

Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về định lượng vi sinh vật – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C

*Microbiology – General guidance for the enumeration of micro-organisms –
Colony count technique at 30°C*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn chung để định lượng vi sinh vật có trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi bằng cách đếm khuẩn lạc phát triển trong môi trường đặc sau khi nuôi hiếu khí ở 30°C¹⁾.

2 Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 4881 : 1989 (ISO 6887: 1983), Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về cách pha chế các dung dịch pha loãng để kiểm nghiệm vi sinh vật.

TCVN 6404:1998 (ISO 7218: 1997), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

3 Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau:

Vi sinh vật (micro-organisms): là các vi khuẩn, nấm men và nấm mốc phát triển hiếu khí trong các điều kiện được xác định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Chuẩn bị hai đĩa rót, để rót môi trường nuôi cấy quy định và cấy vào đó một lượng mẫu thử xác định nếu sản phẩm ban đầu là chất lỏng, hoặc dùng một lượng huyền phù ban đầu xác định nếu các sản phẩm ở dạng khác.

¹⁾ Nhiệt độ 30°C thường được sử dụng nhiều nhất trong định lượng tổng các vi sinh vật và nhiệt độ này đã được ISO/TC 34 Tiểu ban kỹ thuật 9 chấp nhận. Tuy nhiên vì lý do nào đó mà một nhiệt độ khác được sử dụng, thì phải ghi vào trong báo cáo thử nghiệm.

TCVN 4884 : 2001

Chuẩn bị các cặp đĩa khác, trong cùng một điều kiện thử, cấy các dịch pha loãng thập phân từ mẫu thử hoặc từ huyền phù ban đầu.

4.2 Nuôi hiếu khí các đĩa ở 30°C trong 72 h.

4.3 Tính số lượng vi sinh vật trên mililit hoặc trên gam mẫu từ số khuẩn lạc phát triển trong các đĩa được chọn (xem 10.1).

5 Môi trường nuôi cấy và dịch pha loãng

5.1 Khái quát

Thực hành phòng thí nghiệm xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

5.2 Dịch pha loãng

Xem TCVN 4881:1989 (ISO 6887) và tiêu chuẩn cụ thể đối với sản phẩm cần kiểm tra.

5.3 Môi trường đếm đĩa

Thành phần

trypton	5,0 g
cao men khô	2,5 g
glucoza khan	1,0 g
thạch	12 g đến 18 g ²⁾
nước	1 000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi thanh trùng đạt 7,0 ở 25°C, nếu cần.

Phân phối môi trường vào các ống nghiệm (6.8), mỗi ống 15 ml hoặc bình hoặc chai (6.8) có dung tích không quá 500 ml với một lượng khoảng một nửa dung tích của bình chứa.

Thanh trùng trong nồi hấp áp lực ở 121°C trong 15 phút. Nếu môi trường được sử dụng ngay thì làm nguội trong nồi cách thuỷ (6.5) ở 45°C trước khi sử dụng.

Nếu không dùng ngay thì trước khi xét nghiệm vi sinh vật, để tránh sự chậm trễ khi rót môi trường vào đĩa cần làm tan chảy hoàn toàn môi trường trong nồi cách thuỷ đang sôi, sau đó làm nguội trong nồi cách thuỷ (6.5) ở nhiệt độ 45°C.

5.4 Môi trường thạch nước (nếu cần - xem 9.2.3)

Thành phần

thạch	12 g đến 18 g ²⁾
nước	1 000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan thạch trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi thanh trùng đạt 7,0 ở 25°C, nếu cần.

Phân phối môi trường vào các ống nghiệm (6.8), mỗi ống 4 ml, hoặc bình hoặc chai (6.8) với 100 ml môi trường cho mỗi bình hoặc chai (6.8).

Thanh trùng trong nồi hấp áp lực ở 121°C trong 15 phút. Nếu môi trường được sử dụng ngay thì làm nguội trong nồi cách thuỷ (6.5) ở 45°C trước khi sử dụng.

Nếu không dùng ngay thì trước khi xét nghiệm vi sinh vật, để tránh sự chậm trễ khi rót môi trường vào đĩa cần làm tan chảy hoàn toàn môi trường trong nồi cách thuỷ đang sôi, sau đó làm nguội trong nồi cách thuỷ (6.5) ở nhiệt độ 45°C.

6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Chú thích 1 – Có thể sử dụng thiết bị, dụng cụ sử dụng một lần thay cho việc sử dụng lại các dụng cụ thuỷ tinh nếu chúng đáp ứng được các yêu cầu qui định.

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm vi sinh vật và đặc biệt là

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

Xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở 30°C ± 1°C.

6.3 Đĩa Petri, bằng thuỷ tinh hoặc chất dẻo có đường kính 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 thể hoạt động ở 45°C ± 0,5°C.

6.6 Thiết bị đếm khuẩn lạc, bao gồm nền phát quang và thiết bị đếm cơ hoặc điện tử số.

6.7 pH met, chính xác đến ± 0,1 đơn vị pH ở 25°C.

²⁾ Tuỳ thuộc sức đông của thạch

6.8 Các ống nghiệm, có kích thước 20 mm x 200 mm, bình hoặc chai có dung tích 150 ml nhưng không lớn hơn 500 ml .

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu được tiến hành theo tiêu chuẩn thích hợp đối với sản phẩm có liên quan. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn cụ thể thích hợp đối với sản phẩm có liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên liên quan nên thoả thuận với nhau về phần này.

9 Cách tiến hành

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

Xem TCVN 4881:1989 (ISO 6887) và tiêu chuẩn cụ thể liên quan tới sản phẩm.

9.2 Cấy và nuôi ếm

9.2.1 Lấy hai đĩa Petri vô trùng (6.3) dùng pipet vô trùng (6.4) cho vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử nếu sản phẩm là chất lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Lấy hai đĩa Petri vô trùng khác. Dùng pipet vô trùng cho vào mỗi đĩa 1 ml dịch pha loãng thập phân thứ nhất (10^{-1}) của mẫu thử nếu sản phẩm là chất lỏng hoặc 1 ml dịch pha loãng thập phân thứ nhất (10^{-2}) của huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Lặp lại trình tự này với các dịch pha loãng tiếp theo và dùng pipet mới vô trùng đối với mỗi dịch pha loãng thập phân.

9.2.2 Rót khoảng 15 ml môi trường đếm đĩa (5.3) ở $45^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ vào mỗi đĩa Petri. Thời gian từ khi chuẩn bị xong huyền phù ban đầu (hoặc dịch pha loãng 10^{-1} nếu sản phẩm là chất lỏng) đến khi rót môi trường (5.3) vào các đĩa không được vượt quá 15 phút.

Trộn cẩn thận mẫu cấy với môi trường và để cho hỗn hợp đông đặc lại bằng cách đặt các đĩa Petri trên mặt bàn ở chỗ mát.

9.2.3 Sau khi các đĩa đã đông đặc hoàn toàn, và chỉ khi nghi ngờ sản phẩm được xét nghiệm có chứa các vi sinh vật mà khuẩn lạc của chúng có thể mọc lan trên bề mặt của môi trường, rót khoảng 4 ml môi trường thạch nước (5.4) ở $45^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ lên bề mặt môi trường đã cấy mẫu. Để cho đông đặc như mô tả ở trên.

Thao tác này nếu có tiến hành thì phải ghi lại trong báo cáo thử nghiệm.

9.2.4 Lật ngược các đĩa đã cấy mẫu và đưa vào nuôi ở tủ ấm ở 30°C trong $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

9.3 Đếm khuẩn lạc

Sau thời gian ủ ấm theo quy định (xem 9.2.4), dùng thiết bị đếm khuẩn lạc (6.6) tiến hành đếm các khuẩn lạc trong mỗi đĩa chứa không quá 300 khuẩn lạc.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Phương pháp tính

10.1.1 Trường hợp chung – Các đĩa chứa từ 15 đến 300 khuẩn lạc

Giữ lại các đĩa có chứa không quá 300 khuẩn lạc ở hai độ pha loãng kế tiếp nhau và điều cần thiết là một trong các đĩa này có chứa ít nhất 15 khuẩn lạc.

Tính số vi khuẩn N trên mililit hoặc trên gam sản phẩm, tùy thuộc vào từng trường hợp và áp dụng công thức sau:

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

trong đó

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại.

n_1 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất

n_2 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai.

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa.

Biểu thị kết quả số vi sinh vật trên mililit hoặc trên gam sản phẩm bằng cách lấy một số từ 1,0 đến $9,9 \times 10^x$, trong đó x là số mũ của 10.

Thí dụ:

Số vi sinh vật đếm được ở 30°C cho kết quả sau:

- ở dịch pha loãng thứ nhất được giữ lại (10^{-2}): 168 và 215 khuẩn lạc
- ở dịch pha loãng thứ hai được giữ lại (10^{-3}): 14 và 25 khuẩn lạc

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 1918$$

Làm tròn kết quả theo quy định ở trên sẽ cho kết quả là 19 000 hoặc $1,9 \times 10^4$ vi sinh vật trên mililit hoặc trên gam sản phẩm.

10.1.2 Ước đoán số lượng nhỏ

Nếu hai đĩa ứng với mẫu thử (sản phẩm lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (các sản phẩm ở dạng khác) có chứa ít hơn 15 khuẩn lạc thì tính trung bình số học m của số khuẩn lạc đếm được trên cả hai đĩa.

Báo cáo kết quả như sau:

- Số vi sinh vật được ước đoán trong một mililit:

$$N_E = m \text{ (sản phẩm lỏng)}$$

- Số vi sinh vật được ước đoán trong một gam:

$$N_E = m \times d^{-1} \text{ (các sản phẩm ở dạng khác), trong đó } d \text{ là yếu tố pha loãng của huyền phù ban đầu.}$$

10.1.3 Trường hợp không có khuẩn lạc nào mọc

Nếu hai đĩa ứng với mẫu thử (sản phẩm lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (các sản phẩm ở dạng khác) không có các khuẩn lạc nào thì báo cáo kết quả như sau:

- nhỏ hơn 1 vi sinh vật trong một mililit (sản phẩm lỏng)
- nhỏ hơn $1 \times d^{-1}$ vi sinh vật trong một gam (các sản phẩm ở dạng khác), trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

10.2 Độ chụm

10.2.1 Các đĩa chứa từ 15 đến 300 khuẩn lạc (xem 10.1.1)

Xét thuần túy về mặt thống kê, 95% trường hợp giới hạn tin cậy của phương pháp dao động từ $\pm 12\%$ đến $\pm 37\%$ (Cowel và Morisetti, tạp chí nông nghiệp thực phẩm, tập 20 trang 573). Trên thực tế sai lệch này thậm chí còn lớn hơn, đặc biệt là khi kết quả thu được từ những người phân tích khác nhau.

10.2.2 Ước đoán số lượng nhỏ (xem 10.1.2)

Giới hạn tin cậy đối với việc ước đoán số lượng nhỏ vi sinh vật cho ở bảng A.1.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm cần chỉ rõ phương pháp đã sử dụng và kết quả thu được. Báo cáo thử nghiệm cũng cần đề cập đến bất kỳ thao tác nào mà không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như các sự cố có thể ảnh hưởng đến kết quả thử.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

Phụ lục A

(Quy định)

Giới hạn tin cậy để ước đoán số lượng nhỏ khuẩn lạc

Giới hạn tin cậy ở mức 95% đối với việc ước đoán số lượng nhỏ khi số khuẩn lạc ở trên các đĩa được giữ lại ít hơn 15 khuẩn lạc cho ở bảng A.1.

Bảng A.1

Số vi sinh vật	Giới hạn tin cậy ở 95%	
	thấp hơn	cao hơn
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23