

TCVN 7924-3:2008
ISO/TS 16649-3:2005

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 3: KỸ THUẬT TÍNH SỐ CÓ XÁC SUẤT LỚN NHẤT 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 3: Most probable number technique
using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide*

Lời nói đầu

TCVN 7924-3:2008 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 16649-3:2005;

TCVN 7924-3:2008 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

Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn chung để kiểm tra các sản phẩm không được thoả thuận bằng các tiêu chuẩn cụ thể và các phương pháp phân tích vi sinh trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. 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. Trong trường hợp có sẵn tiêu chuẩn quốc tế cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. 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 3: Kỹ thuật tính số có xác suất lớn nhất 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 3: Most probable number technique 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 bằng kỹ thuật cấy trong môi trường lỏng và tính số có xác suất lớn nhất (MPN) sau khi được ủ ở 37 °C rồi ủ tiếp ở 44 °C.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi, và
- các mẫu môi trường trong khu vực chế biến thực phẩm và vận chuyển thực phẩm.

Phương pháp này thích hợp để định lượng các tế bào *Escherichia coli* mà có thể đã trải giai đoạn làm mất nước, đông lạnh, tiếp xúc với môi trường mặn (như nước biển) hoặc bị hư hại do các chất tẩy rửa như các sản phẩm chứa clo.

Sự hạn chế áp dụng của phương pháp này là do tính nhạy của phương pháp với độ dao động lớn. Phương pháp này được áp dụng và các kết quả được diễn giải theo thông tin nêu trong điều 11.

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 và một số chủng *E.coli* gây bệnh khác bằng phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này 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 6263 (ISO 8261), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật.

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.

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 6507-2 (ISO 6887-2), 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 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thịt và sản phẩm thịt.

TCVN 6507-3 (ISO 6887-3), 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 3: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thủy sản và sản phẩm thủy sản.

TCVN 6507-4 (ISO 6887-4), 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 4: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các sản phẩm khác với sữa và sản phẩm sữa, thịt và sản phẩm thịt, thủy sản và sản phẩm thủy sản.

ISO/TS 11133-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và tạo môi trường cấy – Phần 1: Các hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng cho việc chuẩn bị môi trường cấy trong phòng thử nghiệm).

ISO/TS 11133-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và tạo môi trường cấy – Phần 2: Các hướng dẫn thực hành về thử tính năng của môi trường cấy).

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 hoặc màu xanh da trời điển hình trên môi trường trypton-mật-glucuronid 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 có xác suất lớn nhất của *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza được tính trên millilit 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 xác định của mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu dạng lỏng, hoặc với một lượng xác định của huyền phù ban đầu trong trường hợp sản phẩm dạng khác vào ba ống nghiệm¹⁾ chứa môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc nồng độ kép.

4.2 Cấy một lượng xác định của mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu dạng lỏng, hoặc với một lượng xác định của huyền phù ban đầu trong trường hợp sản phẩm dạng khác vào ba ống nghiệm¹⁾ chứa môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc nồng độ đơn.

Sau đó, cấy các lượng xác định của các dung dịch mẫu thử pha loãng thập phân hoặc huyền phù ban đầu vào môi trường tăng sinh lỏng nồng độ đơn trong cùng điều kiện trên.

4.3 Nuôi ấm các ống nghiệm chứa môi trường nồng độ kép và nồng độ đơn ở 37 °C trong 24 h. Kiểm tra các ống này về sự sinh axit và cho thấy lên men lactoza.

4.4 Từ mỗi ống đựng môi trường tăng sinh chọn lọc cho thấy có tạo thành axit sẽ được cấy truyền vào môi trường thạch trypton-mật-glucuronid.

4.5 Thạch trypton-mật-glucuronid được ủ ở 44 °C trong khoảng từ 20 h đến 24 h. Xác định trên môi trường thạch trypton-mật-glucuronid sự có mặt các khuẩn lạc màu xanh hoặc màu xanh da trời, chúng tỏ có mặt *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza.

4.6 Số có xác suất lớn nhất *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] được xác định theo số ống đựng môi trường tăng sinh chọn lọc được cấy truyền có sinh các khuẩn lạc màu xanh hoặc màu xanh da trời trên thạch mật glucuronid.

¹⁾ Có thể dùng năm ống, xem 9.2.1.

TCVN 7924-3:2008

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 các phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc TCVN 6263 (ISO 8261).

5.2 Môi trường cấy

5.2.1 Môi trường glutamat khoáng cải biến (môi trường tăng sinh chọn lọc)

5.2.1.1 Thành phần

	a) Môi trường nồng độ kép	b) Môi trường nồng độ đơn
Natri glutamat	12,7 g	6,35 g
Lactoza	20,0 g	10,0 g
Natri focmat	0,5 g	0,25 g
L-xystin	0,04 g	0,02 g
L(-)-axit aspactic	0,048 g	0,024 g
L(+)-arginin	0,04 g	0,02 g
Thiamin	0,002 g	0,001 g
Axit nicotinic	0,002 g	0,001 g
Axit pantothenic	0,002 g	0,001 g
Magie sunfat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2 g	0,1 g
Sắt (III) amoni xytrat	0,02 g	0,01 g
Canxi clorua ngậm hai phân tử nước ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,02 g	0,01 g
Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	1,8 g	0,9 g
Bromocresol tía	0,02 g	0,01 g
Amoni clorua	5,0 g	2,5 g
Nước	1 000 ml	1 000 ml

5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan amoni clorua trong nước. Bổ sung các thành phần, hoặc môi trường hoàn chỉnh khô còn lại, đun nóng nếu cần.

Để tăng thời gian bảo quản của môi trường khô, có thể thêm natri glutamat một cách riêng rẽ.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng pH phải là $6,7 \pm 0,1$ ở $25^\circ C$.

Phân phối môi trường này theo từng lượng 10 ml vào các ống nghiệm có kích thước 16 mm x 160 mm (6.6) trong trường hợp môi trường nồng độ đơn và phân phối vào các ống nghiệm có kích thước 18 mm x 180 mm hoặc 20 mm x 200 mm (6.6) trong trường hợp môi trường nồng độ kép.

Khử trùng 10 min ở nhiệt độ 116 °C trong nồi hấp áp lực (6.1). Cách khác có thể đun nóng ở 100 °C trong 30 min trong ba ngày liên tiếp.

5.2.2 Thạch trypton-mật-glucuronid (môi trường chọn lọc thứ hai)

5.2.2.1 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 μmol ^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 cyclohexylamoni.

^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 Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan BCIG trong dimetyl sulfoxit. 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 (6.1).

5.2.2.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót các lượng từ 12 ml đến 15 ml môi trường tan chảy vào các đĩa Petri vô trùng (6.9) và để cho đông đặc.

Làm khô các đĩa thạch (6.3) [xem TCVN 6404 (ISO 7218)]. Các đĩa này có thể bảo quản được đến 5 ngày ở 5 °C ± 3 °C.

Các đĩa thạch cần phải đủ khô để hơi nước không xuất hiện trong 15 min khi dàn dịch cấy.

5.2.3 Kiểm tra hiệu quả của việc đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

Về định nghĩa tính chọn lọc và hiệu năng, xem ISO/TS 11133-1 và ISO/TS 11133-2. Đối với các phép thử hiệu quả môi trường glutamate khoáng cải biến và thạch trypton mật glucuronid, xem Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1 – Kiểm tra hiệu năng của môi trường glutamat khoáng cải biến

Chức năng	Ủ	Chủng kiểm chứng	Phương pháp kiểm chứng	Tiêu chí	Phản ứng đặc trưng
Khả năng phát triển	37°C/24 h	<i>E.coli</i> ATCC 25922 hoặc 8739	Bán định lượng	Sinh axit	Chuyển sang màu vàng
Tính chọn lọc	37°C/24 h	<i>E.faecalis</i> ATCC 29212 hoặc 19433	Định lượng	Không phát triển	–

Bảng 2 – Kiểm tra hiệu năng của môi trường thạch trypton mật glucuronid

Chức năng	Ủ	Chủng kiểm chứng	Phương pháp kiểm chứng	Tiêu chí	Phản ứng đặc trưng
Khả năng phát triển	44 °C/20 h đến 24 h	<i>E.coli</i> ATCC 25922 hoặc 8739	Định lượng	Phát triển tốt (2)	Các khuẩn lạc có màu xanh đến xanh da trời
		<i>E.coli</i> NCTC 13216 (dương tính yếu β -glucuronidaza)	Định lượng	Phát triển tốt (2)	Các khuẩn lạc có màu xanh đến xanh da trời
Tính chọn lọc	37°C/24 h	<i>E.faecalis</i> ATCC 29212 hoặc 19433	Định lượng	Không phát triển	–

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần để thay thế cho dụng cụ sử dụng nhiều lần nếu có các yêu cầu tương tự.

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

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

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ và $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3 Tủ sấy hoặc buồng sấy thông gió, có thể duy trì nhiệt độ từ $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, hoặc tủ thổi không khí.

6.4 Tủ lạnh (dùng để bảo quản môi trường đã chuẩn bị), có thể duy trì nhiệt độ ở $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.5 Máy đo pH, có độ phân giải 0,01 đơn vị pH, có độ chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25 °C.

Máy đo pH có thể được gắn với hệ thống cân bằng nhiệt tự động hoặc bằng tay.

6.6 Ống nghiệm, có kích thước khoảng 16 mm x 160 mm và 18 mm x 180 mm hoặc 20 mm x 200 mm.

6.7 Pipet xả hết, có dung tích danh định 1 ml và 10 ml, được chia vạch 0,1 ml.

6.8 Vòng lấy mẫu, bằng platin/iridi hoặc niken/crom, đường kính khoảng 3 mm, hoặc các vòng lấy mẫu vô trùng sử dụng một lần dung tích 10 μ l.

6.9 Đĩa Petri, đường kính khoảng 90 mm.

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

Xem các phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần xác định.

Pha đủ số lượng các độ pha loãng để đảm bảo rằng tất cả các ống nghiệm ứng với độ pha loãng cuối cùng cho kết quả âm tính.

9.2 Cây môi trường tăng sinh chọn lọc

9.2.1 Về nguyên tắc chung, theo quy trình cần ba ống cho mỗi độ pha loãng. Đối với động vật nhuỷên thể có vỏ tươi sống hoặc các sản phẩm đặc biệt khác và/hoặc khi yêu cầu độ chính xác cao hơn của kết quả thì cần cấy năm ống cho mỗi độ pha loãng.

TCVN 7924-3:2008

9.2.2 Lấy ba ống nghiệm đựng môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ kép [5.2.1.1 a)]. Dùng pipet vô trùng (6.7) cho vào mỗi ống 10 ml mẫu thử ở dạng lỏng, hoặc 10 ml huyền phù ban đầu trong trường hợp mẫu thử ở dạng khác.

9.2.3 Lấy ba ống nghiệm đựng môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ đơn [5.2.1.1 b)]. Dùng một pipet vô trùng mới (6.7) cho vào mỗi ống 1 ml mẫu thử ở dạng lỏng, hoặc 1 ml huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng đầu tiên) khi mẫu thử ở dạng khác.

9.2.4 Đối với mỗi một dung dịch pha loãng tiếp theo (10^{-1} hoặc 10^{-2} tùy theo mẫu thử), thì tiến hành theo 9.2.3. Sử dụng một pipet vô trùng mới cho mỗi độ pha loãng. Trộn kỹ dịch cấy với môi trường.

9.3 Nuôi ấm

Ủ các ống nghiệm chứa môi trường chọn lọc nồng độ kép đã cấy trong 9.2.2 và các ống chứa môi trường chọn lọc nồng độ đơn đã cấy trong 9.2.3 đến 9.2.4 trong tủ ấm (6.2) ở 37°C trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

9.4 Cấy truyền

Từ mỗi ống đã ủ theo 9.3 cho thấy có axit, có màu vàng, thì cấy truyền một vòng cấy (6.8) vào đĩa thạch trypton mật glucuronid (5.2.2) và ria cấy để thu được các khuẩn lạc tách biệt rõ.

9.5 Ủ lần hai

Ủ các đĩa đã cấy theo 9.4 từ 20 h đến 24 h trong tủ ấm (6.2) ở 44°C . Không chồng cao quá ba đĩa.

9.6 Kiểm tra các đĩa

Sau thời gian ủ quy định (9.5), kiểm tra các đĩa về sự có mặt các khuẩn lạc có màu tối hoặc màu xanh nhạt hoặc màu xanh da trời, điều này chứng tỏ rằng có mặt *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza.

9.7 Diễn giải kết quả

Các ống chứa môi trường tăng sinh nồng độ đơn hoặc nồng độ kép được ủ theo 9.3, sau khi cấy truyền (9.4) và ủ lần hai (9.5) cho thấy có các khuẩn lạc màu xanh hoặc màu xanh da trời trên môi trường thạch chọn lọc được coi là ống dương tính.

Đếm số ống dương tính đối với mỗi độ pha loãng.

10 Biểu thị kết quả

Tính số có xác suất lớn nhất từ số ống dương tính với mỗi độ pha loãng.

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

11 Độ chụm

Thực nghiệm cho thấy rằng khi sử dụng kỹ thuật MPN kết quả có thể xảy ra sai số lớn khi sử dụng dây ba ống cho mỗi độ pha loãng. Do đó, phải thận trọng khi sử dụng các kết quả thu được bằng phương pháp này. Khi sử dụng dây năm ống thì cần ghi nhận rằng độ chụm thu được có thể so sánh được với kết quả thu được bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc. Các giới hạn tin cậy được đưa ra trong TCVN 6404 (ISO 7218).

VÍ DỤ Đối với mẫu dạng rắn, thì trong 95 % các trường hợp, các giới hạn tin cậy dao động từ 13 đến 200 *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên gam đối với MPN $7,4 \times 10^1$ *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên gam, và từ 4 đến 99 *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên gam đối với MPN $2,4 \times 10^1$ *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên gam.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết về 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;
- e) kết quả thử nghiệm thu được, hoặc 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, 1,988, p. 402
- [2] DAMARE J.M., CAMPBELL D.F. and JOHNSON R.W.. Simplified direct plating method for enhanced recovery of *Escherichia coli* in food. *J Food Sci.*, 50, 1985, pp. 1736-1737,1746
- [3] DELISLE 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] DONOVAN T.J., GALLACHER S., ANDREWS N.J., GREENWOOD M.H., GRAHAM J., RUSSELL J.E., ROBERTS D. and LEE R. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. *Comm Dis & Public Health*, 1, 1998, pp. 188-196
- [5] KILIAN M. and BULOW P. Rapid identification of Enterobacteriaceae. Use of a β -glucuronidase detecting agar (PGUA) for the identification of *Escherichia coli* in primary cultures of urine samples. *Acta Pathol Microbiol Scand., Sect B*, 87, 1979, pp. 271-276
- [6] KILIAN M. and BULOW P. Rapid identification of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. *Acta pathol Microbiol Scand., Sect. B*, 84, 1976, pp. 245-251
- [7] 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 samples. *Canadian J Microbiol.*, 34, 1988, pp. 690-693
- [8] MANAFI M. and KNEIFEL W. A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total conforms and *E.coli* in water. *Zentralbl. Hyg.*, 189, 1989, pp. 225-234
- [9] OGDEN 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
- [10] 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* in 24 hours from ground beef. *J.Food Protection*, 53 (6) 1990, pp. 508-510
- [11] WATKINS W.D., RIPPEYS C, CLAVET C.R., KELLY-REITZ D.J. and BURKHART W. Novel compound for identifying *Escherichia coli*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 54, 1988, pp. 1874-1875