

TÀI LIỆU KỸ THUẬT

IRON SULFITE AGAR (ISA) (ISO 15213-1)

ĐỊNH LƯỢNG *CLOSTRIDIUM* SPP.

1 MỤC ĐÍCH SỬ DỤNG

IRON SULFITE AGAR (ISA) (ISO 15213-1) được khuyến dùng để định lượng *Clostridium* spp. khử sulfite.

Clostridium spp. khử sulfite là vi khuẩn kỵ khí bắt buộc, gram dương, sinh bào tử, hình que. Các loài quan trọng thuộc nhóm này là *Clostridium* (*C.*) *perfringens*, *C. bifermentans* và *C. sporogenes*. Một số loài có thể gây bệnh từ thực phẩm. Là vi khuẩn phổ biến, chúng chủ yếu được tìm thấy trong tự nhiên. Các loài *Clostridium* sống trong đất và đường ruột của động vật và con người.

Clostridium spp. khử sulfite bao gồm cả *C. perfringens* được sử dụng rộng rãi như là chất chỉ thị vi sinh vật về sự nhiễm clostridial trong sản xuất thực phẩm (ví dụ như sản xuất thịt). Chúng có khả năng tạo ra các bào tử chịu nhiệt.

Thành phần điển hình tương ứng với thành phần được xác định trong tiêu chuẩn NF EN ISO 15213-1.

2 NGUYÊN TẮC

Vi sinh vật khử sulfit *Clostridium* spp. khử natri sulfit thành sulfua, chất này cùng với sắt citrat tạo thành kết tủa sắt sulfua màu đen xung quanh các khuẩn lạc.

3 THÀNH PHẦN

Thành phần có thể được điều chỉnh để đạt được hiệu suất tối ưu

Đối với 1 lít môi trường:

- Tryptone 15,0 g
- Papaic digest of soybean meal 5,0 g
- Yeast extract 5,0 g
- Sodium metabisulfite 0.5 g
- Ferric ammonium citrate 1,0 g
- Bacteriological agar 15,5 g

pH của môi trường hoàn chỉnh ở 25°C: $7,6 \pm 0,2$.

4 CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG

Chuẩn bị môi trường khô:

- Hòa tan 42g môi trường khô (BK239) trong 1 lít nước cất hoặc nước khử khoáng
- Đun sôi từ từ, khuấy liên tục cho đến khi sôi hoàn toàn
- Phân phối vào lọ hoặc ống nghiệm.
- Khử trùng trong nồi hấp ở 121°C trong 15 phút.
- Làm mát và duy trì môi trường ở 44 - 47 °C.

✓ **Hoàn nguyên:**
42,0 g/l

✓ **Tiệt trùng:**
15 phút ở 121 ° C

Sử dụng môi trường đồ sẵn:

- Làm tan chảy môi trường thạch (nếu được chuẩn bị trước như trên) hoặc làm tan môi trường trong khoảng thời gian tối thiểu cần thiết để đạt được sự hóa hoàn toàn.
- Làm mát và duy trì môi trường ở 44 - 47 °C.

5 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

Chuẩn bị huyền phù ban đầu và độ pha loãng gấp 10 lần của nó theo các quy tắc được xác định trong các tiêu chuẩn ISO 6887 tương ứng.

Định lượng *Clostridium* spp. khử sulfite (ISO 15213-1)

Đun nóng, nếu cần, dãy pha loãng thập phân đến 80 °C trong 10 phút $\pm$ 1 phút để phá hủy tế bào sinh đường và kích hoạt bào tử.

- Chuyển 1 mL chất cấy và các dung dịch pha loãng nối tiếp của nó vào các đĩa Petri rỗng, vô trùng.
- Đổ khoảng 15mL môi trường.
- Trộn đều. Để hóa rắn trên một bề mặt phẳng.
- Thêm lớp thạch thứ hai và để cho đông lại.
- Ủ các đĩa trong môi trường kỵ khí trong 48 ± 2 giờ ở 37 ± 1 °C.

6 KẾT QUẢ

Đếm khuẩn lạc màu đen hoặc xám đến vàng nâu.

Đếm các đĩa trong vòng 30 phút vì màu của các khuẩn lạc có thể nhanh chóng phai và biến mất do oxy hóa sắt sunfit.

Tiến hành thử nghiệm xác nhận để định lượng *Clostridium* spp. Nếu không tiến hành xác nhận, kết quả có thể được báo cáo là “vi khuẩn kỵ khí khử sulfit”.

Xem PHỤ LỤC 1: ẢNH HỖ TRỢ.

Môi trường gốc khô: bột màu be, chảy tự do và đồng nhất.

Môi trường đã chuẩn bị: thạch hồ phách

Vi sinh vật		Tăng trưởng (Tỷ lệ năng suất : P_R)	Khuẩn lạc đặc trưng
<i>Clostridium perfringens</i>	WDCM 00007	$PR \geq 50 \%$	Đen Khuẩn lạc màu trắng, không đặc trưng
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013		

8 BẢO QUẢN

Môi trường bột khô: 2-30°C

Môi trường hoàn chỉnh: 2-25°C

HSD được in trên bao bì

Môi trường đổ sẵn trong lọ hoặc ống nghiệm (*): 180 ngày ở 20 – 25°C

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

9 BAO BÌ

Môi trường bột khô

500g/chai BK239HA

Môi trường hoàn chỉnh

10 x 200ml vials BM23508

10 THAM KHẢO

NF EN ISO 11133. July 2014. Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media.

NF EN ISO 15213-1. February 2023. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. - Part 1: enumeration of sulfite-reducing *Clostridium* spp. by colony-count technique.

NF EN ISO 6887-1. June 2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: general rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

NF EN ISO 6887-2. June 2017. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products.

NF EN ISO 6887-3. June 2017. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products.

NF EN ISO 6887-4. June 2017. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products.

NF EN ISO 6887-5. May 2020. Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.

NF EN ISO 6887-6. May 2013. Microbiology of food and animal feed - Preparation of test samples, initial suspension and decimal

dilutions for microbiological examination - Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.

11 THÔNG TIN KHÁC

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

Mã tài liệu: **IRON SULFITE AGAR (ISA) (ISO 15213-1)**

Ngày tạo : 07-2023

Cập nhật :

Nguyên nhân cập nhật : Cập nhật hướng dẫn sử dụng, thư mục.

PHỤ LỤC 1 : ẢNH HỖ TRỢ

IRON SULFITE AGAR (ISA)

Định lượng *Clostridium* spp. khử sulfite

Kết quả:

Tăng trưởng thu được sau 24h ủ ở 37°C, trong điều kiện kỵ khí

