

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9980:2013**

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI –  
ĐỊNH LƯỢNG ENTEROBACTERIACEAE BẰNG  
PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG ĐĨA ĐẾM PETRIFILM™**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs –  
Enumeration of Enterobacteriaceae using Petrifilm™ count plate*

HÀ NỘI - 2013

**Lời nói đầu**

TCVN 9980:2013 được xây dựng trên cơ sở AOAC 200.01 *Enumeration of Enterobacteriaceae in Selected Foods. Petrifilm™ Enterobacteriaceae*;

TCVN 9980:2013 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 thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Định lượng Enterobacteriaceae bằng phương pháp sử dụng đĩa đếm Petrifilm™

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Enumeration of Enterobacteriaceae using Petrifilm™ count plate*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sử dụng đĩa đếm Petrifilm™ để định lượng Enterobacteriaceae (EB) trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.

Phương pháp này đã được đánh giá liên phòng thử nghiệm, các kết quả được nêu trong Phụ lục A và Tài liệu tham khảo [1].

### 2 Nguyên tắc

Phương pháp này sử dụng các đĩa cấy chứa môi trường dinh dưỡng khô với chỉ thị pH và chất tạo đông tan được trong nước lạnh. Cho các dung dịch huyền phù mẫu thử chưa pha loãng hoặc đã pha loãng vào các đĩa với lượng 1 ml mỗi đĩa. Dàn đều dung dịch huyền phù trên diện tích khoảng 20 cm<sup>2</sup>. Chất tạo đông có trong thành phần của đĩa sẽ làm môi trường dinh dưỡng trong đĩa đông lại. Đĩa được ủ ấm ở 37 °C ± 1 °C trong 24 h ± 2 h rồi đếm khuẩn lạc.

### 3 Thuộc thử và môi trường

Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

#### 3.1 Nước dùng để pha loãng (dung dịch nước đệm phosphat)

Hòa tan 34 g kali dihydro phosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) vào 500 ml nước đựng trong bình định mức 1 lít, chỉnh pH đến 7,2 bằng khoảng 175 ml dung dịch natri hydroxit 1 M và thêm nước đến vạch. Pha loãng 1,25 ml dung dịch này đến 1 lít bằng nước đã đun sôi và để nguội, rồi hấp áp lực 15 min ở 121 °C.

## TCVN 9980:2013

Nước dùng để pha loãng không được chứa xitrat, bisulfit hoặc thiosulfat vì có thể gây ức chế sự phát triển của vi sinh vật.

### 3.2 Natri hydroxit (NaOH) vô trùng, dung dịch 1 M

Hòa tan 40 g NaOH trong nước và thêm nước đến 1 lít. Hấp áp lực 15 min ở 121 °C.

### 3.3 Chất chỉ thị pH.

### 3.4 Chất chỉ thị màu tetrazolium.

### 3.5 Chất dinh dưỡng glucose mật đỏ tím (violet red bile glucose - VRBG).

### 3.6 Chất tạo đông tan được trong nước lạnh.

## 4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và các thiết bị, dụng cụ sau đây:

### 4.1 Đĩa đếm Enterobacteriaceae Petrifilm™<sup>1)</sup>

Đĩa chứa các chất dinh dưỡng glucose mật đỏ tím (3.5), chỉ thị pH (3.3), chất tạo đông tan được trong nước lạnh (3.6) và chất chỉ thị màu tetrazolium. Vùng sinh trưởng được khoanh tròn trên mỗi đĩa chứa khoảng hai mươi ô vuông, mỗi ô có diện tích 1 cm<sup>2</sup> trên màng nền.

4.2 Dụng cụ dàn mẫu bằng chất dẻo (gồm một mặt có gờ và một mặt láng), được cung cấp cùng với đĩa đếm (4.1), để dàn đều huyền phù lên khắp vùng sinh trưởng của đĩa.

4.3 Pipet, đã được hiệu chuẩn, dùng để phân tích vi sinh vật hoặc pipet dạng xyranh có thể phân phối 1,0 ml, chia vạch đến 0,1 ml. Có thể dùng pipet tự động.

Pipet phải phân phối được chính xác các thể tích yêu cầu. Không sử dụng pipet để phân phối thể tích nhỏ hơn 10 % dung tích của pipet. Ví dụ, không dùng pipet có dung tích lớn hơn 10 ml để phân phối 1 ml.

4.4 Thiết bị đếm khuẩn lạc, loại chuẩn hoặc loại có độ khuếch đại và độ nhìn thấy tương đương.

4.5 Thiết bị trộn tốc độ cao, có bình chứa vô trùng.

4.6 Tủ ấm, có thể duy trì được nhiệt độ ở 37 °C ± 1 °C.

---

<sup>1)</sup> Sản phẩm của 3M Center, St. Paul, MN 55144, USA. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

4.7 Cân, có thể cân chính xác đến 0,1 g.

4.8 Nồi hấp áp lực, có thể duy trì nhiệt độ ở 121 °C.

## 5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này.

Phòng thử nghiệm phải nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

## 6 Chuẩn bị mẫu thử

Cân vô trùng 11,0 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 g, cho vào bình trộn vô trùng của thiết bị trộn tốc độ cao (4.5) (đối với mẫu đông lạnh thì cân phần mẫu thử chưa rã đông). Thêm 99 ml nước dùng để pha loãng (3.1) và trộn ở tốc độ 16 000 r/min đến 18 000 r/min trong 2 min để đồng hóa mẫu. Nếu khối lượng mẫu không đủ 50 g thì cân phần mẫu thử và pha loãng bằng nước để có dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ . Chính pH của dung dịch pha loãng đến khoảng từ 6,5 đến 7,5 bằng dung dịch natri hydroxit (3.2) (khoảng 0,1 ml dung dịch natri hydroxit 1 M cho 1 g phần mẫu thử).

Chuẩn bị tất cả các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo từ 90 ml nước dùng để pha loãng (3.1) và 10 ml dung dịch mẫu thử pha loãng trước đó. Trộn các dung dịch pha loãng bằng cách lắc 25 lần với biên độ dao động 30 cm trong 7 s.

## 7 Cách tiến hành

Đặt đĩa đếm EB Petrifilm™ (4.1) lên bề mặt phẳng. Nhấc tấm màng mỏng phía trên ra và nhỏ 1 ml huyền phù mẫu thử vào chính giữa màng nền. Đậy cẩn thận tấm màng mỏng phía trên xuống chặt cây. Dàn đều huyền phù trên diện tích 20 cm<sup>2</sup> bằng cách ấn nhẹ xuống tâm dụng cụ dàn mẫu (4.2) (mặt láng của dụng cụ dàn mẫu hướng xuống dưới). Lấy dụng cụ dàn mẫu ra và để yên đĩa trong 1 min cho gel đông đặc lại. Đặt các đĩa vào tủ ấm (4.6) theo phương nằm ngang với nắp hướng lên trên, không chồng cao quá 20 đĩa, ủ ấm đĩa ở nhiệt độ 37 °C ± 1 °C trong 24 h ± 2 h.

Đếm khuẩn lạc trên các đĩa này trong vòng 2 h sau khi kết thúc giai đoạn ủ, sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc (4.4). Có thể sử dụng bộ khuếch đại được rọi sáng để thuận tiện cho việc đếm. Đếm tất cả các khuẩn lạc có màu đỏ có sinh khí (có hoặc không kèm theo quầng axit màu vàng bao quanh khuẩn lạc) và tất cả các khuẩn lạc không sinh khí nhưng có quầng axit màu vàng bao quanh khuẩn lạc. Chọn đếm các đĩa có từ 10 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc. Không đếm các khuẩn lạc phát triển ngoài vòng tròn giới hạn của môi trường chọn lọc, không đếm các bọt khí giả có thể được tạo ra do thao tác chưa đúng trong quá trình cấy mẫu lên đĩa.

## 8 Tính và biểu thị kết quả

Để tính số lượng EB, nhân tổng số lượng khuẩn lạc trên một đĩa (hoặc số lượng trung bình các khuẩn lạc trên một đĩa, nếu đếm các đĩa kép của cùng một độ pha loãng) với số nghịch đảo của độ pha loãng tương ứng. Khi đếm các khuẩn lạc trên các đĩa kép của các độ pha loãng kế tiếp, tính số lượng trung bình các khuẩn lạc cho mỗi độ pha loãng trước khi xác định trung bình số đếm EB.

Nếu không có đĩa nào có ít nhất 10 khuẩn lạc thì ghi lại số đếm chính xác trên đĩa có độ pha loãng thấp nhất (tương ứng với dung dịch ít pha loãng nhất).

Nếu tất cả các đĩa có số đếm lớn hơn 150 thì xác định số đếm ước tính bằng cách đếm số khuẩn lạc trong một hoặc nhiều ô vuông đại diện, tính số đếm trung bình trên một ô vuông và nhân số đếm này với 20 (diện tích vùng sinh trưởng khoảng 20 cm<sup>2</sup>). Trong trường hợp này, phải báo cáo đây là số ước tính.

Nếu các đĩa đều có mật độ khuẩn lạc quá lớn để ước tính số đếm thì kết quả được báo cáo là "quá nhiều để đếm".

## 9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin dưới đây:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp đã sử dụng;
- kết quả và đơn vị biểu thị kết quả;
- ngày tháng lấy mẫu và phương thức lấy mẫu (nếu có);
- ngày tháng nhận mẫu phòng thử nghiệm;
- ngày tháng thử nghiệm;
- các điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy chọn, cùng với các chi tiết của sự cố bất kỳ có thể ảnh hưởng đến kết quả.

**Phụ lục A**

(Tham khảo)

**Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm**

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm đối với EB bằng phương pháp sử dụng đĩa đếm Petrifilm™, phương pháp sử dụng môi trường VRBG và phương pháp số đếm có xác suất lớn nhất được nêu trong Bảng A.1, Bảng A.2 và Bảng A.3.

**Bảng A.1 – Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm đối với EB  
bằng phương pháp sử dụng đĩa đếm Petrifilm™**

Mức nhiễm	Số phòng thử nghiệm tham gia <sup>a</sup>	Trung bình các giá trị $\log_{10}$ của số khuẩn lạc trên gam	Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $RSD_r$ , %	Giới hạn lặp lại, $r$	Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $RSD_R$ , %	Giới hạn tái lập, $R$
<b>Phomat</b>								
Không nhiễm	0							
Thấp	12	3,02 <sup>b</sup>	0,18 <sup>c</sup>	5,96	0,51	0,20	6,69	0,57
Trung bình	12	4,07 <sup>b</sup>	0,14 <sup>c</sup>	3,33	0,38	0,14	3,44	0,39
Cao	10	4,91 <sup>b</sup>	0,05 <sup>c,d</sup>	0,92	0,13	0,24	4,89	0,68
<b>Sữa</b>								
Không nhiễm	0							
Thấp	11	2,49 <sup>b,e</sup>	0,06 <sup>c,d</sup>	2,57	0,18	0,44	17,67	1,24
Trung bình	12	3,34 <sup>b</sup>	0,10 <sup>c,d</sup>	3,00	0,28	0,18	5,27	0,50
Cao	11	4,34 <sup>b</sup>	0,10 <sup>c,d</sup>	2,37	0,29	0,18	4,17	0,51
<b>Bột mì</b>								
Không nhiễm	12	2,70	0,25 <sup>c</sup>	9,33	0,71	0,33	12,15	0,92
Thấp	12	2,73 <sup>b</sup>	0,32	11,78	0,91	0,37	13,46	1,04
Trung bình	11	2,83 <sup>b</sup>	0,38	13,31	1,06	0,41	14,35	1,15
Cao	12	2,89 <sup>a</sup>	0,26 <sup>c</sup>	8,90	0,72	0,29	10,10	0,82
<b>Thực ăn chế biến sẵn đông lạnh</b>								
Không nhiễm	0							
Thấp	11	2,61 <sup>b</sup>	0,13 <sup>c</sup>	4,81	0,35	0,17	6,43	0,47
Trung bình	11	3,51 <sup>c</sup>	0,08 <sup>c,d</sup>	2,21	0,22	0,10	2,72	0,27
Cao	11	4,47 <sup>e</sup>	0,08 <sup>c,d</sup>	1,74	0,22	0,21	4,71	0,59
<b>Súp lơ xanh đông lạnh</b>								
Không nhiễm	0							
Thấp	10	1,60	0,32	19,91	0,90	0,43	26,99	1,22
Trung bình	12	2,66 <sup>b,e</sup>	0,14 <sup>c,d</sup>	5,15	0,39	0,40	14,98	1,12
Cao	11	3,44 <sup>b,e</sup>	0,29	8,49	0,82	0,55	16,14	1,56
<b>Quả hạch</b>								
Không nhiễm	10	2,74	0,21	7,53	0,58	0,48	17,47	1,35
Thấp	10	3,50	0,29 <sup>c</sup>	8,40	0,83	0,68	19,33	1,91
Trung bình	7	4,09	0,50	12,10	1,40	0,66	16,20	1,87
Cao	7	4,20	0,29 <sup>c</sup>	6,92	0,82	0,47	11,18	1,32
<sup>a</sup> Số phòng thử nghiệm cho kết quả dương tính. <sup>b</sup> Chênh lệch đáng kể so với phương pháp MPN ( $p < 0,05$ ). <sup>c</sup> Độ lặp lại lớn hơn đáng kể so với phương pháp MPN. <sup>d</sup> Độ lặp lại lớn hơn đáng kể so với phương pháp VRBG. <sup>e</sup> Chênh lệch đáng kể so với phương pháp VRBG ( $p < 0,05$ ).								



**Bảng A.2 – Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm đối với EB  
bằng phương pháp sử dụng môi trường VRBG**

Mức nhiễm	Số phòng thử nghiệm tham gia <sup>a</sup>	Trung bình các giá trị $\log_{10}$ của số khuẩn lạc trên gam	Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $RSD_r, \%$	Giới hạn lặp lại, $r$	Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $RSD_R, \%$	Giới hạn tái lập, $R$
<b>Phomat</b>								
Không nhiễm	0							
Thấp	12	3,03	0,06 <sup>b</sup>	1,94	0,17	0,10	3,43	0,29
Trung bình	12	4,06	0,11	2,69	0,31	0,12	2,93	0,34
Cao	12	4,93	0,13	2,59	0,36	0,29	5,84	0,81
<b>Sữa</b>								
Không nhiễm	0							
Thấp	12	2,27	0,50	22,19	1,42	0,50	22,19	1,42
Trung bình	12	3,27	0,21	6,46	0,60	0,39	11,87	1,09
Cao	11	4,19	0,20	4,69	0,55	0,32	7,57	0,89
<b>Bột mì</b>								
Không nhiễm	12	2,98	0,28	9,23	0,78	0,37	12,34	1,04
Thấp	12	2,95	0,30	10,28	0,86	0,44	14,99	1,25
Trung bình	12	3,06	0,28	9,15	0,79	0,42	13,70	1,18
Cao	12	3,16	0,28	8,84	0,79	0,37	11,74	1,04
<b>Thức ăn chế biến sẵn đông lạnh</b>								
Không nhiễm	0							
Thấp	11	2,52	0,14	5,69	0,40	0,28	11,23	0,80
Trung bình	12	3,30	0,14	4,35	0,40	0,28	8,39	0,78
Cao	12	3,98	0,21	5,24	0,59	0,37	9,22	1,03
<b>Súp lơ xanh đông lạnh</b>								
Không nhiễm	0							
Thấp	5	1,36	0,32	23,62	0,91	0,35	26,03	1,00
Trung bình	11	2,02	0,29	14,28	0,81	0,61	30,30	1,72
Cao	10	2,84	0,55	19,38	1,55	0,68	23,87	1,91
<b>Quả hạch</b>								
Không nhiễm	10	2,89	0,24	8,45	0,69	0,42	14,70	1,20
Thấp	9	3,64	0,44	12,06	1,24	0,71	19,57	2,01
Trung bình	7	4,13	0,47	11,38	1,32	0,68	16,50	1,92
Cao	7	4,14	0,49	11,86	1,39	0,55	13,37	1,56

<sup>a</sup> Số phòng thử nghiệm cho kết quả dương tính.

<sup>b</sup> Độ lặp lại lớn hơn đáng kể so với phương pháp sử dụng đĩa đếm Petrifilm™.

**Bảng A.3 – Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm đối với EB  
bằng phương pháp số đếm có xác suất lớn nhất (MPN)**

Mức nhiễm	Số phòng thử nghiệm tham gia <sup>a</sup>	Trung bình các giá trị $\log_{10}$ của số khuẩn lạc trên gam	Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $RSD_r$ , %	Giới hạn lặp lại, $r$	Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $RSD_R$ , %	Giới hạn tái lập, $R$
<b>Phomat</b>								
Không nhiễm	9	2,09	0,35	16,75	0,98	0,98	46,73	2,73
Thấp	11	3,12	0,31	9,79	0,86	0,34	10,80	0,94
Trung bình	12	4,23	0,38	8,89	1,05	0,38	8,89	1,06
Cao	9	4,82	0,26	5,31	0,72	0,27	5,60	0,76
<b>Sữa</b>								
Không nhiễm	7	1,67	0,31	18,60	0,87	0,58	34,61	1,62
Thấp	12	1,93	0,12	6,00	0,32	0,53	27,60	1,49
Trung bình	12	2,65	0,42	15,79	1,17	0,73	27,73	2,05
Cao	11	3,24	0,63	19,34	1,75	0,93	28,77	2,61
<b>Bột mì</b>								
Không nhiễm	12	2,44	0,47	19,20	1,31	0,47	19,20	1,31
Thấp	12	2,24	0,40	18,02	1,13	0,45	20,21	1,27
Trung bình	12	2,20	0,51	23,36	1,44	0,63	28,72	1,77
Cao	12	2,87	0,52	18,13	1,46	0,65	22,52	1,81
<b>Thực ăn chế biến sẵn đông lạnh</b>								
Không nhiễm	9	1,47	0,34	23,04	0,95	0,34	23,04	0,95
Thấp	9	2,42	0,42	17,43	1,18	0,42	17,43	1,18
Trung bình	12	3,34	0,38	11,42	1,07	0,64	19,30	1,80
Cao	8	4,30	0,52	12,21	1,47	0,52	12,21	1,47
<b>Súp lơ xanh đông lạnh</b>								
Không nhiễm	11	1,32	0,34	26,06	0,96	0,51	38,43	1,42
Thấp	11	1,58	0,36	23,02	1,02	0,48	30,27	1,34
Trung bình	11	2,11	0,45	21,18	1,25	0,78	36,72	2,17
Cao	10	2,71	0,48	17,73	1,34	0,87	32,07	2,43
<b>Quả hạch</b>								
Không nhiễm	9	2,67	0,34	12,76	0,95	0,34	12,76	0,95
Thấp	9	3,48	0,53	15,31	1,49	0,65	18,58	1,81
Trung bình	5	3,82	0,68	17,89	1,91	0,69	18,02	1,93
Cao	7	3,83	0,85	22,13	2,37	1,09	28,40	3,05

<sup>a</sup> Số phòng thử nghiệm cho kết quả dương tính.

### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse. Rapport de synthèse: Etude de reconduction ISO 16140 de la validation de la méthode 3MTM Petrifilm™ EB pour la numération des Enterobacteriaceae dans les produits alimentaires. Synthèse Reconduction Petrifilm Entérobactéries Version 1 (10 novembre 2009)
-