

TOTALT ANTALL LEVENDE BAKTERIER

Anvendelsesområde

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

Definisjon

Med totalt antall levende bakterier etter denne metoden forstås de bakterier eller bakterieansamlinger som vokser aerobt med dannelselse av synlige kolonier etter inkubasjon ved 25°C i 72 timer.

Prinsipp

Totalt antall levende bakterier bestemmes ved utsæd av kjente mengder av prøven på et egnet ikke-selektivt medium. Etter inkubasjon ved 25°C i ca. 72 timer telles synlige bakteriekolonier, og resultatet angis som totalt antall levende bakterier pr. ml eller pr. gram av den ufortynnede prøve.

Medier1. Plate count agar

Sammensetning:

Agar	15 g
Trypton	5 g
Gjærekstrakt	2.5 g
Glukose	1 g
Destillert vann	1000 ml
pH	7.0

Mediet forhandles dehydrert. Det dehydrerte mediet løses opp i destillert vann. Blandingen rystes kraftig, og pH justeres. Mediet oppvarmes i vannbad til koking, fordeles på kolber med ca. 250 ml i hver og autoklaveres ved 121°C i 15 minutter. Etter avkjøling til 70-80°C fordeles mediet i petriskåler, ca. 12 ml i hver.

2. Fortynningsvæske

Saltvann-pepton-oppløsning:

Natriumklorid	8.5 g
Pepton	1 g
Destillert vann	1000 ml
pH	7.2

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

Apparatur

- a. Pipetter, sterile, for avmåling av 10, 1 og 0,1 ml
- b. Petriskåler, sterile, 9 cm i diameter
- c. Rør, 20 ml, sterile
- d. Kolber eller flasker, 250 ml
- e. Homogeniseringsutstyr

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. Blandingen 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. Fra passende fortynninger utpipetteres 0,1 ml som fordeles dråpevis på halve overflaten av en godt tørket petriskål med Plate count agar, 0,1 ml utgjør ca. 10 dråper. Parallellutsæd av tilsvarende prøvemengde sås ut på den andre halvdelen av overflaten. Hver petriskål gir således plass til 2 parallelle prøver. Tiden som går med fra første fortynning påbegynnes til prøven er sådd ut, bør ikke overstige 15 minutter. Skålene med prøvene tørkes godt, fortrinnsvis i en renluftsbenk, for at dråpene ikke skal renne ut over mediumoverflaten. Når det arbeides med ukjent prøvemateriale, må det sås ut på så mange fortynninger at antall kolonier etter inkubering ligger mellom 30-200 pr. prøve.

Inkubasjon. Petriskålene inkuberes i et termostatregulert varmeskap ved 25°C i 72 timer.

Avlesing. Skålene kontrolleres etter 48 timer for å undersøke eventuell rask vekst av enkelte kolonier som kan overvokse og skjule andre kolonier. I slike tilfeller utføres telling etter 48 timer. Ved telling nyttes koloniteller ($\times 1,5$) eller annen forstørrelse som

gir tilsvarende resultat. Alle synlige kolonier registreres. Det er viktig å skille bakteriekolonier fra partikler av prøvemateriale.

Beregning og angivelse av resultatet. Skåler som er overvokst av bakteriekolonier, eller hvor kolonier har forårsaket spredning av bakterievekst på overflaten, skal ikke benyttes i registreringen.

Skåler som har kolonier mellom 30-200 pr. prøve velges ut. For hver fortynning telles 2 parallelle prøver.

Resultatet for totalt antall levende bakterier pr. gram fremkommer ved å multiplisere gjennomsnittsresultatet for de 2 parallelle utsæd med den fortynningen som er benyttet.

Dersom 1 av 2 parallelle prøver ikke gir resultat på mellom 30-200 kolonier på en halvdel av petriskålen, kan likevel resultatene benyttes dersom koloniene med tydelighet kan registreres og telles.

Dersom to påfølgende fortynninger gir resultat som er mellom 30-200 kolonier, beregnes gjennomsnittet for hver fortynning. Resultatet angis som gjennomsnitt for begge fortynninger med mindre det høyeste registrerte resultat for en av fortynningene er mer enn dobbelt så stort som resultatet fra den andre fortynningen. I slike tilfeller benyttes bare resultatet fra den fortynning som gir det laveste resultat.

Etter at beregning er foretatt, angis resultatet som totalt antall levende bakterier pr. ml eller pr. gram av prøven.

Henvisning

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Chapter 4, 1976. American Public Health Association, Washington D.C. 20036.

International Standard ISO. General Guidance for Examination of Total Colony Count.