

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 5287 - 1994

THỦY SẢN ĐÔNG LẠNH

PHƯƠNG PHÁP THỬ VI SINH VẬT

SOÁT XÉT LẦN 2

HÀ NỘI - 1994

Lời nói đầu

TCVN 5287-1994 dựa trên các tiêu chuẩn quốc tế : ISO 6887-1983;
ISO 2293-1988; ISO 4832-1991; ISO 6888-1983;

TCVN 5287-1994 thay thế TCVN 5287-90;

TCVN 5287-1994 do Ban Kỹ thuật Thủy sản biên soạn, Tổng cục
Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị và được Bộ Khoa
học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

THỦY SẢN ĐÔNG LẠNH

PHƯƠNG PHÁP THỬ VI SINH VẬT

Frozen sea products
Methods of microbiological examination

1 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

1.1 Lấy mẫu theo TCVN 2068-1993.

1.2 Chuẩn bị mẫu

1.2.1 Sau khi tiếp nhận mẫu kiểm tra điều kiện bao gói, bảo quản và vận chuyển mẫu, cho mẫu vào các khay vô trùng và đưa vào buồng vô trùng.

1.2.2 Tiến hành rã đông mẫu trong điều kiện vô trùng, dùng dụng cụ vô trùng để lấy mẫu và chứa mẫu. Mẫu dùng để kiểm tra vi sinh vật được lấy ít nhất 10 vị trí khác nhau cho mỗi đơn vị sản phẩm (của mẫu được gửi tới) với khối lượng mẫu khoảng 100g. Tiến hành nghiền mẫu trong điều kiện vô trùng.

1.2.3 Trộn đều mẫu đã nghiền, cân chính xác tới 0,002g một lượng 25g mẫu đã nghiền, cho vào bình tam giác vô trùng đã chứa sẵn 225ml môi trường pha loãng (mục 1 phụ lục), lắc đều. Dung dịch mẫu này là dạng huyền phù ban đầu ứng với độ pha loãng 1/10.

Từ dạng huyền phù ban đầu, tiến hành pha loãng tới các độ pha loãng 1/100, 1/1000... tùy thuộc mức độ nhiễm bẩn dự kiến của mẫu sao cho khi nuôi cấy mỗi đĩa chỉ mọc khoảng 30 - 300 khuẩn lạc.

Phải dùng pipet riêng cho mỗi độ pha loãng. Khi tiến hành pha loãng hoặc nuôi cấy.

2 Phương pháp thử

2.1 Dụng cụ, thiết bị, hoá chất và môi trường

Nơi xác định, các dụng cụ, thiết bị, vật liệu, hoá chất và môi trường phải đảm bảo vô trùng.

- Nồi hấp tiệt trùng có thể duy trì ở $121 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Tủ sấy thanh trùng có thể duy trì ở $170 - 175^\circ\text{C}$;
- Tủ ấm có thể duy trì nhiệt độ ở 30, 35, 37 và $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$;
- Cân phân tích;

- Cân kỹ thuật;
- Kính hiển vi, kính lúp;
- Bộ lọc chuẩn.

Thiết bị :

- Bộ đếm khuẩn lạc;
- Bếp cách thuỷ, đèn cồn hoặc đèn ga;
- Bếp khuấy từ;
- Máy đo pH và giấy đo pH;
- Que cấy các loại;
- Pipet các loại;
- Ống nghiệm các cỡ;
- Bình tam giác các cỡ;
- Bình định mức các cỡ;
- Ống đong các cỡ;
- Đĩa petri, 100mm;
- Khay men các cỡ;
- Dao, kéo, panh;
- Cối nghiền mẫu bằng sứ, dụng cụ nghiền mẫu stomacher;
- Các hoá chất và vật liệu dùng để chuẩn bị môi trường pha loãng và môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

2.2 Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí

2.2.1 Nguyên tắc

Vi khuẩn hiếu khí là những vi sinh vật chỉ tồn tại trong điều kiện có oxy tự do. Chúng được xác định bằng cách đếm số khuẩn lạc mọc được trên môi trường thạch trypton Glucoza ủ ở 30°C trong 72h.

2.2.2 Môi trường nuôi cấy

Môi trường thạch trypton Glucoza (mục 2 phụ lục).

2.3.3 Tiến hành xác định

a) với mỗi mẫu phải nuôi cấy ít nhất ở 3 độ pha loãng liên tiếp (việc quyết định nuôi cấy ở độ pha loãng nào tùy thuộc mức độ nhiễm bẩn dự kiến của mẫu sao cho không quá 300 khuẩn lạc trong mỗi đĩa),

mỗi độ pha loãng nuôi cấy. 3 đĩa phải dùng pipet riêng cho mỗi độ pha loãng và thời gian từ khi pha loãng mẫu tới khi cấy xong không lâu hơn 20 phút.

b) Dùng pipet vô trùng lấy 1ml mẫu đã pha loãng cho vào giữa đĩa petri. Rót vào mỗi đĩa khoảng 15ml môi trường thạch trypton glucoza (đã được pha chế và chuẩn bị theo mục 2 phụ lục). Lắc tròn đĩa theo chiều kim đồng hồ và ngược lại mỗi chiều lắc 5 lần. Đặt đĩa trên mặt phẳng ngang sao cho môi trường đông tự nhiên.

Nếu nghi mẫu có chứa các vi sinh vật mà khuẩn lạc của chúng có thể mọc lan trên bề mặt đĩa thì sau khi môi trường đã đông rót thêm 4ml thạch màng (mục 3 - Phụ lục) lên bề mặt đĩa.

c) Khi môi trường đã đông, lật úp đĩa và đặt vào tủ ấm đã duy trì ở $30 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 72h.

2.2.4 Tính kết quả

a) Cứ sau 24h đếm sơ bộ số khuẩn lạc đã mọc và sau 72h đếm chính thức để tính kết quả.

Chỉ tính kết quả khi sự phân bố khuẩn lạc trên các đĩa là hợp lý với môi trường quan nghịch giữa độ pha loãng và số khuẩn lạc mọc trên đó.

Dùng mắt thường, kính lúp hoặc thiết bị đếm khuẩn lạc để đếm số khuẩn lạc mọc trên mỗi đĩa. Chỉ đếm những đĩa có số khuẩn lạc mọc riêng biệt và có từ 15 đến 300 khuẩn lạc mỗi đĩa.

b) Tổng số vi khuẩn hiếu khí trong 1g mẫu (X) được tính ở 2 độ pha loãng liên tiếp, mỗi độ pha loãng gồm 2 đĩa theo công thức sau:

$$X = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

trong đó :

$\sum c$ - tổng số khuẩn lạc của 4 đĩa ở hai độ pha loãng được đếm;

n_1 - số đĩa được đếm ở độ pha loãng thứ nhất (2 đĩa);

n_2 - số đĩa được đếm ở độ pha loãng thứ hai (2 đĩa);

d - hệ số pha loãng ứng với độ pha loãng thứ nhất;

Làm tròn kết quả tính được và biểu thị theo biểu thức :

$$a \times 10^n$$

trong đó :

a - số thập phân tương ứng từ 1,0 đến 9,9;

n - số mũ phù hợp 10;

Ví dụ:

- Hai đĩa ở độ pha loãng thứ nhất được đếm (10^{-2}) có số khuẩn lạc là 168 và 215;

- Hai đĩa ở độ pha loãng thứ hai được đếm (10^{-3}) có số khuẩn lạc là 14 và 25.

$$X = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2) \times d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022}$$

$$X = 19182$$

Kết quả 19182 làm tròn thành 19000 và được biểu thị theo biểu thức : $n \times 10^x$

$$X = 1,9 \times 10^4 \text{ vi khuẩn hiếu khí/g.}$$

c) Nếu các đĩa của hai độ pha loãng liên tiếp có số khuẩn lạc từ 15 đến 30 tính số khuẩn lạc của mỗi độ pha loãng và kết quả là trung bình số học của hai giá trị thu được. Trong trường hợp tỉ số giữa giá trị cao so với giá trị thấp lớn hơn 2, lấy giá trị thấp là kết quả.

d) Nếu cả hai đĩa chứa huyền phù ban đầu (ứng với độ pha loãng 10^{-1}) đều chứa ít hơn 15 khuẩn lạc, lấy trung bình số học m của chúng và khi đó kết quả X được tính:

$$X = m \times \frac{1}{d} = 10m \text{ vi khuẩn hiếu khí/g}$$

(d là hệ số pha loãng của dịch huyền phù ban đầu bằng 10^{-1}).

d) Nếu cả hai đĩa chứa dịch huyền phù ban đầu đều không có khuẩn lạc nào, kết quả X được tính:

$$X < 1 \times \frac{1}{d}$$

$$X < 10 \text{ vi khuẩn hiếu khí/g.}$$

2.3 Xác định coliform

2.3.1 Nguyên tắc

Coliform là nhóm trực khuẩn đường ruột gram (-) kích thước khoảng $0,5 \times 3 \mu\text{m}$ không sinh bào tử, hiếu khí hoặc kỵ khí, có khả năng sinh axit, sinh đọt lên hơi men lactoza ở 37°C trong 24 giờ.

Coliform được xác định bằng cách đếm số khuẩn lạc đặc trưng trên các đĩa chứa môi trường VRBL và biểu thị bằng số coliform trên g mẫu.

2.3.2 Môi trường nuôi cấy

Môi trường VRBL (Crystal Violet Neutral Red Bile Lactose agar) được pha chế theo mục 4 - Phụ lục.

2.3.3 Tiến hành xác định

a) Như mục a) của 2.2.3.

b) Dùng pipet vô trùng lấy 1ml mẫu đã pha loãng cho vào giữa đĩa petri. Đổ khoảng 15ml môi trường VRBL ở $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (theo mục 4 Phụ lục). Lắc tròn đĩa theo chiều kim đồng hồ và ngược lại, mỗi chiều lắc 5 lần. Đặt đĩa trên mặt phẳng ngang để môi trường đông tự nhiên. Sau khi môi trường trong các đĩa petri đã

đông hoàn toàn, đổ khoảng 4ml môi trường VRBL ở $45 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ tráng phủ kín bề mặt của mỗi đĩa và để đông đặc như trên.

c) Sau khi đông, lật úp các đĩa đặt vào tủ ấm đã duy trì ở 37°C trong $24^{\pm 2}\text{h}$.

2.3.4 Tính kết quả

a) Sau 24h nuôi cấy trên môi trường VRBL các khuẩn lạc coliform đặc trưng có màu đỏ tía, đường kính khoảng 0,5mm đôi khi được bao quanh bởi một vùng hơi đỏ của mật kết tủa.

Đếm các khuẩn lạc coliform đặc trưng từ các đĩa chứa không quá 150 khuẩn lạc.

b) Số coliform (X_1) được tính ở 2 độ pha loãng liên tiếp, mỗi độ pha loãng gồm 2 đĩa (không quá 150 khuẩn lạc mỗi đĩa) theo công thức qui định trong mục b của 2.2.4.

☛ Ví dụ : - 2 đĩa ở độ pha loãng đầu (10^{-2}) ta đếm được 83 và 97 khuẩn lạc đặc trưng;

- 2 đĩa ở độ pha loãng kế tiếp (10^{-3}) ta đếm được 13 và 8 khuẩn lạc đặc trưng;

Ta có :

$$X_1 = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2) d}$$

$$X_1 = \frac{83 + 97 + 13 + 8}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{201}{0,022} = 9136 \approx 9100$$

$$X_1 = 91, \times 10^3 \text{ coliform/g.}$$

c) Nếu mỗi đĩa chứa ít hơn 15 khuẩn lạc đặc trưng

- Với các dạng đã pha loãng, vẫn áp dụng công thức trên để tính toán;

☛ - Với dạng huyền phù ban đầu ($d = 10^{-1}$) tính theo mục d, điều 2.2.4.

d) Nếu không có khuẩn lạc đặc trưng, theo các tính ở đ của 2.2.4.

2.4 Phát triển Escherichia coli

2.4.1 Nguyên tắc

Escherichia coli là dạng coliform có nguồn gốc từ phân, phát triển được ở $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, sinh indol, sinh axit, không sinh acetone và không dùng citrat làm nguồn cacbon Escherichia coli được phát hiện do khả năng lên men lactosa sinh hơi ở $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ và có kết quả nghiệm pháp IMVIC phù hợp.

2.4.2 Hoá chất, môi trường

- Môi trường tăng sinh : môi trường BGGBL 2% (canh lactosa mật bò lọc sáng - mục 5 - Phụ lục) hoặc canh Lauryl sulphat truptoza (mục 6 - Phụ lục);

- Môi trường phân lập : môi trường EMB (mục 7 - Phụ lục) hoặc Endo (mục 8 - Phụ lục).
- Hoá chất, môi trường thử phản ứng sinh hoá
 - . Môi trường MRVP (Methyl Red voges Pros kauer) (mục 9 - Phụ lục);
 - . Môi trường simons citrat agar (mục 10 - Phụ lục);
 - . Nước pepton (Mục 1.2 - Phụ lục);
 - . Đỏ metlyl, dung dịch 0,2%;
 - . Kali hydroxit, dung dịch 40%;
 - . α - Naptol, dung dịch 5%;
 - . Thuốc thử kovac (mục 11 - Phụ lục)
 - . Thuốc nhuộm Gram (mục 12 - Phụ lục).

2.4.3 Tiến hành

a) Tăng sinh :

Lấy 1ml dạng huyền phù ban đầu ($d = 10^{-1}$) cấy vào ống nghiệm chứa 5ml môi trường tăng sinh, để ở $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong 24h. Tiến hành hai ống nghiệm cho mỗi mẫu.

b) Phân lập :

Sau 24h chọn ống nghiệm có phản ứng dương tính (biến màu môi trường từ xanh sang vàng và sinh hơi) để cấy sang môi trường phân lập, để ở 37°C trong 24h.

Nhận dạng khuẩn lạc của E.coli:

- Trên môi trường EMB : khuẩn lạc màu tím ánh kim, tròn, bờ đều, ϕ khoảng 0,5mm;
- Trên môi trường Endo : khuẩn lạc màu đỏ ánh kim, tròn, bờ đều, ϕ khoảng 0,5mm.

c) Thử phản ứng sinh hoá

Tiến hành thử phản ứng sinh hoá các khuẩn lạc nghi ngờ là E.coli.

- Phản ứng indol: cấy khuẩn lạc nghi ngờ vào ống nghiệm chứa 5ml nước pepton để ở 37°C trong 24h cho thêm bằng cách chày dọc theo thành ống nghiệm 0,5ml thuốc thử kovac.

. Môi trường chuyển màu đỏ : indol (+);

. Môi trường không đổi màu : indol (-).

- Phản ứng MR (methyl Red): cấy khuẩn lạc nghi ngờ vào 2 ống nghiệm mỗi ống chứa 5ml môi trường MRVP để ở 37°C từ 48 đến 96h. Cho vào một ống nghiệm vài giọt methyl đỏ ở pH trung tính hoặc kiềm yếu.

. Môi trường chuyển màu đỏ : MR (+);

. Môi trường không đổi màu : MR (-).

- Phản ứng VP (Voges - Proskauer) : cho vào ống nghiệm chứa môi trường MRVP còn lại khoảng 0,6ml dung dịch α - Naphthol và 0,2ml dung dịch kali hydroxit, lắc đều và để yên trong 2 giờ.

- . Môi trường đổi sang màu đỏ eosin hoặc có vệt đỏ eosin phát triển trong vòng 15 phút: VP (+);
- . Môi trường không chuyển màu đỏ : VP (-).

- Phản ứng citrat : Cấy ria khuẩn lạc nghi ngờ lên mặt nghiêng của môi trường simon citrat, để ở 37°C trong 24h.

- . Môi trường đổi màu lục sang xanh dương và xuất hiện khuẩn lạc : Citrat (+)
- . Môi trường không đổi màu, không mọc khuẩn lạc : Citrat (-).

2.4.4 Đọc kết quả

Phát hiện có Escherichiacoli khi:

- Môi trường BGBL đổi màu từ xanh sang vàng và sinh hơi;
- Có khuẩn lạc điển hình trên môi trường EMB hoặc Endo;
- Trục khuẩn Gram (-);
- Các phản ứng sinh hoá :

I (+); MR (+); V (-); Ci (-).

2.5 Xác định staphylococcus aureus

2.5.1 Nguyên tắc

Staphylococcus aureus là cầu khuẩn gram + ϕ khoảng 0,7 μm không có giáp mô, không sinh nha bào, không di động. tụ thành chùm hoặc ghép đôi lên men glucoza và manitol sinh sắc tố vàng, đông vón huyết tương, tan hồng cầu, ưa mặn (7,5% muối).

Xác định staphylococcus aureus trên cơ sở phản ứng đông vón huyết tương sau khi đã nuôi cấy trong môi trường thạch Tellurit - Glyxin (T.G.) ở 37°C trong 48 \pm 2h.

2.5.2 Hoá chất và môi trường

- Môi trường thạch Tellurit - Glyxin (T.G. Agar - mục 13 - Phụ lục);
- Môi trường B.H.I (mục 14 - Phụ lục);
- Huyết tương (mục 15 - Phụ lục)

2.5.3 Tiến hành xác định

a) Dùng pipet vô trùng lấy 0,1ml dạng huyền phù ban đầu của mẫu ($d = 10^{-1}$) dùng que cấy ria bằng thủy tinh, cấy ria nhanh và cẩn thận lên bề mặt môi trường (Tellurit-Glyxin) tránh chạm vào thành đĩa, đậy nắp và để khoảng 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Có thể cấy ở các độ pha loãng kế tiếp nếu cần. Mỗi độ pha loãng cần cấy 3 đĩa và dùng pipet, que cấy vô trùng riêng cho mỗi đĩa.

b) Lật úp các đĩa đã cấy để vào tủ ấm đã duy trì ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 48h.

c) Sau khi để ở tủ ấm 24 - 26h, kiểm tra và đánh dấu dưới đáy đĩa vị trí của các khuẩn lạc đặc trưng.

Tiếp tục đặt vào tủ và sau 22 - 24h tiếp sau kiểm tra và đánh dấu các khuẩn lạc đặc trưng mới xuất hiện và đánh dấu cả các khuẩn lạc không đặc trưng.

Khuẩn lạc đặc trưng có màu đen, sáng tròn lồi ϕ từ 1 đến 1,5mm (sau 24h ở tủ ấm) và từ 1,5 đến 2,5mm (sau 48h ở tủ ấm) và bao quanh bởi một vùng sáng. Các khuẩn lạc không đặc trưng có kích thước và màu sắc tương tự nhưng không có vùng sáng.

d) Số lượng khuẩn lạc dùng để thử phản ứng đông vón

- Nếu mỗi đĩa có số khuẩn lạc từ 15 đến 150 (đặc trưng và không đặc trưng) tùy trường hợp mà chọn 5 khuẩn lạc đặc trưng hoặc không đặc trưng ở mỗi đĩa để khẳng định lại bằng phản ứng đông vón huyết tương.

- Nếu có ít hơn 15 khuẩn lạc ở mỗi đĩa lấy toàn bộ số khuẩn lạc ở mỗi đĩa để thử phản ứng đông vón.

đ) Thử khẳng định bằng phản ứng sinh hoá (phản ứng đông huyết tương)

- Dùng que cấy chuyển các khuẩn lạc được chọn để thử phản ứng sinh hoá vào các ống nghiệm đã chứa môi trường B.H.I đặt ở 37°C trong 24h. Dùng que cấy vô trùng riêng để chuyển mỗi khuẩn lạc vào một ống nghiệm riêng biệt.

- Dùng pipet cho vào mỗi ống nghiệm cỡ 10 x 75mm khoảng 0,3ml huyết tương. Dùng pipet riêng để chuyển vào mỗi ống nghiệm 0,1ml canh trùng B.H.I ở trên. Lắc nhẹ và để vào tủ ấm ở 37°C .

- Sau 4 - 6h kiểm tra sự đông vón của huyết tương. Phản ứng làm đông vón được coi là dương tính khi thể tích đông vón lớn hơn 3/4 thể tích thử.

- Thử mẫu trắng. Cho 0,1ml môi trường B.H.I (không cấy khuẩn lạc) vào ống nghiệm cùng cỡ, cùng một lượng huyết tương và được để vào tủ ấm ở cùng một nhiệt độ (37°C) và kiểm tra trong cùng thời gian (4 - 6h) huyết tương trong mẫu trắng phải không có hiện tượng đông vón thì kết quả thử mới có giá trị.

2.5.4 Tính kết quả

a) Số staphylococcus có trong 1g mẫu được tính theo số đếm ở hai đĩa của mỗi độ pha loãng riêng biệt theo công thức:

$$X_2 = \frac{(a + b)}{v} \times \frac{1}{d}$$

trong đó :

a và b - số khuẩn lạc đếm được ở hai đĩa bao gồm cả số khuẩn lạc đặc trưng (đã qui đổi sau phản ứng sinh hoá) và số khuẩn lạc không đặc trưng;

v - thể tích nuôi cấy, ml;

d - độ pha loãng tương ứng.

Kết quả được biểu thị theo chuẩn thức, $a \times 10^n$

trong đó: a - số thập phân tương ứng từ 1.1 đến 9.9;

n - số mũ phù hợp của 10.

b) Các khuẩn lạc đặc trưng sau khi thử khẳng định bằng phản ứng sinh hoá được tính như sau :

- Nếu ít nhất 80% số khuẩn lạc được thử phản ứng sinh hoá có phản ứng đồng vốn dương tính tính theo tổng số khuẩn lạc đặc trưng đã đếm được.

- Nếu thấp hơn 80%, tính theo tích giữa số khuẩn lạc đặc trưng đếm được với tỉ lệ % có phản ứng dương tính.

c) Tính trên các đĩa có từ 15 đến 150 khuẩn lạc điển hình và không điển hình. Nếu ở hai độ pha loãng liên tiếp đều có từ 15 đến 150, tính riêng cho từng độ pha loãng và kết quả cuối cùng là trung bình số học của 2 giá trị đó. Nếu tỉ số giữa giá trị cao và giá trị thấp lớn hơn 2, lấy giá trị thấp làm kết quả cuối cùng.

Số đếm (a và b) được làm tròn theo nguyên tắc sau:

- Nếu a, b < 100 làm tròn tới bội số của 5;

- Nếu a, b > 100 và tận cùng là 5, làm tròn tới bội số của 20;

- Nếu a, b > 100 và tận cùng không phải là 5, làm tròn tới bội số của 10.

ví dụ : - Dùng 0,1ml dung dịch nuôi cấy (V);

- Độ pha loãng là 10^{-2} (d);

- Đĩa thứ nhất đếm được 65 khuẩn lạc đặc trưng và 0 khuẩn lạc không đặc trưng;

- Đĩa thứ hai đếm được 85 khuẩn lạc đặc trưng và 0 khuẩn lạc không đặc trưng;

- Cả 5 khuẩn lạc từ đĩa thứ nhất đều có phản ứng dương tính đồng vốn ($65 \times 100\% = 65$);

- 3 trong số 5 khuẩn lạc từ đĩa thứ hai có phản ứng dương tính, số staphylococcus aureus được tính : $85 \times 65\% = 51$.

Số staphylococcus aureus của mẫu được tính như sau :

$$X_2 = \frac{(a + b)}{2} \times \frac{1}{v} \times \frac{1}{d}$$

$$X_2 = \frac{(65 + 0) + (51 + 0)}{2} \times \frac{1}{0,1} \times \frac{1}{10^{-2}}$$

$$X_2 = 58 \text{ (làm tròn thành 60)}, \quad 60 \times \frac{1}{0,1} \times \frac{1}{10^{-2}}$$

$$X_2 = 60 \times 10^3 = 6,0 \times 10^4 \text{ staphylococcus aureus/g.}$$

d) Nếu $\frac{a+b}{2} = m$ (m có giá trị nhỏ hơn 15, đối với dạng huyền phù ban đầu $d = 10^{-1}$ thì kết quả được biểu thị :

$$X_2 = 10m \times \frac{1}{v}$$

d) Nếu $\frac{a+b}{2} < 1$ đối với dạng huyền phù ban đầu thì

$$X_2 < 10 \times \frac{1}{v}$$

2.6 Phát hiện salmonella

2.6.1 Nguyên tắc

Salmonella là trực trùng gram (-) kích thước khoảng $0,6 \times 2 \mu\text{m}$, hiếu khí, có thể di động, không tạo bào tử, sinh hơi lên men dextrosa, sinh khí dihydrosunfua. Phát hiện salmonella theo nguyên tắc tăng sinh trong môi trường phù hợp, phân lập để nhận dạng các đặc trưng và thử khẳng định bằng nhuộm gram và các phản ứng sinh hoá.

2.6.2 Hoá chất và môi trường

- Môi trường tăng sinh : Selenite Broth (mục 16 - Phụ lục) hoặc môi trường Muller-kauffmann (mục 17 - Phụ lục);
- Môi trường phân lập : SSagar (mục 18 - Phụ lục) hoặc Mac Conkey (mục 19 - Phụ lục) hay Bismuth sulfite agar (mục 20 - Phụ lục).
- Môi trường và hoá chất thử phản ứng sinh hoá

- . Môi trường KIA (Kligler Iron Agar) (mục 21 - Phụ lục) hoặc TSI (Triple Sugar Iron Agar) (mục 22 - Phụ lục);
- . Môi trường MIU (Motility Indol Urea) (mục 23 - Phụ lục);
- . Thuốc nhuộm Gram (mục 12 - Phụ lục);
- . Thuốc thử Kovacs (mục 11 - Phụ lục).

2.6.3 Tiến hành

a) Tăng sinh

Cân 25 mẫu đã nghiền cho vào bình đã chứa sẵn 225ml môi trường tăng sinh, lắc đều để ở 37°C trong 24h.

Sau 24h, salmonella làm đục đều môi trường Selenite Broth, có thể hơi lắng cặn và tạo vầng mỏng. Làm biến màu môi trường Muller-Kauffmann từ xanh lục sang vàng.

b) Phân lập

Dùng khay cấy cấy ria canh trùng từ môi trường tăng sinh lên đĩa petri chứa môi trường phân lập. Cấy thưa để tạo các khuẩn lạc riêng biệt. Để ở 37°C trong 24h. Trên các môi trường phân lập, salmonella tạo các khuẩn lạc tròn, hơi lồi, trong, bờ đều φ 2 - 4mm, đôi khi có tâm đen.

Nhuộm Gram các khuẩn lạc nghi ngờ. Thử phản ứng sinh hoá nếu Gram (-).

c) Thử phản ứng sinh hoá

Cấy đâm sâu rồi cấy ria vi khuẩn từ những khuẩn lạc nghi ngờ lên ống thạch nghiêng chứa môi trường TSI hoặc KIA và cấy đâm sâu vào môi trường MIU. Để ở 37°C trong 24h.

- Trên môi trường TSI hoặc KIA, các khuẩn lạc salmonella có màu đen : dihydrosulfua (+) giữ nguyên màu đỏ của phần nghiêng : lactosa (-), saccharosa (-); phần đáy đổi màu từ đỏ sang vàng: dextrosa hoặc glucoza (+); tạo những bọt khí trong nền thạch : có sinh hơi.

- Trên môi trường MIU salmonella mọc lan khỏi đường cấy thẳng : có tính di động; không làm biến màu môi trường từ vàng sang đỏ: Ureasa (-).

Cho lên bề mặt môi trường MIU 0,5ml thuốc thử covac. Salmonella không làm đỏ thuốc thử: indol (-).

2.6.4 Đọc kết quả

Mẫu có salmonella khi:

- Làm đục môi trường tăng sinh;
- Tạo khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường phân lập;
- Trục khuẩn Gram (-);
- Có tính di động;
- Lactosa (-), Saccharosa (-);
- Dextrosa hoặc Glucosa (+);
- Dihydrosulfua (+);
- Ureasa (-);
- Indol (-).

2.7 Phát hiện shigella

2.7.1 Nguyên tắc

Shigella là trực trùng Gram (-) kích thước khoảng 0.4 x 2 μ m. hiếu khí hoặc kỵ khí, không di động, không tạo bào tử, không lên men lactosa. saccharosa; lên men dextrosa nhưng không sinh hơi, không sinh dihydrosulfua phát hiện shigella theo nguyên tắc tăng sinh ở môi trường phù hợp. phân lập để nhận dạng các đặc trưng và thử khẳng định bằng nhuộm Gram và các phản ứng sinh hoá.

2.7.2. Hoá chất và môi trường, như 2.6.2.

2.7.3. Tiến hành

a) Tăng sinh, như mục a của 2.6.3.

b) Phân lập, như mục b của 2.6.3.

Trên môi trường phân lập, shigella có khuẩn lạc tròn, hơi lồi, trong, bóng mờ, bờ đều φ khoảng 1 - 2mm không bao giờ có tâm đen.

Nhuộm Gram các khuẩn lạc nghi ngờ, thử phản ứng sinh hoá nếu Gram (-).

c) Thử phản ứng sinh hoá, như mục c của 2.6.3

- Trên môi trường TSI hoặc KIA shigella cho kết quả giống như salmonella với 2 điểm khác biệt :

. Không tạo khuẩn lạc màu đen : dihydrosulfua (-);

. Không sinh hơi.

- Trên môi trường MIU, shigella cho kết quả tương tự salmonella với 1 điểm khác biệt : khuẩn lạc không mọc lan khỏi đường cấy thẳng: không có tính di động.

2.7.4. Đọc kết quả

Phát hiện có shigella khi :

- Làm đục môi trường tăng sinh;

- Tạo khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường phân lập;

- Trục khuẩn Gram (-);

- Không có tính di động;

- Lactosa (), saccharosa (-);

- Dextrosa (+), glucoza (+);

- Dihydrosulfua (-);

- Ureasa (-);

- Indol (-).

Phụ lục A

A.1 Môi trường pha loãng

A.1.1 Nước muối sinh lý

- Thành phần :

Natriclorua	:	8,5g;
Nước cất	:	đủ 1000ml.

- Cách pha chế : Hoà tan muối trong nước cất, thanh trùng bằng nồi hấp ở $121 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 phút.

A.1.2 Nước pepton

- Thành phần :

Pepton	:	10g;
Natriclorua	:	8,5g;
Nước cất	:	đủ 1000ml.

- Cách pha chế :

Hoà tan các thành phần trên trong nước cất. điều chỉnh pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C chứa trong ống nghiệm hoặc bình có dung tích phù hợp tiệt trùng bằng nồi hấp ở $121 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 phút. nếu chưa dùng cần bảo quản trong tối ở $0 - 5^\circ\text{C}$ không quá một tháng.

A.1.3 Dung dịch đệm pepton

- Thành phần :

Pepton	:	10g;
Natriclorua	:	5g;
Dinatri hydrophotphat (Na_2HPO_4)	:	9g;
Kali dihydrophotphat (KH_2PO_4)	:	1,5g;
Nước cất	:	đủ 1000ml.

- Cách pha chế : Đun để hoà tan các thành phần trên, chỉnh pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C . Rót vào các bình hoặc ống nghiệm với dung tích phù hợp. thanh trùng ở $121 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 phút. Nếu chưa dùng, cần bảo quản trong tối ở $0 - 5^\circ\text{C}$ không quá một tháng.

A.2 Môi trường thạch trypton glucoza

- Thành phần :

Trypton	:	5g;
Cao men	:	2,5g;

D-Glucoza khan	:	1,0g;
Agar	:	12 - 18g;
Nước cất	:	đủ 1000ml.

- Cách pha chế: Đun nóng để hoà tan thành phần trên, chỉnh pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C . Rót vào các bình dung tích phù hợp với một lượng môi trường không quá $1/2$ dung tích bình, tiệt khuẩn trong nồi hấp ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút để nguội trong nồi cách thuỷ tới $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Nếu chưa dùng, bảo quản môi trường trong tối, ở $0 - 5^{\circ}\text{C}$ không quá một tháng. Trước khi dùng đun cách thuỷ cho chảy môi trường và để nguội trong nồi cách thuỷ tới $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A.3 Thạch màng

- Thành phần:

Thạch	:	12 - 18g;
Nước cất	:	đủ 1000ml.

- Cách pha chế: như mục 2.

A.4 Môi trường thạch VRBL (Crystal Violet neutral Red Bile lactose)

- Thành phần:

Pepton	:	7g
Cao men	:	3g
Lactoza	:	10g
Natriclorua	:	5g
Muối mật	:	15g
Đỏ trung tính	:	0,03g
Tím tinh thể	:	0,002g
Thạch	:	15g
Nước cất	:	đủ 1000ml.

- Pha chế:

Hoà tan thành phần trên trong nước cất, đun nhỏ lửa tới sôi, thỉnh thoảng khuấy đều. Để sôi trong 2 phút, không để sôi quá lâu hoặc đun nhiều lần. Làm nguội trong nồi cách thuỷ tới $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ điều chỉnh pH là $7,4 \pm 0,1$ ở 25°C . Không được thanh trùng trong nồi hấp, cần kiểm tra độ vô trùng của môi trường khi dùng. Nên sử dụng môi trường trong vòng 3h kể từ khi pha chế xong.

A.5 Môi trường BGBL 2% (Brilliant Green Bile lactose 2%)

- Thành phần:

Pepton	:	10g
Lactosa	:	10g
Mật bò	:	20g

Dung dịch 0,1% Brilliant Green	:	13,3 ml
Nước cất, đủ	:	1000ml.

- Pha chế : Hoà tan pepton và lactosa trong 500ml nước cất. Hoà 20g mật bò trong 200ml nước cất, trộn hai dung dịch, thêm nước cất tới 975ml. Chính pH $7,4 \pm 0,1$ ở 25°C . Cho thêm 13.3ml dung dịch Brilliant Green 0,1% trong nước cất. Thêm nước cất cho đủ 100ml. Rót vào các ống nghiệm cỡ 16mm có chuông Durham, hấp thanh trùng ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

A.6 Canh Lauryl sulfate tryptose

- Thành phần:

Tryptosa	:	10g
Lactosa	:	5g
Dikaly hydrophotphat	:	2,75g
Natriclorua	:	5g
Natri lauryl sunfat	:	0,1g
Nước cất, đủ	:	1000ml.

- Cách pha : Đun để hoà tan thành phần trên trong nước cất, rót vào các ống nghiệm có dung tích phù hợp, hấp thanh trùng ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút. Chính pH là $6,8 \pm 0,1$ ở 25°C .

A.7 Môi trường thạch EMB (Eosine Methylen Blue agar)

- Thành phần :

Pepton	:	10g
Lactosa	:	10g
Dikalihydrophotphat	:	2g
Eosinf	:	0,4g
Methylen xanh	:	0,065g
Thạch	:	15g
Nước cất, đủ	:	1000ml.

- Cách pha : Đun để hoà tan thành phần trên trong nước cất, hấp thanh trùng ở 121°C trong 15 phút. Điều chỉnh pH là $7,2 \pm 0,1$ ở 25°C .

A.8 Môi trường thạch Endo

- Thành phần:

Pepton	:	10 g
Lactosa	:	10 g
Cao thịt	:	10 g

Natriclorua	:	5 g
Fushsine basic	:	0.04 g
Natrisunfit (Na_2SO_3)	:	2.5 g
Aga	:	15 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

- Cách pha : Đun để hoà tan thành phần trên trong nước cất, hấp thanh trùng ở $121 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 phút, điều chỉnh pH là $7,4 \pm 0,1$ ở 25°C .

A.9 Môi trường MRVP (Metyl Red Voges Prokauer)

- Thành phần :

Pepton	:	5 g
Dikali hydrofotfat	:	5 g
Dextrosa hoặc glucosa	:	5 g
Nước cất đủ	:	1000 ml

- Cách pha : Đun để hoà tan thành phần trên trong nước cất, rót vào các ống nghiệm có dung tích phù hợp, hấp thanh trùng ở $121 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 phút. Điều chỉnh pH là $7,5 \pm 0,1$ ở 25°C .

A.10 Môi trường thạch Simons Citrate

- Thành phần :

Amonidihydro photphat	:	1 g
Dikali hydro photphat	:	1 g
Natriclorua	:	5 g
Natricitrat	:	2 g
Magie sunfat	:	0.2 g
Bromothymol xanh	:	0.08g
Aga	:	12,5 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

- Cách pha : Đun để hoà tan thành phần trên trong nước cất, hấp thanh trùng ở $121 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 phút. Điều chỉnh pH là $6,6 \pm 0,1$ ở 25°C .

A.11 Thuốc thử Kovac (để thử phản ứng indol)

Hoà 5 g P - Dimethylaminobenzaldehyt vào 75 ml Amyl alcohol, đun nhẹ ở $50 - 55^\circ\text{C}$ đến tan hết, để nguội và cho thêm 25 ml axit sunfuaric đậm đặc.

A.12 Thuốc nhuộm Gram

A.12.1 Dung dịch tím tinh thể

Hoà tan 2g tím tinh thể trong 20 ml cồn 95% và 0,8 g amoni axalat trong 80 ml nước cất. Trộn đều hai dung dịch, để lắng sau 24 h và lọc bằng giấy lọc thô.

A.12.2 Dung dịch iot

Hoà tan 1 g tinh thể iot và 2 g Kaliiodua trong 300 ml nước cất ss. Nếu có cặn, lọc bằng giấy lọc thô.

A.12.3 Dung dịch safranin O

Hoà tan 0,5 g safranin O trong 100 ml nước cất, lọc bằng giấy lọc thô.

A.13 Môi trường thạch Tellurit - Glyrin

- Thành phần :

Môi trường gốc	:	90 ml (a)
Dung dịch Kalitelurit	:	1 ml (b)
Dung dịch natri pyryvat	:	5 ml (c)
Huyền phù lòng đỏ trứng	:	5 ml (d)
Sunfamezatin, dung dịch 0,2%	:	27,5 ml
(Bổ xung sunfamezatin khi nghi có mặt proteus).		

Các thành phần trên được chuẩn bị như sau :

a) Môi trường gốc :

Trypton	:	10 g
Nước chiết men	:	1 g
Cao thịt	:	5 g
Glykin	:	12 g
Aga	:	15 - 20 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

Dun sôi để hoà tan thành phần trên trong nước cất, điều chỉnh pH ở $7,2 \pm 0,1$ ở 25°C . Chứa từng lượng 90 ml trong các bình có dung tích phù hợp. Hấp thanh trùng ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

b) Dung dịch Kalitelurit

Kalitelurit	:	1 g
Nước cất, đủ	:	100 ml

Dun nóng vừa phải để hòa tan Kalitelurit trong nước cất, thanh trùng bằng phương pháp lọc.

c) Dung dịch natri pyruvat

Natri pyruvat	:	20 g
Nước cất, đủ	:	100 ml

Hoà tan natripyruvat trước trong một lượng nước, thêm nước tới đủ, thanh trùng bằng lọc.

d) Huyền phù lòng đỏ trứng (nồng độ khoảng 20%)

Dùng trứng gà tươi, tách lấy lòng đỏ trộn kỹ với nước theo tỉ lệ 1 trứng / 4 nước. Đun nóng ở nồi chưng cách thủy ở $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong 2h và sau đó để ở $0 - 5^{\circ}\text{C}$ trong 18 - 24h để để lắng cặn, gạn dần chất lỏng ở trên và lọc thanh trùng. Có thể bảo quản ở $0 - 5^{\circ}\text{C}$ không quá 72h.

e) Dung dịch sunfamezatin

Sunphamezatin	:	0,2 g
Natri hydroxit, dung dịch 0,1 M/l	:	10 ml
Nước cất, đủ	:	100 ml

Hoà tan sunphamezatin trong dung dịch natri hydroxit, thêm nước cất cho đủ 100 ml.

- Cách pha môi trường thạch telurit glyxin :

Đun sôi để hoà tan môi trường gốc, làm nguội tới 50°C trong nồi cách thủy, lần lượt cho thêm các dung dịch kalitelurit, natri pyruvat, huyền phù lòng đỏ trứng và sunfamezatin (nếu cần).

Cho vào mỗi đĩa petri 15 - 20 ml môi trường thạch telurit glyxin. Các đĩa có thể để ở $0 - 5^{\circ}\text{C}$ trong 24h trước khi làm khô.

Làm khô : mở nắp đĩa petri, lật úp đặt vào tủ sấy ở $50 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 30 phút.

A.14 Môi trường B.H.I

- Thành phần :

Pepton	:	10 g
Bột não bê khô	:	12,5 g
Bột tim bò khô	:	5 g
Glucoza	:	2 g
Natri clorua	:	5 g
Dinatri hydrophosphat	:	2,5 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

- Cách pha : Đun sôi để hoà toàn thành phần trên trong nước, chỉnh pH là $7,4 \pm 0,1$ ở 25°C . Cho từng lượng 10 ml vào ống nghiệm có dung tích phù hợp, hấp thanh trùng ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

A.15 Huyết tương thỏ

Dùng huyết tương khô có bán trên thị trường và hoàn nguyên lại theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thêm vào 0,1 dung dịch EDTA.

Nếu dùng huyết tương tươi có thể chuẩn bị như sau : Dùng xylín vô trùng lấy máu thỏ khi chúng đang đói cho vào các ống nghiệm đã chứa sẵn dung dịch natri citrat 10% theo tỉ lệ 3 natri citrat/100 máu. Trộn đều để chống đông, quay ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Gạn phần dịch trong ở phía trên vào các ống nghiệm cỡ 7mm mỗi ống 0,5ml. Khi dùng pha loãng theo tỷ lệ 1 huyết tương/3 nước cất vô trùng.

Trước khi dùng cần kiểm tra hiệu lực bằng các chủng *St.aureus* cho phản ứng đông vón dương tính mạnh, yếu và âm tính.

A.16 Selenite Broth

- Thành phần :

Natri hydroselenit	:	4 g
Pepton	:	5 g
Lactosa	:	4 g
Dinatri hydrophotphat	:	9,5 g
Natri dihydro photphat	:	9,5 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

Dun nóng nước cất tới 80°C hoà tan theo thứ tự liệt kê của thành phần trên, thanh trùng bằng hấp sôi cách thủy trong 15 phút. Chính pH là $7,1 \pm 0,1$ ở 25°C.

A.17 Môi trường Muller Kauffmann (Tetrathionate Brilliant Gram)

- Thành phần : + Nhóm a

Cao thịt	:	0,9 g
Pepton	:	4,5 g
Cao nấm men	:	1,8 g
Natriclorua	:	4,5 g
Canxicacbonat	:	25 g
Natri thiosunfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	:	40,7 g
Mật bò	:	4,75 g

+ Nhóm b

. Dung dịch iot :

Kaliiodua	:	5 g
Iod	:	4 g
Nước cất, đủ	:	20 ml

. Brilliant green, dung dịch 0,1% : 10 ml

- Cách pha : Hoà thành phần của nhóm a trong 950 ml nước cất, thanh trùng bằng đun sôi nhanh.

Trước khi dùng, thêm nhóm b theo tỉ lệ :

20 ml dung dịch iot và Kaliiodua

10 ml Brilliant green.

Chuẩn bị dung dịch iot và Kaliiodua như sau : Hoà 5 g Kaliiodua vào 5 ml nước cất, thêm 4 g iot, đun nhẹ cho tan, thêm nước cất vô trùng cho đủ 20 ml. Dung dịch được bảo quản trong chai màu nâu.

Chuẩn bị dung dịch brilliant green như sau : Cho 0,1 g brilliant green vào 100 ml nước cất lắc dung dịch khi đang nguội dần để chất màu tan hết. Dung dịch được bảo quản trong chai màu nâu ở nơi tối.

A.18 Môi trường thạch SS (Salmonella - shigella Agar)

- Thành phần :

Cao thịt	:	5 g
Pepton	:	5 g
Lactosa	:	10 g
Mật bò	:	8,5 g
Natri Citrat	:	8,5 g
Natrithiosunphat	:	8,5 g
Sắt citrat	:	1,0 g
Brilliant green, dung dịch 0,1%	:	0,33 ml
Đỏ trung tính, dung dịch 1%	:	2,5 ml
Agar	:	13,5 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

- Cách pha : Đun sôi để hoà tan hoàn toàn thành phần trên trong nước cất, để nguội tới $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thuỷ, rót vào mỗi đĩa petri 15 - 20 ml môi trường. Không hấp thanh trùng môi trường. Chính pH là $7,0 \pm 0,1$ ở 25°C .

A.19 Môi trường thạch Mac Conkey

- Thành phần :

Pepton	:	20 g
Lactosa	:	10 g
Natriclorua	:	5 g
Mật bò	:	1,5 g
Tim tinh thể, dung dịch 0,1%	:	1 ml
Đỏ trung tính, dung dịch 1%	:	3 ml
Agar	:	13,5 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

- Cách pha : Đun sôi để hoà tan các thành phần trên trong nước cất, chỉnh pH là $7,2 \pm 0,2$ ở 25°C . Hấp thanh trùng ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

A.20 Môi trường thạch Bismuth sulfite

- Thành phần :

Cao thịt	:	5 g
Pepton	:	10 g
Glucosa	:	5 g
Dinatri hydro photphat	:	4 g
Sắt sunfat ngậm 7 phân tử nước ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	:	0,3 g
Chỉ thị Bismuth sulfit	:	8 g
Brilliant Green, dung dịch 0,5%	:	5 ml
Agar	:	20 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

- Cách pha : Đun sôi để hòa tan thành phần trên trong nước cất, để nguội tới $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thủy, điều chỉnh pH là $7,5 \pm 0,1$ ở 25°C . Rót khoảng 15 - 20ml môi trường vào mỗi đĩa petri, không hấp thanh trùng.

A.21 Môi trường thạch KIA (Kligler's Iron Agar)

- Thành phần :

Cao thịt	:	3 g
Cao nấm men	:	3 g
Pepton	:	15 g
Proteose pepton	:	5 g
Natriclorua	:	5 g
Lactosa	:	10 g
Glucosa	:	1 g
Sắt sunfat	:	0,2 g
Natri thiosunfat	:	0,3 g
Đỏ trung tính, dung dịch 0,5%	:	6 ml
Agar	:	12 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

- Cách pha : Đun sôi để hoà tan hoàn toàn thành phần trên trong nước cất, để nguội đến $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thủy, điều chỉnh pH là $7,4 \pm 0,1$ ở 25°C . Rót vào các ống nghiệm 16mm để làm thạch nghiêng sao cho khi môi trường đông lại thể tích phần đáy gấp đôi phần nghiêng.

A.22 Môi trường thạch TSI (Triple Sugar Iron Agar)

- Thành phần:

Cao thịt	:	4 g
Pepton	:	4 g
Dextrosa	:	1 g
Lactosa	:	10 g
Sacarosa	:	10 g
Natriclorua	:	5 g
Natrithiosunfat	:	0,08 g
Natrisunfit	:	0,4 g
Sắt sunfat	:	0,2 g
Đỏ trung tính, dung dịch 1%	:	2,5 ml
Aga	:	15 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

- Cách pha : Đun sôi để hoà tan thành phần trên trong nước cất, để nguội tới $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, chỉnh pH là $7,3 \pm 0,1$ ở 25°C . Hấp thanh trùng ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút. Rót vào ống nghiệm để làm môi trường nghiêng như KIA.

A.23 Môi trường MIU (Motility Indol Urea Medium)

- Thành phần :

Trypton	:	30 g
Kali dihydrophotphat	:	1 g
Natriclorua	:	5 g
Đỏ phenol, dung dịch 0,25%	:	2 ml
Aga	:	4 g
Nước cất, đủ	:	1000 ml

- Cách pha : Đun sôi để hoà tan thành phần trên trong nước cất, lọc qua giấy lọc và hấp thanh trùng ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút điều chỉnh pH là $6,8 \pm 0,1$ ở 25°C .

Để nguội tới $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thuỷ. Cho thêm vào môi trường nóng chảy một lượng dung dịch Ure 20% theo tỉ lệ 1 ure/9 môi trường. Rót vào ống nghiệm có dung tích phù hợp từng lượng 5ml và để thẳng đứng.

Dung dịch Ure được pha bằng nước cất và khử trùng bằng lọc khuẩn.