

TÀI LIỆU KỸ THUẬT

BISMUTH SULFITE AGAR (ISO 6579-1)

PHÁT HIỆN *SALMONELLA* TYPHI, PARATYPHI VÀ CÁC LOẠI *SALMONELLAE* KHÁC

1 MỤC ĐÍCH

Bismuth Sulfite Agar (theo tiêu chuẩn ISO 6579-1) là môi trường chọn lọc được sử dụng để phân lập *Salmonella* trong nước, các sản phẩm từ sữa và các loại thực phẩm khác.

Môi trường này đặc biệt được sử dụng để phát hiện *Salmonella enterica* phân loài Typhi và Paratyphi trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, cũng như trong các mẫu môi trường và mẫu từ giai đoạn sản xuất ban đầu.

Bismuth Sulfite Agar có thể được sử dụng làm môi trường phân lập thứ hai trong các phương pháp chuẩn hóa để phát hiện *Salmonella*. Thành phần đặc trưng của môi trường này tuân thủ các quy định trong tiêu chuẩn NF EN ISO 6579-1.

2 LỊCH SỬ

Năm 1926, Wilson và Blair đã kết hợp bismuth và natri sulfite trong một loại môi trường nhằm phân lập vi khuẩn *Salmonella* thuộc các nhóm typhi và paratyphi. Năm 1956, Hajna và Damon đã mô tả một công thức cải tiến được Dược điển Hoa Kỳ khuyến nghị sử dụng.

3 NGUYÊN TẮC

Nồng độ của brilliant green và bismuth sulfite trong môi trường giúp ức chế hệ vi khuẩn Gram dương và vi khuẩn đường ruột (enterobacteria), ngoại trừ *Salmonella* và một số loài *Shigella*.

Nhờ sử dụng các hợp chất lưu huỳnh có trong môi trường, *Salmonella* giải phóng hydro sulfide; chất này tạo ra kết tủa ánh kim khi có mặt ferrous sulfate, khiến các khuẩn lạc có màu đen hoặc đôi khi là màu xanh lục.

Đặc biệt khuyến nghị thực hiện bước tăng sinh trước đó bằng cách sử dụng các loại canh thang như Tetrathionate, Selenite hoặc Rappaport-Vassiliadis, đồng thời cấy mẫu lên các môi trường có độ chọn lọc thấp hơn, chẳng hạn như thạch MacConkey, XLD hoặc Hektoen Enteric.

Do khả năng ức chế mạnh, môi trường này cho phép sử dụng các mẫu cấy có mức độ nhiễm tạp cao.

4 THÀNH PHẦN

Có thể điều chỉnh thành phần để đạt được hiệu suất tối ưu.

Cho 1 L môi trường:

- Enzymatic digest of animal tissues.....	10.00 g
- Meat extract.....	5.00 g
- Dextrose	5.00 g
- Disodium hydrogen phosphate (anhydrous) (Na ₂ HPO ₄)	4.00 g
- Ferrous sulfate.....	0.30 g
- Bismuth sulfite	8.00 g
- Brilliant green	25.0 mg
- Bacteriological agar.....	20.00 g

pH môi trường hoàn chỉnh tại 25 °C: 7,7 ± 0,2.

5 CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG

- Hòa tan 52,3 g môi trường dạng bột (BK223) vào 1 lít nước cất hoặc nước đã khử khoáng.
- Đun nóng từ từ đến sôi, khuấy đều liên tục cho đến khi tan hoàn toàn.
- Không tiệt trùng bằng nồi hấp (autoclave).
- Làm nguội và duy trì môi trường ở trạng thái lỏng tại nhiệt độ 47–50°C.
- Trộn đều để phân tán phần kết tủa.
- Đổ vào các đĩa Petri vô trùng.
- Để đông đặc trên bề mặt phẳng và mát.
- Làm khô trong tủ ẩm với nắp đĩa được mở hé.

✓ **Pha:**
52.3 g/L

✓ **Khử trùng:** đun
đến khi sôi

Lưu ý:

Ngay sau khi pha chế, môi trường có độ chọn lọc tối ưu nhưng sẽ giảm dần theo thời gian. Do đó, không nên bảo quản môi trường đã pha quá 4 ngày ở nhiệt độ 2–8°C.

6 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

- Cấy bằng cách ria môi trường nuôi cấy với dịch từ môi trường tăng sinh đã sử dụng.
- Ủ ở nhiệt độ từ 34 đến 38°C trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ.

✓ **CẤY:**
Trên bề mặt

✓ **Ủ:**
24 h - 48 h từ
34 - 38°C

7 KẾT QUẢ

Các khuẩn lạc đặc trưng của *Salmonella Typhi* có màu đen, dẹt, khô và được bao quanh bởi một vùng màu nâu đen có ánh kim. Các khuẩn lạc màu từ xanh lục đến nâu, không có vùng tối bao quanh, là đặc điểm của *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Paratyphi*.

Vì khuẩn nhóm *Coliform*, *Proteus* và *Shigella* bị ức chế mạnh nhưng đôi khi vẫn có thể tạo ra các khuẩn lạc nhỏ màu xanh lục hoặc nâu.

Xem PHỤ LỤC 1: HÌNH ẢNH MINH HỌA.

8 QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG

Môi trường dạng bột: bột màu be ánh xanh lục, tơi xốp và đồng nhất.

Môi trường đã pha chế trong đĩa: thạch màu be ánh xanh lục.

Phản ứng nuôi cấy điển hình sau 48 giờ ủ ở 37 °C:

Vi sinh vật		Phát triển	Khuẩn lạc đặc trưng
<i>Salmonella</i> Typhimurium	WDCM 00031	Tốt	Các khuẩn lạc màu đen có ánh kim loại Các khuẩn lạc màu nâu lục Các khuẩn lạc màu lục -
<i>Salmonella</i> Enteritidis	WDCM 00030	Tốt	
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Ức chế một phần	
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Ức chế	

9 BẢO QUẢN / HẠN SỬ DỤNG

Môi trường cơ bản dạng khô: 2-30 °C.

Hạn sử dụng được ghi trên nhãn.

Môi trường đã pha chế trong đĩa (*): 4 ngày ở nhiệt độ 2–8 °C, tránh ánh sáng.

(*) Giá trị tham chiếu được xác định trong điều kiện pha chế tiêu chuẩn, tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Môi trường bột khô:

500 g bottle BK223HA

11 TÀI LIỆU THAM KHẢO

Wilson, J.W., and Blair, E.M. 1931. Further experience of the Bismuth Sulphite Media in the isolation of *Bacillus typhosus* and *Bacillus paratyphosus* B from faeces, sewage and water. J. Hyg., 31: 138.

Wilson, J.W. 1938. Isolation of *Bact. typhosum* by means Bismuth Sulphite Medium in water and milk born epidemics. J.Hyg., 38: 507-519.

NF EN ISO 19250. Juin 2013. Water quality — Detection of Salmonella spp.

NF EN ISO 6579-1. Avril 2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp.

NF EN ISO 6579-1/A1. March 2020. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1 : detection of Salmonella spp. - Amendment 1 Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC

12 THÔNG TIN BỔ SUNG

Thông tin được cung cấp trên nhãn có hiệu lực ưu tiên hơn so với công thức hoặc hướng dẫn được mô tả trong tài liệu này và có thể được sửa đổi bất cứ lúc nào mà không cần báo trước.

Mã tài liệu : BISMUTH SULFITE ISO 6579-1_Env3 Ngày
tạo : 03-2018
Cập nhật : 06-2020
Lý do cập nhật: Cập nhật theo tiêu chuẩn NF EN ISO 6579-1/A1

PHỤ LỤC 1: HÌNH ẢNH MINH HỌA

BISMUTH SULFITE Agar (modified Wilson Blair)

Phát hiện *Salmonella Typhi* và các loài *Salmonella* khác

Kết quả :

Sự phát triển thu được sau 24 giờ ủ ở 37 °C (cấy trên bề mặt).

Salmonella Typhi
Đặc điểm khuẩn lạc: Màu đen có ánh kim, dẹt và khô, được bao quanh bởi một quầng màu nâu đen.

