

FECAL COLIFORME BAKTERIER, MPN-METODEN (MOST PROBABLE NUMBER METHOD)

Anvendelsesområde

Metoden kan anvendes på fisk og fiskeprodukter og matvarer av tilsvarende art som ikke er konservert ved hjelp av salting eller kjemiske konserveringsmidler.

Definisjon

Med fecal coliforme bakterier etter denne metoden forstås Gram-negative, ikke sporedannende stavbakterier som vokser aerobt og fakultativt anaerobt og forgjærer laktose med dannelse av syre og gass etter inkubasjon i 24 timer ved 44°C.

Prinsipp

Antall fecal coliforme bakterier bestemmes ved primær-utsæd i et moderat selektivt, flytende medium som inneholder laktose. Etter inkubasjon ved 37°C i 48 timer registreres de kulturrør som har gassdannelse og et passende inokulum overføres til et nytt selektivt medium som inkuberes i 24 timer ved 44°C. Rør med gassdannelse registreres og resultatet angis som fecal coliforme bakterier pr. ml eller pr. gram av den ufortynnede prøve.

Medier1. Lauryl sulfat tryptose buljong (LST)

Sammensetning:

Tryptose	20 g
Laktose	5 g
Dikaliumfosfat	2.75 g
Kaliumfosfat	2.75 g
Natriumklorid	5 g
Natriumlauryl sulfat	0.1 g
Destillert vann	1000 ml
pH	6,8

2. EC medium

Sammensetning:

Tryptose	20 g
Laktose	5 g
Natriumklorid	5 g
Gallesalt	1.5 g
Dikaliumhydrogenfosfat	4 g
Kaliumdihydrogenfosfat	1.5 g
pH justeres til	6,8

Mediene forhandles dehydrert. De dehydrerte medier løses opp i destillert vann, blandingen rystes kraftig, og pH justeres.

Videre fordeles mediene på kulturrør som er forsynt med omvendte Durhamrør. Det fylles 10 ml substrat i hvert rør, og rørene med substrat autoklaveres ved 121°C i 15 minutter.

3. Fortynningsvæske

Saltvann-pepton-oppløsning:

Natriumklorid	8,5 g
Pepton	1 g
Destillert vann	1000 ml
pH justeres til	7,2 ±0,1

Substratet autoklaveres ved 121°C i 15 minutter. Før bruk skal fortynningsvæsken være avkjølt til romtemperatur.

Apparatur

- Sterile pipetter for avmåling av 10, 1 og 0,1 ml
- Sterile kulturrør, forsynt med kork, 20 og 10 ml
- Durhamrør, 40 x 4-6 mm
- Kolber eller flasker på 200 ml til fortynningsvæske
- Homogeniseringsutstyr for prøver av faste næringsmidler

Utførelse

Uttak av prøvene. Prøver til bakteriologisk undersøkelse må være minst 50 gram. Prøveuttak skal utføres aseptisk. Prøven homogeniseres, og det veies ut 10 gram. Prøven kan også finfordeles ved hjelp av kniv, saks eller skalpell, og det veies ut 10 gram av de finfordelte stykkene slik at uttaket representerer et gjennomsnitt.

Fortynning. 10 gram av prøven fortynnes med 90 ml fortynningsvæske. Blandingens homogeniseres i 3 minutter i en Stomacher, eller

annet homogeniseringsutstyr som gir tilsvarende resultat. Videre lages en dekadisk fortynningsserie ved å pipettere ut 1 ml av blandingen som overføres til 9 ml fortynningsvæske. Ved hver fortynning rystes blandingen nøye, eventuelt ved hjelp av en Whirlmikser.

Utsæd. Tre rør med ferdig substrat av Lauryl sulfat buljong tilsettes 1 ml av fortynningen 1:10. Tre rør tilsettes 1 ml av fortynningen 1:100 og videre tre rør tilsettes 1 ml av fortynningen 1:1000. Fortynning av prøven blir da serier på 0,1, 0,01 og 0,001 gram. Ved større forekomster av fecal coliforme bakterier må ytterligere fortynningsserier utføres. Tiden som går med fra første fortynning påbegynnes til inokuleringen er ferdig utført, bør ikke overstige 15 minutter.

Inkubasjon. De ferdig inokulerte rørene inkuberes i termostatregulert varmeskap ved 37°C i 48 timer.

Fra kulturrør hvor den konkave del av Durhamrøret er fylt med gass, eller det stiger opp gass i substratet ved rysting, overføres ved hjelp av en podenål et inokulum til kulturrør med EC medium forsynt med Durhamrør. Rørene inkuberes i et termostatregulert vannbad ved 44°C ±0,1°C. Vannstanden skal være så høy at den overstiger mediet i kulturrørene.

Avlesing. Avlesing foretas etter inkubasjon i 24 timer. Kulturrør hvor den konkave del av Durhamrøret er fylt med gass, eller det stiger opp gass i substratet ved rysting, registreres som positive. Ut fra antall registrerte positive rør ved hver fortynning, avleses resultatet i MPN-tabellen (McCraeys tabell) og angis som antall fecal coliforme bakterier pr. gram av den ufortynnede prøven.

Identifikasjon. For verifisering av Escherichia coli utføres IMVIC (Indol, methylrødt, Voges Proskauer og Citrat)-reaksjonene på renisolerte kolonier fra positive EC rør. Kolonier som gir reaksjonene ++ -- eller -+--- angis som E. coli.

Henvisning

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Chapter 24, 1976. American Public Health Association. Washington DC 20036.

Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11th Edition 1970.