

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 7924-3:2017

ISO 16649-3:2015

Xuất bản lần 2

**VI SINH VẬT TRONG CHUỖI THỰC PHẨM -
PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ESCHERICHIA COLI
DƯƠNG TÍNH B-GLUCURONIDAZA - PHẦN 3: PHÁT HIỆN
VÀ KỸ THUẬT TÍNH SỐ CÓ XÁC SUẤT LỚN NHẤT SỬ
DỤNG 5-BROMO-4-CLO-3-INDOLYL B-D-GLUCURONID**

Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli - Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide

HÀ NỘI - 2017

Lời nói đầu

TCVN 7924-3:2017 thay thế TCVN 7924-3:2008;

TCVN 7924-3:2017 hoàn toàn tương đương với ISO 16649-3:2015;

TCVN 7924-3:2017 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

TCVN 7924 (ISO 16649) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp định lượng Escherichia coli dương tính β -glucuronidaza*, bao gồm các phần sau:

- TCVN 7924-1:2008 (ISO 16649-1:2001), *Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng màng lọc và 5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-glucuronid*;
- TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001), *Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-glucuronid*;
- TCVN 7924-3:2017 (ISO/TS 16649-3:2015), *Phần 3: Phát hiện và kỹ thuật tính số có xác suất lớn nhất sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-glucuronid*.

Lời giới thiệu

Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi nên phương pháp này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể. Trong trường hợp này, có thể sử dụng các phương pháp khác đặc trưng cho từng sản phẩm, nếu hoàn toàn chỉ vì lý do kỹ thuật. Tuy nhiên, cần cố gắng áp dụng phương pháp này khi có thể.

Khi tiêu chuẩn này được soát xét thì cần phải tính đến mọi thông tin thích hợp liên quan đến phạm vi mà phương pháp này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch phương pháp này trong trường hợp các sản phẩm cụ thể.

Việc hài hoà các phương pháp thử có thể không thực hiện được ngay và đối với một vài nhóm sản phẩm cụ thể có thể tồn tại các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Thông thường khi các tiêu chuẩn như vậy được soát xét, chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch về phương pháp này là các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

**Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp
định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza –
Phần 3: Phát hiện và kỹ thuật tính số có xác suất lớn nhất
sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl β -D-glucuronid**

*Microbiology of the food chain – Horizontal method
for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli* –
Part 3: Detection and most probable number technique using
5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide*

CẢNH BÁO – Một số chủng *Escherichia coli* không phát triển được ở 44 °C và cụ thể là các *Escherichia coli* âm tính β -glucuronidaza như *Escherichia coli* O157 và một số chủng *E. coli* gây bệnh khác sẽ không phát hiện được bằng phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phát hiện và định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza bằng kỹ thuật cấy trong môi trường lỏng và tính số có xác suất lớn nhất (MPN) sau khi được ủ ở (37 ± 1) °C rồi ủ tiếp ở (44 ± 1) °C. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi và
- các mẫu môi trường trong khu vực chế biến thực phẩm và xử lý thực phẩm.

Phương pháp này thích hợp để định lượng các tế bào *Escherichia coli* yếu hoặc bị tổn thương mà có thể đã trải qua giai đoạn làm mất nước, đông lạnh, tiếp xúc với môi trường mặn (như nước biển) hoặc bị tổn thương do các chất tẩy rửa như các sản phẩm chứa clo.

Hạn chế của việc áp dụng phương pháp này là do độ nhạy của phương pháp có sự dao động lớn. Phương pháp này được áp dụng và các kết quả được diễn giải theo thông tin nêu trong Điều 11.

TCVN 7924-3:2017

Phương pháp này chưa được đánh giá đầy đủ trên tất cả các nền mẫu (ví dụ: sữa và sản phẩm sữa). TCVN 6846 (ISO 7251) được dùng cho sữa và sản phẩm sữa.

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 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.

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

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.*

TCVN 6507-2 (ISO 6887-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thịt và sản phẩm thịt.*

TCVN 6507-3 (ISO 6887-3), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 3: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thủy sản và sản phẩm thủy sản.*

TCVN 6507-4 (ISO 6887-4), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 4: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các sản phẩm khác với sữa và sản phẩm sữa, thịt và sản phẩm thịt, thủy sản và sản phẩm thủy sản.*

TCVN 6507-5 (ISO 6887-5) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 5: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu sữa và sản phẩm sữa.*

TCVN 6507-6 (ISO 6887-6) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 6: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu được lấy từ giai đoạn sản xuất ban đầu.*

TCVN 8128 (ISO 11133) *Vi sinh vật trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và nước. – Chuẩn bị, sản xuất, bảo quản và thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

***Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza** (β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*)

Các chủng *E. coli* ở nhiệt độ 44 °C hình thành các khuẩn lạc màu xanh lam hoặc xanh da trời điển hình trên môi trường trypton-mật-glucuronid (TBX) trong các điều kiện được quy định trong tiêu chuẩn này.

3.2

Định lượng *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza (enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*)

Việc xác định số có xác suất lớn nhất của *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza được tính trên millilit hoặc trên gam mẫu, khi phép thử được thực hiện theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Phương pháp phát hiện

4.1.1 Cấy một lượng xác định mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu dạng lỏng, hoặc với một lượng xác định huyền phù ban đầu trong trường hợp sản phẩm dạng khác vào môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc.

4.1.2 Ủ các ống nghiệm ở 37 °C \pm 1 °C trong 24 h \pm 2 h. Kiểm tra các ống này về sự sinh axit do lên men lactose.

4.1.3 Nếu ống cho thấy có sinh axit thì ống này sẽ được cấy truyền vào môi trường thạch trypton-mật-glucuronid (5.3.2).

4.1.4 Ủ thạch trypton-mật-glucuronid (5.3.2) ở 44 °C \pm 1 °C trong 22 h \pm 2 h. Xác định trên môi trường thạch trypton-mật-glucuronid (5.3.2) sự có mặt các khuẩn lạc màu xanh lam hoặc xanh da trời, cho thấy có mặt *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza.

4.1.5 Biểu thị kết quả là có hoặc không có mặt *Escherichia coli* trong x g hoặc x ml sản phẩm.

4.2 Phương pháp định lượng

4.2.1 Cấy một lượng xác định mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu dạng lỏng, hoặc với một lượng xác định huyền phù ban đầu trong trường hợp sản phẩm dạng khác vào ba hoặc năm ống nghiệm chứa môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc nồng độ kép [5.3.1.1a)].

TCVN 7924-3:2017

Đối với nhuyễn thể hai mảnh vỏ tươi sống hoặc các sản phẩm khác cần đến độ chụm cao hơn, do đó cần nuôi cấy một dãy năm ống nghiệm.

4.2.2 Cấy một lượng xác định mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu dạng lỏng, hoặc với một lượng xác định huyền phù ban đầu trong trường hợp sản phẩm dạng khác vào ba hoặc năm ống nghiệm chứa môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc nồng độ đơn [5.3.1.1 b)].

Sau đó, với cùng điều kiện trên, cấy lượng xác định các dung dịch mẫu thử pha loãng thập phân hoặc huyền phù ban đầu vào môi trường trên.

4.2.3 Ủ các ống nghiệm chứa môi trường nồng độ kép và nồng độ đơn ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $22\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Kiểm tra các ống này về sự sinh axit do lên men lactose.

4.2.4 Mỗi ống môi trường (5.3.1) có sinh axit, sẽ được cấy truyền vào môi trường thạch trypton-mật-glucuronid (TBX) (5.3.2).

4.2.5 Ủ thạch trypton-mật-glucuronid (5.3.2) ở $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $22\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Kiểm tra trên môi trường thạch trypton-mật-glucuronid (TBX) (5.3.2) sự có mặt các khuẩn lạc màu xanh lam hoặc xanh da trời, cho thấy có mặt *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza.

4.2.6 Số có xác suất lớn nhất *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] được xác định theo số ống môi trường (5.3.1) được cấy truyền có sinh các khuẩn lạc màu xanh lam hoặc xanh da trời trên thạch trypton-mật-glucuronid (5.3.2) theo TCVN 6404 (ISO 7218).

5 Dịch pha loãng và môi trường nuôi cấy

5.1 Yêu cầu chung

Đối với việc thực hành phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218). Đối với việc chuẩn bị và thử nghiệm môi trường nuôi cấy, xem TCVN 8128 (ISO 11133).

5.2 Dịch pha loãng

Xem các phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần).

5.3 Môi trường nuôi cấy

Nếu sử dụng các môi trường nuôi cấy khô bán sẵn thì chuẩn bị môi trường theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.3.1 Môi trường glutamat khoáng cải biến (môi trường tăng sinh chọn lọc)

5.3.1.1 Thành phần

	a)	b)
	Môi trường nồng độ kép	Môi trường nồng độ đơn
Natri glutamat	12,7 g	6,35 g
Lactose	20,0 g	10,0 g
Natri focmat	0,5 g	0,25 g
L-xystin	0,04 g	0,02 g
L(-)axit aspactic	0,048 g	0,024 g
L(+) arginin	0,04 g	0,02 g
Thiamin	0,002 g	0,001 g
Axit nicotinic	0,002 g	0,001 g
Axit pantothenic	0,002 g	0,001 g
Magie sunfat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2 g	0,1 g
Sắt (III) amoni xytrat	0,02 g	0,01 g
Canxi clorua ngậm hai phân tử nước ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,02 g	0,01 g
Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	1,8 g	0,9 g
Bromocresol tía	0,02 g	0,01 g
Amoni clorua	5,0 g	2,5 g
Nước	1 000 ml	1 000 ml

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan amoni clorua trong nước. Bổ sung các thành phần, hoặc môi trường hoàn chỉnh khô còn lại và hòa tan bằng cách đun nóng, nếu cần.

Để tăng thời gian bảo quản của môi trường khô, có thể bổ sung riêng natri glutamat.

Chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng, pH là $6,7 \pm 0,1$ ở $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Phân phối các lượng 10 ml môi trường nồng độ đơn vào các ống nghiệm hoặc chai có kích thước nhỏ nhất 16 mm × 160 mm (6.7) và môi trường nồng độ kép vào các ống nghiệm hoặc chai có kích thước nhỏ nhất 18 mm × 180 mm hoặc 20 mm × 200 mm (6.7). Nếu cần sử dụng các lượng môi trường lớn hơn thì có thể sử dụng các ống nghiệm hoặc chai có dung tích thích hợp.

Khử trùng 10 min ở $116 \text{ }^\circ\text{C}$ trong nồi hấp áp lực (6.1).

TCVN 7924-3:2017

5.3.2 Thạch trypton-mật-glucuronid (môi trường tăng sinh chọn lọc thứ hai)

5.3.2.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	20,0 g
Muối mật Số 3	1,5 g
Axit 5-bromo-4-clo-3-indolyl- β -D-glucuronid (BCIG)	144 μ mol ^a
Dimetyl sulfoxit (DMSO) ^{b,c}	3 ml
Thạch	9 g đến 18 g ^d
Nước	1 000 ml

^a Ví dụ: 0,075 g muối cyclohexylamoni.
^b Dimetyl sulfoxit rất độc khi hít hoặc tiếp xúc trực tiếp. Cần sử dụng tủ an toàn và trang bị bảo hộ cá nhân thích hợp khi xử lý.
^c Dimetyl sulfoxit chỉ cần đến nếu chuẩn bị dung dịch gốc BCIG đầu tiên.
^d Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.3.2.2 Chuẩn bị

Chỉnh pH, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,2 \pm 0,2$ ở 25°C .

Khử trùng môi trường 15 min 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 18 ml đến 20 ml môi trường tan chảy vào các đĩa Petri vô trùng (6.10) và để cho đông đặc.

Các đĩa này có thể bảo quản được ở nơi tối không bị khô, ở nhiệt độ $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$, đến 4 tuần trừ khi phòng thử nghiệm chứng minh được thời gian bảo quản lâu hơn.

5.3.3 Phép thử hiệu năng về bảo đảm chất lượng môi trường nuôi cấy

Xem TCVN 8128 (ISO 11133) về phép thử hiệu năng (Bảng 1 và Bảng 2).

Bảng 1 – Phép thử hiệu năng của môi trường glutamat khoáng cải biến

Chức năng thử nghiệm	Ủ	Chủng kiểm chứng	Phương pháp kiểm chứng	Tiêu chí	Phản ứng đặc trưng
Khả năng phát triển	$(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ / (24 ± 2) h	<i>E. coli</i> ^a WDCM 00202 hoặc 00013	Định lượng	Sinh axit	Chuyển sang màu vàng
Độ chọn lọc	$(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ / (24 ± 2) h	<i>Enterococcus faecalis</i> ^b WDCM 00009 hoặc 00087	Định tính	Ức chế hoàn toàn	–

^a Xem tư vấn về chủng đối chứng tại <http://www.wfoc.info/> về thông tin số lượng chủng sưu tập và các chi tiết liên hệ.

^b Sử dụng tối thiểu một trong các chủng.

Bảng 2 – Phép thử hiệu năng của môi trường thạch trypton-mật-glucuronid (TBX)

Chức năng thử nghiệm	Ủ	Chủng kiểm chứng ^a	Phương pháp kiểm chứng	Tiêu chí	Phản ứng đặc trưng
Khả năng phát triển	(44 ± 1) °C/ (22 ± 2) h	<i>E. coli</i> WDCM 00202 ^b (β-glucuronidaza dương tính yếu) hoặc 00013 ^c	Định tính	Phát triển tốt	Khuẩn lạc có màu xanh lam đến xanh da trời
Độ đặc hiệu		<i>Citrobacter freundii</i> WDCM 00006 hoặc <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00025	Định tính	Phát triển tốt	Khuẩn lạc có màu xanh lam đến xanh da trời
Độ chọn lọc	(37 ± 1) °C/ (22 ± 2) h	<i>E. faecalis</i> ^d WDCM 00009 hoặc 00087	Định tính	Ức chế hoàn toàn	–

^a Xem tư vấn về chủng đối chứng tại <http://www.wfcc.info/> về thông tin số lượng chủng sưu tập và các chi tiết liên hệ.

^b WDCM 00013 sinh β-glucuronidaza dương tính mạnh nhất và WDCM 00202 sinh β-glucuronidaza dương tính yếu nhất. Sử dụng tối thiểu một chủng.

^c Sử dụng tối thiểu một chủng.

^d Tùy chọn chủng; sử dụng tối thiểu một trong các chủng.

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Sử dụng các thiết bị phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và cụ thể như sau:

- 6.1 Thiết bị khử trùng khô (tủ sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp áp lực),** như quy định trong TCVN 6404 (ISO 7218).
- 6.2 Tủ ấm,** có thể duy trì nhiệt độ 37 °C ± 1 °C và 44 °C ± 1 °C.
- 6.3 Tủ sấy hoặc tủ sấy thông gió,** có thể duy trì nhiệt độ từ 25 °C ± 1 °C đến 50 °C ± 1 °C, hoặc tủ thổi không khí.
- 6.4 Tủ an toàn,** để chuẩn bị môi trường.
- 6.5 Tủ lạnh** (dùng để bảo quản môi trường đã chuẩn bị), có thể duy trì nhiệt độ ở 5 °C ± 3 °C.
- 6.6 Máy đo pH,** có độ phân giải 0,01 đơn vị pH, có độ chính xác đến ± 0,1 đơn vị pH ở 25 °C. Máy đo pH có thể được gắn với hệ thống cân bằng nhiệt tự động hoặc thủ công.
- 6.7 Ống nghiệm hoặc chai,** có kích thước nhỏ nhất là 16 mm × 125 mm (ví dụ: 16 mm × 160 mm, 18 mm × 180 mm hoặc 20 mm × 200 mm).
- 6.8 Pipet xà hệt,** có dung tích danh định 1 ml và 10 ml, được chia vạch 0,1 ml.

TCVN 7924-3:2017

6.9 Que cấy vòng, bằng platin/iridi hoặc niken/crom, đường kính khoảng 3 mm, hoặc các que cấy vòng vô trùng sử dụng một lần dung tích 10 μ l.

6.10 Đĩa Petri, đường kính khoảng 90 mm.

7 Lấy mẫu

Sử dụng các phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) và theo tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm tương ứng. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu sản phẩm tương ứng thì các bên tự thoả thuận về vấn đề này.

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm tương ứng. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên tự thoả thuận về vấn đề này.

9 Cách tiến hành

9.1 Phương pháp phát hiện

9.1.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dịch pha loãng

Xem các phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) và tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm tương ứng.

9.1.2 Ủ môi trường tăng sinh chọn lọc

Ủ canh thang nồng độ đơn hoặc canh thang glutamat khoáng cải biến nồng độ kép (5.3.1.1) trong tủ ấm (6.2) cài đặt ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

9.1.3 Cấy truyền

Từ mỗi ống đã ủ theo 9.1.2 cho thấy có axit, do chuyển sang màu vàng hoặc có sự đổi màu hoặc quan sát bên ngoài có sự thay đổi so với ống kiểm chứng âm tính thì cấy truyền một vòng cấy (6.9) vào đĩa thạch trypton-mật-glucuronid (TBX) (5.3.2) và ria cấy để thu được các khuẩn lạc mọc riêng rẽ.

9.1.4 Ủ lần hai

Ủ các đĩa đã cấy theo 9.1.3 từ 22 h \pm 2 h trong tủ ấm (6.2) cài đặt ở 44 °C \pm 1 °C. Không chồng cao quá sáu đĩa và cần để các chồng đĩa tách rời nhau trong tủ ấm và cách thành tủ ít nhất 25 mm. Có thể chấp nhận các chồng đĩa cao hơn và sát nhau nếu tủ ấm có hệ thống tuần hoàn không khí, trong trường hợp này cần kiểm tra sự phân bố nhiệt độ.

9.1.5 Kiểm tra các đĩa cấy

Sau thời gian ủ quy định (9.1.4), kiểm tra sự có mặt các khuẩn lạc có màu xanh lam đậm hoặc nhạt hoặc xanh da trời trên các đĩa cấy, điều này cho thấy có mặt *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza.

9.1.6 Diễn giải kết quả

Kết quả được coi là dương tính về sự có mặt của *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza nếu đĩa thu được trong 9.1.5 cho thấy có các khuẩn lạc màu xanh lam hoặc xanh da trời.

9.2 Phương pháp định lượng

9.2.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dịch pha loãng

Xem các phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần xác định. Cần chuẩn bị một lượng đủ các dịch pha loãng để thu được độ pha loãng cuối cùng của tất cả các ống cho kết quả âm tính.

9.2.2 Ủ môi trường tăng sinh chọn lọc

9.2.2.1 Yêu cầu chung

Giống như trường hợp chung, quy trình sau đây quy định dây ba ống cho một độ pha loãng. Đối với nhuyễn thể hai mảnh vỏ tươi sống hoặc các sản phẩm đặc thù khác và/hoặc khi yêu cầu độ chụm cao hơn, cần nuôi cấy một dây năm ống cho một độ pha loãng.

Cần chuẩn bị một lượng đủ các dịch pha loãng để thu được độ pha loãng cuối cùng trong đó tất cả các ống cho kết quả âm tính.

9.2.2.2 Lấy ba hoặc năm ống canh thang glutamat khoáng cải biến nồng độ kép [5.3.1.1a)]. Sử dụng pipet vô trùng (6.8), chuyển sang mỗi ống 10 ml dung dịch mẫu thử nếu sản phẩm dạng lỏng hoặc 10 ml huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác. Trộn kỹ dịch cấy với môi trường.

TCVN 7924-3:2017

9.2.2.3 Lấy ba hoặc năm ống canh thang glutamat khoáng cải biến nồng độ đơn [5.3.1.1 a)]. Sử dụng pipet vô trùng mới (6.8) chuyển vào mỗi ống 1 ml mẫu thử nếu sản phẩm dạng lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu sản phẩm dạng khác. Trộn kỹ dịch cấy với môi trường.

9.2.2.4 Lấy ba hoặc năm ống canh thang glutamat khoáng cải biến nồng độ đơn đối với từng độ pha loãng tiếp theo được chuẩn bị từ mẫu thử của sản phẩm dạng lỏng hoặc từ huyền phù ban đầu nếu sản phẩm dạng khác (nghĩa là 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , v.v...). Sử dụng pipet vô trùng mới (6.8) cho mỗi độ pha loãng, chuyển vào mỗi ống 1 ml. Trộn kỹ dịch cấy với môi trường.

9.2.3 Ủ

Ủ các ống môi trường chọn lọc nồng độ kép đã cấy trong 9.2.2.2 hoặc các ống môi trường chọn lọc nồng độ đơn đã cấy trong 9.2.2.3 và 9.2.2.4 trong tủ ấm (6.2) ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

9.2.4 Cấy truyền

Từ mỗi ống đã ủ theo 9.2.3 cho thấy có axit, do chuyển sang màu vàng hoặc quan sát bên ngoài có sự thay đổi so với ống kiểm chứng âm tính thì cấy truyền một vòng cấy (6.9) vào đĩa thạch trypton-mật-glucuronid (TBX) (5.3.2) và ria cấy để thu được các khuẩn lạc mọc riêng rẽ.

9.2.5 Ủ lần hai

Ủ các đĩa đã cấy theo 9.1.3 từ $22\text{ h} \pm 2\text{ h}$ trong tủ ấm (6.2) ở $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Không chồng cao quá ba đĩa và cần để các chồng đĩa tách rời nhau trong tủ ấm và cách thành tủ ít nhất 25 mm. Có thể chấp nhận các chồng đĩa cao hơn và sát nhau nếu tủ ấm có hệ thống tuần hoàn không khí, trong trường hợp này cần kiểm tra sự phân bố nhiệt độ.

9.2.6 Kiểm tra các đĩa cấy

Sau thời gian ủ quy định (9.2.5), kiểm tra sự có mặt các khuẩn lạc có màu xanh lam hoặc xanh da trời trên các đĩa cấy, điều này cho thấy có mặt *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza.

9.2.7 Diễn giải kết quả

Từng ống môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ đơn hoặc nồng độ kép được ủ theo 9.2.3 được coi là dương tính nếu sau khi cấy truyền theo 9.2.4 và ủ theo 9.2.5 cho thấy có mặt các khuẩn lạc màu xanh lam hoặc xanh da trời trên đĩa thạch trypton-mật-glucuronid (TBX) (5.3.2).

Đếm số ống môi trường dương tính đối với từng độ pha loãng.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Phương pháp phát hiện

Theo các kết quả diễn giải (xem 9.1.6), chỉ rõ sự có mặt hay không có mặt *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza.

10.2 Phương pháp định lượng

Theo các kết quả diễn giải (xem 9.2.7), tính số có xác suất lớn nhất (MPN) trên gam hoặc trên mililit từ số ống dương tính với mỗi độ pha loãng theo TCVN 6404 (ISO 7218).

11 Độ chụm

Thực nghiệm cho thấy rằng khi sử dụng kỹ thuật MPN kết quả có thể xảy ra sai số lớn khi sử dụng dãy ba ống cho mỗi độ pha loãng. Do đó, phải thận trọng khi sử dụng các kết quả thu được bằng phương pháp này. Khi sử dụng dãy năm ống thì cần ghi nhận rằng độ chụm thu được bằng phương pháp này có thể so sánh được với kết quả thu được bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc. Các giới hạn tin cậy được nêu trong TCVN 6404 (ISO 7218).

VÍ DỤ 1: Sử dụng ba ống cho mỗi độ pha loãng, trong 95 % các trường hợp có các giới hạn tin cậy dao động từ 5,6 đến 100 *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên gam đối với MPN có 24 *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên gam.

VÍ DỤ 2: Sử dụng năm ống cho mỗi độ pha loãng, trong 95 % các trường hợp có các giới hạn tin cậy dao động từ 7,79 đến 74 *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên gam đối với MPN có 24 *Escherichia coli* dương tính β -glucuronidaza trên gam.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng;
- c) mọi chi tiết về điều kiện thao tác không quy 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;
- d) kết quả thử nghiệm thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6846 (ISO 7251), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng Escherichia coli giả định – Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất*
- [2] BLAZKO N. Evaluation of the β -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide in a 24 hour direct plating method for *Escherichia coli*. *J.Food Protection*, 51, 1, 1988, p. 402
- [3] DAMARE J.M., CAMPBELL D.F. and JOHNSON R.W.. Simplified direct plating method for enhanced recovery of *Escherichia coli* in food. *J Food Sci.*, 50, 1985, pp. 1736-1737, 1746
- [4] DELISLE G.L. and LEY A. Rapid detection of *Escherichia coli* in urine samples by a new chromogenic β -glucuronidase assay. *J.Clin.Microbiol.*, 27, 1989, pp. 778-779
- [5] DONOVAN T.J., GALLACHER S., ANDREWS N.J., GREENWOOD M.H., GRAHAM J., RUSSELL J.E., ROBERTS D. and LEE R. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. *Comm Dis & Public Health*, 1, 1998, pp. 188-196
- [6] KILIAN M. and BULOW P. Rapid identification of Enterobacteriaceae. Use of a β -glucuronidase detecting agar (PGUA) for the identification of *Escherichia coli* in primary cultures of urine samples. *Acta Pathol Microbiol Scand., Sect B*, 87, 1979, pp. 271-276
- [7] KILIAN M. and BULOW P. Rapid identification of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. *Acta pathol Microbiol Scand., Sect. B*, 84, 1976, pp. 245-251
- [8] LEY A.N., BOWERS R.J. and WOLFE S. Indoxyl- β -D-glucuronide, a novel chromogenic reagent for the specific detection and enumeration of *Escherichia coli* in environmental samples. *Canadian J Microbiol.*, 34, 1988, pp. 690-693
- [9] MANAFI M. and KNEIFEL W. A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in water. *Zentralbl. Hyg.*, 189, 1989, pp. 225-234
- [10] OGDEN D. and WATT A.J. An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 13, 1991, pp. 212-215
- [11] RESTAINO L., FRAMPTON E.W. and LYON R.H. Use of chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) for enumeration of *Escherichia coli* in 24 hours from ground beef. *J.Food Protection*, 53 (6) 1990, pp. 508-510
- [12] WATKINS D., RIPPEY S.C., CLAVET C.R., KELLY-REITZ D.J. and BURKHART W. Novel compound for identifying *Escherichia coli*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 54, 1988, pp. 1874-1875