

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9978:2013

Xuất bản lần 1

**SẢN PHẨM SỮA – ĐỊNH LƯỢNG COLIFORM
VÀ TỔNG VI SINH VẬT HIẾU KHÍ BẰNG PHƯƠNG PHÁP
SỬ DỤNG ĐĨA ĐẾM PETRIFILM™**

*Milk products – Enumeration of aerobic plate count and coliforms
using Petrifilm™ count plate*

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 9978:2013 được xây dựng trên cơ sở AOAC 989.10 *Bacterial and Coliform Counts in Dairy Products. Dry Rehydratable Film Methods (Petrifilm™ Aerobic Count Plate™ and Petrifilm™ Coliform Count Plate™) Methods*;

TCVN 9978:2013 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 thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sản phẩm sữa – Định lượng coliform và tổng vi sinh vật hiếu khí bằng phương pháp sử dụng đĩa đếm Petrifilm™

Milk products – Enumeration of aerobic plate count and coliforms using Petrifilm™ count plate

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sử dụng đĩa đếm Petrifilm™ để định lượng coliform và tổng vi sinh vật hiếu khí trong các sản phẩm sữa.

Phương pháp này đã được đánh giá liên phòng thử nghiệm, các kết quả được nêu trong Phụ lục A và Tài liệu tham khảo [2], [3].

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6507-5:2013 (ISO 6887-5:2010) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các 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*

3 Nguyên tắc

Phương pháp này sử dụng các đĩa cấy chứa môi trường dinh dưỡng khô và chất tạo đông tan được trong nước lạnh. Cho các dung dịch huyền phù mẫu thử chưa pha loãng hoặc đã pha loãng vào các đĩa với lượng 1 ml mỗi đĩa. Dàn đều dung dịch huyền phù trên diện tích khoảng 20 cm². Chất tạo đông có trong thành phần của đĩa sẽ làm môi trường dinh dưỡng trong đĩa đông lại. Đĩa được ủ ấm ở 32 °C ± 1 °C trong thời gian thích hợp rồi đếm khuẩn lạc.

4 Thuốc thử và môi trường

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

4.1 Nước dùng để pha loãng (dung dịch nước đệm phosphat)

Hòa tan 34 g kali dihydro phosphat (KH_2PO_4) vào 500 ml nước đựng trong bình định mức 1 lít, chỉnh pH đến 7,2 bằng khoảng 175 ml dung dịch natri hydroxit 1 M và thêm nước đến vạch. Pha loãng 1,25 ml dung dịch này đến 1 lít bằng nước đã đun sôi và để nguội, rồi hấp áp lực 15 min ở 121 °C.

Nước dùng để pha loãng không được chứa xitrat, bisulfit hoặc thiosulfat vì có thể gây ức chế sự phát triển của vi sinh vật.

4.2 Natri hydroxit (NaOH), dung dịch 1 M (40 g/l).

4.3 Chất chỉ thị 2,3,5-triphenyltetrazolium clorua.

4.4 Thạch đếm đĩa (thạch trypton glucose nấm men).

4.5 Chất dinh dưỡng mật đỏ-tím (violet red bile nutrients)¹⁾.

4.6 Chất tạo đông tan được trong nước lạnh.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và các thiết bị, dụng cụ sau đây:

5.1 Đĩa đếm vi sinh vật hiếu khí Petrifilm^{TM 2)}

Màng nền của đĩa chứa thạch (4.4), chất tạo đông tan được trong nước lạnh (4.6), màng phủ của đĩa chứa chất tạo đông cùng với chất chỉ thị 2,3,5-triphenyltetrazolium clorua (4.3) để tăng khả năng quan sát sự phát triển của khuẩn lạc. Vùng sinh trưởng được khoanh tròn trên mỗi đĩa chứa khoảng hai mươi ô vuông, mỗi ô có diện tích 1 cm² trên màng nền.

5.2 Đĩa đếm coliform Petrifilm^{TM 2)}

Đĩa chứa các chất dinh dưỡng mật đỏ-tím (4.5), chất tạo đông tan được trong nước lạnh (4.6) và chất

¹⁾ Tham khảo tiêu chuẩn APHA nêu trong *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (Tuyển tập phương pháp kiểm nghiệm vi sinh vật trong thực phẩm)*, 3rd Ed., 1992, American Public Health Association (Hiệp hội Y tế Hoa Kỳ), Washington, DC 20001-3710, USA.

²⁾ Sản phẩm của 3M Center, St. Paul, MN 55144, USA. Thông tin này đưa ra để thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

chỉ thị 2,3,5-triphenyltetrazolium clorua (4.3). Vùng sinh trưởng được khoanh tròn trên mỗi đĩa chứa khoảng hai mươi ô vuông, mỗi ô có diện tích 1 cm² trên màng nền.

5.3 Dụng cụ dàn mẫu bằng chất dẻo (gồm một mặt có gờ và một mặt láng), được cung cấp cùng với đĩa đếm, để dàn đều huyền phù lên khắp vùng sinh trưởng của đĩa.

5.4 Pipet, đã được hiệu chuẩn, dùng để phân tích vi sinh vật hoặc pipet dạng xyranh có thể phân phối 1,0 ml, chia vạch đến 0,1 ml. Có thể dùng pipet tự động.

Pipet phải phân phối được chính xác các thể tích yêu cầu. Không sử dụng pipet để phân phối thể tích nhỏ hơn 10 % dung tích của pipet. Ví dụ, không dùng pipet có dung tích lớn hơn 10 ml để phân phối 1 ml.

5.5 Thiết bị đếm khuẩn lạc, loại chuẩn hoặc loại có độ khuếch đại và độ nhìn thấy tương đương.

5.6 Cân, có thể cân chính xác đến 0,1 g.

5.7 Thiết bị trộn tốc độ cao, có bình chứa vô trùng.

5.8 Tủ ấm, có thể duy trì được nhiệt độ ở 32 °C ± 1 °C.

5.9 Nồi hấp áp lực, có thể duy trì nhiệt độ ở 121 °C.

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707) ⁽¹⁾.

Phòng thử nghiệm phải nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

7 Chuẩn bị mẫu thử

7.1 Chuẩn bị phần mẫu thử, theo TCVN 6507-5:2013 (ISO 6887-5:2010).

7.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

7.2.1 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử để đếm tổng vi sinh vật hiếu khí

Cân vô trùng 11 g phần mẫu thử đã chuẩn bị (7.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình trộn vô trùng của máy trộn tốc độ cao (5.7). Thêm 99 ml nước dùng để pha loãng (4.1), trộn đều để thu được dung dịch pha loãng 10⁻¹ rồi nhỏ vào đĩa.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng bổ sung theo yêu cầu. Thông thường, dung dịch pha loãng 10⁻¹ và 10⁻² là đủ.

7.2.2 Chuẩn bị dung dịch mẫu thử để đếm coliform

7.2.2.1 Cream, sữa đặc, sữa trứng, phomat, bơ, bơ thực vật, sữa có chứa socola và các sản phẩm liên quan

Cân vô trùng 24,75 g phần mẫu thử đã chuẩn bị (7.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình trộn vô trùng của máy trộn tốc độ cao (5.7). Thêm 99 ml nước dùng để pha loãng (4.1), trộn đều để thu được dung dịch pha loãng 2×10^{-1} rồi nhỏ vào hai đĩa, mỗi đĩa 1 ml.

7.2.2.2 Cream chua và sữa chua (yogurt)

Tiến hành như trong 7.2.2.1, nhưng sau khi pha loãng cần chỉnh pH đến khoảng từ 6,6 đến 7,2 bằng dung dịch natri hydroxit 1,0 M (4.2) (khoảng 0,1 ml dung dịch natri hydroxit 1,0 M cho 1 g phần mẫu thử).

7.2.2.3 Buttermilk

Cân vô trùng 11 g phần mẫu thử đã chuẩn bị (7.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình trộn vô trùng của máy trộn tốc độ cao (5.7). Thêm 99 ml nước dùng để pha loãng (4.1), chỉnh pH đến khoảng từ 6,6 đến 7,2 bằng dung dịch natri hydroxit 1,0 M (4.2) (khoảng 0,1 ml dung dịch natri hydroxit 1,0 M cho 1 g phần mẫu thử), trộn đều để thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} rồi nhỏ vào hai đĩa, mỗi đĩa 1 ml.

7.2.2.4 Kem lạnh thực phẩm, kem trái cây và kem hỗn hợp

Cân vô trùng 10 g phần mẫu thử đã chuẩn bị (7.1), chính xác đến 0,1 g, cho vào bình trộn vô trùng của máy trộn tốc độ cao (5.7). Thêm 5 ml nước dùng để pha loãng (4.1), trộn đều để thu được hỗn hợp đồng nhất có độ pha loãng 2 : 3.

8 Cách tiến hành

8.1 Đếm vi sinh vật hiếu khí

Đặt đĩa đếm vi sinh vật hiếu khí Petrifilm™ (5.1) lên bề mặt phẳng. Nhấc tấm màng mỏng phía trên ra và nhỏ 1 ml huyền phù mẫu thử vào chính giữa màng nền. Đậy cẩn thận tấm màng mỏng phía trên xuống chất cấy. Dàn đều huyền phù trên diện tích 20 cm² bằng cách ấn nhẹ xuống tâm dụng cụ dàn mẫu (5.3) (mặt gờ của dụng cụ dàn mẫu hướng xuống dưới). Lấy dụng cụ dàn mẫu ra và để yên đĩa trong 1 min cho gel đông đặc lại. Đặt các đĩa vào tủ ấm (5.8) theo phương nằm ngang với nắp hướng lên trên, không chổng cao quá 20 đĩa, ủ ấm đĩa ở nhiệt độ $32 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $48 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. Sau khi ủ xong, có thể bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng $-15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ đến 7 ngày, nếu cần.

Đếm khuẩn lạc trên các đĩa này ngay sau giai đoạn ủ, sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc (5.5). Có thể sử dụng bộ khuếch đại được rọi sáng để thuận tiện cho việc đếm. Đếm tất cả các khuẩn lạc có màu đỏ trên

các đĩa chứa từ 25 khuẩn lạc đến 250 khuẩn lạc. Không đếm các bọt khí giả có thể được tạo ra do thao tác chưa đúng trong quá trình cấy mẫu lên đĩa.

Để phân lập các khuẩn lạc cho nhận biết tiếp theo, nhấc màng lên và lấy khuẩn lạc ra khỏi gel.

8.2 Đếm coliform

Sử dụng các đĩa đếm coliform Petrifilm™ (5.2). Đối với dung dịch mẫu thử chuẩn bị theo 7.2.2.1, 7.2.2.2 và 7.2.2.3, tiến hành theo 8.1 nhưng khi phân bố huyền phù mẫu thử lên đĩa bằng cách ấn nhẹ xuống tâm dụng cụ dàn mẫu thì để mặt láng của dụng cụ dàn mẫu hướng xuống dưới. Ủ ấm đĩa ở nhiệt độ $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Riêng đối với dung dịch mẫu thử chuẩn bị theo 7.2.2.4, làm ấm các đĩa đếm coliform Petrifilm™ (5.2) bằng 1 ml nước dùng để pha loãng (4.1) và để ít nhất 1 h cho gel đông đặc. Sau đó, nhấc tấm màng mỏng phía trên ra (gel dính vào tấm màng phía trên) và nhò vào màng nền của ba đĩa, mỗi đĩa 0,5 ml hỗn hợp đồng nhất có độ pha loãng 2 : 3 (7.2.2.4). Đậy cẩn thận tấm màng mỏng phía trên xuống chặt cây. Dàn đều huyền phù trên diện tích 20 cm^2 bằng cách ấn nhẹ xuống tâm dụng cụ dàn mẫu (5.3) (mặt láng của dụng cụ dàn mẫu hướng xuống dưới). Ủ ấm đĩa ở nhiệt độ $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Đếm khuẩn lạc như trong 8.1 nhưng chỉ đếm các khuẩn lạc màu đỏ có một hoặc nhiều bọt khí kèm theo (trong vòng đường kính một khuẩn lạc). Đếm tất cả các khuẩn lạc trên các đĩa chứa từ 15 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc. Các khuẩn lạc màu đỏ không có bọt khí không được coi là coliform.

9 Tính và biểu thị kết quả

Để tính số lượng vi sinh vật, nhân tổng số lượng khuẩn lạc trên một đĩa (hoặc số lượng trung bình các khuẩn lạc trên một đĩa, nếu đếm các đĩa kép của cùng một độ pha loãng) với số nghịch đảo của độ pha loãng tương ứng.

Đối với dung dịch mẫu thử chuẩn bị theo 7.2.2.1 và 7.2.2.2, nhân tổng số đếm trên hai đĩa với 2,5 để thu được số đếm trên gam.

Đối với dung dịch mẫu thử chuẩn bị theo 7.2.2.3, nhân tổng số đếm trên hai đĩa với 5 để thu được số đếm trên gam.

Đối với dung dịch mẫu thử chuẩn bị theo 7.2.2.4, cộng số đếm trên ba đĩa hoặc lấy số đếm trên một đĩa nhân với 3 để thu được số đếm trên gam.

Khi đếm các khuẩn lạc trên các đĩa kép của các độ pha loãng kế tiếp, tính số lượng trung bình các khuẩn lạc cho mỗi độ pha loãng trước khi xác định trung bình số đếm vi sinh vật.

TCVN 9978:2013

Nếu không có đĩa nào có số đếm lớn hơn 25 khuẩn lạc màu đỏ trong trường hợp đếm tổng vi sinh vật hiếu khí và nếu không có đĩa nào có số đếm lớn hơn 15 khuẩn lạc màu đỏ kèm theo bọt khí trong trường hợp đếm coliform thì ghi lại số đếm chính xác trên đĩa có độ pha loãng thấp nhất (tương ứng với dung dịch ít pha loãng nhất).

Nếu tất cả các đĩa có số đếm lớn hơn 250 trong trường hợp đếm tổng vi sinh vật hiếu khí và lớn hơn 150 trong trường hợp đếm coliform thì xác định số đếm ước tính bằng cách đếm số khuẩn lạc trong một hoặc nhiều ô vuông đại diện, tính số đếm trung bình trên một ô vuông và nhân số đếm này với 20 (diện tích vùng sinh trưởng khoảng 20 cm²). Trong trường hợp này, phải báo cáo đây là số ước tính.

Nếu các đĩa đều có mật độ khuẩn lạc quá lớn để ước tính số đếm thì kết quả được báo cáo là "quá nhiều để đếm".

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin dưới đây:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp đã sử dụng;
- kết quả và đơn vị biểu thị kết quả;
- ngày tháng lấy mẫu và phương thức lấy mẫu (nếu có);
- ngày tháng nhận mẫu phòng thử nghiệm;
- ngày tháng thử nghiệm;
- các điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy chọn, cùng với các chi tiết của sự cố bất kỳ có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm được nêu trong Bảng A.1.

Bảng A.1 – Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm đối với coliform và tổng vi sinh vật hiếu khí

Sản phẩm	Độ lệch chuẩn lặp lại, S_r	Độ lệch chuẩn tái lập, S_R	Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $RSD_r, \%$	Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $RSD_R, \%$
Vi sinh vật hiếu khí				
Sữa có chứa socola	0,102	0,177	4,3	7,5
Phomat	0,113	0,117	3,6	3,7
Sữa bột gầy	0,151	0,230	4,5	6,9
Sữa bột	0,193	0,198	8,3	8,5
Kem thực phẩm	0,180	0,222	6,9	8,5
Coliform				
Sữa có chứa socola	0,164	0,257	9,2	14,4
Phomat	0,221	0,225	10,4	10,6
Sữa bột gầy	0,197	0,151	8,5	4,5
Sữa bột	0,200	0,225	13,0	13,0
Kem thực phẩm	0,081	0,131	4,1	6,6

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707) *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
 - [2] AFNOR Validation of Alternative Methods. Report (Preliminary and Collaborative studies according to the NF EN ISO 16140 standard) ISO 16140 validation of 3M™ Petrifilm™ Coliforms count plates (CC) for gas producing colonies enumeration - Quantitative method. PCC Coliforms gas producers Synthesis (Version 2) September 3, 2008
 - [3] Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse. Rapport de synthèse: Reconstitution de la validation ISO 16140 de la méthode 3MTM Petrifilm™ pour la numération de la flore totale dans les produits alimentaires. Synthèse Reconstitution Flore Totale Version 0 (6 juillet 2009)
-