

Bestämning av presumtiv *Bacillus cereus* och sporer. Koloniräkningsteknik.

**Bestämning av presumtiv *Bacillus cereus* och sporer.
Koloniräkningsteknik.****1 Metodreferenser och avvikelser**

ISO 7932:2004

(Mossel 30 °C / 24 – 48 h, nöt- eller fårblodagar 30 °C / 24 – 48 h)

- 1) Bestämning av sporer har satts till som en del av metoden utgående från det inledande stycket i referensmetoden.

2 Metodens syfte och tillämpningsområde

Metoden lämpar sig för bestämning av presumtiv *Bacillus cereus* eller dess sporer i livsmedel och organiska gödselmedel med hjälp av koloniräkningsteknik vid 30 °C.

3 Definition(er)

B. cereus är en stor (cellens tjocklek >0,9 µm), grampositiv, fakultativt anaerob, sporbildande stavbakterie som inte använder mannitol och som i allmänhet producerar lecitinas, fermenterar glukos, reducerar nitrat till nitrit och bildar aceton. Den här metoden särskiljer inte arten *B. cereus* från bacillusarter som påminner om dem men som påträffas mera sällan (*B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. thuringiensis* och *B. mycoides*), och därför får man en presumtiv *B. cereus*-halt med metoden.

En hög halt av *B. cereus* (i allmänhet över 100 000 cfu/g) i livsmedel kan orsaka matförgiftning. Det finns två slag av matförgiftning, nämligen uppkastning och diarré. *B. cereus* förekommer allmänt i naturen, och kan därför lätt hamna i olika livsmedel. Den förekommer också i små halter (< 100 cfu/g) i råa livsmedel, exempelvis spannmål, ris, kött, grönsaker och mjölkkråvara. Bacillus kan också förekomma i mjölkprodukter, eftersom pastörisering inte förstör dess värmetåliga sporer. *B. cereus* bildar proteas och lecitinas som kan orsaka utfällning och smakfel i mjölkprodukter.

4 Princip

Provet hettas upp om man önskar bestämma sporhalten. Det uppvärmda eller ouppvärmda provet ympas som ytodling på ett selektivt substrat, plattorna inkuberas i 1–2 dygn i 30° C. De typiska kolonierna räknas och verifieras genom kontroll av tillväxtens typiskhet på icke-selektiv agarplatta. Utgående från resultatet räknas halten av presumtiv *B. cereus*-bakterie eller sporer/g eller /ml prov.

Bestämning av presumtiv *Bacillus cereus* och sporer. Koloniräkningsteknik.

5 Eventuella felkällor

Om kolonierna växer tätt på substratet förblir de små och atypiska.

Kolonier som är positiva med mannitol kan göra hela substratet gult, och då syns inte *B. cereus*-koloniernas typiska färg.

Lecitinasnegativa och svagt lecitinaspositiva kolonier är svåra att identifiera.

6 Arbetssäkerhet

Vid arbete i ett mikrobiologiskt laboratorium iakttas verksamhetsbeskrivning LAB 223.

7 Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) Stomacher homogenisator och sterila Stomacher 400 påsar
- 3) Värmeskåp 30 ± 1 °C

8 Substrat och reagenser

- 1) Peptonsaltlösning, pepton 0,1 %, salt 0,85 % (PEPSU), om inget annat föreskrivs i verksamhetsbeskrivning LAB 728
- 2) Mossel-agar (MOSSEL)
- 3) Nöt blodagar (NAVERI) eller får blodagar

9 Kontrollstammar

- 1) *B. cereus* EVIRA 594

10 Förbehandling av prov

Om sporhalten i ett prov ska bestämmas, upphettas det vätskeformiga provet eller den första spädningen av det fasta provet i vattenbad i 10 min i 80 °C som förstör de vegetativa cellerna. Därefter fortsätter man som normalt med att göra utspädningsserien.

11 Utförande

Späd ut provet enligt verksamhetsbeskrivning LAB 728. Spädningar som ska odlas väljs ut från fall till fall.

Torka plattorna vid behov innan de ympas genom att låta dem stå öppna i laminarskåp i ca 15 minuter.

Bestämning av presumtiv *Bacillus cereus* och sporer. Koloniräkningsteknik.

Odla lämpliga spädningar som utstryk på Mossel-agar. Odla parallella plattor av spädningarna.

Låt provet absorberas på plattorna så bra som möjligt genom att hålla dem med locket uppåt i rumstemperatur i ca 15 minuter före inkuberingen.

Om man vill öka metodens känslighet, kan man i stället för vanliga petriskålar (Ø 9 cm) använda stora skålar (Ø 14 cm), på vilka 1 ml prov ympas som ytstryk. Man kan också använda tre vanliga plattor, och odla sammanlagt 1 ml på dem. Odla parallella plattor.

Inkubera plattorna vid 30 ± 1 °C / 18 – 24 h. Om kolonierna inte syns tydligt därefter, fortsätt inkuberingen i ytterligare 18– 24 h.

11.1 Räkning av kolonier

Räkna kolonierna på plattor med mindre än 150 kolonier, helst i två spädningar efter varandra.

11.2 Val av kolonier för kontrollprov

11.2.1 Mossel

B. cereus växer på Mossel-plattor i form av stora, ljusst röda kolonier som i allmänhet omges av en grumlig zon.

Plattans och koloniernas ljusst röda färg påvisar att bakterien inte använder mannitol. Om det växer rikligt med organismer som använder mannitol på plattan, som då de producerar syra ändrar substratets färg till gul, kan den för *B. cereus* typiska ljusst röda färgen försvagas eller försvinna helt.

Den grumliga zonen orsakas av uppkomsten av lecitinas. Ibland producerar stammar av *B. cereus* mycket litet lecitinas eller inte alls. Typiska lecitinasnegativa och lecitinaspositiva kolonier kontrolleras.

12 Kontrollprover, blodagar

Kontrollera 5 kolonier på varje platta som du har räknat. Om mindre än 5 typiska/misstänkliga kolonier växer på plattan, kontrollera alla kolonier.

Kontrollen görs genom att odla de kolonier som ska kontrolleras på nöt- eller fårblodagar. Inkubera odlingarna vid 30 ± 1 °C / 24 ± 2 h. Odla vid behov som positiv kontroll stammen *B. cereus* EVIRA 594.

B. cereus växer på blodagar i form av stora, oregelbundna, gröngrå kolonier med matt yta, som i allmänhet omges av en stor hemolyszon. Hemolyszonens storlek kan variera, även icke-hemolytiska stammar förekommer.

Bestämning av presumtiv *Bacillus cereus* och sporer. Koloniräkningsteknik.

12.1 Sammandrag av kontrollproverna/-testerna

Agar	Kontroll av presumtiv <i>B. cereus</i>
Mossel-agar	Ljust röda kolonier som omges av en grumlig zon
Blodagar	Kolonierna är stora, oregelbundna, gröngrå med matt yta. I allmänhet en stor hemolyszon kring kolonin (hemolyszonens storlek kan variera eller hemolys kan saknas)

13 Resultat**13.1 Uträkning av resultaten**

Resultatet räknas enligt verksamhetsbeskrivning LAB 703 på basis av procentandelen kontrollerade kolonier.

13.2 Rapportering av resultaten

Resultatet anges enligt verksamhetsbeskrivning LAB 703 i form av antalet presumtiva *B. cereus*-bakterier eller om provet är upphettat, antalet presumtiva *B. cereus*-sporer per cfu/g eller cfu/ml prov .

14 Validering av metoden

Resultaten av valideringarna av metoden (Schulten etc. 1998) presenteras i referensmetoden.

15 Metodens status

Standardmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Metoden ingår i en internationell methodsamling	<input type="checkbox"/>
Officiell metod	<input type="checkbox"/>
Referensmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Intern metod	<input type="checkbox"/>

16 Metoder för kvalitetssäkring

Jämförande undersökningar mellan laboratorierna	<input checked="" type="checkbox"/>
Metodjämförelser	<input type="checkbox"/>
Användning av referensstammar/kontrollstammar vid behov	<input checked="" type="checkbox"/>
Ympade prover	<input type="checkbox"/>
Parallellbestämningar	<input type="checkbox"/>

Bestämning av presumtiv *Bacillus cereus* och sporer. Koloniräkningsteknik.

17 Referenser

ISO 7932: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Bacillus cereus* - Colony count technique at 30 °C.

Parry, J. M., Turnbull, P. C. B. and Gibson, J. R. (1983). A colour atlas of *Bacillus* species.

Schulten, S.M., Van de Lustgraaf, B.E.B., Nagelkerke, N.J.D & in 't Veld, P.H. Validation of Microbiological Methods, Enumeration of *Bacillus cereus* according to ISO 7932 (second edition). Report No. 286555001, National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, the Netherlands, 1998.

*Bilaga till den ursprungliga metodbeskrivningen i rum B214.

18 Ändringar sedan den tidigare versionen

13.10.2015

Den gamla kontrollstammen EELA 21 har bytts ut mot stam Evira 594 som nu används.

Det gamla numreringsystemet har ändrats till att motsvara nuvarande praxis. Anvisningen uppdaterades av: Tuula Johansson