

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobien lukumäärän määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka maljavalumenetelmällä.

Mikrobien lukumäärän määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka maljavalumenetelmällä.

1 Menetelmäviitteet ja poikkeamat

ISO 4833-1:2013

(PCA 30 °C/72 h; vesinäytteet 25 °C/72 h)

- 1) Menetelmää sovelletaan sisäisessä laadunvarmistuksessa Eviran vesinäytteiden tutkimiseen, jolloin maljojen inkubointilämpötila on 25 °C/72 h.
- 2) Siirrostettava näytemäärä voi olla myös 0,1 ml.
- 3) Elatusaineen toimivuutta ei varmisteta ISO 11133 –standardin mukaisesti vaan muunnetulla hajotusviljelymenetelmällä.

2 Menetelmän tarkoitus ja soveltamisala

Standardin ISO 4833 osat 1 ja 2 soveltuvat mikro-organismien lukumäärän määrittämiseen

- 1) elintarvikkeista ja rehuista
- 2) elintarvikkeiden ja rehujen tuotanto- ja käsittely-ympäristönäytteistä

Standardin 4833 osa 1 soveltuu

- 1) Tuotteille, joista halutaan määrittää luotettavasti pieniäkin pitoisuuksia (maljavalu).
- 2) Tuotteille, joissa oletetaan kasvavan maljalla leviäviä pesäkkeitä, jotka peittävät alleen muut mikro-organismit. Tällaisia tuotteita ovat esim. maito ja maitotuotteet, joissa todennäköisesti esiintyy Bacillus-suvun bakteereita

Tämä standardi ei sovellu tietyille fermentoiduille elintarvikkeille.

Joillekin matriiseille menetelmä saattaa antaa poikkeavia tuloksia verrattuna menetelmän osaan 2.

Menetelmää käytetään mikro-organismien lukumäärän määrittämiseen elintarvikkeista, raakamaidosta, rehuraaka-aineista, entsyymivalmisteista ja biologisista torjunta-aineista pesäkelaskentatekniikalla 30 °C:ssa. Menetelmää sovelletaan myös TUTOn vesinäytteiden tutkimiseen sisäisessä laadunvarmistuksessa.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobien lukumäärän määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka maljavalumenetelmällä.

3 Määritelmä

Mikro-organismeilla tarkoitetaan laskettavissa olevia pesäkkeitä muodostavia bakteereja, hiivoja ja homeita, jotka kasvavat menetelmässä kuvatuissa olosuhteissa.

4 Periaate

Näyte viljellään maljavalutekniikalla. Maljoja inkuboidaan aerobisesti $30 \pm 1 \text{ °C} / 72 \pm 3\text{h}$, vesinäytteitä $25 \pm 1 \text{ °C} / 72 \pm 3\text{h}$. Pesäkkeet lasketaan. Pesäkemäärien perusteella lasketaan mikro-organismien määrä millilitrassa tai grammassa näytettä.

5 Mahdolliset virhelähteet

Liukenematon tai saostunut materiaali voi muistuttaa pesäkettä. Tarvittaessa käytetään suurennusta, stereomikroskooppia tms.

Kaikki näytteen mikrobit eivät tule esille, myös yhteen kasvaneiden tai levinneiden pesäkkeiden tulkinta voi olla vaikeaa.

Näytteen aiheuttaman samentuman vuoksi pienet laimennokset voivat olla hankalia laskea.

6 Työturvallisuus

Mikrobiologisessa laboratoriossa työskennellessä noudatetaan toimintaohjetta LAB 223.

7 Laitteet ja välineet

- 1) Mikrobiologinen perusvälineistö
- 2) Stomacher-homogenisaattori ja steriilejä Stomacher-400 pusseja
- 3) Lämpökaappi $30 \pm 1 \text{ °C}$
- 4) Lämpökaappi $25 \pm 1 \text{ °C}$

8 Elatusaineet ja reagenssit

- 1) Peptonisuolaliuos, peptoni 0,1%, suola 0,85% (PEPSU), mikäli toimintaohjeessa LAB 728 ei toisin mainita
- 2) Plate count agar (PCA) esimerkiksi 100 tai 200 ml:n pulloissa
- 3) PCA, johon lisätty rasvatonta maitojauhetta 1,0 g/l (MPCA) 100 tai 200 ml:n pulloissa

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobien lukumäärän määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka maljavalumenetelmällä.

9 Kontrollikannat

Menetelmässä ei käytetä kontrollikantoja.

10 Näytteen esikäsittely

Sulata tarvittava määrä PCA:a vesinäytteitä ja muita elintarvikenäytteitä kuin maitovalmisteita tutkittaessa ja MPCA:a maitovalmisteita tutkittaessa. Temperoi agar (toimintaohje LAB 702). Jos ongelmana ovat leviävät pesäkkeet, varaa agarია myös pintakerrosta varten.

Esikäsittele näyte tarvittaessa toimintaohjeen LAB 702 mukaan. Tee tarvittavat laimennokset esimerkiksi toimintaohjeen LAB 728 mukaisesti tai sovi niistä vastuuhenkilön kanssa.

11 Suoritus

Viljele nestemäisestä näytteestä/alkususpensiosta ja/tai laimennoksista joko 1 ml tai 0,1 ml rinnakkaisille maljoille. Kaada maljoille noin 12 - 15 ml temperoitua PCA:a/MPCA:a, sekoita hyvin ja anna jähmettyä (toimintaohje LAB 702). Vala agar näytteiden päälle viimeistään 45 minuutin kuluttua ensimmäisten laimennusten tekemisestä.

Mikäli näytteestä epäillään kasvavan leviäviä pesäkkeitä, vala pintakerrokseksi noin 4 ml PCA:a/MPCA:a/vesiagarია ja anna jälleen jähmettyä.

Inkuboi maljoja 30 ± 1 °C / 72 ± 3 h, mikäli tutkit elintarvike- tai rehunäytteitä ja 25 ± 1 °C / 72 ± 3 h, mikäli tutkit vesinäytteitä.

11.1 Kontrollit

Tee PCA:sta/MPCA:sta steriiliyskontrollit tarvittaessa toimintaohjeen LAB 702 mukaisesti.

11.2 Pesäkkeiden laskeminen

Laske pesäkkeet maljoilta, joilla on enintään 300 pesäkettä toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti. Kaikki erikokoiset, myös pienet pesäkkeet lasketaan, samoin hiivat ja homeet. On kuitenkin varottava laskemasta muita hiukkasia (liukenematon näyte, pöly).

HUOM! Homeiden määrä merkitään erikseen, mikäli mahdollista (esim. jos maljalla 50 muuta pesäkettä ja 4 homepesäkettä, merkitään esimerkiksi 50 + 4 home).

12 Varmistuskokeet

Menetelmässä ei käytetä varmistuskokeita.

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobien lukumäärän määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka maljavalumenetelmällä.

13 Tulokset

13.1 Tulosten laskeminen

Laske tulos toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti.

13.2 Tulosten ilmoittaminen

Ilmoita tulos pesäkelukuna grammassa (pmy/g) tai millilitrassa (pmy/ml) näytettä toimintaohjeen LAB 703 mukaisesti.

14 Menetelmän validointi

Menetelmän validointitulokset on esitetty viitemenetelmässä ja raportissa ISO 4833:2003. Microbiology – General guidance for the enumeration of micro-organisms - Colony count technique at 30 °C.

15 Menetelmän status

Standardimenetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Kansainvälisen menetelmäkokoelman menetelmä	<input type="checkbox"/>
Virallinen menetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Referenssimenetelmä	<input checked="" type="checkbox"/>
Sisäinen menetelmä	<input type="checkbox"/>

16 Laadunvarmistusmenetelmät

Laboratorioiden väliset vertailututkimukset	<input checked="" type="checkbox"/>
Menetelmävertailut	<input type="checkbox"/>
Vertailukantojen käyttö	<input type="checkbox"/>
Siirrostetut näytteet	<input type="checkbox"/>
Rinnakkaismäärytykset	<input type="checkbox"/>

17 Liitteet

*ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of micro-organisms – Part 1: - Colony count technique at 30 °C by the pour plate technique.

*Alkuperäisen menetelmäohjeen liitteenä MIBIn ohjeyhdyshenkilön huoneessa.

18 Ohjeen laatijat

Tuula Johansson ja Tuula Pirhonen

Elintarvike- ja rehumikrobiologia

Mikrobien lukumäärän määrittäminen. Pesäkelaskentatekniikka maljavalumenetelmällä.

19 Muutokset edelliseen versioon

Lisätty Satu Hakolan sijasta Tuula Pirhonen ohjeen toiseksi laatijaksi.

Päivitetty ohje uusimman standardin mukaiseksi. Poistettu mm. kappele leviävien pesäkkeiden laskemisesta, koska siitä on kuvaus toimintaohjeessa LAB 703.