

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 8881 : 2011**

**ISO 16266 : 2010**

Xuất bản lần 1

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC**  
**PHÁT HIỆN VÀ ĐẾM PSEUDOMONAS AERUGINOSA –**  
**PHƯƠNG PHÁP MÀNG LỌC**

*Water quality – Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa –  
Method by membrane filtration*

**HÀ NỘI - 2011**

**Lời nói đầu**

TCVN 8881:2011 hoàn toàn tương đương với ISO 16266:2006.

TCVN 8881:2011 do Ban kỹ thuật Tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 147 *Chất lượng nước* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Lời giới thiệu

*Pseudomonas aeruginosa* là một tác nhân gây bệnh cho con người, có khả năng phát triển trong nước có nồng độ chất dinh dưỡng rất thấp. Tại nguồn và trong quá trình bán trên thị trường, nước khoáng tự nhiên hoặc nước suối không có *Pseudomonas aeruginosa* trong mỗi 250 ml mẫu được kiểm tra (xem, ví dụ Council directive 80/777/EEC<sup>(1)</sup> và Council directive 96/70/EC<sup>(2)</sup>). Các loại nước đóng chai khác để bán cũng không có *Pseudomonas aeruginosa* trong mỗi 250 ml mẫu (xem, ví dụ Council directive 80/777/EEC<sup>(3)</sup>). Các loại nước khác, kể cả nước bể bơi và nước tiêu thụ, đôi khi có thể được thử *Pseudomonas aeruginosa* vì lý do sức khỏe cộng đồng. Trong trường hợp này, thể tích kiểm tra điển hình là 100 ml.

## Chất lượng nước - Phát hiện và đếm *Pseudomonas aeruginosa* - Phương pháp màng lọc

*Water quality - Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa - Method by membrane filtration*

**CẢNH BÁO** – Người sử dụng tiêu chuẩn này cần phải thành thạo với các thực hành trong phòng thí nghiệm thông thường. Tiêu chuẩn này không đề cập tới mọi vấn đề an toàn đối với người sử dụng tiêu chuẩn, nếu có. Người sử dụng có trách nhiệm xây dựng biện pháp bảo đảm an toàn và sức khỏe phù hợp với các qui định của quốc gia.

**QUAN TRỌNG** – Chỉ những nhân viên được đào tạo phù hợp mới được tiến hành phép thử theo tiêu chuẩn này.

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phân lập và đếm *Pseudomonas aeruginosa* trong mẫu nước đóng chai bằng kỹ thuật màng lọc. Phương pháp này cũng có thể áp dụng cho các loại nước khác với hệ thực vật nền thấp, ví dụ, nước bể bơi và nước dùng cho mục đích sinh hoạt.

### 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử*

TCVN 5963:1995 (ISO 11465:1993), *Chất lượng đất – Xác định chất khô và hàm lượng nước trên cơ sở khối lượng*.

TCVN 6495-2 (ISO 11074-2), *Chất lượng đất – Từ vựng – Phần 2: Các thuật ngữ và định nghĩa liên quan đến lấy mẫu*.

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân*

## TCVN 8881:2011

TCVN 6663-1 (ISO 5667-1), *Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 1: Hướng dẫn lập chương trình lấy mẫu và kỹ thuật lấy mẫu.*

TCVN 6663-3 (ISO 5667-3), *Chất lượng nước – Lấy mẫu – Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu.*

TCVN 8880 (ISO 19458), *Chất lượng nước – Lấy mẫu để phân tích vi sinh vật*

ISO 7704, *Water quality – Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses (Chất lượng nước – Đánh giá màng lọc sử dụng cho phân tích vi sinh vật)*

ISO 8199, *Water quality – General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture (Chất lượng nước - Hướng dẫn chung cho việc đếm vi sinh vật bằng nuôi cấy)*

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Tiêu chuẩn này áp dụng thuật ngữ và định nghĩa sau:

#### 3.1

**Trực khuẩn mù xanh/*Pseudomonas aeruginosa*** (*Pseudomonas aeruginosa*)

Vi sinh vật phát triển trong môi trường chọn lọc có chứa cetrimide và tạo ra pyocyanin, hoặc vi sinh vật phát triển trong môi trường chọn lọc có chứa cetrimid, sinh ra enzym oxidaza, phát xạ huỳnh quang dưới bức xạ UV ( $360 \pm 20$ ) nm, và có khả năng tạo ra amoniac từ acetamid.

### 4 Nguyên tắc

#### 4.1 Lọc

Lấy màng lọc có cỡ lỗ  $0,45 \mu\text{m}$  lọc một lượng mẫu nước đã xác định, hoặc mẫu đã được pha loãng. Màng lọc được đặt trên mặt môi trường chọn lọc và được ủ trong các điều kiện đã qui định đối với môi trường.

#### 4.2 Đếm

Số lượng *Pseudimonas aeruginosa* già định thu được bằng cách đếm số khuẩn lạc đặc trưng trên màng lọc sau khi ủ. Khuẩn lạc tạo pyocyanin được khẳng định *Pseudimonas aeruginosa* nhưng các khuẩn lạc huỳnh quang hoặc có màu nâu đỏ khác cần phép thử khẳng định.

#### 4.3 Khẳng định

Các khuẩn lạc cần được xác định thêm được cấy chuyển từ màng lọc sang các đĩa môi trường thạch (xem Phụ lục B). Sau khi ủ, khuẩn lạc ban đầu không phát huỳnh quang được thử phản ứng oxidaza, và các khuẩn lạc sinh oxidaza được thử về khả năng tạo chất huỳnh quang và khả năng tạo ra amoniac từ acetamin. Những khuẩn lạc phát xạ huỳnh quang ban đầu được thử về khả năng tạo ra amoniac từ acetamin.

## 5 Chất pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Sử dụng thuốc thử đạt chất lượng cấp phân tích trong quá trình chuẩn bị môi trường nuôi cấy và chất pha loãng, nếu không có qui định khác. Chuẩn bị môi trường dưới đây và thêm thuốc thử chọn lọc như chất phụ trợ có nồng độ đã biết hoặc sử dụng môi trường bán sẵn và các thuốc thử được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để chuẩn bị môi trường và thuốc thử, sử dụng nước loại 3 như qui định trong TCVN 4851 (ISO 3696), hoặc nước có độ tinh khiết tương đương và không có chất gây ức chế sự phát triển của khuẩn lạc trong các điều kiện thử.

### 5.1 Môi trường nuôi cấy

Sử dụng môi trường sau để xác định *Pseudomonas aeruginosa*:

#### 5.1.1 Môi trường thạch *Pseudomonas* cơ bản/thạch CN

##### 5.1.1.1 Thành phần

Gelatin pepton	16,0 g
Casein hydrolysat	10,0 g
Kali sunfat (khan) (KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	10,0 g
Magie clorua (khan) (MgCl <sub>2</sub> )	1,4 g
Glyxerol	10 ml
Thạch	11,0 g đến 18,0 g
Nước (nước cất hoặc tương đương)	1 000 ml

CHÚ THÍCH: Lượng thạch cần thiết phụ thuộc vào khả năng đông của thạch. Sử dụng thạch theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

##### Chất bổ sung CN

Hexadecyltrimetyl amoni bromua (cetrimid)	0,2 g
Axit nalidixic	0,015 g.

##### 5.1.1.2 Chuẩn bị

Hòa pepton, casein hydrolysat, kali sunfat, magie clorua và thạch vào 1 000 ml nước cất (hoặc nước tương đương). Thêm 10 ml glyxerol. Đun nóng đến sôi để hòa tan hoàn toàn và khử khuẩn trong nồi hấp ở (121 ± 3) °C trong 15 min. Để môi trường nguội về (45 đến 50) °C. Thêm chất bổ sung CN đã hòa tan trong 2 ml nước cất vô khuẩn, trộn đều và thêm vào môi trường cơ bản nóng chảy vô khuẩn. Trộn đều và rót vào các đĩa Petri vô khuẩn với độ dày thạch tối thiểu 5 mm. pH cuối cùng của môi trường đông kết phải tương ứng với 7,1 ± 0,2 tại 25 °C. Bảo quản các đĩa môi trường trong tối ở (5 ± 3) °C tránh làm khô đĩa thạch, và sử dụng trong vòng một tháng. Không giữ thạch đã nóng chảy quá 4 h. Không làm tan chảy lại môi trường.

## TCVN 8881:2011

### 5.2 Môi trường và thuốc thử để khẳng định

#### 5.2.1 Môi trường King's B

##### 5.2.1.1 Thành phần

Gelatin pepton	20,0 g
Glyxerol	10 ml
Di-kali hydro phosphat ( $K_2HPO_4$ )	1,5 g
Magie sunfat ngậm bảy phân tử nước ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	1,5 g
Thạch	15,0 g
Nước (nước cất hoặc tương đương)	1 000 ml

##### 5.2.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước bằng đun nóng. Làm nguội xuống tới (45 đến 50) °C và sử dụng axit clohydric hoặc natri hydroxit để điều chỉnh pH tương ứng tới  $7,2 \pm 0,2$  ở 25 °C. Chia môi trường thành các phần 5 ml cho vào các ống nghiệm nuôi cấy có nắp đậy và khử khuẩn ở  $(121 \pm 3)$  °C trong khoảng 15 min. Để các ống này nguội và làm đông kết thạch theo vị trí nghiêng.

Bảo quản môi trường trong tối ở  $(5 \pm 3)$  °C và sử dụng trong vòng ba tháng.

#### 5.2.2 Acetamide broth

##### 5.2.2.1 Thành phần

##### Dung dịch A

Kali di-hydrophosphat ( $KH_2PO_4$ )	1,0 g
Magie sunfat (khan) ( $MgSO_4$ )	0,2 g
Acetamid	2,0 g
Natri clorua ( $NaCl$ )	0,2 g
Nước (nước cất hoặc tương đương, không có amoniac)	900 ml

Hòa tan các thành phần trên trong nước sau đó điều chỉnh pH tới  $7,0 \pm 0,5$  ở 25 °C bằng axit clohydric hoặc natri hydroxit.

**CHÚ Ý – Acetamid là chất gây ung thư và chất kích thích – Phải thực hiện các biện pháp phòng ngừa thích hợp khi cân, chuẩn bị và đổ bỏ môi trường.**

**Dung dịch B**

Natri molyphat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,5 g
Sắt sunfat ngậm bảy phân tử nước ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,05 g
Nước	100 ml

**5.2.2.2 Chuẩn bị**

Để chuẩn bị môi trường acetamid broth, thêm 1 ml dung dịch B vào 900 ml dung dịch A (5.2.2.1) vừa được chuẩn bị. Vừa thêm nước vừa khuấy đều cho tới thể tích tổng là một lít. Chia hỗn hợp này thành các phần 5 ml cho vào các ống nuôi cấy sau đó đậy nắp và khử khuẩn trong nồi hấp ở  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$  trong khoảng 15 min. Bảo quản môi trường trong tối ở  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  và sử dụng môi trường này trong vòng ba tháng.

**5.2.3 Thạch dinh dưỡng****5.2.3.1 Thành phần**

Pepton	0,5 g
Chất chiết thịt	1,0 g
Chất chiết nấm men	2,0 g
Natri clorua ( $\text{NaCl}$ )	5,0 g
Thạch	15,0 g
Nước	1 000 ml

**5.2.3.1 Chuẩn bị**

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng. Khử khuẩn trong nồi hấp ở  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$  trong khoảng 15 min. pH của môi trường đông kết phải đạt  $7,4 \pm 0,2$  ở  $25^\circ\text{C}$ . Làm khô các đĩa thạch để loại bỏ nước ngưng trên bề mặt trước khi sử dụng. Bảo quản các đĩa môi trường trong tối ở  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$  tránh làm khô đĩa thạch và sử dụng trong vòng một tháng.

**5.2.4 Thuốc thử oxidaza****5.2.4.1 Thành phần**

Tetrametyl- <i>p</i> -phenylendiamin dihydroclorua	0,1 g
Nước	10 ml

**5.2.4.2 Chuẩn bị**

Hòa tan Tetrametyl-*p*-phenylendiamin dihydroclorua trong nước ngay trước khi sử dụng và bảo quản tránh ánh sáng. Thuốc thử này không bền. Chuẩn bị từng lượng nhỏ ngay trước khi dùng.

Hoặc có thể sử dụng thuốc thử oxidaza có bán sẵn.



## TCVN 8881:2011

### 5.2.5 Thuốc thử Nessler

#### 5.2.5.1 Thành phần

Thủy ngân II clorua (HgCl <sub>2</sub> )	10 g
Kali iodua (KI)	7 g
Natri hydroxit (NaOH)	16 g
Nước (không có amoni)	đến 100 ml

Hòa tan 10 g HgCl<sub>2</sub> và 7 g KI trong một lượng nước nhỏ và trong khi vừa khuấy, thêm từ từ vào hỗn hợp này dung dịch mất 16 g NaOH hoà tan trong 50 ml nước. Pha loãng tới 100 ml. Bảo quản thuốc thử trong bình thủy tinh borosilicat có nút bằng cao su và tránh ánh sáng mặt trời, thời gian bảo quản tối đa là một năm.

**CHÚ Ý** – HgCl<sub>2</sub> là chất độc – Tránh nuốt phải.

## 6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng thiết bị phòng thí nghiệm vi sinh thông thường.

### 6.1 Thiết bị, dụng cụ thủy tinh

Khử khuẩn tất cả các dụng cụ thủy tinh ở (170 ± 5) °C trong 1 h trong lò sấy hoặc ở (121 ± 3) °C trong 15 min trong nồi hấp trước khi sử dụng.

6.2 Tủ ủ, có khả năng duy trì nhiệt độ ở (36 ± 2) °C.

6.3 Đèn tia cực tím, có khả năng phát bức xạ ở bước sóng (360 ± 20) nm.

6.4 Màn lọc vô khuẩn, có cỡ lỗ danh nghĩa 0,45 µm.

Kiểm tra màn lọc thường xuyên theo qui định trong ISO 7704.

## 7 Lấy mẫu

Tiến hành thu thập, bảo quản và xử lý các mẫu theo qui định trong TCVN 6663-1 (ISO 5667-1), TCVN 6663-3 (ISO 5667-3) và TCVN 8880 (ISO 19458).

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Khái quát

Tiến hành kỹ thuật lọc màng theo qui định trong ISO 8199, và chuẩn bị dây pha loãng theo qui định trong TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

## 8.2 Lọc màng

Lọc thể tích mẫu nước hoặc các phần nhỏ của dung dịch pha loãng qua một màng lọc xenlulo este vô khuẩn với đường kính lỗ danh định tương đương với 0,45 µm. Như đã qui định trong ISO 8199, đặt mỗi màng lên đĩa Petri có chứa thạch CN (5.1) bảo đảm không có bọt khí ở dưới màng.

## 8.3 Ủ các đĩa

Ủ đĩa Petri ở  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  trong  $(44 \pm 4)$  h trong các hộp và đảm bảo tránh làm khô các đĩa thạch.

## 8.4 Kiểm tra màng lọc

Kiểm tra sự phát triển của khuẩn lạc trên các màng lọc sau  $(22 \pm 2)$  h và  $(44 \pm 4)$  h.

Đếm tất cả các khuẩn lạc tạo màu xanh lam/xanh lục (pyocyanin) khi kháng định *Pseudomonas aeruginosa*.

Kiểm tra màng dưới bức xạ UV. Cần chú ý tránh kéo dài thời gian chiếu UV vì các khuẩn lạc có thể bị chết và không phát triển được trên môi trường kháng định. Đếm tất cả các khuẩn lạc không tạo pyocyanin mà phát huỳnh quang là *Pseudomonas aeruginosa* giả định và kháng định nhân dạng của chúng bằng cách sử dụng môi trường acetamide broth như được mô tả dưới đây.

Đếm tất cả các khuẩn lạc có màu nâu đỏ mà không phát huỳnh quang là *Pseudomonas aeruginosa* giả định và dùng phép thử phản ứng của oxidaza, môi trường acetamide broth, và môi trường King's B để kháng định nhân dạng chúng như được mô tả dưới đây. Đọc kết quả sau  $(22 \pm 2)$  h, trong trường hợp phát triển quá nhiều và sự hợp nhất của các khuẩn lạc sau  $(44 \pm 4)$  h có thể xảy ra. Sử dụng số đếm cao nhất để tính số *Pseudomonas aeruginosa* như trong Điều 9.

Bảng 1 tóm tắt việc lựa chọn khuẩn lạc và các bước kháng định.

**Bảng 1 – Các bước cần để kháng định khuẩn lạc phát triển trên thạch CN**

Mô tả khuẩn lạc trên thạch CN	Amoniac từ acetamid	Tạo ra oxidaza	Huỳnh quang trên môi trường King'B	Kháng định là <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Xanh lam/xanh lục	NT <sup>a</sup>	NT	NT	Có
Huỳnh quang (không xanh lam/xanh lục)	+	NT	NT	Có
Nâu đỏ	+	+	+	Có
Các loại khác	NT	NT	NT	Không

<sup>a</sup> NT (not tested): không được thử

## 8.5 Khẳng định

### 8.5.1 Thạch dinh dưỡng

Cấy chuyển tất cả, hoặc nếu không thực hiện được thì cấy càng nhiều càng tốt (xem ISO 8199) các khuẩn lạc cần phải khẳng định từ màng lọc và ủ khoảng  $(22 \pm 2)$  h ở  $(36 \pm 2)$  °C. Kiểm tra các đĩa cấy chuyển về độ tinh khiết và thử phản ứng oxidaza những khuẩn lạc có màu nâu đỏ ban đầu (8.5.2).

### 8.5.2 Phép thử oxidaza

Nhỏ 2 đến 3 giọt thuốc thử oxidaza vừa chuẩn bị (5.2.4) lên giấy lọc trong đĩa Petri.

Dùng vòng cấy platin (không có Ni crom), vòng nhựa, que hoặc que thủy tinh, bôi dàn một số khuẩn lạc phát triển trên giấy lọc đã chuẩn bị. Quan sát nếu xuất hiện của màu xanh tím than trong khoảng 10 s là phản ứng dương tính. Hoặc, sử dụng bộ thử oxidaza bán sẵn theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### 8.5.3 Môi trường King's B

Cấy chuyển khuẩn lạc màu nâu đỏ dương tính với oxidaza được nuôi cấy từ 8.5.1 lên môi trường King B và ủ tới 5 ngày ở  $(36 \pm 2)$  °C<sup>1)</sup>. Kiểm tra sự phát triển dưới bức xạ UV hàng ngày và ghi nhận sự xuất hiện của khuẩn lạc huỳnh quang. Ghi lại những khuẩn lạc huỳnh quang xuất hiện cho tới 5 ngày là dương tính.

### 8.5.4 Acetamide broth

Cấy vào ống nghiệm những khuẩn lạc từ 8.5.1, và ủ ở  $(36 \pm 2)$  °C trong khoảng  $(22 \pm 2)$  h. Thêm 1 đến 2 giọt thuốc thử Nessler (5.2.5) và kiểm tra amoniac sinh ra trong các ống, đặc trưng bằng sự thay đổi từ màu vàng sang đỏ gạch, tùy thuộc vào nồng độ.

### 8.5.5 Đếm

Đếm tất cả các khuẩn lạc được khẳng định *Pseudomonas aeruginosa* là những khuẩn lạc sinh pyocyanin (sắc tố xanh lam/xanh lục) hoặc những khuẩn lạc dương tính với oxidaza, phát xạ huỳnh quang dưới bức xạ UV (8.4 hoặc 8.5.3) và có thể tạo amoniac từ acetamid (8.5.4).

CHÚ THÍCH: Các khuẩn lạc phát huỳnh quang trên màng đầu tiên luôn luôn có phản ứng dương tính oxidaza, do vậy không cần thử đối với thông số này (xem Bảng 1).

## 9 Biểu thị kết quả

Từ số khuẩn lạc đặc trưng đếm được trên màng, và có tính đến tỷ lệ phép thử khẳng định tiên hành, tính số *Pseudomonas aeruginosa* được khẳng định có trong thể tích nước xác định. Đối với nước khoáng, nước suối và các loại nước đóng chai khác, thể tích là 250 ml (ví dụ xem Tài liệu tham khảo [1], [2] và [3]). Đối với các loại nước khác, thể tích thường là 100 ml.

<sup>1)</sup> Thông thường, 24 h là đủ

## VÍ DỤ

## Nếu

- $p$  là số khuẩn lạc xanh lam/xanh lục; tất cả đã được đếm là khuẩn lạc được kháng định;
- $f$  là số khuẩn lạc phát huỳnh quang;
- $R$  là số khuẩn lạc nâu đỏ;
- $n_f$  là số khuẩn lạc phát huỳnh quang được thử về sinh ra amoniac;
- f.  $c_f$  là số khuẩn lạc phát huỳnh quang có sinh ra amoniac;
- $n_R$  là số khuẩn lạc nâu đỏ được thử về sự tạo ra amoniac và oxidaza và phản ứng huỳnh quang trên môi trường King's B;
- $c_R$  là số khuẩn lạc nâu đỏ có sinh ra amoniac và oxidaza và phát xạ huỳnh quang trên môi trường King's B

Như vậy, số *Pseudomonas aeruginosa* bằng  $P + F(c_f / n_f) + R(c_R / n_R)$  trên thể tích mẫu được kiểm tra

Hoặc, biểu thị các kết quả định tính bằng cách ghi là *Pseudomonas aeruginosa* có hoặc không có trong thể tích nước được kiểm tra.

## 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải qui định như sau:

- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này TCVN 8881 (ISO 16266);
- b) Mọi chi tiết cần để nhận dạng đầy đủ mẫu;
- c) Kết quả được biểu thị theo Điều 9;
- d) Mọi diễn biến đặc biệt quan sát được trong suốt quá trình phân tích và những thao tác không được qui định trong phương pháp hoặc được xem như tùy chọn mà có thể có ảnh hưởng đến kết quả

## 11 Dữ liệu thực hiện phép thử

Phép thử với sáu phòng thí nghiệm từ năm quốc gia tham gia, các kết quả thu được như sau (xem Bảng 2)

**Bảng 2 – Thử trên thạch *Pseudomonas* – Độ thu hồi trung bình (%) tương ứng với số đếm trên thạch dinh dưỡng sau pha loãng bằng nước cất và lọc**

Chủng	Ù	%
1	24 h	101,7
	48 h	100,1
2	24 h	92,6
	48 h	91,3
3	24 h	104,4
	48 h	124,8
4	24 h	94,7
	48 h	91,3

## 12 Cản trở

Nếu số lượng lớn *Pseudomonas aeruginosa* giả định được phân lập, đặc tính lan truyền của khuẩn lạc có thể gây khó khăn cho việc đánh giá định lượng độ đúng.

## 13 Đàm bào chất lượng

Có thể sử dụng *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10332 là đối chứng dương và *E. coli* NCTC 9001 là đối chứng âm cho tất cả các giai đoạn.

**Phụ lục A**

(Tham khảo)

**Thông tin bổ sung về *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* là loài điển hình thuộc chi *Pseudomonas*.

Đây là vi khuẩn Gram âm, không tạo bào tử hình que, phản ứng sinh ra oxidaza và catalas. Vi khuẩn ức chế sự trao đổi chất oxi hóa như đã chỉ thị bằng phép thử Leifson và Hugh, thường khử nitrat sau giai đoạn nitrit và tạo ra amoniac từ sự phá vỡ cấu trúc của acetamid. Hầu hết các chủng (98 %) tạo ra sắc tố huỳnh quang tan trong nước. Đa số các chủng *Pseudomonas aeruginosa* này có khả năng phát triển ở 42 °C nhưng không phát triển được ở 4 °C còn *Pseudomonas fluorescen* thì phát triển ở 4 °C nhưng không phát triển ở 42 °C.

*Pseudomonas aeruginosa* hóa lỏng gelatin, thủy phân casein, nhưng không thủy phân tinh bột. Hơn 90 % các chủng tạo ra sắc tố pyocyanin (xanh lam - xanh lục).

**Phụ lục B**

(Tham khảo)

**Môi trường thay thế**

Có thể sử dụng môi trường thay thế cho thạch dinh dưỡng, miễn là môi trường đó không chọn lọc và không chứa hydrat cacbon lên men.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] Council Directive 80/777/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to the exploitation and marketing of natural mineral waters. *Official Journal of the European Communities*, **L229**, 1980, pp. 1-10
  - [2] Directive 96/70/EC of the European Parliament and of the Council amending Council Directive 80/777/EEC on the approximation of the laws of the Member State relating to the exploitation and marketing of nature mineral waters. *Official Journal of the European Communities*, **L229**, 1996, pp. 26-28
  - [3] Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, **L330**, 1998, pp. 32-53
-