



Köttfärs i butik. Foto:
Wikimedia Commons

Laboration i mikrobiologi

Bakteriehalt i livsmedel

I livsmedels hygieniska undersökningar är man intresserad av att dels kunna påvisa förekomst av eventuella sjukdomsalstrande bakterier, dels kontrollera att livsmedlet inte innehåller för stora mängder av sådana mikroorganismer som förstör smak, konsistens och näringsvärde. Hög halt av mikroorganismer i matvaror behöver i och för sig inte innebära att dessa är farliga att äta. I produkter som filmjolk, ost och bagerijäst utgör mikroorganismerna en nödvändig ingrediens.

Vid bakteriologiska undersökningar av livsmedel utförs förutom bestämning av total antalet bakterier även bestämning av koliforma bakterier. Inom denna grupp finner man bl.a. *E. coli*, som normalt förekommer i stora mängder i människans tarmkanal och oftast är helt ofarlig. Förekomsten av *E. coli* i ett livsmedel eller i ett vatten ger dock en fingervisning om att även andra tarmbakterier kan förekomma i produkten t ex *Salmonellabakterier*.

Vissa arter inom den koliforma gruppen finns normalt i jorden och på växtmaterial därför visar ett positivt prov inte nödvändigtvis en fekal förorening, d v s direkt kontakt med avföring eller föremål som förorenats med detta. Om det finns koliforma organismer i ett livsmedel visar detta att produkten förorenats på något sätt. Möjliga föroreningskällor är t.ex. smutsiga maskiner, förorenat vatten eller dåligt tvättade händer hos någon som kommit i kontakt med livsmedlet.

Köttfärs och korv kan innehålla upp till 10⁶ bakterier per gram utan att det behöver märkas. Stora mängder koliforma bakterier i en produkt visar att det funnits möjlighet till kraftig förökning av bakterier, vilket beror på att livsmedlet förvarats vid fel temperatur. Det finns då risk för att även patogena bakterier av släkten som *Salmonella*, *Shigella* och *Stafylococcus* har massförökats. Hur livsmedlens bakteriehalt är beroende av olika förvaringstemperatur kan undersökas, liksom betydelsen av olika konserveringsmetoder. Som testmaterial kan köttfärs, smörgåspålägg, färdiglagade maträtter, mejeriprodukter som glass, filmjolk m.m. användas.

Laborationens syfte är att bestämma dels totalantalet bakterier i ett livsmedel, dels antalet koliforma bakterier i några olika livsmedelsprover.

Säkerhet Det kan finnas sjukdomsframkallande bakterier i livsmedelsproverna. Öppna därför inte plattorna efter uppodlingen och renodla inte bakterier från de uppodlade plattorna.



Material och kemikalier

- Mortel med pistill (sterila) om livsmedelsprovet behöver malas sönder
- Sked, skalpell eller spatel (sterila)
- 1 ml pipetter (proppade och sterila), 5 st
- Petriskålar, 10 st
- Violett-gallagar (VGA), 100 ml, 45-50°C
- Nutrientagar (NA), 100 ml, 45-50°C
- 1 flaska med 45 ml sterilt peptonvatten (0.1 % pepton, 0.9 % NaCl per liter)
- 4 rör med 9 ml sterilt peptonvatten (5 rör om livsmedlet förvarats i rumstemperatur.)
- Bomull
- Gasbrännare
- 70%-ig spritlösning
- Värmeskåp, 35°C
- Utförande

Utförande 1. Torka av bänkytan med 70 % spritlösning.

2. Invägning

Väg in ett representativt prov på 5 gram av det livsmedel som ska undersökas. Väg direkt i en steril flaska eller mortel. Använd sterila verktyg. Flytande livsmedel späds direkt enligt punkt fyra nedan.

3. Homogenisering

Tillsätt 45 ml sterilt peptonvatten till provet. Skaka flaskan eller mal sönder provet i morteln. När provet är väl homogeniserat får blandningen stå orörd i ca 10 minuter.

4. Spädningsserie

Efter ca 10 minuter görs en spädningsserie enligt följande för att få följande utspädningar 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} och 10^{-5} . (Se figur nedan.) Späd ytterligare ett steg om livsmedlet förvarats i rumstemperatur) (Spädningen 10^{-1} är blandningen i flaskan eller morteln). Märk 4 alternativt fem provrör som innehåller peptonvatten. En ml av homogenatet (10^{-1}) överförs med steril pipett till ett rör med 9 ml sterilt peptonvatten. Efter omskakning överförs med ny pipett en ml av denna blandning (10^{-2}) till ett nytt rör med 9 ml peptonvatten osv. Detta upprepas tills utspädningen 10^{-5} eller 10^{-6} nåtts.

5. Ingjutning

Märk de 10 eller 12 petriskålarna med namn och utspädningsgrad enligt figuren på nästa sida. Märk undersidan av skålarna.

Överför med steril pipett 1 ml-portioner av de olika spädningarna till respektive skålar. Om man börjar med den mest utspädda lösningen (10^{-5} eller 10^{-6}) och går mot mindre utspädningar, så kan samma pipett användas. Det ska vara två petriskålar med samma utspädning. Sug upp och blås ut pipetten ett par gånger vid övergång till ny spädning.

Håll snarast möjligt ca 15 ml smält NA (45°C) i fem alternativt sex av petriskålarna (märkning 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) och blanda om genom att försiktigt rotera skålarna. I fem skålar alternativt sex (märkning 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) hålls på samma sätt VGA för test på coliforma bakterier. (I skålarna med VGA kan hållas ett tunt skikt av samma agar för att på så sätt gjuta in alla bakterier. Avläsningen av resultatet underlättas då)

6. Inkubering

När agarn stelnat vänds skålarna och inkuberas vid 35°C under 1 dygn för VGA och tre dygn för NA. Plattorna kan avläsas vid senare tillfälle om de förvaras i kylskåp.



7. Avläsning

Vid avläsning av totalhalt bakterier väljer man ut en NA-platta som beräknas innehålla mellan 30 och 300 kolonier. Vid avläsning av antalet koliforma bakterier väljs en VGA-platta som innehåller maximalt 100 kolonier. (Övriga skålar används ej.) Räkna samtliga kolonier genom att markera med en tuschpenna på skålens undersida. (OBS! Kolonierna på NA-plattorna kan vara mycket små och kräva förstoring för avläsning.) Beräkna antalet bakterier per gram livsmedel.

Figur över utförandet

Flaska eller mortel
med 45 ml pepton-
vatten + prov 5g



1 ml tas från
blandningen till
första spädnings-
röret

1 ml tas från respek-
tive provrör till NA-
plattor
1 ml tas från respek-
tive provrör till VGA-
plattor

