

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 6848:2007**

**ISO 4832:2007**

Xuất bản lần 3

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN  
NUÔI – PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG COLIFORM --  
KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the  
enumeration of coliforms -- Colony-count technique*

**HÀ NỘI – 2007**

## Lời nói đầu

TCVN 6848:2007 thay thế TCVN 6848:2001 và TCVN 6262-1:1997;

TCVN 6848:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 4832:2007;

TCVN 6848:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn 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.

## 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 quốc tế ISO 4832 này được soát xét thì cần phải tính đến mọi thông tin liên quan đến phạm vi mà phương pháp đếm đĩa này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch so với phương pháp 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 có thể tồn tại các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Trong trường hợp có sẵn tiêu chuẩn quốc tế cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Thông thường khi các tiêu chuẩn như thế được soát xét, thì chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với phương pháp đếm đĩa này là các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

Kỹ thuật mô tả trong tiêu chuẩn này có độ chính xác cao hơn so với kỹ thuật mô tả trong TCVN 4882 (ISO 4831), nhưng không cho phép kiểm tra vi sinh vật khi thực hiện trên mẫu thử lớn. Do đó, phương pháp này thích hợp khi trong mẫu thử có mặt coliform với số lượng lớn. Hơn nữa, do định nghĩa "coliform" trong hai tiêu chuẩn này khác nhau, nên các vi sinh vật đếm được là không cần thiết phải giống nhau. Đối với sản phẩm cụ thể bất kỳ thì phương pháp được chọn sẽ được qui định trong tiêu chuẩn đối với sản phẩm đó.

Đối với mục đích của phương pháp thử thực tế, thì định nghĩa "coliform" đưa ra trong điều 3 và được sử dụng làm cơ sở cho qui trình là không cần thiết phải giống hệt với các định nghĩa tương ứng đưa ra trong các ấn bản khác. Phương pháp mô tả trong tiêu chuẩn này sẽ phát hiện, theo trung bình, chỉ khoảng 90 % các chủng vi sinh vật liên quan đến các ấn bản khác là "coliform (giả định)" (ví dụ: các chủng *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*) (xem [2]).

## Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng coliform – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn chung về định lượng coliform. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

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

bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc trên môi trường đặc sau khi ủ ở 30 °C hoặc 37 °C.

**CHÚ THÍCH** Nhiệt độ này cần được thoả thuận giữa các bên có liên quan. Trong trường hợp đối với sữa và sản phẩm sữa, thì nhiệt độ ủ là 30 °C.

Kỹ thuật này được khuyến cáo sử dụng khi số lượng khuẩn lạc cần tìm dự kiến lớn hơn 100 trên mililit hoặc trên gam mẫu thử.

### 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 ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

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 6848:2007

TCVN 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

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

ISO/TS 11133–1, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị môi trường nuôi cấy – Phần 1: Các hướng dẫn chung để đảm bảo chất lượng cho việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong phòng thử nghiệm).

ISO/TS 11133–2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị môi trường nuôi cấy – Phần 2: Các hướng dẫn thực hành các phép thử trên môi trường nuôi cấy).

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 3.1

**coliform** (coliforms)

vi khuẩn ở nhiệt độ qui định (nghĩa là ở 30 °C hoặc 37°C như thoả thuận) hình thành các khuẩn lạc đặc trưng trong thạch lactoza mật đỏ trung tính tím tinh thể và trong phép thử khẳng định có lên men lactoza có sinh khí dưới các điều kiện thử quy định trong tiêu chuẩn này.

### 4 Nguyên tắc

**4.1** Chuẩn bị hai môi trường đặc chọn lọc, và lấy một lượng mẫu thử theo quy định nếu là sản phẩm ban đầu là chất lỏng, hoặc lấy một lượng huyền phù ban đầu theo quy định nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Chuẩn bị các cặp đĩa môi trường chọn lọc khác trong cùng một điều kiện, dùng các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu.

**4.2** Ủ các đĩa này ở 30 °C hoặc 37 °C (như thoả thuận) trong 24 h.

**4.3** Đếm các khuẩn lạc đặc trưng và nếu cần, số khuẩn lạc được khẳng định bằng lên men lactoza.

**4.4** Số coliform có trong 1 mililit hoặc trong 1 gam mẫu thử được tính từ số khuẩn lạc đặc trưng thu được trên các đĩa được chọn [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

## 5 Môi trường nuôi cấy và dịch pha loãng

### 5.1 Khái quát

Xem TCVN 6404 (ISO 7218), ISO/TS 11133-1 và ISO/TS 11133-2 về việc chuẩn bị, pha chế và thử tính năng của môi trường cấy.

### 5.2 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507 (ISO 6887) (phần có liên quan), TCVN 6263 (ISO 8261) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần kiểm tra.

### 5.3 Môi trường đặc chọn lọc: Thạch lactoza mật đỏ trung tính tím tinh thể (VRBL)

#### 5.3.1 Thành phần

Dịch thủy phân mô động vật bằng enzym	7 g
Cao men	3 g
Lactoza ( $C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$ )	10 g
Natri clorua	5 g
Muối mật (bile salts)	1,5 g
Đỏ trung tính	0,03 g
Tím tinh thể	0,002 g
Thạch	12 g đến 18 g <sup>a</sup>
Nước	1 000 ml
a Tùy thuộc vào sức đông của thạch	

#### 5.3.2 Chuẩn bị

Tiến hành như sau để giữ được tính chọn lọc và đặc trưng của môi trường.

Trộn kỹ các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước và để yên vài phút. Chỉnh pH sao cho sau khi đun sôi pH bằng  $7,4 \pm 0,2$  ở  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Đun đến sôi và thỉnh thoảng khuấy cho tan hết.

Giữ sôi trong 2 phút. Làm nguội ngay môi trường trong nồi cách thủy (6.5) ở nhiệt độ  $44\text{ }^\circ\text{C}$  đến  $47\text{ }^\circ\text{C}$ .

Để tránh làm quá nhiệt, không đun môi trường quá lâu cũng như không đun lại. Do đó, không khử trùng trong nồi áp lực và cần kiểm tra độ vô trùng của môi trường tại thời điểm sử dụng (xem 9.2.2).

Sử dụng môi trường trong vòng 4 h sau khi chuẩn bị.

### 5.3.3 Kiểm tra tính năng về đảm bảo chất lượng môi trường cấy

Đối với việc xác định tính chọn lọc và hiệu quả, xem ISO/TS 11133-1. Kiểm tra tính năng đối với thạch lactoza mật đỏ trung tính tím tinh thể (VRBL) theo ISO/TS 11133-2:2003, Bảng B.1.

## 5.4 Môi trường khăng định: Canh thang mật lactoza lục sáng

### 5.4.1 Thành phần

Dịch thuỷ phân casein bằng emzym	10 g
Lactoza ( $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ )	10 g
Mật bò khô	20 g
Lục sáng (Brilliant green)	0,0133 g
Nước	1 000 ml

### 5.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng nhẹ, nếu cần, trên nồi cách thuỷ (6.5). Chính pH sao cho sau khi khử trùng là  $7,2 \pm 0,2$  ở  $25^\circ C$ , nếu cần.

Chuyển 10 ml môi trường vào từng ống nghiệm (6.7) chứa các ống Durham (6.8). Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở  $121^\circ C$ . Các ống Durham không được chứa bọt khí sau khi khử trùng.

## 6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

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

### 6.1 Thiết bị để thanh trùng khô (tủ sấy) hoặc để thanh trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

### 6.2 Tủ ấm, có thể hoạt động ở $30^\circ C \pm 1^\circ C$ hoặc $37^\circ C \pm 1^\circ C$ .

### 6.3 Đĩa Petri, bằng thuỷ tinh hoặc bằng chất dẻo có đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

### 6.4 Pipet xả hết, có dung tích danh định 1 ml.

### 6.5 Nồi cách thuỷ, hoặc thiết bị tương tự có khả năng hoạt động từ $44^\circ C$ đến $47^\circ C$ hoặc ở $100^\circ C$ .

### 6.6 Thiết bị đếm khuẩn lạc, gồm một nguồn chiếu sáng và dụng cụ đếm cơ học hoặc điện tử.

### 6.7 Ống nghiệm, kích thước khoảng 16 mm x 160 mm.

### 6.8 Ống Durham, có kích thước phù hợp với các ống nghiệm (6.7).

**6.9 Bình hoặc chai**, để đun sôi và bảo quản môi trường cấy.

**6.10 pH met**, chính xác đến  $\pm 0,1$  đơn vị pH ở 25°C.

**6.11 Que cấy vòng**, bằng platin-iridi hoặc niken-crom, đường kính khoảng 3 mm, hoặc loại vòng cấy dùng một lần.

## 7 Lấy mẫu

Lấy mẫu theo tiêu chuẩn cụ thể thích hợp đối với sản phẩm tương ứng. Nếu không có các tiêu chuẩn như vậy thì các bên liên quan cần thoả thuận với nhau về vấn đề này.

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu theo TCVN 6507 (ISO 6887) (phần có liên quan), TCVN 6263 (ISO 8261) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần kiểm tra. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên liên quan cần thoả thuận với nhau về vấn đề này.

## 9 Cách tiến hành

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

Chuẩn bị phần mẫu thử, huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng đầu tiên) và các dung dịch pha loãng tiếp theo TCVN 6507 (ISO 6887) (phần có liên quan), TCVN 6263 (ISO 8261) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần kiểm tra.

### 9.2 Cấy và ủ ấm mẫu

**9.2.1** Chuẩn bị hai đĩa đối với sản phẩm dạng lỏng và/hoặc đối với mỗi độ pha loãng đã chọn. Dùng pipet vô trùng (6.4) cho vào tâm của mỗi đĩa 1 ml của mẫu thử nếu là sản phẩm lỏng hoặc của các dung dịch pha loãng thích hợp. Sử dụng một pipet vô trùng mới cho mỗi dung dịch pha loãng.

**9.2.2** Rót khoảng 15 ml môi trường VRBL (5.3) ở 44 °C đến 47 °C vào mỗi đĩa Petri. Thời gian tính từ khi kết thúc khâu chuẩn bị huyền phù ban đầu (hoặc dung dịch pha loãng 1/10 nếu là sản phẩm lỏng) đến thời điểm rót môi trường vào đĩa không vượt quá 15 phút.

Trộn đều dịch cấy với môi trường và để cho hỗn hợp đông đặc lại bằng cách đặt đĩa Petri ở một mặt phẳng ngang, mát.

Đồng thời chuẩn bị một đĩa kiểm tra với 15 ml môi trường để kiểm tra độ vô trùng.



## TCVN 6848:2007

9.2.3 Sau khi đông đặc hoàn toàn, rót khoảng 4 ml môi trường VRBL (5.3) ở 44 °C đến 47 °C lên bề mặt của môi trường cấy. Để cho đông lại như mô tả ở trên.

9.2.4 Lật ngược các đĩa đã cấy và để vào tủ ấm (6.2) ở 30 °C hoặc 37 °C (như thoả thuận) trong  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ .

### 9.3 Đếm các khuẩn lạc

Sau thời gian ủ quy định (xem 9.2.4), nếu có thể, chọn các đĩa Petri có từ 10 khuẩn lạc trở lên đến 150 khuẩn lạc. Dùng thiết bị đếm khuẩn lạc (6.6) để đếm các khuẩn lạc màu đỏ ánh tím có đường kính 0,5 mm hoặc lớn hơn (đôi khi có vùng mật tủa hơi đỏ bao quanh). Các khuẩn lạc này được coi là các coliform điển hình và không cần phải thử khẳng định tiếp.

Đối với các chi tiết về kỹ thuật đếm khuẩn lạc, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Cũng đếm và khẳng định các khuẩn lạc điển hình (ví dụ kích cỡ nhỏ hơn), và tất cả các khuẩn lạc có nguồn gốc từ các sản phẩm sữa và có chứa đường không phải là lactoza, ngay sau khi ủ theo 9.4. Việc chuyển hóa đường không phải là đường lactoza có thể làm cho khuẩn lạc có hình dạng nhìn tương tự như coliform điển hình.

CHÚ THÍCH Về bề ngoài của vùng mật tủa hơi đỏ bao quanh các khuẩn lạc phụ thuộc vào loại coliform và chất lượng của môi trường.

### 9.4 Khẳng định

Cấy năm khuẩn lạc của từng loại không điển hình, nếu sẵn có, cho vào các ống nghiệm canh thang mật lactoza lục sáng (5.4). Ủ các ống nghiệm này trong tủ ấm (6.2) đặt ở 30 °C hoặc 37 °C (theo thoả thuận) trong  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ . Các ống Durham cho thấy có sinh khí thì được coi là có chứa Coliform. Lấy kết quả đếm trong phép tính (điều 10).

## 10 Biểu thị kết quả

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

## 11 Độ chụm

Căn cứ vào sự phân bố Poission của các vi sinh vật trong các chất nền, mà các giới hạn tin cậy của phương pháp này biến đổi theo số đếm các khuẩn lạc  $\pm 16 \%$  đến  $\pm 52 \%$  (xem Tài liệu tham khảo [3]). Trên thực tế, sai lệch này thậm chí còn lớn hơn. Trong các nghiên cứu cộng tác khác nhau, độ lệch chuẩn của độ lặp lại ( $s_r$ ) là 0,20 log của các đơn vị, độ lệch chuẩn của độ tái lập ( $s_R$ ) là 0,35 log của các đơn vị (xem Tài liệu tham khảo [4] và [5]).

Chi tiết hơn về các giới hạn tin cậy, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

## 12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ ra:

- 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 và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- các kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu độ lặp lại được kiểm tra, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4882 (ISO 4831), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện và định lượng coliform – Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất.
  - [2] EDWARD, P.R. and EWING, W.H. Identification of Enterobacteriaceae 3<sup>rd</sup> edition, Burgess Publishing Company, Minneapolis, USA, 1972.
  - [3] COWELL and MORISETTI. *J.Sci. Food Agric.* **20**, 1969, pp. 573.
  - [4] PITON and GRAPPIN. *J. Assoc. Anal. Chem.* **74**, 1991, pp. 92-103.
  - [5] ALDRIDGE et al. *Report of the Ministry of Agriculture, Fish and Food, Norwich, NR47UQ*, 1993.
-