

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 4884-2:2015
ISO 4833-2:2013 ĐÍNH CHÍNH KỸ THUẬT 1:2014**

**VI SINH VẬT TRONG CHUỖI THỰC PHẨM -
PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG VI SINH VẬT -
PHẦN 2: ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 30 ĐỘ C
BẰNG KỸ THUẬT CẤY BỀ MẶT**

*Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms --
Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 4884-2:2015 hoàn toàn tương đương với ISO 4833-2:2013 và đính chính kỹ thuật 1:2014;

TCVN 4884-2:2015 cùng với TCVN 4884-1:2015 thay thế TCVN 4884:2005;

TCVN 4884-2:2015 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;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 4884 (ISO 4833) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp định lượng vi sinh vật*, gồm các phần sau đây:

- TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013), *Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30 °C bằng kỹ thuật đổ đĩa*;
- TCVN 4884-2:2015 (ISO 4833-2:2013), *Phần 2: Đếm khuẩn lạc ở 30 °C bằng kỹ thuật cấy bề mặt*.

Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp định lượng vi sinh vật - Phần 2: Đếm khuẩn lạc ở 30 °C bằng kỹ thuật cấy bề mặt

Microbiology of the food chain –

Horizontal method for the enumeration of microorganisms –

Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng vi sinh vật có thể phát triển và tạo thành khuẩn lạc trong môi trường đặc sau khi ủ hiếu khí ở 30 °C. Phương pháp này áp dụng cho:

- a) thực phẩm và thức ăn chăn nuôi;
- b) các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất và chế biến thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.

Tiêu chuẩn này áp dụng cho:

- 1) các sản phẩm chứa các vi sinh vật nhạy cảm với nhiệt chiếm ưu thế trong hệ tổng số (ví dụ: các vi sinh vật ưa lạnh trong thực phẩm đông lạnh và ướp lạnh, thực phẩm khô, các thực phẩm khác có thể chứa các vi sinh vật nhạy cảm với nhiệt).
- 2) các sản phẩm có chứa vi khuẩn hiếu khí bắt buộc có khả năng tạo thành tỷ lệ đáng kể trong hệ tổng số (ví dụ *Pseudomonas* spp.).
- 3) các sản phẩm có chứa các hạt nhỏ có thể rất khó phân biệt với các khuẩn lạc trong đĩa rót.
- 4) các sản phẩm sẫm màu làm cản trở việc nhận biết khuẩn lạc trong đĩa rót.
- 5) các sản phẩm được đánh giá chất lượng cần được phân biệt thông qua các loài khuẩn lạc khác nhau.

TCVN 4884-2:2015

Ngoài kỹ thuật cấy đĩa bằng tay, tiêu chuẩn này cũng quy định sử dụng thiết bị cấy xoắn, phương pháp nhanh để thực hiện đếm khuẩn lạc bề mặt.

Khả năng áp dụng của tiêu chuẩn này bị hạn chế khi kiểm tra các thực phẩm lên men và thức ăn chăn nuôi các môi trường hoặc điều kiện ủ khác thích hợp hơn. Tuy nhiên, phương pháp này có thể áp dụng cho các sản phẩm đó mặc dù không phát hiện hiệu quả các vi sinh vật chiếm ưu thế trong các sản phẩm.

Đối với một vài nền mẫu, phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này có thể cho các kết quả khác với các kết quả thu được khi sử dụng phương pháp quy định trong TCVN 4884-1 (ISO 4833-1).

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 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 (ISO 6887) tất cả các phần, *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.*

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:

3.1

Vi sinh vật (microorganism)

Cơ thể sống có kích thước rất nhỏ quan sát được bằng kính hiển vi, bao gồm vi khuẩn, nấm, động vật nguyên sinh và virus.

[nguồn: ISO/TS 11139:2006^[3], 2.26].

CHÚ THÍCH 1 Đối với mục đích của tiêu chuẩn này thì vi sinh vật gồm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc có thể hình thành khuẩn lạc dưới các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

Lượng quy định của mẫu thử hoặc lượng quy định của huyền phù ban đầu trong trường hợp các sản phẩm ở dạng khác, được rót lên bề mặt môi trường nuôi cấy thạch đặc đựng trong đĩa Petri.

Các đĩa khác được chuẩn bị trong cùng một điều kiện, sử dụng dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu.

Các đĩa được ủ trong điều kiện hiếu khí ở 30 °C trong 72 h.

Tính số lượng vi sinh vật trong một gam hoặc một mililit mẫu thử theo số lượng khuẩn lạc thu được trong các đĩa có chứa ít hơn 300 khuẩn lạc.

5 Môi trường nuôi cấy và dịch pha loãng

5.1 Yêu cầu chung

Chuẩn bị, sản xuất và thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy theo TCVN 8128 (ISO 11133).

5.2 Dịch pha loãng

Sử dụng dịch pha loãng quy định trong TCVN 6507 (ISO 6887) đối với sản phẩm liên quan hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần kiểm tra.

5.3 Môi trường thạch: thạch đếm đĩa (PCA)

5.3.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	5,0 g
Chất chiết nấm men	2,5 g
Glucose khan ($C_6H_{12}O_6$)	1,0 g
Thạch ^a	từ 9 g đến 18 g
Nước	1 000 ml

^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

Khi kiểm tra các sản phẩm sữa, bổ sung 1,0 g sữa bột gầy vào một lít môi trường nuôi cấy. Sữa bột gầy không được chứa các chất gây ức chế.

5.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên hoặc môi trường hoàn chỉnh khô vào nước, đun nóng nếu cần. Trộn kỹ và để yên trong vài phút.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,0 \pm 0,2$ ở 25 °C, sử dụng máy đo pH (6.5), nếu cần.

TCVN 4884-2:2015

Phân phối môi trường vào các bình hoặc chai (6.9) có dung tích thích hợp. Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 °C trong 15 min.

Nếu sử dụng ngay thì làm nguội môi trường trong nồi cách thủy (6.4) duy trì nhiệt độ từ 47 °C đến 50 °C trước khi sử dụng. Nếu không, để môi trường đông đặc lại trong bình hoặc chai. Trước khi sử dụng, làm tan chảy hoàn toàn môi trường trong nồi cách thủy đun sôi, rồi để nguội trong nồi cách thủy (6.4) duy trì nhiệt độ từ 47 °C đến 50 °C.

5.3.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót từ 15 ml đến 20 ml môi trường vào dãy các đĩa Petri vô trùng (6.6) và để cho đông đặc.

Các đĩa này có thể bảo quản ở nhiệt độ $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ đến 4 tuần.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch theo quy định trong TCVN 8128 (ISO 11133).

5.3.4 Phép thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy

5.3.4.1 Yêu cầu chung

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thạch đếm đĩa là môi trường không chọn lọc. Kiểm tra hiệu suất theo TCVN 8128 (ISO 11133).

5.3.4.2 Hiệu suất

Ủ	Nhiệt độ $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ trong (72 ± 3) h
Chủng kiểm chứng	<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013 hoặc <i>Escherichia coli</i> WDCM 00012 ^a [Trung tâm Dữ liệu Thế giới về Vi sinh vật (WDCM)]. <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> WDCM 00003 ^a <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00032 hoặc WDCM 00034
Môi trường đối chứng	Thạch đậu tương trypton
Phương pháp kiểm chứng	Định lượng
Tiêu chí	Tỷ số hiệu suất (PR) $\geq 0,7$

^a Các chủng được sử dụng trong phòng thử nghiệm là tối thiểu. Xem Tài liệu tham khảo [2] thông tin về số lượng các chủng nuôi cấy chọn lọc và các chi tiết liên quan.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

Sử dụng các thiết bị của phòng thử nghiệm vi sinh [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] và cụ thể như sau:

6.1 Tủ sấy để khử trùng khô và **nồi hấp áp lực** để khử trùng ướt, theo TCVN 6404 (ISO 7218)

6.2 Tủ ẩm hoặc **tủ sấy**, được thông gió đối lưu để làm khô các đĩa, có thể duy trì nhiệt độ từ 37 °C đến 55 °C hoặc tủ cấy vi sinh.

6.3 Tủ ẩm, có thể duy trì nhiệt độ từ 30 °C ± 1 °C.

6.4 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ từ 47 °C đến 50 °C và có thể duy trì nước ở nhiệt độ sôi.

6.5 Máy đo pH, có độ chính xác đến ± 0,1 đơn vị pH ở 25 °C.

6.6 Đĩa Petri, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo có đường kính từ 90 mm đến 100 mm hoặc 140 mm.

6.7 Pipet chia vạch xả hết, vô trùng, dung tích danh nghĩa 0,1 ml và 1 ml, phù hợp với loại A hoặc pipet tự động trong TCVN 7150-2 (ISO 835-2)^[2] sử dụng đầu tip vô trùng.

6.8 Thiết bị đếm khuẩn lạc (tùy chọn), cơ học hoặc điện tử có nền được rọi sáng thích hợp.

6.9 Bình hoặc chai, có dung tích thích hợp để chuẩn bị, khử trùng và bảo quản môi trường nuôi cấy, nếu cần.

6.10 Que dàn mẫu, bằng thủy tinh, chất dẻo hoặc bằng thép không gỉ, vô trùng, để dàn chất cấy trên bề mặt môi trường nuôi cấy.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể về lấy mẫu sản phẩm có liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên liên quan tự thỏa thuận về vấn đề này.

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn cụ thể thích hợp với sản phẩm liên quan.

9 Cách tiến hành

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

Theo quy định trong TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc tiêu chuẩn cụ thể thích hợp với sản phẩm liên quan.

9.2 Cấy và ủ

9.2.1 Dùng pipet vô trùng (6.7) chuyển 0,1 ml mẫu thử nếu sản phẩm dạng lỏng hoặc huyền phù ban đầu (độ pha loãng 10^{-1}) trong trường hợp các sản phẩm ở dạng khác vào tâm của hai đĩa thạch (5.3). Nếu chuẩn bị các đĩa từ nhiều hơn một độ pha loãng thì có thể giảm xuống thành một đĩa [TCVN 6404 (ISO 7218)].

Đối với một số các sản phẩm, tốt nhất là đếm số lượng nhỏ các vi sinh vật, giới hạn phát hiện có thể tăng theo hệ số 10 bằng cách cấy 1,0 ml mẫu thử nếu sản phẩm dạng lỏng hoặc 1,0 ml huyền phù ban đầu đối với sản phẩm ở dạng khác, trên bề mặt một đĩa thạch lớn (140 mm) hoặc trên bề mặt của ba đĩa thạch nhỏ (90 mm). Trong cả hai trường hợp, chuẩn bị các đĩa kép bằng cách sử dụng hai đĩa thạch lớn hoặc sáu đĩa thạch nhỏ.

9.2.2 Lấy một đĩa thạch (5.3) khác. Dùng một pipet vô trùng khác (6.7) phân phối 0,1 ml dịch pha loãng 10^{-1} (sản phẩm dạng lỏng) hoặc 0,1 ml dịch pha loãng 10^{-2} (các sản phẩm dạng khác).

9.2.3 Nếu cần, lặp lại quy trình với các dịch pha loãng thập phân tiếp theo, dùng pipet mới vô trùng với mỗi độ pha loãng thập phân.

9.2.4 Cẩn thận dàn đều chất cấy càng nhanh càng tốt lên khắp bề mặt đĩa thạch, không để bộ dàn mẫu (6.10) chạm vào thành đĩa. Nếu có thể, sử dụng cùng một bộ dàn mẫu cho tất cả các độ pha loãng từ một mẫu có độ pha loãng cao nhất.

Đề các đĩa đậy nắp khoảng 15 min ở nhiệt độ môi trường để chất cấy hấp thụ vào thạch.

9.2.5 Lật úp các đĩa đã chuẩn bị rồi đặt vào tủ ấm (6.3) ở 30 °C theo TCVN 6404 (ISO 7218). Ủ trong (72 ± 3) h.

CHÚ THÍCH: Sử dụng thiết bị cấy xoắn để nuôi cấy, xem Phụ lục A.

9.3 Đếm khuẩn lạc

9.3.1 Sau giai đoạn ủ quy định (xem 9.2.5), giữ lại các đĩa có ít hơn 300 khuẩn lạc, nếu có thể. Đếm các khuẩn lạc trên các đĩa, sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc (6.8), nếu cần. Phải đếm đúng khuẩn lạc, tránh đếm nhầm các hạt thực phẩm với các khuẩn lạc chính.

9.3.2 Các khuẩn lạc mọc lan được coi là các khuẩn lạc đơn lẻ. Nếu dự kiến có các khuẩn lạc mọc lan thì kiểm tra các đĩa sau 24 h hoặc 48 h và đánh dấu các khuẩn lạc nhìn thấy. Nếu các khuẩn lạc mọc lan ít hơn một phần tư đĩa, thì đếm các khuẩn lạc trên phần đĩa còn lại và tính số tương ứng cho cả đĩa. Nếu khuẩn lạc mọc lan nhiều hơn một phần tư đĩa thì loại không đếm đĩa đó. Nếu tất cả các đĩa đều có các khuẩn lạc mọc lan thì đếm các đĩa thích hợp nhất và ghi vào báo cáo kết quả rằng kết quả có thể bị ảnh hưởng bởi các khuẩn lạc mọc lan.

10 Biểu thị kết quả

Theo quy định trong TCVN 6404 (ISO 7218).

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi 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 đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này cùng với mọi tình huống bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Đếm khuẩn lạc bề mặt sử dụng thiết bị cấy xoắn

A.1 Yêu cầu chung

Phụ lục này quy định phương pháp định lượng các vi sinh vật có mặt trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và các mẫu môi trường sử dụng thiết bị cấy xoắn và đếm các khuẩn lạc phát triển trên môi trường đặc sau khi ủ hiếu khí (định nghĩa về vi sinh vật, xem 3.1).

A.2 Nguyên tắc

Mẫu dạng lỏng hoặc huyền phù của các sản phẩm dạng khác được cho liên tục trên bề mặt đĩa thạch quay ở dạng hình xoắn Acsmet.

Thể tích phân phối tăng dần trong khi hệ thống phân phối (kim vạch hoặc microxyranh vô trùng dùng một lần) chuyển động từ tâm đến mép đĩa, sao cho tồn tại mối tương quan số mũ giữa thể tích và bán kính của vòng xoắn.

Trong tủ ấm các khuẩn lạc mọc theo các đường cấy nơi mà dịch lỏng được cho lên đĩa thạch. Ở đếm đã được hiệu chuẩn theo thể tích mẫu được phân phối lên các phần diện tích khác nhau của thạch.

Đếm số lượng khuẩn lạc trong một diện tích xác định và tính số lượng trong một millilit hoặc trong một gam. Cách khác, có thể sử dụng máy đếm tự động.

A.3 Môi trường nuôi cấy và dịch pha loãng

Xem Điều 5.

Sử dụng các dung dịch sau đây để làm sạch và khử nhiễm kim vạch. Không cần sử dụng các dung dịch này cho thiết bị cấy xoắn dùng microxyranh sử dụng một lần.

A.3.1 Nước vô trùng. Nếu mẫu thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi có chứa chất béo, thì có thể dùng nước bổ sung 1 % thể tích polysorbat 80.

A.3.2 Dung dịch natri hypo clorua, 5 % clo.

A.4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh, xem Điều 6.

A.4.1 Thiết bị cấy xoắn, được chỉnh để phân phối tổng lượng mẫu mong muốn, ví dụ: 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml hoặc 0,4 ml trên một đĩa và thường có bẫy chân không để kiểm soát việc nạp và phân phối mẫu, loại bỏ mẫu thừa, khử trùng và tráng rửa hệ thống. Cần có áp lực dư khoảng từ 24 kPa đến 35 kPa (160 mmHg đến 260 mmHg).

A.4.2 Thiết bị đếm khuẩn lạc, có ô đếm đã hiệu chuẩn liên quan đến lượng mẫu cần cho vào các vùng cụ thể của thạch. Cách khác, có thể sử dụng máy đếm tự động.

A.4.3 Cốc đựng mẫu vô trùng sử dụng một lần dung tích 5 ml. Một số kiểu mới sử dụng các vật chứa kích thước khác nhau, chuyên để khử trùng và tráng rửa.

A.4.4 Microxyranh sử dụng một lần (tùy chọn).

A.4.5 Đĩa thạch đã chuẩn bị sẵn theo 5.3. Các đĩa phải chứa đủ và có độ sâu thạch đồng đều và bề mặt thạch phải bằng phẳng. Nhãn được dán vào thành đĩa.

A.5 Lấy mẫu

Lấy mẫu theo Điều 7.

A.6 Chuẩn bị mẫu

Chuẩn bị mẫu theo Điều 8.

A.7 Cách tiến hành

A.7.1 Phần mẫu thử và các độ pha loãng

Xem 9.1.

Nhìn chung, khi sử dụng kỹ thuật đĩa xoắn thì có thể không cần hoặc ít khi cần đến các dung dịch pha loãng. Dùng pipet vô trùng chuyển 3 ml đến 5 ml mẫu đồng nhất sang cốc đựng mẫu vô trùng sử dụng một lần dung tích 5 ml (A.4.3).

Nếu cần, để mẫu đồng nhất lắng xuống vài phút trước khi lấy ra phần chất lỏng nổi phía trên để sang đĩa xoắn, vì khi có mặt của các hạt nhỏ có thể làm tắc ống. Sử dụng các túi bằng chất dẻo vô trùng có bộ lọc để chuẩn bị huyền phù ban đầu của mẫu không phải dạng lỏng nếu bộ lọc thường xuyên bị tắc.

A.7.2 Cài đặt

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Cài đặt và điều chỉnh thiết bị nếu cần, theo hướng dẫn của nhà sản xuất, cần chú ý kiểm tra:

a) Máy vận hành cơ, bộ truyền động theo cam ở đúng độ cao, sao cho phân phối được chính xác thể tích yêu cầu;

TCVN 4884-2:2015

- b) Đĩa đã dán nhãn được đặt chính giữa bàn quay;
- c) Đầu tip kim vạch hoặc microxyranh có góc độ chính xác với bề mặt thạch do nhà sản xuất quy định;
- d) Kim vạch bắt đầu và ghi tại các điểm chính xác – đối với thiết bị điện tử chỉ cần kiểm tra điểm bắt đầu.

Lặp lại việc kiểm tra này nếu trong quá trình vận hành thiết bị, kim vạch bị hỏng hoặc không thẳng (thể hiện qua kết bám không đều hoặc không thẳng hàng của đầu tip kim vạch với dấu chấm bắt đầu trên đầu quay của thiết bị).

A.7.3 Nuôi cấy

A.7.3.1 Yêu cầu chung

Đối với kiểu bán tự động cần thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, đối với kiểu vận hành thủ công thì thực hiện như sau:

Cho dung dịch natri hypo clorua (A.3.2) vào đầy một cốc đựng mẫu sử dụng một lần (A.4.3), cho nước vô trùng vào đầy cốc thứ hai và cho mẫu vào đầy cốc thứ ba. Làm sạch đầu tip kim vạch trước khi sử dụng, khử trùng kim vạch sau mỗi lần vẽ mẫu bằng cách dùng dung dịch natri hypo clorua tráng trong 1 s, sau đó dùng nước vô trùng tráng trong 1 s.

Sau khi tráng, hạ thấp kim vạch vào mẫu và mở van chân không. Rút mẫu qua đầu tip kim vạch cho đến khi tạo thành cột chất lỏng trong ống phía trên van chân không. Khi đầu tip kim vạch vẫn còn thấp hơn mức chất lỏng, đóng van chân không. Nâng đầu tip kim vạch và quay để giữ mẫu. Đặt đế của đĩa thạch đã rót trước, dán nhãn bên cạnh vào vòng quay và hạ thấp kim vạch cho đến khi đầu tip nằm tự do trên bề mặt thạch. Khởi động motor và cho quay đến khi kim vạch được nâng lên và thiết bị dừng tự động. Đậy nắp và lấy đĩa ra khỏi vòng quay.

Sau khi kiểm tra mỗi mẫu, tráng rửa thiết bị bằng dung dịch natri hypo clorua và nước như trước đó. Khi không sử dụng, đổ đầy nước vào thiết bị.

Nếu thực hiện với nhiều độ pha loãng của mẫu thì bắt đầu với độ pha loãng cao nhất.

Để các đĩa đậy nắp khoảng 15 min ở nhiệt độ môi trường để chất cấy hấp thụ vào thạch.

A.7.3.2 Kiểm tra độ vô trùng

Kiểm tra độ vô trùng của thiết bị cấy xoắn bằng nước vô trùng trước và cần được kiểm tra sau mỗi dãy mẫu.

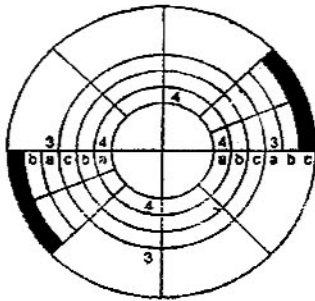
A.7.4 Ủ

Xem 9.2.5.

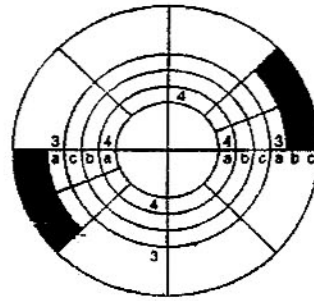
A.7.5 Đếm khuẩn lạc

A.7.5.1 Ô đếm

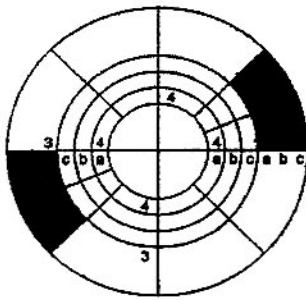
Hai ô đếm sẵn có phù hợp với kích thước đĩa được sử dụng. Cách khác, ô đếm là đĩa trong suốt, đường kính 150 mm nhưng đối với các đĩa đếm 90 mm thì chỉ sử dụng phần trong của vòng đường kính 90 mm. Sử dụng các ô đếm được cung cấp kèm theo thiết bị và theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ô đếm được sử dụng liên quan đến các khuẩn lạc được đếm trong một vùng của đĩa xoắn với thể tích chất cấy được dàn trên vùng này. Xem các ví dụ trong Hình A.1.



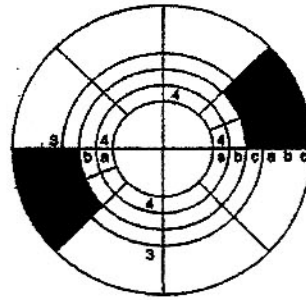
Vùng 3c – 0,0005 ml



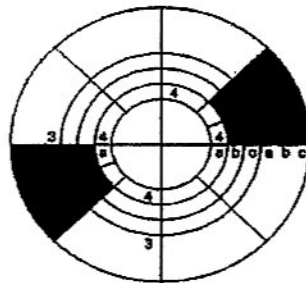
Vùng 3b – 0,0015 ml



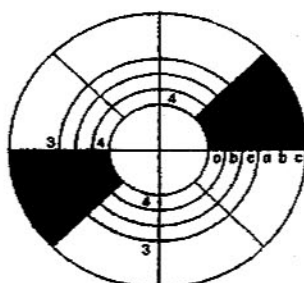
Vùng 3a – 0,0025 ml



Vùng 4c – 0,0038 ml



Vùng 4b – 0,0060 ml



Vùng 4c – 0,0090 ml

Hình A.1 – Các vùng đếm

A.7.5.2 Hiệu chuẩn và kiểm tra xác nhận

Các thể tích được đưa lên các vùng khác nhau của ô đếm được nêu trong tài liệu đi kèm thiết bị. Để hiệu chuẩn chính xác, các thể tích trên vùng của ô đếm phải được chuyên gia kiểm tra.

Để kiểm tra các thể tích đưa vào mỗi vùng, chuẩn bị 11 nồng độ vi khuẩn trong phạm vi từ 10^6 tế bào/ml đến 10^3 tế bào/ml bằng cách tạo các dung dịch pha loãng 1 + 1 của huyền phù vi khuẩn không mọc lan. Dùng thiết bị cấy xoắn, cấy đĩa tất cả các dung dịch pha loãng theo quy định trong 9.2, sử dụng cùng môi trường và cùng tủ ấm. Sau khi ủ ấm, đếm các khuẩn lạc. Tính thể tích đưa vào trong vùng ô đếm được bằng công thức sau:

$$V = \frac{C_A}{C_m}$$

Trong đó:

V là thể tích dùng cho vùng ô đếm, tính bằng mililit (ml);

C_A là số đếm khuẩn lạc trong vùng nêu trên;

C_m là số đếm khuẩn lạc chuẩn trên mililit.

Kiểm tra tổng thể tích đã phân phối từ thiết bị cấy xoắn bằng cách cân lượng đã phân phối trên cân phân tích có độ chính xác đến ± 2 mg.

A.7.5.3 Kiểm tra và báo cáo số đếm đĩa (phương pháp thủ công)

Chỉnh tâm đĩa lên tâm ô đếm. Chọn vùng bất kỳ và đếm các khuẩn lạc từ mép đến tâm cho đến khi đếm được 20 khuẩn lạc.

Tiếp tục đếm các khuẩn lạc còn lại trong vùng đếm (nghĩa là đoạn hoặc đoạn nhỏ) trong đó quan sát được khuẩn lạc thứ 20. Ghi lại số đếm này cùng với số vùng có khuẩn lạc thứ 20 (ví dụ: 3c, 3b, 3a, 4c, 4b, 4a trong Hình A.1). Đếm khuẩn lạc trong vùng đối xứng của đĩa, chia tổng số đếm của hai vùng này cho thể tích mẫu đưa vào trên các vùng đã đếm để thu được số đếm trên mililit.

Nếu tổng số khuẩn lạc đếm được vượt quá 75 và việc đếm hoàn thành trong vùng chứa khuẩn lạc thứ 20 thì số đếm thường thấp do lỗi trùng hợp liên quan đến các cụm khuẩn lạc. Do đó, nên đếm các đoạn vòng liền kề xung quanh đường tròn cho đến khi đếm được tất cả ít nhất là 50 khuẩn lạc. Tính số đếm bằng cách chia số khuẩn lạc đếm được cho thể tích của vùng được đếm.

Nếu đếm được ít hơn 20 khuẩn lạc trên toàn bộ đĩa thì khoảng tin cậy của số đếm thu được là rộng. Nếu số đếm khuẩn lạc vượt quá 75 trong vùng đầu tiên của góc, nghĩa là vùng 3c, thì báo cáo kết quả là: ước tính khoảng $> 300\ 000$ khuẩn lạc/ml.

A.7.5.4 Kiểm tra và báo cáo số đếm đĩa xoắn (sử dụng máy đếm khuẩn lạc điện tử)

Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, nhưng kiểm tra thủ công (A.7.5.3), ít nhất là kiểm tra khi lần đầu tiên sử dụng thiết bị hoặc khi kiểm tra mẫu thực phẩm hoặc mẫu thức ăn chăn nuôi mới.

A.8 Tính và biểu thị kết quả

Tính số đếm khuẩn lạc đĩa xoắn. Báo cáo số đếm khuẩn lạc trên millilit hoặc trên gam sản phẩm.

A.9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- c) tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này cùng với mọi tình huống bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- d) kết quả thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 7150 (ISO 835), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ.*
- [2] TCVN 10505-2 (ISO 8655-2), *Dụng cụ đo thể tích có cơ cấu pittông – Phần 2: Pipet pittông.*
- [3] ISO/TS 11139:2006, *Sterilization of health care products – Vocabulary.*
- [4] TCVN 7904:2008 (ISO 17410:2001) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi sinh vật ưa lạnh*
- [5] BS 4285-2.3:1984¹⁾, *Microbiological examination for dairy purposes – Methods of general application forenumeration of microorganisms – Enumeration of microorganisms by surface plate technique for colony count*
- [6] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION Standard methods for the examination of dairy products. Washington, DC: APHA, Seventeenth Edition, 2004
- [7] AOAC INTERNATIONAL 977.27 Spiral Plate method. In: *Official methods of analysis.* Gaithersburg, MD: AOAC, Nineteenth Edition, 2012
- [8] D. Roberts, M. Greenwood Enumeration of microorganisms. In: *Practical food microbiology.* Oxford: Blackwell, Third Edition, 2003, pp. 105–29.
- [9] L. Maturin, J.T Peeler Chapter 3. Aerobic plate count. In: *Bacteriological analytical manual.* Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration, 2001. Available (viewed 2012-07-13) at: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm063346.htm>
- [10] M.H. Greenwood, E.F.C. Coetzee, B.M. Ford, P. Gill, W.L. Hooper, S.C. Matthews The microbiology of selected retail food products with an evaluation of viable counting methods. *J. Hyg. (Lond.).* 1984, 92 pp. 67–77
- [11] International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in foods. 1 Their significance and methods of enumeration.* London, ON: University of Toronto Press, Second Edition, 1978

¹⁾ Tiêu chuẩn này đã hủy, được thay thế bằng tiêu chuẩn ISO 7218:2007 đã được chấp nhận thành TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007).

- [12] J.E. Gilchrist, C.B. Donnelly, J.T. Peeler, J.E. Campbell Collaborative study comparing the spiral plate and aerobic plate count methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1977, 60 pp. 807–812
- [13] B. Jarvis, V.H. Lach, J.M. Wood Evaluation of the spiral plate maker for the enumeration of microorganisms in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 1977, 43 pp. 149–157
- [14] J.M. Kramer, R.J. Gilbert Enumeration of micro-organisms in food: A comparative study of five methods. *J. Hyg. (Lond.)*. 1978, 81 pp. 151–159
- [15] WORLD DATA CENTRE FOR MICROORGANISMS. Reference strain catalogue pertaining to organisms for performance testing culture media. Available (2013-03-07) at: http://www.wfcc.info/pdf/WDCM_Reference_Strain_Catalogue.pdf
-