

COLIFORME BAKTERIER, PLATESPREDNINGSMETODEN

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 coliforme bakterier etter denne metoden forstås Gram-negative, ikke sporedannende stavbakterier som vokser aerobt og fakultativt anaerobt og forgjærer laktose med dannelselse av syre etter inkubasjon i 20 til 48 timer ved 37°C.

Prinsipp

Coliforme bakteriers antall bestemmes ved utsæd av kjente mengder av prøven i et egnet, selektivt medium som inneholder laktose og en pH-indikator. Etter inkubasjon ved 37°C i ca. 20 timer telles typiske laktose-forgjærende kolonier, og resultatet angis som coliforme bakterier pr. ml eller pr. g av den ufortynnede prøve. Uspesifikke kolonier undersøkes på nytt etter inkubasjon i 48 timer.

Medier1. Rødviolett galleagar

Sammensetning:

Agar	15 g
Gallesalt	1,5 g
Gjærekstrakt	3 g
Krystallfiolett	0,002 g
Laktose	10 g
Natriumklorid	5 g
Nøytralrødt	0,03 g
Pepton	7 g
Destillert vann	1000 ml
pH	7,4

2. MacConkey buljong

Sammensetning:

Pepton	20 g
Laktose	10 g
Oksegalle	5 g
Bromkresol purpur	0,01 g
Destillert vann	1000 ml
pH	7,3 \pm 0,1

Ferdig komponerte medier forhandles i dehydrert form. Mediene løses opp i destillert vann og henses ca. 5 minutter. Deretter rystes blandingen kraftig og pH justeres.

3. Fortynningsväske

Salt-vann-pepton-oppløsning:

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

Substratet autoklaveres ved 121°C i 15 minutter. Før bruk skal fortynningsväsken avkjøles til romtemperatur.

Apparatur

- Pipetter, sterile, for avmåling av 10, 1 og 0,1 ml
- Petriskåler, sterile, 9 cm i diameter
- Rør, 20 ml, sterile
- Kolber eller flasker, 200 ml, til fortynningsväske
- 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 g. Alternativt kan prøven finfordeles ved hjelp av kniv, skalpell eller saks, og det veies ut 10 g av de finfordelte stykkene.

Fortynning. 10 g av prøven fortynnes med 90 ml fortynningsväske. Blandingen homogeniseres 3 minutter i en Stomacher eller homogeniseringsutstyr som gir tilsvarende god homogenisering. Videre lages en dekadisk fortynningsrekke ved å pipettere ut 1 ml av blandingen som overføres til 9 ml av fortynningsväske. Ved hver fortynning må

blandingen nøye rystes, eventuelt ved hjelp av en Whirlmikser.

Utsæd. Fra en passende fortynning utpipetteres parallelt i 2 petriskåler 1 ml av prøven. Når det arbeides med ukjent prøvemateriale må det sås ut fra så mange fortynninger at antall kolonier etter inkubering ikke overstiger 150 pr. skål.

Etter at prøvemateriale er utpipettert i skålene, fylles ca. 12 ml smeltet Rødviolettgalleagar med en temperatur på 45°C i hver petriskål, og prøven fordeles godt i mediet. Tiden som går med fra første fortynning påbegynnes til mediet er fylt i skålene, bør ikke overstige 15 minutter.

Etter at mediet er stivnet i skålene påfylles smeltet Rødviolett galleagar i et tynt lag på overflaten.

Inkubasjon. Petriskålene inkuberes med bunnen opp i et termostatregulert varmeskap ved 37°C i 48 timer.

Avlesing. Avlesing foretas tidligst etter ca. 20 timer. Mørkerøde kolonier med diameter minst 0,5 mm og med en omgivende rødfarget sone med presipitat er karakteristisk for de coliforme bakterier. Negative eller ukarakteristiske kulturer avleses på ny etter 48 timer. Kolonier av coliforme bakterier telles, eventuelt ved hjelp av en koloniteller. Antall kolonier telles på hver av de 2 skålene og gjennomsnittet beregnes. Ut fra antallet coliforme bakterier i gjennomsnitt av 2 skåler, og den anvendte mengde og fortynning, regner en ut antall coliforme bakterier pr. ml eller g av den ufortynnede prøve.

Verifisering. Koloniene fra Rødviolett galleagar overføres til MacConkey buljong som inkuberes i 48 timer ved 37°C. Kolonier som gir syre og gassproduksjon avleses som verifiserte coliforme bakterier.

Henvisning

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Chapter 24, 1976. American Public Health Association, Washington DC 20036
International Standard ISO General Guidance for Enumeration of Coliforms. Colony Count Technique.