

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9975:2013

Xuất bản lần 1

**THỰC PHẨM --
ĐỊNH LƯỢNG COLIFORM VÀ *ESCHERICHIA COLI*
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG ĐĨA ĐEM PETRIFILM™**

*Foodstuffs - Enumeration of coliforms and Escherichia coli
using Petrifilm™ count plate*

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 9975:2013 được xây dựng trên cơ sở AOAC 991.14 *Coliforms and Escherichia coli Counts in Foods. Dry Rehydratable Film (Petrifilm™ E. coli/Coliform Count Plate™ and Petrifilm™ Coliform Count Plate™) Methods*;

TCVN 9975:2013 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 – Định lượng coliform và *Escherichia coli* bằng phương pháp sử dụng đĩa đếm Petrifilm™

*Foodstuffs – Enumeration of coliforms and Escherichia coli
using Petrifilm™ count plate*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sử dụng đĩa đếm Petrifilm™ để định lượng coliform và *Escherichia coli* trong thực phẩm.

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 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 cm². Chất tạo đông có trong thành phần của đĩa sẽ làm môi trường dinh dưỡng trong đĩa đông lại. Đĩa được ủ ấm ở 35 °C ± 1 °C trong thời gian thích hợp rồi đếm khuẩn lạc.

3 Thuốc 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 (KH₂PO₄) 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.

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 Chất chỉ thị 2,3,5-triphenyltetrazolium clorua.

3.3 Chất chỉ thị 5-brom-4-clo-3-indolyl- β -D-glucuronid.

3.4 Chất dinh dưỡng mật đỏ-tím (violet red bile nutrients) ¹⁾.

3.5 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 coliform Petrifilm^{TM 2)}

Đĩa chứa các chất dinh dưỡng mật đỏ-tím (3.4), chất tạo đông tan được trong nước lạnh (3.5) và chất chỉ thị 2,3,5-triphenyltetrazolium clorua (3.2) để tăng khả năng quan sát sự phát triển của khuẩn lạc. Vùng sinh trưởng được khoanh tròn trên mỗi đĩa chứa khoảng hai mươi ô vuông, mỗi ô có diện tích 1 cm² trên màng nền.

4.2 Đĩa đếm *E. coli*/coliform Petrifilm^{TM 2)}

Đĩa chứa các chất dinh dưỡng mật đỏ-tím (3.4), chất tạo đông tan được trong nước lạnh (3.5), chất chỉ thị 2,3,5-triphenyltetrazolium clorua (3.2) và chất chỉ thị hoạt độ glucuronidase là 5-brom-4-clo-3-indolyl- β -D-glucuronid (3.3), có thể đếm coliform và *E. coli* trên cùng một đĩa. Vùng sinh trưởng được khoanh tròn trên mỗi đĩa chứa khoảng hai mươi ô vuông, mỗi ô có diện tích 1 cm² trên màng nền.

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

4.4 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.

¹⁾ Tham khảo tiêu chuẩn APHA nêu trong *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Tuyển tập phương pháp kiểm nghiệm vi sinh vật trong thực phẩm)*, 3rd Ed., 1992, American Public Health Association (Hiệp hội Y tế Hoa Kỳ), Washington, DC 20001-3710, USA.

²⁾ 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.

- 4.5 Thiết bị đếm khuẩn lạc, loại chuẩn hoặc loại có độ khuếch đại và độ nhìn thấy tương đương.
- 4.6 Cân, có thể cân chính xác đến 0,1 g.
- 4.7 Thiết bị trộn tốc độ cao, có bình chứa vô trùng.
- 4.8 Tủ ấm, có thể duy trì được nhiệt độ ở $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 4.9 Nồi hấp áp lực, có thể duy trì nhiệt độ ở $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

6.1 Yêu cầu chung

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, trừ khi có quy định khác. Lắc các dung dịch pha loãng 25 lần với biên độ dao động 30 cm.

6.2 Thực phẩm nói chung

Cân vô trùng 50 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 g, cho vào bình trộn vô trùng của thiết bị trộn tốc độ cao (4.7). (Đối với mẫu đông lạnh, cân mẫu chưa rã đông. Ôn định mẫu thử đông lạnh ở $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong thời gian không quá 18 h để lấy 50 g phần mẫu thử, nếu cần). Thêm 450 ml nước dùng để pha loãng (3.1) và trộn trong 2 min. Thời gian trộn mẫu thử đến khi cây mẫu lên đĩa môi trường không được quá 15 min.

Nếu tổng khối lượng mẫu không đủ 50 g thì lấy khoảng một nửa rồi thêm thể tích nước dùng để pha loãng (3.1) cần thiết để có dung dịch pha loãng 10^{-1} . Tổng thể tích trong bình trộn phải phủ hoàn toàn dao trộn.

6.3 Hạt vờ

Cân vô trùng 50 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 g, cho vào bình trộn vô trùng của thiết bị trộn (4.7). Thêm 50 ml nước dùng để pha loãng (3.1) và lắc mạnh (lắc 50 lần với biên độ dao động 30 cm) để thu được dung dịch pha loãng 10^0 . Để yên trong 3 min đến 5 min và lắc ngay trước khi chuẩn bị dãy dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo và trước khi cấy mẫu.

6.4 Bột từ các loại hạt

Cân vô trùng 10 g mẫu thử, chính xác đến 0,1 g, cho vào bình trộn vô trùng của thiết bị trộn (4.7). Thêm 90 ml nước dùng để pha loãng (3.1) và lắc mạnh (lắc 50 lần với biên độ dao động 30 cm) để thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} . Để yên trong 3 min đến 5 min và lắc ngay trước khi chuẩn bị dãy dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo và trước khi cấy mẫu.

7 Cách tiến hành

7.1 Đếm coliform

Đặt đĩa đếm coliform Petrifilm™ (4.1) hoặc đĩa đếm *E. coli*/coliform Petrifilm™ (4.2) lên bề mặt phẳng. Nhấc tấm màng mỏng phía trên ra và nhỏ 1 ml huyền phù mẫu thử vào chính giữa màng nền. Đẩy cán thận tâm màng mỏng phía trên xuống chất cấy. Dàn đều huyền phù trên diện tích 20 cm² bằng cách ấn nhẹ xuống tâm dụng cụ dàn mẫu (4.3) (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 (4.8) theo phương nằm ngang với nắp hướng lên trên, không chổng cao quá 20 đĩa, ủ ấm đĩa ở nhiệt độ 35 °C ± 1 °C trong 24 h ± 2 h. Sau khi ủ xong, có thể bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng - 15 °C đến 7 ngày, nếu cần.

Đếm khuẩn lạc trên các đĩa này ngay sau giai đoạn ủ, sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc (4.5). 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 kèm theo một hoặc nhiều bọt khí (trong vòng đường kính một khuẩn lạc) trên các đĩa chứa từ 15 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc. Các khuẩn lạc có màu đỏ nhưng không có bọt khí không được coi là coliform. 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.

7.2 Đếm *E. coli*

Sử dụng đĩa đếm *E. coli*/coliform Petrifilm™ (4.2) và tiến hành theo 7.1, nhưng thời gian ủ là 48 h ± 4 h.

Trường hợp đếm *E. coli* và coliform trên cùng một đĩa thì ngay sau khi đếm coliform, tiếp tục ủ ấm đĩa ở nhiệt độ 35 °C ± 1 °C trong 24 h ± 2 h (tổng thời gian là 48 h ± 4 h).

Các khuẩn lạc *E. coli* có màu xanh kèm theo các bọt khí, các vi khuẩn coliform khác có màu đỏ kèm theo bọt khí.

8 Tính và biểu thị kết quả

Để tính số lượng coliform hoặc *E. coli*, 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 kếp 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 coliform hoặc *E. coli*.

Nếu không có đĩa nào có số đếm lớn hơn 15 khuẩn lạc với màu đặc trưng kèm bọt khí trở lên (màu đỏ đối với khuẩn lạc coliform, màu xanh đối với khuẩn lạc *E. coli*) 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 cm²). 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 của phép thử liên phòng thử nghiệm

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm được nêu trong Bảng A.1.

Bảng A.1 – Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm đối với *E. coli* và coliform tổng số

Sản phẩm	Mức nhiễm	Trung bình các giá trị \log_{10} của số khuẩn lạc trên gam	Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $RSD_r, \%$	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $RSD_R, \%$
Coliform tổng số từ các đĩa đếm coliform						
Thịt gà tây xay	Thấp	1,845	0,193	0,296	10,5	16,1
	Trung bình	2,235	0,361	0,361	16,2	16,2
	Cao	2,744	0,105	0,270	3,8	9,9
Nấm tươi	Thấp	4,241	0,278	0,808	6,6	19,0
	Trung bình	4,999	0,662	1,141	13,2	22,8
	Cao	5,197	0,120	0,872	2,3	16,8
Thịt bò trong nước sốt	Thấp	1,069	0,243	0,288	22,7	27,0
	Trung bình	2,062	0,257	0,391	12,5	18,9
	Cao	2,732	0,233	0,320	8,5	11,7
Phomat	Thấp	0,783	0,172	0,172	21,9	21,9
	Trung bình	2,411	0,092	0,206	3,8	8,5
	Cao	3,434	0,212	0,364	6,2	10,6
Bột mì	Thấp	2,635	0,291	0,874	11,1	33,2
	Trung bình	3,460	0,746	1,291	21,6	37,3
	Cao	4,049	0,873	1,550	21,6	38,3
Bột từ các loại hạt	Thấp	0,896	0,336	0,443	37,5	49,5
	Trung bình	1,345	0,486	0,699	36,2	52,0
	Cao	2,370	0,267	0,831	11,3	35,1

Bảng A.1 (tiếp theo)

Sản phẩm	Mức nhiễm	Trung bình các giá trị \log_{10} của số khuẩn lạc trên gam	Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $RSD_r, \%$	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $RSD_R, \%$
Coliform tổng số từ các đĩa đếm <i>E. coli</i>/coliform						
Thịt gà tây xay	Thấp	1,934	0,177	0,261	9,2	13,5
	Trung bình	2,216	0,285	0,315	12,9	14,2
	Cao	2,835	0,113	0,242	4,0	8,5
Nấm tươi	Thấp	4,550	0,079	0,722	1,7	15,9
	Trung bình	5,278	0,600	1,001	11,4	19,0
	Cao	5,227	0,346	0,817	6,6	15,6
Thịt bò trong nước sốt	Thấp	1,016	0,215	0,284	21,2	27,9
	Trung bình	2,060	0,256	0,295	12,4	14,3
	Cao	2,679	0,191	0,331	7,1	12,4
Phomat	Thấp	0,813	0,172	0,192	21,1	23,6
	Trung bình	2,507	0,109	0,238	4,3	9,5
	Cao	3,620	0,074	0,106	2,1	2,9
Bột mì	Thấp	2,639	0,243	0,883	9,2	33,4
	Trung bình	3,432	0,826	1,318	24,1	38,4
	Cao	4,064	0,929	1,557	22,9	38,8
Bột từ các loại hạt	Thấp	0,759	0,028	0,295	3,7	38,8
	Trung bình	1,403	0,378	0,728	26,9	51,8
	Cao	2,355	0,425	0,915	18,0	38,9
<i>E. coli</i> từ các đĩa đếm <i>E. coli</i>/coliform						
Thịt gà tây xay	Thấp	1,419	0,316	0,316	22,3	22,3
	Trung bình	1,923	0,364	0,364	18,9	18,9
	Cao	2,607	0,098	0,233	3,8	8,9
Nấm tươi	Thấp	2,500	0,261	0,343	10,4	13,7
	Trung bình	3,058	0,296	0,422	9,7	13,8
	Cao	3,436	0,715	0,760	20,8	22,1
Thịt bò trong nước sốt	Thấp	0,753	0,028	0,172	3,7	22,8
	Trung bình	0,991	0,154	0,601	15,6	60,7
	Cao	1,312	0,161	0,828	12,3	63,1

Bảng A.1 (kết thúc)

Sản phẩm	Mức nhiễm	Trung bình các giá trị \log_{10} của số khuẩn lạc trên gam	Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $RSD_r, \%$	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $RSD_R, \%$
Phomat	Thấp	0,819	0,190	0,190	23,2	23,2
	Trung bình	2,454	0,098	0,166	4,0	6,8
	Cao	3,440	0,112	0,123	3,2	3,6
Bột mì	Thấp	1,175	0,524	0,737	44,6	62,7
	Trung bình	3,095	0,967	1,362	31,3	44,0
	Cao	3,549	0,821	1,442	23,1	40,6
Bột từ các loại hạt	Thấp	0,716	0,067	0,236	9,4	33,0
	Trung bình	1,268	0,268	0,605	21,1	47,7
	Cao	2,314	0,265	0,857	11,4	37,0

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] AFNOR Validation of Alternative Methods. Report (Preliminary and Collaborative studies according to the NF EN ISO 16140 standard) ISO 16140 validation of 3M™ Petrifilm™ Coliforms count plates (CC) for gas producing colonies enumeration - Quantitative method. PCC Coliforms gas producers Synthesis (Version 2) September 3, 2008
-