GIDA VE KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

NUMUNE HAZIRLAMA KILAVUZU

(EK-3)

2022

Numune Hazırlama Klavuzu

1. AMAÇ ve KAPSAM

Bu talimatın amacı, mikrobiyoloji laboratuvarına analiz edilmek üzere gelen örneklerin, analiz işleminden önce; numunenin kabulü, tartımı, başlangıç ve seri dilüsyonlarının yapılması, homojenizasyonu gibi numunenin analize hazır hale gelmesi için gerçekleştirilen tüm iş ve işlemlerin nasıl yapılacağını belirlemektir.

İnsan gıdası, hayvan yemleri, kullanım suları veya gıda ile temas eden yüzeylerden alınan örneklerin mikrobiyolojik analizleri için; örneğin kabulü ve hazırlanması ile başlangıç süspansiyonun ve ondalık seyreltilerin hazırlanması kurallarını kapsar.

2. SORUMLULUKLAR

Bu talimatın yürütülmesinden yetkili tüm laboratuvar personeli sorumludur.

3. TANIMLAR ve KISALTMALAR

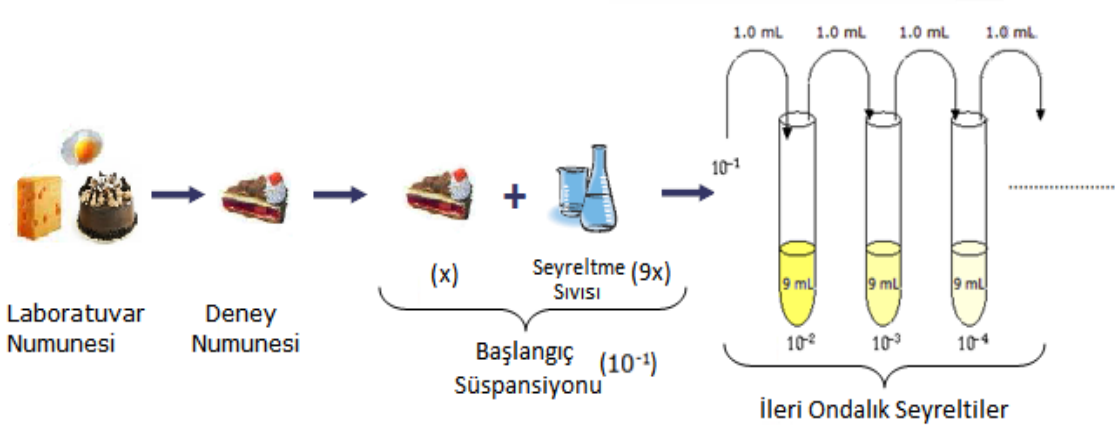
Laboratuvar Numunesi: Muayene veya deney amacıyla laboratuvara gönderilmek için hazırlanmış numunedir. Laboratuvar numunesi sıvı veya katı olabilir. Örnek sıvı ise başlangıç süspansiyonu yapılmadan da doğrudan analiz edilebilir.

Deney Numunesi Miktarı (Test Örneği): Başlangıç süspansiyonunun hazırlanmasında kullanmak için laboratuvar numunesinden alınan temsili numune miktarıdır (hacim veya kütle olarak).

Başlangıç Süspansiyonu (İlk Seyreltme): Muayene edilecek ürünün (veya üründen hazırlanmış deney numunesinin) tartılmış veya ölçülmüş bir miktarının, dokuz katı miktarda seyreltme sıvısı ile karıştırılarak, varsa iri parçacıkların çökmesi için beklenerek, hazırlanan süspansiyon, çözelti veya emülsiyondur.

NOT: Yüzey numuneleri için başlangıç seyreltmesi gösterilmelidir. Örneğin, toplam 25 mL seyreltici hacminde seyreltilmiş 25 cm^2'lik yüzeye sahip bir numunede (swab veya diğer), bu başlangıç süspansiyonunun 1 mL'si 1 cm^2'yi temsil eder.

İleri Ondalık Seyreltiler: Belirli hacimdeki başlangıç süspansiyonunun dokuz katı hacimdeki seyreltme sıvısı ile karıştırılması ve bu işlemin besiyerine ekimi için uygun bir seyrelti elde edilinceye kadar ileri seyreltmelerin tekrarlanması ile elde edilen süspansiyon ve çözelti veya emülsiyonlardır (Şekil 1).



Şekil 1. Numuneden seyrelti hazırlanması

4. UYGULAMA

4.1. Numune Sayısı ve Miktarının Seçimi

- Birçok ulusal/uluslararası standart ve mevzuat (Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği), analiz edilecek gıda miktarını; sayım yapılacak analizler için 10 g/mL, patojen mikroorganizma tespiti için 25 g/mL olarak belirtir.

- Ancak mikrobiyoloji laboratuvarına analizler için teslim edilen "laboratuvar numunesi"'nin yeterli örnekleme homojenizasyonunu sağlayabilmek, istenebilecek tüm analizleri yapabilmek veya olası bir durumda tekrar tartım yapabilmek için en az 200 g/ml olması tavsiye edilir.

- Su analizlerinde parametre başına 200 mL yeterlidir. Ancak *Legionella* türleri veya *Salmonella* spp. analizleri için bu miktar 1 litreye çıkabilir.

- Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde analizi yapılan gıdada yasal olarak bulunmasına izin verilen mikroorganizma sınırı n, c, m, M ile gösterilir. Harflerin açıklamaları aşağıda açıklanmıştır.

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

- Aşağıda, bu konu ile ilgili örnekler verilmiştir:
  - n = 5; c= 2; m= 5000; M= 50000 ise;

5 (n) adet örneğin; 2 adedinde (c) mikroorganizma sayısı en fazla 50000 (M) olabilir.

5 örnekten (n) geriye kalan 3 adedinde (n-c) mikroorganizma sayısı en fazla 5000 (m) olabilir.

5 örnekten (n) biri 50000 değerini (M) geçerse parti reddedilir.

5 örnekten 3 veya daha fazlasında 5000 (m) değeri geçilirse yine parti reddedilir. Çünkü c= 2 olması gerekirken bu durumda 3 veya 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 veya daha fazla örnek pozitif olarak değerlendirilirse parti reddedilir. Bu örnek genellikle *Salmonella, L. monocytogenes, E. coli* O157 serotipi gibi patojenlerin analizi için verilmiştir.

4.2. Numunenin Laboratuvara Kabulü

- Steril, kuru ve nem geçirmeyen ambalajlardakiler gibi mikrobiyel yönden stabil ürünlerde, taşıma sırasında soğutmaya gerek yoktur.

- Buna karşın işlem görmemiş, soğutulmuş, pastörize edilmiş vb. gıdalar 0 °C ile +4 °C arasında, dondurulmuş ürünler ise -18 °C'de taşınmalıdır.

- Laboratuvar personeli, numunenin laboratuvara gereken koşullarda getirilip getirilmediğini kontrol etmeli, standart koşullarda getirildiğine emin olursa numuneyi kabul etmelidir. Aksi halde ya reddetmeli ya da kabul formuna sorun ile ilgili tüm olumsuzlukları yazmalıdır.

- Su örnekleri ilgili standartlarda belirtilen şekilde steril kaplara alındıktan sonra 8 saat içerisinde laboratuvara teslim edilmelidir. Bu esnada örnek 5±3 °C'de muhafaza edilmelidir.

- Herhangi bir standartta farklı bir şekilde belirtilmedikçe örneklerin taşınma süresi de dahil olmak üzere tavsiye edilen (A) ve kabul edilebilir (B) depolama süreleri ile depolanma sıcaklıkları Tablo 1'de belirtildiği gibi olmalıdır (Tablo 1).

Tablo 1. Mikroorganizmaların depolama süre ve sıcaklıkları

	Depolama süresi (saat)		Depolama sıcaklığı
	Tavsiye edilen (A)	Kabul edilebilir (B)	(°C)
Genel • Kültürü yapılabilen mikroorganizmalar (22 °C, 30 °C, 36 °C)	8	12	5±3
Fekal indikatörler Vejetatif bakteriler • *Escherichia coli* ve diğer koliformlar • Enterekoklar • *Clostridium perfringens* (vejetatif hücreleri)	 12 12 12	 18 18 18	 5±3 5±3 5±3
Sporlar • Sülfit indirgeyen bakterilerin sporları (*Clostridium* spp.)	24	72	5±3
Diğer mikroorganizmalar • *Pseudomonas aeruginosa* • *Legionella* spp.	 8 24	 12 -	Laboratuvar sıcaklığında 5±3

- Bir oksitleyici yani dezenfektan ile (klor, kloramin, brom veya ozon) dezenfekte edilmiş suyun mikrobiyolojik kalitesini değerlendirmede, oksitleyici maddenin etkisini durdurmak için numune en kısa sürede alınır. Bu tür numune alımlarında kullanılacak şişeler bir indirgeyici madde olan tiyosülfat içermelidir.

- Teorik olarak 1 mg klorini inaktive etmek için 7,1 mg sodyum tiyosülfat (pentahidrat) kütlece yeterlidir. Bu nedenle 100 mL'lik kapasiteye sahip numune şişesine % 1,8'lik sodyum tiyosülfat çözeltisinden 0,1 mL eklenir. En az 2 mg/L bu çözelti 5 mg ve daha üstü serbest klor artığını inaktive eder. Bu da örneklerin çoğu için yeterlidir. Sodyum tiyosülfat otoklav veya kuru ısıtma ile imha

edilemez. Sodyum tiyosülfat çözeltisinin pH değerinin nötr civarında olduğundan emin olunmalıdır. Düşük pH sodyum tiyosülfatın ayrışmasına neden olabilir. Sodyum tiyosülfatın numune üzerinde herhangi bir etkisi yoktur ve klorsuz sular için de kullanılabilir.

- Gıda ile temas eden yüzeylerden alınan eküvyon çubuğu (swab), kontakt petri veya sünger numuneleri 1-4°C'de tercihen 4 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. En geç 24 saat içinde analize alınmalıdır.

- Somatik Hücre Sayımı analizi için numunenin alınışı (örneklemeyi takiben) ile analizin yapılışı arasında geçen süre 6 saati geçmemelidir. Numunenin dondurulmasından kaçınılmalıdır. Depolama sırasında sıcaklık 6°C'yi geçmemelidir. Eğer daha sonra analize alınacaksa (koruyucu eklenmiş süt örnekleri en fazla 6 gün +4 °C'de muhafaza edilebilir.) Son konsantrasyonu 0,6 g /100mL sütte olacak şekilde borik asit, son konsantrasyonu 0,05 g /100mL sütte olacak şekilde bronopol ya da potasyum dikromat 0.1 g/100 mL sütte olacak şekilde ilave edilir.

4.3. Laboratuvar Numunesinin Açılması

- Örnekler, tüm mikrobiyel bulaşma risklerinden göz önünde bulundurularak alınmalıdır. Bunun için aşağıdaki maddelere dikkat edilmelidir.

- Numune mümkün olan en kısa sürede analize alınmalıdır.

- Taze ve soğutulmuş ürünler kabulden sonra, 24 saat içinde analize alınmalıdır. Daha uzun depolama süresi kaçınılmaz ve ürün dondurulabiliyorsa derhal dondurulmalı ve -18°C'de depolanmalıdır. Dondurma işlemi üründeki mikrobiyel florayı etkileyeceği için, bu durum analiz raporunda açıkça belirtilmelidir.

NOT: *Campylobacter spp. ve C. perfringens* dondurma işleminden çok fazla etkilendiğinden analizi yapılacak numuneler dondurulmamalıdır.

- Çalışma alanında, kontaminasyonu engellemek için mümkün olduğu kadar az eşya bulunmalıdır.

- Çalışma sırasında hava akımını engellemek için kapı ve pencereler kapalı olmalıdır.

- Örneklemeye başlamadan önce tüm çalışma alanı uygun bir dezenfektanla temizlenmelidir.

- Eller örneklemeye başlamadan önce ve çalışma bittikten sonra yıkanmalıdır.

- Temiz ve kirli olabileceği düşünülen ürünlerde zaman veya yer ayrımı yapılmalıdır (örn; çiğ et ve yumurta gibi yüksek riskli gıdalar için; örnekleme alanı ayrılabilir veya en son örnekleme yapılabilir).

- Örnekleme mutlaka bek alevi yanında yapılmalıdır.

- Ambalajlı ürünlerde; ambalajın açılma yerinin etrafı % 70'lik etanol ile temizlenmeli ve alkol buharlaşıncaya kadar beklenmelidir.

- Ambalajı açmak ve numune almak için kullanılan her gereç (pens, bistüri, kaşık, makas vb.) steril olmalıdır. Bu amaçla gereçler, önceden kuru sterilizatörde veya otoklavda steril edilmeli veya numune alımında kullanmadan önce % 70'lik etanol ile muamele edilip bek alevinden geçirildikten sonra kullanılmalıdır.

- Laboratuvar numunesinin içinde olduğu kaplar, plastik torbalar vb. laboratuvar kodu ile dikkatlice işaretlenmelidir. Etiketleme yapılmalıdır.

4.4. Gıda Kaynaklı Patojenlerin Tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)- Genel Kurallar

- Tesadüfi DNA bulaşmasının kaynağı, tozlar veya yayılan aerosoller olabilir.
- Laboratuvardaki çalışma alanının düzenlenmesi ve iyi laboratuvar uygulaması için aşağıdaki kurallar esas alınmalıdır:
  - ✓ Sonuçların elde edilmesindeki metodolojik aşamaların sistematik varlığı.
  - ✓ Numune muamelesinde "ileri akım" ilkesi.
- Bu önlemler, deney maddesindeki DNA ve PCR ile çoğaltılmış DNA'nın fiziksel olarak karışmamasını garanti eder.
- Asgari olarak aşağıda belirtildiği üzere dört ayrı özel çalışma alanı gereklidir:
  a) Deney maddesinden nükleik asit çözeltisinin hazırlandığı alan
  b) İlk karışımın hazırlandığı alan
  c) Deney maddesinden hazırlanan nükleik asit çözeltisinin ilave edildiği alan
  d) PCR ürünlerinin tespit edildiği ve doğrulandığı alan

NOT 1: Çoğaltma işlemi c) veya d) maddelerinde verilen çalışma alanlarında gerçekleştirilebilir. Isıl döngü cihazı c) bendindeki çalışma alanındaysa, çoğaltma reaksiyonu ürünlerinin bulunduğu deney tüpleri bu çalışma alanında açılmamalıdır.

- Numune hazırlanması ve ilk karışımın hazırlanması için farklı pipet takımları kullanılmalıdır.
- Deneyler uygun çevre şartlarında yapılmalıdır.
- Farklı çalışma alanları ve çalışma donanımı sağlamanın en etkili ve tercih edilen yolu fiziksel alanların ayrılması ile farklı odaların kullanımıdır.

NOT 2: PCR ürünleri, % 3'lük hipoklorit çözeltisi (kütlece) kullanılarak yok edilebilir.

4.5. Örneklerin Analize Hazır Hale Getirilmesi İçin Genel Kurallar

4.5.1. Dondurulmuş ürünler

Dondurularak muhafaza edilen ürünler 18- 27°C'de maksimum 3 saat veya 5° C ± 3°C'de maksimum 24 saat süre ile depolanarak örnek almaya hazır hale getirilmelidir. Ambalajdan sızıntı yapan "damla" (çözülme sıvısı) ile çapraz bulaşmayı önlemek için çözündürülen örnekleri ayrı raflarda saklanması önerilir. Örnekler bundan sonra mümkün olduğunca hızlı analiz edilmelidir. Şayet ürün hala donmuş halde ise, çözünme işlemini kolaylaştırmak amacıyla, örnek alma esnasında laboratuvar sıcaklığında bir seyreltici kullanılabilir.

NOT 3: Dondurulmuş ürünün su banyosunda veya soğuk su altında çözülmesi önerilmez, çünkü ambalaj tamamen su geçirmez değilse numunenin kirlenmesine neden olabilir.

4.5.2. Sert ve kuru ürünler

Sert ve kuru ürünler steril blender ile bir defada en fazla 2,5 dakika homojenize edilmelidir. Sıcaklığın aşırı artışına engel olmak için kıyma veya öğütme işlemi en fazla 1 dakika yapılmalıdır.

4.5.3. Kurutulmuş ve diğer düşük nemli ürünler

Kurutulmuş ve diğer düşük nemli ürünler için, seyreltiyi tartmak ve ardından mevcut herhangi bir mikroorganizma üzerindeki ozmotik şoku azaltmak için test kısmını eklemek önemlidir. Düşük nemli ürünler, homojenizasyon ve müteakip manipülasyonlardan önce yumuşatmak için ilk süspansiyon için kullanılan seyreltici içinde bir süre (1 saate kadar) bekletmeyi gerektirebilir.

4.5.4. Sıvı ve viskoz olmayan ürünler

Sıvı ve viskoz olmayan ürünler, el ile çalkalama işlemi veya mekanik yollarla karıştırma işlemi yapılarak mikroorganizmaların homojen dağılması sağlandıktan sonra analize alınmalıdır.,

4.5.5. Heterojen ürünler

Heterojen ürünlerden deney numunesi alırken, laboratuvar örneğinde yer alan her bir bileşeni temsil edecek oranda örnekleme yapılır. Örneğin homojen hale getirilebilmesi için öğütmek gerekebilir. Sıcaklığın aşırı artışını önlemek için, kıyma veya öğütme işlemi 1 dakikadan daha uzun süre yapılmamalıdır.

4.5.6. Asitli ürünler

Asidik ürünlerde, süspansiyon çözeltisi kullanıldığında pH'nın nötr hale getirilmesi önemlidir. pH değeri 4,5'e eşit veya daha büyük olan çoğu ürün için tamponlanmış peptonlu suyun kullanılması yeterlidir. Daha asidik ürünler (pH 3,5'ten büyük veya eşit), çift kuvvetli tamponlu pepton su kullanılarak gerekli pH'ya getirilebilir. pH ayarlama 1-4 N NaOH ve 5 N HCl ile yapılmalıdır. En uygun NaOH konsantrasyonu (ör; 0,1 mol/L veya 1 mol/L) 9 birim seyreltici içerisinde 1 birim oranına yakın seyreltilmiş konsantrasyondur.

4.5.7. Yüksek yağlı gıdalar (toplam kütlesinin % 20'sinden fazlası yağ olan)

Yaklaşık yağ düzeylerine göre (örn; % 40 yağ içeriğine 4 g/L eklenir) 1 g/L ve 10 g/L arasında sorbitan monooleat (Tween 80) eklenmiş bir seyreltici kullanılması süspansiyon sırasında emülsifikasyonu artırabilir.

4.5.8. Gıda ile temas eden yüzeylerden alınan örnekler

Dezenfektan kullanılan yüzeylerden örnekleme yapıldığında, nötralizan bir ajan kullanılmalıdır. Tüm durumlar için uygun bir nötralizan bildirilemez. Ancak genel olarak kuarterner amonyum bileşikleri, amfoterikler için sorbitan monooleat (30 g/L) ve lesitin (3 g/L), halojen bazlı ürünler için sodyum tiyosülfat (5 g/L), peroksit bazlı ürünler için katalaz veya peroksidaz nötralizatör olarak kullanılabilir. Kontakt petri metodu ile alınan örnekler analiz edilecek mikroorganizmanın türüne göre ilgili standartta belirtilen şekilde inkübe edilir ve değerlendirilir.

Swab metodu ile alınan örnekler incelenen alanın büyüklüğüne göre (100 cm^2'den alınan örneği 100 mL ile) genel dilüsyon sıvısı veya nötralizanlı sıvı içinde karıştırılır. Bu ilk dilüsyonu temsil eder. Gerekli görülürse ileri dilüsyonlar hazırlanır.

Kalitatif analizlerde ise ilgili standartta belirtilen önzenginleştirme besiyerine eküvyon çubuğu/sünger direkt atılıp karıştırılarak yapılır.

4.6. Örneklerin Analize Hazır Hale Getirilmesi İçin Özel Kurallar

- Sucukların üzerindeki kılıfı tüketim amaçlı olmayanlarında % 70'lik alkollü pamukla silinmesi gerekir. Daha sonra aseptik koşullarda kılıf içinden numune çıkarılır ve dilimlenerek numune alınır.
- Katı ve kuru ürünler öğütülürken ısınmayı önlemek için; karıştırma 2,5 dakika, öğütme ise 1 dakikadan fazla sürmemelidir.
- Asidik ürünler için çözelti kullanıldığında, pH'nın nötral pH'ya geldiğinden emin olunmalıdır. Bunun için dipotasyum hidrojen fosfat kullanılır.
- Orta derecede asitli numunelerin pH ayarlaması için (pH ≥ 3,5 ila pH <4,5), çift kuvvetli tamponlanmış pepton su kullanılır.
- Çok yağlı et ürünlerinin homojenizasyonunu kolaylaştırmak için Tween 80 kullanılmalıdır. Tween 80 ilave oranı, yağ yüzdesine göre yapılır. Örneğin % 40 yağ için 4 g/L kullanılabilir.
- Sosis, dilimlenerek numune alınır. Isıl işlem görmüş çiğ sosisin kılıfı çıkarılmamalıdır.
- Etten numune almak için spatül veya bistüri kullanılır.
- Deniz kabuğu canlılarından numune almak için, kabukların % 70 alkollü pamukla silinmesi gerekir. Daha sonra aseptik koşullarda kabuk kırılarak içinden numune çıkarılır.
- Midye, istiridye vb. deniz canlılarında, kabuk aseptik koşullarda açılarak içinden, steril pens, bistüri vb. ile numune çıkarılır. Kabuklardan kıymık geçmemiş ise stomacherde tek torbayla, geçmiş ise 2-3'lü torba içinde homojenize edilir.
- Denizkestanesi, içilebilir su altında yıkanır ve daha sonra aseptik koşullarda sivri olmayan kenardan kesilerek numune çıkarılır.
- Çiğ deniz karındanbacaklıları için, en az 10 ayrı karındanbacaklı akan içme suyu altında yıkanmalı ve steril bir ortama konulmalıdır. Forseps, steril pens veya kabuklu deniz ürünleri toplayıcı kullanarak hayvanın vücudunu çıkarılmalıdır. Kabuklar ayrıca bir çekiç kullanılarak kırılarak da açılabilir. Homojenizasyon kolaylığı ve analizin doğru bir şekilde uygulanabilirliği için, kabuk kalıntılarını forseps ile çıkarırken etin küp şeklinde kesilmesi önerilmektedir Seyreltici içinde yaklaşık 1/3'lik bir başlangıç süspansiyonu hazırlanmalıdır, Homojenizatörde homojenizasyonu sağlanan numune diluent karışımı daha sonra 1:10 süspansiyon elde etmek için gerekli miktarda seyreltici eklenmelidir.
- Salamura deniz ürünlerinde numune, aseptik koşullarda iç, orta ve dış kısımdan kesilerek çıkarılır. Çok tuzlu ürünlerde dilüsyon sayısı artırılmalıdır.
- Süt ve likit süt ürünleri en az 25 defa karıştırılmalı ve köpük oluşumundan kaçınılmalıdır. Karıştırma ve numune alma arasındaki süre 3 dk'yı geçmemelidir. Steril bir pipet ile 1 mL test örneği alınır ve dokuz katı hacminde genel çözeltiye eklenir. Bu başlangıç süspansiyonu, 10-1 dilüsyon elde etmek için vorteks ile 5-10 sn karıştırılır. Daha sonra ileri dilüsyonlar hazırlanabilir.
- Kurutulmuş (dehidrate) süt ürünleri iyice karıştırıldıktan sonra (en az 25 kez), aseptik koşullarda numune alınır. Kurutulmuş ürünler ve diğer düşük nemli ürünlerin ilk süspansiyonu genel kullanım için ISO 6887-1'e göre bir seyrelticiyle hazırlanmalıdır.
- Asidik peynir altı suyu tozunun asitliğini dengelemek için tamponlayıcı olarak pH 8,4 ± 0,2'de dipotasyum hidrojen fosfat veya gerekirse pH 7,5 ± 0,2'de silindirle kurutulmuş süt için sodyum sitrat

çözeltisi veya dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi kullanılabilir. pH'nın nötrleştiği kontrol edilmelidir.

NOT 4: Dilüentler muhakkak önceden ılık su banyosunda 44-47°C'ye getirilmelidir.

- Kazein ve benzeri ürünlerin homojenizasyonu sıkıntılı olabilir. Bu nedenle homojenizasyon sırasında numune miktarı fazla tutulur.

- Yağlı süt ürünlerinden numune alırken, numunenin 45°C'lik su banyosunda 5 dakika beklemesi ve dilüent sıcaklığının 45 °C olması kolaylık sağlar.

- Tereyağında, 10 g test örneği örnek kabına alındıktan sonra kap 44-47°C'ye ayarlanmış su banyosuna yerleştirilir. Tüm test örneği eriyinceye kadar su banyosunda bekletilir. Daha sonra 44-47°C'ye ısıtılmış genel kullanım amaçlı seyrelticiden 90 mL eklenir ve karıştırılır. Alternatif olarak margarin numunesi gibi hazırlanıp sıvı fazdan analiz yapılabilir (Burada 50g tereyağı numunesi için numunenin 8 gr'ı sıvı fazdır $(50 - [50 \times W/100])$ ve üzerine 42 mL dilüent eklenmesi gerekmektedir.

- Peynirlerde, 10 g test örneği örnek kabına alınır. 90 mL genel dilüsyon çözeltisi veya peynir için pH 7,5 ±0,2 olan 90 mL sodyum sitrat çözeltisi ya da dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi eklenir. Peynir iyice dağılana kadar karıştırılır.

- Fermente süt ve ekşi kremada (pH <5) 10 g test örneği tartılır. Daha sonra oda sıcaklığına getirilmiş ve pH'sı 7,5±0,2 olan 90 mL tamponlanmış çift kuvvet peptonlu su veya dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi eklenir. Dağıtmak için çalkalanır.

- Un, tahıl taneleri, tahıl yan ürünleri ve hayvan yemlerinde; deney numunesi tartılmadan önce kuru toz halindeki laboratuvar numunesi kendi kabı içinde karıştırılır. 1 birim deney numunesine 9 birim peptonlu tuz çözeltisi (MRD) eklenir ve karıştırılır. Homojenizasyondan önce 18-27 °C'de (laboratuvar sıcaklığı) 20-30 dk bekletilir. Süspansiyonun vizkozitesi artarsa karışım çok iyi karıştırılır ve 1/20 olacak şekilde MRD ile seyreltilir. Ürüne göre peristaltik homojenizatör veya döner karıştırıcıdan biri kullanılarak 1 dakika süreyle karıştırılır. Sayım hesaplamalarında ilave yapılan dilüsyon dikkate alınır.

- Tahıl ve diğer heterojen ürünler analiz edileceğinde 50 g'lık bir test örneğinin alınması tavsiye edilir. Bu durumda birinci süspansiyon 1/5 olmalı ve homojenize edildikten sonra 1/2 oranında seyreltme yapılmalıdır.

NOT: Peristaltik homojenizatörde sert malzemeler (ör; tahıl ve kemik unu) torbaların delinmesine neden olacağından çift torbalama yapılması tavsiye edilir.

- Çok sert ürünlerde gerekli örneği almak için laboratuvar numunesi steril koşullarda steril plastik bir torbada çekiçle küçük parçalara ayrılır. 1 birim test örneğine 9 birim peptonlu tuz çözeltisi eklenir ve karıştırılır. Homojenizasyondan önce 18-27 °C'de 20-30 dk bekletilir. Döner karıştırıcıda karıştırılır.

- Jelatinden (granül veya yaprak formu) örnek almak için; aseptik teknikler kullanılarak 20 g test örneği alınır ve 500 mL steril şişeye koyulur. 180 mL tamponlanmış fosfat çözeltisi (PBS) eklenir ve sıvı içindeki granülleri dağıtmak için karıştırılır. Jelatinin seyreltme sıvısını emmesi için karışım oda sıcaklığında 60 dk bekletilir. Şişe daha sonra 45 °C'ye ayarlanmış su banyosunda en fazla 30 dk boyunca bekletilir, jelatinin çözünmesi için şişe sık sık karıştırılır ve sonuçta 1/10'luk çözelti elde edilir. Alternatif olarak %2 papain eklenebilir.

- Margarin ve sürülebilen ürünlerde; örnekler alındıktan sonra steril bir şişeye *50* gram örnek tartılır. Steril bir kaba margarin veya sürülebilir numunenin içermiş olduğu yağ oranına denk miktarda seyreltme sıvısı eklenir. Örneğin % *84* yağ içeren bir margarinden *50* g test örneği alındığında bu örnekteki yağ oranı *50 x 0,84 = 42* gr'dır. Bu miktara denk olacak şekilde *42* mL seyreltme sıvısı eklenir. Steril kap içerisinde bulunan ürün 45 °C'ye ayarlanmış su banyosuna konularak tamamen erimesi sağlanır. Bu süre 20 dk'yı geçmemelidir. Homojen bir emülsiyon elde edilinceye kadar karıştırılır. Karıştırma süresi margarin/sürülebilir ürünün türüne bağlı olarak 2-5 dk arasında değişir. Kap ortam sıcaklığında kendi haline bırakıldığında yağ katmanı (üst) ve sulu katman (alt) uygun şekilde ayrılır. Çalışma sıvı faz üzerinde yapılır ve buradan alınan 1 mL'lik çözelti 1 g margarine karşılık gelir. Bu örnek kullanılarak başlangıç süspansiyonu ayarlanır.

- Kurutulmuş ürünlerde; su içinde şişen tüm ürünler (polisakkaritler, sakız, jel maddeler, kurutulmuş maydanoz) kullanılabilir. Çözelti elde etmek için seyreltme sıvısı ile ileri seyreltmeler (1/20, 1/50, 1/100) yapılır. Daha fazla seyreltme yapıldığında; düşük sayıların beklendiği test örneklerinde 0,1 g'lık dağıtımlar yapılarak petri sayısı artırılabilir. Tamponlanmış peptonlu suya spesifik enzimlerin eklenmesi ile bazı maddelerin çözünürlükleri artırılabilir (ör; karboksi metil selüloz için %1 selülaz enzimi, Nişastalı ürünler için %1 alfa-amilaz, jelatin için %2 papain).

- Antimikrobiyel aktiviteyi azaltmak için inhibitör gıda katkı maddeleri içeren (ör; soğan tozu, sarımsak, kekik, biber vb.) ürünlere daha fazla seyreltme yapılır (örn; tarçın ve kekik için 1/100 ve karanfil için 1/1000) veya tamponlanmış peptonlu suya, son konsantrasyonda % 0,5 olacak şekilde K2SO3 (Potasyum sülfit) katılır.

- Çikolata ve çikolata mamülleri hazırlanırken seyreltme sıvısı 40 °C'ye kadar ön ısıtmaya tabii tutulur. Seyreltme sıvısı tartılan test örneğine eklenir ve elle hemen karıştırılır. Karışım oda sıcaklığında 20-30 dk boyunca bırakılır. Karışım peristaltik homojenizatör ile homojenize edilir*60 s ± 5 s*.

- Kakao ve kakao ihtiva eden ürünlerde Salmonella spp. ve STEC gibi önemli patojenlerin tespiti için ön zenginleştirme besiyerine UHT süt veya steril yağsız süt tozu (100 g /L); kullanılır. BPW diğer testler için genel seyreltici olarak kullanılabilir.

NOT 5: Süt, kakao veya kakao ihtiva eden ürünlerin bakterisidal etkisini nötralize etmek için kullanılır. Kakaodaki olası inhibitör faktör antosiyanindir.

- Kakao tozu ve yetersiz ısıl işlem görmüş ürünler gibi Gram Pozitif mikroorganizma kontaminasyonunun fazla olduğu düşünülen numunelerde düşük miktardaki Gram negatif mikroorganizma inhibisyonunu önlemek için 225 mL'lik ön zenginleştirme sıvısına %1'lik (1 g/100 mL) Brillant Green Solüsyonundan 0,45 mL ilave edilmelidir.

- Taze bütün yumurtalarda; gözle görülür çatlak olmamalıdır. Yumurtalar amacına göre tek veya gruplar halinde incelenir. Kabuğu kirli ise yumurta kırılmadan önce temizlenerek steril edilir. Gerektiğinde kabuğun dışındaki patojenlerin saptanması için sterilizasyon yapılmayabilir. Dış kabuk temizlenirken bir mendil ve su ile yüzeydeki kir veya dışkı temizlenir ve kuru bir mendille kabuk kurutulur. Steril eldiven giyilir ve % 70'lik alkol içeren çözeltiye batırılmış bir gazlı bez ile kabuk yüzeyinin tamamı silinir. Yumurta, kontaminasyona maruz kalmayacak şekilde kurumaya bırakılır.

- Fermente ürünler (canlı mikroorganizma içeren ürünler); probiyotik ürünler bu kapsamda ele alınmamıştır. Amaç fermente ürünlerde başka mikroorganizmalarla kontaminasyon durumunu incelemektir. Brom krezol moru katkılı peptonlu tuz çözeltisi kullanılır. Süspansiyonun renginde

asitliği gösteren bir renk oluştuğunda pH'yı nötre getirecek şekilde 40 g/L NaOH eklenebilir. Maya bulunması halinde sayım ortamına bir antifungal ajan (ör; nistatin 50 mg/kg) eklenir.

4.7. Numunenin Tartımı

- Numune tartılması aseptik koşullarda yapılmalıdır.
- Tartım; seyreltme veya önzenginleştirme besiyerini rahatlıkla alabilecek boyutta steril bir kapta olmalıdır. Bu işlem için steril stomacher poşeti kullanılır.
- Katı gıda maddesi tartım sırasında sorun çıkaracak büyüklükte ve nitelikte parçalardan oluşuyor ise, tartımdan önce uygun boyutlara parçalanmalıdır.
- 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 1:9 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. % 5'ten daha fazla tartım yapılmaması gerektiği unutulmamalıdır.

4.8. Seyreltme Sıvıları

Sonuçların tekrarlanabilirliğini artırmak için, dilüsyon sıvısının hazırlanmasında susuz hazır bileşimler kullanılır. Bu konuda üreticinin uyarıları göz önünde bulundurulmalıdır.

NOT: Kimyasal ürünler, mevcut mikrobiyolojik analizler için belirtilen saflıkta olmalıdır.

NOT: Kullanılan su, damıtık su veya buna eşdeğer saflıkta bir su olmalıdır.

4.8.1. Genel kullanım için seyreltme sıvıları

4.8.1.1. Peptonlu tuz çözeltisi/Maximum Recovery Diluent (MRD)

Formül:

Kazeinin enzimatik parçalanmış hali	1 g
Sodyum klorür	8,5 g
Su	1000 mL

Yukarıda verilen maddeler su içinde ve gerekirse ısıtılarak çözündürülür. Gerektiğinde, pH sterilizasyondan sonra, 25 °C'de 7,0 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır.

4.8.1.2. Tamponlanmış peptonlu su/Buffered Peptone Water (BPW)

Formül:

Hayvan dokusunun enzimatik parçalanmış hali	10 g
Sodyum klorür	5 g
Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4.12 H_2O$)	9 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	1,5 g
Su	1000 mL

Yukarıda verilen maddeler su içinde ve gerekirse ısıtılarak çözündürülür. Gerektiğinde, sterilizasyondan sonra 25 °C'de pH 7,0 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır.

4.8.1.3. Ringer çözeltisi (1/4 güçlü)

Formül:

Sodyum klorür (NaCl)	2,25 g
Potasyum klorür (KCl)	0,105 g
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$), susuz	0,06 g[a]
Sodyum hidrojen karbonat ($NaHCO_3$)	0,05 g
Su	1000 mL
[a] Alternatif olarak 0,12 g $CaCl_2.H_2O$	

Yukarıda verilen maddeler su içinde, gerekirse ısıtılarak çözündürülür. Gerektiğinde, sterilizasyondan sonra 25 °C'de pH 6,9 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır.

4.8.2. Özel amaçlı seyreltme sıvıları

4.8.2.1. Brom krezol moru katkılı tamponlanmış peptonlu su çözeltisi

Formül:

Tamponlanmış peptonlu su çözeltisi	1000 mL
Brom kresol moru (% 0,04 alkol çözeltisi örneğin, etanol çözeltisi)	0,1 mL

Tamponlanmış peptonlu su çözeltisinin 1000 mL'sine 0,1 mL brom kresol moru ilave edilir.
Bu çözelti belli asitliğe sahip ürünlerde kullanılabilir, pH ayarlaması steril bir pH elektrodu kullanılmaksızın yapılabilir. Bromkresol moru asidik pH'da sarıdır, pH 6,8'de mor renge dönüşür.

4.8.2.2. Brom kresol moru katkılı peptonlu tuz çözeltisi

Formül:

Peptonlu tuz çözeltisi	1000 mL
Brom krezol moru (% 0,04 alkol çözeltisi ör; etanol çözeltisi)	0,1 mL

Tamponlanmış peptonlu su çözeltisinin 1000 mL'sine 0,1 mL brom krezol moru ilave edilir.
Bu çözelti belli asitliğe sahip ürünlerde kullanılabilir, pH ayarlaması steril bir pH elektrodu kullanılmaksızın yapılabilir. Brom krezol moru asidik pH'da sarıdır, pH 6,8'de mor renge dönüşür.

4.8.2.3. Pepton çözeltisi

Formül:

Enzimatik olarak parçalanmış kazein	1 gr
Su	1000 mL

Yukarıda verilen maddeler su içinde, gerekirse ısıtılarak çözündürülür. Gerektiğinde pH, sterilizasyondan sonra, 25 °C'de 7,0 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır.

4.8.2.4. Tamponlanmış fosfat çözeltisi (PBS) 1

Formül:

Disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	9 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	1,5 g
Su	1000 mL

Yukarıda verilen maddeler su içinde, gerekirse ısıtılarak çözündürülür. Gerektiğinde pH, sterilizasyondan sonra, 25 °C'de 7,0±0,2 olacak şekilde ayarlanır. Her şişeye 180 mL koyulur. 121 °C'de 15 dakika sterilize edilir. Bu çözelti jelatin ve diğer örnekler için seyreltici olarak kullanılır.

4.8.2.5. Tamponlanmış fosfat çözeltisi (PBS) 2

Formül:

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	42,5 g
Su	1000 mL

Yukarıda verilen maddeler su içinde, gerekirse ısıtılarak çözündürülür. 500 mL su içerisinde çözündürülür. Gerektiğinde pH, sterilizasyondan sonra, 25 °C'de 7,2±0,2 olacak şekilde ayarlanır. Kalan su ile 1000 mL'ye seyreltilir.

4.8.2.6. Sodyum sitrat çözeltisi

Formül:

Trisodyum sitrat dihidrat ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	20 g
Su	1000 mL

Yukarıda verilen maddeler su içinde, gerekirse ısıtılarak çözündürülür. Gerektiğinde pH, sterilizasyondan sonra, 25 °C'de 7,5 ± 0,2 olacak şekilde ayarlanır. Bu çözelti peynir, kurutulmuş süt ürünleri ve bazı kazeinatlarda kullanılır.

4.8.2.7. Dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi

Formül:

Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	20 g
Su	1000 mL

Yukarıda verilen maddeler su içinde, gerekirse ısıtılarak çözündürülür. Asidik peynir altı sularında kullanılacaksa; gerektiğinde pH sterilizasyondan sonra, 25°C'de 8,4±0,2 olacak şekilde ayarlanır. Peynir, silindirik yöntemle kurutulmuş süt, fermente sütler, kazeinat ve ekşi krema için kullanılacaksa; gerektiğinde pH sterilizasyondan sonra, 25 °C'de 7,5 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır.

4.8.2.8. Köpük önleyici maddeli dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi

4.8.2.8.1. Dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisi

Formül:

Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	20 g
Su	1000 mL

Yukarıda verilen maddeler su içinde, gerekirse ısıtılarak çözündürülür.

4.8.2.8.2. Köpük önleyici stok çözelti

Formül:

Polietilen glikol 2000	1 g
Su	100 mL

Yukarıda verilen maddeler su içinde çözündürülür.

Tam Çözeltinin Hazırlanışı:

1 litre dipotasyum hidrojen fosfat çözeltisine 1 mL köpük önleyici stok solüsyon eklenir. Asit kazein ve laktik kazein için kullanılacaksa pH sterilizasyondan sonra 25 °C'de 8,4 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır.

Rennet kazein için kullanılacaksa; pH sterilizasyondan sonra 25°C'de 7,5 ±0,2 olacak şekilde ayarlanır.

4.8.2.9. Genel nötralizan solüsyonu

Formül:

Sorbitan monooleat (polisorbat 80)	30 g/L
Lesitin	3 g/L
Sodyum tiyosülfat	7.8 g/L
Disodyum fosfat ($Na_2HPO_4.12\ H_2O$)	100,8 g
L-histidin	1 g/L
Saponin	30 g/L
Su	1000 mL

Yukarıda verilen maddeler su içerisinde gerekirse ısıtılarak çözündürülür. Tüp veya şişelere dağıtılarak 121 °C'de 15 dk sterilize edilir. 5 ±3°C'de 3 ay saklanabilir.

Nötralizan Madde	**Nötralize edilen madde**
Lesitin	Kuaterner amonyum bileşikleri Ethanol Fenoller
Sorbitan monooleat (polisorbat 80)	Aldehitler Ethanol Fenoller
L-histidin	Aldehitler Fenoller
Sodyum tiyosülfat	Halojenler Fenoller
Disodyum fosfat ($Na_2HPO_4.12\ H_2O$)	Asit veya alkaliler

4.8. Seyreltme sıvılarının sterilizasyonu ve dağıtımı

Seyreltme sıvısı, başlangıç süspansiyonunun hazırlanması için uygun hacimli balonlara gerekli hacimde dağıtılır.
Ondalık seyreltiler için deney tüplerinin içine belirli miktarda seyreltme sıvısı dağıtılır. Sterilizasyondan sonra her tüp 9,0 mL ondalık seyrelti içerir. Son hacim sterilizasyondan sonra ±% 2'yi aşmamalıdır.

Seyreltme sıvıları, üretici talimatlarında belirlenen sıcaklık ve sürelerde sterilize edilir.

NOT 6: Farklı besiyerleri kullanarak birden fazla mikroorganizma grubunun sayılması gerekiyorsa, bütün seyreltme sıvılarının (veya bazılarının) 9,0 mL'den fazla dağıtılması gerekebilir. Deney tüplerinin büyüklüğü buna göre seçilir. Deney tüplerinin ağızları kapatılır.

4.9. Deney Numunesinin ve İleri Ondalık Seyreltilerin Hazırlanışı

Deney numunesinin içerdiği olası mikroorganizmaların homojen dağılımını sağlayacak şekilde başlangıç süspansiyonu hazırlanır. Öngörülen mikroorganizma sayısı çok fazla ise, bu başlangıç süspansiyonu kullanılarak izin verilen her hacimde mikroorganizma sayısını azaltmak için ileri ondalık seyreltiler hazırlanır.

4.9.1. Deney numunesi ve başlangıç süspansiyonu (ilk seyrelti)

Deney numunesinden ±% 5 hata payı ile V mL (aksi belirtilmedikçe en az 10 mL) veya m gramı steril plastik bir torba veya kaba alınır.
İlave edilen seyreltme sıvısı miktarı "9 x m" g veya "9 x V" mL'ye eşit olmalıdır. Bu ölçümlerde ±% 5 hata payı bulunur.

NOT 7: Özellikle çok viskoz veya yoğun olan başlangıç süspansiyonlarına daha fazla seyreltme sıvısı ilave etmek gerekebilir. Bu durum, sonuçlar hesaplanırken dikkate alınmalıdır.

NOT 8: Başlangıç süspansiyonu, kullanılan tekniğe (örn; gram başına 10 mikroorganizma ile sınırlı olan, 1/10'luk süspansiyondan 1 mL inokulum alınan dökme petri tekniği) bağlı olarak sayım sınırının daha altında bir değeri gerektirebilir. Gerekli durumlarda belli ürünlerin bazı sayımlarında bu limitin altına düşülebilir. Bu işlem daha küçük seyreltme sıvısı kullanılarak yapılabilir. İnokulum/medium oranındaki (gıda bileşiminin konsantrasyonunun artmasıyla, mikrobiyel üremenin engellenmesi) dengesizlikten dolayı farklılıklarla sonuçlanabilen başlangıç süspansiyonuna dikkat edilmelidir.

Mikroorganizmaların ani sıcaklık değişmelerinden zarar görmesini önlemek için seyreltme sıvısının sıcaklığı, özel ürünler dışında ortam sıcaklığı ile yaklaşık olarak aynı olmalıdır.

Elde edilen karışım homojenizatör vasıtasıyla homojenize edilir. Büyük partiküller mevcutsa, gerektiğinde 15 dakika daha homojenize etme işlemine devam edilir. Aynı sonuçları veren süzme sistemleri de kullanılabilir.

Sporların sayılmasında kullanılacak başlangıç süspansiyonu, hazırlandıktan hemen sonra ısıtılır (örneğin; 80°C ± 5°C'de 10 dakika ± 1 dakika) ve hemen soğutulur.

4.9.2. İleri ondalık seyreltiler

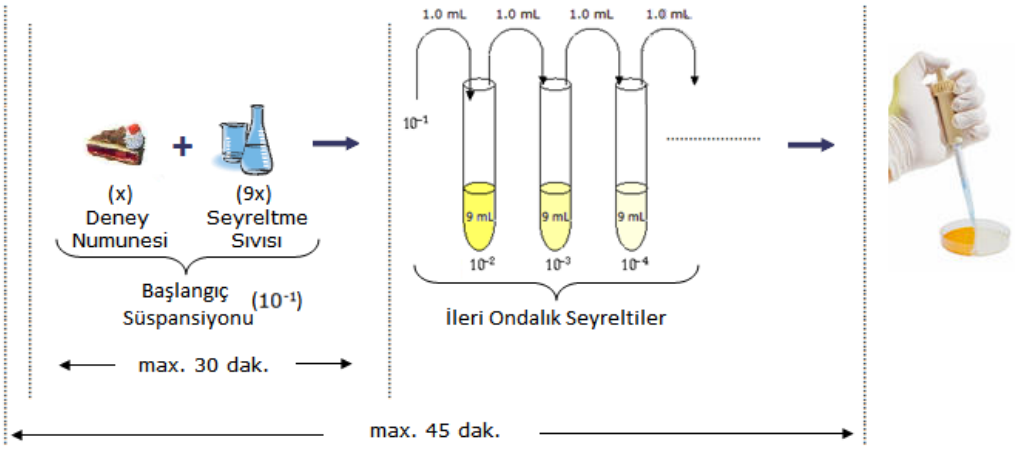
Her seyreltı için yeni bir pipet ucu kullanılması gerekir. Başlangıç süspansiyonundan pipetle 1 mL alınarak, 9 mL steril seyreltme sıvısı içeren tüpe aktarılır (1:9) ve 5-10 saniye karıştırılarak 10^{-2}'lik seyrelti elde edilmiş olur. 10^{-2}'lik seyreltiden 1 mL alınarak 9 mL steril seyreltme sıvısı içeren tüpe aktarılıp, karıştırıldıktan sonra 10^{-3}'lük dilüsyon hazırlanmış olur. Benzer işlemler tekrarlanarak ileri dilüsyonlar hazırlanır (Şekil 2).

NOT 9: Optimal sonuç alabilmek için, pipet başlangıç süspansiyonunun içine 1 cm'den daha fazla girmemelidir. Başlangıç süspansiyonunun belirtilen hacmine 1 mL ± % 5 hata payı ile inokulum aktarmak kabul edilmektedir.

4.9.3. İşlem süresi

Özel olarak belirtilmedikçe, başlangıç süspansiyonunun hazırlanmasının başlangıcından, ondalık seyreltilerin hazırlanmasının başlangıcına kadar geçen süre 30 dk ile sınırlıdır. Ayrıca başlangıç süspansiyonunun hazırlanmasından kültür besiyerine ekim anına kadar geçen süre 45 dakikayı geçmemelidir (Şekil 2).

NOT 10: Laboratuvarın sıcaklığı çok yüksekse, uygun sıcaklığa düşürülmelidir.



Şekil 2. Başlangıç süspansiyon ile dilüsyon ve ekim işlemleri arasındaki süre ile dilüsyon hazırlama

5. KAYNAKLAR (REFERANSLAR)

- ISO 6887-1/2017, Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- ISO 6887-2/2017, Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.
- ISO 6887-3/AMD 1, 2020, Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products — Amendment 1: Sample preparation for raw marine gastropods
- TS EN ISO 6887-3/A1, Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products - Amendment 1: Sample preparation for raw marine gastropods, 2021
- ISO 6887-4/2017, Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products
- TS EN ISO 6887-5/2020, Gıda ve hayvan yemlerinin mikrobiyolojisi- Mikrobiyolojik muayene için deney numunelerinin, başlangıç süspansiyonların ve ondalık seyreltilerin hazırlanması için genel kılavuz-Bölüm 5: Süt ve süt ürünlerinin hazırlanması için özel kurallar.
- ISO 13307/2013,Microbiology of food and animal feed -Primary production stage – Sampling techniques
- TS EN ISO 7218/A1, Gıda ve hayvan yemlerinin mikrobiyolojisi- Mikrobiyolijik analizler için genel şartlar ve rehber, 2014.
- TS EN ISO 19458, Su kalitesi - Mikrobiyolojik analizler için numune alma, 2006.
- TS EN ISO 22174, Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi- Gıda kaynaklı patojenlerin tespiti için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)- Genel kurallar ve tarifler, 2008.
- ISO 18593, Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs, 2018.
- TS EN ISO 13366-1/AC Süt - Somatik Hücrelerin Sayılması - Bölüm 1: Mikroskobik Yöntem (Referans Yöntem), 2010.
- Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara.