

# Bestämning av mikrobernas antal. Koloniräkningstekning med ingjutningsmetoden.

## 1 Metodreferenser och avvikelser

ISO 4833-1:2013

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

- 1) Metoden tillämpas vid intern kvalitetssäkring för undersökning av Eviras vattenprover, skålarnas inkuberings temperatur är 25 °C/72 h.
- 2) Provmängd för ympning kan också vara 0,1 ml.
- 3) Att substratet fungerar säkerställs inte enligt standard ISO 11133, utan genom en modifierad spridningsteknik.

## 2 Metodens syfte och tillämpningsområde

Del 1 och 2 i standard ISO 4833 lämpar sig för bestämning av antalet mikroorganismer

- 1) i livsmedel och foder
- 2) i miljöprover då det gäller produktion och hantering av livsmedel och foder

Del 1 i standard 4833 lämpar sig för

- 1) Produkter där även små halter ska bestämmas tillförlitligt (ingjutning).
- 2) Produkter för vilka det antas växa utbredda kolonier på plattorna, och som täcker andra mikro-organismer. Sådana produkter är exempelvis mjölk och mjölkprodukter hos vilka det är sannolikt att bakterier av släktet *Bacillus* förekommer.

Denna standard lämpar sig inte för vissa fermenterade livsmedel.

Metoden kan ge avvikande resultat för vissa matriser jämfört med del 2 i metoden.

Metoden används för bestämning av antalet mikroorganismer i livsmedel, mjölkråvara, foder, foderråvaror, enzympreparat och biologiska bekämpningsmedel med koloniräkningsteknik vid 30 °C. Metoden tillämpas också vid analys av TUTO:s vattenprover inom den interna kvalitetssäkringen.

Livsmedels- och fodermikrobiologi

## Bestämning av mikrobernas antal. Koloniräkningstekning med ingjutningsmetoden.

---

### 3 Definition

Med mikroorganismer avses bakterier, jäster och mögel som bildar kolonier som kan räknas, och som växer under de betingelser som beskrivs i metoden.

### 4 Princip

Provet odlas med ingjutningsmetoden. Plattorna inkuberas aerobt vid  $30 \pm 1$  °C /  $72 \pm 3$ h, vattenprover vid  $25 \pm 1$  °C /  $72 \pm 3$ h. Kolonierna räknas. Utgående från antalet kolonier räknas mikroorganismernas antal i milliliter eller gram av provet.

### 5 Eventuella felkällor

Olösligt eller utfällt material kan påminna om en koloni. Vid behov används förstoring, ett stereomikroskop eller liknande.

Alla mikrober i provet syns inte, det kan även vara svårt att tolka sammanväxta eller utbredda kolonier.

På grund av grumligheten i provet kan det vara svårt att räkna små utspädningar.

### 6 Arbetssäkerhet

Vid arbete i mikrobiologiskt laboratorium iakttas verksamhetsbeskrivning LAB 223.

### 7 Utrustning och redskap

- 1) Mikrobiologisk basutrustning
- 2) Stomacher homogenisator och sterila Stomacher-400 påsar
- 3) Värmeskåp  $30 \pm 1$  °C
- 4) Värmeskåp  $25 \pm 1$  °C

### 8 Substrat och reagenser

- 1) Peptonsaltlösning, pepton 0,1 %, salt 0,85 % (PEPSU), om inget annat föreskrivs i verksamhetsbeskrivning LAB 728
- 2) Plate count agar (PCA) t.ex. i 100 eller 200 ml flaskor
- 3) PCA, till vilket har tillsatts fettfritt mjölkpulver 1,0 g/l (MPCA) i 100 eller 200 ml flaskor

### 9 Kontrollstammar

Kontrollstammar används inte för denna metod.

Livsmedels- och fodermikrobiologi

## Bestämning av mikrobernas antal. Koloniräkningstekning med injutningsmetoden.

---

### 10 Förbehandling av prov

Smält behövlig mängd PCA vid undersökning av vattenprover och andra livsmedelsprover än mjölkprodukter och MPCA vid undersökning av mjölkprodukter. Temperera agar (verksamhetsbeskrivning LAB 702). Om utbredda kolonier orsakar problem, reservera agar också för ytskiktet.

Förbehandla vid behov provet i enlighet med verksamhetsbeskrivning LAB 702. Gör lämpliga spädningar av provet, exempelvis enligt verksamhetsbeskrivning LAB 728 eller enligt överenskommelse med ansvarspersonen.

### 11 Utförande

Odlav ett flytande prov/en startsuspension och/eller spädningar antingen 1 ml eller 0,1 ml på parallella plattor. Håll cirka 12-15 ml tempererat PCA/MPCA på plattorna, blanda väl och låt stelna (verksamhetsbeskrivning LAB 702). Gjut agar på proverna senast 45 minuter efter de första spädningarna.

Om det misstänks att utbredda kolonier kan växa på provet, gjut ungefär 4 ml PCA/MPCA/vattenagar som ytskikt och låt åter stelna.

Inkubera plattorna vid  $30 \pm 1$  °C /  $72 \pm 3$  h om du undersöker livsmedels- eller foderprover och  $25 \pm 1$  °C /  $72 \pm 3$  h, om du undersöker vattenprover.

#### 11.1 Kontroller

Utför vid behov sterilitetskontroller av PCA/MPCA enligt verksamhetsbeskrivning LAB 702.

#### 11.2 Räkning av kolonier

Räkna kolonierna på plattor som har högst 300 kolonier i enlighet med verksamhetsbeskrivning LAB 703. Alla kolonier av olika storlekar, även små kolonier, räknas, liksom jäster och mögel. Man ska ändå se till att man inte räknar andra partiklar (olösligt prov, damm).

MÄRK! Antalet mögel antecknas om möjligt skilt (om det t.ex. finns 50 andra kolonier och 4 mögelkolonier på plattan antecknas exempelvis 50 + 4 mögel).

### 12 Konfirmeringstester

Konfirmeringstester används inte för denna metod.

Livsmedels- och fodermikrobiologi

## Bestämning av mikrobernas antal. Koloniräkningstekning med injutningsmetoden.

---

### 13 Resultat

#### 13.1 Uträkning av resultaten

Räkna ut resultatet enligt verksamhetsbeskrivning LAB 703.

#### 13.2 Rapportering av resultaten

Ange resultatet som antal kolonier per gram (cfu/g) eller per milliliter (cfu/ml) prov i enlighet med verksamhetsbeskrivning LAB 703.

### 14 Validering av metoden

Metodens valideringsresultat presenteras i referensmetoden och i rapporten ISO 4833:2003. Microbiology – General guidance for the enumeration of micro-organisms - Colony count technique at 30 °C.

### 15 Metodens status

Standardmetod	<input checked="" type="checkbox"/>
Metoden ingår i en internationell methodsamling	<input type="checkbox"/>
Officiell metod	<input checked="" 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	<input type="checkbox"/>
Ympade prover	<input type="checkbox"/>
Parallellbestämningar	<input type="checkbox"/>

### 17 Bilagor

\*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.

\*Bilaga till den ursprungliga metodbeskrivningen finns i kontaktpersonens (MIBI) rum.

### 18 Anvisningen sammanställdes av

Tuula Johansson och Tuula Pirhonen

Livsmedels- och fodermikrobiologi

Bestämning av mikrobernas antal. Koloniräkningstekning med injutningsmetoden.

---

## 19 Ändringar sedan föregående version

Tuula Pirhonen har lagts till som andra författare av anvisningen i stället för Satu Hakola.

Anvisningen har uppdaterats enligt den nyaste standarden. Bl.a. stycket om räkning av utbredda kolonier har tagits bort, eftersom detta beskrivs i verksamhetsbeskrivning LAB 703.