

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 7904:2008**

**ISO 17410:2001**

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI –  
PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG VI SINH VẬT ƯA LẠNH**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs –  
Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms*

HÀ NỘI - 2008

**Lời nói đầu**

TCVN 7904:2008 hoàn toàn tương đương với ISO 17410:2001;

TCVN 7904:2008 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.

## **Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi**

### **Phương pháp định lượng vi sinh vật ưa lạnh**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs –*

*Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms*

#### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng vi sinh vật ưa lạnh bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 6,5 °C. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi.

#### **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 6263 (ISO 8261), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh

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.

#### **3 Thuật ngữ và định nghĩa**

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

3.1

**Vi sinh vật ưa lạnh (psychrotrophic microorganisms)**

Các vi khuẩn, nấm men, nấm mốc hình thành các khuẩn lạc có thể đếm được dưới các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

**4 Nguyên tắc**

**4.1** Chuẩn bị hai đĩa thạch, sử dụng môi trường cấy không chọn lọc dạng rắn và một lượng xác định của mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu ở dạng lỏng, hoặc một lượng xác định huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác. Để tránh bị áp lực do nhiệt, nên sử dụng phương pháp cấy bề mặt.

Chuẩn bị hai đĩa thạch khác, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu, dưới cùng một điều kiện.

**4.2** Ủ các đĩa trong điều kiện hiếu khí ở 6,5 °C trong 10 ngày.

**4.3** Tính số lượng vi sinh vật trên mililit hoặc gam mẫu thử từ số lượng khuẩn lạc thu được trên các đĩa đã chọn.

**5 Môi trường nuôi cấy và dịch pha loãng**

Về thực hành thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước được sử dụng phải là nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

Nếu môi trường nuôi cấy và thuốc thử đã chuẩn bị mà chưa sử dụng ngay, thì bảo quản chúng ở nơi tối, nhiệt độ 3 °C ± 2 °C không quá 1 tháng, trong các điều kiện không làm thay đổi thành phần của chúng, trừ khi có quy định khác.

**5.1 Dung dịch pha loãng**

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

**5.2 Thạch đếm đĩa (PCA)**

**5.2.1 Thành phần**

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	5.0 g
Dịch chiết nấm men	2.5 g
Glucoza	1.0 g
Thạch	9 g đến 18 g <sup>2</sup>
Nước	1 000 ml

<sup>2</sup> Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

Khi cần kiểm tra các sản phẩm sữa, thì nên thêm 1,0 g bột sữa gầy trên lít môi trường nuôi cấy. Bột sữa gầy không được chứa các chất ức chế.

### 5.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, đun nóng nếu cần. Trộn kỹ và để yên trong vài phút. Chính pH (6.9), sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,0 \pm 0,2$  ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Rót môi trường này với các lượng thích hợp vào các bình cầu hoặc chai (6.10). Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực (6.1) ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nếu môi trường được sử dụng ngay, thì làm nguội trên nồi cách thủy (6.7) đặt ở  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nếu không thì để môi trường đông đặc lại trong bình cầu hoặc chai. Trước khi sử dụng, làm tan chảy hoàn toàn môi trường rồi làm nguội trên nồi cách thủy (6.7) ở  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Phân phối vào các đĩa Petri (6.5) với các lượng 15 ml môi trường hoàn chỉnh vừa mới chuẩn bị hoặc làm tan chảy lại. Để cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô cẩn thận các đĩa thạch (tốt nhất là mở nắp và úp mặt thạch xuống dưới) trong tủ ẩm (6.3) ở nhiệt độ từ  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  cho đến khi bề mặt thạch khô hẳn. Các đĩa thạch cũng có thể được làm khô trong tủ an toàn thông khí trong 30 min với nắp đĩa mở một nửa, hoặc để qua đêm với nắp đậy kín [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

## 6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Các yêu cầu chung [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu đáp ứng được các yêu cầu tương tự.

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

**6.1 Nồi hấp áp lực**, có thể duy trì nhiệt độ ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.2 Tủ khử trùng khô**, có thể duy trì nhiệt độ từ  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $175\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 1 h.

**6.3 Tủ ẩm**, có thể duy trì nhiệt độ từ  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.4 Tủ ẩm**, có thể duy trì ở nhiệt độ ở  $6,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**6.5 Đĩa Petri**, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

**6.6 Pipet**, được hiệu chuẩn cho mục đích vi khuẩn học, có dung tích danh định 0,1 ml, 1 ml và 10 ml.

## TCVN 7904:2008

**6.7 Nồi cách thủy**, hoặc dụng cụ tương tự, một loại có khả năng duy trì nhiệt độ từ 44 °C đến 47 °C và một loại có thể duy trì ở nhiệt độ sôi.

**6.8 Dụng cụ đếm khuẩn lạc**, gồm có nền được chiếu sáng và bộ đếm cơ hoặc đếm điện tử, tùy chọn.

**6.9 Máy đo pH**, có thể đọc chính xác đến 0,01 đơn vị pH ở 25 °C và có thể đo chính xác đến  $\pm 0,1$  đơn vị pH.

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

**6.11 Bộ dàn mẫu bằng thủy tinh hoặc chất dẻo**, vô trùng, dùng để dàn dịch cấy trên bề mặt môi trường cấy.

## 7 Lấy mẫu

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

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

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) hoặc đối với các sản phẩm sữa theo TCVN 6263 (ISO 8261).

## 9 Cách tiến hành

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

Chuẩn bị phần mẫu thử, huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng ban đầu) và các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) hoặc đối với các sản phẩm sữa theo TCVN 6263 (ISO 8261).

### 9.2 Nuôi cấy và ủ

**9.2.1** Chuẩn bị hai đĩa từ mẫu thử (nếu sản phẩm dạng lỏng) hoặc từ dung dịch pha loãng ban đầu của sản phẩm ở dạng khác và từ mỗi dung dịch pha loãng đã chọn. Dùng pipet vô trùng (6.6) lấy 0,1 ml của sản phẩm dạng lỏng, huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng ban đầu) hoặc các dung dịch pha loãng thích hợp cho vào tâm của từng đĩa Petri đã dán nhãn có chứa môi trường PCA (5.2).

**9.2.2** Dùng bộ dàn mẫu (6.11) dàn cẩn thận dịch cấy trên bề mặt thạch và thực hiện càng nhanh càng tốt, không để chạm vào mép đĩa, cho đến khi không còn chất lỏng trên bề mặt đĩa. Sử dụng một đĩa kiểm chứng không có dịch cấy để kiểm tra độ vô trùng. Dùng một bộ dàn mẫu mới cho mỗi đĩa.

Cũng có thể sử dụng cùng một bộ dàn mẫu cho tất cả các dung dịch pha loãng từ một mẫu bắt đầu từ độ pha loãng cao nhất và thực hiện theo thứ tự với dung dịch có lượng chất thử cao nhất.

**9.2.3** Lật ngược các đĩa đã chuẩn bị trong 9.2.2 và đặt vào tủ ấm (6.4) ở 6,5 °C. Ủ trong 10 ngày.

### 9.3 Đếm khuẩn lạc

Sau thời gian ủ quy định (xem 9.2.3), đếm các khuẩn lạc trên mỗi đĩa Petri chứa không quá 150 khuẩn lạc, sử dụng bộ đếm khuẩn lạc (6.8). Điều quan trọng là xác định chính xác các khuẩn lạc, nhưng người thực hiện tránh đếm nhầm các hạt không hoà tan hoặc chất kết tủa trên đĩa với các khuẩn lạc đích thực.

Các khuẩn lạc mọc lan được coi là các khuẩn lạc đơn lẻ. Nếu có ít hơn một phần bốn đĩa mọc quá dày bởi khuẩn lạc mọc lan, thì đếm các khuẩn lạc trên phần đĩa không bị ảnh hưởng và tính số lượng tương ứng với toàn bộ đĩa. Nếu có nhiều hơn một phần bốn đĩa có các khuẩn lạc mọc lan thì loại bỏ đĩa đó không đếm.

## 10 Tính toán và biểu thị kết quả

### 10.1 Tính toán

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Đối với kết quả có giá trị, nhìn chung cho rằng cần đếm các khuẩn lạc trên ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 15 khuẩn lạc.

Tính số lượng,  $N$ , đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của vi sinh vật ưa lạnh trên gam hoặc mililit mẫu thử theo công thức (1):

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2) d} \quad (1)$$

trong đó

$\sum C$  là tổng các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại từ hai độ pha loãng liên tiếp và trong đó một đĩa có chứa ít nhất 15 khuẩn lạc.

$V$  là thể tích dịch cấy trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

$n_1$  là số đĩa của độ pha loãng thứ nhất được giữ lại;

## TCVN 7904:2008

$n_2$  là số đĩa của độ pha loãng thứ hai được giữ lại;

$d$  là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại.

CHÚ THÍCH Độ pha loãng thấp nhất là độ pha loãng có hàm lượng mẫu thử cao nhất.

### 10.2 Biểu thị kết quả

#### 10.2.1 Trường hợp chung: Các đĩa chứa từ 15 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc

Làm tròn số các kết quả thu được đến hai chữ số có nghĩa. Nếu chữ số thứ ba nhỏ hơn 5 thì không thay đổi chữ số đứng trước nó; nếu chữ số thứ ba lớn hơn hoặc bằng 5 thì tăng chữ số đứng trước lên một đơn vị. Ví dụ: 28 500 được làm tròn thành 29 000 và 11 500 được làm tròn thành 12 000.

Lấy kết quả là số lượng CFU của vi sinh vật ưa lạnh trên mililit (các sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (các sản phẩm ở dạng khác), được biểu thị là số thích hợp giữa 1,0 và 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10, hoặc là số nguyên với hai chữ số có nghĩa.

#### 10.2.2 Ước tính số lượng nhỏ

Nếu hai đĩa mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác), chứa ít hơn 15 khuẩn lạc, thì tính trung bình số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa.

Biểu thị kết quả như sau:

- số ước tính vi sinh vật ưa lạnh,  $N_E$ , trên mililit (các sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (các sản phẩm ở dạng khác), theo công thức (2):

$$N_E = \frac{\sum C}{V \times n \times d} \quad (2)$$

trong đó

$\sum C$  là tổng số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa;

$V$  là thể tích dịch cấy đã cấy trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

$n$  là số đĩa được giữ lại (trong trường hợp này  $n = 2$ );

$d$  là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu hoặc của độ pha loãng được cấy.



### 10.2.3 Không có mặt khuẩn lạc

Nếu hai đĩa mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác), không chứa khuẩn lạc nào, thì biểu thị kết quả như sau:

- ít hơn  $1/(V \times d)$  vi sinh vật ưa lạnh trên mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác);

trong đó

$V$  là thể tích dịch cấy đã sử dụng trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

$d$  là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

### 10.2.4 Ước tính số lượng lớn

Nếu tất cả các đĩa chứa nhiều hơn 150 khuẩn lạc, thì tính trung bình số ước tính từ các đĩa chứa gần 150 khuẩn lạc nhất.

Biểu thị kết quả như sau, sử dụng công thức (3):

- số ước tính vi sinh vật ưa lạnh,  $N'$ , trên mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác):

$$N' = \frac{\sum C}{V \times n \times d}$$

trong đó

$\sum C$  là tổng số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa;

$V$  là thể tích dịch cấy đã cấy trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

$n$  là số đĩa được giữ lại (trong trường hợp này  $n = 2$ );

$d$  là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng được giữ lại.

### 10.3 Ví dụ về cách tính

Số đếm vi sinh vật, sử dụng 0,1 ml dịch cấy cho kết quả như sau:

- tại độ pha loãng  $10^{-2}$  giữ lại: 138 khuẩn lạc và 125 khuẩn lạc;
- tại độ pha loãng  $10^{-3}$  giữ lại: 20 khuẩn lạc và 18 khuẩn lạc.

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{138 + 125 + 20 + 18}{0,1[2 + (0,1 \times 2)]10^{-2}} = \frac{301}{0,0022} = 136818$$

Làm tròn kết quả theo TCVN 6404 (ISO 7218) có được 140 000 hoặc  $1,4 \times 10^5$  CFU của vi sinh vật ưa lạnh trên millilit hoặc trên gam.

## 11 Độ chụm

Theo phân bố Poisson các vi sinh vật trong cơ chất thì các giới hạn tin cậy của phương pháp này thay đổi theo số đếm khuẩn lạc cần kiểm tra khoảng từ 16 % đến 52 % (xem [1]). Trong thực tế thậm chí có thể thấy độ dao động lớn hơn.

Các thông tin giới hạn tin cậy về việc ước tính lượng nhỏ vi sinh vật nêu trong TCVN 6404 (ISO 7218).

## 12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng (với PCA có hoặc không có bột sữa gầy);
- mọi chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- các kết quả thử nghiệm thu được và phương pháp biểu thị kết quả đã sử dụng;
- nếu đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] Cowell and Morisetti, *J.Sc. Fd. Agr.*, **20**, 1969, p. 573.
- [2] IDF Standard 132A:1991, Milk – Estimation of numbers of psychrotrophic microorganisms, rapid colony count technique, 25 hours at 21 °C.
- [3] TCVN 6507-2:2005 (ISO 6887-2:2003), 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 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị thịt và sản phẩm thịt.
- [4] TCVN 6507-3:2005 (ISO 6887-3:2003) 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 3: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thủy sản và sản phẩm thủy sản.
- [5] TCVN 6507-4:2005 (ISO 6887-4:2003) 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 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.
-