

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9716:2013

ISO 8199:2005

Xuất bản lần 1

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC – HƯỚNG DẪN CHUNG VỀ
ĐẾM VI SINH VẬT BẰNG NUÔI CẤY**

Water quality – General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture

HÀ NỘI – 2013

Mục lục

	Trang
Lời nói đầu.....	4
Lời giới thiệu.....	5
1 Phạm vi áp dụng.....	7
2 Tài liệu viện dẫn.....	7
3 Nguyên tắc.....	8
4 Quy định chung.....	8
5 Dung dịch pha loãng và môi trường nuôi cấy.....	8
6 Khử khuẩn dụng cụ và bình thủy tinh.....	11
7 Mẫu.....	12
8 Đếm sau khi nuôi cấy các phần mẫu thử trong (hoặc trên) môi trường đặc.....	12
9 Đếm bằng phương pháp nuôi cấy trong môi trường lỏng.....	24
Phụ lục A (Tham khảo) Tiêu chí chọn kỹ thuật đếm.....	32
Phụ lục B (Tham khảo) Các bảng MPN.....	38
Thư mục tài liệu tham khảo.....	48

TCVN 9716:2013

Lời nói đầu

TCVN 9716:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 8199:2005.

TCVN 9716:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 147 *Chất lượng nước* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Kỹ thuật phân lập và đếm vi sinh vật dựa vào khả năng phát triển của chúng trên môi trường nuôi cấy đặc trưng có ý nghĩa quan trọng và được sử dụng rộng rãi để đánh giá chất lượng vi sinh trong nước. Mục đích của tiêu chuẩn này là tập hợp các thông tin chung của các kỹ thuật đếm khác nhau trong một văn bản để tránh lặp lại các chi tiết kỹ thuật trong những tiêu chuẩn riêng lẻ và để tạo điều kiện thuận lợi lựa chọn kỹ thuật phù hợp nhất cho các vấn đề cụ thể.

Chất lượng nước – Hướng dẫn chung về đếm vi sinh vật bằng nuôi cấy

Water quality – General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture

CẢNH BÁO – Người sử dụng tiêu chuẩn này cần phải thành thạo với các thực hành trong phòng thí nghiệm thông thường. Tiêu chuẩn này không đề cập tới mọi vấn đề an toàn đối với người sử dụng tiêu chuẩn, nếu có. Người sử dụng có trách nhiệm xây dựng biện pháp bảo đảm an toàn và sức khỏe phù hợp với các qui định của quốc gia.

QUAN TRỌNG – Chỉ những nhân viên đã được đào tạo phù hợp mới được tiến hành phép thử theo tiêu chuẩn này.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này hướng dẫn thực hiện các thao tác thông dụng đối với từng kỹ thuật kiểm tra vi sinh vật trong nước, cụ thể là chuẩn bị mẫu, môi trường nuôi cấy và dụng cụ. Tiêu chuẩn cũng mô tả các kỹ thuật đếm đang hiện hành khác nhau và các tiêu chí để chọn lựa kỹ thuật cụ thể. Tiêu chuẩn này chủ yếu nhằm áp dụng cho vi khuẩn, nấm men và nấm mốc. Một số khía cạnh cũng áp dụng được với virus và ký sinh trùng.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là 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 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

TCVN 8880 (ISO 19458), *Chất lượng nước – Lấy mẫu để phân tích vi sinh vật.*

3 Nguyên tắc

Nguyên tắc chung của các kỹ thuật này bao gồm cấy một thể tích định sẵn mẫu nước lên hoặc vào môi trường nuôi cấy (đặc hoặc lỏng). Giả sử rằng sau khi nuôi cấy mỗi vi sinh vật có mặt đều tạo nên một khuẩn lạc nhìn thấy trên bề mặt môi trường đặc hoặc làm thay đổi về các đặc tính có thể quan sát được của môi trường lỏng. Việc lựa chọn các phương pháp cụ thể không chỉ phụ thuộc vào bản chất của các vi sinh vật được tìm kiếm mà còn phụ thuộc vào tính chất của nước và lý do cần phải kiểm tra.

4 Quy định chung

Sự đồng nhất về nhiệt độ và thời gian (nuôi cấy): Các khoảng nhiệt độ và thời gian cho phép dưới đây trong quá trình nuôi cấy và bảo quản được áp dụng trong trường hợp thích hợp đối với các sinh vật dự định kiểm tra, trừ các trường hợp quy định trong tiêu chuẩn cụ thể.

Nhiệt độ bảo quản: $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$; $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$; $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$;

Nhiệt độ nuôi cấy: $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$; $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$;

Nhiệt độ khử khuẩn: $(115 \pm 3) ^\circ\text{C}$; $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$; $(170 \pm 10) ^\circ\text{C}$;

Thời gian nuôi cấy: $(21 \pm 3) \text{ h}$; $(44 \pm 4) \text{ h}$; $(68 \pm 4) \text{ h}$.

Khi cần có thể quy định nhiệt độ và thời gian khác đối với các phương pháp cụ thể.

Các giới hạn nhiệt độ trên cho nuôi cấy phải tuân thủ nghiêm ngặt (có thể ảnh hưởng lớn đến sự phát triển). Giới hạn nhiệt độ dưới cho nuôi cấy có thể dao động trong khoảng thời gian ngắn, ví dụ do mở cửa tủ nuôi cấy, nhưng cần nhanh chóng việc phục hồi lại nhiệt độ chuẩn.

Dung sai về thể tích và khối lượng: Trừ khi có các qui định khác, dải của giá trị đo được được chấp nhận là: giá trị công bố $\pm 5 \%$.

5 Dung dịch pha loãng và môi trường nuôi cấy

5.1 Quy định chung

5.1.1 Yêu cầu về chất lượng

Sử dụng các thành phần có chất lượng đồng nhất và các hóa chất cấp phân tích để chuẩn bị môi trường. Các cấp khác của hóa chất có thể được sử dụng nếu chúng cho các kết quả phân tích tương tự. Ngoài ra, có thể sử dụng môi trường đã loại nước hoàn toàn hoặc dung dịch pha loãng. Cần tuân thủ nghiêm ngặt theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Sử dụng nước loại khoáng hoặc nước cất bằng thiết bị thủy tinh không chứa các chất có thể ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật dưới điều kiện thử nghiệm. Nước phải phù hợp yêu cầu của TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), loại 3.

Trừ khi có các qui định khác, thông thường khi chuẩn bị môi trường nuôi cấy vi sinh vật thì các thành phần được thêm vào một thể tích nước chứ không để định mức tới thể tích xác định.

Trước khi sử dụng, kiểm tra chất lượng môi trường, dung dịch pha loãng và màng lọc, ví dụ theo quy trình mô tả tại ISO 7704, TCVN 8128-1(ISO/TS 11133-1) hoặc TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2).

5.1.2 Khử khuẩn

Rót các dung dịch pha loãng và môi trường nuôi cấy vào bình chứa thích hợp để khử khuẩn bằng nồi hấp. Nhiệt độ (121 ± 3) °C trong 15 min là đủ đối với hầu hết các mục đích. Tuy nhiên, khoảng thời gian và nhiệt độ khử khuẩn khác đôi khi được yêu cầu sử dụng, tùy thuộc theo từng tiêu chuẩn cụ thể.

Ngoài ra, với các chất không bền nhiệt, việc loại bỏ các vi sinh vật có thể hiệu quả hơn bằng cách lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 0,2 µm, do nhà sản xuất quy định là thích hợp để "khử khuẩn".

5.2 Dung dịch pha loãng

Các dung dịch pha loãng dưới đây được sử dụng phổ biến cho vi sinh vật trong nước. Tuy nhiên, danh mục chưa đầy đủ hết và có thể sử dụng các dung dịch pha loãng thích hợp khác.

Sau khi pha, cho từng dung dịch vào chai và khử khuẩn, ví dụ khử khuẩn tại (121 ± 3) °C trong 15 min. Cách khác là, dung dịch pha loãng có thể cho vào từng chai trong điều kiện vô khuẩn sau khi khử khuẩn. Bảo quản ở nhiệt độ phòng hoặc trong tủ lạnh ở (5 ± 3) °C tối đa 6 tháng. Nếu dung dịch pha loãng có bất cứ biểu hiện thay đổi nào thì loại bỏ đi.

5.2.1 Dung dịch muối

Thành phần

Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước (xem 5.1.1)	1000 mL

Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần thiết. Điều chỉnh pH bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$] hoặc axit clohydrit [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$] sao cho sau khi khử khuẩn (xem 5.1.2) dung dịch có pH tương đương $7,0 \pm 0,5$ tại 25 °C.

5.2.2 Pepton pha loãng

Thành phần

Cazein phân hủy bằng enzym (pepton)	1,0 g
Nước (xem 5.1.1)	1000 mL

Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần thiết. Điều chỉnh pH bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$] hoặc axit clohydrit [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$] sao cho sau khi khử khuẩn (xem 5.1.2) dung dịch có pH tương đương $7,0 \pm 0,5$ tại 25 °C

TCVN 9716:2013

5.2.3 Dung dịch muối pepton

Thành phần

Cazein phân hủy bằng enzym (pepton)	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước (xem 5.1.1)	1000 mL

Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần thiết. Điều chỉnh pH bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$] hoặc axit clohydrit [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$] để sau khi khử khuẩn (xem 5.1.2) dung dịch có pH tương đương $7,0 \pm 0,5$ tại 25°C

5.2.4 Dung dịch Ringer, nồng độ 1/4

Thành phần

Natri clorua (NaCl)	2,25 g
Kali clorua (KCl)	0,105 g
Canxi clorua (khan) (CaCl_2)	0,12 g
Natri hydro cacbonat (NaHCO_3)	0,05 g
Nước (xem 5.1.1)	1000 mL

Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần thiết. Điều chỉnh pH bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$] hoặc axit clohydrit [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$] để sau khi khử khuẩn (xem 5.1.2) dung dịch có pH tương đương $7,0 \pm 0,2$ tại 25°C

5.2.5 Dung dịch đệm photphat

a) Dung dịch photphat

Thành phần

Kali dihydro octophotphat (KH_2PO_4)	34 g
Nước (xem 5.1.1)	1000 mL

Chuẩn bị

Hòa tan kali dihydro octophotphat trong 500 mL nước. Điều chỉnh pH đến giá trị $7,2 \pm 0,2$ bằng cách thêm dung dịch natri hydroxit [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$] hoặc axit clohydrit [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$]. Thêm nước đến 1000 mL. Nếu dung dịch cần bảo quản, khử khuẩn (xem 5.1.2) trước khi bảo quản.

b) Dung dịch magie clorua

Thành phần

Magie clorua (MgCl ₂)	38 g
Nước (xem 5.1.1)	1000 mL

Ngoài ra, có thể sử dụng một lượng tương đương (99 g) magie sunphat (MgSO₄.7H₂O)

Chuẩn bị

Hòa tan magie clorua trong nước. Nếu dung dịch cần bảo quản, khử khuẩn (xem 5.1.2) trước khi bảo quản.

c) Dung dịch cuối cùng

Thành phần

Dung dịch photphat (a)	1,25 mL
Dung dịch magie clorua (b)	5,0 mL
Nước (xem 5.1.1)	1000 mL

Chuẩn bị

Cho dung dịch photphat (a) và dung dịch magie clorua (b) vào nước, chia thành các thể tích tiện dụng và khử khuẩn (xem 5.1.2). pH cuối cùng vào khoảng $7,0 \pm 0,2$ tại 25 °C

5.3 Môi trường nuôi cấy

Ngay sau khi mở chai môi trường đã loại nước (hóa chất), các thông tin về ngày mở và thời hạn bảo quản tối đa phải được ghi ngay trên thành chai.

Nói chung, hầu hết các môi trường sau khi khử khuẩn trong bình chứa đầy kín có thể bảo quản tốt khoảng vài tháng tại nhiệt độ phòng nếu các môi trường được bảo quản trong tối và vãn đầy kín. Môi trường pha chế vô khuẩn có thể bảo quản ở (5 ± 3) °C trong vòng 1 tháng, hoặc lâu hơn nếu được chấp thuận. Trước khi sử dụng, kiểm tra cẩn thận tình trạng nhiễm bẩn, bị bay hơi quá mức, hoặc các dấu hiệu khác của sự phân hủy. Hầu hết các thuốc thử được bảo quản tốt nhất ở (5 ± 3) °C. Sử dụng môi trường nuôi cấy được chuẩn bị sẵn theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

Làm nguội môi trường đến khoảng 45 °C tới 50 °C nếu các chất nhạy nhiệt cần thiết để bổ sung sau khi khử khuẩn.

6 Khử khuẩn dụng cụ và bình thủy tinh

Khử khuẩn dụng cụ và bình thủy tinh không được vô khuẩn sẵn theo một trong các phương pháp sau:

- Trong lò, tại (170 ± 10) °C trong ít nhất 1 h (không kể thời gian làm nóng);
- Trong nồi hấp, ở (121 ± 3) °C ít nhất 15 min.

Nếu các màng lọc không vô khuẩn sẵn, phải khử khuẩn chúng trước khi sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

7 Mẫu

7.1 Lấy mẫu

Lấy mẫu theo TCVN 8880 (ISO 19458)

7.2 Chuẩn bị mẫu thử

Trước khi kiểm tra, trộn mẫu kỹ bằng cách khuấy mạnh để đạt được sự phân bố đồng đều của vi sinh vật và phụ thuộc vào tính chất của nước và thành phần vi sinh có mặt có thể cần pha loãng tại bước này.

Trong trường hợp đếm trên đĩa, nên pha loãng mười lần. Đối với màng lọc (với diện tích bề mặt nhỏ hơn), cần tiến hành các bước pha loãng nhỏ hơn.

Đối với các dung dịch pha loãng mười lần, cho 90 mL hoặc 9 mL dung dịch dùng pha loãng vào bình hoặc ống pha loãng vô khuẩn. Cách khác là, dung dịch dùng pha loãng đã được khử khuẩn trước đựng trong bình có nắp xoáy có thể được sử dụng. Một hoặc nhiều các dung dịch pha loãng 10 lần được chuẩn bị bằng cách pha một thể tích mẫu nước với chín thể tích dung dịch dùng pha loãng. Trộn đều dung dịch (bằng pipet sạch hoặc bằng phương pháp cơ học) và pha tiếp một thể tích dung dịch này với chín thể tích dung dịch dùng pha loãng. Các bước này lặp lại nhiều lần theo yêu cầu cần thiết. Cần chuẩn bị đủ thể tích của các dung dịch pha loãng cần thiết cho tất cả các thí nghiệm được tiến hành trên mẫu cần phân tích.

Đối với các dung dịch cần độ pha loãng khác thì thể tích dung dịch dùng pha loãng so với dung dịch mẫu phải được điều chỉnh phù hợp. Có thể tiến hành theo các phương pháp khác nhau, tức là các chuỗi dung dịch pha loãng 3 lần hoặc 4 lần, hoặc chuỗi dung dịch pha loãng mười lần của cả lượng thể tích 10 mL và 30 mL đã được lọc. Để chuẩn bị dung dịch pha loãng bốn lần, tiến hành các bước theo mô tả như trên đối với pha loãng mười lần, với tỉ lệ một thể tích mẫu nước trộn với ba thể tích dung dịch dùng để pha loãng.

Nếu mật độ các sinh vật đang xét được dự đoán là cao, thì có thể sử dụng các bước pha loãng trăm lần.

Các hướng dẫn chung về chuẩn bị dung dịch pha loãng mười lần, xem ISO 6887-1.

8 Đếm sau khi nuôi cấy các phần mẫu thử trong (hoặc trên) môi trường đặc

8.1 Nguyên tắc

Một phần thử của mẫu nước, hoặc của một dung dịch pha loãng được cấy trực tiếp hoặc tập trung trên một màng đặt lên bề mặt của môi trường nuôi cấy đặc quy định hoặc trong môi trường nấu chảy để trong thời gian nuôi ủ các vi sinh vật sẽ hình thành khuẩn lạc trên hoặc trong môi trường.

Đối với các mục đích thực hành, mỗi khuẩn lạc được coi là có nguồn gốc từ một vi sinh vật hoặc một nhóm các vi sinh vật có mặt trong phần mẫu thử tại thời điểm cấy. Xét trên thể tích của các lượng mẫu kiểm tra và số lượng các khuẩn lạc hình thành, thì kết quả có thể được thể hiện ở số lượng các đơn vị

tạo khuẩn lạc (cfu) hoặc các hạt tạo khuẩn lạc (cfp) trong một lượng thể tích đã cho của mẫu, ví dụ 1 mL hoặc 100 mL.

8.2 Cách tiến hành

8.2.1 Nguyên tắc chung

Ba quy trình chính có thể được sử dụng để cấy trên môi trường đặc.

a) Kỹ thuật đổ đĩa

Phần mẫu thử được trộn với môi trường đã được làm nóng chảy trước đó và làm nguội tới gần nhiệt độ đông đặc; sau khi nuôi ủ, sẽ đếm các khuẩn lạc phát triển bên trong hoặc trên bề mặt của môi trường.

b) Kỹ thuật trải đĩa

Phần mẫu thử được trải trên bề mặt khô của môi trường thạch, và sau khi nuôi ủ sẽ đếm các khuẩn lạc phát triển trên bề mặt của môi trường.

c) Kỹ thuật lọc qua màng

Phần mẫu thử được cho qua màng lọc, các vi sinh vật cần tìm được giữ lại, màng lọc sau đó được đặt trên môi trường thạch hoặc trên giấy thấm môi trường lỏng hoặc môi trường bù nước. Khi nuôi ủ, các khuẩn lạc hình thành trên bề mặt màng lọc. Ngoài ra, đối với các vi sinh vật cụ thể như là kỵ khí, màng lọc có thể được úp xuống đĩa Petri và được phủ bởi môi trường thạch tan chảy.

8.2.2 Lựa chọn phương pháp

Sự lựa chọn phương pháp kỹ thuật phụ thuộc vào một vài yếu tố, bao gồm: các đặc tính vật lý và hóa học của nước cũng như là các đặc tính tự nhiên của vi sinh vật được tìm (xem Phụ lục A, A.3), nồng độ vi sinh vật dự đoán, sự hồi phục hiệu quả của các vi sinh vật bị sốc hoặc (cận chết) bị thương, độ chụm của phép thử và độ nhạy yêu cầu. Trong 8.2.3.1, 8.2.4.1 và 8.2.5.1 nêu ra các thể tích mẫu nước cần sử dụng đối với mỗi kỹ thuật và các giới hạn phát hiện được giải thích tại A.2. Độ chính xác của các kỹ thuật cũng được giải thích tại A.2. Các yêu cầu theo quy định cũng có thể ảnh hưởng đến sự lựa chọn kỹ thuật được sử dụng bằng cách chỉ ra, ví dụ như, đòi hỏi sự chính xác hay chỉ cần chỉ ra sự tồn tại hay không tồn tại của vi sinh vật trong một thể tích thử nghiệm được chỉ định là đủ.

8.2.3 Kỹ thuật đổ đĩa

8.2.3.1 Phần mẫu thử

Thể tích phần mẫu thử, hoặc của dung dịch pha loãng của mẫu, có thể thay đổi trong khoảng từ 0,1 mL đến 5 mL, phụ thuộc vào kích thước của đĩa Petri và thể tích môi trường nuôi cấy được sử dụng. Các dung dịch pha loãng nên chọn sao cho số lượng các khuẩn lạc điển hình hình thành trên đĩa có đường kính từ 90 mm đến 100 mm vào khoảng 10 đến 150. Tổng số các khuẩn lạc trên đĩa (điển

TCVN 9716:2013

hình và không điển hình) nên thấp hơn 300 (xem TCVN 6404 (ISO 7218)). Tuy nhiên nên biết rằng tổng số các khuẩn lạc đếm được phụ thuộc và kích thước của khuẩn lạc và số lượng này có thể phải giảm đi đối với các khuẩn lạc có kích thước lớn.

8.2.3.2 Nuôi cấy

Làm tan môi trường cần thiết trong nước sôi hoặc bằng bất kỳ quy trình thích hợp nào (ví dụ trong tủ ủ khí thích hợp, nồi hấp bằng dòng hơi nước hoặc lò vi sóng, nếu sự phối hợp thời gian/nhiệt độ làm nóng đã được đánh giá phù hợp với sự chuẩn bị môi trường). Tránh đun nóng quá và di chuyển môi trường ngay khi mới nóng chảy. Đặt môi trường đã tan vào bể ổn nhiệt (45 ± 1) °C trong thời gian đủ để môi trường cân bằng đến nhiệt độ này. Không nên giữ môi trường đã tan hơn 4 h. Không nên làm tan môi trường thạch quá một lần.

Chuẩn bị và đánh dấu các đĩa Petri cần dùng. Pha loãng các dung dịch cần thiết theo 7.2. Sau khi trộn kỹ, đổ các phần mẫu thử vào các đĩa.

Chuyển các ống hoặc bình của môi trường đã tan ra khỏi bể ổn nhiệt, làm khô bên ngoài ống hoặc bình và hơi nóng cổ bình. Ngay lập tức, cho đều môi trường vào mỗi đĩa Petri, tránh để phần mẫu thử bị sốc nhiệt, và trộn cẩn thận để thu được sự phân bố đồng nhất các vi sinh vật. Nói chung, 15 mL môi trường được sử dụng cho một phần mẫu thử là 1 mL hoặc 2 mL; đối với phần mẫu thử lớn hơn, cần điều chỉnh nồng độ của môi trường phù hợp theo. Đặt đĩa để nguội bề mặt tới khi thạch đông đặc trên bề mặt phẳng nằm ngang. Ngay khi thạch đông, nuôi ủ đĩa theo 8.2.6.

CHÚ THÍCH: Hệ thống máy xếp chuẩn bị đồ thạch có thể sử dụng thuận tiện trong phòng thí nghiệm để phân tích lượng mẫu lớn.

8.2.4 Kỹ thuật trải đĩa

8.2.4.1 Phần mẫu thử

Đối với đĩa Petri có đường kính từ 90 mm đến 100 mm, thể tích phần mẫu thử, hoặc của dung dịch pha loãng của mẫu nên trong khoảng từ 0,1 mL đến 5 mL. Chọn các dung dịch pha loãng sao cho số lượng các khuẩn lạc điển hình có được vào khoảng từ 10 đến 150. Tổng số các khuẩn lạc trên đĩa (điển hình và không điển hình) nên ít hơn 200. Tuy vậy, nên chú ý rằng tổng số các khuẩn lạc đếm được phụ thuộc vào kích thước của khuẩn lạc và số lượng các khuẩn lạc có thể bị giảm đối với các khuẩn lạc lớn.

8.2.4.2 Nuôi cấy

Mỗi đĩa đã được chuẩn bị và đánh dấu chứa khoảng 15 mL môi trường nuôi cấy. Làm khô bề mặt môi trường trước khi sử dụng (nếu cần). Dùng pipet hút phần mẫu thử cho lên bề mặt môi trường và dàn trải trên bề mặt đĩa bằng que vô khuẩn hoặc bằng dụng cụ cơ học. Sau khi hấp thụ sản phẩm cấy, nuôi ủ các đĩa theo 8.2.6.

Để làm khô đĩa, các điểm sau đây là cần thiết:

- Độ ẩm của môi trường nuôi cấy rất quan trọng vì sự sinh trưởng tối ưu của vi khuẩn phụ thuộc vào điều kiện ẩm trong và trên bề mặt môi trường. Ví dụ nếu độ ẩm giảm nhiều có thể dẫn đến việc tăng nồng độ chất ức chế trong môi trường nuôi cấy có chọn lọc và giảm về hoạt tính của nước trên bề mặt môi trường nuôi cấy.
- Khi vi khuẩn không dần trải nhanh được nuôi cấy, và các đĩa bị khô sau khi thích nghi, thì việc làm khô không phải lúc nào cũng cần thiết. Trong trường hợp này, quá trình làm khô có thể bỏ qua, vì làm khô chỉ làm tăng khả năng nhiễm và giảm độ ẩm không cần thiết.
- Chọn nhiệt độ và thời gian làm khô càng ngắn càng tốt để giảm tối đa khả năng bị nhiễm có thể và việc làm nóng không ảnh hưởng xấu tới chất lượng của môi trường nuôi cấy. Thời gian làm khô phụ thuộc vào độ đông đặc trên đĩa Petri, nhưng nên giữ ngắn nhất có thể.

Để tránh bị nhiễm, và nếu các đĩa không làm khô trong tủ cấy vô khuẩn, thì luôn luôn làm khô đĩa bằng cách úp bề mặt môi trường sẽ được cấy mẫu xuống phía dưới.

Trong thực tế, đĩa được làm khô bằng cách đặt bề mặt thạch úp xuống và mở một nửa nắp trong tủ nuôi cấy ở nhiệt độ giữa 25 °C và 50 °C. Làm khô đĩa đến khi các giọt nước không còn xuất hiện trên bề mặt nắp. Không làm khô tiếp nữa. Các đĩa thạch cũng có thể làm khô (giống cách nêu trên) trong tủ cấy an toàn (ở nhiệt độ phòng) khoảng 30 min đến 60 min, hoặc qua đêm ở nhiệt độ phòng với đĩa có nắp đậy.

8.2.5 Kỹ thuật lọc màng

8.2.5.1 Phần mẫu thử

Thể tích lớn nhất của phần mẫu thử phụ thuộc vào khả năng lọc của mẫu nước và màng sử dụng. Kỹ thuật này thích hợp với nước chứa ít chất hạt hoặc chất nhớt (ví dụ sắt) trong huyền phù, ví dụ nước uống. Với các màng có kích thước lỗ trung bình 0,45 µm thì có thể lọc vài lít nước qua một màng đơn, và như vậy đạt được độ nhạy cao của phép thử. Tuy vậy, đối với một số vi sinh vật (như *Legionella*), cần phải lọc qua màng có kích thước lỗ trung bình là 0,2 µm.

Thể tích phần thử của mẫu hoặc của dung dịch pha loãng nên được chọn sao cho số lượng các khuẩn lạc điển hình hình thành trên màng với đường kính từ 47 mm đến 50 mm vào khoảng từ 10 đến 100. Tổng số các khuẩn lạc trên màng lọc (điển hình và không điển hình) nên ít hơn 200. Tuy vậy, nên chú ý rằng tổng số các khuẩn lạc đếm được phụ thuộc vào kích thước của khuẩn lạc và số lượng các khuẩn lạc có thể bị giảm đối với các khuẩn lạc lớn.

8.2.5.2 Lọc

Nối hệ thống lọc vô khuẩn với nguồn chân không. Để mặt có chia vạch hướng lên trên, đặt màng lọc vô khuẩn trên đĩa xốp rõ của đáy lọc bằng cách dùng kẹp vô khuẩn có đầu bằng kẹp ở phần ngoài của màng lọc. Đặt phễu vô khuẩn chắc chắn trên đế của bộ lọc. Dùng pipet hút hoặc đổ một trong những dịch sau lên phễu (với van áp suất khóa):

TCVN 9716:2013

- a) Thể tích đã biết của mẫu, hoặc dung dịch pha loãng của mẫu, trộn cẩn thận (ít nhất 10 mL);
- b) Phần chứa trong bình hoặc chai gồm phần mẫu thử và thêm dung dịch đủ để pha loãng đến thể tích ít nhất là 10 mL;
- c) Ít nhất 10 mL dung dịch để pha loãng, thêm trực tiếp vào phần mẫu thử bằng pipet, và trộn bằng pipet.

Mở van đóng và cung cấp đủ áp suất (khoảng 70 kPa) để lọc nước qua màng. Đóng van ngay khi mẫu đã lọc xong. Chỉ nên rửa phễu bằng cách lọc một đến ba lần thể tích 10 mL đến 30 mL dung dịch để pha loãng vô khuẩn, khi đó màng lọc vẫn ở đúng vị trí.

8.2.5.3 Chuyển màng

Bỏ phễu (phải kiểm tra khóa vòi đã đóng trước khi thực hiện) và chuyển màng bằng kẹp vô khuẩn sang một trong các môi trường sau, bảo đảm không có bọt khí giữa màng và môi trường:

- a) Môi trường thạch trong đĩa Petri;
- b) Giấy thấm vô khuẩn đã được làm ướt bằng môi trường lỏng, hoặc miếng môi trường khô đã được phục hồi bằng nước vô khuẩn trong đĩa Petri (tránh sự phát triển bên ngoài màng, đổ hết lượng môi trường thừa, tốt nhất là trước khi đặt màng lên giấy);
- c) Đĩa Petri, hoặc lên môi trường thạch mỏng trong đĩa Petri, rồi phủ lên trên màng với môi trường thạch tan chảy tại $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Đối với các lượng thể tích khác nhau của cùng một mẫu, phễu có thể sử dụng lại không cần khử khuẩn miễn là lượng thể tích nhỏ nhất và/hoặc mẫu pha loãng nhất được lọc đầu tiên. Để lọc các mẫu khác, sử dụng bộ dụng cụ khử khuẩn khác hoặc khử khuẩn phễu, ví dụ bằng cách đốt trên ngọn lửa. Hoặc, khử khuẩn theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

8.2.6 Ủ mẫu

Úp ngược đĩa cấy và đặt đĩa trong tủ ủ hoặc trong bình chứa không thấm nước trong bể ổn nhiệt. Nếu cần, gói đĩa trong túi nhựa để tránh làm khô môi trường (ví dụ khi sử dụng tủ ủ có quạt). Các đĩa chứa màng trên giấy thấm nên đặt (không úp ngược) trong bình chứa không khí ẩm hoặc bình không thấm nước để tránh làm khô môi trường, nếu cần. Không nên cho vào một túi nhiều hơn 6 đĩa Petri để chắc chắn rằng các đĩa nhanh đạt đến nhiệt độ ủ.

Tham khảo các phương pháp chuẩn để chọn khoảng thời gian và nhiệt độ nuôi ủ phụ thuộc vào vi sinh vật, hoặc nhóm các vi sinh vật cần tìm.

Nuôi ủ có thể thực hiện theo hai giai đoạn, như sau:

Nuôi ủ trước trong khoảng thời gian khác nhau, ví dụ 2 h đến 4 h tại nhiệt độ thấp hơn (ví dụ $25 ^\circ\text{C}$ đến $30 ^\circ\text{C}$) để nuôi phục hồi vi sinh vật bị sốc, tiếp theo là khoảng thời gian nuôi ủ dài hơn tại nhiệt độ thích hợp đối với vi sinh vật cần tìm. Sự thay đổi này cũng bị ảnh hưởng do chuyển sang tủ nuôi cấy khác

hoặc bể nước khác, hoặc sử dụng các hệ thống có nhiệt độ chỉnh tự động sau một khoảng thời gian định trước. Lý tưởng nhất là đặt tất cả đĩa trong tủ nuôi cấy hoặc bể nước cùng một thời điểm.

Cách khác, màng có thể nuôi ủ trong khoảng thời gian-giới hạn (ví dụ 2 h hoặc 4 h) trong môi trường nuôi phục hồi, sau đó chuyển sang môi trường nuôi ủ khác, thường là môi trường chọn lọc.

8.3 Đếm

8.3.1 Quy định chung

Kiểm tra các đĩa hoặc màng ngay sau khi nuôi ủ. Nếu không thể kiểm tra ngay, có thể giữ tại nhiệt độ $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ trong thời gian ngắn (ví dụ vài ngày) miễn là không ảnh hưởng đến số lượng, hình thái hoặc sự xác định tiếp theo của khuẩn lạc. Nếu các đĩa hoặc màng phải bảo quản, cần xác định khoảng thời gian bảo quản phù hợp với phương pháp và loại mẫu.

8.3.2 Các khuẩn lạc đếm được và xác nhận

Để đếm "tổng số" trên môi trường không chọn lọc, tất cả các khuẩn lạc đều được đếm. Đối với môi trường chọn lọc và môi trường phân biệt, chỉ đếm các khuẩn lạc có hình thái điển hình đối với vi sinh vật cần tìm. Có thể dùng phương tiện phóng đại (trừ có ngoại lệ được chỉ ra) khi kích cỡ các khuẩn lạc nhỏ và/hoặc khi khó phân biệt các khuẩn lạc với các hạt khác. Nói chung, phương pháp đếm này là không thông dụng để cho thấy các sinh vật chỉ thuộc một nhóm phân loại, nhưng trong thực tế sự khác nhau này có thể chấp nhận được và kết quả có thể coi như là ước lượng. Để phân lập đặc điểm chính xác hơn, cần thiết phải có thí nghiệm kiểm chứng.

Trong thực tế khó có thể khẳng định sự đồng nhất của một số lượng các khuẩn lạc. Trong trường hợp như vậy, kiểm tra tất cả các khuẩn lạc điển hình trong một vùng nhỏ của đĩa hoặc màng (xem thêm 8.4.3)

8.4 Tính toán kết quả

8.4.1 Nguyên tắc

Phần lớn của điều này được lấy từ TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007) ^[14].

Các phương pháp tính toán dưới đây được áp dụng trong các trường hợp thường xảy ra nhất khi các phép thử được thực hiện theo các phương pháp thực hành chuẩn của phòng thí nghiệm. Các trường hợp đặc biệt hiếm khi xuất hiện (ví dụ, sự khác nhau rõ rệt giữa số lượng khuẩn lạc trên hai đĩa với cùng một lượng pha loãng, hoặc tỷ lệ khác biệt rõ rệt so với hệ số pha loãng giữa các đĩa của hai lần pha loãng kế tiếp nhau), và do đó cần thiết phải có chuyên gia vi sinh học kiểm tra, giải thích hoặc thậm chí không chấp nhận kết quả đếm thu được.

8.4.2 Trường hợp khái quát

Việc tính toán các kết quả trong điều này có thể sử dụng trong các trường hợp khi tổng số các khuẩn lạc trên đĩa vào khoảng từ 10 đến 200 (kỹ thuật trải đĩa và lọc qua màng) hoặc giữa 10 đến 300 (kỹ

TCVN 9716:2013

thuật đổ đĩa), và khi số lượng khuẩn lạc điển hình trong khoảng từ 10 đến 150 (kỹ thuật trải và đổ đĩa) hoặc giữa 10 đến 100 (kỹ thuật lọc màng).

Vì mỗi khuẩn lạc được cho là mọc lên từ một vi sinh vật hoặc từ một nhóm đơn các vi sinh vật, nên kết quả được biểu thị bằng số lượng các đơn vị tạo khuẩn lạc (cfu) hoặc các hạt tạo khuẩn lạc (cfp) trong một lượng thể tích chuẩn quy định của mẫu thử (thường là 100 mL hoặc 1 mL) theo Công thức (1):

$$C_s = \frac{Z}{V_{\text{tot}}} \times V_s \quad (1)$$

Trong đó:

C_s là giá trị ước lượng các cfu hoặc cfp trong thể tích chuẩn sử dụng V_s của mẫu;

Z là tổng số các khuẩn lạc đếm trên đĩa hoặc trên màng từ các độ pha loãng d_1, d_2, \dots, d_i , hoặc từ các thể tích riêng biệt của các phần mẫu thử (mẫu hoặc dung dịch pha loãng);

V_s là thể tích chuẩn được chọn để biểu thị nồng độ của vi sinh vật có trong mẫu;

V_{tot} là thể tích tổng tính được của các mẫu ban đầu bao gồm các đĩa được đếm. V_{tot} hoặc là tổng các thể tích riêng biệt của các phần mẫu thử (mẫu hoặc dung dịch pha loãng) hoặc được tính theo Công thức (2):

$$V_{\text{tot}} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i) \quad (2)$$

Trong đó

V_{tot} là thể tích tổng được tính của các mẫu ban đầu bao gồm các đĩa được đếm;

n_1, n_2, \dots, n_i là số lượng các đĩa được đếm đối với độ pha loãng d_1, d_2, \dots, d_i ;

V_1, V_2, \dots, V_i là thể tích mẫu thử được sử dụng với độ pha loãng d_1, d_2, \dots, d_i ;

d_1, d_2, \dots, d_i là độ pha loãng sử dụng đối với các thể tích thử V_1, V_2, \dots, V_i ($d = 1$ đối với mẫu không pha loãng, $d = 0,1$ đối với dung dịch pha loãng mười lần v.v...).

CHÚ THÍCH 1: Kết quả cuối cùng thu được là hàm số trung bình cộng các số đếm trên từng đĩa.

Nếu không có quy định, khi báo cáo kết quả cuối cùng cần làm tròn số các kết quả tính toán đến hai chữ số có ý nghĩa. Để thực hiện điều này, nếu chữ số thứ ba nhỏ hơn 5 thì giữ nguyên số phía trước, nếu chữ số thứ ba lớn hơn hoặc bằng 5, tăng số phía trước lên một đơn vị.

Tốt nhất thể hiện kết quả bằng số trong khoảng từ 1,0 và 9,9 nhân với lũy thừa chính xác của 10, hoặc bằng một số nguyên với hai chữ số có nghĩa.

Sau đây là ví dụ cách tính đối với kỹ thuật đổ và trải đĩa (được đếm hai lần) như sau:

VÍ DỤ 1:

Nếu thể tích dung dịch thử sử dụng (V_i) là 1 mL, và các tổng đếm sau được lấy từ các độ pha loãng khác nhau:

Độ pha loãng	Tổng số đếm
10^{-2}	81 khuẩn lạc và 97 khuẩn lạc
10^{-3}	9 khuẩn lạc và 15 khuẩn lạc

Thì:

$$Z = 81 + 97 + 9 + 15 = 202$$

$$V_{\text{tot}} = (2 \times 1 \times 0,01) + (2 \times 1 \times 0,001) = 0,022$$

Và nếu $V_s = 1$ mL:

$$C_s = \frac{202}{0,022} \times 1 = 9182$$

Sau khi làm tròn: $C_s = 9,2 \times 10^3$ cfu/mL (hoặc cfp/mL)

Ví dụ tính đối với kỹ thuật lọc qua màng (được đếm một lần) như sau:

VÍ DỤ 2:

Thể tích thử (V_i)	Tổng số đếm
100 mL	82 khuẩn lạc
10 mL	11 khuẩn lạc

Thì:

$$Z = 82 + 11 = 93$$

$$V_{\text{tot}} = (1 \times 100 \times 1) + (1 \times 10 \times 1) = 110$$

Và nếu V_s là 100 mL:

$$C_s = \frac{93}{110} \times 100 = 84 \text{ cfu/100 mL (hoặc cfp/100 mL)}$$

Báo cáo kết quả tổng số khuẩn lạc cần đi kèm với mức tin cậy 95 % thu được từ việc áp dụng Công thức sau (xem Tài liệu Tham khảo [5]):

1) Khi $Z \geq 20$, kết quả cuối cùng với khoảng tin cậy (CI) 95 % được tính bằng Công thức (3):

$$C_s \pm 95\% \text{ CI} = \left(\frac{Z \pm 2\sqrt{Z}}{V_{\text{tot}}} \right) \times V_s = \left(\frac{Z}{V_{\text{tot}}} \pm \frac{2\sqrt{Z}}{V_{\text{tot}}} \right) \times V_s \quad (3)$$

Trong đó các ký hiệu được định nghĩa như ở trên.

2) Khi $Z < 20$, ảnh hưởng của độ xiên tăng (tính không đối xứng) của phân phối Poisson lên mức tin cậy chính xác được tính bằng cách có sự chỉnh sửa nhỏ được nêu trong Công thức (4):

$$\text{Trên và dưới 95\% } CI = \left(\frac{Z + 2 \pm 2\sqrt{Z + 1}}{V_{\text{tot}}} \right) \times V_s \quad (4)$$

CHÚ THÍCH 2 : Công thức cuối cùng cho giá trị trung bình và khoảng tin cậy 95 % thậm chí đối với $Z = 0$, mà có thể gây hiểu không đúng.

CHÚ THÍCH 3 : Số "2" (trước căn bậc hai) trong Công thức là số làm tròn của 1,96 (≈ 2).

CHÚ THÍCH 4 : Tính toán khoảng tin cậy 95 % theo phân phối Poisson trong mọi trường hợp.

8.4.3 Trường hợp sau khi xác định hoặc khẳng định

Khi các phương pháp sử dụng đòi hỏi sự xác định hoặc khẳng định, tất cả các khuẩn lạc được cho là đáng nghi nên được cấy ủ từ từng đĩa được bảo quản để đếm khuẩn lạc. Nếu trên thực tế, không thực hiện được, thì tiến hành kiểm tra tất cả khuẩn lạc điển hình (n) trong một vùng nhỏ trên đĩa và màng (n có thể khác nhau giữa các đĩa). Lý do chính cho việc đề xuất phải khẳng định tất cả các khuẩn lạc nghi ngờ từ một vùng xác định thay vì chọn ngẫu nhiên là vì các phòng thí nghiệm có thể không có khả năng tách nhóm ngẫu nhiên các khuẩn lạc đáng nghi một cách khách quan. Nếu có khả năng lấy được mẫu ngẫu nhiên đáng tin cậy, thì giá trị cực trị và giá trị trung bình đủ trong cùng thời điểm đối với quan sát thường xuyên để khẳng định vào khoảng $n = 5$ khuẩn lạc trên một đĩa. Thực tế khuyến nghị là tách biệt tất cả các khuẩn lạc khi số lượng vào khoảng 1 đến 5. Do đó, giá trị trung bình $n = 5$ là phù hợp. (Nếu số các khuẩn lạc khẳng định là 6 hoặc 7 thì việc chỉ chọn nhóm có $n = 5$ là không có nghĩa). Sau khi xác định và khẳng định, kết quả khẳng định của từng đĩa sẽ được tính theo phần trăm các khuẩn lạc nghi ngờ theo các tiêu chí xác định hoặc khẳng định, sử dụng Công thức (5):

$$x = \frac{k}{n} \times z \quad (5)$$

Trong đó:

- x là số ước lượng các khuẩn lạc được khẳng định trên một đĩa;
- k là số các khuẩn lạc phù hợp các tiêu chí để xác định hoặc khẳng định trong số các khuẩn lạc đã nuôi cấy n ;
- n là số các khuẩn lạc dương tính có khả năng nuôi cấy từ một đĩa để khẳng định;
- z là tổng số các khuẩn lạc dương tính có khả năng đếm trên một đĩa.

Không làm tròn các kết quả phép thử khẳng định trung gian x .

Tính số C_s của các vi sinh vật đã được xác định hoặc khẳng định có mặt trong mẫu thử bằng sự thay thế Z bởi X (tổng của x), sử dụng Công thức (1) nêu trong 8.4.2. Làm tròn và biểu thị kết quả như nêu tại 8.4.2.

VÍ DỤ:

Quá trình tính đã cho kết quả như sau:

Độ pha loãng	Tổng số đếm
10^{-3}	66 khuẩn lạc và 80 khuẩn lạc
10^{-4}	4 khuẩn lạc và 7 khuẩn lạc

Khẳng định các khuẩn lạc đã chọn lọc được thực hiện:

trong 66 khuẩn lạc, 8 khuẩn lạc được thử, 6 trong số đó phù hợp các tiêu chí; do đó $x_1 = \frac{6}{8} \times 66 = 49,5$;

trong 80 khuẩn lạc, 9 khuẩn lạc được thử, 6 trong số đó phù hợp các tiêu chí; do đó $x_2 = 53,3$;

trong 7 khuẩn lạc, 5 khuẩn lạc được thử, 4 trong số đó phù hợp các tiêu chí; do đó $x_3 = 5,6$;

trong 4 khuẩn lạc, cả 4 khuẩn lạc được thử, cả 4 phù hợp các tiêu chí; do đó $x_4 = z_4 = 4,0$;

$$X = 49,5 + 53,3 + 5,6 + 4,0 = 112,4$$

Và nếu $V_s = 1$ mL:

$$C_s = \frac{Z}{V_{\text{tot}}} \times V_s = \frac{112,4}{(2 \times 1 \times 0,001) + (2 \times 1 \times 0,0001)} \times V_s = \frac{112,4}{0,0022} \times 1 = 51091$$

Sau khi làm tròn: $C_s = 5,1 \times 10^4$ cfu/mL (hoặc cfp/mL)

Khi áp dụng sự khẳng định một phần (đoạn) giống như ví dụ trên, thì các kết quả được khẳng định không tuân theo phân phối Poisson. Các công thức đối với khoảng tin cậy 95 % như trong 8.4.2 không có giá trị^[5].

8.4.4 Trường hợp đặc biệt

8.4.4.1 Tất cả các đĩa mẫu thử chứa không quá mười khuẩn lạc

Tổng đếm từ 20 trở lên đến giới hạn trên (thực tế) của mỗi phương pháp là trong khoảng độ chụm tối ưu. Độ chụm vẫn được chấp nhận đối với tổng đếm từ 10 đến 20. Độ chụm giảm khá nhanh khi số khuẩn lạc giảm dưới 10. Phụ thuộc vào mục đích của phép thử, giới hạn xác định dưới có thể định rõ tại một phép đếm dưới 10.

Theo ISO/TR 13843, định nghĩa về giới hạn xác định là "mật độ hạt trung bình thấp nhất x trên lượng mẫu phân tích khi giá trị bất định tiêu chuẩn tương đối mong muốn bằng giá trị lý thuyết (RSD)". RSD là độ lệch chuẩn tương đối, được tính bằng thương của ước lượng độ lệch chuẩn s dân số của một mẫu với giá trị trung bình \bar{x} của mẫu đấy. Thay cho RSD, w được sử dụng để ký hiệu cho độ lệch tiêu chuẩn tương đối. Do đó, $w = s/\bar{x}$

Trong trường hợp phân phối Poisson, x được tính theo Công thức (6):

$$x = \frac{1}{w^2} \quad (6)$$

Nếu w được đặt tại 0,50 (50 %) là giới hạn của độ chụm tương đối chấp nhận được (số này có về hợp lý trong vi sinh), thì giới hạn xác định dưới đối với số khuẩn lạc được cho bởi

$$x = \frac{1}{0,50^2} = 4$$

Do đó, các kết quả dựa trên các tổng đếm nhỏ hơn bốn được coi là chỉ mới phát hiện được sự có mặt của sinh vật.

Tóm lại:

Nếu tất cả các đĩa chứa ít hơn 10 khuẩn lạc, nhưng tổng số khuẩn lạc trên tất cả các đĩa là 4 hoặc lớn hơn, thì kết quả được tính như trong trường hợp chung (8.4.2), nhưng chỉ là số ước lượng. Nếu tổng từ 3 đến 1, độ chụm của kết quả là quá thấp để quyết định báo cáo kết quả là vi sinh vật có tồn tại trong thể tích nghiên cứu.

8.4.4.2 Không có đĩa nào chứa khuẩn lạc

Nếu các đĩa chứa mẫu thử không chứa khuẩn lạc nào, biểu diễn kết quả như sau:

nhỏ hơn $1/V_{\text{tot}}$ cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu

trong đó V_{tot} là thể tích tổng được tính của các mẫu ban đầu trong các đĩa được đếm (xem 8.4.2).

Nếu cần, có thể báo cáo kết quả là “không” hoặc “không phát hiện có sinh vật”. Nếu vậy nên chỉ ra thể tích mẫu được phân tích.

8.4.4.3 Hơn 200 hoặc 300 khuẩn lạc điển hình quan sát được hoặc được khẳng định

Nếu số tất cả các khuẩn lạc điển hình và không điển hình trên tất cả các đĩa chứa độ pha loãng đầu tiên d_1 cao hơn 200 (trong trường hợp các đĩa trải và lọc qua màng) hoặc lớn hơn 300 (trong trường hợp đĩa đổ) với các khuẩn lạc điển hình quan sát được hoặc khuẩn lạc được khẳng định và, nếu như, đối với tất cả các đĩa có độ pha loãng tiếp theo d_2 chứa ít hơn 200 khuẩn lạc hoặc ít hơn 300 khuẩn lạc tương ứng, thì không một khuẩn lạc điển hình hoặc được khẳng định có thể được đếm thì kết quả được thể hiện như sau:

nhỏ hơn $1/d_2$ cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu và lớn hơn $1/d_1$ cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu

trong đó $1/d_1$ và $1/d_2$ là các hệ số pha loãng tương ứng với các độ pha loãng d_1 và d_2 .

VÍ DỤ:

- Tại độ pha loãng đầu tiên (10^{-2}): hơn 300 khuẩn lạc trên mỗi đĩa, có mặt các khuẩn lạc điển hình hoặc được khẳng định;

- Tại độ pha loãng thứ hai (10^{-3}): 33 khuẩn lạc và 35 khuẩn lạc, không có sự có mặt của các khuẩn lạc điển hình hoặc được khẳng định;

Kết quả là: nhỏ hơn 1000 cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu và lớn hơn 100 cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu

8.4.4.4 Nhiều hơn 200 hoặc 300 khuẩn lạc không điển hình quan sát được hoặc được khẳng định

Nếu số các khuẩn lạc điển hình và không điển hình trên các đĩa chứa độ pha loãng đầu tiên d_1 cao hơn 200 (trong trường hợp các đĩa trải và lọc qua màng) hoặc lớn hơn 300 (trong trường hợp đĩa đổ) không có các khuẩn lạc điển hình quan sát được hoặc khuẩn lạc được khẳng định và, nếu như, đối với tất cả các đĩa có độ pha loãng tiếp theo d_2 chứa ít hơn 200 khuẩn lạc hoặc ít hơn 300 khuẩn lạc, không một khuẩn lạc điển hình hoặc được khẳng định nào được đếm, thì kết quả được thể hiện như sau:

nhỏ hơn $1/d_2$ cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu

trong đó $1/d_2$ là các hệ số pha loãng tương ứng với các độ pha loãng d_2 .

VÍ DỤ:

- Tại độ pha loãng đầu tiên (10^{-2}): hơn 300 khuẩn lạc trên mỗi đĩa, không có mặt của các khuẩn lạc điển hình quan sát được hoặc được khẳng định;
- Tại độ pha loãng thứ hai (10^{-3}): 33 khuẩn lạc và 35 khuẩn lạc, không có mặt của các khuẩn lạc điển hình quan sát được hoặc được khẳng định;

Kết quả là: nhỏ hơn 1 000 cfu (hoặc cfp) trên lượng mẫu.

CHÚ THÍCH: Khi có nhiều khuẩn lạc không điển hình, thì các khuẩn lạc điển hình bị che phủ do phát triển quá mức. Đây là thông tin để ghi lại thực tế này.

8.4.4.5 Nhiều hơn 200 hoặc 300 khuẩn lạc điển hình quan sát được hoặc nghi ngờ tại tất cả các dung dịch pha loãng

Nếu đếm tổng số các khuẩn lạc trên mỗi đĩa chứa các dung dịch pha loãng nuôi cấy cho tổng cao hơn 200 (trong trường hợp các đĩa trải và lọc qua màng) hoặc lớn hơn 300 (trong trường hợp đĩa đổ) và nếu số các khuẩn lạc điển hình hoặc khuẩn lạc nghi ngờ cao hơn 150 khuẩn lạc (trong trường hợp các kỹ thuật đĩa trải và đĩa đổ) hoặc cao hơn 100 (trong trường hợp lọc qua màng), biểu thị kết quả như sau:

Lọc qua màng: tổng số các khuẩn lạc cao hơn $200/d$ cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu và số các khuẩn lạc điển hình cao hơn $100 \times k/n \times 1/d$ cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu

Các đĩa đổ: tổng số các khuẩn lạc cao hơn $300/d$ cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu và số các khuẩn lạc điển hình cao hơn $150 \times k/n \times 1/d$ cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu

Các đĩa trải: tổng số các khuẩn lạc cao hơn $200/d$ cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu và số các khuẩn lạc điển hình cao hơn $150 \times k/n \times 1/d$ cfu (hoặc cfp) trên thể tích mẫu

Trong đó:

$1/d$ là hệ số pha loãng của dung dịch pha loãng nuôi cấy cuối cùng;

k là số khuẩn lạc phù hợp theo các tiêu chí xác định và khẳng định trong số các khuẩn lạc nghi ngờ n .

9 Đếm bằng phương pháp nuôi cấy trong môi trường lỏng

9.1 Nguyên tắc

Các phần mẫu thử của mẫu nước được cấy trong môi trường lỏng đảm bảo sự sinh trưởng của một vi sinh vật cụ thể hoặc một nhóm các vi sinh vật. Số có xác suất lớn nhất (MPN) của các vi sinh vật tồn tại trong mẫu ban đầu và độ chụm trong việc ước lượng có thể được tính toán theo các phương pháp thống kê dựa trên các phần mẫu thử dương tính và âm tính thu được sau thời kì nuôi ủ.

9.2 Áp dụng

9.2.1 Kiểm tra sự có mặt hoặc không có mặt của một vi sinh vật

Sau khi một phần mẫu thử đơn lẻ đã được cấy và nuôi trong ống nghiệm chứa môi trường lỏng và biểu hiện có tăng trưởng của một vi sinh vật đã cho, thì kết luận duy nhất có thể rút ra chính là sự có hoặc không có mặt của vi sinh vật trong thể tích thử nghiệm này.

Phương pháp này có thể được áp dụng như một phép khẳng định tại chỗ phù hợp với quy định trong thuật ngữ như: "sự không có mặt của...[tên loại vi sinh vật xác định] trong ... mL". Điều này không dự đoán sự tồn tại hoặc không có mặt của những vi sinh vật trong bất kì các phần mẫu thử nào khác hay tạo điều kiện xác định nồng độ vi sinh vật.

9.2.2 Ước lượng số có xác suất lớn nhất (MPN)

Trong phần lớn các ứng dụng, nguyên tắc của kỹ thuật MPN là để cấy một số lượng lớn các phần mẫu thử khác nhau của cùng một mẫu và/hoặc các mẫu pha loãng trong các ống nghiệm chứa môi trường nuôi cấy lỏng.

Trong quá trình ủ, giả sử rằng mỗi ống nghiệm chứa một hoặc nhiều hơn vi sinh vật trong dịch cấy có thể hiện sự phát triển, có thể kèm hoặc không kèm theo sự thay đổi về đặc tính ở môi trường nuôi cấy. Với một vài ống nghiệm cho kết quả dương tính và một vài cho kết quả âm tính, thì số MPN của vi sinh vật trong một thể tích xác định của mẫu có thể được ước lượng từ số lượng và sự phân bố của ống nghiệm mang kết quả dương tính.

Cần lựa chọn từ hàng loạt thông số MPN khác nhau (xem 9.3.3) có sẵn dựa vào số lượng xác định của vi sinh vật trong mẫu, điều kiện bắt buộc, độ chụm cần thiết và các lưu ý thực tế khác. Độ chụm phụ thuộc vào số lượng các phần mẫu thử dương tính quan sát được theo cách tương tự như với độ chụm của phương pháp đếm một khuẩn lạc phụ thuộc vào số lượng khuẩn lạc. Độ chụm tăng lên theo phương trình căn bậc hai của số lượng ống nghiệm sử dụng. Số lượng ống nghiệm do đó được chia

làm bốn để nhân đôi độ chụm. Với các hệ thống mà chỉ sử dụng một vài ống lặp lại, độ chụm sẽ thấp. Mặt khác, trong những hệ thống này độ nhạy (phụ thuộc vào tổng thể tích được kiểm tra) nhìn chung là đáp ứng đủ cho các mục đích thực tiễn. Dễ dàng phân tích những kết quả dương tính là một trong những ưu điểm nổi bật của phần lớn kỹ thuật MPN.

9.3 Cách tiến hành

9.3.1 Quy định chung

Sự lựa chọn phương pháp đếm MPN phụ thuộc vào các yếu tố tương tự như nêu tại 8.2.2. Hướng dẫn dưới đây được dựa trên quy trình được áp dụng phổ biến nhất.

9.3.2 Phần mẫu thử

Chất bổ sung trong các phần mẫu thử không nên làm thay đổi thành phần môi trường đến mức gây nên trở ngại đáng kể đến sự sinh trưởng của vi sinh vật. Thể tích của phần mẫu thử nhỏ hơn hoặc bằng 1 mL thường được bổ sung 5 lần hoặc nhiều hơn thể tích của môi trường 1 X. Những phần mẫu thử từ 1 mL đến 100 mL thường được cho vào một lượng bằng thể tích của môi trường 2 X với điều kiện là mẫu thử không chứa hàm lượng lớn các muối vô cơ, dưỡng chất hoặc độc tố có thể ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn. Phương pháp nuôi lỏng nhìn chung có thể chịu được một lượng lớn chất rắn lơ lửng.

Với các thể tích lớn hơn 100 mL, có thể sử dụng môi trường đậm đặc hơn. Đối với các mục đích đặc biệt, môi trường khan vô khuẩn có thể được hòa tan trong mẫu lạnh (hoặc làm ấm trước ở nhiệt độ 30 °C) để phân tích.

Nhược điểm của việc có mặt các khoáng chất ở nồng độ cao hoặc các hợp chất độc hại có thể được khắc phục bằng cách tách vi sinh vật từ mẫu nước. Điều này có thể thực hiện bằng cách tiến hành lọc tế bào lên màng như nêu tại 8.2.5 hoặc cho vào mẫu chất trợ lọc như điatomit hoặc dung dịch ôxit nhôm dạng huyền phù nếu dung dịch bị đục. Những chất trợ lọc này lắng xuống và mang theo các vi sinh vật; các chất này được phân tách bằng li tâm hoặc lọc. Màng lọc, điatomit hoặc ôxit nhôm sau đó được đặt vào trong môi trường nuôi cấy lỏng.

9.3.3 Lựa chọn hệ thống nuôi cấy

Trong trường hợp nồng độ dự đoán của vi sinh vật là nhỏ hoặc dao động ở mức trung bình, thì phương pháp nuôi cấy thích hợp nhất là một dãy các phần mẫu thử đơn bằng nhau. Khi tỉ lệ kỳ vọng giữa số lượng vi sinh vật lớn nhất và nhỏ nhất thấp hơn 25, thì số lượng mẫu thí nghiệm ít nhất để tính là 10 mẫu tiến hành đồng thời; trong trường hợp với 50 ống đồng thời, thì tỉ lệ 200 là giới hạn. Ví dụ về MPN pha loãng một lần được nêu tại Phụ lục B, Bảng B.1 đến Bảng B.4.

Khi có mẫu không xác định hoặc dự tính có sự dao động lớn, thì cần phải nuôi cấy hàng loạt các ống từ một vài độ pha loãng. Cần phải cấy một lượng vừa đủ các mẫu pha loãng để đảm bảo có được một hệ thống kết quả bao gồm cả kết quả dương tính và kết quả âm tính. Số lượng các lần pha loãng phụ thuộc vào phương pháp có sẵn dùng ước tính giá trị MPN. Nếu cần phải lập bảng, thì phải có các kết

TCVN 9716:2013

quá từ ba độ pha loãng và cấu thành của các hệ thống được tuân thủ đúng cho những số liệu trong các bảng. Nếu sử dụng các chương trình tính toán trên máy tính thì số lượng các mức pha loãng và ống mẫu song song không bị giới hạn.

Hệ thống MPN được áp dụng phổ biến nhất hiện nay chỉ sử dụng từ ba tới năm ống cho một mức pha loãng. Các hệ thống này, đặc biệt ở thiết kế 3 ống, cho độ chụm thấp đến mức các kết quả gần như không tốt hơn chỉ số thứ tự của lượng đo nồng độ. Nên sử dụng năm hoặc nhiều hơn ống song song. Ví dụ của MPN 3 ống và MPN 5 ống được cho tại Phụ lục B, Bảng B.5 và Bảng B.6.

Với hệ thống "không đối xứng", những độ pha loãng khác nhau sẽ không có cùng số lượng ống thử. Những hệ thống này chỉ được sử dụng để ước tính số lượng vi sinh vật trong một giới hạn xác định. Các ví dụ được nêu tại Phụ lục B, Bảng B.7, Bảng B.8 và Bảng B.9.

Đĩa nuôi cấy đa giếng (hoặc tương tự) có thể dùng như một phương pháp thay thế để nuôi cấy các ống mẫu với mỗi "giếng" đại diện cho một ống. Lợi thế của việc dùng đĩa đa giếng là có một lượng lớn các giếng có thể được nuôi cấy (ví dụ ba độ pha loãng kế tiếp nhau, mỗi độ pha loãng cấy trong 32 giếng). Độ chụm của kết quả MPN nuôi cấy trong đĩa đa giếng tương tự với độ chụm đếm từ một đĩa hoặc một màng lọc. Nhược điểm của các đĩa đa giếng chính là việc chỉ có một lượng mẫu nhỏ được cấy (thường là 0,2 mL/giếng). Tuy nhiên, điều này còn phụ thuộc vào kích thước của đĩa và giếng. Hiện có các loại đĩa với 12 x 5 mL, 24 x 3 mL và 48 x 1 mL. Kích thước của giếng tăng đồng thời với giảm số lượng giếng và giảm độ chụm của kết quả cuối cùng. Hiện những bảng MNP đặc thù và/hoặc các chương trình máy tính đã sẵn có để tính MPN trong các đĩa đa giếng. Các ví dụ của trường hợp này có thể tham khảo tại TCVN 6189-1 (ISO 7899-1) và ISO 9308-3.

9.3.4 Nuôi cấy trong môi trường lỏng

Sử dụng qui trình vô khuẩn đặt các thể tích đã đo của mẫu nước vào các chai hoặc bình và/hoặc đặt các dung dịch pha loãng của mẫu nước vào trong các bộ ống môi trường lỏng tương ứng trong hệ thống pha loãng đã được chọn (xem 9.3.3). Ngoài ra, nếu cần thiết phải lọc sơ bộ hoặc lắng cặn thì chuyển màng, diatomit hoặc cặn, hoặc các phần mẫu vào bình và/hoặc các bộ ống môi trường tương ứng.

9.3.5 Nuôi ủ

Đặt các ống nuôi cấy trong tủ ủ hoặc bể ổn nhiệt. Lựa chọn thời gian và nhiệt độ ủ dựa vào phương pháp tiêu chuẩn, phụ thuộc vào vi sinh vật hoặc nhóm các vi sinh vật cần tìm.

Đối với một số các vi sinh vật, quá trình nuôi ủ hai bước cần được tiến hành như mô tả trong 8.2.6.

9.4 Diễn giải kết quả

Sau khi nuôi ủ, đếm và ghi lại số các kết quả dương tính trong mỗi bộ ống.

Đặc điểm phân biệt rõ kết quả dương tính với kết quả âm tính khác nhau đối với mỗi loại vi sinh vật hoặc nhóm các vi sinh vật với môi trường nuôi cấy sử dụng.

Sự xuất hiện các kết quả dương tính không phải luôn luôn cho phép kết luận rằng vi sinh vật cần tìm hiện tại đang tồn tại. Do đó, cần có các phép thử khẳng định, áp dụng một trong các phương pháp sau:

- Cấy chuyển sang môi trường phân lập có chọn lọc, sử dụng các phép thử hóa sinh, huyết học và phép thử khác để xác minh các khuẩn lạc nghi ngờ;
- Cấy chuyển sang môi trường lỏng khác, kiểm tra trực tiếp các mẫu này đôi khi đưa ra được sự khẳng định với mức độ chấp nhận về mặt xác suất, hoặc từ những sinh vật có thể được phân lập và xác định;
- Cấy chuyển sang môi trường thạch không chọn lọc nhằm làm sạch và thu được khuẩn lạc đơn để tiếp tục xác định.

Các quy trình khẳng định này giúp có được các kết quả dương tính thực và sử dụng để quyết định giá trị MPN. Cần thiết phải theo dõi các kết quả thí nghiệm khẳng định đối với các ống dương tính giả định (ít nhất ở mức độ pha loãng) để kết luận các giá trị đã được khẳng định.

9.5 Xác định giá trị MPN

9.5.1 Nguyên tắc

Có ba cách cơ bản để xác định giá trị MPN:

- Công thức toán học;
- Bảng biểu;
- Chương trình máy tính.

9.5.2 Công thức toán học

9.5.2.1 Công thức gần đúng cho tất cả các trường hợp

Để tính gần đúng giá trị MPN cho bất cứ số lượng độ pha loãng nào và số các ống song song, có thể áp dụng công thức sau của Thomas ^[7]

$$MPN = \frac{n_{pos} \times V_s}{\sqrt{V_{neg} \times V_{tot}}} \quad (7)$$

Trong đó:

- n_{pos} là số các ống có phản ứng dương tính.
- V_s là thể tích mẫu chuẩn với mẫu ban đầu, tính theo mL;
- V_{neg} là tổng thể tích, của mẫu trong các ống có phản ứng âm tính, tính theo mL;
- V_{tot} là tổng thể tích, của mẫu trong tất cả các ống, tính theo mL.

Giá trị MPN được tính trên thể tích mẫu chuẩn, tính theo mL.

TCVN 9716:2013

9.5.2.2 Giải pháp tính “chính xác” cho nhóm các ống

Giá trị MPN cho một dãy đơn các ống thử có thể được tính từ Công thức (8):

$$MPN = \frac{V_s}{V_{tube}} \ln \left(\frac{n}{n - n_{pos}} \right) \quad (8)$$

Trong đó:

- V_s là thể tích mẫu chuẩn với mẫu ban đầu, tính theo mL;
- V_{tube} là thể tích, của mẫu trong mỗi ống của nhóm, tính theo mL;
- \ln là logarit cơ số tự nhiên;
- n là số các ống trong nhóm;
- n_{pos} là số các ống có phản ứng dương tính.

9.5.3 Các bảng MPN

9.5.3.1 Quy định chung

Trong Phụ lục B là một vài ví dụ về bảng tính MPN cho các MPN ở một độ pha loãng (Các Bảng từ Bảng B.1 đến Bảng B.4), dãy đối xứng của nhiều ống (Bảng B.5 và Bảng B.6) và dãy không đối xứng của nhiều ống (Bảng B.7, Bảng B.8 và Bảng B.9).

9.5.3.2 Các bảng cho một bộ mẫu kiểm tra song song ở một độ pha loãng

Các giá trị MPN và khoảng tin cậy 95 % của mỗi phần mẫu thử với 10, 15, 20, và 25 ống song song [mỗi ống được cấy với cùng một loại (đơn) dung dịch pha loãng] được thể hiện trong các Bảng từ B.1 đến B.4 trong Phụ lục B. Giá trị MPN và giá trị giới hạn 95 % được nhân lên với tỉ lệ: (thể tích chuẩn)/(thể tích phần mẫu thử) để biểu thị kết quả trên thể tích mẫu chuẩn. Không nhân giá trị độ không đảm bảo chuẩn logarit. Thể tích mẫu chuẩn của vi sinh vật trong nước thông thường là 100 mL. Thể tích phần mẫu thử có thể là ví dụ 1 mL hoặc một lượng tùy ý được chuyển sang ống.

VÍ DỤ: (từ Thư mục tài liệu tham khảo [4])

Hai mươi ống chứa môi trường gấp đôi nồng độ được cấy ủ với mỗi lượng 5mL mẫu lỏng. Sau khi nuôi ủ, quan sát được sự sinh trưởng ở 16 ống. Mật độ vi khuẩn có xác suất lớn nhất chiếm trong mẫu là bao nhiêu (sinh vật trong 100 mL)? Từ bảng B.3 cho thấy 1,61 là số của sinh vật có xác suất lớn nhất trong mỗi ống. Vì mỗi ống chứa 5 mL mẫu, mật độ có xác suất lớn nhất của sinh vật trong 100 mL mẫu là $(1,61/5 \text{ mL}) \times 100 \text{ mL} = 32$ trong 100 mL.

9.5.3.3 Bảng dùng cho nhiều độ pha loãng

Trong tài liệu chỉ cung cấp một số lượng có hạn các bảng. Cách lựa chọn được nêu lại trong Phụ lục B. Với hệ thống đối xứng, phương pháp thông thường nhất sẽ là chọn 3 bộ ống kế tiếp cho một vài kết quả dương tính và một vài âm tính (xem bên dưới). Ghi lại kết quả các kết quả dương tính cho mỗi bộ

ống và, từ bảng MPN đối với hệ thống cấy sử dụng, đọc số có khả năng nhất của sinh vật xuất hiện trong thể tích chuẩn của mẫu. Các Bảng B.5 và Bảng B.6 miêu tả hệ thống đối xứng của, tương ứng là $(3 \text{ hoặc } 5) \times 10 \text{ mL} + (3 \text{ hoặc } 5) \times 1 \text{ mL} + (3 \text{ hoặc } 5) \times 0,1 \text{ mL}$ và được cấu thành với thể tích chuẩn là 100 mL. Đây là hệ thống MPN truyền thống được sử dụng trong phân tích nước (và thực phẩm).

Trái lại, với các hệ thống không đối xứng, tất cả các ống đều cần được xem xét. Bảng B.7, Bảng B.8 và Bảng B.9 trong Phụ lục B trình bày các hệ thống "không đối xứng": tương ứng là $1 \times 50 \text{ mL} + 5 \times 10 \text{ mL}$, $5 \times 100 \text{ mL} + 1 \times 10 \text{ mL} + 1 \times 1 \text{ mL}$, và $1 \times 50 \text{ mL} + 5 \times 10 \text{ mL} + 5 \times 1 \text{ mL}$.

Với nhiều thể tích hoặc độ pha loãng của mẫu, áp dụng các quy tắc sau, chủ yếu dựa trên các quy tắc Taylor^[6], nếu quan sát các kết quả trong Bảng B.6 hoặc trong các bảng khác của các hệ thống MPN đối xứng:

- Nếu với một dãy có nhiều hơn ba độ pha loãng được sử dụng, chọn thể tích mẫu lớn nhất chỉ có kết quả âm tính và thể tích mẫu nhỏ nhất chỉ có kết quả dương tính, và tất cả các độ pha loãng ở giữa.
- Nếu việc áp dụng quy tắc a) chỉ với ba độ pha loãng, có thể tìm thấy giá trị MPN tương ứng trong Bảng B.6 [xem b) trong Bảng 1];
- Nếu việc áp dụng quy tắc a) với bốn độ pha loãng, có thể tìm thấy sự ước lượng MPN cho cả bộ ba độ pha loãng và trung bình về hình học của hai ước lượng được cho bằng giá trị MPN [xem c) trong Bảng 1] nếu quan tâm đến sự khác nhau của các mức độ pha loãng ;
- Nếu việc áp dụng quy tắc a) chỉ với hai độ pha loãng, chọn các bộ ba độ pha loãng để thu được một bộ đầy đủ các kết quả dương tính, nếu có [xem d) trong Bảng 1];
- Nếu việc áp dụng quy tắc a) với nhiều hơn bốn độ pha loãng, những giả định về mặt thống kê cho ước lượng MPN không được đáp ứng và không có kết quả nào được đưa ra (nguyên tắc này không áp dụng cho các hệ số pha loãng nhỏ hơn 10);
- Nếu chỉ một bộ ống cho một hoặc hai kết quả dương tính, sử dụng pha loãng này với một độ pha loãng cao hơn và một độ pha loãng thấp hơn [xem f) trong Bảng 1];

Bảng B.6 chỉ ra kết quả của các sự kết hợp giữa các ống dương tính và âm tính thường gặp. Nếu sự kết hợp các ống dương tính và âm tính quan sát được không xuất hiện trong Bảng B.6, thì bỏ qua kết quả. Thậm chí khi Công thức gần đúng trong 9.5.2.1 và chương trình máy tính (xem 9.5.4) định ra số MPN đối với các bộ ống không có trong Bảng B.6, thì kết quả vẫn không chắc chắn và không nên báo cáo.

9.5.4 Chương trình máy tính

Số lần pha loãng và số các ống song song hoặc sự đối xứng của hệ thống MPN không bị hạn chế trong chương trình máy tính mạnh nhất. Ví dụ, Hurley và Roscoe^[2] cho ước lượng MPN, độ không đảm bảo chuẩn (sai số chuẩn) của lg MPN (lg là \log_{10}), khoảng tin cậy 95 % và sự đánh giá độ tin cậy thống kê của bộ các số liệu.

Bảng 1 – Ví dụ về cách tính MPN từ các số lượng các kết quả dương tính trong bộ năm ống sử dụng Bảng B.6

Ví dụ trong phần nội dung	Thể tích mẫu trong phần mẫu thử, mL					MPN/ 100 mL
	10	1	0,1	0,01	0,001	
b)	5	5 ^a	2 ^a	0 ^a	0	490
b)	3 ^a	1 ^a	0 ^a	0		11
c)	5	5 ^a	3 ^a	2 ^a	0 ^a	
c)1	5	3	3			180
c)2		3	3	0		170
Trung bình của c)1 và c)2						175
d)	5 ^a	5 ^a	0 ^a	0	0	240
f)	0 ^a	1 ^a	0 ^a	0		2

^a Kết quả được sử dụng để xác định các giá trị MPN.

9.6 Ước lượng chính xác

9.6.1 Quy định chung

Các bảng đã công bố đưa ra độ chụm tại mức tin cậy 95 %. Chương trình máy tính có thể cung cấp thêm các giá trị bất định chuẩn của lg MPN.

9.6.2 Phép phân tích độ pha loãng đơn

Khi các bảng hoặc chương trình máy tính không có sẵn, mức tin cậy 95 % của ước lượng MPN có thể ước lượng gần đúng bằng Công thức (9):

$$x = \frac{V_s}{V_{tube}} \ln \left(\frac{n}{n_{neg} \pm 2 \sqrt{\frac{n_{neg} (n - n_{neg})}{n}}} \right) \tag{9}$$

Trong đó

- x là mức tin cậy 95 % trên và dưới;
- V_s là thể tích mẫu chuẩn của mẫu ban đầu, tính theo mL;
- V_{tube} là thể tích, của các mẫu trong mỗi ống của nhóm, tính theo mL;
- \ln là logarit cơ số tự nhiên;
- n là số các ống trong nhóm;
- n_{neg} là số các ống có phản ứng âm tính.

Ký hiệu dấu cộng liên quan đến giới hạn dưới, dấu trừ liên quan đến giới hạn trên. Ước lượng là không tốt khi hầu hết các ống thử là âm tính (không kết quả) nhưng sẽ tốt hơn khi số lượng các ống dương tính tăng lên.

9.6.3 Phép phân tích nhiều độ pha loãng đối xứng

Trong trường hợp khi các giải pháp bằng máy tính và các bảng không có sẵn, thì độ không đảm bảo của logarit của hệ thống MPN của nhiều độ pha loãng đối xứng có thể tính bằng Công thức gần đúng Cochran[1] cho sau đây:

$$s_{\bar{x}}(\lg \text{MPN}) = 0,58 \sqrt{\frac{\lg f}{n}} \quad (10)$$

Trong đó

- $s_{\bar{x}}$ là sai số chuẩn;
- \lg là logarit cơ số mười (\log_{10});
- f là hệ số pha loãng giữa các độ pha loãng kế tiếp nhau;
- n là số các ống của một độ pha loãng.

Mức tin cậy 95 % có thể tính gần đúng bằng cách nhân và chia cho giá trị ước lượng MPN bằng đối logarit. Quy trình có xu hướng phóng đại mức tin cậy trên.

Phụ lục A
(Tham khảo)
Tiêu chí để chọn kỹ thuật đếm

A.1 Giới thiệu

Hầu hết các vi sinh vật trong nước có thể nuôi cấy được đều có thể đếm bằng một trong bốn quy trình được nêu tại Điều 8 và Điều 9. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự lựa chọn quy trình có thể phân loại như sau:

- a) Các yếu tố liên quan đến chất lượng của kết quả (xem A.2)
- b) Các yếu tố liên quan đến bản chất của mẫu (xem A.3)
- c) Các yếu tố liên quan đến giá thành của các phép phân tích (xem A.4)

Phụ lục này đưa ra cái nhìn tổng quan chung. Các thông tin chi tiết có thể tham khảo chỗ khác ví dụ trong ISO/TR 13843.

A.2 Các yếu tố liên quan đến chất lượng của kết quả

A.2.1 Quy định chung

Chất lượng kết quả thu được từ bất kỳ phép thử nào cũng được định nghĩa bằng các thuật ngữ sau: Độ không đảm bảo đo, độ chính xác (bao gồm cả độ đúng và độ chụm) và hạn chế của sự phát hiện.

A.2.2 Độ không đảm bảo đo

Không có phép đo nào là hoàn hảo. Nó có độ không đảm bảo phát sinh từ nhiều yếu tố bao gồm các sai số và độ tái lập không hoàn hảo. Một cách lý tưởng thì mỗi phép đo nên việ dẫn cùng với độ không đảm bảo đo, thường là thêm dấu \pm vào con số, như vậy các quyết định dựa trên số đo được thông tin một cách đầy đủ.

ISO/TR 13843 đưa các thông tin sau về độ không đảm bảo:

Định nghĩa: Độ không đảm bảo (đếm) là độ lệch chuẩn tương đối của các kết quả của việc đếm được lặp lại của các khuẩn lạc hoặc các hạt của các đĩa mẫu hoặc các phạm vi mẫu dưới các điều kiện quy định.

Ví dụ: Các điều kiện qui định có thể là cùng một người thực hiện hoặc nhiều người thực hiện khác nhau trong một phòng thử nghiệm hoặc trong các phòng thử nghiệm khác nhau.

A.2.3 Độ chính xác

A.2.3.1 Nguyên tắc

Theo ISO/TR 13843, độ chính xác của phép đo được định nghĩa là sự gần giống nhau về kết luận giữa kết quả thử và giá trị chuẩn đã được chấp nhận. Theo Lightfoot và Maier^[3], độ chính xác tỷ lệ nghịch

với độ không đảm bảo đo toàn phần, ví dụ sự chênh lệch giữa giá trị đo được và giá trị thật. Độ không đảm bảo đo toàn phần của phép đo đơn được hiểu là gồm có hai thành phần: hệ thống (tức là độ chệch) và ngẫu nhiên (không chụm), như sau:

$$\text{Độ không đảm bảo} = \text{Độ chệch} + \text{Độ không chụm}$$

Sau đây là sự đơn giản hóa trường hợp này. Trong vi sinh, thường có sự phân bố bất định không phù hợp với công thức này – sự thay đổi bất thường không lường trước không thể diễn giải bằng toán học. Ngược lại với độ chệch là độ đúng của phương pháp. Đây là đặc điểm của phương pháp sử dụng cho phân tích và cũng phụ thuộc vào bản chất của mẫu. Độ đúng không liên quan đến sai số khi áp dụng phương pháp trong các phòng thử nghiệm riêng. Bao gồm cả những sai số ngẫu nhiên của phép đo, như là sự khác nhau giữa các phòng thử nghiệm hoặc trong một phòng thử nghiệm. Ngược lại của sai số ngẫu nhiên là độ chụm. Ví thế, mối quan hệ như trên được biểu thị một cách thông dụng như sau:

$$\text{Độ chính xác} = \text{Độ đúng} + \text{Độ chụm}$$

A.2.3.2 Độ đúng

A.2.3.2.1 Quy định chung

Theo TCVN 8244-1 (ISO 3534-1), định nghĩa của độ đúng là mức độ gần nhau giữa giá trị trung bình thu được từ nhóm lớn các kết quả thử và giá trị đã được công nhận. TCVN 8244-1 (ISO 3534-1) cũng chỉ ra rằng số đo độ đúng thường được biểu thị qua độ chệch, độ chệch được định nghĩa là: sự chênh lệch giữa các kết quả phép thử dự kiến và giá trị chuẩn đã được công nhận.

Nhìn chung đối với các phép phân tích vi sinh, nồng độ thực của một thành phần không được biết và chỉ được sử dụng như là giả thuyết. Do đó sai số hệ thống không thể công bố theo giá trị tuyệt đối. Về lý thuyết có thể tiếp cận nghiên cứu một mẫu lặp lại, bằng nhiều phương pháp khác nhau. Vì phương pháp vi sinh không bền trong tự nhiên (ví dụ mẫu bị mất trong quá trình phân tích) điều này đòi hỏi mẫu thử phải được trộn kỹ để vi khuẩn phân bố một cách ngẫu nhiên và/hoặc nhóm lớn các phòng thí nghiệm (xem Tham khảo [3]).

Sai số có thể định lượng hoặc định tính. Sai số về định lượng xuất hiện, ví dụ, khi vi sinh vật được đếm qua thật thuộc một nhóm tìm kiếm, nhưng kết quả của sự đếm cuối cùng lại được đánh giá dưới số lượng thực. Sai số về định tính xuất hiện, ví dụ, khi số vi sinh vật không thuộc một nhóm tìm kiếm được coi và đếm để giá trị cuối cùng lại cao hơn giá trị thật. Cả hai sai số trên có thể đồng thời xảy ra.

A.2.3.2.2 Các sai số về định lượng

Một số sai số không phụ thuộc vào quy trình đếm. Khi tồn tại các hạt lơ lửng, các vi sinh vật có thể bị hấp phụ thành cụm do sự chuyển động mạnh; nó sẽ làm thay đổi sự thừa nhận quá trình hình thành một khuẩn lạc hoặc màu đục của dịch nuôi cấy từ một lượng nhỏ thể tích mẫu có nguồn gốc từ một vi sinh vật.

Phản ứng của môi trường chọn lọc cũng có thể bị ức chế quá mức và do đó gây trở ngại tới sự phát triển của không những các vi sinh vật khác mà cả các vi sinh vật cần được đếm.

TCVN 9716:2013

Các sai số khác có thể là do bản chất của mẫu nước. Các thành phần lý hóa như chất độc hoặc nồng độ muối cao có thể ảnh hưởng đến môi trường nuôi cấy và do đó hạn chế sự phát triển. Kết quả này khá quan trọng khi các thể tích của phần mẫu thử sử dụng lớn so với thể tích của môi trường nuôi cấy. (ví dụ các quy trình MPN trong môi trường mạnh gấp đôi hoặc gấp nhiều lần được sử dụng hoặc môi trường khử nước hòa tan trong mẫu phân tích). Sự lọc qua màng, dùng phân lập vi sinh vật khỏi mẫu, có thể khắc phục vấn đề này, miễn là các chất ức chế không giữ lại trên màng.

Các thành phần sinh học như là microflora, bình, cả sự cạnh tranh sinh học, gây trở ngại tới sự phát triển của vi sinh vật cần tìm. Kết quả này xuất hiện đặc biệt trong môi trường lỏng. Trong quá trình khác khi vi sinh vật hình thành từ khuẩn lạc phân lập từ các vi sinh vật khác, sự cạnh tranh sinh học này bị hạn chế, miễn là không có sự phát tán hoặc nhiễu quá.

A.2.3.2.3 Các sai số về định tính

Các sai số về định tính xuất hiện khi có sự khác nhau về định nghĩa các vi sinh vật cần tìm và sự xác định các vi sinh vật đã được phân lập. Khi định nghĩa này chính xác, thì với các cá thể trong chi hoặc loài, có sự ngoại lệ đối với sự quan sát đơn để có các kết quả cuối cùng chính xác, và thường không thể thực hiện được các phép thử xác định tiếp theo.

Do đó điều quan trọng là cần sử dụng các quy trình nuôi cấy và môi trường có nhiều thông tin chẩn đoán nhất có thể.

A.2.3.3 Độ chụm

Theo TCVN 8244-1 (ISO 3534-1) và ISO 13843, định nghĩa về độ chụm là mức độ gần nhau giữa các kết quả phép thử độc lập nhận được dưới các điều kiện quy định. TCVN 8244-1 (ISO 3534-1) cũng chỉ ra số đo độ chụm thường được biểu thị theo độ không chụm và được tính theo độ lệch chuẩn của các kết quả thử. Độ chụm kém phản ánh bằng độ lệch chuẩn lớn.

Nguyên tắc chung của đặc điểm về độ chụm của các phương pháp thử được nêu tại TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và ISO 16140. Hai số đo độ chụm được mô tả: theo độ lặp lại và độ tái lập. Các định nghĩa như sau:

Độ lặp lại (r): mức độ gần nhau giữa các kết quả của phép thử độc lập với nhau thu được bởi cùng một phương pháp trên cùng nguyên liệu đồng nhất của phép thử trong cùng một phòng thí nghiệm do cùng một người thực hiện sử dụng các dụng cụ giống nhau trong khoảng thời gian ngắn.

Độ tái lập (R): mức độ gần nhau giữa các kết quả của phép thử thu được bởi cùng một phương pháp trên cùng nguyên liệu đồng nhất của phép thử các phòng thí nghiệm khác nhau do người thực hiện khác nhau sử dụng các dụng cụ khác nhau.

Trong vi sinh, không thể cung cấp các vật liệu thực sự giống nhau cho các phép thử. Sự phân bố ngẫu nhiên của vi sinh vật là khách quan nhất, và mức độ cần đạt được là rất quan trọng để thiết lập r và R .

Bất kỳ sự phân tán quá mức nào trong các vật liệu của phép thử này cũng sẽ làm tăng thêm sự sai khác trong các kết quả phép thử.

Nhiều yếu tố ảnh hưởng đến độ chụm nhưng chỉ những yếu tố có quan hệ với sự phân bố ngẫu nhiên của vi sinh vật trong mẫu được thảo luận trong Tiêu chuẩn quốc tế.

Phân bố ngẫu nhiên của vi sinh vật trong mẫu tạo độ không chụm kết quả; điều này có thể hạn chế bằng cách sử dụng hệ thống nuôi cấy thích hợp.

Với quy trình MPN, độ chụm tăng lên khi tăng số lượng các ống nuôi cấy lặp lại với mỗi nhóm thể tích của phần mẫu thử. Độ chụm tương đối phụ thuộc vào mẫu hình các kết quả dương tính thu được.

Với quy trình đếm khuẩn lạc, độ chụm phụ thuộc vào tổng số các khuẩn lạc và do đó độ chụm tăng khi tăng số lượng đĩa hoặc màng cấy. Độ chụm cũng tăng khi số lượng khuẩn lạc tăng tới đa đến khoảng 150 khuẩn lạc (điển hình) trong một đĩa đối với đếm đĩa và khoảng 100 khuẩn lạc (điển hình) trong một đĩa đối với lọc qua màng.

A.2.4 Giới hạn phát hiện

A.2.4.1 Nguyên tắc

Ngược lại với các phép phân tích hóa học khi giới hạn phát hiện liên quan đến giá trị thực, trong vi sinh vật học giới hạn phát hiện phụ thuộc vào phương pháp sử dụng.

Giới hạn phát hiện là một quy trình được xem như là một thể tích trong đó một cá thể riêng lẻ được phát hiện hoặc số lượng nhỏ nhất của các vi sinh vật có thể phát hiện được trong một thể tích nước, thường là 1 mL hoặc 100mL. Theo ISO/TR 13843, giới hạn phát hiện được xác định như là số lượng hạt x (trên phần mẫu thử), trong đó xác suất p_0 của một kết quả âm tính tương đương 5%.

A.2.4.2 Giới hạn phát hiện của các quy trình đếm khuẩn lạc

Giới hạn phát hiện tương ứng với sự phát triển của một khuẩn lạc trong phần mẫu thử. Vì thế, giới hạn này sẽ phụ thuộc vào thể tích của mẫu được nuôi cấy.

Tuy nhiên, có một hạn chế do vi sinh vật đi kèm khác trong mẫu thử có khả năng sinh trưởng trong cùng điều kiện thử khi vi sinh vật được đếm. Nếu có số lượng lớn, chúng có thể sinh trưởng quá mức. Ví dụ, trên màng có hơn 100 khuẩn lạc được chấp nhận, giới hạn phát hiện sẽ bị giảm đi nếu số lượng khuẩn lạc đi kèm lớn hơn 100 lần so với khuẩn lạc cần tìm. Trong trường hợp này, nhất là trên môi trường không có chất chọn lọc phù hợp thì quá trình tính MPN có thể là ưa dùng.

Trong thực tế, các giới hạn phát hiện bao gồm như sau:

- a) Với lọc màng, trong trường hợp nước sạch thì có thể dễ dàng lọc một lượng mẫu lớn vì thế đưa ra một giới hạn phát hiện của một cá thể vi sinh vật trong thể tích được lọc;
- b) Với quy trình đổ đĩa, 5 mL là thể tích lớn nhất có thể được nuôi cấy, dẫn đến giới hạn phát hiện một cá thể vi sinh vật trong 5 mL (giới hạn phát hiện có thể cải tiến bằng cách tăng số lượng các

TCVN 9716:2013

phần mẫu thử được dùng, nhưng trong thực tế việc nuôi cấy nhiều hơn 5 đĩa là không thực tế và vì thế giới hạn phát hiện là một cá thể vi sinh vật trong 25 mL);

- c) Với quy trình trải đĩa, thể tích mẫu tối đa thường dùng là 0,2 mL trong mỗi đĩa, và vì thế giới hạn phát hiện với 5 đĩa nuôi cấy là một cá thể vi sinh vật/mL. Với môi trường khô (xem 8.2.4.2 về ảnh hưởng của đĩa thạch bị quá khô), có thể dùng các phần mẫu thử là 0,5 mL cho mỗi đĩa, dẫn đến giới hạn phép đo cho một cá thể vi sinh vật trong 2,5 mL khi nuôi cấy 5 đĩa.

A.2.4.3 Giới hạn phát hiện trong quy trình xác định số MPN

Giới hạn phát hiện phụ thuộc vào thể tích của mẫu thực tế được kiểm tra. Tổng thể tích của mẫu kiểm tra tăng lên thì giới hạn phát hiện sẽ được cải thiện. Với quy trình xác định MPN, điều này có thể đạt được bằng cách tăng số lượng ống thử trong mỗi độ pha loãng hoặc tăng thể tích phần mẫu thử cho mỗi ống hoặc sử dụng nồng độ đậm đặc sau quá trình lọc.

A.3 Các yêu cầu liên quan đến bản chất của mẫu

A.3.1 Bản chất của vi sinh vật

Ngoài các vi sinh vật cần phát hiện, việc phát triển của các vi sinh vật khác trong cùng môi trường có thể cũng ảnh hưởng đến việc lựa chọn phương pháp.

Ví dụ, những vi sinh vật nhất định là hiếu khí bắt buộc và việc phát hiện chúng có thể phải tiến hành bằng kỹ thuật trải đĩa hoặc lọc màng. Các vi sinh vật yếm khí đôi khi lại cần mức độ yếm khí nhất định và kỹ thuật đổ đĩa là thích hợp (xem 8.2.3). Để loại bỏ vi sinh vật hiếu khí thì đòi hỏi điều kiện yếm khí tốt hơn, nên dùng các ống môi trường sâu.

Có một số vi sinh vật không thể chịu được sốc nhiệt khi trộn mẫu với thạch nóng chảy ở $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ thì phải tránh dùng kỹ thuật đổ đĩa để đếm; điều này áp dụng cho nhiều vi sinh vật trong các hồ và nước bề mặt. Tuy nhiên, để tìm kiếm vi sinh vật trong các nguồn nước trên, nhưng thường sống ở nhiệt độ cao hơn và chịu được sốc nhiệt thì kỹ thuật đổ đĩa có một vài ưu điểm.

A.3.2 Thành phần của nước

Các chất huyền phù gây cản trở đặc biệt trong quá trình lọc màng; làm tắc màng hạn chế quá trình lọc và độ nhạy của phương pháp. Tắc một phần có thể giảm sự trao đổi chất và ngăn ngừa các vi sinh vật nằm trên màng hình thành các khuẩn lạc. Sự tắc nghẽn này thường gây nên bởi các sinh vật sống bao gồm vi sinh vật phù du hoặc thậm chí là các vi khuẩn nhân lên trong các lỗ.

Đôi khi một vài các hạt lớn có thể bị nhầm lẫn là các khuẩn lạc trong quy trình đổ đĩa.

Đối với nước rất đục, quy trình MPN có thể là quy trình duy nhất được sử dụng; vì thường là kỹ thuật đổ đĩa không cung cấp đủ độ nhạy.

Các chất hòa tan có thể ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật do thay đổi thành phần của môi trường chọn lọc hoặc do tính độc của chúng. Đặc biệt, ảnh hưởng này xảy ra khi thể tích mẫu tương

đổi lớn so với lượng môi trường được sử dụng (xem 9.3.2.). Đôi khi các chất trong mẫu có thể phản ứng với thành phần môi trường và gây bất lợi đến các phản ứng đặc thù của vi sinh vật cần tìm mà không ảnh hưởng đến quá trình phát triển, mặc dù sự hình thành đường lên men không có mặt trong môi trường nuôi cấy ban đầu mà kết quả là giá trị pH bị thay đổi do quá trình lên men của đường này. Kỹ thuật lọc lên màng có thể giải quyết yếu điểm này.

A.4 Các yêu cầu về tài chính

So sánh chi phí của các quy trình khác nhau này là không dễ dàng và thường phụ thuộc vào điều kiện tại chỗ. Mặc dù vậy, sự hiểu biết về các yếu tố tài chính có thể tạo thuận lợi cho việc chọn lựa phương pháp được chấp nhận.

Phụ lục B
(Tham khảo)
Các bảng MPN

Bảng B.1 – Giá trị MPN trên phần mẫu thử và mức tin cậy 95 % đối với một bộ 10 ống được tính theo Hurley và Roscoe ^[2]

Số ống có thực	Bộ 10 ống			
	MPN	Độ không đảm bảo đo chuẩn của lg MPN	Mức 95 %	
			Dưới	Trên
1	0,11	0,435	0,02	0,75
2	0,22	0,308	0,06	0,89
3	0,36	0,252	0,11	1,11
4	0,51	0,220	0,19	1,38
5	0,69	0,198	0,28	1,69
6	0,92	0,184	0,40	2,10
7	1,20	0,174	0,55	2,64
8	1,61	0,171	0,75	3,48
9	2,30	0,179	1,03	5,16

Bảng B.2 – Giá trị MPN trên phần mẫu thử và mức tin cậy 95 % đối với một bộ 15 ống được tính theo Hurley và Roscoe ^[2]

Số ống có thực	Bộ 15 ống			
	MPN	Độ không đảm bảo đo chuẩn của lg MPN	Mức 95 %	
			Dưới	Trên
1	0,07	0,434	0,01	0,49
2	0,14	0,307	0,04	0,57
3	0,22	0,251	0,07	0,69
4	0,31	0,219	0,12	0,83
5	0,41	0,196	0,17	0,98
6	0,51	0,179	0,23	1,15
7	0,63	0,167	0,30	1,33
8	0,76	0,157	0,37	1,55
9	0,92	0,150	0,47	1,80
10	1,10	0,144	0,57	2,11
11	1,32	0,141	0,70	2,49
12	1,61	0,139	0,86	3,02
13	2,01	0,142	1,06	3,82
14	2,71	0,155	1,35	5,45

Bảng B.3 – Giá trị MPN trên phân mẫu thử và mức tin cậy 95 % đối với một bộ 20 ống được tính theo Hurley và Roscoe ^[2].

Số ống có thực	Bộ 20 ống			
	MPN	Độ không đảm bảo đo chuẩn của lg MPN	Mức 95 %	
			Dưới	Trên
1	0,05	0,434	0,01	0,36
2	0,11	0,307	0,03	0,42
3	0,16	0,251	0,05	0,50
4	0,22	0,218	0,08	0,60
5	0,29	0,195	0,12	0,69
6	0,36	0,178	0,16	0,80
7	0,43	0,165	0,20	0,91
8	0,51	0,155	0,25	1,03
9	0,59	0,147	0,31	1,16
10	0,69	0,140	0,37	1,30
11	0,80	0,134	0,44	1,46
12	0,92	0,130	0,51	1,65
13	1,05	0,126	0,59	1,85
14	1,20	0,123	0,69	2,10
15	1,39	0,121	0,80	2,40
16	1,61	0,121	0,93	2,77
17	1,90	0,122	1,09	3,29
18	2,30	0,127	1,30	4,08
19	3,00	0,141	1,58	5,67

Bảng B.4 – Giá trị MPN trên phần mẫu thử và mức tin cậy 95 % đối với một bộ 25 ống được tính theo Hurley và Roscoe ^[2]

Số ống có thực	Bộ 25 ống			
	MPN	Độ không đảm bảo đo chuẩn của lg MPN	Mức 95 %	
			Dưới	Trên
1	0,04	0,434	0,01	0,29
2	0,08	0,307	0,02	0,33
3	0,13	0,251	0,04	0,40
4	0,17	0,217	0,07	0,47
5	0,22	0,195	0,09	0,54
6	0,27	0,178	0,12	0,61
7	0,33	0,165	0,16	0,69
8	0,39	0,154	0,19	0,77
9	0,45	0,146	0,23	0,86
10	0,51	0,139	0,27	0,96
11	0,58	0,133	0,32	1,06
12	0,65	0,128	0,37	1,16
13	0,73	0,123	0,42	1,28
14	0,82	0,119	0,48	1,41
15	0,92	0,116	0,54	1,55
16	1,02	0,113	0,61	1,70
17	1,14	0,111	0,69	1,88
18	1,27	0,109	0,78	2,09
19	1,43	0,108	0,88	2,33
20	1,61	0,108	0,99	2,62
21	1,83	0,109	1,12	2,99
22	2,12	0,111	1,29	3,50
23	2,53	0,117	1,49	4,28
24	3,22	0,123	1,77	5,85

Bảng B.5 – Giá trị MPN trên 100 mL mẫu và mức tin cậy 95 % (đối với các kết hợp khác nhau của các kết quả dương khi sử dụng các phần mẫu thử 3 ống 10 mL, 3 ống 1 mL và 3 ống 0,1 mL)

Số ống có phản ứng dương tính			MPN (MPN / 100 mL)	Mức tin cậy 95 %	
3 ống 10 mL	3 ống 1 mL	3 ống 0,1 mL		Dưới	Trên
0	0	1	3	< 1	9
0	1	0	3	< 1	13
1	0	0	4	< 1	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Bảng B.6 – Giá trị MPN trên 100 mL mẫu và mức tin cậy 95 % (khi sử dụng các phần mẫu thử 5 ống 10 mL, 5 ống 1 mL và 5 ống 0,1 mL)

Số ống có phản ứng dương tính			MPN (MPN / 100 mL)	Mức tin cậy 95 %	
5 ống 10 mL	5 ống 1 mL	5 ống 0,1 mL		Dưới	Trên
0	0	0	< 2	<1	7
0	1	0	2	<1	7
0	2	0	4	<1	11
1	0	0	2	<1	7
1	0	1	4	<1	11
1	1	0	4	<1	11
1	1	1	6	<1	15
2	0	0	5	<1	13
2	0	1	7	1	17
2	1	0	7	1	17
2	1	1	9	2	21
2	2	0	9	2	21
2	3	0	12	3	28
3	0	0	8	1	19
3	0	1	11	2	25
3	1	0	11	2	25
3	1	1	14	4	34
3	2	0	14	4	34
3	2	1	17	5	46
3	3	0	17	5	46
4	0	0	13	3	31
4	0	1	17	5	46
4	1	0	17	5	46
4	1	1	21	7	63
4	1	2	26	9	78
4	2	0	22	7	67
4	2	1	26	9	78
4	3	0	27	9	80
4	3	1	33	11	93
4	4	0	34	12	93

Bảng B.6 – (kết thúc)

Số ống có phản ứng dương tính			MPN (MPN / 100 mL)	Mức tin cậy 95 %	
5 ống 10 mL	5 ống 1 mL	5 ống 0,1 mL		Dưới	Trên
5	0	0	23	7	70
5	0	1	31	11	89
5	0	2	43	15	110
5	1	0	33	11	93
5	1	1	46	16	120
5	1	2	63	21	150
5	2	0	49	17	130
5	2	1	70	23	170
5	2	2	94	28	220
5	3	0	79	25	190
5	3	1	110	31	250
5	3	2	140	37	340
5	3	3	180	44	500
5	4	0	130	35	300
5	4	1	170	43	490
5	4	2	220	57	700
5	4	3	280	90	850
5	4	4	350	120	1000
5	5	0	240	68	750
5	5	1	350	120	1000
5	5	2	540	180	1400
5	5	3	920	300	3200
5	5	4	1600	640	5800
5	5	5	> 1800	–	–

Bảng B.7 – Giá trị MPN trên 100 mL mẫu và mức tin cậy 95 % (khi sử dụng các phần mẫu thử 1 ống 50 mL và 5 ống 10 mL)

Số ống có phản ứng dương tính		MPN (MPN / 100 mL)	Mức tin cậy 95 %	
1 ống 50 mL	5 ống 10 mL		Dưới	Trên
0	0	< 1	< 1	
0	1	1	< 1	4
0	2	2	< 1	6
0	3	4	1	11
0	4	5		13
0	5	7	2	17
1	0	2	< 1	6
1	1	3	< 1	9
1	2	6	1	15
1	3	9	2	21
1	4	16	4	40
1	5	> 18		

Bảng B.8 – Giá trị MPN trên 100 mL mẫu và mức tin cậy 95 % (khi sử dụng các phần mẫu thử 5 ống 100 mL, 1 ống 10 mL và 1 ống 1 mL)

Số ống có phản ứng dương tính			MPN (MPN / 100 mL)	Mức tin cậy 95 %	
5 ống 100 mL	1 ống 10 mL	1 ống 1 mL		Dưới	Trên
1 ^a			< 1	< 1	1
0	1	0	< 1	< 1	1
1	0	0	< 1	< 1	1
1	1	0	< 1	< 1	2
2 ^a			< 1	< 1	2
2	0	0	< 1	< 1	2
2	1	0	< 1	< 1	2
3 ^a			< 1	< 1	3
3	0	0	< 1	< 1	3
3	0	1	1	< 1	3
3	1	0	1	< 1	4
4 ^a			2	< 1	5
4	0	0	2	< 1	5
4	0	1	2	< 1	6
4	1	0	2	< 1	6
5	0	0	4	2	36
5	0	1	10	3	54
5	1	0	20	10	380

^a Các kết quả này biểu thị cho trường hợp khi chỉ sử dụng một mức với 5 ống.

Bảng B.9 – Giá trị MPN trên 100 mL mẫu và mức tin cậy 95 % (khi sử dụng các phần mẫu thử 1 ống 100 mL, 5 ống 10 mL và 1 ống 1 mL)

Số ống có phản ứng dương tính			MPN (MPN / 100 mL)	Mức tin cậy 95 %	
1 ống 50 mL	5 ống 10 mL	5 ống 1 mL		Dưới	Trên
0	0	0	< 1		
0	0	1	1	< 1	4
0	0	2	2	< 1	6
0	1	0	1	< 1	4
0	1	1	2	< 1	6
0	1	2	3	< 1	8
0	2	0	2	< 1	6
0	2	1	3	< 1	8
0	2	2	4	< 1	11
0	3	0	3	< 1	8
0	3	1	5	< 1	13
0	4	0	5	< 1	13
1	0	0	1	< 1	4
1	0	1	3	< 1	8
1	0	2	4	< 1	11
1	0	3	6	< 1	15
1	1	0	3	< 1	8
1	1	1	5	< 1	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	< 1	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31

Bảng B.9 – (kết thúc)

Số ống có phản ứng dương tính			MPN (MPN / 100 mL)	Mức tin cậy 95 %	
1 ống 50 mL	5 ống 10 mL	5 ống 1 mL		Dưới	Trên
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	69
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	101
1	4	5	43	15	117
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	101
1	5	2	54	18	138
1	5	3	92	27	217
1	5	4	161	3	450
1	5	5	> 180	–	–

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] COCHRAN W.G. 1950. Estimation of bacterial sensitivities by means of the "Most Probable Number". *Biometrics*, 6, 105-116
- [2] HURLEY M.A. and ROSCOE M.E. 1983. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *J. Appl. Bacteriol.*, 55, pp. 159-64
- [3] LIGHTFOOT N.F. and MAIER E.A. 1998. *Microbiological Analysis of Food and Water: Guidelines for Quality Assurance*. Elsevier, Amsterdam, etc.
- [4] NIEMELÄ S. 1983. *Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations*. Nordic Committee on Food Analysis. NMKL, Report No. 1, 2nd edition
- [5] NIEMELÄ S. 2003. *Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms*. Centre for Metrology and Accreditation. Publication J4/2003, 82 pp. Helsinki, Finland (www.mikes.fi)
- [6] TAYLOR J. 1962. The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series. *J. Appl. Bacteriol.*, 25, pp. 54-61
- [7] THOMAS H.A., Jr. 1942. Bacterial densities from fermentation tube tests. *J. Am. Wat. Wks Ass.*, 34, pp. 572-76.
- [8] TCVN 8244-1:2010 (ISO 3534-1:2006), *Thống kê học – Từ vựng và ký hiệu – Phần 1: Thuật ngữ chung về thống kê và thuật ngữ dùng trong xác suất*
- [9] ISO 5667-2:1991, *Water quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques*
- [10] TCVN 6663-3:2008 (ISO 5667-3:2003), *Chất lượng nước – Lấy mẫu – Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu*
- [11] 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*
- [12] TCVN 8184-8:2009 (ISO 6107-8:1993), *Chất lượng nước – Thuật ngữ - Phần 8*
- [13] ISO 6887-1:1999, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*
- [14] TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật*
- [15] ISO 7704:1985, *Water quality – Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses*
- [16] TCVN 6189-1:2009 (ISO 7899-1:1998/Cor 1:2001), *Chất lượng nước – Phát hiện và đếm Escherichia coli và vi khuẩn coliform – Phần 1: Phương pháp lọc màng*

- [17] ISO 9308-3:1998, *Water quality – Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria – Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) for the detection and enumeration of E. coli in surface and waste water, including Technical Corrigendum 1:2000 to ISO 9308-3:1998*
- [18] 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*
- [19] TCVN 8128-2:2009(ISO/TS 11133-2:2003), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 2: Các hướng dẫn thực hành về thử nghiệm hiệu năng của môi trường nuôi cấy*
- [20] ISO/TR 13843:2000, *Water quality – Guidance on validation of microbiological methods*
- [21] ISO 16140:2003, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods*
-