

Bakterier i fødevarer

A
B
C



Formål

Det er forsøgets formål at bestemme antallet af bakterier i en fødevareprøve.

Teori

En generel metode, man kan benytte til at optælle mikroorganismer, er den såkaldte tællemetode, hvor man benytter et tællekammer. Den kan bruges, når man kan se mikroorganismen med et almindeligt lysmikroskop. Det er desværre ikke tilfældet for langt de fleste bakterier, men metoden kan anvendes på store eukaryote celler såsom gærceller eller sædceller. Princippet er, at man optæller antallet af celler i en fortyndet opløsning, og idet man kender det volumen, man tæller på (og kender fortyndingsfaktoren), kan man fx omregne til antal celler pr. mL prøve.

Den metode, vi skal prøve her, bruges til at bestemme bakterieantallet, idet man her udnytter, at en isoleret bakterie vil danne en hel koloni (klon). Ved at tælle antallet af kolonier kan man bestemme antallet af bakterier i den oprindelige prøve. Kolonierne kan først ses med det blotte øje, når de består af ca. 125.000 bakterier. Derfor skal prøverne stå et stykke tid i et varmeskab ved 37 grader. Den enkelte bakterie kan dog ikke ses i et almindeligt lysmikroskop. Antallet af kolonier vil ofte være meget højt i en ufortyndet prøve, hvorfor det er nødvendigt med en kraftig fortynding – ofte helt op til en million gange eller mere!

I en fødevare som hakket oksekød (som bruges i forsøget) må der maksimalt være 5 millioner bakterier pr. gram kød, for at kødet er egnet som menneskeføde. Forsøget skulle gerne belyse, om denne maksimalværdi er overholdt. Vi går ikke ind og ser på typen af bakterie, men dette er også meget vigtigt i forbindelse med fødevarer. Er der tale om colibakterier, må antallet fx ikke overskride 500 bakterier pr. gram. Er det tilfældet, tyder det på fækal forurening (lort i maden!). Colibakterier er dog i sig selv ikke specielt farlige.

Man kan eventuelt undersøge to forskellige kødprøver – en som har ligget et døgn i køleskabet og en, som har ligget et døgn ved stuetemperatur. Herved får man et indblik i opbevaringstemperaturens betydning for antallet af bakterier i fødevarer.

Materialer

1 g hakket oksekød (evt. opbevaret hhv. i køleskab og ved stuetemperatur) → stamopløsning (til alle)

Hver gruppe:

3 petriskåle med vækstmedium, varmeskab, Drigalsky-spatler, sterilt saltvand, alkohol, bunsenbrænder/fyrfadsllys (til evt. sterilisering undervejs), pipetter, 10 mL måleglas, 5 reagensglas, mikropipette (0,1 mL)



Fremgangsmåde

- 1.** Gøres eventuelt af læreren før forsøget:
10 g hakket oksekød blandes omhyggeligt i et bægerglas med 90 mL sterilt saltvand (0,85 % NaCl).
Dette gøres ved at bruge en spatel. Homogeniser opløsningen så meget som muligt.
Dette er stamopløsningen, som alle grupper benytter (evt. 2 stamopløsninger – kød gemt i køleskab hhv. ved stuetemperatur).
Den oprindelige prøve er nu fortyndet med en faktor 10 (antagelse: 1 mL oksekød vejer 1 g).
Der fremstilles 3 petriskåle med agarplader til hver gruppe. Gøres ved at blande X LB-agar-tabletter med 50·X mL vand og autoklavere. Herefter hældes på petriskåle (vurder X ud fra antal petriskåle til forsøget).
Alle relevante materialer gøres sterile via autoklavering. Dette kan udføres som demonstration for eleverne. Det gælder glaspetriskåle, drigalsky-spatler, måleglas, reagensglas og som nævnt ovenfor – agaren til petriskålene.
Hvis der bruges plastpetriskåle og sterile engangsmaterialer (plastic), må de ikke autoklavere (smelter).
- 2.** Nu skal der laves en fortyndingsrække ud fra stamopløsningen, idet bakterieantallet formentlig er højt i stamopløsningen. For senere at kunne skelne de enkelte kolonier fra hinanden med henblik på at optælle dem, er en fortynding således påkrævet.
I fem reagensglas fyldes 9 mL sterilt saltvand.
Glassene mærkes hhv. x100, x1.000, x10.000, x100.000, x1.000.000
Nu overføres 1 mL fra stamopløsningen (væskefasen) til glasset markeret med x100. Herved er den oprindelige prøve fortyndet 100 gange. Bland godt med pipetten.
Nu overføres 1 mL fra glasset markeret med x100 til glasset markeret med x1.000. Igen blandes med pipetten. Nu er prøven fortyndet 1.000 gange. På lignende vis udtages 1 mL fra x1.000 og overføres til x10.000 osv.
- 3.** Nu arbejdes der kun videre med fortyndingerne x10.000, x100.000 og x1.000.000. De resterende prøver hældes i vasken, og reagensglassene rengøres grundigt.

Der overføres nu 0,1 mL via en mikropipette fra reagensglasset mærket x10.000 til en steril petriskål med vækstmedium i. Dråben placeres tæt ved kanten af petriskålen.

- 4.** Samtidig gøres en spatel steril ved at dyppe den i alkohol og kortvarigt holde den over en flamme fra et fyrfadsllys eller bunsenbrænder. Den lufttørres herefter kortvarigt, så den ikke er for varm til bakterierne. Evt. kan man berøre vækstmediet i petriskålen med spatelen inden man fordeles bakterierne. Man kan også bruge en autoklaveret spatel og derved undlade sprit + flamme (alternativt en steril engangsspatel).
Prøven fordeles over hele vækstmediets overflade ved at føre Drigalsky-spatlen hen over overfladen. Petriskålen lukkes med låg, og låget tapes fast. Det er meget vigtigt at arbejde så sterilt som muligt. Undgå unødigt berøring af petriskålen og undgå at hoste og nyse ned i den!
- 5.** Nu gøres nøjagtigt det samme med x100.000 og x1.000.000. Husk steril Drigalsky-spatel (eller ny engangsspatel)!
I alt haves nu 3 lukkede petriskåle med vækstmedium og fortyndede prøver.
- 6.** De tre petriskåle mærkes med holdnummer og klasse og sættes i varmeskab ved 37 grader til næste gang (24-48 timer).
- 7.** Efter inkubationen i varmeskabet undersøges petriskålene for bakterievækst.
De skåle, der har et passende antal kolonier (=muligt at tælle), optælles. Optælles fx 25 kolonier fra petriskålen markeret med x100.000, betyder det, at der er 25 bakterier i 0,1 mL ved en fortynding på 100.000. Det betyder 25 millioner bakterier pr. g (mL), hvilket altså er uacceptabelt iht. anbefalingerne, der maksimalt tillod 5 millioner pr. g.
- 8.** Resultatet indføres i resultatskemaet (se næste side).

RESULTATER

Tælling af bakterier

Gruppe nr.	Bakterier pr. gram kød	Køleskab / stuetemperatur
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		

Fejlkilder

Diskussion

Kommenter de forskellige bakterieoptællinger og vurder betydningen af opbevaring i køleskab.

Lever kødet generelt op til myndighedernes krav?

Hvad kan der ske, hvis man spiser kød med for højt bakterieantal?



Mere diskussion.....

