

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 6505-2:2007**

**ISO 11866-2:2005**

Xuất bản lần 2

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – ĐỊNH LƯỢNG *ESCHERICHIA COLI* GIẢ ĐỊNH – PHẦN 2: KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 44 °C SỬ DỤNG MÀNG LỌC**

*Milk and milk products – Enumeration of presumptive Escherichia coli  
Part 2: Colony-count technique at 44 °C using membranes*

HÀ NỘI – 2007

## Lời nói đầu

TCVN 6505-2:2007 thay thế TCVN 6505-3:1999;

TCVN 6505-2:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 11866-2:2005/ IDF 170-2:2005;

TCVN 6505-2:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

TCVN 6505:2007 (ISO 11866:2005) *Sữa và sản phẩm sữa - Định lượng Escherichia coli* giả định, bao gồm các phần sau:

- Phần 1: Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất sử dụng 4-metylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronit (MUG);
- Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng màng lọc.

## Sữa và sản phẩm sữa – Định lượng *Escherichia Coli* giả định Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng màng lọc

*Milk and milk products – Enumeration of presumptive Escherichia coli*  
Part 2 : Colony-count technique at 44 °C using membranes

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng *E.coli* giả định bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng;
- sữa bột, whey bột, buttermilk bột và lactoza;
- casein axit, casein lactic và casein rennet;
- caseinat, whey bột axit;
- phomat và phomat chế biến;
- bơ;
- sản phẩm sữa đông lạnh (bao gồm cả kem lạnh thực phẩm);
- custard, món tráng miệng và cream.

Phương pháp này thích hợp đối với các mẫu có số lượng *E.coli* giả định dự đoán tương đối lớn (lớn hơn 100 *E.coli* trong một gam, hoặc lớn hơn 10 *E.coli* trong một mililit).

**CHÚY – Một vài chủng *E.coli* gây bệnh không phát triển được ở 44 °C.**

### 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 ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

## TCVN 6505-2:2007

TCVN 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.

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.

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 3.1

***E.coli* giả định** (presumptive *Escherichia coli*)

các vi khuẩn ở nhiệt độ 44 °C hình thành các khuẩn lạc (màu hồng) cho phản ứng indol dương tính trên màng axetat xenluloza được phủ trên thạch mật-trypton, dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này.

### 4 Nguyên tắc

#### 4.1 Phục hồi

Cấy một lượng xác định mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu lên các màng axetat xenlulo phủ trên thạch glutamat khoáng đã biến tính, rồi ủ ở 37 °C trong 4 giờ.

**CHÚ THÍCH** Qui trình này có thể làm khôi phục lại các *E.coli* giả định bị hư hại do bảo quản đông lạnh, các điều kiện làm khô hoặc làm lạnh, hoặc bị hư hại bởi quá trình xử lý nhiệt hoặc hoá chất. Qui trình này cũng cho phép khuyếch tán nồng độ cao của bất kỳ cacbonhydrat nào có thể lên men có mặt trong mẫu thử mà có thể gây cản trở việc tạo indol trong suốt giai đoạn phân lập tiếp theo.

#### 4.2 Phân lập

Các màng ở giai đoạn phục hồi trên thạch glutamat khoáng biến tính được chuyển sang thạch mật trypton. Sau đó ủ ở 44 °C trong 18 giờ đến 24 giờ.

#### 4.3 Phát hiện

Sự có mặt của *E.coli* giả định trên màng được chứng minh bằng sự sinh indol của từng khuẩn lạc.

#### 4.4 Tính

Số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của *E.coli* giả định trong một gam hoặc một mililit mẫu thử được tính từ số lượng các khuẩn lạc indol dương tính thu được trên các màng ở các mức pha loãng được chọn sao cho thu được kết quả có ý nghĩa.

## 5 Dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

### 5.1 Khái quát

Đối với thực hành phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 6263 (ISO 8261).

Đối với môi trường và thuốc thử đã chuẩn bị nhưng không sử dụng ngay, nếu không có qui định khác, phải bảo quản chỗ tối ở nhiệt độ từ 0 °C đến +5 °C không quá 1 tháng trong các điều kiện không làm thay đổi thành phần của chúng.

### 5.2 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

### 5.3 Môi trường cấy và thuốc thử

#### 5.3.1 Môi trường phục hồi: Thạch glutamat khoáng biển tinh

##### 5.3.1.1 Thành phần

Natri glutamat	6,35 g
Lactoza	10,0 g
Natri focmat	0,25 g
L(-)Xystin	0,02 g
Axit L(-) aspactic	0,02 g
L(+) arginin	0,024 g
Thiamin	0,001 g
Axit nicotinic	0,001 g
Axit pantotenic	0,001 g
Magie sunfat ngậm 7 phân tử nước ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,100 g
Sắt (III) amoni xytrat <sup>a</sup>	0,010 g
Canxi clorua ngậm 2 phân tử nước ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	0,010 g
Dikali hydro phosphat ( $K_2HPO_4$ )	0,90 g
Amoni clorua	2,5 g
Thạch	12 g đến 18 g <sup>b</sup>
Nước	1 000 ml
<sup>a</sup> Hàm lượng sắt ít nhất là 15 % (phần khối lượng).	
<sup>b</sup> Tùy thuộc vào sức đông của thạch.	

### 5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan amoni clorua trong nước. Cho thêm các thành phần khác và đun đến sôi.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng pH phải là 6,7, ở 25 °C.

Chuyển các lượng 100 ml môi trường này sang các vật chứa thích hợp.

Khử trùng 10 phút ở nhiệt độ 115 °C trong nồi hấp áp lực (6.1).

### 5.3.1.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót các lượng từ 12 ml đến 15 ml môi trường đã làm nguội đến 45 °C vào các đĩa Petri vô trùng (6.12) và để cho đông đặc lại. Các đĩa này có thể bảo quản đến 4 ngày ở 0 °C đến +5 °C.

Ngay trước khi sử dụng, sấy khô các đĩa, tốt nhất là mở nắp ra và lật úp mặt thạch xuống và đặt trong tủ sấy hoặc buồng sấy (6.3) trong 30 phút ở 50 °C hoặc cho đến khi trên bề mặt môi trường không còn các giọt hơi nước đọng lại.

Thạch cần phải đủ khô để hơi nước không xuất hiện trong 15 phút khi dàn chất cấy (1 ml).

## 5.3.2 Môi trường chọn lọc: Thạch mật-trypton

### 5.3.2.1 Thành phần

Trypton	20,0 g
Muối mật	1,5 g
Thạch	12 g đến 18 g <sup>a</sup>
Nước	1 000 ml
<sup>a</sup> Phụ thuộc vào sức đông của thạch.	

### 5.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước và đun đến sôi.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng pH phải là 7,2, ở 25 °C.

Chuyển các lượng 500 ml môi trường này sang các vật chứa thích hợp.

Khử trùng môi trường 15 phút ở nhiệt độ 121 °C trong nồi hấp áp lực (6.1).

### 5.3.2.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót các lượng từ 12 ml đến 15 ml môi trường đã làm nguội đến 45 °C vào các đĩa Petri vô trùng (6.12) và để cho đông đặc lại. Các đĩa này có thể bảo quản đến 4 ngày ở 0 °C đến +5 °C.

Ngay trước khi sử dụng, sấy khô các đĩa, tốt nhất là mở nắp ra và lật úp mặt thạch xuống và đặt trong tủ sấy hoặc buồng sấy (6.3) trong 30 phút ở 50 °C hoặc cho đến khi trên bề mặt môi trường không còn các giọt hơi nước đọng lại.

### 5.3.3 Thuốc thử phát hiện indol (thuốc thử Vracko và Sherris)

#### 5.3.3.1 Thành phần

4-Dimethylaminobenzaldehyt	5,0 g
Axit clohydric, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$	100 ml

#### 5.3.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan 4-Dimethylaminobenzaldehyt trong axit clohydric bằng cách đun nóng, nếu cần. Thuốc thử này có thể bảo quản nơi tối, tối đa đến 3 tháng ở 0 °C đến +5 °C

## 6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Đối với các yêu cầu chung, xem TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 6263 (ISO 8261). Dụng cụ thuỷ tinh phải bền khi khử trùng lại.

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

**6.1 Nồi hấp áp lực**, có thể duy trì nhiệt độ ở 115 °C ± 1 °C và 121 °C ± 1 °C.

Về chi tiết, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

**6.2 Tủ ấm**, có thể duy trì nhiệt độ 37 °C ± 1 °C và 44 °C ± 0,5 °C.

**6.3 Tủ sấy hoặc buồng sấy**, được thông gió đối lưu, có thể duy trì nhiệt độ ở 50 °C ± 1 °C.

**6.4 Tủ lạnh** (dùng để bảo quản môi trường và thuốc thử đã chuẩn bị), có thể duy trì nhiệt độ ở 0 °C đến 5 °C.

**6.5 Màng axetat xenlulo**, cỡ lỗ từ 0,45 µm đến 1,2 µm hoặc đường kính 85 mm.

**6.6 Đèn cực tím sóng dài (UV)**, có bước sóng từ 360 nm đến 366 nm, được gắn với bộ lọc thích hợp để loại bỏ bức xạ UV dưới 310 nm.

**6.7 Bộ kẹp đầu tù**, vô trùng, dài khoảng 12 cm.

**6.8 pH-met**, có độ chính xác đến ± 0,1 đơn vị pH ở 25 °C.

**6.9 Pipet**, được hiệu chuẩn để sử dụng cho vi khuẩn học, dung tích danh định là 1 ml, được chia vạch 0,1 ml và lỗ thoát có đường kính từ 2 mm đến 3 mm.

**6.10 Ống đồng**, để chuẩn bị môi trường và thuốc thử.

**6.11 Bình hoặc chai**, để khử trùng và bảo quản môi trường cấy.

**6.12 Đĩa Petri**, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, đường kính khoảng 90 mm hoặc 100 mm.

**6.13 Bộ dàn mẫu**, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, ví dụ: que bằng thủy tinh, đường kính khoảng 3,5 mm, dài 20 cm, được uốn vuông góc tại một đầu dài khoảng 3 cm và đầu cuối được làm nhẵn bằng cách đốt nóng.

## 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 TCVN 6400 (ISO 707).

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6263 (ISO 8261).

## 9 Cách tiến hành

**CHÚ THÍCH** Nếu cần phải kiểm tra về độ lặp lại (xem Điều 11), thì thực hiện hai phép xác định độc lập theo 9.1 đến 9.5.

### 9.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng tiếp theo

Chuẩn bị phần mẫu thử, huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng đầu tiên) và các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo TCVN 6263 (ISO 8261).

### 9.2 Phục hồi

**9.2.1** Dùng bộ kẹp vô trùng (6.7), đặt màng axetat xenlulo (6.5) lên bề mặt khô của hai đĩa thạch glutamat (5.3.1.3), chú ý không để lẫn bọt khí vào trong màng lọc. Dùng bộ dàn mẫu vô trùng (6.13) để dàn phẳng màng.

Dùng pipet vô trùng (6.9), lấy 1 ml mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu cho vào giữa màng. Dùng bộ dàn mẫu vô trùng (6.13), dàn đều chất cấy trên khắp bề mặt màng, tránh để tràn khỏi màng.



**9.2.2** Dùng pipet vô trùng (6.9) khác, cấy các lượng thể tích tương tự của mẫu thử hoặc huyền phù đã được pha loãng tiếp lên các màng khác, như qui định trong 9.2.1.

**9.2.3** Để các đĩa đã cấy theo phương nằm ngang ở nhiệt độ phòng trong khoảng 15 phút cho đến khi chất cấy đã ngấm sâu vào trong thạch. Ủ ấm các đĩa này 4 giờ trong tủ ấm (6.2) ở nhiệt độ 37 °C với màng/mặt thạch hướng lên trên.

### **9.3 Chuyển sang môi trường chọn lọc và ủ ấm**

**9.3.1** Dùng bộ kẹp vô trùng (6.7), chuyển màng từ thạch glutamat (5.3.1.3) sang các đĩa thạch mật trypton (5.3.2.3).

**CẢNH BÁO – Màng ẩm ướt sẽ dính vào bề mặt thạch. Tránh để lẫn bọt khí. Không sử dụng bộ dàn mẫu.**

**9.3.2** Ủ ấm các đĩa này từ 18 giờ đến 24 giờ trong tủ ấm (6.2) ở nhiệt độ 44 °C với màng/mặt thạch hướng lên trên. Không chồng các đĩa quá ba lớp.

### **9.4 Phát hiện về việc sinh indol bởi các khuẩn lạc trên màng**

**9.4.1** Ghi nhãn cho từng đĩa (9.3.2) để nhận biết.

**9.4.2** Dùng pipet lấy 2 ml thuốc thử indol (5.3.3) cho vào nắp để theo phương nằm ngang.

**9.4.3** Dùng bộ kẹp vô trùng (6.7), tháo màng ra khỏi bề mặt thạch và nhúng vào thuốc thử indol. Nếu cần, nghiêng nắp sao cho toàn bộ màng được thấm ướt thuốc thử indol. Sau 5 phút, dùng pipet hút hết thuốc thử còn dư.

**9.4.4** Các khuẩn lạc dương tính indol hiện màu hồng trong vài phút. Nếu cần ghi chép thường xuyên thì đặt màng dưới đèn cực tím (6.6) trong 30 phút.

### **9.5 Định lượng**

Đếm các khuẩn lạc indol dương tính (màu hồng) trên các màng, tốt nhất là các màng có chứa từ 10 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc màu hồng.

Đối với các chi tiết về kỹ thuật đếm khuẩn lạc, xem TCVN 4884 (ISO 4833).

## **10 Tính và biểu thị kết quả**

### **10.1 Tính**

Tính  $N$ , số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của *E.coli* giả định trên gam hoặc trên mililit sản phẩm bằng công thức sau:

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

trong đó

$\sum a$  là tổng các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại sau hai độ pha loãng liên tiếp;

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

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

$d$  hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại.

**CHÚ THÍCH 1** Hệ số pha loãng của  $10^{-2}$  có nghĩa là  $10^{-2}$  g hoặc  $10^{-2}$  ml của mẫu thử chưa pha loãng (ở trạng thái đã pha loãng) được đưa vào đĩa.

**CHÚ THÍCH 2** Độ pha loãng thấp hơn là dung dịch có hàm lượng mẫu thử cao hơn.

## 10.2 Biểu thị kết quả

**10.2.1** Làm tròn các kết quả tính được đến hai chữ số có nghĩa. Nghĩa là, nếu chữ số sau cùng dưới 5 thì giữ nguyên số đứng trước; nếu chữ số sau cùng lớn hơn hoặc bằng 5 thì tăng chữ số đứng trước lên một đơn vị. Tiến hành theo bậc thang cho đến khi thu được hai chữ số có nghĩa.

Lấy kết quả là số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của *E.coli* giả định trên mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác) được biểu thị là số từ 1,0 đến 9,9 nhân lũy thừa của 10.

**10.2.2** Nếu có hai đĩa tương ứng với mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) chứa ít hơn 10 khuẩn lạc, thì báo cáo kết quả như sau:

- ít hơn 10 đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) *E.coli* giả định trên mililit (sản phẩm dạng lỏng);
- ít hơn  $10 \times 1/d$  đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) *E.coli* giả định trên gam (sản phẩm dạng khác), trong đó  $d$  là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu;

**10.2.3** Nếu chỉ có các đĩa chứa nhiều hơn 300 khuẩn lạc thì tính số ước tính từ các đĩa chứa gần 150 khuẩn lạc và nhân số này với số đảo của giá trị tương ứng với độ pha loãng cao nhất.

Báo cáo kết quả: "số ước tính đơn vị hình thành khuẩn lạc *E.coli* giả định trên mililit hoặc trên gam".

## 10.3 Ví dụ về cách tính

Số đếm của khuẩn lạc *E.coli* giả định ở 44 °C cho kết quả như sau:

- ở độ pha loãng thứ nhất giữ lại ( $10^{-2}$ ): 138 khuẩn lạc và 125 khuẩn lạc;

- ở độ pha loãng thứ hai giữ lại ( $10^{-3}$ ): 20 khuẩn lạc và 18 khuẩn lạc

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{138 + 125 + 20 + 18}{[2 + (0,1 \cdot 2)]10^{-2}} = \frac{301}{0,022} = 13680$$

Làm tròn kết quả theo 10.2.1 ta có 14 000 hoặc  $1,4 \times 10^4$  đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) *E.coli* giả định trên gam hoặc trên mililit sản phẩm.

## 11 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ độc lập, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, trên vật liệu thử giống hệt nhau, do cùng một người phân tích, sử dụng cùng một thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được lớn hơn 50 % của kết quả thấp hơn.

Nếu yêu cầu về độ lặp lại không thoả mãn trong nhiều hơn hoặc bằng 5 % trường hợp, thì phải tìm ra nguyên nhân gây sai lệch.

CHÚ THÍCH Các định nghĩa về độ lặp lại được đưa ra trong TCVN 6910-1 (ISO 6725-1).

## 12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các 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.
- kết quả thử nghiệm thu được, nêu rõ phương pháp biểu thị đã sử dụng.

## Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
  - [2] TCVN 4884 (ISO 4833), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 °C.
  - [3] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.
  - [4] TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
  - [5] TCVN 7135 (ISO 6391), Thịt và sản phẩm thịt. Định lượng *E.coli*. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng màng lọc.
-