

TÀI LIỆU KỸ THUẬT

TRYPTONE-BILE-X-GLUCURONATE (TBX) AGAR

ĐỀM *ESCHERICHIA COLI* DƯƠNG TÍNH β -D-GLUCURONIDASE

1 MỤC ĐÍCH

TBX Agar là một môi trường chọn lọc để định lượng *Escherichia coli* dương tính với β D-glucuronidase trong thực phẩm và các mẫu môi trường. Kết quả thu được trực tiếp bằng cách đếm các khuẩn lạc đặc trưng chỉ sau 24 giờ ủ và không cần khẳng định.

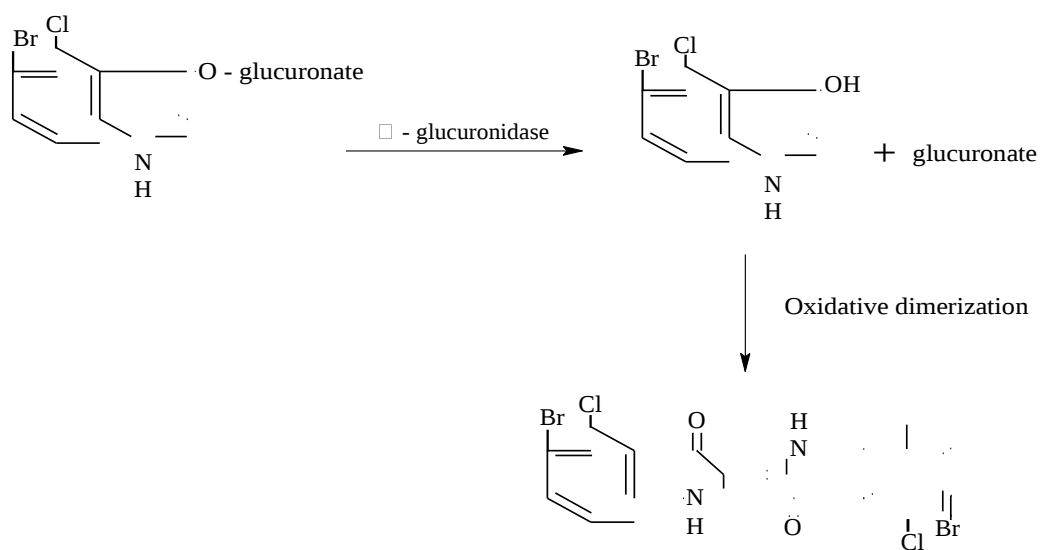
Thành phần điển hình tương ứng với thành phần được xác định trong các tiêu chuẩn NF ISO 16649-1, NF ISO 16649-2 và NF EN ISO 16649-3.

2 LỊCH SỬ

In 1949, Buehler và cộng sự là những người đầu tiên báo cáo sự hiện diện của β D-glucuronidase trong *Escherichia coli*. Kể từ đó, hầu hết các nghiên cứu đã chỉ ra rằng 94 đến 97% *Escherichia coli* có nguồn gốc từ con người hoặc môi trường có β -D-glucuronidase. Enzyme này cũng có thể được phát hiện trong *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* và *Yersinia*, nhưng sự hiện diện của nó chỉ liên quan đến một số chủng của những loài này. Do đó, β D-glucuronidase có thể được coi là một dấu hiệu để phát hiện *Escherichia coli* trong thực phẩm và nước. Vào năm 1990, Restaino đã sử dụng thành công chất nền tạo màu mới: BCIG. Khi được kết hợp vào thạch tergitol, nó cho phép đếm *Escherichia coli* trong các sản phẩm thịt trong 24 giờ. Ngược lại, thạch TBX đã được chế tạo theo công thức đặc biệt, sử dụng muối mật làm chất chọn lọc thay vì tergitol.

3 NGUYÊN TẮC

BCIG (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β D-glucuronic acid) là một chất nền tạo màu. Hầu hết các chủng *Escherichia coli* có β D-glucuronidase phân cắt BCIG, làm cho các khuẩn lạc có màu xanh lam theo cơ chế phản ứng sau:



Blue precipitate of dichloro-dibromo indigo

Điều quan trọng cần lưu ý là không phải tất cả *Escherichia coli* đều có β D-glucuronidase, đặc biệt là loại huyết thanh enterohemorrhagic O157: H7, tạo thành các khuẩn lạc màu trắng.

Muối mật ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương và có lợi cho sự phục hồi của *Escherichia coli*.

4 THÀNH PHẦN

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

Trong 1 lit môi trường:

- Tryptone(*) 20,0 g
- Bile salts n°3 1,5 g
- BCIG (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronate) 75,0 mg
- Bacteriological agar 9,0 g

pH của môi trường hoàn chỉnh ở 25 °C : $7,2 \pm 0,2$.

(*): Tryptone tương ứng với Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym

5 CHUẨN BỊ

Chuẩn bị môi trường:

- Hòa tan 30,6 g môi trường (BK146) vào 1 lít nước cất hoặc nước khử ion.
- Đun sôi từ từ, khuấy liên tục trong khoảng thời gian tối thiểu để hòa tan hoàn toàn.
- Phân phối trong ống hoặc lọ.
- Khử trùng trong nồi hấp ở 121 °C trong 15 phút.
- Làm nguội đến nhiệt độ 47-50 °C.

✓ **Pha loãng** : 30,6 g/L

✓ **Hấp khử trùng** :
15 phút tại 121 °C

Sử dụng môi trường pha sẵn:

- Làm tan chảy môi trường (BM069 hoặc BM171), trong thời gian ngắn nhất để hóa lỏng môi trường.
- Làm nguội đến nhiệt độ 47-50°C.

6 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

Đếm bằng phương pháp màng lọc (NF ISO 16649-1)

- Cấy vào màng 1 mL chất cấy và đặt trên bề mặt thạch Modified Glutamate agar.
- Ủ trong $4 \pm 0,25$ h tại 37 ± 1 °C.
- Bóc màng khỏi đĩa trước và đặt nhẹ lên bề mặt thạch TBX agar.
- Ủ trong 20 - 24 h tại 44 ± 1 °C.

✓ **Cấy** : Sử dụng màng lọc

✓ **Ủ** :
20 h - 24 h tại 44 ± 1 °C

Cấy vào đĩa đổ (NF EN ISO 16649-2)

- Chuyển 1 mL mẫu huyền phù và các dung dịch pha loãng nối tiếp của nó vào đĩa Petri.
- Đổ khoảng 15 mL môi trường nóng chảy được giữ ở 44-47 °C vào mỗi đĩa.
- Trộn đều và để đông đặc.
- Ủ ở nhiệt độ 44 ± 1 °C trong 18 - 24 giờ.

✓ **Cấy** :
1 mL vào đĩa

✓ **Ủ** :
18 h - 24 h tại 44 ± 1 °C

CHÚ Ý

Nếu nghi ngờ sự hiện diện của các vi sinh vật bị căng thẳng, trước tiên ủ trong 4 giờ ở 37 °C, sau đó trong 18 đến 24 giờ ở 44 °C.

Đếm bằng phương pháp MPN (NF EN ISO 16649-3)

- Đổ môi trường vào đĩa Petri vô trùng và chờ thạch đông lại.
- Làm khô các đĩa trong tủ ẩm.
- Cấy ria các ống Modified glutamate broth (BK186) dương tính lên môi trường TBX như đã chuẩn bị ở trên.
- Ủ tại 44 ± 1 °C trong 20 - 24 h.

✓ **Cấy** : Ria trên bề mặt

✓ **Ủ** :
20 - 24 h tại 44 °C

7 KẾT QUẢ

Khuẩn lạc đặc trưng có màu xanh lam đến xanh lục.

Đếm khuẩn lạc các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc đặc trưng và ít hơn 300 khuẩn lạc tổng số (đặc trưng và không đặc trưng).

Xem PHỤ LỤC 1 : HÌNH ẢNH HỖ TRỢ .

8 QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG

Môi trường bột khô: bột màu trắng kem, chảy tự do và đồng nhất.

Môi trường đã pha : whitish agar.

Phản ứng nuôi cấy điển hình sau 21 giờ ủ ở 44 ° C (NF EN ISO 11133) :

Vi sinh vật		Phát triển (Hiệu suất thu hồi : P_R)	Đặc điểm
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	$P_R \geq 50\%$	Khuẩn lạc màu xanh
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00202	$P_R \geq 50\%$	Khuẩn lạc màu xanh
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	Không ức chế, score 2	Khuẩn lạc màu trắng
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	Không ức chế, score 2	Khuẩn lạc màu trắng đến màu be xám-
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	ức chế, score 0	

9 BẢO QUẢN/ HẠN SỬ DỤNG

Môi trường bột khô: 2-20 °C.

Môi trường pha sẵn: 2-8 °C, Tránh ánh sáng.

Hạn sử dụng được in trên nhãn.

Môi trường đã pha trong chai (*) : 180 ngày tại 2-8 °C tránh ánh sáng.

Môi trường đã pha trong đĩa (*) : 15 ngày tại 2-8 °C, tránh ánh sáng

(*) Giá trị điểm 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:

Chai 100 g BK146HM

Chai 500 g BK146HA

Môi trường chuẩn bị sẵn:

10 chai x 100 mL BM06908

10 chai x 200 mL BM17108

11 THAM KHẢO

Buehler, H.J., Katzman, P.A. and Doisey, E.A.. 1949. Bacterial glucuronidase. Federation Proceedings, 8 : 189.

Adams, M.R., Grubb, S.M., Hamer, A. and Clifford, M.N.. 1990. Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on β -glucuronidase activity. Applied and Environmental Microbiology, 56 (7) : 2021-2024.

Restaino, L., Frampton, E.W. and Lyon, R.H.. 1990. Use of the chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3 indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) for enumerating *Escherichia coli* in 24 h from ground beef. Journal of Food Protection, 53 (6) : 508-510.

NF ISO 16649-2. Juillet 2001. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive. Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5- bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronate.

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 (Tirage 2 (2016-01-01)).

NF EN ISO 16649-3. Juillet 2015. Microbiologie de la chaîne alimentaire.. Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase-positives. Partie 3 : recherche et technique du nombre le plus probable utilisant le bromo-5-chloro-4-indolyl-3- β -D-glucuronate.

NF ISO 16649-1. Septembre 2018. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive - Partie 1 : technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D glucuronide.

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 : AGAR TBX_ENv11
Ngày phát hành : 01-2003
Ngày cập nhật : 11-2021
Lý do sửa đổi : Cập nhật lại hướng dẫn sử dụng.

TBX Agar

Đếm *Escherichia coli* dương tính β -D-glucuronidase.

Kết quả :

Tăng trưởng sau 24h tại 44 °C (đổ đĩa).

Escherichia coli dương tính β -glucuronidase posi

Khuẩn lạc đặc trưng :
Màu xanh lam- xanh lục

