

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 7924-2:2008

ISO 16649-2:2001

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN
CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG
ESCHERICHIA COLI DƯƠNG TÍNH β -GLUCURONIDAZA –
PHẦN 2: KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 44 °C SỬ DỤNG
5-BROMO-4-CLO-3-INDOLYL β -D-GLUCURONID**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method
for the enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli –*

Part 2: Colony-count technique at 44 °C

using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide

HÀ NỘI - 2008

Lời nói đầu

TCVN 7924-2:2008 hoàn toàn tương đương với ISO 16649-2:2001;

TCVN 7924-2:2008 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

TCVN 7924:2008 (ISO 16649) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza, bao gồm các phần sau:

– TCVN 7924-1:2008 (ISO 16649-1:2001) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza – Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng màng lọc và 5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-glucuronid;

– TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-glucuronid;

– TCVN 7924-3: 2008 (ISO/TS 16649-3:2005) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza – Phần 3: Kỹ thuật tính số có xác suất lớn nhất sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-glucuronid.

Lời giới thiệu

Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi nên phương pháp này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể. Trong trường hợp này, có thể sử dụng các phương pháp khác đặc trưng cho từng sản phẩm, nếu hoàn toàn chỉ vì lý do kỹ thuật. Tuy nhiên, cần cố gắng áp dụng phương pháp này khi có thể.

Khi tiêu chuẩn này được soát xét thì cần phải tính đến mọi thông tin liên quan đến phạm vi mà phương pháp đếm đĩa này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch so với phương pháp trong trường hợp các sản phẩm cụ thể.

Việc hài hoà các phương pháp thử có thể không thực hiện được ngay và đối với một vài nhóm sản phẩm có thể tồn tại các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Thông thường khi các tiêu chuẩn quốc tế như vậy được soát xét, thì chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với phương pháp đếm đĩa này là các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi
Phương pháp định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza
– Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng
5-bromo-4-clo-3-indolyl β -D-glucuronid

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method
for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* –
Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi. Phương pháp này sử dụng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C trên môi trường đặc có chứa thành phần tạo sắc để phát hiện enzym β -glucuronidaza.

CẢNH BÁO – Một số chủng *Escherichia coli* không phát triển được ở 44 °C và cụ thể là các *Escherichia coli* âm tính β -glucuronidaza như *Escherichia coli* O157 sẽ không phát hiện được.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. 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.

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch 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 huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.

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.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

***Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza** (β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*)

Vi khuẩn ở nhiệt độ 44 °C hình thành các khuẩn lạc màu xanh điển hình trên môi trường trypton-mật-glucuronid (TBX) trong các điều kiện được qui định trong tiêu chuẩn này.

3.2

Định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza (enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*)

Việc xác định số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza được tính trên mililit hoặc trên gam mẫu, khi phép thử và việc tính toán được thực hiện theo quy định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Cấy một lượng mẫu thử xác định hoặc với một lượng xác định huyền phù ban đầu lên các đĩa kép chứa môi trường trypton-mật-glucuronid (TBX).

Sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu cấy vào hai đĩa cho mỗi dung dịch pha loãng, trong cùng một điều kiện.

Các đĩa này được ủ ở 44 °C \pm 1 °C trong 18 h đến 24 h rồi kiểm tra để phát hiện sự có mặt của các khuẩn lạc đặc trưng được coi là *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza.

4.2 Tính số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên gam hoặc trên mililit mẫu (xem điều 10).

5 Dịch pha loãng và môi trường cấy

Đối với các phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

5.1 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần xác định.

5.2 Môi trường nuôi cấy: Thạch trypton-mật-glucuronid (TBX)

5.2.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	20,0 g
Muối mật No.3	1,5 g
Axit 5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-glucuronid (BCIG)	144 μ mol ^a
Dimetyl sulfoxit (DMSO) ^b	3 ml
Thạch	9 g đến 18 g ^c
Nước	1 000 ml

^a Ví dụ: 0,075 g muối xyclohexylamoni.

^b Dimetyl sulfoxit là rất độc khi hít hoặc tiếp xúc phải. Cần sử dụng trong tủ hút khói. Vì độc tính đó nên nhà sản xuất khuyến cáo dùng dung dịch pha loãng.

^c Phụ thuộc vào sức đông của thạch.

5.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan BCIG trong dimetyl sulfoxit hoặc trong dung dịch loãng theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Hoà tan tất cả các thành phần trên trong nước và đun đến sôi.

Chỉnh pH để sau khi khử trùng pH phải là $7,2 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

Khử trùng môi trường 15 min ở nhiệt độ 121 °C trong nồi hấp áp lực. Làm nguội ngay môi trường trên nồi cách thủy (6.3) đến khoảng từ 44 °C đến 47 °C.

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm vi sinh thông thường [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] và cụ thể như sau:

6.1 Thiết bị khử trùng khô (tủ) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp áp lực).

6.2 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở $44 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3 Nồi cách thủy, có thể duy trì được nhiệt độ từ 44 °C đến 47 °C

6.4 Bình, ống nghiệm hoặc chai, có dung tích thích hợp.

6.5 Pipet hoặc micropipet, xả hết (đầu thổi), miệng rộng và có dung tích danh định từ 1 ml đến 10 ml, được chia vạch 0,1 ml đến 0,5 ml tương ứng.

6.6 Đĩa Petri, đường kính khoảng 90 mm.

TCVN 7924-2:2008

6.7 Máy đo pH, có độ chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH.

Ngưỡng đo tối thiểu của máy đo pH phải là 0,01 đơn vị pH. Máy đo pH có thể được gắn với hệ thống cân bằng nhiệt tự động hoặc điều chỉnh bằng tay.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi thành phần trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên tự thoả thuận về vấn đề này.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên tự thoả thuận về vấn đề này.

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng tiếp theo

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần xác định.

9.2 Cấy và ủ

9.2.1 Dùng pipet hoặc micropipet vô trùng (6.5) chuyển 1 ml mẫu thử (nếu mẫu thử ở dạng lỏng) hoặc 1 ml dịch pha loãng ban đầu (10^{-1}) (nếu sản phẩm ở dạng khác) vào đĩa Petri vô trùng (6.6.)

Cấy vào hai đĩa ở mỗi độ pha loãng.

Lặp lại quy trình trên cho các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, sử dụng một pipet mới vô trùng cho mỗi độ pha loãng, nếu cần.

9.2.2 Rót vào mỗi đĩa Petri khoảng 15 ml môi trường TBX (5.2) mà trước đó đã được làm nguội đến khoảng từ 44 °C đến 47 °C trên nổi cách thuỷ (6.3).

Trộn cẩn thận dịch cấy với môi trường và để yên cho hỗn hợp đông lại, để các đĩa Petri trên mặt phẳng mát nằm ngang.

Thời gian tính từ khi phân phối dịch cấy vào đĩa đến khi rót môi trường không được quá 15 min.

9.2.3 Lật ngược các đĩa (9.2.2) và để vào tủ ấm (6.2) để ở 44 °C trong khoảng từ 18 h đến 24 h. Tổng thời gian ủ không được quá 24 h.

CẢNH BÁO – Nếu nghi ngờ có mặt các tế bào bị ức chế thì ủ giai đoạn đầu khoảng 4 h ở 37 °C sau đó tăng nhiệt độ lên 44 °C ủ trong khoảng 18 h đến 24 h. Nhiệt độ ủ không được vượt quá 45 °C.

9.3 Đếm các đơn vị hình thành khuẩn lạc

Sau giai đoạn ủ ấm quy định (9.2.3), đếm các CFU điển hình của *Escherichia coli* dương tính β-glucuronidaza trên mỗi đĩa thạch chứa ít hơn 150 CFU điển hình và ít hơn 300 CFU tổng số (điển hình và không điển hình).

Nếu dịch cấy không thể tách riêng và không thể quan sát được các khuẩn lạc điển hình, thì các đĩa chứa 0 CFU điển hình cần được xem xét theo các phương pháp tính khác nhau như trong điều 10.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Yêu cầu chung

Việc tính toán trong 10.2 cần tính đến các trường hợp thường gặp nhất khi tiến hành theo thực hành phòng thử nghiệm tốt. Cũng có một số trường hợp đặc biệt nhưng cũng hiếm khi xảy ra (ví dụ như số lượng CFU rất khác nhau giữa hai đĩa từ cùng một dung dịch pha loãng, hoặc các tỷ lệ khác nhau nhiều từ một hệ số pha loãng giữa các đĩa từ hai độ pha loãng liên tiếp). Các kết quả đếm cần được người phân tích có năng lực kiểm tra, giải thích và kết quả đó cũng có thể bị loại bỏ.

10.2 Tính toán

Để có kết quả đúng, cần đếm các CFU điển hình trên ít nhất một đĩa chứa ít nhất 15 CFU màu xanh điển hình.

Tính N , số lượng CFU của *Escherichia coli* dương tính β-glucuronidaza có mặt trong mẫu thử trên mililit hoặc trên gam sản phẩm từ hai độ pha loãng liên tiếp sử dụng công thức (1):

$$N = \frac{\sum a}{V \times (n_1 + 0,1n_2) \times d} \quad (1)$$

trong đó

$\sum a$ là tổng số các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại sau hai độ pha loãng liên tiếp, có ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 15 CFU màu xanh;

n_1 là số đĩa được giữ lại tại độ pha loãng thứ nhất;

TCVN 7924-2:2008

V thể tích dịch cấy đã dùng trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

n_2 là số đĩa được giữ lại tại độ pha loãng thứ hai;

d hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại [$d = 1$ trong trường hợp (các mẫu ở dạng lỏng) khi mẫu thử được cấy trực tiếp].

Làm tròn các kết quả đến hai chữ số có nghĩa [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Lấy kết quả là số lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác) được biểu thị theo số nguyên đến hai chữ số có nghĩa (dưới 100) hoặc theo số từ 1,0 đến 9,9 nhân lũy thừa của 10.

10.3 Ước tính các số lượng nhỏ

10.3.1 Nếu có hai đĩa [của mẫu thử (nếu sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc của huyền phù ban đầu (nếu sản phẩm ở dạng khác) hoặc của độ pha loãng thứ nhất được cấy hoặc được giữ lại] chứa ít hơn 15 CFU màu xanh, thì tính N_E , số CFU của *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza có mặt trong mẫu thử là trung bình của hai đĩa song song theo công thức (2):

$$N_E = \frac{\sum c}{V \times n \times d} \quad (2)$$

trong đó

$\sum c$ là tổng các CFU màu xanh điển hình đếm được trên hai đĩa;

V thể tích dịch cấy đã dùng trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

n là số đĩa được giữ lại (trong trường hợp này $n = 2$);

d hệ số pha loãng tương ứng với dung dịch huyền phù ban đầu hoặc độ pha loãng thứ nhất được cấy hoặc được giữ lại [$d = 1$ trong trường hợp (sản phẩm dạng lỏng) khi mẫu thử được cấy trực tiếp].

Làm tròn các kết quả đến hai chữ số có nghĩa [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Biểu thị kết quả như sau:

– số lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza ước tính trong một mililit (đối với sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một miligam (sản phẩm dạng khác): $N_E = Y$.

10.3.2 Nếu hai đĩa của mẫu thử [(sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) của độ pha loãng thứ nhất đã cấy hoặc giữ lại] không chứa bất kỳ CFU màu xanh nào, thì biểu thị kết quả như sau:

– ít hơn $1/d$ *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trong millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong gam (sản phẩm dạng khác);

trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu hoặc độ pha loãng thứ nhất đã cấy hoặc giữ lại [$d = 1$] trong trường hợp (sản phẩm dạng lỏng) mẫu thử được cấy trực tiếp.

10.3.3 Nếu tất cả các CFU điển hình hoặc không điển hình trên hai đĩa ở độ pha loãng thứ nhất d_1 chứa nhiều hơn 300 có CFU màu xanh có thể nhìn thấy, hoặc nếu trên hai đĩa ở độ pha loãng tiếp theo d_2 chứa ít hơn 300 khuẩn lạc, không có CFU màu xanh nào cần đếm, thì biểu thị kết quả như sau:

– ít hơn $1/d_2$ và nhiều hơn $1/d_1$ *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza có trong một millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm dạng khác);

trong đó d_1 và d_2 là các hệ số pha loãng tương ứng với các dung dịch pha loãng d_1 và d_2 .

10.3.4 Nếu tất cả các CFU điển hình hoặc không điển hình trên hai đĩa ở độ pha loãng thứ nhất d_1 chứa nhiều hơn 300, không có CFU màu xanh có thể nhìn thấy, hoặc nếu trên hai đĩa ở độ pha loãng tiếp theo d_2 chứa ít hơn 300 khuẩn lạc, không có CFU màu xanh cần đếm, thì biểu thị kết quả như sau:

– ít hơn $1/d_2$ các CFU của *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza có trong một millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm dạng khác);

trong đó d_2 là các hệ số pha loãng tương ứng với dung dịch pha loãng d_2 .

10.4 Phương pháp tính: Các trường hợp đặc biệt

10.4.1 Trong trường hợp trên hai đĩa ở độ pha loãng d_1 chứa nhiều hơn 150 CFU màu xanh, trên hai đĩa ở độ pha loãng tiếp theo d_2 chứa ít hơn 15 CFU màu xanh:

– nếu số lượng CFU màu xanh trên từng đĩa ở độ pha loãng d_1 nằm trong khoảng từ 150 đến 167 (giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với giá trị trung bình bằng 150), thì sử dụng phương pháp tính đối với trường hợp chung (10.2);

– nếu số lượng CFU màu xanh trên từng đĩa ở độ pha loãng d_1 nhiều hơn 167 (giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với giá trị trung bình bằng 150 CFU), thì chỉ tính đến kết quả của số đếm của độ pha loãng d_2 và thực hiện tiếp với việc đếm số lượng nhỏ (10.3).

10.4.2 Trong trường hợp số đếm CFU màu xanh trên mỗi đĩa đối với tất cả các độ pha loãng đã cấy có nhiều hơn 150, thì biểu thị kết quả như sau:

– nhiều hơn $150/d$ *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza có trong millilit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc gam (sản phẩm dạng khác).

TCVN 7924-2:2008

trong đó d là hệ số pha loãng của dung dịch pha loãng đã cấy sau cùng.

10.4.3 Trong trường hợp chỉ có hai đĩa ở độ pha loãng thấp nhất (nồng độ cao nhất) chứa ít hơn 150 CFU điển hình, thì tính số N' các *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza có mặt trong mẫu thử là trung bình số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa, sử dụng công thức (3):

$$N' = \frac{\sum c}{V \times n \times d} \quad (3)$$

trong đó

$\sum c$ là tổng số khuẩn lạc màu xanh đếm được trên hai đĩa, có ít nhất một đĩa chứa tối thiểu là 15 CFU điển hình;

V là thể tích dịch cấy đã cấy trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

n là số đĩa được giữ lại (trong trường hợp này $n = 2$);

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng được giữ lại.

Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

10.5 Các giới hạn tin cậy

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các điều kiện thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy ý, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.
- kết quả thử nghiệm thu được, nêu rõ phương pháp biểu thị đã sử dụng; và
- nếu đáp ứng được yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] BLAZKO N. Evaluation of the β -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide in a 24 hour direct plating method for *Escherichia coli*. *J. Food Protection*, 51. p. 402.
- [2] DAUARE J.M., CAMPBELL D.R and JOHNSON R.W Simplified direct plating method for enhanced recovery of *Escherichia coli* in food. *Journal of Food Science* 50. 1985, pp. 1736-1737. 1746.
- [3] DELISE G.L. and LEY A. Rapid detection of *Escherichia coli* in urine samples by a new chromogenic β -glucuronidase assay. *J. Clin. Microbiol*, 27. 1989, pp. 778-779.
- [4] KILIAN M. and BULOW P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Sect. B. 84. 1976. pp. 245-251.
- [5] KILIAN M. and BULOW P. Rapid identification of Enterobacteriaceae. Use of a β -glucuronidase detecting agar medium (PGUA agar) for the identification of *Escherichia coli* in primary cultures of urine samples. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Sect. B. 87, 1979. pp. 271-276.
- [6] LEY A.N . BOWERS R.J. and WOLFE S. Indoxyl- β -D-glucuronide, a novel chromogenic reagent for the specific detection and enumeration of *Escherichia coli* in environmental sample. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 1988. pp. 690-693.
- [7] MANAFI M. and KNEIFEL W. A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in water. *Zentralbl. Hyg.*, 189, 1989, pp. 225-234.
- [8] OGOCN L.D. and WATT A.J. An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 13, 1991, pp. 212-215.
- [9] RESTAINO L., FRAMPTON E.W. and LYON R.H. Use of chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) for enumeration of *Escherichia coli* on 24 hours from ground beef. *J Food Protection*. 53 (6). 1990. pp. 508-510.
- [10] WATKINS W.O., RIPPEY S.C., CLAVET C.R., KELLY-REITZ D.J. and BURKHARDT W. Novel compound for identifying *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*. 54. 1988, pp. 1874-1875