

TCVN 8155 : 2009

ISO 13559 : 2002

Xuất bản lần 1

**BO, SỮA LÊN MEN VÀ PHOMAT TƯƠI –
ĐỊNH LƯỢNG CÁC VI SINH VẬT NHIỄM BẮN –
KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 30 °C**

*Butter, fermented milks and fresh cheese –
Enumeration of contaminating microorganisms –
Colony-count technique at 30 °C*

HÀ NỘI – 2009

**Bơ, sữa lên men và phomat tươi –
Định lượng các vi sinh vật nhiễm bẩn –
Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 °C**

*Butter, fermented milks and fresh cheese – Enumeration of
contaminating microorganisms – Colony-count technique at 30 °C*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng các vi sinh vật nhiễm bẩn bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 °C. Phương pháp này áp dụng cho bơ, sữa lên men và phomat tươi.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. 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, bổ sung (nếu có).

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 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 8128-1 : 2009 (ISO/TS 11133-1 : 2009), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 1: Hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng đối với việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong phòng thử nghiệm.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

Vi sinh vật nhiễm bẩn (contaminating microorganisms)

Vi khuẩn không sinh axit lactic, nấm men, nấm mốc tạo ra các khuẩn lạc có thể đếm được dưới các điều kiện được qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH 1 Vi khuẩn lactic của sản phẩm đặc thù không phát hiện được bằng phương pháp này.

CHÚ THÍCH 2 Trong một số loại sữa lên men cụ thể, thì vi khuẩn không sinh axit lactic, nấm men và nấm mốc có thể là một phần của hệ vi sinh vật tạo nên các đặc trưng của sản phẩm. Khi đó, cần thận trọng khi áp dụng phương pháp này.

4 Nguyên tắc

4.1 Chuẩn bị các đĩa rót sử dụng môi trường nuôi cấy qui định, sau đó cấy lên bề mặt môi trường này một lượng huyền phù ban đầu của sản phẩm. Trong cùng điều kiện, chuẩn bị các đĩa rót rồi cấy lên bề mặt các đĩa này một lượng qui định dung dịch pha loãng thập phân của huyền phù ban đầu.

4.2 Ủ các đĩa trong các điều kiện hiếu khí ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 72 h.

4.3 Tính số lượng các vi sinh vật trên gam mẫu thử từ số lượng khuẩn lạc thu được trên các đĩa ở độ pha loãng đã chọn sao cho thu được kết quả có ý nghĩa.

5 Thuốc thử, dịch pha loãng và môi trường cấy

5.1 Yêu cầu chung

Xem TCVN 6404 (ISO 7218) về thực hành phòng thử nghiệm.

5.2 Vật liệu cơ bản

Xem 5.1 của TCVN 6263 (ISO 8261).

5.3 Dịch pha loãng dùng cho mục đích chung

Xem 5.2 của TCVN 6263 (ISO 8261).

5.4 Dịch pha loãng dùng cho mục đích cụ thể

Xem 5.3 của TCVN 6263 (ISO 8261).

5.5 Phân phối, khử trùng và bảo quản dịch pha loãng

Xem 5.4 của TCVN 6263 (ISO 8261).

5.6 Môi trường nuôi cấy

5.6.1 Yêu cầu chung

Tất cả các thành phần của môi trường nuôi cấy không được chứa cacbohydrat. Điều quan trọng của phương pháp này là không có mặt cacbohydrat trong môi trường nuôi cấy. Chất lượng của môi trường không chứa cacbohydrat được sử dụng phải đảm bảo theo TCVN 8128-1-1 : 2009 (ISO 11133-1 : 2009).

5.6.2 Thành phần

Pepton từ casein	7,5 g
Pepton từ gelatin	7,5 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Thạch	10 g đến 15 g ¹⁾
Nước	1000 ml
¹⁾ Tùy thuộc vào sức đông của thạch.	

5.6.3 Chuẩn bị

5.6.3.1 Chuẩn bị từ môi trường hoàn chỉnh khô bán sẵn

Thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chỉnh pH để sau khi khử trùng pH là $7,5 \pm 0,1$ ở 25°C , nếu cần. Đối với sữa lên men, chỉnh pH để sau khi khử trùng pH là $8,0 \pm 0,1$ ở 25°C , nếu cần.

5.6.3.2 Chuẩn bị từ các thành phần cơ bản khô

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun nóng, theo thứ tự: pepton từ casein, pepton từ gelatin, natri clorua. Thêm thạch và đun đến sôi trong khi vẫn khuấy cho đến khi thạch tan hết hoặc làm nóng bằng hơi nước 30 min. Lọc qua giấy lọc, nếu cần. Chỉnh pH để sau khi khử trùng pH là $7,5 \pm 0,1$ ở 25°C , nếu cần. Đối với sữa lên men, chỉnh pH để sau khi khử trùng pH là $8,0 \pm 0,1$ ở 25°C , nếu cần.

5.6.3.3 Phân phối, khử trùng và bảo quản

Phân phối vào mỗi ống nghiệm (6.8), các lượng từ 12 ml đến 15 ml môi trường mỗi ống, hoặc vào bình cấy hoặc vào chai (6.9) các lượng từ 100 ml đến 150 ml. Khử trùng bằng hấp áp lực 15 min ở $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Nếu môi trường được sử dụng ngay thì làm nguội môi trường đến khoảng từ 44°C đến 47°C trong nồi cách thủy (6.5). Còn nếu môi trường chưa được sử dụng ngay thì bảo quản ở nơi tối từ 1°C đến 5°C trong không quá 3 tháng. Để tránh bị chậm trễ khi rót môi trường và khi bắt đầu kiểm tra vi sinh

vật thì làm tan chảy hoàn toàn môi trường trong nồi cách thủy đang sôi, rồi làm nguội trong một nồi cách thủy khác ở 44 °C đến 47 °C trước khi sử dụng.

6 Thiết bị, dụng cụ

Dụng cụ sử dụng một lần có thể được dùng để thay thế cho dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu có các qui định phù hợp. Các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần phải bền với việc khử trùng lặp lại và trở về hóa học.

Khử trùng tất cả các dụng cụ tiếp xúc với mẫu thử, với dịch pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy phù hợp với yêu cầu của TCVN 6263 (ISO 8261).

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thử nghiệm vi sinh [xem TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 6263 (ISO 8261)] và cụ thể như sau:

6.1 Tủ ấm, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 30 °C ± 1 °C.

6.2 Tủ sấy hoặc tủ ấm, được tuần hoàn không khí, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 50 °C ± 1 °C hoặc tủ ấm thông gió đối lưu.

6.3 Đĩa Petri, bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100 mm, hoặc khi nhiều hơn 0,1 ml dịch cấy thì sử dụng đĩa đường kính 140 mm.

6.4 Pipet chia độ, dung tích danh nghĩa 1 ml ± 0,02 ml và 10 ml ± 0,2 ml.

6.5 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 44 °C đến 47 °C và có khả năng đun sôi.

6.6 Dụng cụ đếm khuẩn lạc, được rọi sáng trên nền đen, có thấu kính khuếch đại với độ phóng đại 1,5 lần và có bộ đếm bằng cơ hoặc điện tử.

6.7 Máy đo pH, có độ chính xác ± 0,1 đơn vị pH ở 25 °C và có thể đọc đến 0,01 đơn vị.

6.8 Ống nghiệm, có nắp hoặc nút, có dung tích khoảng 20 ml.

6.9 Bình hoặc chai, có nắp hoặc nút, dung tích danh nghĩa từ 150 ml đến 250 ml.

Có thể sử dụng bình hoặc chai có nắp vặn bằng kim loại không độc.

6.10 Bộ dàn mẫu vô trùng, có đường kính khoảng 3,5 mm, dài 20 cm, được uốn vuông góc một đầu dài 3 cm. Đầu cuối được làm nhẵn bằng cách nung.

7 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không được hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình bảo quản và vận chuyển.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị phần mẫu thử và huyền phù ban đầu

8.1.1 Yêu cầu chung

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) về các yêu cầu chung và TCVN 6263 (ISO 8261) về các yêu cầu cụ thể.

Chú ý về vô trùng. Các thao tác trong 8.1 và 8.2 không được thực hiện dưới ánh sáng trực tiếp mặt trời.

8.1.2 Bơ

Xem 8.2.6 của TCVN 6263 (ISO 8261).

8.1.3 Phomat tươi

Xem 8.2.4 của TCVN 6263 (ISO 8261).

8.1.4 Sữa lên men

Xem 8.2.9 của TCVN 6263 (ISO 8261).

8.2 Các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

8.3 Chuẩn bị các đĩa

Rót từ 12 ml đến 15 ml môi trường đã chuẩn bị (5.6) vào các đĩa Petri (6.3) và để cho đông đặc. Làm khô các đĩa, tốt nhất là mở nắp và bề mặt thạch xuống dưới, để trong tủ sấy hoặc tủ ẩm (6.2) ở 50 °C trong 30 min. Xem thêm TCVN 6404 (ISO 7218).

Cách khác, có thể sử dụng các đĩa Petri đường kính 140 mm (6.3) khi sử dụng dịch cấy > 0,1 ml.

Có thể làm khô các đĩa trong tủ ẩm thông gió đối lưu (6.2) 30 min thay cho làm khô trong tủ ẩm.

8.4 Cấy và ủ

8.4.1 Dùng pipet vô trùng (6.4) cho vào hai đĩa đã chuẩn bị (8.3), mỗi đĩa 0,1 ml huyền phù ban đầu của sản phẩm.

8.4.2 Lặp lại thao tác này khi sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo.

8.4.3 Dùng bộ dàn mẫu vô trùng (6.10) để dàn nhanh dịch cấy một cách cẩn thận lên bề mặt đĩa, chú ý không chạm vào thành đĩa. Sử dụng một bộ dàn mẫu vô trùng cho mỗi đĩa. Để yên các đĩa có nắp đậy khoảng 15 min trên bàn để cho dịch cấy hấp thụ vào các đĩa.

8.4.4 Lật úp các đĩa đã chuẩn bị và đặt vào tủ ẩm (6.1) ở 30 °C trong 72 h ± 2 h. Không chồng cao quá sáu đĩa. Các chồng đĩa được để tách riêng, cách trần và thành tủ [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

8.5 Đếm khuẩn lạc

Sau khi ủ (8.4.4), sử dụng dụng cụ đếm khuẩn lạc (6.6) để đếm các khuẩn lạc. Đếm các khuẩn lạc đặc trưng đối với vi sinh vật nhiễm bẩn trong mỗi đĩa chứa không nhiều hơn 150 khuẩn lạc. Không đếm các khuẩn lạc nhỏ vì chúng không điển hình cho các vi sinh vật nhiễm bẩn.

Thông tin về nguồn gốc sự nhiễm bẩn có thể thu được bằng cách kiểm tra khuẩn lạc có mặt. Điều này có thể rất giá trị do đó cần ghi lại các loại khuẩn lạc có mặt (ví dụ: nấm men, mốc, *Bacillus* sp. v.v...thuần khiết hay hỗn tạp).

9 Tính và biểu thị kết quả

9.1 Tính kết quả

Giữ lại các đĩa có nhiều hơn 10 khuẩn lạc và ít hơn 150 khuẩn lạc đặc trưng ở hai độ pha loãng liên tiếp.

Tính số lượng, N , vi sinh vật nhiễm bẩn trên gam mẫu thử, theo công thức sau:

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

trong đó

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đặc trưng đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại;

n_1 là số đĩa của độ pha loãng thứ nhất được giữ lại;

n_2 là số đĩa của độ pha loãng thứ hai được giữ lại;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

9.2 Biểu thị kết quả

9.2.1 Làm tròn kết quả thu được trong 9.1 đến hai chữ số có nghĩa. Đối với chữ số thứ ba, làm tròn chữ số thứ ba này đến zero gần nhất. Nếu chữ số thứ ba này là 5 thì làm tròn đến số thấp hơn nếu chữ số thứ hai là chẵn và làm tròn đến số cao hơn nếu số thứ hai là số lẻ.

VÍ DỤ

Làm tròn	234 thành 230
	235 thành 240
	225 thành 220
	245 thành 240

9.2.2 Nếu chỉ có số đếm nhỏ hơn 10, thì báo cáo số lượng vi sinh vật trên mỗi gam là "ít hơn $10 \times 1/d$ " (trong đó d là giá trị tương ứng với độ pha loãng thấp nhất).

9.2.3 Nếu chỉ có các số đếm lớn hơn 150, thì tính số đếm ước lượng từ các đĩa có số đếm gần 150 khuẩn lạc và nhân với số nghịch đảo của giá trị ứng với độ pha loãng cao nhất. Báo cáo kết quả là "Số lượng vi sinh vật ước tính trên gam sản phẩm".

9.2.4 Kết quả được biểu thị bằng số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10.

VÍ DỤ:

Ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}): 83 khuẩn lạc và 97 khuẩn lạc

Ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}): 13 khuẩn lạc và 10 khuẩn lạc

Tính kết quả theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{83 + 97 + 13 + 10}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = 9227$$

Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa là 9200 hoặc $9,2 \times 10^3$ vi sinh vật nhiễm bẩn trong một gam mẫu thử.

10 Độ chụm**10.1 Yêu cầu chung**

Xem TCVN 6404 (ISO 7218) về thông tin giới hạn tin cậy để ước tính số lượng nhỏ vi sinh vật.

CHÚ THÍCH Hiện nay chưa có số liệu chi tiết về độ chụm từ nghiên cứu cộng tác. Tuy nhiên, do tính đa dạng của vi sinh vật nhiễm bẩn lớn phụ thuộc vào từng loại sản phẩm, nguồn gốc địa lý và nơi sản xuất, nên việc đưa số liệu về độ chụm của nghiên cứu cộng tác dựa trên các chủng cụ thể là chưa thích hợp.

10.2 Độ lặp lại

Kinh nghiệm cho thấy rằng nếu hai phòng thử nghiệm độc lập trên cùng một mẫu thử thường cho kết quả cao hơn 30 % so với kết quả thấp hơn thì cần kiểm tra lại qui trình để tìm ra sai lỗi.