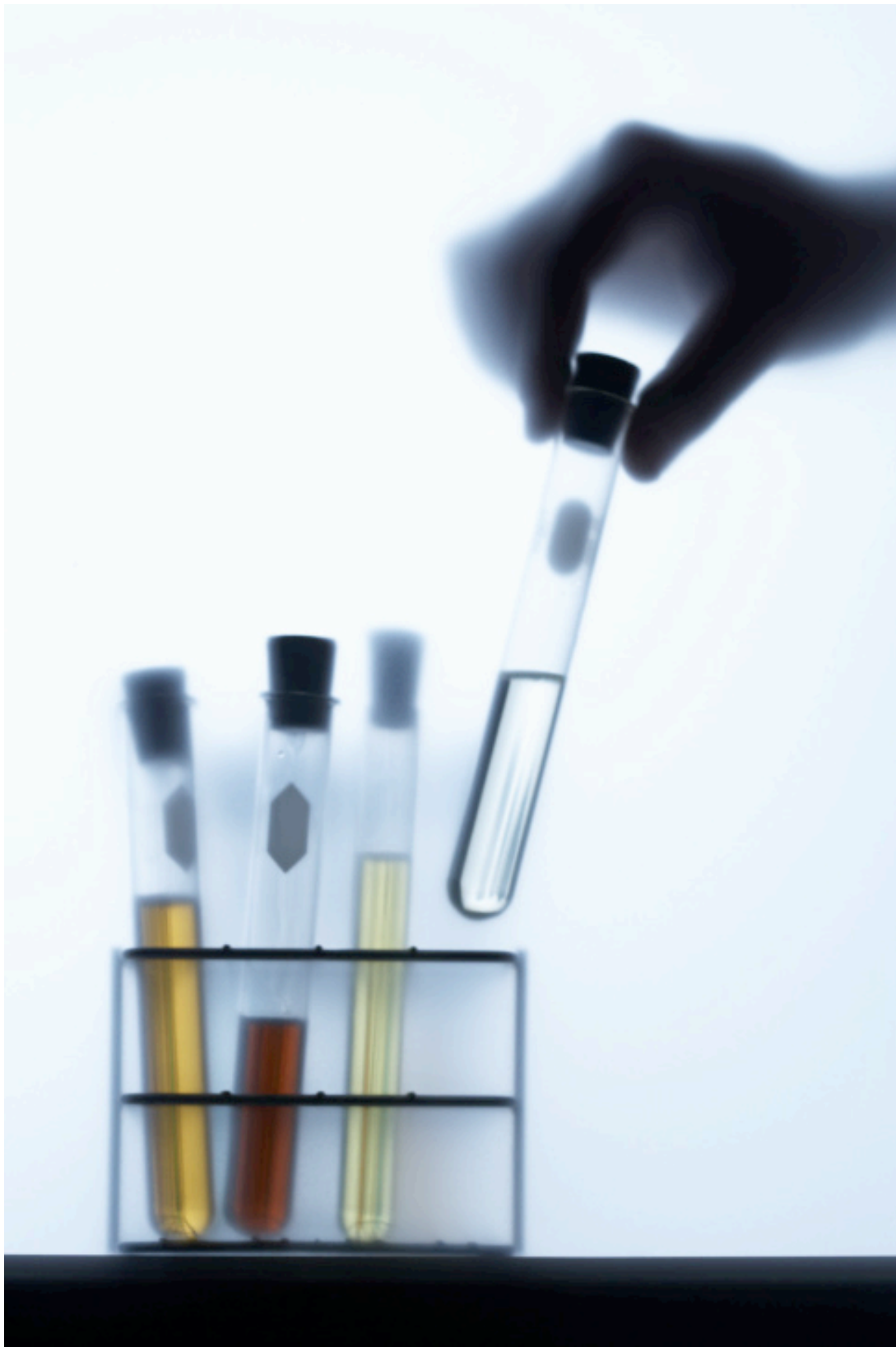


ANALYSE AF HAKKET SVINEKØD



LEVNEDSMIDDELTEMA

METTE BERTHEL

KENNETH JOHANSEN

Nordjyllands Erhvervsakademi
Laborantskolen
Sofiendalsvej 60
9100 Aalborg



Titel: Analyse af hakket svinekød

Tema: Levnedsmidler I

Projektperiode: December 2007 – Januar 2008, 1. semesters

Hold: 1laba0807

Projektgruppe:

Mette Berthel
Kenneth Johansen

Synopsis:

Denne rapport dokumenterer temaet Levnedsmidler I på laborantuddannelsen, Nordjyllands Erhvervsakademi.

En prøve af hakket svinekød er blevet analyseret for mikrobiologisk indhold samt for bl.a. fedt-, protein- og kulhydratindhold. Prøven er blevet analyseret ved hjælp af analyseforskrifter fra Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler.

Analyserne har vist et meget højt indhold af mikroorganisme, hvilket bryder med de vejledende grænseværdier, rapporten har draget parallel mod. Der er desuden fundet mere fedt i kødet, end varedeklarationen skriver – 16% mod varedeklarationens 8-12%.

Bortset fra dette, holder kødprøven sig indenfor grænseværdierne.

Forord

Nærværende rapport er resultatet af temaet "Levnedsmidler 1" på 1. semester for laborantstuderende på NOEA, vinteren 2007.

Igennem rapporten vil referencer til anden litteratur blive skrevet ved hjælp af forkortelser, f.eks. Krav07, som henviser til "Vejledende grænseværdier ved rutinemæssig kontrol i detailladet" i litteraturlisten.

Mette Berthel

Kenneth Johansen

INDHOLD

Introduktion	1
1 Analysemetoder.....	1
1.1 Aske/tørstof.....	1
1.2 Fedt.....	1
1.3 Forsæbning.....	2
1.4 Iodtal	4
1.5 Nitrogen/protein.....	6
1.6 Kulhydrat.....	8
1.7 Aerobe mikroorganismer	8
1.7.1 PCA	9
1.8 B. cereus.....	9
1.8.1 Blodagar	10
1.8.2 Cereus-Selektiv-Agar.....	10
1.9 Enterokokker.....	11
1.9.1 Trypton-Soya-Agar	12
1.9.2 Slanetz Agar	12
1.10 S. aureus.....	12
1.10.1 Blodagar	13
1.10.2 Baird Parker.....	14
1.11 Termotolerante koliforme bakterier og E. Coli	14
1.11.1 Trypton-Soya-Agar (TSA).....	16
1.11.2 RVG = Rød-Violet-Galde Agar.....	16
1.12 1.-trins tests.....	17
1.12.1 Katalase-test.....	17
1.12.2 Oxidase-test	17
1.12.3 OF-test.....	17
1.12.4 Bevægelighedstest	18
1.12.5 Gramreaktion.....	18
2 Resultatbehandling	19
2.1 Aske/tørstof.....	19
2.2 Fedt.....	19
2.3 Forsæbning.....	19
2.4 Iodtal	20
2.5 Nitrogen/protein.....	20
2.6 Kulhydrat.....	20
2.7 Aerobe mikroorganismer	20
2.7.1 Kimtal 30°C.....	21
2.7.2 Kimtal 6,5°C.....	21
2.8 B. cereus.....	22
2.9 Enterokokker.....	22
2.10 S. aureus.....	22
2.11 Termotolerante koliforme bakterier og E. Coli	22
2.12 1.-trins tests.....	23
3 Diskussion.....	25
3.1 Aske/tørstof.....	25
3.2 Fedt.....	25

3.3	Forsæbning	25
3.4	Iodtal	25
3.5	Nitrogen/protein.....	26
3.6	Kulhydrat.....	26
3.7	Aerobe mikroorganismer.....	26
3.8	B. cereus.....	26
3.9	Enterokokker.....	27
3.10	S. aureus.....	27
3.11	Termotolerante koliforme bakterier og E. Coli.....	27
3.12	1.-trins tests.....	27
4	Konklusion	27
5	Referencer.....	28
6	Bilag.....	29
6.1	Aske/tørstof.....	29
6.2	Fedt.....	29
6.3	Forsæbningstal bestemmelse	30
6.4	Iodtalsbestemmelse	31
6.5	Nitrogen/protein.....	32
6.6	Varedeklaration	34
6.7	Krav07: Vejledende grænseværdier ved rutinemæssig kontrol i detailedet.	35

Introduktion

En prøve af hakket svinekød ønskes analyseret i henhold til fødevarerstyrelsens krav til fødevarer. Disse findes i Krav07, som er at finde i bilag 6.7 s. 35. Desuden ønskes indholdet af fedt, protein og kulhydrater bestemt.

Der bestemmes desuden iodtal og forsæbningstal for rapsolie.

Svinekødsprøven er købt hos SuperBedst i Lindholm (Nørresundby), og varedeklarationen kan findes i bilag 6.6 s. 34.

1 Analysemetoder

Nedenfor vil de forskellige analysemetode blive beskrevet. Alle de mikrobiologiske analyser foregår ved pladespredning, og udover analyserne beskrevet i forskrifterne, vil alle påviste bakterier blive udsat for 1.-trins tests. 1.-trins testene er

- Katalase-test
- Oxidase-test
- OF-test (oxidation-fermentation)
- Bevægelighedstest
- Gramreaktion

Disse bliver behandlet nærmere i afsnit 1.12 på side 17.

1.1 Aske/tørstof

Aske defineres som den mængde uorganisk stof, der er tilbage, efter fjernelse af væske og organisk materiale ved varmebehandling.

Bestemmelsen af askeindhold foretages ved hjælp af NMKL23. Prøven afvejes og puttes i en digel. Den opvarmes langsomt og tørres i 16-18 timer ved 550°C, indtil asken er blevet grå/hvid.

Prøven afkøles til stuetemperatur i eksikator, hvorefter den vejes.

Tørstof er den mængde af prøven, der er tilbage efter tørring ved 105°C i ca. 18 timer.

Ved både akse- og tørstofsbestemmelse skal digler og porcelænsskåle tørres i henholdsvis muffelovn og varmeskab, for at slippe af med f.eks. fedtfingre på skålene.

1.2 Fedt

Varedeklarationen på kødprøven fortæller at fedtindholdet er 8-12%. Rigtigheden af denne oplysning ønskes bestemt.

Fedtbestemmelse foretages ved soxhlet metoden, som henviser til en soxhlet ekstraktor, som er det ekstraktionsapparat, der skal bruges i analysen.

Den homogeniserede prøve blandes med sand og tørres. Herefter ekstraheres prøven med petroleumsether (NB; stinkskab, se nedenfor). Efter afdestillation tørres det ekstraherede fedt og vejes.

Petroleumsether



Sundhedsskadelig



Brandfarlig

Meget brandfarlig. Farlig: alvorlig sundhedsfare ved længere tids påvirkning ved indånding.

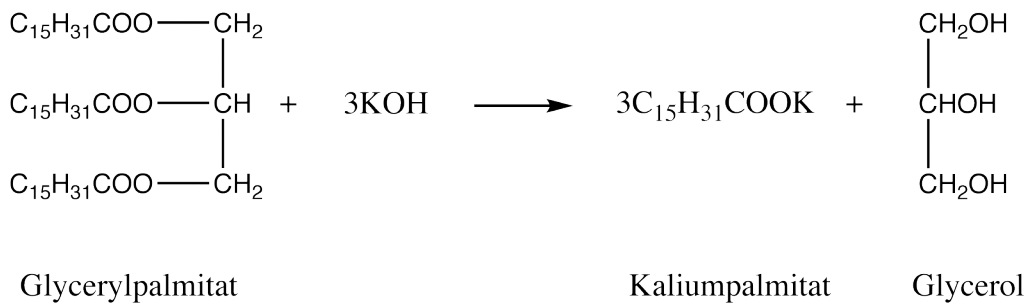
Emballagen skal opbevares på et godt ventileret sted. Holdes væk fra antændelseskilder, Rygning Forbudt. Undgå indånding af gas/røg/dampe/aerosoltåger. Undgå kontakt med huden. Ved indtagelse undgå at fremprovokere opkastning. Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig; vis etiketten, hvis det er muligt.

Affaldsgruppe C.

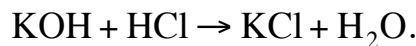
1.3 Forsæbning

Forsæbning bestemmes for rapsolie, med olivenolie som kontrol, og altså ikke for svinekødsprøven.

Forsæbning er en hydrolyse af fedtstoffet i basisk væske, hvorved der dannes sæbe og glycerol.



Overskuddet af base bestemmes ved titrering med stærk syre, og titrerligningen ser da således ud:



Forsæbningstallet angives som mg. KOH, der anvendes til forsæbning af esterne og neutralisation af de frie syrer i 1g. fedt.

Til analysen benyttes bl.a. alkoholisk kaliumhydroxid, som har følgende faremærkning:

Alkoholisk kaliumhydroxid



Sundhedsskadelig



Ætsende

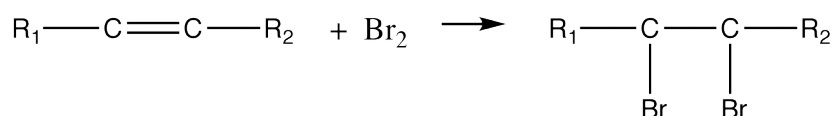
Farlig ved indtagelse. Alvorlig ætsningsfare. Meget brandfarlig. Kommer stoffet i øjnene, skylles straks grundigt med vand og læge kontaktes. Brug særligt arbejdstøj, egnede beskyttelseshandsker og briller/ansigtsskærm. Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig; vis etiketten, hvis det er muligt. Emballagen skal holdes tæt lukket. Holdes væk fra antændelseskilder. Rygning forbudt. Affaldsgruppe C.

1.4 Iodtal

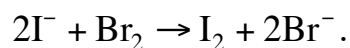
Iodtal bestemmes for rapsolien, med olivenolie som kontrol, og altså ikke for svinekødsprøven.

Iodtallet fortæller hvor meget I_2 , der kan adderes til fedtstoffets dobbeltbinding. Et højt iodtal betyder, at der er tale om en umættet fedtsyre. Iodtallet angives altså som g. halogener (beregnet som iod), 100g fedt kan optage, altså $\text{iodtal} = \text{g. } I_2 / 100\text{g. fedtstof}$.

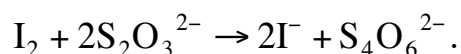
Fedtstoffet tilsættes en kendt mængde halogen, brom, i form af brommethanol, og en del af den tilsatte mængde adderes til fedtstoffet:



Herefter tilsættes iod i form af kaliumiodid, hvorved der forløber følgende reaktion:



Der foretages nu en titrering med natriumthiosulfat, med titrerligningen



Det skal bemærkes at der arbejdes med chloroform og brommethanol, som begge er halogener. Det vil sige, at der afvikles giftige dampe, og der arbejdes altså med stinkskab. De to kemikalier har følgende sikkerhedsmærkninger:

Chloroform (methyltrichlorid)



Sundhedsskadelig
Lokalirriterende
Carc3

Farlig ved indtagelse. Alvorlig sundhedsfare ved længere tids påvirkning ved indånding og indtagelse.

Irriterer huden. Mulighed for kræftfremkaldende effekt.

Brug særligt arbejdstøj og egnede beskyttelseshandsker.

Affaldsgruppe B.

Brom-methanol (0,1M)



Giftig

Meget brandfarlig. Giftig ved indånding, ved hudkontakt og ved indtagelse. Irriterer øjnene og huden. Fare for alvorlig skade på helbredet.

Emballagen skal holdes tæt lukket. Holdes væk fra antændelseskilder; Rygning forbudt. Brug særligt arbejdstøj og egnede beskyttelseshandsker. Ved ulykkestilfælde eller ved



Meget brandfarlig

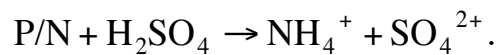
ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig, vis etiketten, hvis det er muligt.

Affaldsgruppe B/C.

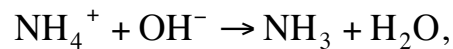
1.5 Nitrogen/protein

Prøven analyseres for indholdet af nitrogen og protein vha. Kjeldahl-metoden.

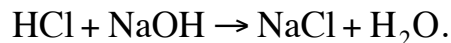
Prøven destrueres ved ca. 420°C i konc. svovlsyre med Kjeltabs som katalysator. Herved omdannes nitrogenen til ammoniumioner. Reaktionen forløber således:



Herefter tilsættes Kjeldahlud i overskud, og den dannede NH_3 destilleres over i et forlag af HCl:



Overskuddet af HCl titreres med NaOH og Kjeldahlindikator. Titrerligningen er altså:



I analysen skal der bruges tre farlige stoffer, nemlig Kjeldahlud, Kjeltabs og konc. svovlsyre. Faremærkningerne ses nedenfor.

Kjeldahlud (32% NaOH)



Ætsende

Alvorlig ætsningsfare.

Kommer stoffet i øjnene, skylles straks grundigt med vand og læge kontaktes. Brug egnede beskyttelsehandsker og briller/ansigtsskærm under Arbejdet. Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig; vis etiketten, hvis det er muligt.

Affaldsgruppe X.

Kjeltabs ($K_2SO_4 + CuSO_4 \cdot 5H_2O + TiO_2$)



Sundhedsskadelig
Lokalirriterende

Farlig ved indtagelse. Irriterer øjnene og huden.

Undgå indånding af støv.

Affaldsgruppe X.

Koncentreret svovlsyre (H₂SO₄)



Ætsende

Alvorlig ætsningsfare.

Kommer stoffet i øjnene, skylles grundigt med vand og læge kontaktes. Hæld aldrig vand på eller i produktet. Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig; vis etiketten, hvis det er muligt.

Affaldsgruppe X.

1.6 Kulhydrat

Kulhydratindholdet bestemmes ved differensmetoden, altså

$$\text{kulhydrat} = \text{tørstof} - (\text{protein} + \text{fedt} + \text{aske}).$$

Det skønnes altså, at det ikke er nødvendigt at lave en analyse for at bestemme kulhydratindholdet direkte.

1.7 Aerobe mikroorganismer

Der ønskes et overblik over indholdet af mikroorganismer i prøven. Der benyttes metoden NMKL86, og der analyseres for levende aerobe mikroorganismer i prøven. Der analyseres generelt for aerobe mikroorganismer (ved 30°C), men også for psykrotrofe mikroorganismer (ved 6,5°C). Psykrotrofe mikroorganismer har evnen til relativ hurtig vækst ved temperaturer mellem 0 og 10°C.

Metoden benytter dybdeudsæd, altså indstøbning i agaren, og der vil blive lavet fortyndingerne 10⁻⁴, 10⁻⁵ og 10⁻⁶, idet grænseværdien for indholdet af aerobe mikroorganismer er 10.000.000 km/g ≈ 10.000.000 km/ml, og der ønskes mellem 25 og 250 kolonier på hver plade. Analysen omfatter brugen af agaren PCA.

1.7.1 PCA

Plate Count Agar er et universalagar, som de fleste bakterier kan vokse i, idet det indeholder pepton (kvælstof-kilde), glucose (kulstof- og energikilde), gærekstrakt, vækststoffer og mineralsalte. Det har desuden en neutral pH på 7,0.

1.8 B. cereus

Følgende tre underafsnit er taget fra Fødevarestyrelsens pjece om fødevarerbakterier (Fød05).

Overordnet

Bacillus er en sporedannende bakterie, der findes naturligt i jordbunden. Herfra kan den overføres til vegetabiliske fødevarer, og da dens sporer er meget resistente over for bl.a. udtørring og varme, kan disse ofte findes i korn, mel, melprodukter og krydderier. Mælk kan også indeholde Bacillus.

Det er især arten Bacillus cereus, der kan forårsage fødevarerforgiftning. B. cereus kan give problemer i fødevarer, hvis den får mulighed for at opformere sig.

Betydning

Årsagen til B. cereus-forgiftninger er ofte forkert afkøling af maden. Hvis melholdige produkter som fx cremer, saucer og sammenkogte retter koges og derefter afkøles langsomt ved stuetemperatur, kan der ske en opformering af B. cereus, hvis bakteriens sporer har overlevet opvarmningen. Sporerne dræbes i reglen først ved ca. 1/2 times opvarmning til ca. 90°C. Der kan også opstå forgiftninger, hvis maden efter kogning kontamineres med B. cereus. Efter kogningen er madens øvrige bakterieflora ofte dræbt. Derfor kan B. cereus vokse frem, hvis maden i en periode er mellem 7°C og 48°C. Pasteuriseret mælk kan også være årsag til B. cereusforgiftning. Det skyldes, at sporerne kan overleve pasteuriseringen og derefter vokse frem til infektionsdoser, hvis mælken opbevares for længe. Nogle B. cereus-stammer kan vokse helt ned til 4°C, altså ved køleskabstemperatur.

Sygdommen

B. cereus kan forårsage to typer af fødevarerforgiftninger, idet den kan producere to typer af toksiner. Det almindeligste toksin forårsager diarré og mavesmerter. Inkubationstiden for denne type er ca. 12 timer, og sygdommen varer ca. 1/2 døgn.

Det andet toksin forårsager kvalme og opkastning. Inkubationstiden for denne type er meget kort, ofte kun 1-5 timer, og sygdommen varer omkring 1-2 døgn. Sidstnævnte forgiftning skyldes ofte kogte eller stegte ris, der ikke afkøles tilstrækkeligt hurtigt.

Toksinerne har forskellig varmeresistens, idet diarrétypens toksin ødelægges ved opvarmning til 55-60°C i 5 minutter, mens toksinet, der giver opkastning, kan modstå opvarmning til 80°C i mere end 15 minutter.

Mikrobiologiske Egenskaber:

B. cereus tilhører gruppen af endosporedannende, grampositive stave og kokker, og Bacilluslægten er desuden karakteriseret ved at være

- katalasepositive,
- aerobe eller fakultativt anaerobe,
- bevægelige.

B. cereus er fakultativt anaerob.

Analysen:

Når der skal laves identifikation af *B. cereus* benyttes egenskaberne, at bakterien er lecitinasepositiv og mannitolnegativ. At bakterien er lecitinasepositiv betyder at den kan spalte æggeblommefedt, og den vil derfor lave hæmolyseområde omkring kolonierne på Blodagar og Cereus-Selektiv Agar, som benyttes i analysen. Begrebet mannitolnegativ vil blive forklaret nærmere i afsnit 1.8.2 om Cereus-Selektiv-Agar.

Der benyttes analysemetoden NMKL67. Denne metode skelner ikke mellem *B. cereus* og *B. thuringiensis*, men da disse arter er meget nært beslægtet, og da begge kan være enterotoksinproducerende, er det i næringsmidler ikke nødvendigt at skelne mellem dem. Dog kan de skelnes imellem ved mikroskopisk undersøgelse, idet *B. cereus* danner sporer på blodagar. Den mikroskopiske undersøgelse vil blive foretaget som 1.-trins test.

Metoden benytter overfladeudsæd, og der vil blive lavet fortyndingerne 10^{-2} og 10^{-3} , idet grænseværdien for indholdet af *B. cereus* er $1000 \text{ km/g} \approx 1000 \text{ km/ml}$, og der ønskes mellem 10 og 100 kolonier på hver plade. Det optimale havde altså været at have fortyndingen 10^{-1} med, men det tillader analysemetoden ikke.

Til konfirmering af kolonierne laves der udsæd på Cereus-Selektiv Agar, og kolonierne undersøges mikroskopisk for sporedannelse, idet *B. cereus* er sporedannende (laves ved gramfarvning under 1.-trins tests).

1.8.1 Blodagar

Blodagar indeholder, som navnet antyder, blod. Der er tale om fåre-, heste- eller kalveblod. Substratet bruges til dyrkning af kræsnе bakterier samt, som nævnt ovenfor, til bestemmelse af hæmolyseområder. Der er tale om et substrat, der er specielt rigt på næringsstoffer, og giver derfor gode vækstbetingelser for mange bakterier. Substratet kunne gøres selektivt overfor *B. cereus*, ved at tilsætte polymyxin, som *B. cereus* er resistent overfor, og som hæmmer mange andre bakterier. Dette er imidlertid ikke nødvendigt, da der også bruges Cereus-Selektiv-Agar.

1.8.2 Cereus-Selektiv-Agar

Denne agar er både selektiv og indikativ, og bruges udelukkende til påvisning af *Bacillus cereus*. Agaren indeholder grundsubstrat, polymyxin (som tidligere nævnt hæmmer andre bakterier end *B. cereus*), æggeblommeemulsion (som *B. cereus* kan spalte og derved danne udfældningszoner omkring kolonierne),

mannitol (som forklares nærmere nedenfor) og phenolrødt (som farver *B. cereus* rød).

Selektivt princip:

Som tidligere nævnt er *B. cereus* resistent overfor polymyxin, der hæmmer mange andre, specielt gramnegative bakterier.

Indikativt princip:

B. cereus er lecitinasepositiv, og vil derfor danne udfældningszoner omkring kolonierne. Den er desuden mannitolnegativ, hvorfor den ikke vil danne syre, og derfor vokser med røde kolonier. Ved mannitolpositive bakterier (f.eks. *B. subtilis*) vil agaren og kolonierne farves gule.

1.9 Enterokokker

Der er forskellige former af *Enterococcus*¹ bl.a. *E. faecalis* og *E. faecium*. De findes normalt i tarmkanalen hos mennesker og dyr, men er også i stand til at formere sig udenfor tarmen.

En bestemt type af *E. faecium* bruges som starterkultur ved fremstilling af surmælksproduktet Gaiø. Bakterien anvendes også som forebyggelse og afhjælpning af diarree ved indtagelse af bestemte kapsler. *Enterococci* påvises i fødevarer ved dyrkning på Slanetz's Agar².

Mikrobiologiske egenskaber

Enterococcus hører til gruppen af grampositive kokker, og er desuden karakteriseret ved at være katalasenegativ, kædelejrning, homofermentativ (forgærer kulhydrater til et produkt), vækst ved 10 °C og 45 °C (lancefieldsystemets gruppe D), indikator for fækal forurening (specielt i dybfrostvarer), kolonierne er lyserøde til mørkerøde evt. omringet af en ufarvet zone, 0,5-3,0 mm i diameter.

Analysen

Der benyttes analysemetoden NMKL 68. *Enterococcus* producerer ikke enzymet katalase, men den vokser i medier med 6,5 % NaCl ved pH 9,6 og ved 45 °C. der dannes lyserøde til mørkerøde kolonier pga. reduktion af trifenyltetrazoliumchlorid.

Metoden benytter dybdeudsæd, og der vil blive foretaget fortyndingerne 10⁻¹ og 10⁻², idet grænseværdien for *Enterococcus* er 1000 kim/g = 1000 kim/ml, og der ønskes 15-150 kolonier på hver plade.

¹ Mik07 s. 154-155 og 163.

² Se afsnit 1.9.2

1.9.1 Trypton-Soya-Agar³

Der anvendes dette non-selektive agar, fordi der forventes forekomst af stressede bakterier.

1.9.2 Slanetz Agar⁴

Selektivt princip:

NaN₃ fremmer vækst af mikroaerofile og anaerobe mikroorganismer, og hæmmer aerobe og fakultativt anaerobe mikroorganismer.

Indikativt princip:

Det farveløse TTC reduceres til rødt formazan, og det er dette der bevirker, at kolonierne er røde.

1.10 *S. aureus*

Stafylokokker findes først og fremmest i næse, svælg og hud hos mange mennesker og dyr. *Staphylococcus aureus* kan forårsage fødevarebåren sygdom. Den findes hos 30-40 procent af raske mennesker og kan udover at findes i næse, på hænder, hud m.m. ofte isoleres fra betændte områder, fx sår, buldne fingre og bylder.

Kontamineres fødevarer med *S. aureus*, og sker der en opformering i fødevareren, kan det give anledning til forgiftning, idet nogle *S. aureus* under opformeringen kan producere et toksin.

S. aureus kan findes i mange forskellige fødevarer som fx rått okse- og svinekød og rått fjerkræ. Den kan også findes i varmebehandlede fødevarer som fx kogt skinke, bacon, fjerkræ- og fiskeprodukter samt ægholdige produkter som cremer og saucer. Varmebehandlede fødevarer kontamineres hyppigst med *S. aureus* fra mennesker.

Betydning

S. aureus-forgiftning er en meget almindelig fødevarebåren sygdom, der sandsynligvis forekommer hyppigt i Danmark. Det er dog sjældent, den registreres. Det kan skyldes, at selve forgiftningen – på trods af at den er voldsom og meget ubehagelig – er hurtigt overstået, så der sjældent søges læge.

Forgiftninger forekommer oftest, hvis varmebehandlede fødevarer kontamineres og derefter opbevares for varmt, fx ved stuetemperatur. Stafylokokker vokser dårligt i konkurrence med andre bakterier fx i rått kød, hvorimod de hurtigt kan formere sig i varmebehandlede varer, hvor der er få andre bakterier.

Årsagen til forgiftninger er oftest, at mennesker overfører bakterier fra fx et sår, næsen eller via hænderne til maden under forarbejdningen, og at maden derefter ikke køles tilstrækkeligt. Bakterien kan så opformere sig og danne toksin. *S. aureus*-toksin er meget varmestabilt og kan tåle mere end 1/2 times kogning.

³ Se afsnit 1.11.1

⁴ PM s. 106-107

Sygdommen

Et stafylokokindhold på 100.000-1.000.000 pr. gram fødevarer kan forårsage forgiftning. Toksinet giver akut forgiftning, idet symptomerne ofte indtræder allerede et par timer efter, at maden er spist.

Symptomerne er først stærk kvalme og voldsomme opkastninger, herefter mavesmerter og diarré og ofte hovedpine. Sygdommen er i reglen kortvarig og går over i løbet af 1-2 dage.

Desuden skal det lige nævnes at der er et stort problem på sygehusene med *S. aureus*, idet nogle er blevet penicillinresistente⁵.

Mikrobiologiske egenskaber

S. aureus hører til gruppen af grampositive kokker, og *Staphylococcus*-slægten er karakteriseret ved at være katalasepositive, fakultativt anaerob, drueklaselejrning, salttolerante.

S. aureus er desuden koagulasepositiv, DN'ase positiv, hæmolytisk, mannitolforgærende,

og vokser med konvekse orange-gule/gylde pigmenterede kolonier på agarplader (*aureus* = gylden).

1,0-1,5 mm efter 1 døgn

1,5-2,5 mm efter 2 døgn

Analysen

Der benyttes analysemetoden NMKL66. Denne metode anvender koagulasetest, for direkte at adskille den fra *S. epidermidis*. At *S. aureus* er koagulasepositiv vil sige at den er i stand til at få blodplasmaet til at koagulere dvs. stivne. Desuden er *S. aureus* mannitolforgærende (= mannitolpositive), dvs. den forgærer kulhydratet og der dannes syre, og det er her den gyldne farve ses på kolonierne. Den er også hæmolytisk, dvs. den springer de røde blodlegemer (hæmoglobin) og det kan oftest ses ved en udfældningszone (hæmolysezone) omkring kolonierne. Der anvendes også gramfarvning. Metoden benytter overfladeudsæd, og der vil blive foretaget fortyndingerne 10^{-1} og 10^{-2} , idet grænseværdien for *S. aureus* er 1000 kim/g = 1000 kim/ml, og der ønskes 10-100 kolonier på hver plade.

1.10.1 Blodagar

Substratet kan gøres selektivt ved tilsætning af polymyxin. Nærmere beskrivelse af substratet i afsnit 1.8.1.

⁵ Dette og følgende er taget fra Mik07 s. 152-153, 162 og 276.

1.10.2 Baird Parker⁶

Substratet består af:

Grundsubstrat,
Li-chlorid,
K-tellurit,
Na-pyruvat,
Glycin
æggeblommeemulsion.

Indikativt princip:

S. aureus vokser med sorte kolonier evt. med en hvid rand på Baird Parker, pga. af stoffet tellurit der reduceres til tellur, der giver sortfarvning af kolonierne. Efter 1-2 døgn har der forekommet en protein- og lecithinspaltning, hvilket bevirker opklarings- og udfældningszoner i substratet.

Selektivt princip:

Pyruvat og glycin fremmer væksten af *S. aureus*, mens Li-chlorid og tellurit virker hæmmende på vækst af de fleste andre bakterier.

1.11 Termotolerante koliforme bakterier og *E. Coli*⁷

Der findes mange forskellige typer colibakterier. De fleste typer er helt uskadelige og findes i tarmen hos raske mennesker og dyr. Nogle særlige typer kan dog danne toksiner og derved forårsage alvorlig sygdom hos mennesker. Disse typer kaldes VTEC (verotoksinproducerende *E. coli*). Verotoksinproducerende *E. coli* O157 er den almindeligste af disse bakterier. Det er en forholdsvis ny bakterie, som første gang blev beskrevet som årsag til fødevareråben sygdom i 1982.

VTEC kan findes i tarmen hos drøvtyggere, bl.a. kvæg, og den vigtigste kilde til sygdom hos mennesker er sandsynligvis utilstrækkeligt varmebehandlet oksekød. Bakterien kan fx overføres til kød, hvis kødet kommer i kontakt med dyrenes gødning under slagtingen.

Betydning

I USA har der været flere store sygdomsudbrud, der skyldes *E. coli* O157. Årsagen har især været hakket oksekød, i form af hamburgere, der ikke var gennemstegt. Indtagelse af rå mælk eller mælk, der ikke var pasteuriseret ordentligt, drikkevand og badning i vand, der er forurenet med afføring, har også været årsag til infektioner.

Det hidtil største udbrud er registreret i Japan i 1996 og omfattede mere end 9.000 mennesker, der blev syge af at spise spirer. Spirefrø og grønsager i øvrigt kan muligvis blive kontamineret på marken pga. forurenet gødning eller vand.

Endelig ses person til person-smitte relativt hyppigt, ligesom sygdommen kan overføres ved direkte kontakt med dyr. Derfor er det vigtigt at vaske hænder, også efter kontakt med dyr.

⁶ PM07 s. 105

⁷ Følgende tre afsnit er taget fra:

http://www.foedevarestyrelsen.dk/FDir/Publications/2005212/side18_19.asp

I Danmark er der hidtil ikke registreret større udbrud af VTEC, men antallet af VTEC-infektioner hos mennesker er steget fra 33 i 1997 til 167 i 2004. E.coli O157 er den hyppigst forekommende (ca. 28 procent).

Kød er ikke rapporteret som direkte kilde til de danske VTEC-tilfælde. I en undersøgelse fra 2001 blev VTEC O157 påvist i 3,2 procent af prøverne fra kvæg. En anden undersøgelse af 580 kvæg viste VTEC O157 hos 4,3 procent af dyrene og 0,7 procent af slagtekroppene.

I Danmark er der i 1996 og 1997 foretaget undersøgelser, der påviste E. coli O157 i ganske få prøver af ferske kødvarer. Bakterien blev ikke påvist i hakket svinekød, men i 0,1 procent af prøverne af hakket oksekød i henholdsvis 1996 og 1997. I 1997 blev der fundet E. coli O157 i 0,7 procent af prøverne af fåre- og lammekød og i 1 procent af det undersøgte hjortekød. Myndighederne samarbejder med forskningsinstitutioner og erhvervet for at få mere viden om, hvordan VTEC kan forebygges og bekæmpes i primærproduktionen og i slagte- og detailled.

Sygdommen

Der skal kun et lille antal verotoksinproducerende E. coli O157 til for at give sygdom. Infektionsdosis er sandsynligvis få hundrede bakterier. Bakterien kan derfor forårsage sygdom uden forudgående opformering i fødevarer. Vigtige hygiejneråd er gennemstegning af hakket oksekød samt at undgå spredning af bakterien fra råt kød til fx spiseklar salat.

Symptomerne på sygdommen kan starte efter en inkubationstid på ca. 1-2 dage. Symptomerne er ofte diarré og efterfølgende blodig diarré samt mavekrampe og eventuelt opkastninger. Normalt medfører sygdommen ingen eller kun let feber. Sygdommen går for det meste over i løbet af 5-10 dage. I sjældnere tilfælde og oftest hos ældre mennesker og børn under fem år kan infektionen blive mere alvorlig. I disse tilfælde kan sygdommen forårsage skade på nyrer eller centralnervesystemet. Der kan også forekomme akut nyresvigt, der kan medføre døden.

Mikrobiologiske egenskaber

E. coli hører til gruppen af fakultativt anaerobe, gramnegative stave, og Enterobacteriaceae familien, der er karakteriseret ved at være katalasepositive, oxidasenegative, galdetolerante, glucoseforgærende, nitratreducerende, ofte bevægelige.

E. coli er desuden

lactosepositive

indikator for fækal forurening

sorbitolnegativ (det er vildtypen ikke)

kendt under navnet "Burger-coli".

vokser med røde kolonier og med en udfældningszone og er mindst 0,5 mm.

Analysen

Der benyttes analysemetoden NMKL125. Denne metode anvender indoltest⁸. Der undersøges om bakterien har enzymet tryptophanase, så den kan spalte aminosyren tryptophan under dannelse af indol. Der benyttes kovacs reagens, som tilsættes i et rør med trypton og en bakteriekoloni, hvis der er dannet gas i Durhamrøret. E. coli er indolpositiv, hvis der dannes en kraftig rød ring i toppen af røret.

Metoden benytter dybdeudsæd, og der vil blive foretaget fortyndingerne 10^{-1} og 10^{-2} , idet grænseværdien for E. coli er $100 \text{ km/g} = 100 \text{ km/ml}$, og der ønskes 10-100 kolonier på hver plade.

1.11.1 Trypton-Soya-Agar (TSA)

TSA er et alsidigt substrat, hvori stressede bakterier kan påbegynde vækst, inden andre stoffer tilsættes. Trypton er et delvist nedbrudt protein, der derfor er let at nedbryde.

1.11.2 RVG = Rød-Violet-Galde Agar⁹

Substratet består af:
grundsubstrat,
crystalviolet,
galdesalte,
lactose,
neutralrødt.

Danner røde kolonier med violet udfældningszone.

Selektivt princip:

Galdesalte og crystalviolet er begge selektive komponenter, der bruges til at hæmme andre bakterier, end tarmbakterier. De hæmmer de grampositive og tillader vækst af de gramnegative.

Indikativt princip:

Ved lactoseforgæringen sænkes pH pga. syredannelse. Derefter dannes der galdesyre, der uddrives af galdesaltene og farvestoffer fælder ud. Dvs. at der omkring kolonierne dannes komplekser af galdesyre og substratets farvestoffer (crystalviolet).

Lactose-Trypton-Lauryl-Sulfat-Bouillon (LTLST)

Trypton er et delvist nedbrudt protein, der derfor er let at nedbryde. Lauryl-Sulfat selekterer og E.coli hæmmes derfor ikke.

⁸ PM07 s. 78-79

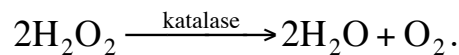
⁹ PM07 s. 108

1.12 1.-trins tests

Dette afsnit handler om 1.-trins testene, som er blevet brugt til analysen. Afsnittene er skrevet med inspiration fra PM07.

1.12.1 Katalase-test

De fleste aerobe og fakultativt anaerobe bakterier danner enzymet katalase. Man påviser enzymets tilstedeværelse ved tilsætning af hydrogenperoxid, som katalase kan spalte;



Hvis man under testen lader hydrogenperoxiden få kontakt med substratet, kan der imidlertid dannes en falsk positiv reaktion, idet visse substrater (f.eks. blodagar) indeholder katalase.

Testen er hurtig og nem, idet der blot overføres lidt kolonimasse til et objektglas, hvorpå man drypper en dråbe 3% H_2O_2 . En positiv reaktion danner bobler eller skum.

Katalasetesten har til formål at adskille *Bacillus* fra *Clostridium*, samt adskille *Streptococcus/Enterococcus* (katalase-) fra *Staphylococcus/Micrococcus* (katalase+).

1.12.2 Oxidase-test

Aerobe og fakultativt anaerobe bakterier indeholder enzymet cytochromoxidase (oxidase). Nogle af disse bakterier har en variant af enzymet, som er i stand til at omdanne det farveløse stof N,N',N,N'-tetramethyl-p-phenylen-diamin-dihydrochlorid til det blå stof indophenol.

Testen laves ved at bukke et stykke filterpapir og stille det i en tom petriskål. Der dryppes et par dråber oxidasereagens på siden af filterpapiret, og der stryges kolonimasse ud på reagenset med en podenål (platin eller plastik, da jern kan få oxidasereagenset til at reagere). En blåfarvning inden 10 sek. betragtes som en positiv reaktion.

Oxidasetesten har til formål at adskille f.eks. enterobakterier (oxidase-) fra *Pseudomonas*-arter (oxidase+).

1.12.3 OF-test

Der undersøges, om bakterien kan nedbryde glucose (kulhydrat) oxidativt (aerobt) eller fermentativt (anaerobt).

Testen udføres ved at pøde den pågældende bakterie i halvflydende H&L medium, der er smeltet og tilsat 10% glucoseopløsning. Blandingen afkøles og det ene rør påhædes et lag paraffinolie, således at dette rør skaber anaerobe forhold for bakterien. Rørene inkuberes ved 37°C og iagttages i op

til 14 dage. Bestemmelsen af bakteriens nedbrydningsevne sker ved hjælp af nedenstående skema.

Aflæsning	aerobe rør	anaerobe rør
Oxidativ nedbrydning (O/-)	gul	grøn
Fermentativ nedbrydning (O/F)	gul	gul
Ingen nedbrydning (-/-)	blå/grøn	grøn

Tabel 1.1 Oxidase-test

OF-testen har været brugt meget til at adskille stafylokokker (fermentativ nedbrydning) og mikrokokker (ingen eller oxidativ nedbrydning), men enkelte arter af mikrokokker kan være fermentative. Testen er mest egnet til adskillelse af enterobakterier (fermentative) og *Pseudomonas* (ingen nedbrydning).

1.12.4 Bevægelighedstest

En bakteries bevægelighed undersøges oftest mikroskopisk. Dette skal helst gøres fra en ung kultur, og der skal fokuseres på væskelaget. De bakterier, der er bevægelige, udviser kraftige individuelle bevægelsesmønstre.

1.12.5 Gramreaktion

Om den pågældende bakterie er grampositiv eller gramnegativ bestemmes her på 2 måder.

Metode 1 (KOH):

Denne metode er meget hurtig og let. En dråbe 3% KOH dryppes på et objektglas. Rigeligt med kolonimateriale udrøres i prøven, og efter ca. 20 omrøringer vil en positiv reaktion være, at der er blevet dannet slim, som hænger i en tråd fra podenålen. Dette skyldes at gramnegative bakterier har en cellevæg, der ikke kan tåle påvirkning af KOH, hvorfor cellevægen nedbrydes. Resultatet af dette er at cellens DNA trænger ud og giver den slimede substans. Grampositive bakterier har derimod en mere modstandsdygtig cellevæg, som ikke nedbrydes. En positiv reaktion er altså tegn på, at bakterien er gramnegativ.

Metode 2 (gramfarvning):

Kolonimasse farves med krystalviolet, hvorved cellerne farves. Man drypper jod-jodkalium på kolonimassen, og der dannes komplekse forbindelser med krystalviolet i cellerne. Præparatet behandles med ren ethanol, som gør at gramnegative bakterier bliver affarvet. De grampositive bakterier beholder deres farve pga. deres tætte cellevæg. Man farver nu med safranin for at

forstærke farverne. I mikroskop vil grampositive bakterier nu være blåviolet, og gramnegative vil være røde.

2 Resultatbehandling

I dette kapitel gennemgås analyseresultaterne, og der laves beregningseksempler. Analyseresultaterne er opsummeret i Tabel 2.2, og resultatet af 1.-trins testene er opsummeret i Tabel 2.1.

2.1 Aske/tørstof

Mængden af aske pr. 100g beregnes ved ligningen:

$$\begin{aligned} \text{g. aske}/100\text{g} &= \frac{m_{\text{digel+aske}} - m_{\text{digel}}}{m_{\text{prøve}}} \cdot 100 \\ &= \frac{27,5889 - 27,5738}{1,5416} \cdot 100 = 0,9795018163 \\ &\approx 0,9795. \end{aligned}$$

Tørstofsmængden bestemmes ved:

$$\begin{aligned} \text{g. tørstof}/100\text{g} &= \frac{m_{\text{skål + tørret prøve}} - m_{\text{skål}}}{m_{\text{prøve}}} \cdot 100 \\ &= \frac{108,5003 - 106,3207}{6,4303} \cdot 100 = 33,89577469 \\ &\approx 33,90. \end{aligned}$$

Resultatbehandlingen ses i bilaget, afsnit 6.1.

2.2 Fedt

Mængden af fedtstof pr. 100g kan beregnes:

$$\text{g. fedt}/100\text{g} = \frac{m_{\text{ekstraheret fedt}}}{m_{\text{prøve}}} \cdot 100$$

2.3 Forsæbning

Molforholdet mellem kaliumhydroxid og saltsyre er 1:1, hvorfor mængden af forbrugt KOH (= forsæbningstal) kan bestemmes:

$$\begin{aligned} F_t &= \frac{(V_{\text{HCl,blind}} - V_{\text{HCl,prøve}}) \cdot c_{\text{HCl}} \cdot M_{\text{KOH}} \cdot 1000 \text{ mg/g}}{1 \cdot 1000 \text{ mL/L} \cdot m_{\text{fedt}}} \\ &= \frac{(23,22 - 11,05) \cdot 0,4919 \text{ mol/L} \cdot 56,11 \text{ g/mol} \cdot 1000 \text{ mg/g}}{1000 \text{ mL/L} \cdot 2,0063 \text{ g}} \\ &= 167,42 \approx 167. \end{aligned}$$

Resultatbehandlingen ses i bilaget, afsnit 6.3.

2.4 Iodtal

Fra reaktionsligningerne på side 4 (afsnit 1.4) ses det, at molforholdet mellem brom og natriumthiosulfat er 1:2. Forholdet mellem iod og brom er 1:1, så med oplysningen om, hvor meget natriumthiosulfat, der er forbrugt ved titreringen, kan iodtallet beregnes:

$$\begin{aligned} \text{Iodtal} &= \frac{(V_{\text{thio,blind}} - V_{\text{thio,prøve}}) \cdot c_{\text{thio}} \cdot M_{\text{iodid}} \cdot 100}{2 \cdot 1000 \text{ mL/L} \cdot m_{\text{fedt}}} \\ &= \frac{(42,9125 \text{ mL} - 18,80 \text{ mL}) \cdot 0,09820 \text{ mol/L} \cdot 253,8 \text{ g/mol}}{2 \cdot 1000 \text{ mL/L} \cdot 0,2730 \text{ g}} = 110,06178 \\ &\approx 110. \end{aligned}$$

Resultatbehandlingen ses i bilaget, afsnit 6.4.

2.5 Nitrogen/protein

Indholdet af nitrogen kan beregnes:

$$\text{g. N/100g.} = \frac{(V_{\text{NaOH,blind}} - V_{\text{NaOH,prøve}}) \cdot c_{\text{NaOH}} \cdot M_{\text{N}}}{1000 \text{ mL/L} \cdot m_{\text{prøve}}}$$

2.6 Kulhydrat

Kulhydratindholdet bestemmes ved differensmetoden, altså

$$\begin{aligned} \text{g. kulhydrat /100g.} &= \text{tørstof} - (\text{protein} + \text{fedt} + \text{aske}) \\ &= 34,5 \text{ g} - (19,26 \text{ g} + 16 \text{ g} + 0,99 \text{ g}) \\ &= -1,75 \text{ g}. \end{aligned}$$

Det må altså konkluderes, at en af analyserne har givet et forkert resultat, når kulhydratindholdet er negativt.

2.7 Aerobe mikroorganismer

Kimtalsbestemmelserne ser ud som følger:

Fortynding	10-4	10-5	10-6	K
Kimtal 30°C	TNTC	261, 257	28, 25	0
	TNTC	271, 261	27, 22	0
Kimtal 6,5°C	TNTC	>300	53, 51	0
	TNTC	>300	43, 35	0

Der undersøges først, om der er sammenhæng mellem kimtallene med χ^2 -test:

$$H_0 : \frac{C_1}{V_1} = \dots = \frac{C_n}{V_n}.$$

H_1 : mindst 2 $\frac{C_i}{V_i}$ er forskellige.

2.7.1 Kimtal 30°C

Der ønskes 25-250 kim på hver plade, og der er derfor kun 3 kimal, der kan bruges.

$$E_{10^{-6}} = 10^{-6} \cdot \frac{28\text{kim} + 25\text{kim} + 27\text{kim}}{3 \cdot 10^{-6} \text{ mL}} = 26,66667 \text{ kim/mL} \approx 27 \text{ kim/mL}.$$

Teststørrelsen kan nu beregnes:

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} = \frac{(28 - 27)^2}{27} + \frac{(25 - 27)^2}{27} + \frac{(27 - 27)^2}{27} \\ &= \frac{1}{27} + \frac{4}{27} + 0 = \frac{5}{27} \approx 0,185185. \end{aligned}$$

Acceptområdet er $\chi^2 \leq \chi_{1-\alpha}^2(n-1) = \chi_{0,95}^2(2) = 5,99$, som i dette tilfælde er accepteret. Man kan altså ikke afvise at der er sammenhæng mellem kimtallene, og kimaltallet kan beregnes:

$$\begin{aligned} \text{Kimal}_{30^\circ\text{C}} &= \frac{\sum C_i}{\sum V_i} = \frac{28\text{kim} + 25\text{kim} + 27\text{kim}}{3 \cdot 10^{-6} \text{ mL}} = 26666666,67 \text{ kim/mL} \\ &\approx 2,67 \cdot 10^7 \text{ kim/mL}. \end{aligned}$$

Der kan nu beregnes konfidensinterval:

$$\begin{aligned} \left[\text{Kimal} \pm 1,96 \cdot \frac{\sqrt{28 + 25 + 27}}{3 \cdot 10^{-6}} \right] &= \left[2,667 \cdot 10^7 \pm 5,84 \cdot 10^6 \right] \\ &= \left[2,08 \cdot 10^7 \text{ kim/mL}; 3,25 \cdot 10^7 \text{ kim/mL} \right]. \end{aligned}$$

2.7.2 Kimtal 6,5°C

Der ønskes 25-250 kim pr. plade, så kun fortyndingen 10^{-6} kan bruges.

$$E_{10^{-6}} = 10^{-6} \cdot \frac{53\text{kim} + 51\text{kim} + 43\text{kim} + 35\text{kim}}{4 \cdot 10^{-6} \text{ mL}} = 45,5 \text{ kim/mL} \approx 46 \text{ kim/mL}.$$

Teststørrelsen kan nu beregnes:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} = \frac{(53 - 46)^2}{46} + \frac{(51 - 46)^2}{46} + \frac{(43 - 46)^2}{46} + \frac{(35 - 46)^2}{46} \\ = 4,4348.$$

Acceptområdet er $\chi^2 \leq \chi^2_{1-\alpha}(n-1) = \chi^2_{0,95}(3) = 7,81$, som kan accepteres.

Man kan altså ikke afvise, at der er sammenhæng mellem kimtallene, og kimtallet kan beregnes:

$$\text{Kimal}_{6,5^\circ\text{C}} = \frac{\sum C_i}{\sum V_i} = \frac{53\text{kim} + 51\text{kim} + 43\text{kim} + 35\text{kim}}{4 \cdot 10^{-6} \text{ mL}} = 45.500.000 \text{ kim/mL} \\ \approx 4,55 \cdot 10^7 \text{ kim/mL}.$$

Der beregnes konfidensinterval:

$$\left[\text{Kimal} \pm 1,96 \cdot \frac{\sqrt{53 + 51 + 43 + 35}}{4 \cdot 10^{-6}} \right] = \left[4,55 \cdot 10^7 \pm 6,61 \cdot 10^6 \right] \\ = \left[3,89 \cdot 10^7 \text{ kim/mL}; 5,21 \cdot 10^7 \text{ kim/mL} \right].$$

2.8 *B. cereus*

Både på blodagar og på Cereus-Selektiv Agar var der ingen hæmolysezoner eller opklaringszoner, og aflæsningen kan altså betragtes som værende negativ. Der er altså ikke tegn på *B. cereus* i prøven. 1.-trins testene vil derfor blive lavet på en rendyrket *B. cereus*, som ikke har noget med svinekødsprøven at gøre.

2.9 *Enterokokker*

Ved aflæsningen blev der fundet mistænkelige kolonier. Disse gav ved videredykning positiv reaktion i begge BHI-kulturer. Ved 1.-trins testene blev mistanken dog afkræftet, idet kolonierne viste sig at være katalasepositive. Der kan altså ikke siges at være fundet enterokokker i svinekødsprøven.

2.10 *S. aureus*

Under aflæsningen blev der fundet nogle mistænkelige kolonier, som godt kunne være *S. aureus*. Disse blev rendyrket, men under 1.-trins testene, blev mistanken afkræftet. Se afsnit 2.12.

2.11 *Termotolerante koliforme bakterier og E. Coli*

Ved aflæsningen kunne der ikke findes nogle mistænkelige kolonier. Kolonierne kunne ikke leve op til kravene om at de skulle have en diameter på 0,5mm, og der var desuden ingen udtværingszone at se. I stedet laves 1.trins testene på en rendyrket *E. Coli* kultur, som ikke har noget med svinekødsprøven at gøre.

2.12 1.-trins tests

Nedenfor ses resultatskemaet for 1.-trins testene.

	Katalase	Oxidase	OF-test	Bevægelighed	Gramreaktion (KOH)	Gramreaktion (gramfarvning)
B. cereus	+	+	(-/-)	ej bestemt	G+	G+ (blå)
Enterokokker	+	-	(O/F)	ej bestemt	G+	G+ (blåviolet)
S. aureus (Mette)	+	+	(-/-)	ej bestemt	G-	G- (rød)
S. aureus (Kenneth)	+	-	(O/F)	ej bestemt	G-	G- (rød)
Termotolerante koliforme bakterier og E. coli	-	-	(O/F)	ej bestemt	G-	G- (rød)

Tabel 2.1 1.-trins tests for mikrobiologiske analyser

1.-trins testene har vist, at mistanken om *S. aureus* i prøven var ubegrundet. De kolonier, der var mistænkt for at være *S. aureus*, viste sig at være gramnegative, hvor *S. aureus* er grampositiv.

S. aureus (Mette): en gramnegativ bakterie, der er katalasepositiv, oxidasepositiv og som ingen nedbrydning har i OF-testen. Ved hjælp af identifikationstabellen fra PM07, bliver et bud på, hvilken bakterie, der er tale om: *Pseudomonas*.

S. aureus (Kenneth): en gramnegativ bakterie, der er katalasepositiv, oxidasenegativ og som har fermentativ nedbrydning i OF-testen. Ved hjælp af identifikationstabellen fra PM07, bliver et bud på, hvilken bakterier, der er tale om: Enterobakterier.

Katalasetesten har vist sig at give nogle forkerte resultater, idet de koliforme bakterier burde være katalasepositive. Til gengæld kunne katalasetesten afkræfte, at der var enterokokker i prøven, idet enterokokker er katalasenegative, men katalasetesten gav katalasepositiv reaktion.

Analyse	Metode	Enhed	Resultat	Grænseværdi	CV%	RF%	Bilag
Aske	NMKL23	g. aske / 100g.	0,99	-	2,17	-	afsnit 6.1
Tørstof	NMKL23	g. tørstof / 100g.	34,5	-	2,21	-	afsnit 6.1
Fedt	ANA07	g. fedt / 100g.	16	8-12%	8,4	33	afsnit 6.2
Forsæbning	ANA077	mg. KOH / g. fedt	141 (168 ¹⁰)	168-179	21	-21	afsnit 6.3
Iodtal	ANA07	g. iod / 100g.	109	95-105	0,91	3,8	afsnit 6.4
Protein	ANA07 + Büc07	g. protein / 100g.	19,26	22,27 ¹¹	1,8	-13,5	afsnit 6.5
Kulhydrat	differens	g. kulhydrat / 100g.	-1,75	-	-	-	-
Aerobe mikroorganismer 30°C	NMKL86	kim/g.	2,67·10 ⁷	10.000.000 (=10 ⁷)	-	167	-
Aerobe mikroorganismer 6,5°C	NMKL86	kim/g.	4,55·10 ⁷	10.000.000 (=10 ⁷)	-	355	-
B. cereus	NMKL67	kim/g.	i. m.	1000	-	-	-
Enterokokker	NMKL68	kim/g.	i. m.	1000	-	-	-
S. aureus	NMKL66	kim/g.	i. m.	1000	-	-	-
Termotolerante koliforme bakterier og E. coli	NMKL125	kim/g.	i. m.	100	-	-	-

Tabel 2.2 Resultater ved analyse af hakket svinekød

¹⁰ Forsæbningstallet 168 er mere realistisk – se afsnit 3.3.

¹¹ Vejledende resultat fra Büc07

3 Diskussion

3.1 Aske/tørstof

Analysen giver et forholdsvist nøjagtigt resultat. Med en CV% på ca. 2, er det gået temmelig godt. Der skal nemlig ikke særlig meget til for at få store udslag i resultaterne, da man arbejder med meget små mængder, og f.eks. kan noget af asken nemt "blæse væk", når man flytter på diglerne.

Der er ikke nogle grænseværdier for aske og tørstof, og det er derfor ikke muligt at udtale sig om, hvor præcis analysen har været.

3.2 Fedt

Ifølge varedeklarationen¹² er den forventede fedtprocent på 8-12 %. Den beregnede fedtprocent er noget højere, da den ligger på 16 %. Årsagen til dette kan være vanskeligt til besvare, men tankerne leder hen på slagteren, der evt. kunne have brugt en grovvægt til sit arbejde.

En anden grund kunne være at analysen ikke blev gjort så præcist efter endt ekstraktion. Cups'ene kom ind i stinkskebet til afdestillation af etheren i ca. en times tid, og derefter ind i varmeskebet til tørring i ca. 2½ time. Derefter kom det til afkøling i eksikator, og blev først vejet ca. 3½ time senere. Prøverne var konstante med det samme, og det kunne ses med det blotte øje, at der kun var fedt tilbage i cups'ene, men muligvis med meget få sandkorn i enkelte cups. Sandmængden var desuden ikke særlig præcis ved afvejning, men ca. 15 g **plus/minus** 1g.

Analysen gik fint, men tiden var knap efter endt ekstraktion, da der blev lavet Kjeldahl på samme tidspunkt.

3.3 Forsæbning

Ved denne analyse var forsæbningstallet, den forventede værdi på 168-179 mg KOH/g fedt. Den beregnede værdi var meget lavere og kun på 141 mg KOH/g fedt. Fejlen ved dette er klar og tydelig, da de individuelle forsæbningstal ikke passer godt sammen, men parvist passer de utrolig godt. Årsagen til dette er, at der måtte åbnes for en ny flaske KOH til de to sidste titreringer, da den anden flaske, som blev delt sammen med gruppe 2, desværre blev tømt. Koncentrationerne i de to flasker KOH må forventes at have meget forskellige koncentrationer, og det er dette, der er med til at få de lave forsæbningstal på 115 for de to sidste prøver. De andre to prøver ligger med forsæbningstal på 167 og 168 mg KOH/g fedt, og de tal passer meget bedre sammen med den forventede værdi, og må siges at være de tal, som giver et realistisk billede af analysen.

3.4 Iodtal

Analysen er gået fint, og der har ikke været nogle problemer eller eventuelle fejlkilder. Analysen har også givet en CV% på 0,91, som må betyde at det har

¹² Jf. bilag 6.6

været ret nøjagtigt. At iodtallet så ligger lidt højere end tabelværdien, er ikke rigtig til at forklare.

Men noget usikkerhed må der være ved analysen, for kontrollen viste sig at få for lav iodtal i forhold til tabellen.

Rapsolien har et forholdsvis højt iodtal, hvilket betyder at der er en høj umættethed af fedtstofferne.

3.5 Nitrogen/protein

Denne analyse endte med et proteinindhold på 19,26g. Dette indhold er lidt lavere end den forventede værdi, der er på 22,27 % protein¹³. Det kan være svært at overskue, hvad årsagen til dette kan være, men det er en analyse, hvor alt skal være meget præcist. Det eneste, der kunne have påvirket resultaterne, er at der blev anvendt koniske kolber uden ml-skala på, og der måtte tages en tusse i brug, for at markere hvor de 150 ml var på kolben, så forlaget kunne kun blive et estimat. Der burde have blevet anvendt bægerglas. Men ellers var det en meget langt og tidskrævende analyse. Det var lidt ærgerligt, at der var en anden gruppe før os, så der skulle ventes på at de blev færdige med destruktionsglassene, og så skulle de køles af først og derefter vaskes, inden analysen kunne startes.

3.6 Kulhydrat

Differensmetoden er nem at bruge. Desværre er resultatet negativ, så en eller flere af de andre metoder må have givet et forkert resultat.

3.7 Aerobe mikroorganismer

Analysen har givet nogle meget høj kimtal. Faktisk er der over dobbelt så mange mikroorganismer i prøven, som grænseværdien tillader. Der er fin sammenhæng mellem kimtallene, og det må derfor konkluderes, at analysen giver et realistisk billede af prøven.

At kimtallet er så højt, når ingen af de andre analyser har vist noget, kunne skyldes at der er tale om bakterier, der ikke testes for. Et eksempel kunne være *Pseudomonas*, som er en forrådnelsesbakterie, der oftest kommer stammer fra drikkevand, der er kontamineret med spildevand, men som også kan eksistere i tarmen. Et andet bud kunne være *Yersinia*, som kan påvises hos ca. 25% af alle slagtesvin.

3.8 B. cereus

Der blev ikke fundet nogle *B. cereus* i prøven, men udover det er analysen vellykket. *B. cereus* giver nogle store kolonier, der er forholdsvis nemme at kende, og de store hæmolysezoner gør det endnu sværere at fejlaflæse.

¹³ Jf. Application Büc07, Minced meat (pork).

3.9 Enterokokker

Analysen viste, hvorfor der er lavet et konfirmeringstrin, da de fremvoksede kolonier godt kunne antages at være enterokokker. Analysen foreslog så en test i BHI-kultur, som også viste et positivt resultat. Havde kun analyseforskriften blevet følget, ville konklusionen være, at der var enterokokker i prøven. Katalasetesten viste til gengæld, at dette ikke var tilfældet.

3.10 S. aureus

Analysen viste i første omgang, at der var tegn på S. aureus i prøven. Dette blev dog afkræftet i 1.-trins testene. Dette er et godt eksempel på, at man skal være forsigtig med at drage konklusioner i den mikrobiologiske verden. Det er vigtigt at få konfirmeringstestene med!

3.11 Termotolerante koliforme bakterier og E. Coli

Analysen var nemt udførlig, men aflæsningen var temmelig svær. Positive kolonier skal være over 0,5mm, hvilket er meget svært at måle. Der blev dog ikke fundet nogle positive kolonier i prøven.

3.12 1.-trins tests

Bevægelighedstesten blev forsøgt udført, men det viser sig at være utroligt svært at finde noget interessant i mikroskopet. Man skal nærmest være heldig (eller bare meget erfaren), hvis man skal kunne finde bakterierne, der er meget svære at få øje på. Desuden er der en masse regler, der skal følges, idet bakterierne godt kan se ud som om de er bevægelige, hvor de slet ikke er det. Alt i alt endte det med at undersøgelsen blev opgivet, og der håbes på bedre held næste gang.

4 Konklusion

Svinekødsprøven har en del mangler i forhold til de forventede resultater.

Fedtprocenten er højere end varedeklarationen fortæller – 16% mod varedeklarationens 8-12%. Samtidig er der et lidt lavere proteinindhold, end forventet.

Der blev ikke fundet nogle bakterier i prøven, som kan give fødevareforgiftning, men antallet af mikroorganismer generelt i prøven er alarmerende højt.

Konklusionen, gruppemedlemmerne har gjort, er, at der nok ikke bliver købt kød hos den pågældende slagter mere.

Iodtalsbestemmelse og forsæbning har givet nogle lidt usikre resultater, der har afviget en smule fra grænseværdierne.

5 Referencer

Forkortelse	Titel	Forfatter	Årstal
ANA07	Levnedsmiddeltema 1 Efteråret 2007: Kemi	Jenni Sloth	2007
Büc07	Büchi – Kjeldahl – Systems. Nitrogen and Protein Determination	Büchi Labortechnik AG	Udleveret december 2007 af JeS
Fød05	Fakta om fødevarerhygiejne - Bakterier	Fødevarestyrelsen	Juni 2005
	http://www.foedevarestyrelsen.dk/FDir/Publications/2005212/side26_27.asp		
Hånd06	Håndbog for laboratoriefolk	Flemming Simonsen	2. udgave, 2006
Krav07	Vejledende grænseværdier ved rutinemæssig kontrol i detailleret	Laboratorieklubben for Sjælland, Lolland-Falster og Bornholm	Udleveret december 2007 af Ask
Mik07	Mikrobiologi. Fødevarer, Hygiejne, Genteknologi.	Herluf Thougard, Verner Varlund og Rene Madsen.	2. udgave, 2007
NMKL23	Vatten och aska. Gravimetrisk bestämning i kött och köttvaror	Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler	3. udgave, 1991
NMKL66	Staphylococcus aureus. Bestemmelse i næringsmidler	Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler	4. udgave, 2003
NMKL67	Bacillus cereus bestemmelse i næringsmidler	Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler	5. udgave, 2003
NMKL68	Enterococcus. Bestemmelse i næringsmidler og fôr.	Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler	4. udgave, 2004
NMKL86	Aerobe Mikroorganismer. Bestemmelse i næringsmidler ved 30°C, 20°C og 6,5°C.	Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler	4. udgave, 2006
NMKL91	Prøveudtagning og forbehandling af levnedsmidler og foderstoffer til kvantitativ mikrobiologisk undersøgelse	Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler	4. udgave, 2002
NMKL125	Termotolerante koliforme bakterier og Escherichia coli.	Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler	4. udgave, 2005

	Bestemmelse i næringsmidler og fôr.		
PM07	Praktisk Mikrobiologi	Herluf Thougard, Verner Varlund og Rene Madsen.	2. udgave, 2007

6 Bilag

6.1 Aske/tørstof

Aske:

Aske						
Prøve nr.	Digel (g)	Prøve (g)	Digel + aske (g)	g. Aske / 100g prøve	Gennemsnit	CV%
1	27,5738	1,5416	27,5889	0,979501816	0,99	2,17%
2	28,8772	1,9156	28,8961	0,986636041		
3	28,4842	1,5363	28,4998	1,015426674		
4	28,2203	1,5036	28,2348	0,964352221		

Tørstof:

Tørstof						
Prøve nr.	Skål (g)	Prøve (g)	Skål + tørret prøve (g)	g. tørstof / 100g prøve	Gennemsnit	CV%
1	106,3207	6,4303	108,5003	33,89577469	34,5	2,21%
2	105,9331	6,4600	108,1432	34,2120743		
3	108,1306	6,2878	110,2853	34,26794745		
4	84,7597	6,1100	86,9359	35,61702128		

6.2 Fedt

Fedtbestemmelse i kødprodukter ved soxhlet metoden

	g prøve	g cup	g cup efter ekstraktion ¹⁴	g ekstraheret fedt	g fedt/ 100 g ¹⁵	Gennemsnit	Std.afv.	CV%	RF%
Cup 1	5,1271	85,3297	86,2526	0,9229	18	16	1,3	8,4%	33%
Cup 2	5,4078	85,6048	86,4079	0,8031	15				
Cup 3	5,2604	85,4018	86,2334	0,8316	16				
Cup 4	5,0454	88,1310	88,9219	0,7909	16				

Beregningseksempel:

Cup 4:

¹⁴ Der blev også tilsat 15 g sand, men dette har ingen betydning for beregningerne.

¹⁵ Henvielse til vores varedeklaration, der havde en fedtprocent på 8-12%.

g ekstraheret fedt = g cup efter ekstraktion - g cup \Leftrightarrow
 g ekstraheret fedt = 88,9219 g - 88,1310 g = 0,7909 g.

g fedt/100 g = $\frac{b \cdot 100}{a}$, hvor a er g prøve og b er g ekstraheret fedt. \Leftrightarrow

g fedt/100 g = $\frac{0,7909 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}}{5,0454 \text{ g}} = 16 \text{ g fedt/100 g.}$

6.3 Forsæbningstal bestemmelse

Indstilling af titrervæske:

Indstilling af HCL vha. K3 fra intro						
g TRIS	ml HCL	C _{HCL, fort.}	Middelværdi	Std.afv.	CV%	C _{HCL, ufort.}
0,2308	19,38	0,09831	0,09839	0,000275	0,28%	0,4919
0,2300	19,32	0,09827				
0,2305	19,38	0,09818				
0,2305	19,26	0,09879				

Blindprøver:

Blindprøver				
	ml HCL	Middelværdi	Std.afv.	CV%
Blindprøve 1	22,95	23,22	0,25	1,1%
Blindprøve 2	23,55			
Blindprøve 3	23,19			
Blindprøve 4	23,20			

Prøver:

Prøver med rapsolie							
	g rapsolie	ml HCL	Ft ¹⁶ _mg KOH/ g fedt	Middelværdi	Std.afv.	CV%	RF%
Rapsolie 1	2,0060	11,04	168	141	30	21%	-21%
Rapsolie 2	2,0063	11,05	167				
Rapsolie 3	2,0178	14,82	115				
Rapsolie 4	2,0162	14,80	115				
Rapsolies kendingstal = 168-179 ¹⁷							

¹⁶ FT = Forsæbningstal

¹⁷ Hånd06 s. 30

Beregningseksempel:

Rapsolie 2:

$$F_t = \frac{(V_{HCL, blind} - V_{HCL, prøve}) \cdot C_{HCL, ufort.} \cdot 56,11 \text{ g/mol} \cdot 1000 \text{ mg/g}}{1000 \text{ ml/l} \cdot 1 \cdot g \text{ prøve}} \Leftrightarrow$$

$$F_t = \frac{((23,22 \text{ ml} - 11,05 \text{ ml}) \cdot 0,4919 \text{ mol/l} \cdot 56,11 \text{ g/mol} \cdot 1000 \text{ mg/g})}{1000 \text{ ml/l} \cdot 1 \cdot 2,0063 \text{ g}} = 167 \text{ mg KOH/g}$$

fedt.

Kontrol:

Kontroller med olivenolie							
	g olivenolie	ml HCL	Ft mg KOH/g fedt	Middelværdi	Std.afv.	CV%	RF%
Olivenolie 1	2,0056	9,30	192	188	2,5	1,3%	-4%
Olivenolie 2	2,0161	9,65	186				
Olivenolie 3	2,0035	9,65	187				
Olivenolie 4	2,0081	9,53	188				
Olivenolies kendingstal = 185-196 ¹⁸							

6.4 Iodtalsbestemmelse

Indstilling:

V(Na ₂ S ₂ O ₃)	m(KIO ₃)	c(Na ₂ S ₂ O ₃)	Gennemsnit	CV%
20,89	1,825	0,09798	0,09820	0,27%
20,86		0,09812		
20,78		0,09850		

Blindprøve:

V(Na ₂ S ₂ O ₃)	Gennemsnit	CV%
43,5	42,9125	1,33%
42,5		
43,3		
42,35		

Kontrol:

Kontrol nr:	g. Olivenolie	V(Na ₂ S ₂ O ₃)	Iodtal	Gennemsnit	CV%
1	0,3250	23,98	72,59079	77,01371672	4,57%
2	0,3015	23,45	80,43929		
3	0,3119	23,10	79,15545		
4	0,3057	24,30	75,86932		
Olivenoliens iodtal: 78-88					

¹⁸ Hånd06 s. 30

Prøver:

prøve nr:	g. Rapsolie	V(Na ₂ S ₂ O ₃)	Iodtal	Gennemsnit	CV%
1	0,2730	18,80	110,06178	108,7029895	0,91%
2	0,2618	20,29	107,67823		
3	0,2558	20,65	108,45019		
4	0,2640	19,90	108,62176		
Rapsoliens iodtal: 94-105					

6.5 Nitrogen/protein

Indstilling af titrervæsker:

Indstilling af HCL vha. K3 fra intro							
	g TRIS	ml HCL	M _{HCL, fort.}	Middelværdi	Std.afv.	CV%	M _{HCL, ufort.}
Titring 1	0,2301	18,95	0,1002	0,1001	0,00013	0,13%	0,5003
Titring 2	0,2303	19,00	0,1001				
Titring 3	0,2304	19,02	0,1000				
Titring 4	0,2310	19,08	0,0999				

Indstilling af NaOH vha. K3 fra intro						
	ml HCL	ml NaOH	C NaOH	Middelværdi	Std.afv.	CV %
Titring 1	20	18,95	0,5280	0,5301	0,00164	0,31%
Titring 2	20	18,83	0,5314			
Titring 3	20	18,83	0,5314			
Titring 4	20	18,90	0,5294			

Beregningseksempel:

NaOH, titring 3:

$$C_{\text{NaOH}} = \frac{V_{\text{HCL}} \cdot C_{\text{HCL}}}{V_{\text{NaOH}}} \Leftrightarrow$$

$$C_{\text{NaOH}} = \frac{20 \text{ ml} \cdot 0,5003 \text{ g/mol}}{18,83 \text{ ml}} = 0,5314 \text{ mol/l.}$$

Blindprøver:

Blindprøver med saccharose					
	g saccharose	ml NaOH	Middelværdi	Std.afv.	CV %
Saccharose 1	0,1465	23,70	23,73	0,038	0,16%
Saccharose 2	0,1517	23,78			
Saccharose 3	0,1505	23,70			
Saccharose 4	0,1497	23,73			

Prøver:

Prøver med hakket svinekød								
	g hakket svinekød	ml NaOH	g N / 100 g	g protein / 100 g	Middelværdi	Std.afv.	CV %	RF%
Svinekød 1	2,0018	15,20	3,165	19,78	19,26	0,35	1,8%	-13,5%
Svinekød 2	2,0008	15,50	3,055	19,09				
Svinekød 3	2,0037	15,49	3,054	19,09				
Svinekød 4	2,0001	15,51	3,052	19,08				

Beregningseksempel:

Svinekød 3:

$$\text{g N/100 g} = \frac{(V_{\text{NaOH,blind}} - V_{\text{NaOH,prøve}}) * C_{\text{NaOH}} * 14,01 \text{ g/mol} * 100}{1000 \text{ ml/l} * \text{g prøve}} \Leftrightarrow$$

$$\text{g N/100 g} = \frac{((23,73 \text{ ml} - 15,49 \text{ ml}) * 0,5301 * \text{mol/l} * 14,01 \text{ g/mol} * 100)}{1000 \text{ ml/l} * 2,0037 \text{ g}} = 3,054.$$

$$\text{g protein/100 g} = \text{g N/100 g} * 6,25^{19} \Leftrightarrow$$

$$\text{g protein/100 g} = 3,054 * 6,25 = 19,09.$$

Kontrol:

Kontroller med trypton									
	g Trypton	ml NaOH	g N / 100 g	Middelværdi	RF %	g protein / 100 g	Middelværdi	Std.afv.	CV %
Trypton 1	0,8262	10,02	12,3	12,3	-1,6%	77,02	76,67	1,01	1,3%
Trypton 2	0,8251	10,08	12,3			76,79			
Trypton 3	0,8253	10,35	12,0			75,25			
Trypton 4	0,8258	9,920	12,4			77,62			
N = 12,5+0,3% ²⁰									

¹⁹ Johansen s. 55 - Omregningsfaktor fra nitrogen til protein

²⁰ Levnedsmiddeltema 1 Efteråret 2007: Kemi s.8 + stod på Tryptonplasticbøtten.

6.6 Varedeklaration

6.7 Krav07: Vejledende grænseværdier ved rutinemæssig kontrol i detailedet.