

TÀI LIỆU KỸ THUẬT

BACILLUS CEREUS AGAR (DỰA THEO MOSSEL)

ĐỊNH LƯỢNG *BACILLUS CEREUS*

1 MỤC ĐÍCH

Bacillus cereus Agar được sử dụng để phát hiện và định lượng số bào tử, tế bào sinh dưỡng của vi khuẩn *Bacillus cereus* trong các sản phẩm thực phẩm. Nó được sử dụng để định lượng *Bacillus cereus* giả định ở 30°C của theo tiêu chuẩn (NF EN ISO 7932). Nó cũng được đề nghị sử dụng trong các phương pháp phát hiện số lượng nhỏ theo NF EN ISO 21871.

Thành phần chính tương ứng với MYP agar (mannitol, lòng đỏ trứng gà, polymyxin agar) được mô tả trong tiêu chuẩn NF EN ISO 7932 và NF EN ISO 21871.

2 LỊCH SỬ

Năm 1967, Mossel và cộng sự đề nghị sử dụng môi trường mannitol-phenol red-egg yolk, nguyên tắc môi trường dựa trên hai yếu tố:

- *Bacillus cereus* không có khả năng lên men mannitol.
- Sự hiện diện của một lecithinase trong phần lớn các chủng thử nghiệm.

Các tác giả cho thấy khả năng chọn lọc tốt khi sử dụng với polymyxin B tại 10 mg/lít.

3 NGUYÊN TẮC

Tryptone và meat extract giúp sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus cereus*.

Nhũ tương lòng đỏ trứng vô trùng được sử dụng để phát hiện sự hiện diện của lecithinase trong hầu hết các chủng *Bacillus cereus*. Sản phẩm phân hủy không hoà tan của lòng đỏ trứng, lecithin tích tụ xung quanh các khuẩn lạc tạo thành một chất kết tủa màu trắng.

Mannitol được sử dụng để phân biệt sự nhiễm vi sinh vật, làm cho phenol red chuyển sang màu vàng.

Lecithin của lòng trắng trứng tích tụ quanh các khuẩn lạc, tạo thành một quầng trắng.

Polymyxin được dùng để ức chế vi thực vật đi kèm khi mẫu xét nghiệm bị ô nhiễm nặng.

4 THÀNH PHẦN

Có thể được điều chỉnh để có được hiệu suất tối ưu

Trong 1 lit môi trường:

- Tryptone 10,0 g
- Meat extract..... 1,0 g

- D-mannitol..... 10,0 g
 - Sodium chloride 10,0 g
 - Phenol red..... 25,0 mg
 - Polymyxin B..... 1x105 IU
 - Sterile Egg Yolk emulsion 100 mL
 - Bacteriological agar..... 13,5 g
- pH môi trường hoàn chỉnh 25 °C : 7,2 ± 0,2.

5 CHUẨN BỊ

- Hòa tan 44,5 g môi trường bột khô (BK116) trong 0,9 lít nước cất hoặc nước khử ion.
- Đun từ từ đến sôi, khuấy đều cho đến khi tan hoàn toàn.
- Phân phối 90 ml vào mỗi bình.
- Tiệt trùng trong nồi hấp ở 121°C trong 15 phút.
- Duy trì nóng chảy ở 44-47 ° C
- Thêm vô trùng 10ml egg yolk emulsion với Polymyxin B (BS055) vào 90ml môi trường cơ bản.
- Lắc đều.
- Đổ vào đĩa Petri tiệt trùng và chờ môi trường đông lại trên bề mặt môi trường phẳng.

Lưu ý:

Có thể thay 10ml Egg Yolk emulsion vô trùng với Polymyxin B bằng cách thêm 10 mL Egg Yolk emulsion (BS066) và 1 mL Polymyxin B hoàn nguyên (chất bổ sung BS007 hoàn nguyên với 5 mL nước cất vô trùng).

6 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

Định lượng *Bacillus cereus* ở 30 °C (NF EN ISO 7932)

- Làm khô đĩa môi trường trong tủ ẩm bằng cách mở hé nắp
- Hút 0,1ml mẫu cần phân tích hoặc dây nồng độ pha loãng của nó vào đĩa môi trường đã chuẩn bị ở trên hoặc đĩa đồ sẵn (BM038, BM199)
- Dùng que cấy tam giác trái đều trên bề mặt môi trường.
- Ủ ở 30 °C trong 18 đến 24h. Nếu khuẩn lạc không dễ nhìn thấy, kéo dài thời gian ủ thêm 24 giờ.

Phát hiện số lượng nhỏ vi khuẩn *Bacillus cereus* (NF EN ISO 21871)

- Trên bề mặt của môi trường đã được chuẩn bị như trên hoặc các đĩa môi trường đồ sẵn (BM038, BM199), dùng que cấy vòng cấy 1 vòng môi trường tăng sinh lên đĩa môi trường thạch
- Ủ ở 30 °C trong 18 đến 24 giờ. Nếu khuẩn lạc không dễ nhìn thấy, kéo dài thời gian ủ thêm 24 giờ.

7 KẾT QUẢ

Các khuẩn lạc được xem là *Bacillus cereus* có màu hồng (âm tính mannitol) và gần như luôn được bao quanh bởi một màng kết tủa, cho thấy việc sản xuất lecithinase. Nhìn chung, chúng có kích thước từ 2 đến 5 mm và rìa ngoài răng cưa

Ghi chú:

Nếu những đĩa bị nhiễm khuẩn nặng, chúng sẽ lên men mannitol, màu hồng của thạch và các khuẩn lạc *Bacillus cereus* có thể khó nhận dạng .

XEM PHỤ LỤC HÌNH ẢNH

8 KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

Môi trường bột khô cơ bản: bột màu hồng nhạt, chảy tự do và đồng nhất.

Chất bổ sung Polymyxin B: trắng, dung dịch không màu sau khi hoàn nguyên

Chất bổ sung Egg Yolk: nhũ tương màu vàng, đục.

Môi trường đồ sẵn hoàn chỉnh: agar màu hồng nhạt đến màu cam đục.

Phản ứng nuôi cấy đặc trưng sau 24⁽¹⁾ hoặc 48 giờ ủ ở 30°C (NF EN ISO 11133):

VI SINH VẬT	PHÁT TRIỂN (TỈ LỆ NĂNG SUẤT P _R)	ĐẶC TRƯNG
⁽¹⁾ <i>Bacillus cereus</i> WDCM 00001	Tốt đến rất tốt, score 2	Khuẩn lạc hồng với quầng
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> WDCM 00003	Hạn chế, score 1-2	Khuẩn lạc vàng không có quầng
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013	ức chế, score 0	-

9 BẢO QUẢN

Môi trường bột khô : 2-30°C

Môi trường chuẩn bị sẵn trong đĩa Petri: 2-8 °C.

Egg Yolk Emulsion tiệt trùng: 2-8 °C

Egg Yolk Emulsion tiệt trùng với Polymyxin B: 2-8 °C

Polymyxin B Selective Supplement: 2-8 °C

Hạn sử dụng được in trên nhãn

Môi trường cơ bản chuẩn bị sẵn trong chai: 180 ngày, 2-8°C.

Môi trường hoàn chỉnh chuẩn bị sẵn trong đĩa petri: 30 ngày, 2-8°C

Chất bổ sung Polymycin B đã hoàn nguyên: 30 ngày, 2-8°C

(*) Giá trị chuẩn được xác định trong các điều kiện chuẩn bị tiêu chuẩn, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

10 ĐÓNG GÓI

Môi trường bột khô cơ bản (không có egg yolk và Polymyxin B) :

Chai 500 g

.....BK116HA

Egg yolk emulsion tiệt trùng với Polymyxin B :

10 ống x 50 mLBS05508

Egg yolk emulsion tiệt trùng :

10 ống x 50 mL.....BS06608

Chất bổ sung chọn lọc Polymyxin B:

10 vials

.....BS00708

Môi trường đồ sẵn trong đĩa Petri (Ø 90 mm) :

20 đĩa

.....BM03808

120 đĩa

.....BM19908

11 THAM KHẢO

Mossel, D.A.A., Koopman, M.J., and Jongerius, E. 1967. Enumeration of *Bacillus cereus* in Foods. *App. Microb.*, 15, (3): 650-653.

NF EN ISO 7932. Juillet 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présumptifs. Technique par comptage des colonies à 30 °C.

NF EN ISO 21871. Juillet 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présumés en petit nombre. Technique du nombre le plus probable et méthode de recherche.

NF EN ISO 11133. Juillet 2014. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau. Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture.

12 THÔNG TIN BỔ SUNG

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

Mã tài liệu: BACILLUS MOSSEL_ENv10

Ngày tạo: 02-2003

Cập nhật: 04-2018

Nguồn gốc sửa đổi: Bổ sung bao bì mới BM19908

HÌNH ẢNH MINH HỌA

MYP agar (cho *Bacillus cereus* theo Mossel)

Phát hiện và định lượng *Bacillus cereus*.

Các kết quả :

Phát triển thu được sau 24 giờ ủ ở 30 ° C.

Bacillus cereus
Khuẩn lạc đặc trưng:
Khuẩn lạc màu hồng bao
quanh bởi một quầng đục
(sản xuất lecithinase)

