

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN VIỆT NAM**

**TCVN 11039-1:2015**

Xuất bản lần 1

**PHỤ GIA THỰC PHẨM -  
PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VI SINH VẬT -  
PHẦN 1: XÁC ĐỊNH TỔNG SỐ VI SINH VẬT HIẾU KHÍ  
BẰNG KỸ THUẬT ĐẾM ĐĨA**

*Food additive - Microbiological analyses -  
Part 1: Determination of total aerobic count by plate count technique*

**HÀ NỘI - 2015**

## Lời nói đầu

TCVN 11039-1:2015 được xây dựng trên cơ sở tham khảo JECFA 2006, *Combined compendium of food additive specifications, Volume 4: Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications*;

TCVN 11039-1:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/IF4 Gia vị và phụ gia thực phẩm biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 11039 Phụ gia thực phẩm – Phương pháp phân tích vi sinh vật gồm các phần sau:

- TCVN 11039-1:2015, Phần 1: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa;
- TCVN 11039-2:2015, Phần 2: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa xoắn;
- TCVN 11039-3:2015, Phần 3: Phát hiện và định lượng coliform và *E. coli* bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp chuẩn);
- TCVN 11039-4:2015, Phần 4: Phát hiện và định lượng coliform và *E. coli* bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp thông dụng);
- TCVN 11039-5:2015, Phần 5: Phát hiện *Salmonella*;
- TCVN 11039-6:2015, Phần 6: Phát hiện và định lượng *Staphylococcus aureus* bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc;
- TCVN 11039-7:2015, Phần 7: Phát hiện và định lượng *Staphylococcus aureus* bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN);
- TCVN 11039-8:2015, Phần 8: Định lượng nấm men và nấm mốc.

# Phụ gia thực phẩm - Phương pháp phân tích vi sinh vật - Phần 1: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa

*Food additives - Microbiological analyses -*

*Part 1: Determination of total aerobic count by plate count technique*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí trong phụ gia thực phẩm bằng kỹ thuật đếm đĩa.

## 2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

### 2.1

**Vi sinh vật hiếu khí** (aerobic micro-organisms)

Vi khuẩn, nấm men và nấm mốc hình thành khuẩn lạc có thể đếm được, phát triển trong điều kiện hiếu khí theo quy định trong tiêu chuẩn này.

## 3 Nguyên tắc

**3.1** Chuẩn bị hai đĩa rớt sử dụng môi trường cấy quy định và một lượng dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử.

**3.2** Ủ các đĩa trong điều kiện hiếu khí ở  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 48 h.

**3.3** Tính số lượng vi sinh vật trong một gam mẫu từ số lượng khuẩn lạc thu được trên các đĩa đã chọn (xem Điều 9).

#### 4 Môi trường nuôi cấy và dịch pha loãng

Các thuốc thử được sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích và nước được sử dụng phải là nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

##### 4.1 Dung dịch đệm phosphat Butterfield

###### 4.1.1 Thành phần

Kali dihydrophosphat ( $KH_2PO_4$ )	34 g
Nước	500 ml

###### 4.1.2 Chuẩn bị

###### 4.1.2.1 Dung dịch gốc

Hòa tan kali dihydrophosphat trong nước. Chính pH đến 7,2 bằng dung dịch natri hydroxit 1 M. Thêm nước đến 1 lít. Khử trùng 15 min ở 121 °C. Bảo quản trong tủ lạnh.

###### 4.1.2.2 Dung dịch pha loãng

Lấy 1,25 ml dung dịch gốc (4.1.2.1), thêm nước đến 1 lít. Phân phối vào các chai 90 ml hoặc 99 ml (5.9). Khử trùng 15 min ở 121 °C.

#### 4.2 Môi trường thạch đếm đĩa (PCA)

##### 4.2.1 Thành phần

Trypton	5,0 g
Chất chiết nấm men	2,5 g
Dextrose	1,0 g
Thạch	15,0 g
Nước	1 000 ml

##### 4.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước. Có thể đun nóng nước để hoà tan các thành phần.

Thêm thạch và đun đến sôi, thỉnh thoảng khuấy cho đến khi tan hết thạch.

Phân phối môi trường vào các ống hoặc bình thủy tinh có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực (5.1) ở 121 °C. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH đạt  $7,0 \pm 0,2$ , nếu cần.

## **5 Thiết bị, dụng cụ**

Có thể dùng dụng cụ thủy tinh sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu chúng có các đặc tính thích hợp.

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

**5.1 Thiết bị để khử trùng khô (tủ sấy) hoặc để khử trùng ướt (nồi hấp áp lực).**

**5.2 Tủ ấm**, có khả năng duy trì nhiệt độ ở  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**5.3 Đĩa Petri**, bằng thủy tinh có chiều cao 15 mm, đường kính 100 mm hoặc bằng chất dẻo có chiều cao 15 mm, đường kính 90 mm.

**5.4 Pipet vô trùng**, có dung tích danh nghĩa 1 ml, 5 ml và 10 ml, được chia vạch đến 0,1 ml.

**5.5 Nồi cách thủy**, có thể kiểm soát nhiệt độ ổn định ở  $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**5.6 Thiết bị đếm khuẩn lạc**, loại cơ học hoặc điện tử, có nguồn sáng thích hợp, đĩa lưới và bộ đếm.

**5.7 Máy đo pH**, có độ chính xác  $\pm 0,1$  đơn vị pH, ở 25 °C.

**5.8 Nhiệt kế**, có thể đo với khoảng nhiệt độ thích hợp.

**5.9 Chai pha loãng**, dung tích 90 ml hoặc 99 ml.

**5.10 Chai pha loãng**, dung tích 160 ml, bằng thủy tinh bosilicat chịu nhiệt, có nút cao su hoặc nắp vặn bằng chất dẻo.

## **6 Lấy mẫu**

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên có liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

## **7 Chuẩn bị mẫu thử**

Mẫu được trộn đều để thu được các phần mẫu thử đồng nhất.

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Cấy và ủ

8.1.1 Dùng các pipet vô trùng (5.4) để chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  và các dung dịch pha loãng thập phân thích hợp khác, từ mẫu đã đồng nhất bằng cách chuyển 10 ml dung dịch đã được pha loãng vào 90 ml chất pha loãng. Tránh tạo bọt. Lắc các dung dịch pha loãng 25 lần với biên độ 30 cm trong 7 s.

8.1.2 Dùng pipet lấy 1 ml mỗi dung dịch pha loãng cho vào từng cặp đĩa Petri (5.3) riêng rẽ, được đánh dấu thích hợp. Nếu sau 3 min mới cấy mẫu thì lắc lại các chai pha loãng (5.10) 25 lần với biên độ 30 cm trong 7 s trước khi dùng pipet chuyển phần mẫu thử sang đĩa Petri.

8.1.3 Cho vào mỗi đĩa từ 12 ml đến 15 ml môi trường PCA (4.2), đã làm nguội trước về nhiệt độ  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ , trong vòng 15 min sau lần pha loãng đầu tiên. Cho ngay thạch vào các đĩa Petri nếu chất pha loãng có chứa chất hút ẩm. Rót thạch và nước pha loãng (4.1) vào đĩa kiểm chứng cho mỗi dãy mẫu. Trộn ngay các dung dịch pha loãng mẫu với môi trường thạch, trộn kỹ và trộn đều bằng cách xoay đĩa và di chuyển đĩa tới lui trên bề mặt phẳng.

8.1.4 Khi thạch đông đặc, lật ngược đĩa Petri và ủ ngay trong  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$  ở  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 8.2 Đếm khuẩn lạc

Sau khi ủ (8.1.4), dùng thiết bị đếm khuẩn lạc (5.6) để đếm các đĩa kép trong dải thích hợp (từ 25 đến 250 khuẩn lạc), ghi kết quả trên đĩa pha loãng đã đếm. Trong 3 độ pha loãng phải có ít nhất một độ pha loãng có 2 đĩa cho kết quả nằm trong dải từ 25 đến 250 khuẩn lạc.

## 9 Biểu thị kết quả

9.1 Nếu chỉ có 1 độ pha loãng cho kết quả nằm trong dải từ 25 đến 250 khuẩn lạc thì tính số đếm trung bình trên gam cho mỗi độ pha loãng và nhân với hệ số pha loãng để có tổng số vi sinh vật hiếu khí trên gam (xem Bảng 1, mẫu số 1).

9.2 Nếu có 2 độ pha loãng cho kết quả nằm trong dải phù hợp thì tính số đếm trung bình của mỗi độ pha loãng sau đó tính số đếm trung bình của 2 độ pha loãng và nhân với hệ số pha loãng để có tổng số vi sinh vật hiếu khí trên gam (xem Bảng 1, mẫu số 2).

9.3 Nếu không có đĩa nào hoặc chỉ có một trong hai đĩa kép có từ 25 đến 250 khuẩn lạc thì thực hiện như sau:

a) Nếu tất cả các đĩa đều có ít hơn 25 khuẩn lạc: khi 2 đĩa của độ pha loãng thấp nhất có ít hơn 25 khuẩn lạc, đếm số khuẩn lạc trên mỗi đĩa của độ pha loãng đó, tính số đếm trung bình và nhân với hệ

số pha loãng để có tổng số vi sinh vật hiếu khí ước tính. Đánh dấu kết quả này để lưu ý rằng đây là kết quả ước tính từ số đếm đĩa nằm ngoài dải từ 25 đến 250 khuẩn lạc (xem Bảng 1, mẫu số 3).

- b) Nếu tất cả các đĩa đều có nhiều hơn 250 khuẩn lạc: đếm số khuẩn lạc tại các phần của đĩa sao cho đại diện cho sự phân bố khuẩn lạc. Đánh dấu tổng số đếm đĩa này để lưu ý rằng đây là kết quả ước tính từ số đếm đĩa nằm ngoài dải từ 25 đến 250 khuẩn lạc (xem Bảng 1, mẫu số 4).
- c) Trường hợp khuẩn lạc mọc lan rộng: thường có 3 dạng đặc trưng:
- i) tạo thành chuỗi các khuẩn lạc, không tách biệt rõ ràng, do sự tan rã của một cụm vi sinh vật;
  - ii) khuẩn lạc phát triển trong lớp màng nước giữa thạch và đáy đĩa;
  - iii) khuẩn lạc hình thành trong lớp màng nước ở cạnh hoặc trên bề mặt thạch.

Nếu các đĩa được chuẩn bị từ mẫu có khuẩn lạc lan rộng quá mức, diện tích lan rộng bao trùm trên 50 % diện tích đĩa hoặc diện tích mọc chằng lên đến 25 % diện tích đĩa thì đĩa được coi là bị khuẩn lạc mọc lan rộng. Xác định số đếm trung bình của mỗi độ pha loãng, tổng số đếm đĩa được tính theo trung bình của các giá trị này (xem Bảng 1, mẫu số 5).

Khi cần đếm các đĩa chứa khuẩn lạc lan rộng không nằm trong 2 trường hợp nêu trên thì đếm từng dạng khuẩn lạc lan rộng đặc trưng nêu trên. Đối với dạng thứ nhất (i), nếu chỉ có một chuỗi lan rộng thì tính là một khuẩn lạc. Nếu có một hoặc nhiều chuỗi riêng rẽ thì đếm mỗi chuỗi là một khuẩn lạc. Không đếm từng thành phần đơn lẻ trong chuỗi như là khuẩn lạc riêng. Đối với dạng thứ hai (ii) và dạng thứ ba (iii), thường là các khuẩn lạc đặc trưng và được đếm bình thường. Gộp số đếm khuẩn lạc lan rộng và số đếm khuẩn lạc để có tổng số đếm đĩa.

- d) Đối với các cặp đĩa có một đĩa chứa từ 25 đến 250 khuẩn lạc và đĩa còn lại chứa nhiều hơn 250 khuẩn lạc: đếm cả hai đĩa và tính tổng số đếm từ hai số đếm này (xem Bảng 1, mẫu số 6).
- e) Đối với các cặp đĩa mà một đĩa của mỗi độ pha loãng chứa từ 25 đến 250 khuẩn lạc và đĩa còn lại chứa nhiều hơn 250 khuẩn lạc hoặc ít hơn 25 khuẩn lạc: đếm cả bốn đĩa và lấy các số đếm này để tính tổng số đếm đĩa (xem Bảng 1, mẫu số 7).
- f) Đối với các cặp đĩa mà cả hai đĩa của một độ pha loãng chứa từ 25 đến 250 khuẩn lạc và trong cặp đĩa còn lại chỉ có một đĩa chứa từ 25 đến 250 khuẩn lạc: đếm cả bốn đĩa và lấy các số đếm này để tính tổng số đếm đĩa (xem Bảng 1, mẫu số 8).
- g) Đối với các đĩa không chứa các đơn vị hình thành khuẩn lạc: báo cáo kết quả tổng số đếm đĩa hiếu khí ít hơn 1 lần tương ứng với độ pha loãng thấp nhất đã sử dụng. Đánh dấu kết quả này để lưu ý rằng đây là số ước tính từ số đếm nằm ngoài dải từ 25 đến 250 khuẩn lạc. Khi đĩa chứa mẫu đã biết là bị nhiễm hoặc mặt khác không thỏa mãn thì báo cáo kết quả là có sai sót của phòng thử nghiệm.

9.4 Làm tròn số đếm đến hai chữ số có nghĩa, chỉ thực hiện làm tròn một lần khi tính tổng số đếm đĩa. Khi làm tròn, tăng chữ số có nghĩa thứ hai tính từ trái sang phải lên một đơn vị nếu chữ số có nghĩa thứ ba bằng hoặc lớn hơn 5; giảm chữ số có nghĩa thứ hai xuống một đơn vị nếu chữ số có nghĩa thứ ba nhỏ hơn 5.

**Bảng 1 – Ví dụ về việc tính tổng số đếm đĩa (2 đĩa cho mỗi độ pha loãng)**

Số thứ tự của mẫu	Số khuẩn lạc đếm được			Tổng số đếm đĩa/g
	1 : 100	1 : 1 000	1 : 1 0000	
1	TNTC <sup>a)</sup>	<u>175</u> <sup>b)</sup>	16	190 000
	TNTC	<u>208</u>	17	
2	TNTC	<u>224</u>	<u>25</u>	250 000
	TNTC	<u>245</u>	<u>30</u>	
3	<u>18</u>	2	0	1 600 <sup>c)</sup>
	<u>14</u>	0	0	
4	TNTC	TNTC	<u>523</u>	5 200 000 <sup>c)</sup>
	TNTC	TNTC	<u>487</u>	
5	TNTC	<u>245</u>	<u>35</u>	290 000
	TNTC	<u>230</u>	mọc lan rộng	
6	TNTC	<u>245</u>	23	260 000
	TNTC	<u>278</u>	20	
7	TNTC	<u>225</u>	<u>21</u>	270 000
	TNTC	<u>255</u>	<u>40</u>	
8	TNTC	<u>210</u>	<u>18</u>	230 000
	TNTC	<u>240</u>	<u>28</u>	
	TNTC	<u>260</u>	<u>30</u>	270 000
	TNTC	<u>230</u>	<u>28</u>	

CHÚ THÍCH:

<sup>a)</sup> Số đếm khuẩn lạc > 250.

<sup>b)</sup> Các số có gạch dưới là số đếm được dùng để tính kết quả.

<sup>c)</sup> Số đếm ước tính



## 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn cũng như các sự cố bất kỳ có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] TCVN 4884:2005 (ISO 4833:2003) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 độ C*
- [2] TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp định lượng vi sinh vật – Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30 °C bằng kỹ thuật đổ đĩa*
-