

Stofnaam	Sulfiet-reducerende Clostridia
Type methode	telplaatmethode
Te onderzoeken in	diervoeders, diervoedergrondstoffen
Minimum bepaalbaarheids grens	in 10% monstersuspensie 10 kve/g monster
Herhaalbaarheid	nvt
Reproduceerbaarheid	nvt
Categorie	
Titel	Onderzoek op sulfietreducerende clostridia Uit: Microbiologisch onderzoek van levensmiddelen, : strategie, principes en methoden, Hoofdstuk 14. 3e uitgave , 1990. Door prof. dr. D.A.A. Mossel en mw. ir. W.F. Jacobs-Reitsma. Uitgeverij P.C. Noordervliet B.V. Zeist

**leeswijzer:** De nu volgende beschrijving is overgenomen uit het op het voorblad vermelde boek. In dit boek is de beschrijving opgenomen onder Hoofdstuk 14. In de onderstaande methodebeschrijving komen verwijzingen naar andere hoofdstukken uit dit boek. Deze verwijzingen zijn aangegeven met H... Voor verdere informatie dient men dan dit boek te raadplegen.

Verder geldt, dat om de streefwaarde te toetsen, men kan volstaan met de telplaattechniek. Grensreactie en identificatie van stammen zijn niet nodig, en daarom niet overgenomen in de onderstaande beschrijving.

## 1. KOLONIETELLING VOLGENS DE PLAATMETHODE

### 1.1 Definitie

Onder een aantal kolonievormende eenheden van sulfietreducerende clostridia wordt verstaan het aantal kolonies met zwarte hof, dat zich per g of ml van het product ontwikkelt in het onder 1.2.1 beschreven medium, na anaërobe bebroeding gedurende 1, 2 of 3 dagen bij 30°C volgens de onder 1.2.6 beschreven werkwijze, voorzover deze kolonies tevens de onder 1.3 aangegeven eigenschappen vertonen.

### 1.2 Telmethode

#### 1.2.1 Medium (sulfiet polymyxine agar)

- Basismedium (reinforced Clostridium agar zonder glucose)

pepton	10 g
vleesextractpoeder	10 g
gistextractpoeder	3 g
oplosbaar zetmeel	1 g
natriumchloride	5 g
natriumacetaat	3 g
l-cysteine HCl	0,5 g
agar	15 g
aqua dest	1000 ml

Los de overige ingrediënten onder verwarming in het water op. Stel de pH zodanig in, dat deze na sterilisatie  $6,8 \pm 0,2$  bedraagt bij 25°C. Vul af in kolfjes in porties van 100 ml en steriliseer gedurende 15 min bij 121°C. Koel af tot ca. 48°C.

#### 1.2.2 IJzercitraatoplossing

ijzer(III)citraat ( $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	1 g
aqua dest	1000 ml

Bereid onmiddellijk voor gebruik een oplossing van de boven aangegeven samenstelling en steriliseer deze door middel van filtratie over een 0,45 µm filter.

#### 1.2.3 Natriumsulfietoplossing

natriumsulfiet ( $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	5 g
aqua dest	100 ml

Bereid onmiddellijk voor gebruik een oplossing van de boven aangegeven samenstelling en steriliseer deze door middel van filtratie over een 0,45 µm filter.

#### 1.2.4 Polymyxine-oplossing

polymyxine-B-sulfaat	100 mg
aqua dest	100 ml

Bereid een oplossing van de boven aangegeven samenstelling en steriliseer deze door middel van filtratie over een 0,45 µm filter. De oplossing is ongeveer een maand houdbaar bij 4°C.

#### 1.2.5 Bereiding

Voeg op aseptische wijze aan 100 ml van het opgesmolten en tot ca. 48°C afgekoelde basismedium (1.2.1) toe:

2 ml ijzercitraatoplossing (1.2.2)

1 ml natriumsulfietoplossing (1.2.3)

1 ml polymyxine-oplossing (1.2.4)

Meng door voorzichtig zwenken de toevoegingen door het basismedium heen en giet onmiddellijk daarna uit in petrischalen. Laat stollen. Droog voor het gebruik de platen met de bodem omhoog gedurende 20 min bij 55°C of 45 min bij 37°C, in ieder geval tot ze goed, maar niet **te** droog zijn<sup>1</sup>.

#### 1.2.6 Werkwijze

Kies de in te zetten verdunningen dusdanig dat zo mogelijk tenminste één ervan kan worden geacht een aantal kolonies tussen 30 en 300 op te leveren. Gebruik voor elke te onderzoeken decimale verdunning twee petrischalen van ca. 9 cm doorsnee. Pipetteer in elk van deze twee schalen 1 ml van de betrokken verdunning. Voeg per petrischaal toe 15 ml van het tot ca. 48°C afgekoelde sulfiet-polymyxine-telmedium, meng zorgvuldig en laat stollen. Bedek de agarlaag daarna met ongeveer 10 ml van hetzelfde medium en laat ook die stollen. Bebroed de platen onder anaërobe omstandigheden bij 30 ± 1°C.

Tel na 1, 2 en 3 dagen het aantal zwarte kolonies, zo mogelijk in die platen, waarin dit aantal tussen 30 en 300 ligt. Stel dit aantal gelijk aan K. Bevestig een voor telplaten gebruikelijk aantal kolonies volgens 1.3 (H3.4.7). Noteer het aantal kolonies q dat aan het beschreven reactiepatroon voldoet en bereken (H3.4.8) uit de verkregen resultaten het aantal gezochte kolonievormende eenheden per g of ml monster.

### 1.3 Bevestiging

Onderzoek na zuivering de kolonies op de volgende, voor clostridia karakteristieke eigenschappen:

- morfologie	staafvormig, met of zonder sporen
- Gramkleuring (H 5.1)	Grampositief
- katalase (1.4)	θ

---

<sup>1</sup> De aanduiding 'niet te droog' is niet nauwkeuriger te omschrijven

## 1.4 Katalasereactie

### 1.4.1 Medium (BHI met cysteine)

Aftreksel van kalfshersenen (in droge vorm)	12,5 g
afreksel van runderhart (in droge vorm)	5 g
proteose pepton	10 g
glucose	2 g
natriumchloride	5 g
dinatriumwaterstoffosfaat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	2,5 g
L-cysteine HCL	0,5 g
aqua dest	1000 ml

Los de overige ingrediënten in het water op. Stel de pH zodanig in, dat deze na sterilisatie  $7,3 \pm 0,1$  bedraagt bij 25°C. Vul af in buizen en steriliseer gedurende 15 min bij 121°C.

### 1.4.2 Reagens

3% waterstofperoxide-oplossing, vers bereid, zie H8.4.1.

### 1.4.3 Uitvoering

Beënt een buis met het onder 1.4.1 genoemde medium met het te onderzoeken bacteriemateriaal. Bedek de vloeistof met een laag van ca. 2 cm steriele 2% agar-oplossing en laat deze stollen. Bebroed de buis gedurende 24 uur bij  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Verwijder van buizen waarin duidelijke groei van bacteriën is opgetreden de agarlaag en voeg 0,1 ml van de 3% waterstofperoxide-oplossing toe. Bij positieve reactie vormen zich gasbellen in de vloeistof, *Clostridium*-soorten geven bij deze reactie dus geen gasbellen.

### N.B. Afsluiting en weer toegankelijk maken van buizen voor anaerobiose

Gebruik voor het afdekken van buizen een steriele 2% agaroplossing. Eventueel kan ook gesteriliseerd rundvet gebruikt worden.

Gebruikt om de buizen opnieuw toegankelijk te maken de volgende procedure: Doorsteek de deklaag aan de zijde van de glaswand met een in de vlam verhitte roestvrijstalen staaf van enkele mm diameter. Houd daarbij de buis scheef en doorsteek op het hoogste punt, zodat het gedeeltelijk gesmolten deklaagmateriaal de ontstane opening zo weinig mogelijk blokkeert. Neem de vloeistof af met een pipet met nauwe uitmonding, b.v. een pasteurpipet. Sluit, zo nodig, de vloeistof daarna opnieuw van de lucht af.