

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 7905-2:2008
ISO/TS 21872-2:2007**

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN
CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN *VIBRIO* SPP.
CÓ KHẢ NĂNG GÂY BỆNH ĐƯỜNG RUỘT –
PHẦN 2: PHÁT HIỆN CÁC LOÀI KHÔNG PHẢI LÀ
VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS VÀ *VIBRIO CHOLERAЕ***

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method
for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp. –*

Part 2: Detection of species other than Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae

HÀ NỘI - 2008

Lời nói đầu

TCVN 7905-2:2008 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 21872-2:2007;

TCVN 7905-2:2008 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 7905:2008 (ISO/TS 21872:2007) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Vibrio spp. có khả năng gây bệnh đường ruột, gồm có các phần sau:*

- TCVN 7905-1:2008 *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Vibrio spp. có khả năng gây bệnh đường ruột – Phần 1: Phát hiện Vibrio parahaemolyticus và Vibrio cholerae;*
- TCVN 7905-2:2008 *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện Vibrio spp. có khả năng gây bệnh đường ruột – Phần 2: Phát hiện các loài không phải là Vibrio parahaemolyticus và Vibrio cholerae.*

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. Trong trường hợp có sẵn tiêu chuẩn cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Thông thường khi các tiêu chuẩn đó 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 vì các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện *Vibrio* spp. có khả năng gây bệnh đường ruột –

Phần 2: Phát hiện các loài không phải là *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio cholerae*

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp. –

Part 2: Detection of species other than Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae

CẢNH BÁO – Để đảm bảo an toàn cho nhân viên phòng thử nghiệm, cần chú ý rằng các phép thử phát hiện *Vibrio* spp. và đặc biệt là *Vibrio cholerae* có độc tố chỉ được thực hiện trong các phòng thử nghiệm được trang bị cho mục đích này và phải dưới sự kiểm soát của các nhà vi sinh vật học có kinh nghiệm và hết sức thận trọng khi thải tất cả các vật liệu đã nhiễm bẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phát hiện các loài *Vibrio* gây bệnh đường ruột không phải là *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio cholerae*. Các loài có thể phát hiện được bằng các phương pháp quy định bao gồm *Vibrio fluvialis*, *Vibrio mimicus* và *Vibrio vulnificus*¹⁾. Phương pháp này không thích hợp cho việc phân lập *Vibrio hollisae*. Các chủng *V. parahaemolyticus* và *V. cholerae* cũng có thể phát hiện được trong quá trình áp dụng phương pháp này.

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 và vận chuyển thực phẩm.

Phương pháp này không thích hợp cho việc phát hiện *Vibrio metschnikovii* vì cho phản ứng âm tính oxidaza.

¹⁾ Xem 9.4.4.

TCVN 7905-2:2008

CHÚ THÍCH 1 *Vibrio metschnikovii* đôi khi được phân lập từ các mẫu phân người và có thể gây bệnh tiêu chảy.

CHÚ THÍCH 2 Việc nhận dạng các loài *Vibrio* không phải là *V. parahaemolyticus* và *V. cholerae* là rất khó, nên cần phải nghiên cứu tiếp. Các phép thử sinh hoá nêu trong tiêu chuẩn này chỉ có thể khẳng định giả định các loài này.

CHÚ THÍCH 3 Các lý do không áp dụng phương pháp này được nêu trong lời giới thiệu.

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 các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh.

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 (ISO 6887) (tất cả các phần), 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.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Vibrio có khả năng gây bệnh đường ruột (potentially enteropathogenic Vibrio)

Vi sinh vật tạo thành các khuẩn lạc điển hình trên môi trường đặc chọn lọc và cho thấy rõ các đặc tính sinh hoá như đã mô tả, khi tiến hành thử theo tiêu chuẩn này.

3.2

Phát hiện *Vibrio* có khả năng gây bệnh đường ruột (Detection of potentially enteropathogenic Vibrio)

Xác định sự có mặt hay không có mặt của *Vibrio* trong một lượng sản phẩm xác định, khi tiến hành thử theo tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Yêu cầu chung

Việc phát hiện *Vibrio* spp. có khả năng gây bệnh đường ruột cần đến bốn giai đoạn liên tiếp (Xem Phụ lục A).

CHÚ THÍCH 1 *Vibrio* thực tế có thể có mặt với một lượng nhỏ và thường đi kèm với một lượng lớn đáng kể các loài vi sinh vật khác thuộc họ Vibrionaceae hoặc thuộc các họ khác. Do đó, cần phải có hai bước tăng sinh chọn lọc liên tiếp để phát hiện các vi sinh vật đích này.

4.2 Tăng sinh lần đầu trong môi trường lỏng chọn lọc

Cấy phần mẫu thử vào môi trường tăng sinh (nước pepton muối kiềm, ASPW) (5.1) ở nhiệt độ môi trường. Ủ ở 37 °C trong 6 h ± 1 h.

Đối với các lượng lớn, thì làm ấm môi trường ASPW đến 37 °C trước khi cấy phần mẫu thử.

4.3 Tăng sinh lần thứ hai trong môi trường lỏng chọn lọc

Cấy dịch cấy thu được trong 4.2 vào môi trường tăng sinh (ASPW).

Sau đó ủ ở 37 °C trong 18 h ± 1 h.

4.4 Phân lập và nhận dạng

Cấy dịch cấy thu được trong 4.2 và 4.3 vào hai môi trường đặc chọn lọc sau đây:

- thạch sacaroza, mật, xitrat và thiosulfat (TCBS);
- môi trường đặc chọn lọc thích hợp khác (do phòng thử nghiệm chọn), như môi trường thạch β -xellobioza polymixin colistin (CPC), thạch natri dodexyl sulfat B polymixin sacaroza (SDS) hoặc thạch colistin polymixin xellobioza cải biến (mCPC).

Ủ hai môi trường phân lập này ở 37 °C và kiểm tra sau 24 h ± 3 h.

4.5 Kháng định

Các khuẩn lạc *Vibrio* spp. đặc trưng gây bệnh đường ruột đã phân lập trong 4.4 được cấy truyền rồi kháng định bằng các thử nghiệm sinh hoá thích hợp.

5 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Về thực hành trong phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

CHÚ THÍCH Do trong tiêu chuẩn sử dụng một lượng lớn môi trường nuôi cấy và thuốc thử, để cho nội dung tiêu chuẩn được gọn nên thành phần và cách chuẩn bị môi trường nuôi cấy và thuốc thử được đưa riêng vào trong Phụ lục B.

TCVN 7905-2:2008

5.1 Môi trường tăng sinh: Dung dịch pepton muối kiềm (ASPW)

Xem B.1.

5.2 Môi trường phân lập đặc chọn lọc

5.2.1 Môi trường thứ nhất: Thạch sacaroza, mật, xitrat và thiosulfat (TCBS)

Xem B.2.

5.2.2 Môi trường thứ hai

Chọn một trong các loại môi trường sau đây:

- a) thạch natri dodexyl sulfat B polymixin sacaroza (SDS), xem B.3.
- b) thạch xellobioza polymixin colistin (CPC), xem B.4.
- c) thạch colistin polymixin xellobioza cải biến (mCPC), xem B.5.

5.3 Thạch muối dinh dưỡng (SNA)

Xem B.6.

5.4 Thuốc thử để phát hiện oxidaza

Xem B.7.

5.5 Thạch, sắt, ba đường và muối (TSI)

Xem B.8.

5.6 Môi trường muối để phát hiện ornithin decarboxylaza (ODC)

Xem B.9.

5.7 Môi trường muối để phát hiện lyzin decarboxylaza (LDC)

Xem B.10.

5.8 Môi trường muối để phát hiện arginin dihydrolaza (ADH)

Xem B.11.

5.9 Thuốc thử để phát hiện β -galactoxidaza

Xem B.12.

5.10 Môi trường muối để phát hiện indol

Xem B.13.

5.11 Dung dịch pepton muối

Xem B.14.

5.12 Dung dịch natri clorua

Xem B.15.

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

CHÚ THÍCH Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu đáp ứng được các yêu cầu tương tự.

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

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

6.2 Tủ ấm hoặc nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ từ $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $47\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nên sử dụng các nồi cách thủy (6.2, 6.3 và 6.4) có chứa chất kháng khuẩn.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi trong suốt 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 riêng về lấy mẫu sản phẩm có liên quan thì các bên tự thỏa thuận về vấn đề này.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) và/hoặc TCVN 6263 (ISO 8261) và tiêu chuẩn có liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn riêng đó thì các bên tự thỏa thuận về vấn đề này.

9 Cách tiến hành (xem Phụ lục A)

9.1 Phần mẫu thử và huyền phù ban đầu

Để chuẩn bị huyền phù ban đầu, sử dụng môi trường tăng sinh thứ nhất (ASPW) qui định trong 5.1.

Lấy một phần mẫu thử (x g hoặc x ml), tùy thuộc vào độ nhạy yêu cầu và đồng hoá trong $9x$ ml (hoặc $9x$ g) môi trường tăng sinh.

Trường hợp đối với các lượng mẫu thử lớn hơn, thì cần làm ấm môi trường ASPW đến $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ trước khi cấy mẫu thử.

Nếu các công đoạn pha loãng và ủ không thể thực hiện trong ngày thì bảo quản huyền phù ở $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến ngày hôm sau.

Để giảm bớt công đoạn kiểm tra, khi cần kiểm tra nhiều phần mẫu thử 25 g từ cùng một mẻ sản phẩm và khi có bằng chứng cho thấy hỗn hợp (của các phần mẫu thử) không làm thay đổi các kết quả liên quan đến sản phẩm cụ thể này, thì có thể trộn các phần mẫu thử.

Ví dụ Nếu có 10 phần mẫu thử 25 g cần kiểm tra, thì có thể gộp 10 phần đó để thu được mẫu tổng thể 250 g và bổ sung 2,25 l môi trường tăng sinh.

Số tế bào *Vibrio* spp. có khả năng gây bệnh đường ruột suy giảm đáng kể khi bảo quản ở nhiệt độ lạnh. Khi có thể, nên tránh bảo quản các mẫu, các dung dịch huyền phù ở nhiệt độ đó và cần giữ ở mức tối thiểu.

9.2 Tăng sinh chọn lọc lần thứ nhất

Ủ huyền phù ban đầu (9.1) ở $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $6\text{ h} \pm 1\text{ h}$.

Cần chú ý khi áp dụng toàn bộ phương pháp cho các sản phẩm có hàm lượng muối cao, vì nồng độ muối cuối cùng trong môi trường có thể làm thay đổi các đặc tính [xem TCVN 6507-4 (ISO 6887-4)].

9.3 Tăng sinh chọn lọc lần thứ hai

9.3.1 Chuyển 1 ml dịch cấy thu được trong 9.2 được lấy từ bề mặt cho vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường ASPW (5.1).

9.3.2 Ủ môi trường ASPW ở 37 °C trong 18 h ± 1 h.

9.4 Phân lập và nhận dạng

9.4.1 Dùng que cấy vòng lấy dịch cấy thu được trong ASPW (9.2 và 9.3.2), cấy lên bề mặt thạch TCBS (5.2.1), sao cho thu được các khuẩn lạc tách biệt tốt.

Tiến hành tương tự với môi trường phân lập chọn lọc thứ hai (5.2.2) sử dụng vòng lấy mẫu mới.

9.4.2 Lật ngược các đĩa thạch (9.4.1) và đặt vào tủ ấm (6.1) ở 37 °C.

9.4.3 Sau khi ủ 24 h ± 3 h, kiểm tra các đĩa (9.4.1 và 9.4.2) về sự có mặt các khuẩn lạc *Vibrio* spp. điển hình. Đánh dấu các vị trí này dưới đáy đĩa.

Có hai hình thái điển hình của các khuẩn lạc *Vibrio* spp. trên thạch TCSB (5.2.1) như sau:

- các khuẩn lạc điển hình của *V. mimicus* và *V. vulnificus* là trơn nhẵn, có màu xanh (âm tính sacaroza), đường kính từ 2 mm đến 3 mm;
- các khuẩn lạc điển hình của *V. fluvialis* là trơn nhẵn, có màu vàng (dương tính sacaroza), đường kính từ 2 mm đến 3 mm.

CHÚ THÍCH *V. parahaemolyticus* và *V. cholerae* trong TCVN -1:2008 (ISO/TS 21872-1) tạo ra các khuẩn lạc có màu vàng và xanh tương ứng trên thạch TCBS.

Có hai hình thái điển hình của các khuẩn lạc *Vibrio* spp. trên môi trường SDS [5.2.2 a)] như sau:

- các khuẩn lạc điển hình của *V. mimicus* và *V. vulnificus* có màu đỏ tía, đường kính lớn hơn hoặc bằng 2 mm và có quang mờ đục;
- các khuẩn lạc điển hình của *V. cholerae* O1 có màu vàng, đường kính lớn hơn hoặc bằng 2 mm và có quang mờ đục; các *V. cholerae* không phải chủng O1 có thể có hoặc không có quang mờ đục.

Các *Vibrio* spp. khác sẽ không phát triển trên thạch SDS hoặc tạo ra các khuẩn lạc không có quang.

Có hai hình thái điển hình của các khuẩn lạc *Vibrio* spp. trên môi trường CPC và mCPC [5.2.2 b) và c)] như sau:

- các khuẩn lạc điển hình của *V. vulnificus* có màu vàng, đường kính lớn hơn hoặc bằng 2 mm và được bao quanh bởi vùng màu vàng;
- các khuẩn lạc điển hình của *V. cholerae* có màu đỏ tía, đường kính lớn hơn hoặc bằng 2 mm và được bao quanh bởi vùng màu xanh.

TCVN 7905-2:2008

Một số các chủng *Vibrio* spp. khác có thể phát triển trên thạch CPC hoặc mCPC, tạo ra các khuẩn lạc giống như mô tả ở trên.

9.4.4 Để thu hồi *V. vulnificus* cần phải chú ý về hiệu năng của môi trường CPC hoặc mCPC.

9.5 Khẳng định

9.5.1 Yêu cầu chung

Có thể sử dụng các bộ kit thử nhận dạng sinh hoá có sẵn để nhận dạng *Vibrio* đến mức độ loài, với điều kiện là chúng được cấy với các huyền phù của vi khuẩn cần nhận dạng trong môi trường muối thích hợp hoặc dịch pha loãng và với điều kiện là bảng dữ liệu hoặc bảng nhận dạng đối với sản phẩm đã dựa trên các phản ứng thu được khi sử dụng môi trường tương tự như mô tả trong tiêu chuẩn này. Sử dụng các bộ kit thử này theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

CHÚ THÍCH Việc nhận biết các khuẩn lạc *Vibrio* đòi hỏi phải có nhiều kinh nghiệm và hình dạng bên ngoài của chúng đôi khi có thể không chỉ thay đổi từ loài này sang loài khác, mà còn có thể thay đổi từ mẻ môi trường cấy này đến mẻ môi trường khác.

9.5.2 Chọn lọc các khuẩn lạc để khẳng định và chuẩn bị dịch cấy tinh khiết

Để khẳng định, từ mỗi môi trường chọn lọc (xem 9.4), lấy ra ít nhất năm khuẩn lạc được coi là điển hình hoặc giống với từng *Vibrio* spp. có khả năng gây bệnh để cấy truyền. Nếu trên đĩa có ít hơn năm khuẩn lạc của loài đích thì cấy truyền tất cả các khuẩn lạc này.

CHÚ THÍCH Các loại thực phẩm, đặc biệt là hải sản có thể chứa một lượng lớn vi khuẩn, kể cả *Vibrio* spp. không gây bệnh mà có thể phát triển nhờ quá trình cấy chọn lọc. Việc cấy truyền các lượng nhỏ các khuẩn lạc có thể làm thất thoát các loài có khả năng gây bệnh.

Cấy các khuẩn lạc đã chọn lên bề mặt các đĩa thạch muối dinh dưỡng hoặc mặt nghiêng của thạch muối dinh dưỡng (5.3) để thu được các khuẩn lạc tách biệt tốt. Ủ các đĩa đã cấy (9.4.2) ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Sử dụng các dịch cấy tinh khiết này để khẳng định sinh hoá.

9.5.3 Các phép thử nhận dạng giả định

9.5.3.1 Phép thử phản ứng oxidaza

Dùng vòng lấy mẫu, que thẳng bằng platin iridi hoặc đũa thủy tinh, lấy một phần dịch cấy tinh khiết từ thạch muối dinh dưỡng (9.5.2) và cấy vạch lên giấy lọc đã làm ẩm bằng thuốc thử oxidaza (5.4), hoặc sử dụng loại có bán sẵn, theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Không sử dụng vòng lấy mẫu bằng niken-crom hoặc que bằng kim loại. Phép thử được coi là dương tính nếu màu chuyển sang màu tím hoa cà, màu tím hoặc tím sẫm trong 10 s.

9.5.3.2 Kiểm tra bằng kính hiển vi

Đối với mỗi dịch cấy tinh khiết thu được trong 9.4.2, tiến hành kiểm tra theo a) và b) như sau:

- Chuẩn bị màng để nhuộm Gram [xem TCVN 6404 (ISO 7218)]. Sau khi nhuộm, kiểm tra hình thái và phản ứng Gram bằng kính hiển vi và ghi lại kết quả.
- Cấy vào ống đựng dung dịch nước pepton muối kiềm (ASPW) (5.1). Ủ ở 37 °C trong khoảng từ 1 h đến 6 h. Cho một giọt dịch cấy lên phiến kính sạch, đẩy lam men và kiểm tra tính di động dưới kính hiển vi. Ghi lại các ống cho kết quả dương tính về tính di động.

9.5.3.3 Chọn dịch cấy để thử sinh hoá

Giữ lại các khuẩn lạc dương tính oxidaza và âm tính Gram cho kết quả dương tính về tính di động để kháng định sinh hoá.

9.5.4 Kháng định sinh hoá

9.5.4.1 Yêu cầu chung

Dùng que cấy vòng, cấy từng dịch cấy thu được từ các khuẩn lạc được giữ lại trong 9.5.3.3 vào môi trường quy định trong 9.5.4.2 đến 9.5.4.8.

9.5.4.2 Thử nghiệm trên thạch TSI (5.5)

Cấy đâm sâu xuống đáy ống thạch và cấy ria theo mặt nghiêng của thạch. Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Diễn giải các phản ứng như sau:

a) Quan sát ở đáy cột thạch

- màu vàng: dương tính glucoza (lên men glucoza);
- màu đỏ hoặc không đổi màu: âm tính glucoza (không lên men glucoza);
- màu đen: sinh khí hydro sulfua;
- có bọt hoặc rạn nứt: sinh khí từ glucoza

b) Quan sát trên mặt nghiêng của thạch

- màu vàng: dương tính lactoza và/hoặc sacaroza (sử dụng lactoza và/hoặc sacaroza);
- màu đỏ hoặc không đổi màu: âm tính lactoza (không sử dụng lactoza hoặc sacaroza);

Các phản ứng điển hình của *V. vulnificus* và *V. fluvialis* ứng với cấy bề mặt nghiêng axit (màu vàng) và cấy đâm sâu axit (màu vàng) mà không sinh hydro sulfua hoặc khí.

TCVN 7905-2:2008

Các phản ứng điển hình của *V. mimicus* ứng với cấy bề mặt nghiêng kiềm (màu đỏ) (đôi khi bề mặt nghiêng axit: màu vàng) và cấy đâm sâu axit (màu vàng) mà không sinh hydro sulfua hoặc khí.

9.5.4.3 Phát hiện ornithin tách nhóm cacboxyl (decarboxylaza)

Cấy dung dịch muối lỏng (5.6) ngay dưới bề mặt. Thêm khoảng 1 ml dầu khoáng vô trùng lên mặt môi trường. Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Sau khi ủ mà thấy đục hoặc có màu tím chứng tỏ phản ứng dương tính [có vi khuẩn mọc và có sự tách nhóm cacboxyl của ornithin]. Màu vàng chứng tỏ phản ứng âm tính.

9.5.4.4 Phát hiện L-lyzin tách nhóm cacboxyl (decarboxylaza)

Cấy dung dịch muối lỏng (5.7) ngay dưới bề mặt. Thêm khoảng 1 ml dầu khoáng vô trùng lên mặt môi trường. Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Sau khi ủ mà thấy đục hoặc có màu tím chứng tỏ phản ứng dương tính [có vi khuẩn mọc và có sự tách nhóm cacboxyl của lyzin]. Màu vàng chứng tỏ phản ứng âm tính.

9.5.4.5 Phát hiện dihydrolaza arginin

Cấy môi trường dung dịch muối (5.8) ngay dưới bề mặt. Thêm khoảng 1 ml dầu khoáng vô trùng lên mặt môi trường. Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Sau khi ủ mà thấy đục hoặc có màu tím chứng tỏ phản ứng dương tính [có vi khuẩn mọc và có sự dihydrolaza arginin]. Màu vàng chứng tỏ phản ứng âm tính.

9.5.4.6 Phát hiện β-galactoxidaza

Cấy khuẩn lạc nghi ngờ vào ống nghiệm chứa 0,25 ml dung dịch muối (5.12). Thêm 1 giọt toluen và lắc ống.

Đặt ống vào nồi cách thủy (6.4) để ở 37 °C và để yên khoảng 5 min.

Thêm 0,25 ml thuốc thử phát hiện β-galactoxidaza (5.9) và trộn. Đặt ống vào nồi cách thủy để ở 37 °C, để yên trong 24 h ± 3 h, kiểm tra liên tục.

Màu vàng chứng tỏ phản ứng dương tính (có mặt β-galactoxidaza). Phản ứng thường xảy ra sau 20 min. Sau 24 h không có màu chứng tỏ phản ứng âm tính.

Nếu sử dụng các đĩa giấy có bán sẵn thì theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

9.5.4.7 Phát hiện indol

Cấy các khuẩn lạc nghi ngờ vào ống chứa 5 ml môi trường muối trypton-tryptophan (5.10). Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h. Sau khi ủ, thêm 1 ml thuốc thử Kovacs.

Việc hình thành vòng màu đỏ chứng tỏ phản ứng dương tính (hình thành indol). Vòng màu nâu-vàng chứng tỏ phản ứng âm tính.

9.5.4.8 Phép thử khả năng chịu mặn

Chuẩn bị một dãy các dung dịch nước pepton (5.11) với nồng độ muối (NaCl) tăng dần: 0 %, 2 %, 4 %, 6 %, 8 % và 10 % (5.11).

Chuẩn bị huyền phù có khuẩn lạc cần nhận dạng và cấy nhẹ vào mỗi ống (bằng một vòng cấy đầy). Ủ ở 37 °C trong 24 h ± 3 h.

Nếu quan sát thấy đục chứng tỏ vi khuẩn nghi ngờ có thể phát triển với nồng độ natri clorua có mặt trong ống đựng nước pepton muối.

9.5.4.9 Diễn giải các phép thử sinh hoá

Các loài *Vibrio* spp. có khả năng gây bệnh đường ruột thường cho các phản ứng như trong Bảng 1. Các phản ứng của *V. cholerae* và *V. parahaemolyticus* được nêu trong TCVN 7905-1:2008 (ISO/TS 21872-1), cũng thường thấy có vì chúng có thể được phân lập khi sử dụng quy trình nêu trong tiêu chuẩn này. Các phản ứng đối với *V. hollisae* không thấy có vì không chắc chắn rằng các chủng của loài này có thể phát hiện được bằng các quy trình đó.

Bảng 1 – Diễn giải các phép thử sinh hoá

Phép thử	<i>V. cholerae</i> ^a	<i>V. mimicus</i> ^a	<i>V. parahaemolyticus</i> ^a	<i>V. vulnificus</i> ^a	<i>V. fluvialis</i> ^a
Oxidaza	+	+	+	+	+
Sinh khí (glucoza)	-	-	-	-	-
Lactoza	-	-	-	+	-
Sacaroza	+	-	-	-	+
ODC	+	+	+	+	-
LDC	+	+	+	+	-
ADH	-	-	-	-	+
Thủy phân ONPG	+	+		+	+
Sinh indol	+	+	+	+	b
Sinh trưởng trong nước pepton với					
0 % NaCl	+	+	-	-	-
2 % NaCl	+	+	+	+	+
6 % NaCl	-	-	+	+	+
8 % NaCl	-	-	+	-	-
10 % NaCl	-	-	-	-	-

^a Dấu + nghĩa là từ 76 % đến 89 % dương tính.
^b Các kết quả đáng tin cậy

TCVN 7905-2:2008

CHÚ THÍCH Các phản ứng nêu trong Bảng 1 là để hướng dẫn nhận dạng các loài đã liệt kê. Các phép thử kiểu hình bổ sung là cần thiết để phân biệt đầy đủ giữa loài này với loài khác và giữa các loài của *Vibrio* không gây bệnh với các vi sinh vật âm tính Gram lên men khác như *Aeromonas* spp.

9.5.4.10 Kháng định từng bước (nếu cần)

Thực hiện các phép thử để kiểm tra sự phát triển trong dung dịch nước muối pepton 10 % (5.11). Tiếp tục bằng việc kháng định (các phép thử khác) trên các khuẩn lạc cho thấy không phát triển trong dung dịch nước muối pepton.

CHÚ THÍCH Nên cấy truyền vào dung dịch nước muối pepton 2 % hoặc cấy truyền vào thạch muối dinh dưỡng tại cùng một thời điểm để chắc chắn rằng vi khuẩn "không phát triển" trong dung dịch nước muối pepton 10 % không phải vì dịch cấy đã hỏng.

9.5.5 Kháng định việc nhận dạng bằng sinh hoá

Việc nhận dạng bằng sinh hoá của *Vibrio* là rất khó, tốt nhất để kháng định chính xác các chủng *Vibro* có khả năng gây bệnh đường ruột bằng cách gửi đến phòng thử nghiệm chuẩn/chuyên dụng.

Để vận chuyển chúng, cấy vào bề mặt nghiêng của thạch dinh dưỡng muối (5.3).

10 Biểu thị kết quả

Theo diễn giải các kết quả, ghi lại sự có mặt hay không có mặt *Vibrio*. Có khả năng gây bệnh đường ruột có trong xg hoặc xml sản phẩm [xem TCVN 6404 (ISO 7218)], nêu rõ tên loài vi khuẩn có liên quan.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

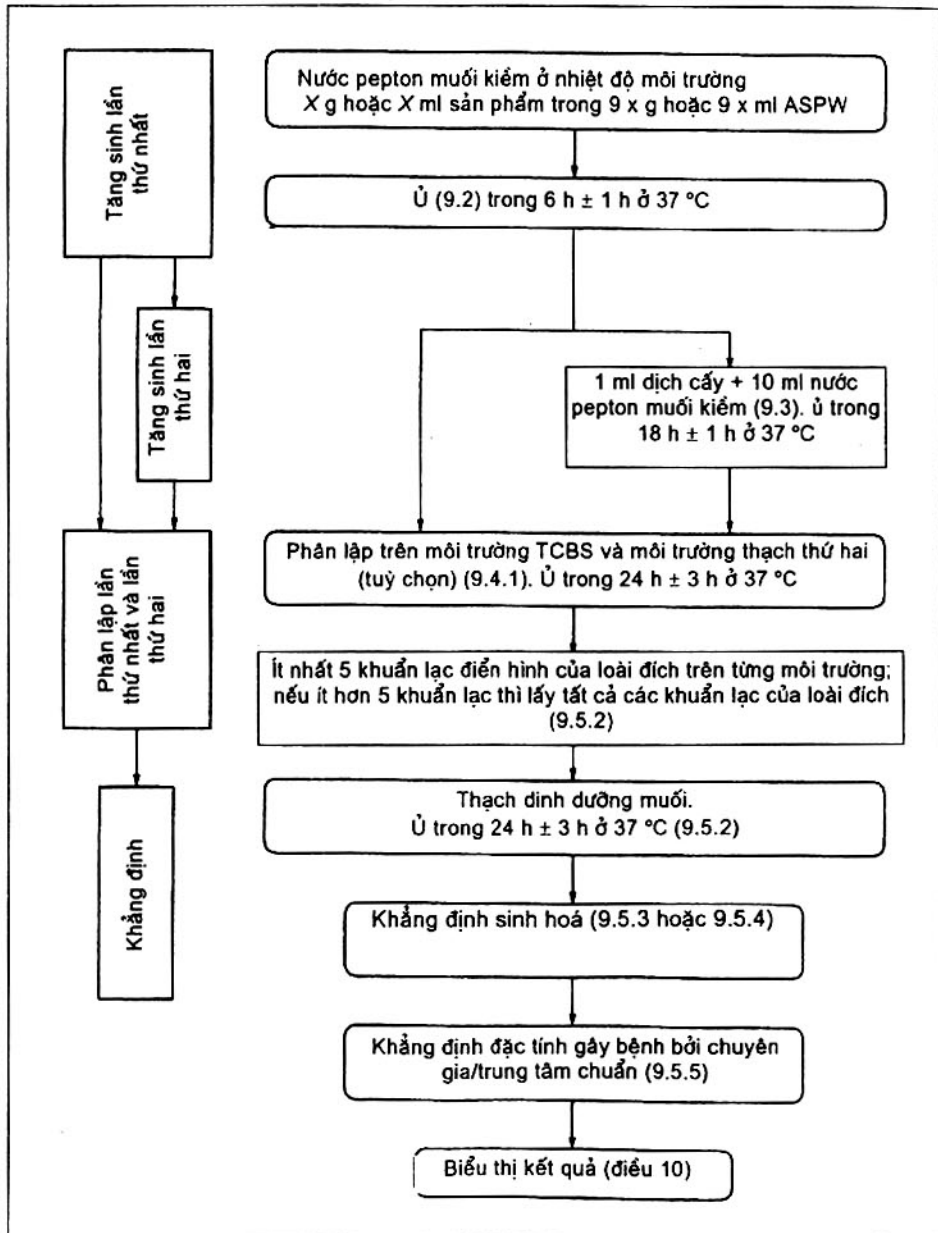
- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- mọi sai lệch liên quan đến môi trường tăng sinh hoặc điều kiện ủ đã sử dụng;
- mọi chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- các kết quả thử nghiệm thu được;

Báo cáo thử nghiệm cũng phải nêu rõ kết quả dương tính có thu được hay không khi sử dụng chỉ một môi trường phân lập (5.2) không được quy định trong tiêu chuẩn này.

Phụ lục A

(qui định)

Sơ đồ cách tiến hành



Phụ lục B

(qui định)

Thành phần và cách chuẩn bị môi trường nuôi cấy và thuốc thử

B.1 Dung dịch nước pepton muối kiềm (ASPW)

B.1.1 Thành phần

Pepton	20,0 g
Natri clorua (NaCl)	20,0 g
Nước	1 000 ml

B.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng là $8,6 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Phân phối môi trường với các lượng cần thiết cho phép thử vào các bình cầu hoặc ống có dung tích thích hợp (9.1 và 9.3.1). Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.2 Thạch sacaroza, mật xitrat thiosulfat (TCBS)

B.2.1 Thành phần

Pepton	10,0 g
Dịch chiết nấm men	5,0 g
Natri xitrat	10,0 g
Natri thiosulfat	10,0 g
Sắt (III) xitrat	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Mật bò khô	8,0 g
Sacaroza	20,0 g
Bromothymol xanh	0,04 g
Thymol xanh	0,04 g
Thạch	Từ 8,0 g đến 18,0 g ^a
Nước	1 000 ml
^a Tuỳ thuộc vào sức đông của thạch.	

B.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, đun đến sôi.

Chỉnh pH, đạt $8,6 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần. Không hấp áp lực.

B.2.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Phân phối các lượng từ 15 ml đến 20 ml môi trường vừa mới chuẩn bị và làm nguội đến khoảng $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, vào các đĩa Petri và để yên cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô cẩn thận các đĩa thạch (tốt nhất là mở nắp và lật úp đĩa) cho đến khi mặt thạch khô.

B.2.4 Kiểm chứng môi trường

Xem ISO/TS 11133 về các hướng dẫn.

Thực hiện ước tính hiệu quả của thạch đổ đĩa đối với mỗi mẻ TCBS sử dụng thạch dinh dưỡng muối (SNA) làm môi trường so sánh và các chủng sau đây:

- *V. parahaemolyticus*: NCTC 10885;
- *V. furnissii*: NCTC 11218;
- *Escherichia coli*: ATCC 25922, 8739 hoặc 11775.

Hiệu quả thạch đổ đĩa được tính bằng công thức sau đây:

$$\left(\frac{N_{TCBS}}{N_{SNA}} \times 100 \right)$$

trong đó N là số lượng khuẩn lạc đếm được.

Hiệu quả thạch đổ đĩa phải ít nhất là 50 % đối với mỗi chủng *Vibrio* (sinh vật kiểm chứng dương tính) và ít nhất là 1 % đối với *E. coli* (sinh vật kiểm chứng âm tính). Các khuẩn lạc *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 phải là màu xanh (âm tính sacaroza), trong khi đó các khuẩn lạc *V. furnissii* và NCTC 11218 phải là màu vàng (dương tính sacaroza).

B.3 Thạch natri dodexyl sulfat B polymixin sacaroza (SDS)

B.3.1 Môi trường cơ bản

B.3.1.1 Thành phần

Pepton proteoza	10,0 g
Dịch chiết thịt bò	5,0 g
Sacaroza	15,0 g
Natri clorua (NaCl)	20,0 g
Natri dodexyl sulfat	1,0 g
Xanh bromothymol	0,04 g
Đỏ cresol	0,04 g
Thạch	15,00 g *
Nước cất	1 000 ml
* Tùy thuộc vào sức đông của thạch.	

B.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước. Chính pH, đến $7,6 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.3.2 Dung dịch polymixin B

B.3.2.1 Thành phần

Polymyxin B sulfat	100 000 đơn vị
Nước	5 ml

B.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan thành phần trên trong nước. Lọc để khử trùng.

B.3.3 Chuẩn bị môi trường hoàn chỉnh

Làm nguội môi trường cơ bản đến khoảng $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ và thêm 5 ml dung dịch polymixin B vô trùng. Trộn kỹ.

B.3.4 Chuẩn bị các đĩa thạch

Phân phối các lượng từ 15 ml đến 20 ml môi trường vào các đĩa Petri. Để cho bề mặt thạch khô trước khi sử dụng.

B.3.5 Kiểm chứng môi trường

Xem ISO/TS 11133 về các hướng dẫn.

Thực hiện ước tính hiệu quả của thạch đổ đĩa đối với mỗi mẻ SDS sử dụng thạch dinh dưỡng muối (SNA) làm môi trường so sánh và các chủng sau đây:

- *V. vulnificus*: NCTC 11067 (ATCC 29307);
- *V. cholerae* không phải O1/không phải O139: NCTC 8042 (ATCC 14733);
- *Escherichia coli*: ATCC 25922, 8739 hoặc 11775.

Hiệu quả thạch đổ đĩa được tính bằng công thức sau đây:

$$\left(\frac{N_{SDS}}{N_{SNA}} \times 100 \right)$$

trong đó N là số lượng khuẩn lạc đếm được.

Hiệu quả thạch đổ đĩa phải ít nhất là 50 % đối với mỗi chủng *Vibrio* và nhỏ hơn 1 % đối với *E. coli*. Các khuẩn lạc *V. vulnificus* NCTC 11067 phải là màu xanh/tía có quầng mờ đục bao quanh, trong khi đó các khuẩn lạc *V. cholerae* NCTC 8042 phải là màu vàng có quầng mờ đục bao quanh.

B.4 Thạch colistin polymyxin xellobioza (CPC)**B.4.1 Dung dịch 1****B.4.1.1 Thành phần**

Pepton dùng cho vi khuẩn học	10,0 g
Dịch chiết thịt bò	5,0 g
Sắt xitrat	0,10 g
Natri clorua (NaCl)	20,0 g
Xanh bromothymol	0,04 g
Đỏ cresol	0,04 g
Thạch	15,0 g
Nước cất	900 ml

B.4.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước. Chính pH đến $7,6 \pm 0,2$.

TCVN 7905-2:2008

Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121 °C. Để nguội đến 50 °C.

B.4.2 Dung dịch 2

B.4.2.1 Thành phần

Xellobioza	15,0 g
Colistin	1360 000 đơn vị
Polymixin B	100 000 đơn vị
Nước cất	100 ml

B.4.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan xellobioza trong nước cất bằng cách đun nóng nhẹ. Để nguội, sau đó thêm chất kháng sinh.

Lọc để khử trùng.

B.4.3 Môi trường hoàn chỉnh

Cho (100 ml) dung dịch 2 và o (900 ml) dung dịch 1 và trộn.

B.4.4 Chuẩn bị các đĩa thạch

Phân phối các lượng 20 ml môi trường vào các đĩa Petri. Để cho bề mặt thạch khô trước khi sử dụng.

B.4.5 Kiểm chứng môi trường

Thực hiện ước tính hiệu quả của thạch đổ đĩa đối với đối với mỗi mẻ CPC sử dụng thạch dinh dưỡng muối (SNA) làm môi trường so sánh và các chủng sau đây:

- *Vbrio vulnificus*: NCTC 11067 (ATCC 29307);
- *Vibrio cholerae* không phải O1/không phải O139: NCTC 8042 (ATCC 14733);
- *Escherichia coli*: ATCC 25922, 8739 hoặc 11775.

Hiệu quả thạch đổ đĩa được tính bằng công thức sau đây:

$$\left(\frac{N_{CPC}}{N_{SNA}} \times 100 \right)$$

trong đó N là số lượng khuẩn lạc đếm được.

Hiệu quả thạch đổ đĩa phải ít nhất là 50 % đối với mỗi chủng *Vibrio* và nhỏ hơn 1 % đối với *E. coli*. Các khuẩn lạc *V. vulnificus* NCTC 11067 phải là màu vàng có quang màu vàng bao quanh trong

môi trường, trong khi đó các khuẩn lạc *V. cholerae* NCTC 8042 phải là màu đỏ tía có quầng đỏ tía bao quanh trong môi trường.

B.5 Thạch colistin polymyxin xellobioza cải biến (mCPC)

B.5.1 Dung dịch nhuộm gốc 1000 X

B.5.1.1 Thành phần

Xanh bromothymol	4,0 g
Đỏ cresol	4,0 g
Etanol, 95 %	100 ml

B.5.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thuốc nhuộm vào etanol để cho dung dịch gốc 4 % (khối lượng bằng thể tích).

Cho 1 ml dung dịch này vào 1 l thạch mCPC để thu được nồng độ cuối cùng là 40 mg xanh bromothymol và 40 mg đỏ cresol trên lít.

B.5.2 Dung dịch 1

B.5.2.1 Thành phần

Pepton	10 g
Dịch chiết thịt bò	5 g
Natri clorua (NaCl)	20 g
Dung dịch thuốc nhuộm gốc 1000 X	1 ml
Thạch	15 g
Nước cất	900 ml

B.5.2.2 Chuẩn bị

Trộn các thành phần trên và chỉnh pH đến 7,6. Đun sôi để hoà tan thạch. Làm nguội đến khoảng 50 °C.

B.5.3 Dung dịch 2

B.5.3.1 Thành phần

Xellobioza	10 g
Colistin	400 000 đơn vị
Polymyxin B	100 000 đơn vị
Nước cất	100 ml

TCVN 7905-2:2008

B.5.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan xellobioza trong nước cất bằng cách đun nóng nhẹ. Để nguội đến khoảng 50 °C.

Bổ sung các chất kháng sinh và trộn.

B.5.4 Môi trường hoàn chỉnh

B.5.4.1 Thành phần

Dung dịch thuốc nhuộm gốc 1 000 X	1 ml
Dung dịch 1	900 ml
Dung dịch 2	100 ml

B.5.4.2 Chuẩn bị

Cho dung dịch 2 vào dung dịch 1 và trộn.

Cho 1 ml dung dịch này vào 1 l thạch mCPC để thu được nồng độ cuối cùng là 40 mg xanh bromothymol và 40 mg đỏ cresol trên lít.

B.5.5 Chuẩn bị các đĩa thạch

Phân phối các lượng 20 ml môi trường vào các đĩa Petri. Để cho bề mặt thạch khô trước khi sử dụng.

B.5.6 Kiểm chứng môi trường

Thực hiện ước tính hiệu quả của thạch đổ đĩa đối với mỗi mẻ CPC sử dụng thạch dinh dưỡng muối (SNA) làm môi trường so sánh và các chủng sau đây:

- *V. vulnificus*: NCTC 11067 (ATCC 29307);
- *V. cholerae* không phải O1/không phải O139: NCTC 8042 (ATCC 14733);
- *Escherichia coli*: ATCC 25922, 8739 hoặc 11775.

Hiệu quả thạch đổ đĩa được tính bằng công thức sau đây:

$$\left(\frac{N_{mCPC}}{N_{SNA}} \times 100 \right)$$

trong đó N là số lượng khuẩn lạc đếm được.

Hiệu quả thạch đổ đĩa phải ít nhất là 50 % đối với mỗi chủng *Vibrio* và nhỏ hơn 1 % đối với *E. coli*. Các khuẩn lạc *V. vulnificus* NCTC 11067 phải là màu vàng có quầng màu vàng bao quanh trong

môi trường, trong khi đó các khuẩn lạc *V. cholerae* NCTC 8042 phải là màu đỏ tía có quang đỏ tía bao quanh trong môi trường.

B.6 Thạch dinh dưỡng muối (SNA)

B.6.1 Thành phần

Dịch chiết thịt	5,0 g
Pepton	3,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Thạch	Từ 8 g đến 18 g *
Nước	1 000 ml
* Tùy thuộc vào sức đông của thạch.	

B.6.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần khô hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH, sao cho sau khi khử trùng là $7,2 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Chuyển môi trường này vào các vật chứa có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C .

B.6.3 Chuẩn bị các đĩa thạch của môi trường thạch dinh dưỡng muối

Phân phối các lượng từ 15 ml đến 20 ml môi trường, làm nguội đến khoảng 50°C , vào các đĩa Petri và để yên cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô cẩn thận các đĩa thạch (tốt nhất là mở nắp và lật úp đĩa) cho đến khi mặt thạch khô.

B.6.4 Chuẩn bị các ống thạch nghiêng

Phân phối khoảng 10 ml môi trường đã làm nguội đến khoảng 50°C vào các ống có dung tích thích hợp.

Để nghiêng ống cho đông đặc.

B.7 Thuốc thử phát hiện oxidaza

B.7.1 Thành phần

<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyl- <i>p</i> -phenylendiamin dihydroclorua	1,0 g
Nước	100 ml

B.7.2 Chuẩn bị

Hòa tan thành phần trên trong nước lạnh ngay trước khi sử dụng.

TCVN 7905-2:2008

B.8 Thạch, sắt, ba đường và muối (TSI)

B.8.1 Môi trường cơ bản

B.8.1.1 Thành phần

Pepton	20,0 g
Dịch chiết thịt	3,0 g
Dịch chiết nấm men	3,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Lactoza	10,0 g
Sacaroza	10,0 g
Glucoza	1,0 g
Sắt (III) xitrat	0,3 g
Đỏ phenol	0,024 g
Thạch	Từ 8,0 g đến 18 g *
Nước	1 000 ml

^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

B.8.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng là $7,4 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Chuyển môi trường này với các lượng 10 ml vào các ống có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C .

Để yên ở tư thế nghiêng cho đông đặc, sao để thu được khoảng 2,5 cm chiều sâu ống.

Nếu sau khi chuẩn bị, môi trường được sử dụng sau 8 ngày, thì phục hồi môi trường này bằng cách làm tan chảy trên nồi cách thủy hoặc bằng thổi hơi nước tự do trong 10 min. Để cho đông đặc như mô tả ở trên.

B.9 Môi trường muối để phát hiện Ornithin decarboxylaza (ODC)

B.9.1 Thành phần

L-Ornithin	5,0 g
Dịch chiết nấm men	3,0 g
Glucoza	1,0 g
Bromocresol lía	0,015 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Nước	1 000 ml

B.9.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng là $6,8 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Phân phối môi trường này với các lượng từ 2 ml đến 5 ml vào các ống hẹp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.10 Môi trường muối để phát hiện lysin decarboxylaza (LDC)**B.10.1 Thành phần**

L-lysin monohydroclorua	5,0 g
Dịch chiết nấm men	3,0 g
Glucoza	1,0 g
Bromocresol tía	0,015 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Nước	1 000 ml

B.10.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng là $6,8 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Phân phối môi trường này với các lượng từ 2 ml đến 5 ml vào các ống hẹp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.11 Môi trường muối để phát hiện Arginin dihydroxylaza (ADH)**B.11.1 Thành phần**

Arginin monohydro clorua	5,0 g
Dịch chiết nấm men	3,0 g
Glucoza	1,0 g
Bromocresol tía	0,015 g
Natri clorua	10,0 g
Nước	1 000 ml

TCVN 7905-2:2008

B.11.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng là $6,8 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Phân phối môi trường này với các lượng từ 2 ml đến 5 ml môi trường này vào các ống hẹp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.12 Thuốc thử phát hiện β -galactoxidaza

B.12.1 Dung dịch ONPG

B.12.1.1 Thành phần

2-ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosit (ONPG)	0,08 g
Nước	15 ml

B.12.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan ONPG trong nước ở khoảng $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Làm nguội dung dịch.

B.12.2 Dung dịch đệm

B.12.2.1 Thành phần

Natri dihydro phosphat (NaH_2PO_4)	6,9 g
Natri hydroxit (NaOH) (dung dịch 0,1 mol/l)	Xấp xỉ 3 ml
Nước, lượng đủ cho thể tích cuối cùng là	50 ml

B.12.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan natri dihydro phosphat trong khoảng 45 ml nước trong bình định mức.

Chính pH đến $7,0 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bằng dung dịch natri hydroxit 0,1 mol/l. Thêm nước đến 50 ml.

B.12.3 Thuốc thử hoàn chỉnh

B.12.3.1 Thành phần

Dung dịch đệm (B.12.2)	5 ml
Dung dịch ONPG (B.12.1)	15 ml

B.12.3.2 Chuẩn bị

Cho dung dịch đậm vào dung dịch ONPG. Bảo quản dung dịch này ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C.

B.13 Môi trường muối để phát hiện indol**B.13.1 Môi trường muối tryptophan****B.13.1.1 Thành phần**

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	10,0 g
DL-Tryptophan	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Nước	1000 ml

B.13.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần và lọc. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,0 \pm 0,2$ ở 25 °C, nếu cần.

Phân phối môi trường này với các lượng 5 ml môi trường này vào các ống có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121 °C.

B.13.2 Thuốc thử Kovacs**B.13.2.1 Thành phần**

4-Dimethylaminobenzaldehyt	5 g
Axit clohydric, $\rho = 1,18$ g/ml đến 1,19 g/ml	25 ml
2-Metylbutan-2-ol	75 ml

B.13.2.2 Chuẩn bị

Trộn các thành phần trên.

B.14 Dung dịch nước pepton muối**B.14.1 Thành phần**

Pepton	10 g
Natri clorua (NaCl)	0 g, 20 g, 60 g, 80 g hoặc 100 g
Nước	1000 ml

TCVN 7905-2:2008

B.14.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,5 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Phân phối môi trường này vào các ống có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

B.15 Dung dịch natri clorua

B.15.1 Thành phần

Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Nước	1000 ml

B.15.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,5 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

Phân phối môi trường này vào các ống có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] 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*
- [2] 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.*
-