

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN VIỆT NAM**

**TCVN 11039-4:2015**

Xuất bản lần 1

**PHỤ GIA THỰC PHẨM -  
PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VI SINH VẬT -  
PHẦN 4: PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG COLIFORM VÀ  
E.COLI BẰNG KỸ THUẬT ĐẾM SỐ CÓ XÁC SUẤT  
LỚN NHẤT (PHƯƠNG PHÁP THÔNG DỤNG)**

*Food additive - Microbiological analyses -  
Part 4: Detection and enumeration of coliforms and E.coli by most probable number  
technique (Routine method)*

**HÀ NỘI - 2015**

## Lời nói đầu

TCVN 11039-4:2015 được xây dựng trên cơ sở tham khảo JECFA 2006, *Combined compendium of food additive specifications, Volume 4: Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications*;

TCVN 11039-4:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F4 Gia vị và phụ gia thực phẩm biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 11039 Phụ gia thực phẩm – Phương pháp phân tích vi sinh vật gồm các phần sau:

- TCVN 11039-1:2015, Phần 1: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa;
- TCVN 11039-2:2015, Phần 2: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa xoắn;
- TCVN 11039-3:2015, Phần 3: Phát hiện và định lượng coliform và *E. coli* bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp chuẩn);
- TCVN 11039-4:2015, Phần 4: Phát hiện và định lượng coliform và *E. coli* bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp thông dụng);
- TCVN 11039-5:2015, Phần 5: Phát hiện *Salmonella*;
- TCVN 11039-6:2015, Phần 6: Phát hiện và định lượng *Staphylococcus aureus* bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc;
- TCVN 11039-7:2015, Phần 7: Phát hiện và định lượng *Staphylococcus aureus* bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN);
- TCVN 11039-8:2015, Phần 8: Định lượng nấm men và nấm mốc.

**Phụ gia thực phẩm - Phương pháp phân tích vi sinh vật -  
Phần 4: Phát hiện và định lượng coliform và *E. coli* bằng kỹ thuật  
đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp thông dụng)**

*Food additives - Microbiological analyses -*

*Part 4: Detection and enumeration of coliforms and *E. coli* by  
most probable number technique (Routine method)*

## **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp thông dụng để phát hiện và định lượng coliform và *E. coli* trong phụ gia thực phẩm bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN).

## **2 Thuật ngữ và định nghĩa**

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

### **2.1**

**Coliform (coliform)**

Vi khuẩn ở nhiệt độ quy định (30 °C hoặc 37 °C theo thoả thuận) lên men lactose có sinh khí theo các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

### **2.2**

***E. coli* giả định (presumptive *Escherichia coli*)**

Vi khuẩn lên men lactose có sinh khí ở 44 °C và sinh indol từ tryptophan ở 44 °C theo các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

## **3 Nguyên tắc**

**3.1** Cấy phần mẫu thử vào ống nghiệm chứa môi trường tăng sinh chọn lọc và ủ 48 h ở 35 °C. Các ống thu được cho thấy có sinh khí là ống chứa coliform giả định.

## **TCVN 11039-4:2015**

3.2 Để khẳng định coliform, cấy tiếp vào ống đựng môi trường khẳng định và ủ ở 35 °C trong 48 h. Sau khi kiểm tra ống thu được trong 4.1.2 mà có sinh khí thì khẳng định sự có mặt của coliform. Định lượng coliform bằng kỹ thuật MPN.

3.3 Để khẳng định *E. coli*, cấy tiếp vào ống đựng môi trường EC và ủ ở 45 °C trong 48 h rồi tiếp tục cấy vào thạch L-EMB, ủ ở 45 °C trong thời gian từ 18 h đến 24 h và thực hiện phép thử hình thái học và các phép thử sinh hóa.

## **4 Môi trường cấy, dịch pha loãng và thuốc thử**

- 4.1 Canh thang lauryl tryptose (LST) (xem A.1).
- 4.2 Canh thang brilliant green-lactose-mật (BGLB), 2 % (xem A.2).
- 4.3 Canh thang EC (xem A.3).
- 4.4 Thạch eosin Levine-metylen xanh (L-EMB) (xem A.4).
- 4.5 Thạch đếm đĩa (PCA) (xem A.5).
- 4.6 Canh thang trypton (tryptophan) (xem A.6).
- 4.7 Canh thang MR-VP (xem A.7).
- 4.8 Canh thang xitrat Koser (xem A.8).
- 4.9 Thuốc thử Kovacs (xem A.9).
- 4.10 Các thuốc thử Voges-Proskauer (VP) (xem A.10).
- 4.11 Dung dịch đệm phosphat Butterfield (xem A.11).
- 4.12 Chất chỉ thị metyl đỏ (xem A.12).
- 4.13 Thuốc nhuộm Gram.
- 4.14 Creatin, dạng tinh thể.

## **5 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh**

Có thể dùng dụng cụ thủy tinh sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu chúng có các đặc tính thích hợp.

Sử dụng các thiết bị của phòng thử nghiệm vi sinh và cụ thể là:

- 5.1 Nồi cách thủy, tuần hoàn, có nắp, duy trì được nhiệt độ  $45,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Mức nước phải cao hơn môi trường mà ống được nhúng vào.
- 5.2 Nhiệt kế kiểu nhúng, dài khoảng 55 cm, có thể đo trong dải từ  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , chia độ đến  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 5.3 Tủ ẩm, có thể hoạt động ở  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 5.4 Cân, có thể cân chính xác đến  $0,1\text{ g}$ .
- 5.5 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến  $1\text{ mg}$ .
- 5.6 Bình trộn.
- 5.7 Máy trộn Vortex.
- 5.8 Pipet chia vạch, vô trùng, dung tích  $1,0\text{ ml}$  và  $10,0\text{ ml}$ .
- 5.9 Thiết bị khử trùng để xử lý mẫu.
- 5.10 Chai pha loãng, bằng thủy tinh borosilicat, có nút hoặc nắp vận bằng polyetylen với vòng đệm teflon. Có thể sử dụng các chai pha loãng chứa dung dịch đệm phosphat Butterfield có bán sẵn trên thị trường.
- 5.11 Thiết bị đếm khuẩn lạc, loại cơ học hoặc điện tử, có nguồn sáng thích hợp, đĩa lưới và bộ đếm.
- 5.12 Thiết bị đo pH.
- 5.13 Vòng cấy.
- 5.14 Ống nghiệm, kích thước  $13\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ .

## 6 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên có liên quan nên thỏa thuận với nhau về vấn đề này.

## 7 Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu được trộn đều để thu được các phần mẫu thử đồng nhất.

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Phép thử coliform, coliform phân và *E. coli* giả định

Cân 50 g vào bình trộn tốc độ cao (5.6) đã khử trùng. Thêm 450 ml dung dịch đệm phosphat Butterfield vô trùng (4.11) và trộn trong 2 min. Nếu chỉ có < 50 g thì cân phần mẫu thử tương đương với một nửa lượng mẫu và thêm thể tích thích hợp chất pha loãng vô trùng để có dung dịch pha loãng 1 : 10. Lượng chứa trong bình trộn phải bao trùm lưới trộn.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân bằng dung dịch pha loãng phosphat Butterfield vô trùng (4.11). Số dung dịch pha loãng cần chuẩn bị phụ thuộc vào mật độ coliform dự kiến. Lắc tất cả huyền phù 25 lần với biên độ 30 cm hoặc dùng máy trộn Vortex (5.7) trong 7 s. Không dùng pipet để phân phối cá thể tích nhỏ hơn 10 % dung tích. Chuyển 1 ml phần mẫu thử vào ba ống đựng canh thang LST (4.1) đối với mỗi độ pha loãng đối với ít nhất ba độ pha loãng liên tiếp. Giữ pipet với góc sao cho pipet thấp hơn cạnh dưới đối diện của ống. Để pipet chảy trong 2 s đến 3 s. Thời gian từ khi trộn mẫu đến khi kết thúc cấy mẫu là không quá 15 min.

Ủ các ống ở 35 °C trong tủ ấm (5.3). Kiểm tra sự sinh khí của các ống sau 24 h ± 2 h, về sự thay đổi môi trường trong ống Durham do lên men hoặc sự sủi bọt khí các ống được khuấy nhẹ. Ủ thêm các ống âm tính trong 24 h. Kiểm tra và ghi lại phản ứng sau 48 h ± 2 h. Thực hiện phép thử khẳng định trên tất cả các ống dương tính giả định (có sinh khí) .

### 8.2 Phép thử khẳng định coliform

Từ mỗi ống LST sinh khí (xem 8.1), chuyển vòng cấy (5.13) chứa đầy huyền phù vào ống canh thang BGLB (4.2), không lấy lớp màng, nếu có. Ủ các ống BGLB ở 35 °C và kiểm tra sự sinh khí sau 48 h ± 2 h.

Ống nghiệm thu được có sinh khí sau khi ủ 48 h ± 2 h ở 35 °C được coi là dương tính.

### 8.3 Phép thử khẳng định coliform phân và *E. coli*

Từ mỗi ống LST sinh khí trong phép thử giả định (xem 8.1), chuyển một vòng cấy chứa đầy huyền phù vào ống đựng canh thang EC (4.3) (có thể dùng que cấy gỗ vô trùng để chuyển chủng cấy). Ủ các ống EC trong 24 h ± 2 h ở 45,5 °C trong nồi cách thủy (5.1) và kiểm tra sự sinh khí. Nếu âm tính thì ủ lại và kiểm tra ở 48 h ± 2 h.

Ống nghiệm thu được có sinh khí sau khi ủ 48 h ± 2 h ở 45,5 °C được coi là dương tính với coliform phân và *E. coli*.

Sử dụng các kết quả của phép thử này để tính số MPN của coliform phân.

Để tiếp tục phân tích *E. coli*, tiến hành theo 8.4.

**Chú ý:** Các phép phân tích coliform phân được thực hiện ở 45,5 °C ± 0,2 °C.

#### 8.4 Phép thử cuối cùng (completed test) đối với *E. coli*

Khuấy nhẹ mỗi ống EC sinh khí (xem 8.3) và đánh dấu để phân lập, đưa một vòng cấy vào đĩa thạch L-EMB (4.4) và ủ trong tủ ấm (5.3) trong thời gian từ 18 h đến 24 h ở 35 °C. Kiểm tra các đĩa nghi ngờ chứa các khuẩn lạc *E. coli*, là các khuẩn lạc có tâm tối màu, có hoặc không có ánh kim loại. Chuyển năm khuẩn lạc nghi ngờ từ mỗi đĩa L-EMB sang thạch nghiêng PCA (4.5), ủ trong thời gian từ 18 h đến 24 h ở 35 °C và dùng cho thử nghiệm tiếp theo.

Nếu nhận diện được bất kì một trong năm khuẩn lạc là *E. coli* là đủ để coi ống EC dương tính; vì vậy, không nhất thiết thử cả năm khuẩn lạc.

Tiến hành nhuộm Gram để xem hình thể. Kiểm tra các tính chất sinh hóa sau đây (bốn phép thử đầu tiên gọi chung là IMViC) đối với các vi khuẩn hình que ngắn hoặc hình cầu bắt màu Gram âm.

##### a) Khả năng sinh indol

Cấy vi khuẩn vào canh thang trypton (4.6) và ủ 24 h  $\pm$  2 h ở 35 °C. Kiểm tra việc sinh indol bằng cách thêm từ 0,2 ml đến 0,3 ml thuốc thử Kovacs (4.9). Phép thử dương tính nếu xuất hiện màu đỏ đặc trưng ở lớp phía trên.

##### b) Phản ứng Voges-Proskauer

Cấy vi khuẩn vào canh thang MR-VP (4.7) và ủ 48 h  $\pm$  2 h ở 35 °C. Chuyển 1 ml vào ống 13 mm x 100 mm (5.14). Thêm 0,6 ml dung dịch alpha-naphthol trong etanol (4.10.1) cùng với 0,2 ml dung dịch kali hydroxit 40 % (4.10.2) và trộn. Thêm vài tinh thể creatine (4.14). Lắc và để yên trong 2 h. Phép thử dương tính nếu xuất hiện màu hồng eosin.

##### c) Phản ứng với metyl đỏ

Ủ ống MR-VP thêm 48 h  $\pm$  2 h ở 35 °C sau phép thử Voges-Proskauer. Thêm 5 giọt dung dịch metyl đỏ (4.12) vào mỗi ống. Phép thử dương tính nếu có màu đỏ đặc trưng. Phép thử âm tính nếu xuất hiện màu vàng.

##### d) Sử dụng xitrat

Cấy nhẹ vào canh thang xitrat Koser (4.8); tránh làm đục ống. Ủ 96 h  $\pm$  2 h ở 35 °C. Nếu canh thang đục là phản ứng dương tính.

##### e) Sinh khí từ lactose

Cấy vào canh thang LST (4.1) và ủ 48 h  $\pm$  2 h ở 35 °C. Nếu có bọt khí trong ống Durham thì phản ứng dương tính.

## TCVN 11039-4:2015

CHÚ THÍCH: Thay vì thực hiện các phép thử IMViC, có thể dùng các phép thử sinh hóa dùng dải vật liệu chuẩn bị sẵn. Cây vi khuẩn trên thạch nghiêng PCA để thực hiện phép thử.

Tất cả chủng cấy được coi là *E. coli* nếu:

- lên men lactose có sinh khí trong 48 h ở 35 °C,
- xuất hiện dưới dạng hình que ngắn hoặc hình cầu không sinh bào tử, bắt màu Gram âm, và
- cho IMViC (bốn phép thử đầu tiên) kiểu ++--- (dạng sinh học 1) hoặc -+--- (dạng sinh học 2).

### 9 Tính và biểu thị kết quả

Theo các kết quả diễn giải (xem 8.2, 8.3 hoặc 8.4), chỉ rõ sự có mặt hay không có mặt của coliform, coliform phân và *E. coli* trong phần mẫu thử. Tham khảo TCVN 6404 (ISO 7218) <sup>[3]</sup>.

Tính số MPN của coliform dựa trên các phần của các ống LST có sinh khí đã được khẳng định (xem 8.2) đối với ba độ pha loãng liên tiếp. Tham khảo TCVN 6404 (ISO 7218) <sup>[3]</sup>.

Tính số MPN của coliform phân dựa trên các phần của các ống EC có sinh khí đã được khẳng định (xem 8.3) đối với ba độ pha loãng liên tiếp. Tham khảo TCVN 6404 (ISO 7218) <sup>[3]</sup>.

### 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn cũng như các sự cố bất kỳ có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.



**Phụ lục A**

(Quy định)

**Thành phần và chuẩn bị môi trường cấy và thuốc thử****A.1 Canh thang lauryl tryptose (LST)****A.1.1 Thành phần**

Tryptose hoặc trypticase	20 g
Lactose	5 g
Kali hydro phosphat ( $K_2HPO_4$ )	2,75 g
Kali dihydro phosphat ( $KH_2PO_4$ )	2,75 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Natri lauryl sulfat	0,1 g
Nước cất	1 lít

**A.1.2 Chuẩn bị**

Phân phối các phần 10 ml vào các ống Durham 20 mm x 150 mm chứa các ống lên men 10 mm x 75 mm đã úp ngược. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt  $6,8 \pm 0,2$ .

**A.2 Canh thang brilliant green-lactose-mật****A.2.1 Thành phần**

Pepton	10 g
Lactose	10 g
Mật bò khô	20 g
Brilliant green	0,0133 g
Nước cất	1 lít

**A.2.2 Chuẩn bị**

Hòa tan pepton và lactose trong 500 ml nước cất. Thêm 20 g mật bò khô đã hòa tan trong 200 ml nước cất. pH của dung dịch này phải đạt từ 7,0 đến 7,5. Trộn và thêm nước đến 975 ml. Chính pH đến 7,4. Thêm 13,3 ml brilliant green 0,1 % trong nước cất. Thêm nước cất vừa đủ 1 lít. Phân phối vào các ống Durham, sao cho mức chất lỏng phủ các ống Durham đã được úp ngược. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt  $7,2 \pm 0,1$ .

## TCVN 11039-4:2015

### A.3 Canh thang EC

#### A.3.1 Thành phần

Trypticase hoặc tryptose	20 g
Hỗn hợp các muối mật No. 3	1.5 g
Lactose	5 g
Kali hydro phosphat ( $K_2HPO_4$ )	4 g
Kali dihydro phosphat ( $KH_2PO_4$ )	1.5 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Nước cất	1 lít

#### A.3.2 Chuẩn bị

Phân phối các phần 8 ml vào các ống 16 mm x 150 mm chứa các ống lên men 10 mm x 75 mm đã úp ngược. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt  $6,9 \pm 0,2$ .

### A.4 Thạch eosin Levine-metylen xanh (L-EMB)

#### A.4.1 Thành phần

Pepton	10 g
Lactose	10 g
Kali hydro phosphat	2 g
Thạch	15 g
Eosin Y	0,4 g
Metylen xanh	0,065 g
Nước cất	1 lít

#### A.4.2 Chuẩn bị

Đun sôi để hòa tan pepton, phosphat và thạch trong 1 lít nước. Bù nước đến thể tích ban đầu, nếu cần. Phân phối các phần 100 hoặc 200 ml và hấp áp lực 15 min ở nhiệt độ không quá 121 °C. pH cuối cùng đạt  $7,1 \pm 0,2$ .

Trước khi sử dụng, làm tan chảy thạch và cứ mỗi phần 100 ml thì thêm:

- 5 ml dung dịch lactose 20 % vô trùng;
- 2 ml dung dịch 2 % eosin Y;
- 4,3 ml dung dịch metylen xanh 0,15 %.

Khi sử dụng sản phẩm khô, đun sôi để hòa tan tất cả các thành phần trong 1 lít nước. Phân phối các phần 100 ml hoặc 200 ml và hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt  $7,1 \pm 0,2$ .

**A.5 Môi trường thạch để đếm đĩa (PCA)****A.5.1 Thành phần**

Trypton	5,0 g
Chất chiết nấm men	2,5 g
Dextrose	1,0 g
Thạch	15 g
Nước cất	1 lít

**A.5.2 Chuẩn bị**

Đun sôi nước để hoà tan các thành phần. Phân phối môi trường vào các ống hoặc bình thủy tinh có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở 121 °C. pH cuối cùng 7,0 ± 0,2.

**A.6 Canh thang trypton (tryptophan), 1 %****A.6.1 Thành phần**

Trypton hoặc trypticase	10 g
Nước cất	1 lít

**A.6.2 Chuẩn bị**

Phân phối các phần 5 ml vào các ống Durham 16 mm x 125 mm hoặc 16 mm x 150 mm. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt 6,9 ± 0,2.

**A.7 Canh thang MR-VP****A.7.1 Môi trường 1****A.7.1.1 Thành phần**

Bột nước đệm pepton	7 g
Glucose	5 g
Kali hydro phosphat	5 g
Nước cất	1 lít

**A.7.1.2 Chuẩn bị**

Hòa tan các thành phần trong 800 ml nước có đun nhẹ. Lọc và để nguội đến 20 °C và thêm nước đến 1 lít. Hấp áp lực từ 12 min đến 15 min at 121 °C. pH cuối cùng đạt 6,9 ± 0,2.

## TCVN 11039-4:2015

### A.7.2 Môi trường 2

#### A.7.2.1 Thành phần

Pepton casein	3,5 g
Pepton thịt	3,5 g
Dextrose	5 g
Kali photphat	5 g
Nước cất	1 lít

#### A.7.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước có đun nhẹ nếu cần. Phân phối 10 ml vào các ống Durham 16 mm x 150 mm và hấp áp lực 15 min ở nhiệt độ từ 118 °C đến 121 °C. pH cuối cùng đạt  $6,9 \pm 0,2$ .

### A.7.3 Môi trường 3

#### A.7.3.1 Thành phần

Pepton	5 g
Glucose	5 g
Đệm photphat	5 g
Nước cất	1 lít

#### A.7.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước. Phân phối 10 ml vào các ống Durham 16 mm x 150 mm và hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt  $7,5 \pm 0,2$ .

## A.8 Canh thang xitrat Koser

### A.8.1 Thành phần

Natri amoni hydro photphat ngậm bốn phân tử nước ( $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	1,5 g
Kali hydro photphat	1 g
Magie sulfat ngậm bảy phân tử nước ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,2 g
Natri xitrat ngậm hai phân tử nước	3 g
Nước cất	1 lít

### A.8.2 Chuẩn bị

Phân phối vào các ống nắp vặn nếu có yêu cầu. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C. pH cuối cùng đạt  $6,2 \pm 0,2$ .

CHÚ THÍCH: Công thức này được nêu trong các phương pháp phân tích của AOAC. Công thức này khác với môi trường khô bán sẵn. Môi trường này được coi là thích hợp.

**A.9 Thuốc thử Kovacs****A.9.1 Thành phần (Tham khảo [1])**

p-Dimethylaminobenzaldehyde	5 g
2-Metylbutan-2-ol (amyl alcohol)	75 ml
Axit clohydric (HCl) đặc	25 ml

**A.9.2 Chuẩn bị**

Hòa tan p-dimethylaminobenzaldehyde trong 2-metylbutan-2-ol. Thêm từ từ axit clohydric đặc. Bảo quản ở 4 °C. Để thử indol, nhỏ từ 0,2 ml đến 0,3 ml thuốc thử đã chuẩn bị vào 5 ml chủng cấy vi khuẩn trong canh thang trypton 24 h. Phản ứng dương tính indol nếu có màu đỏ sẫm trên lớp bề mặt. Đối với *E. coli* gây bệnh đường ruột, nếu âm tính sau 24 h thì thử thêm sau 72 h.

**A.10 Các thuốc thử Voges-Proskauer (VP)****A.10.1 Dung dịch alpha-naphthol trong etanol**

Thành phần:

alpha-Naphthol	5 g
Etanol (tuyệt đối)	100 ml

**A.10.2 Dung dịch kali hydroxit, 40 % (khối lượng)**

Thành phần:

Kali hydroxit	40 g
Nước cất	100 ml

**A.10.3 Phép thử Voges-Proskauer (VP)**

Ở nhiệt độ phòng, chuyển 1 ml chủng cấy 48 h vào ống nghiệm và thêm 0,6 ml dung dịch 1 và 0,2 ml dung dịch 2. Lắc sau khi thêm mỗi dung dịch. Để tăng cường độ và tốc độ phản ứng, thêm vài tinh thể creatine vào hỗn hợp. Đọc kết quả sau khi thêm các thuốc thử 4 h. Phản ứng dương tính nếu xuất hiện màu hồng eosin.

**A.11 Dung dịch pha loãng phosphat Butterfield****A.11.1 Thành phần**

Kali dihydro phosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	34 g
Nước cất	500 ml

## **TCVN 11039-4:2015**

### **A.11.2 Chuẩn bị**

Chỉnh pH đến 7,2 bằng dung dịch natri hydroxit 1 M. Thêm nước đến 1 lít. Tiệt trùng 15 min ở 121 °C. Bảo quản trong tủ lạnh.

Thuốc thử trắng pha loãng: Lấy 1,25 ml dung dịch gốc nêu trên, thêm nước đến 1 lít. Phân phối vào các chai 90 ml hoặc 99 ml  $\pm$  1 ml. Tiệt trùng 15 min ở 121 °C.

### **A.12 Chất chỉ thị metyl đỏ**

Metyl đỏ	0,1 g
Etanol (95 %)	300 ml
Nước cất	500 ml

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 4829:2005 (ISO 6579:2002, Cor 1:2004) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Salmonella trên đĩa thạch*
  - [2] TCVN 4882:2007 (ISO 4831:2006) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng coliform – Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất*
  - [3] TCVN 6404 (ISO 7218) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật*
  - [4] TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2006) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng coliform – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc*
-