

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 11039-3:2015

Xuất bản lần 1

**PHỤ GIA THỰC PHẨM -
PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VI SINH VẬT -
PHẦN 3: PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG COLIFORM VÀ
E.COLI BẰNG KỸ THUẬT ĐẾM SỐ CÓ XÁC SUẤT
LỚN NHẤT (PHƯƠNG PHÁP CHUẨN)**

*Food additive - Microbiological analyses -
Part 3: Detection and enumeration of coliforms and E.coli by most probable number
technique (Reference method)*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 11039-3:2015 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 11039-3:2015 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 3: Phát hiện và định lượng coliform và *E. coli* bằng kỹ thuật
đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp chuẩn)**

Food additives - Microbiological analyses -

*Part 4: Detection and enumeration of coliforms and *E. coli* by*

most probable number technique (Reference method)

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp chuẩn 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 lên men lactose có sinh khí ở nhiệt độ 35 °C 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 35 °C và sinh indol từ tryptophan ở 35 °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 11039-3:2015

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 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 $45,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mực 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 ấm**, có thể hoạt động ở $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 5.4 **Cân**, có thể chính xác đến 0,1 g.
- 5.5 **Cân phân tích**, có thể cân chính xác đến 1 mg.
- 5.6 **Thiết bị trộn và bình trộn**.
- 5.7 **Pipet chia vạch**, vô trùng, dung tích 1,0 ml và 10,0 ml.
- 5.8 **Thiết bị khử trùng để xử lý mẫu**.
- 5.9 **Chai pha loãng**, bằng thủy tinh borosilicat, có nút hoặc nắp vặn 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.
- 5.10 **Thiết bị đếm khuẩn lạc**, loại cơ học hoặc điện tử, có nguồn sáng thích hợp, đĩa lưới và bộ đếm.
- 5.11 **Máy đo pH**.

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 thoả 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 vi khuẩn coliform già định

Cân vô trùng 10 g mẫu, cho vào lọ vô trùng có nắp vặn. Thêm 90 ml dung dịch đệm phosphat Butterfield (4.11) và lắc mạnh (50 lần với biên độ 30 cm) để thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} . Để yên

TCVN 11039-3:2015

từ 3 min đến 5 min và lắng lại huyền phù (5 lần với biên độ 30 cm) ngay trước khi chuẩn bị dãy các dung dịch pha loãng và cấy.

Chuẩn bị tất cả các dung dịch pha loãng thập phân với 90 ml dung dịch đệm phosphat Butterfield cùng với 10 ml dung dịch pha loãng trước đó, trừ khi có quy định khác. Các độ pha loãng được chuẩn bị phụ thuộc vào mật độ coliform dự đoán. Lắc tất cả các huyền phù 25 lần với biên độ 30 cm trong 7 s. Không dùng pipet để phân phối các thể tích nhỏ hơn 10 % dung tích pipet. Chuyển các thể tích 1 ml vào 3 ống LST (4.1) đối với mỗi độ pha loãng của 3 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 đến 3 s. Thời gian từ khi trộn mẫu đến khi kết thúc cấy mẫu là không quá 15 min.

Ủ các ống 48 h \pm 2 h ở 35 °C. Kiểm tra sự sinh khí của các ống sau 24 h \pm 2 h, về sự thay đổi môi trường trong ống Durham do lên men hoặc có sủi bọt khí các ống được khuấy nhẹ. Ủ thêm các ống không sinh khí trong 24 h. Kiểm tra tiếp về sự sinh khí. Thực hiện phép thử khẳng định (8.2 hoặc 8.3) trên các ống dương tính giả định (có sinh khí).

8.2 Phép thử khẳng định coliform

Khuấy nhẹ từng ống LST có sinh khí (xem 8.1). Giữ nghiêng ống và dùng que cấy lấy đầy một vòng cấy (không lấy lớp màng, nếu có), cấy vào ống canh thang BGLB (4.2). Ủ ống BGLB trong 48 h \pm 2 h ở 35 °C. Kiểm tra sự sinh khí và ghi lại ống có sinh khí.

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

8.3 Phép thử khẳng định *E. coli*

Khuấy nhẹ mỗi ống LST sinh khí (xem 8.1) và chuyển một vòng cấy chứa đầy dịch cấy vào ống đựng canh thang EC (4.3). Ủ các ống EC trong 48 h \pm 2 h ở 45,5 °C \pm 0,2 °C trong nồi cách thủy (5.1). Kiểm tra sinh khí tại thời điểm 24 h \pm 2 h; nếu âm tính thì kiểm tra tiếp sau khi ủ 48 h \pm 2 h.

Đưa vòng cấy chứa đầy dịch cấy từ các ống có sinh khí vào thạch L-EMB (4.4) sao cho một phần đĩa có các khuẩn lạc phân tách rõ. Ủ trong 18 h đến 24 h ở 35 °C.

Các đĩa nghi ngờ chứa các khuẩn lạc *E. coli*, có chứa các khuẩn lạc có tâm tối màu, có hoặc không có ánh kim loại. Chọn hai khuẩn lạc nghi ngờ từ mỗi đĩa L-EMB và chuyển sang thạch nghiêng PCA (4.5) để kiểm tra hình thái và thử sinh hóa. Ủ môi trường thạch nghiêng PCA từ 18 h đến 24 h ở 35 °C. Nếu không thấy các khuẩn lạc điển hình thì chọn từ mỗi đĩa từ 5 đến 10 hoặc nhiều hơn các khuẩn lạc giống *E. coli* nhất.

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 bất 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 (5.15). 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 creatin (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.

CHÚ THÍCH: Thay vì thực hiện các phép thử IMViC, có thể dùng các phép thử sinh hóa dùng dài vật liệu chuẩn bị sẵn. Cấy 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 hoặc 8.3), chỉ rõ sự có mặt hay không có mặt coliform và/hoặc *E. coli* trong phần mẫu thử. Tham khảo TCVN 6404 (ISO 7218) [9].

TCVN 11039-3:2015

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) ^[3].

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. Chỉnh 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 11039-3:2015

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 (K_2HPO_4)	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 ml 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 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 $7,0 \pm 0,2$.

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 $6,9 \pm 0,2$.

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 (K_2HPO_4)	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 ở 121 °C. pH cuối cùng đạt $6,9 \pm 0,2$.

TCVN 11039-3:2015

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 phosphat	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 phosphat	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 phosphat ngậm bốn phân tử nước ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1,5 g
Kali hydro phosphat (K_2HPO_4)	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 (dung dịch 1)**

Thành phần:

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

A.10.2 Dung dịch kali hydroxit, 40 % (khối lượng) (dung dịch 2)

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 creatin 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 (KH ₂ PO ₄)	34 g
Nước cất	500 ml

TCVN 11039-3:2015

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*
-