yüksek bir değerdir.

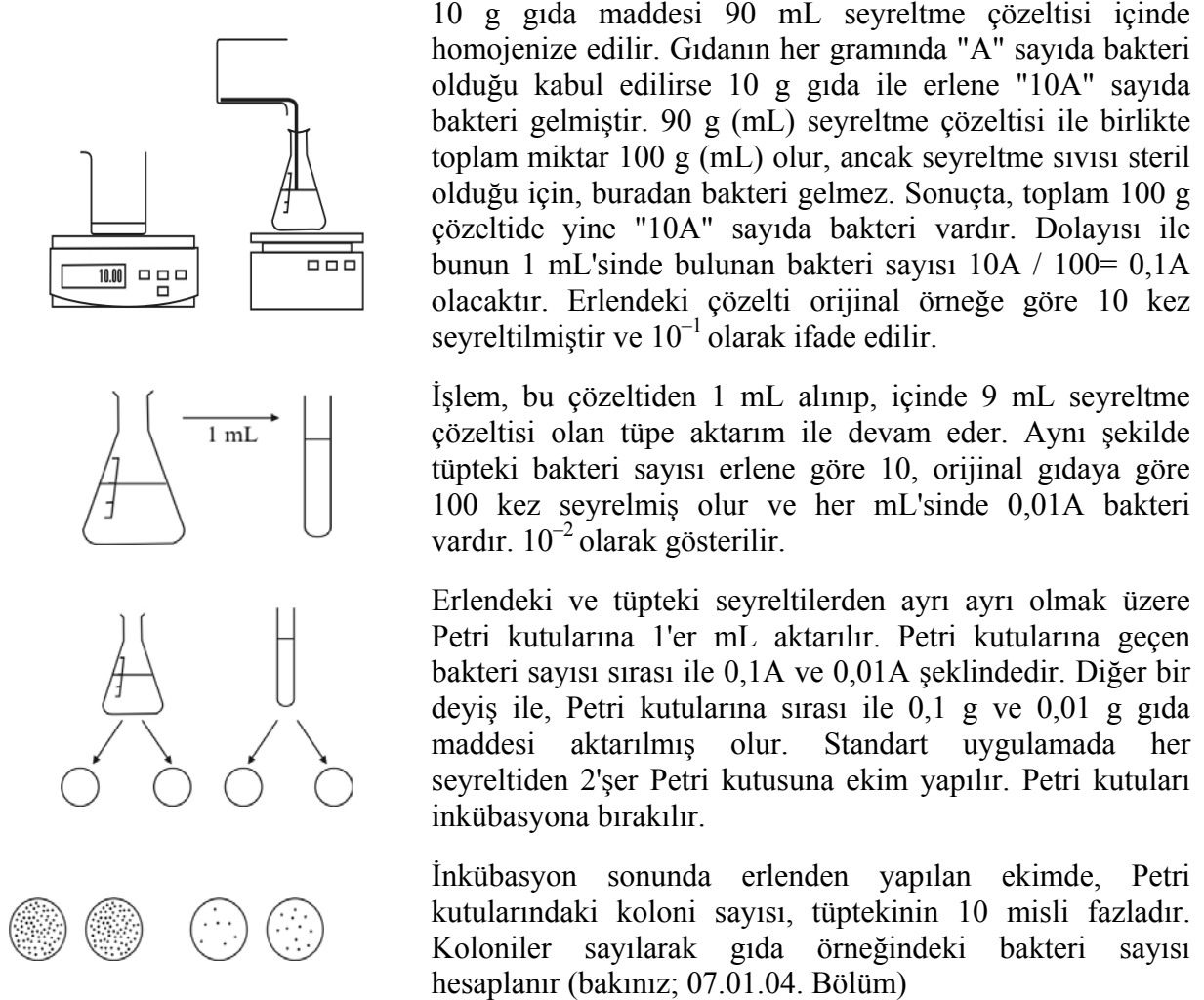
İdeal olarak Petri kutusunda 100 koloni gelişmesi istenir. Bu durumda dökme yöntemi ile çalışılacaksa seyreltmenin 10^{-3} düzeyine kadar gitmesi gerekir. Bu seyreltiden 1 mL alındığında aslında, orijinal örnekten 0,001 g gıda maddesi Petri kutusuna homojen bir şekilde aktarılmış olur. Buna göre 1 g gıdada 100.000 bakteri varsa, 0,001 gramında 100 bakteri olacaktır. Kuşkusuz, bu işlem tersinden gidilerek uygulanır. Amaç, analiz edilen gıdadaki mikroorganizma sayısını öğrenmektir. 1000 kez seyreltilmiş örnekten yapılan analizde 85 koloni varsa, orijinal gıdada bulunan sayı basit orantı ile 85.000 kob/g olarak hesaplanır.

E. coli O157:H7 analizi sırasında zenginleştirme kültüründen katı besiyerine ekim yapılırken de seyreltme uygulanır. Burada amaç, Petri kutusunda rahatlıkla izole edilecek kolonileri elde etmektir.

Seyreltme tekniği ve gerekliliği aşağıda şematik olarak özetlenmiştir.

Sıvı gıdadan Petri kutularında sayılabilecek kadar koloni gelişmesi bekleniyor ise homojenizasyon yapılmadan doğrudan ekim yapılır. Çiğ süt gibi yüksek sayıda bakteri olan ürünlerde seyreltme zorunludur (bakınız; 06.01.01. Bölüm).

Şekil 08. Seyreltme Tekniği ile Ekim



05.02.01. Homojenizatörler

Analiz edilecek gıdaya ve laboratuvar olanaklarına göre blender ya da stomacher kullanılmalıdır. Blender, mutfak tiplerinde olduğu gibi dönen bıçakları ile katı gıdayı kullanılan çözelti içinde homojen hale getirir.

Stomacher ise özel torbaları içinde pedalları sayesinde bir anlamda gıdayı ezerek homojenizasyon sağlar.

Ketçap ve yoğurt gibi yarı katı gıdaların analizinde homojenizatör olarak manyetik karıştırıcı da kullanılabilir.

05.02.02. Homojenizasyon ve Seyreltme Çözeltileri

Genel amaçlı seyreltme çözeltisi olarak "Serum Fizyolojik" (%0,85 NaCl; Merck 1.06404) yaygın kullanım alanı bulmuşsa da, bugün ISO 6887'ye göre formülü Serum Fizyolojik (%0,85) + Pepton (%0,1) olan "Maximum Recovery Diluent" (Merck 1.12535) kullanılmaktadır. Bu çözelti "pepton-tuz (saline-peptone)" olarak da anılmaktadır.

Yine ISO 6887'ye göre %0,1 pepton çözeltisi (Merck 1.07214) ile *Salmonella* analizinde kullanılan "Tamponlanmış Peptonlu Su" (Merck 1.07228) seyreltme amacı ile kullanılmaktadır.

Başta peynirler olmak üzere süt ürünlerinin mikrobiyolojik analizinde, seyreltme sıvısı olarak ¼ kuvvetinde Ringer çözeltisi (Merck 1.15525) kullanılmalıdır. Süt ürünleri dışında Ringer çözeltisi kullanmak gerekli değildir. Peynirlerde %2 sodyum sitrat çözeltisi, ISO 6887'de seyreltme çözeltisi olarak verilmektedir.

Reçel, meyve suyu konsantresi gibi yüksek şekerli gıdalardaki ozmofilik-ozmotolerant mayaların sayımında %20 glikoz çözeltisi ilk ve daha sonraki seyreltmelerde kullanılır. Anaerobların analizinde oksijeni bağlayan özel seyreltme çözeltisi kullanılması gerekmektedir. Halofil bakteriler ve *Vibrio* türleri vb. gibi özel grupların analizinde de özel seyreltme çözeltiler kullanılmaktadır.

Yağ oranı yüksek örneklerin homojenizasyonu için Tween 80 (Merck 8.22187) kullanılabilir. Bu amaçla seyreltme sıvısı içine (sterilizasyon öncesinde) %1 oranında Tween 80 katılması, özellikle krema gibi çok yağlı süt ürünleri için önerilmektedir.

Benzer şekilde, mayonez için Triton X 100'ün (Merck 1.08603) %1'lik çözeltisinden 90 mL'ye 1 mL ilavesi ile daha iyi bir homojenizasyon sağlanmaktadır. Bu çözeltilerin dışında daha pek çok çözelti de özel amaçlarla kullanılabilir.

Seyreltme çözeltileri her 6 ayda bir toksik maddelerin varlığı açısından kontrol edilmelidir. Basit olarak, sayım sonucunun sağlıklı olarak alınacağı (yaklaşık 100 kob/Petri) seyreltiden, seyreltme yapıldıktan 0, 15, 30, 45 dakika sonra tercihen PCA'ya ekim yapılır. Bu amaçla çiğ süt kullanılabilir ve gerekirse birden fazla seyreltiden ekim yapılabilir. Eğer, 45. dakika sayımları 0. dakika sayımlarına oranla %20'den daha az ise; bunun nedeni saptanıp, düzeltici işlem uygulanır ve tekrar test edilir. Bununla ilgili kayıtlar tutulmalıdır.

05.02.03. Homojenizasyon ve Seyreltme İşlemi

Gıdanın çeşidine göre değişmek üzere gıdada homojenizasyon ve/veya seyreltme yapılması gerekebilir. Sıvı ya da yoğurt, şeker, dondurma, tuz, süt tozu gibi suda kolaylıkla eriyen gıdalar için herhangi bir ön hazırlığa gerek yoktur. Bu gıdalar seyreltme sıvısı içinde basit bir mekanik karıştırma ile homojenize edilebilir.

Tereyağı homojenizasyonunda kullanılan çözeltiler 30–32 °C'da olmalıdır. Pipetleme sırasında pipetin içinde tereyağının katılaşmasını önlemek için pipet birkaç kez alevden geçirilerek ısıtılır.

Baharat örnekleri için ilave steril tüpe ihtiyaç vardır. Bisküvi, makarna gibi kuru gıdalar ile peynirler blender kullanılarak, et ürünleri ise tercihen stomacher kullanılarak homojenize edilir.

Homojenizasyon (ilk seyreltme) ve sonraki seyreltmeler, standart olarak 1:9 oranında yapılır. Bunun için başlangıçta 10 g gıda örneği 90 mL seyreltme çözeltisi ile homojenize edilir. *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 serotipi ve *Listeria* analizinde ise 25 g gıda 225 mL besiyerine ilave edilir.

Bu uygulamada seyreltme amacı yoktur, sadece gıda için yeterli miktarda besiyeri kullanılmaktadır. 11 g numunenin 99 mL seyreltme çözeltisinde homojenize edilmesi de uygulanan bir yöntemdir.

Seyreltmenin 1:9 oranında yapılmasının nedeni hesap kolaylığı içindir. Petri kutusunda sayılan koloni basit olarak seyreltme faktörü ile çarpılır. Bu faktör, 1:9 oranı kullanıldığında 10, 100, 1000 gibi bir değerdir. 1:99 oranında seyreltme kullanılarak doğrudan 100 kez seyreltme de yapılabilir. Aşağıda açıklanacağı gibi katı (agarlı) besiyeri kullanımlarında ve En Muhtemel Sayı yönteminde de ilk seyreltmenin 1:9 oranında yapılması zorunlu değildir.

Un, hazır çorba ve kuru maydanoz gibi gıdalar 1:9 oranında homojenize edilemez. Bu oranda işlem yapıldığında un ve hazır çorba pıhtılaşır, kuru maydanoz mevcut suyu tutar. Bu nedenle ilk seyreltme 1:19 oranında yapılır.

Örnek: Unda toplam mezofil aerob bakteri sayımı için ilk seyreltme 1:19 oranında yapılmış, bu kısım sanki ayrı bir sıvı gıda örneği gibi düşünülüp, buradan standart 1:9 oranında seyreltme yapılmış, yayma yöntemi ile ekim ve inkübasyon sonunda 10^{-2} seyreltide 219 ve 185, 10^{-3} seyreltide 28 ve 18 koloni sayılmıştır. Yukarıdaki örneğe göre "ayrı bir örnek olarak düşünülen" un çözeltisinde bulunan bakteri sayısı $2,1 \times 10^5$ kob/mL'dir. Bu değer 20 ile çarpılarak un örneğinde $4,2 \times 10^6$ kob/g bakteri olduğu hesaplanır. Hesaplama yöntemi 07.01.04. Bölümde verilmiştir. EMS yönteminde de aynı yaklaşım söz konusudur (bakınız; 07.02.04. Bölüm).

Kuru gıdalarda erimeyi kolaylaştırmak için ilk seyreltmenin yapılacağı erlene (sterilizasyon öncesinde) yaklaşık 6 mm çaplı cam boncuk atılması önerilmektedir. Cam boncuk kullanılması, hardal, fındık ezmesi ürünleri, krema vb. gibi kolay erimeyen gıdalar için de önerilir.

Yine kuru gıdaların homojenizasyonunda -özellikle Gram negatif bakterileri ozmotik şoktan korumak için- kademeli homojenizasyon önerilmektedir. Bu amaçla, steril bir erlene 10 gram örnek alınıp, üzerine 10 mL kadar seyreltme çözeltisi ilave edilir ve elle karıştırılarak yeterli ıslanma sağlanır. Sonra seyreltme çözeltisinin kalan kısmı ilave edilir.

Sayımı yapılacak bakteri sayısı çok az olarak bekleniyor ve şeker, yoğurt, süt tozu gibi suda kolaylıkla eriyen bir katı ya da yarı katı gıda kullanılıyor ise, ilk seyreltme 1:4 oranında da yapılabilir.

Örnek: Süt tozunda *Staphylococcus aureus* sayımı için 10 gram örnek 40 mL seyreltme çözeltisi ile homojenize edilmiş, 3 adet Baird Parker Agar besiyerine buradan alınan 1 mL eşit şekilde aktarılmış ve yayılmış, inkübasyon sonunda Petri kutularında sırası ile 3, 1, 2 adet *S. aureus* sayılmıştır. Buna göre süt tozu çözeltisinde 6 kob/mL sayıda *S. aureus* vardır. Bu değer 5 ile çarpılarak süt tozu örneğinde 30 kob/g *S. aureus* olarak sonuç verilir.

Standart analizlerde manyet ile birlikte sterilize edilmiş 90 mL seyreltme sıvısına aseptik koşullarda tartılmış 10 gram gıda maddesi ilave edilir ve manyetik karıştırıcıda orta devirde yaklaşık 1 dakika tutulup homojenizasyon sağlanır.

Bazı gıdalar seyreltme sıvısında bu yöntemle kolaylıkla homojenize edilemez. Bu durumda ya stomacher ya da blender kullanılmalıdır. Her iki koşulda da ilk seyreltme 225 mL seyreltme sıvısına 25 gram gıda ilavesi ile yapılır.

Blender kullanımında ilave 250 mL boş bir steril erlen bulundurulmalı, 25 gram gıda ile seyreltme sıvısından 150 mL kadar kısım blenderde homojenize edilip, boş steril erlene aktarılmalı, seyreltme sıvısından arta kalan kısım ile blender çalkalanmalı ve erlene ilave edilmelidir.

İlk seyrelti (10^{-1}) yapıldıktan sonra 10^{-2} ve 10^{-3} seyreltilere yine aynı seyreltme çözeltisi ile devam edilir. Standart gıda analizlerinde daha fazla seyreltmeye gerek yoktur. Bu seyreltmeler steril 1 mL'lik pipet kullanılarak standart şekilde yapılır. Bu amaçla erlend 1 mL alınıp, 9 mL seyreltme sıvısına aktarılır ve tüp karıştırıcıda karıştırılır. Bu şekilde 10^{-2} seyrelti elde edilir. Buradan bir başka steril pipet ile 1 mL alınıp diğer tüpe aktarılır ve yine mekanik tüp karıştırıcıda karıştırılır. Bu tüp ise 10^{-3} seyreltidir.

Analiz edilecek gıda maddesi (örneğin baharat) suda tam olarak erimiyor ise ilk seyreltinin (10^{-1}) yapıldığı erlen kendi halinde oda sıcaklığında 5 dakika bırakılır. Sonra steril bir 10 mL pipet ile sıvının üst tarafından 10 mL çekilip, steril bir tüpe aktarılır. Böylece daha sonraki pipetlemelerde pipetin gıda partikülleri ile tıkanması önlenmiş olur.

Eğer *Clostridium perfringens* ve/veya sülfid indirgeyen anaerob bakteri sayımı da yapılacak ise; özellikle homojenizasyon sırasında gıdanın aşırı miktarda hava (oksijen) ile teması, sahte negatif ya da gerçekte olduğundan daha az sayıda sonuç alınmasına neden olur. Bu koşulda eğer analiz edilecek gıda seyreltme sıvısında basit bir karıştırma ile homojenize edilemiyorsa, ilk seyreltinin blenderde yapılması önerilmez, stomacher kullanılmalıdır.

Bu tip analizlerde bir başka homojenizasyon yöntemi, gıdayı kum ile ezmektir. İçinde steril kum ve seyreltme çözeltisi bulunan laboratuvar tipi porselen havanlarda gıda ezilerek ilk seyrelti yapılır. Sonra havan kendi halinde 5–10 dakika tutularak, kum ve katı parçacıkların çökmesi beklenir ve yukarıda açıklandığı şekilde steril bir pipet ile 10 mL alınıp, steril bir boş tüpe aktarılır. Peynir gibi gıdalar için kullanılabilen bu uygulamada seyreltme çözeltisinin tamamı havana konulursa iyi bir ezme yapılmayabilir. Bu nedenle, önce seyreltme çözeltisinden yeteri kadar kısım havana ilave edilir, homojenizasyon bittikten sonra çözeltinin kalan kısmı da eklenir ve karıştırılır.

Gıda mikrobiyolojisinde gerekli olmamakla beraber, zorunlu anaerob bakterilerin analizinde özel seyreltme çözeltileri kullanılmaktadır.

Seyreltme işlemi yapıldıktan sonra tercihen 15 dakika içinde ekim işlemi bitirilmiş olmalıdır. Bu süre uzarsa, koliformlar gibi hızlı çoğalan bakteriler sayılarını artırabilir. Homojenizasyon aşamasından itibaren ekime kadar geçen süre en çok 30 dakika olarak verilmektedir.

Eğer ekim öncesinde bir canlandırma işlemi yapılacaksa, burada verilen süre geçerli değildir. İlgili talimatta canlandırma işleminin ne kadar süre ile yapılacağı belirtilmelidir.