

Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek T.N.O., Utrecht

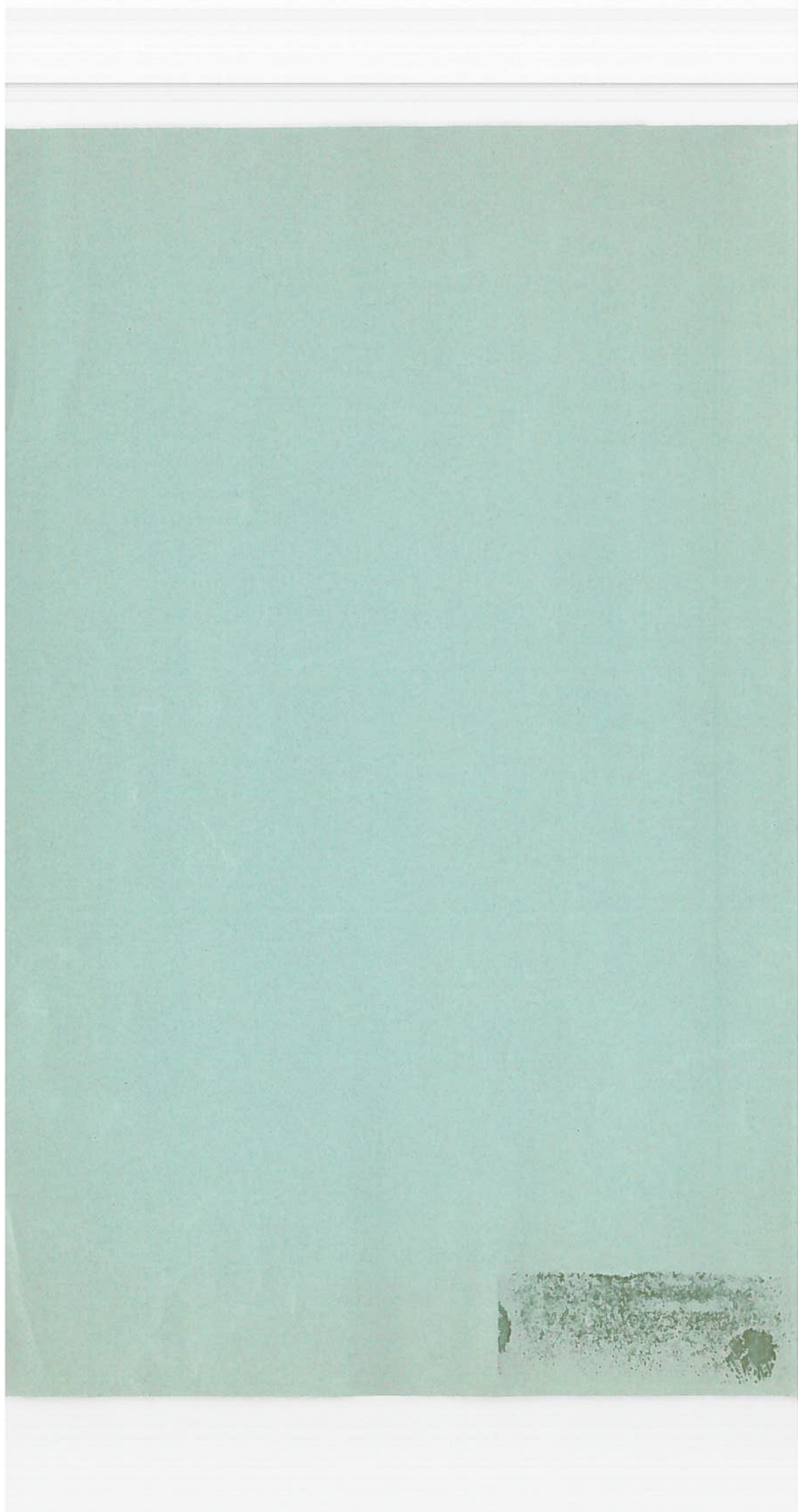
**METHODEN VAN ONDERZOEK
VOOR DE HYGIËNISCH-BACTERIOLOGISCHE
BEOORDELING VAN VOEDINGSMIDDELEN**



Overdruk uit Maandschr. v. Kindergeneeskunde 25 (1957) 51-62

TNO-VOEDING ZEIST
BIBLIOTHEEK

T: 14.857



METHODE VAN ONDERZOEK NR. MB I

Microscopisch kiemgetal

Beginsel

In een, volgens de methode van CHARLETT ontvet en gekleurd, preparaat worden de microscopisch waarneembare bacteriën en bacterie-groepen geteld.

Werkwijze

1. Breng op een zorgvuldig gereinigd objectglas ca 0.01 ml van een passende verdunning van het te onderzoeken produkt, spreid dit uit over ca 1 cm², laat drogen bij ca 55° C en fixeer.
2. Bedek het preparaat ca 10 sec. met een ex tempore bereid mengsel van 2 delen der, *in een stopfles in de ijskast bewaarde*, gefiltreerde oplossing I en 1 deel van de idem oplossing II.

Opl. I.	methyleenblauw	1 g	}	indien noodzakelijk: oplossen door verwarmen tot < 60° C
	ethanol, 96 %	54 ml		
	tetrachloorethaan	60 ml		
	ijsazijn	6 ml		
Opl. II.	basische fuchsine	1 g		
	ethanol, 70 %	200 ml		
3. Spoel het preparaat in een bekeerglas voorzichtig met leidingwater tot licht rose, droog aan de lucht en microscopeer met de olie-immersie.
Tel het *totale aantal bacteriën* in 25 willekeurig gekozen velden (N) en bereken hieruit het microscopische kiemgetal (K) met de formule $K = 2 \times 10^4 N$.

Literatuur

- BREED, R. S., The determination of the number of bacteria in milk by direct microscopical examination. Centralbl. Bakteriöl. Parasitenk. Abt. II, 30 (1911) 337—340.
- CHARLETT, S. M., An improved staining method for the direct microscopical counting of bacteria in milk. Dairy Inds 19 (1954) 652—653.

METHODE VAN ONDERZOEK NR. MB 2

Kiemgetal

Beginsel

Het aantal in trypton/glucose/gistextract/agar bij 32° C kweekbare bacteriën wordt geteld.

Werkwijze

1. Maak van het te onderzoeken produkt een passende serie decimale verdunningen met behulp van steriele fysiologische zoutoplossing.
2. Breng in drie petrischalen 1 ml van elk van deze verdunningen en meng deze zorgvuldig met ca 15 ml, na opsmelten tot ca 50° C afgekoelde, steriele agar van de volgende samenstelling:

trypton (Difco)	5 g	} in de handel als „Bacto Plate Count Agar” (B 479)
glucose	1 g	
gistextractpoeder (Difco)	2.5 g	
agar	15 g	
water	1 l	

pH = 7.0 ± 0.1

sterilisatie: 20 min/121° C

3. Bebroed, nadat de agar gestold is, bij 31 ± 1° C. Tel het aantal kolonies na 1, 2 en 3 dagen in platen, die tussen 30 en 300 kolonies bevatten.

Literatuur

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION and Association of Official Agricultural Chemists, Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 10th Ed. New York, 1953, p. 99.
- BABEL, F. J., E. B. COLLINS, J. C. OLSON, I. I. PETERS, G. H. WATROUS and M. L. SPECK, The standard plate count of milk as affected by the temperature of incubation. *J. Dairy Sci.* 38 (1955) 499—503.
- BUCHBINDER, L., Y. BARIS and L. GOLDSTEIN, Further studies on new milk-free media for the standard plate count of dairy products. *Amer. J. Public Health* 43 (1953) 869—872.

METHODE VAN ONDERZOEK NR. MB 3

Aantal anaeroob kweekbare bacteriën

Beginsel

Het *totale* aantal, bij 32° C, in sulfiet/ijzer/agar kweekbare bacteriën, alsmede het aantal *zwarte kolonies* (gevormd door pathogene, toxinogene en proteolytische clostridia alsmede door Salmonelleae), dat aldus ontstaat, wordt geteld.

Werkwijze

1. Maak van het te onderzoeken produkt een passende serie decimale verdunningen met behulp van steriele fysiologische zoutoplossing.
2. Breng in drie ovale cultuurbuizen volgens MILLER-PRICKETT (gefabriceerd door Corning Glass Works, (59—11 Crystal Street, Corning, N.Y., U.S.A.) onder cat. nr. 9200) 1 ml van elk van deze verdunningen en voeg daaraan — zonder schudden — toe ca 15 ml, *ex tempore bereide*, steriele agar van de volgende samenstelling:

1. trypton (Difco)	15 g	} na opsmelten tot ca 50° C afkoelen
gistextractpoeder (Difco)	10 g	
agar	15 g	
water	1 l	
<hr/>		
pH = 7.1 ± 0.1		
<hr/>		
sterilisatie: 20 min/121° C		

2. ijzercitraat, 5 %, bereid door verhitting op open vlam 10 ml
sterilisatie door filtratie over een G5-filter
3. natriumsulfiet (ca 23 % SO₂), 10 %
ex tempore bereid en gesteriliseerd door
filtratie over een G5-filter 10 ml
3. Dek de buizen *onmiddellijk* af met ca 5 ml opgesmolten, steriele paraffine (smeltpunt ca 80° C) en koel af in koud water.
4. Bebroed, nadat de paraffine gestold is, bij 32 ± 1° C. Tel het aantal witte en zwarte kolonies *afzonderlijk*, na 1, 2 en 3 dagen in buizen, die tussen 5 en 50 kolonies bevatten.

Literatuur

- MILLER, N. J., O. W. GARRETT and P. S. PRICKETT, Anaerobic technique — a modified deep agar shake. Food Research 4 (1939) 447—451.
- MOSSEL, D. A. A., A. S. DE BRUIN, H. M. J. VAN DIEPEN, C. M. A. VENDRIG and G. ZOUTEWELLE, The enumeration of anaerobic bacteria, and of Clos-

tridium species in particular, in foods. J. Applied Bacteriol. 19 (1956) 142—154.

WILSON, W. J. and E. M. BLAIR, The application of a sulphite-glucose-iron-agar medium to the quantitative estimation of *B. welchii* and other reducing bacteria in water supplies. J. Pathol. Bacteriol. 27 (1924) 119—121.

METHODE VAN ONDERZOEK NR. MB 4

Gelatinolytische bacteriën, o.a. in biologisch verzuurde voedingsmiddelen

Beginsel

Het aantal gelatinolytische kolonies, dat ontstaat op de gelatine/agar volgens FRAZIER, wordt geteld.

Het te onderzoeken materiaal wordt hierbij *niet*, zoals in vele andere gevallen, met de agar *gemengd*, doch *daarover uitgestreken* met behulp van een DRIGALSKI-spatel.

Werkwijze

1. Maak van het te onderzoeken produkt een passende serie decimale verdunningen met behulp van steriele fysiologische zoutoplossing.
2. Breng een druppel van ca. 0.05 ml van elk van deze verdunningen op het centrum van het oppervlak van 3 petrischalen, gevuld met ca. 10 ml steriele agar van de volgende samenstelling, die na stolling ca. 15 min. bij 55° C werd gedroogd:

trypton (Difco)	5 g
gistextractpoeder (Difco)	3 g
gelatine	4 g
agar	15 g
water	1 l

pH = 7.0 ± 0.1

sterilisatie: 20 min/121° C

3. Spreid het inoculum met behulp van een steriele DRIGALSKI-spatel uit over het gehele agar-oppervlak en bebroed de platen bij 31 ± 1° C.
4. Bedek de platen na 2 dagen bebroeden met een oplossing van 15 g HgCl₂ in 20 ml zuiver 38 %-ig HCl, na oplossen verdund met 100 ml gedestilleerd water.

Verwijder de sublimaat-oplossing en de losgeweekte kolonies na 3 minuten, was na met leidingwater en tel het aantal heldere hoven op platen, die tussen 3 en 30 van dergelijke hoven bevatten.

Literatuur

- FRAZIER, W. C., A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. Infect. Diseases* 39 (1926) 302—309.
- MOSSEL, D. A. A. and A. S. DE BRUIN, The enumeration of proteolytic bacteria in foods. *Antonie van Leeuwenhoek* 23 (1957), in druk.

METHODE VAN ONDERZOEK NR. MB 5

Aantal kweekbare coliachtige bacteriën

Beginsel

Het aantal bacteriën, voornamelijk van de soorten *E. coli*, *E. freundii* en *Kb. aerogenes*, alsmede de z.g. intermediaire coli-achtigen, kweekbaar in een voedingsbodem, die ter onderdrukking van de groei van andere bacteriën kristalviolet en galzouten bevat, wordt geteld.

Werkwijze

1. Maak van het te onderzoeken produkt een passende serie decimale verdunningen met behulp van steriele fysiologische zoutoplossing.
2. Breng in drie petrischalen 1 ml van elk van deze verdunningen en meng deze zorgvuldig met ca 15 ml, na opsmelten tot ca 50° C afgekoelde, ex tempore bereide, *niet gesteriliseerde* (doch slechts tot 100° C verhitte) agar van de volgende samenstelling:

kristalviolet	2 mg	} In de handel als „Bacto Violet Red Bile Agar” (B 12)
neutraalrood	30 mg	
galzouten (Difco)	1.5 g	
lactose	10 g	
keukenzout	5 g	
pepton (Difco)	7 g	
gistextractpoeder (Difco)	3 g	
agar	15 g	
water	1 l	

pH = 7.4 ± 0.1

3. Breng, nadat de beënte agar gestold is, daarop een deklaag van dezelfde agar van ca 5 ml aan en laat deze eveneens stollen.
4. Bebroed bij 37 ± 1° C. Tel het aantal paarse kolonies, omringd door een paars precipitaat, na 18—24 uur, in platen, die tussen 20 en 150 van dergelijke kolonies bevatten.

Literatuur

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION and Association of Official Agricultural Chemists, Standard Methods for the Examination of Dairy Products' 10th Ed. New York, 1953, p. 144.
- BARTRAM, M. T. and L. A. BLACK, Detection and significance of the coliform group in milk. I. A comparison of media for use in isolation. Food Research 1 (1936) 551—563.

METHODE VAN ONDERZOEK NR. MB 6

Salmonella-titer

Beginsel

Na ophopen van een passende inweging van het te onderzoeken produkt in tetrathionaatbouillon volgens MULLER en in selenietbouillon volgens LEIFSON, gewijzigd door NORTH en BARTRAM, mogen geen Salmonelleae aantoonbaar zijn blijkens (i) overenten op briljantgroen/fenolrood/agar volgens KAUFFMANN en op z.g. SS-agar (Difco); (ii) bevestiging langs serologische en biochemische weg, dit laatste door middel van de z.g. GLUCIS-reactie.

Werkwijze

1. Breng ca 20 g van het te onderzoeken produkt in 2 kolfjes, elk bevattende 3.5 g krijt (1 h/170° C gesteriliseerd) en 62 ml MULLER bouillon van de volgende samenstelling:

1. *Basis-medium:*

gistextractpoeder (Difco)	5 g
trypton (Difco)	5 g
NaCl	3 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	2 g
water	1 g

pH = 7.0 ± 0.1

sterilisatie: 20 min/121° C

2. *Per kolfje toevoegen:*

50 %-ige opl. van Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O, gesteriliseerd door verhitting 5 min/121° C.	7 ml
jood-joodkalioplossing (20 g KJ + 25 g J ₂ in 100 ml gedestilleerd water)	1.4 ml

2. Breng ca 5 g van het te onderzoeken produkt in 2 kolfjes, elk bevattende 50 ml seleniet-bouillon van de volgende samenstelling:

cystine .HCl	10 mg
trypton (Difco)	5 g
lactose	4 g
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	10 g
natriumseleniet	4 g
water	1 l

pH = 7.0 ± 0.1

sterilisatie: niet in de drukpan, doch door kort opkoken.

3. Ent na 24 uur bebroeden bij 37° C vanuit *alle* sub 1 en 2 bedoelde kolfjes op

1. Agar volgens KAUFFMANN van de volgende samenstelling:

proteose peptone nr. 3 (Difco)	10 g	} In de handel als „Bacto Brilliant Green Agar” (B 285)
gistextractpoeder (Difco)	3 g	
lactose	10 g	
saccharose	10 g	
NaCl	5 g	
agar	20 g	
briljantgroen	12.5 mg	
fenolrood	80 mg	
water	1 l	

pH = 6.9 ± 0.1

sterilisatie: 15 min/121° C

2. SS-agar, bereid uit „Bacto SS Agar” (B 74) volgens het voorschrift, vervat in Difco Manual, 9th Ed., 134—138.

Als „verdachte kolonies” zijn aan te merken:

1. op KAUFFMANN-agar: witte tot lichtroze kolonies in rood gekleurde agar
2. op SS-agar: kleurloze kolonies in geel gekleurde agar.

4. Maak van verdachte kolonies uitstrijkjes op schuine buizen met bouillon/agar van de volgende samenstelling, welke niet ouder zijn dan 3 dagen:

vlesextractpasta (Difco)	3 g	} In de handel als „Bacto Nutrient Agar” (B 1)
pepton (Difco)	5 g	
agar	15 g	
water	1 l	

pH = 6.8 ± 0.1

sterilisatie: 20 min/121° C

5. Voer na 24 uur bebroeden bij $37 \pm 1^\circ \text{C}$ met de verkregen kolonies een agglutinatiereactie uit met polyvalent Salmonella-O-serum, verkrijgbaar bij het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid te Utrecht.

6. Breng een oogje van de subcultures sub 4 over in elk der onderstaande media:

1. *Glucose/gistextract/broomkresolpurpur/water*

glucose	10 g
gistextractpoeder (Difco)	5 g
broomkresolpurpur	15 mg
water	1 l

pH = 7.0 ± 0.1

sterilisatie: 20 min/ 121°C , in cultuurbuizen met DURHAM-buisjes.

2. *Lactose/gistextract/broomkresolpurpur/water*

lactose	10 g
gistextractpoeder (Difco)	5 g
broomkresolpurpur	15 mg
water	1 l

pH = 7.0 ± 0.1

sterilisatie: 20 min/ 121°C , in cultuurbuizen met DURHAM-buisjes.

3. *Ureum/agar*

(i) pepton (Difco)	1 g
glucose	1 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	2 g
ureum	20 g
fenolrood	12 mg
water	100 ml

pH = 6.3 ± 0.1

sterilisatie: door filtratie over een G 5-filter

(ii) agar-oplossing 15 g/900 ml gedestilleerd water, 20 min/ 121°C gesteriliseerd.

(iii) voeg aseptisch 100 ml van de ureum/nutriëntenoplossing bij 900 ml agar en vul af in buizen ad 4 ml schuin gestolde agar.

4. *Trypton/water*

trypton (Difco)	10	g
water	1	l

sterilisatie: 20 min/121° C in cultuurbuizen ad 5 ml/buis.

5. *Citraat/agar*

MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.2	g	} In de handel als „Bacto SIMMONS Citrate Agar” (B 91)
Na(NH ₄)HPO ₄ · 4 H ₂ O	1	g	
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	1	g	
natriumcitraat (5½ aq)	2	g	
NaCl	5	g	
broomthymolblauw	80	mg	
agar	15	g	
water	1	l	

pH = 6.8 ± 0.1

sterilisatie: 20 min/121° C in buizen ad 5 ml welke men later schuin laat stollen.

6. *Cysteïne/ijzer/agar*

(i) trypton (Difco)	15	g	} na opsmelten tot ca 50° C afkoelen
gistextractpoeder (Difco)	10	g	
cysteïne · HCl	0.5	g	
agar	15	g	
water	1	l	

pH = 7.1 ± 0.1

sterilisatie: 20 min/121° C

(ii) door verhitting op open vlam bereide ijzercitraatoplossing 5 %, gesteriliseerd door filtratie over een G 5-filter.

(iii) voeg aseptisch 10 ml ijzercitraat-oplossing bij 1 liter agar.

7. *Thiosulfaat/ijzer/agar*

(i) trypton (Difco)	15	g	} na opsmelten tot ca 50° C afkoelen
gistextractpoeder (Difco)	10	g	
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O	1	g	
agar	15	g	
water	1	l	

pH = 7.1 ± 0.1

sterilisatie: 20 min/121° C

(ii) ijzercitraat-oplossing 5 %, gesteriliseerd door filtratie over een G 5-filter.

(iii) voeg aseptisch 10 ml ijzercitraat-oplossing bij 1 liter agar.

8. *Sulfet/ijzer/agar*

Bereid ex tempore volgens Methode van Onderzoek nr. MB 3.

7. Na 24 uur bebroeden bij 37° C wordt:

1. in de media 6.1 en 6.2 gelet op de vorming van zuur en gas;
2. in de media 6.3 en 6.5 gelet op kleurverandering;
3. in de media 6.6, 6.7 en 6.8 gelet op zwarting rond de entstreep;
4. in het medium 6.4 gereageerd op de vorming van indol door toevoeging per 5 ml medium van 0.25 ml van een oplossing van 5 g p. dimethylaminobenzaldehyde (pro analyse) in 75 ml amylalcohol (pro analyse), waaraan ex tempore 25 ml zuiver 38 %-ig HCl wordt toegevoegd.

De uitslag van de reactie geldt als positief als 10 min. na doorschudden van het reagens met de geïnoculeerde en bebroede bouillon een donkerrode bovenlaag is ontstaan.

De bebroeding van de media 6.1 en 6.2 wordt, indien noodzakelijk, tot 10 dagen voortgezet, terwijl de bebroeding van de media 6.3, 6.5, 6.6, 6.7 en 6.8 tot 2 dagen kan worden voortgezet.

Literatuur

DIFCO MANUAL of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures, 9th Ed. (1953), 134—138.

KAUFFMANN, F., Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für Salmonellabacillen. *Z. Hygiene Infektionskrankh.* 117 (1935) 26—32.

MOSSEL, D. A. A., Aufgaben und Durchführung der modernen hygienisch-bakteriologischen Lebensmittelüberwachung. *Wiener tierärztl. Monatsschr.* 43 (1956) 321—340; 596—610.

MULLER, L., Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du Bacille typhique et des paratyphiques. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 89 (1923) 434—437.

NORTH, W. R. and M. T. BARTRAM, The efficiency of selenite broth of different compositions in the isolation of Salmonella. *Applied Microbiol.* 1 (1953) 130—134.

RIJKSINSTITUUT VOOR DE VOLKSGEZONDHEID UTRECHT, Agglutinatie-reacties op het voorwerp glas met behulp van verdunde, agglutinerende Salmonellaseren. Utrecht, z.j.

WARENWET S 1935, Eierenbesluit, Methoden van Onderzoek, Art. B 2.

METHODE VAN ONDERZOEK NR. MB 7

Aantal kweekbare fecale streptococci

Begin sel

Het aantal bacteriën van de soorten *Str. faecalis*, *Str. faecium* en *Str. liquefaciens*, kweekbaar in de voedingsbodem volgens PACKER, die ter onderdrukking van de groei van andere bacteriën kristalviolet en natriumazide bevat, wordt geteld.

Werkwijze

1. Maak van het te onderzoeken produkt een passende serie decimale verdunningen met behulp van steriele fysiologische zoutoplossing.
2. Breng in drie petrischalen 1 ml van elk van deze verdunningen, meng deze zorgvuldig met ca 8 ml, ex tempore bereide, steriele agar van de volgende samenstelling:

1. tryptose (Difco)	15 g	} na opsmelten tot ca 50° C afkoelen
vleesextractpasta (Difco)	3 g	
keukenzout	5 g	
agar	15 g	
water	1 l	
<hr/>		
pH = 6.8 ± 0.1		
<hr/>		
sterilisatie: 20 min/121° C		

2. gedefibrineerd schapenbloed (niet ouder dan 48 h/5° C) 50 ml
kristalviolet 0.05 %; sterilisatie: 20 min/121° C, daarna
in een gesloten kolf in de ijskast bewaard 4 ml
natriumazide 5 %, gesteriliseerd door filtratie over een
G 5-filter (in de ijskast bewaard) 10 ml
3. Bebroed, nadat de agar gestold is, bij 39.5 ± 0.5° C. Tel het aantal kolonies na 2 en 5 dagen in platen, die tussen 30 en 300 kolonies bevatten.

Literatuur

- PACKER, R. A., The use of sodium azide (NaN₃) and crystal violet in a selective medium for Streptococci and Erysipelothrix rhusiopathiae. J. Bacteriol. 46 (1943) 343—349.
- MOSSEL, D. A. A., Aufgaben und Durchführung der modernen hygienisch-bakteriologischen Lebensmittelüberwachung. Wiener tierärztl. Monatsschr. 43 (1956) 321—340; 596—610.

METHODE VAN ONDERZOEK NR. MB 8

Aantal kweekbare Staph. aureus

Beginsel

Het aantal goudgele kolonies, dat ontstaat op de selectieve agar volgens CHAPMAN, die ter onderdrukking van de groei van andere bacteriën 7.5 % NaCl bevat, wordt geteld.

Het te onderzoeken materiaal wordt hierbij *niet*, zoals in vele andere gevallen met de agar *gemengd*, doch *daarover uitgestreken* met behulp van een DRIGALSKI-spatel.

Werkwijze

1. Maak van het te onderzoeken product een passende serie decimale verdunningen met behulp van steriele fysiologische zoutoplossing.
2. Breng een druppel van ca 0.05 ml van elk van deze verdunningen op het centrum van het oppervlak van 3 petrischalen, gevuld met ca 15 ml steriele agar van de volgende samenstelling, die na stolling ca 30 min. bij 55° C werd gedroogd:

gistextractpoeder (Difco)	2.5 g	} In de handel als „Bacto Staphylococcus Medium nr 110” (B 297)
trypton (Difco)	10 g	
gelatine	30 g	
lactose	2 g	
d-mannitol	10 g	
keuzenzout	75 g	
K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	5 g	
agar	15 g	
water	1 l	

pH = 7.0 ± 0.1

sterilisatie: 20 min/121° C.

3. Spreid het inoculum met behulp van een steriele DRIGALSKI-spatel uit over het gehele agar-oppervlak en bebroed de platen bij 37 ± 1° C. Tel het aantal *duidelijk goudkleurige* kolonies na 3 dagen op platen, die tussen 5 en 50 van dergelijke kolonies bevatten.

Literatuur

- CHAPMAN, G. H., The significance of sodium chloride in studies of Staphylococci. *J. Bacterio.*, 5 (1945) 201—203.
- MOSSEL, D. A. A. and C. M. A. VENDRIC, The enumeration of Staphylococcus aureus in foods. *Antonie van Leeuwenhoek* 22 (1956) 205—208.