

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

Prinsipp

Antall coliforme bakterier bestemmes ved utsåd i et moderat selektivt flytende medium som inneholder laktose. Etter inkubasjon ved 37°C i 48 timer registreres antall kulturrør med gassdannelse, og resultatet angis som presumtivt antall coliforme bakterier pr. ml eller pr. g 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. MacConkey buljong

Sammenstning:

Pepton	20 g
Laktose	10 g
Oksegalle	5 g
Bromkresol purpur	0,01 g
Destillert vann	1000 ml
pH justeres til	7,3

3. Brilliantgrønt-laktose gallesalt buljong

Sammensetning:

Pepton	10 g
Laktose	10 g
Oksegalle	20 g
Brilliantgrønn	0,0133 g
Destillert vann	1000 ml
pH justeres til	7,3

Mediene forhandles dehydrert. De dehydrerte medier løses 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.

4. Fortynningsvæske

Saltvann-pepton-oppløsning:

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

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 40x8 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 g 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 fortynningsrekke 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 Laurylsulfat-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 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 termostat-regulert varmeskap ved 37°C i 48 timer.

Avlesing. Avlesing foretas etter inkubasjon i 48 timer. Kulturrør hvor den konkave del av Durhamrøret er fylt av 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 (McCraideys tabell) og angis som antall coliforme bakterier pr. gram av den ufortynnede prøven.

Verifisering. For verifisering av reaksjonen overføres kulturen til et mer selektivt medium som inkuberes i 48 timer ved 37°C. Det kan benyttes MacConkeys buljong hvor både gass og syreproduksjon kan avleses, eller Brilliantgrønt laktose gallesaltbuljong benyttes hvor bare gassproduksjon kan observeres.

Positive rør med henholdsvis syre og gassproduksjon eller bare gassproduksjon registreres, og det verifiserte resultat avleses i MPN-tabellen (McCraideys tabell).

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. Most Probable Number Method.