

Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về định lượng coliform – Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất

*Microbiology – General guidance for the enumeration of coliforms –
Most probable number technique*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn chung để định lượng coliform có trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi bằng cách tính số có xác suất lớn nhất (MPN) sau khi nuôi ở 30°C, 35°C hoặc 37°C trong môi trường lỏng, nhiệt độ này cần được thoả thuận giữa các bên có liên quan.

Chú thích 1 – Nhiệt độ ủ ấm 30°C được sử dụng với mục đích định lượng coliform trong công nghệ sản xuất; nhiệt độ 35°C hoặc 37°C được sử dụng nhiều trong lĩnh vực sức khoẻ cộng đồng.

Điểm hạn chế khi áp dụng của tiêu chuẩn này là ở chỗ kết quả có độ dao động lớn. Do đó phương pháp này chỉ nên sử dụng và giải thích kết quả theo thông tin nêu trong điều 10.4.

2 Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 4829 : 2001 (ISO 6579 : 1993), Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về phương pháp phát hiện Salmonella.

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:

Coliform (Coliforms): Vi khuẩn ở nhiệt độ qui định (tức là 30°C, 35°C, 37°C theo thoả thuận) lên men lactoza và sinh khí trong các điều kiện thử theo qui định của tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Cấy vào bộ ba ống nghiệm chứa môi trường tăng sinh chọn lọc lỏng nồng độ kép [xem 5.3 a)] một lượng mẫu thử xác định nếu sản phẩm ban đầu là chất lỏng hoặc với một lượng huyền phù ban đầu xác định nếu các sản phẩm ở dạng khác.

4.2 Cấy vào bộ ba ống nghiệm chứa môi trường tăng sinh chọn lọc lỏng nồng độ đơn [xem 5.3 b)] với một lượng mẫu thử xác định nếu sản phẩm ban đầu là chất lỏng, hoặc với lượng huyền phù ban đầu xác định nếu các sản phẩm ở dạng khác.

Sau đó, trong cùng điều kiện, cấy các ống tiếp theo chứa môi trường [5.3 b)] với các dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu.

4.3 Ủ ấm ở 30°C, 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) các ống chứa môi trường nồng độ kép [5.3 a)] trong 24 h và các ống chứa môi trường nồng độ đơn [5.3 b)] trong 24 h hoặc 48 h và sau đó kiểm tra các ống này.

4.4 Cấy vào một loạt các ống chứa môi trường thử khẳng định (5.4) bằng các chất cấy từ các ống chứa môi trường 5.3 a) và bằng các chất cấy trong loạt ống thứ nhất chứa môi trường 5.3 b) có màu đục hoặc có sinh khí .

4.5 Ủ ấm ở 30°C, 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong 24 h hoặc 48 h, và sau đó kiểm tra các loạt ống mới này (4.4).

4.6 Tính số có xác suất lớn nhất của coliform có trong 1 mililit hoặc trong 1 gam mẫu (tức là số MPN) từ số ống có sinh khí trong loạt ống thử mới (4.5). Dùng bảng để xác định số có xác suất lớn nhất.

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 liên quan đến sản phẩm cần kiểm nghiệm.

5.3 Canh thang tryptoza lauryl sulfat (môi trường tăng sinh chọn lọc)

Thành phần

	a)	b)
	Môi trường nồng độ kép	Môi trường nồng độ đơn
Tryptoza	40 g	20 g
Lactoza	10 g	5 g
Dikali hidro phosphat (K_2HPO_4)	5,5 g	2,75 g
Kali dihidro phosphat (KH_2PO_4)	5,5 g	2,75 g
Natri clorua	10 g	5 g
Natri lauryl sunfat	0,2 g	0,1 g
Nước	1 000 ml	1 000 ml

Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi thanh trùng bằng 6,8 ở 25°C, nếu cần.

Phân phối từng lượng môi trường 10 ml vào các ống có kích thước 16 mm x 160 mm (6.4) chứa ống Durham (6.5) đối với môi trường nồng độ đơn, và vào các ống nghiệm có kích thước 20 mm x 200 mm (6.4) [không chứa các ống Durham (6.5)] đối với môi trường nồng độ kép.

Thanh trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

Các ống Durham không được chứa bọt khí sau khi thanh trùng

5.4 Canh thang mật lactoza lục sáng (lactose bile brilliant green broth) (môi trường thử kháng định)

Thành phần

Pepton	10 g
Lactoza	10 g
Mật bò khô	20 g
Lục sáng ¹⁾	0,0133 g
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.

Chỉnh pH sao cho sau khi thanh trùng bằng 7,2 ở 25°C, nếu cần.

¹⁾ Phù hợp với các yêu cầu nêu trong TCVN 4829 : 2001 (ISO 6579 : 1993), phụ lục C.

TCVN 4882 : 2001

Phân phối từng lượng môi trường 10 ml vào các ống có kích thước 16 mm x 160 mm (6.4) có ống Durham (6.5).

Thanh trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

Các ống Durham không được chứa bọt khí sau khi thanh trùng.

Chú thích 2 – Do môi trường hoàn chỉnh khô, có thể không phải lúc nào cũng cho kết quả mong muốn, vì vậy cần phải kiểm tra trước khi sử dụng.

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Chú thích 3 – Có thể dùng thiết bị, dụng cụ sử dụng một lần thay cho việc sử dụng lại các dụng cụ thủy tinh nếu chúng phù hợp các yêu cầu qui định.

Sử dụng thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm phân tích 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, 35°C ± 1°C hoặc 37°C ± 1°C.

6.3 Vòng que cấy, bằng platin/iridi hoặc niken/crom có đường kính khoảng 3 mm hoặc vòng que cấy sử dụng một lần.

6.4 Các ống nghiệm, có kích thước khoảng 16 mm x 160 mm và 20 mm x 200 mm, hoặc các chai có dung tích thích hợp

6.5 Ống Durham, phù hợp để dùng với các ống nghiệm có kích thước 16 mm x 160 mm (6.4).

6.6 Pipet xả hết, có dung tích danh định 1 ml và 10 ml

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

7 Lấy mẫu

Tiến hành lấy mẫu theo tiêu chuẩn cụ thể thích hợp đối với sản phẩm liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên có 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 vấn đề này.

9 Cách tiến hành (xem sơ đồ trong phụ lục A)

Khi một số mẫu được lấy từ cùng một lô hàng để xét nghiệm, thì tiến hành thử nghiệm đối với từng mẫu.

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

Xem TCVN 4881:1989 (ISO 6887) và tiêu chuẩn cụ thể thích hợp đối với sản phẩm.

Chuẩn bị một số độ pha loãng đủ để đảm bảo rằng các ống tương ứng với độ pha loãng cuối cùng sẽ cho kết quả âm tính.

9.2 Cấy²⁾ và ủ ấm

9.2.1 Lấy ba ống môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ kép [5.3.a)]. Dùng pipet vô trùng (6.6) chuyển 10 ml mẫu thử nếu là chất lỏng hoặc 10 ml huyền phù ban đầu, nếu các sản phẩm ở dạng khác vào từng ống trên.

9.2.2 Sau đó, lấy ba ống môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ đơn [5.3.1b)]. Dùng pipet mới vô trùng (6.6) chuyển 1 ml mẫu thử nếu là chất lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu các sản phẩm ở dạng khác vào từng ống trên.

9.2.3 Đối với mỗi dịch pha loãng tiếp theo (từ 10^{-1} hoặc 10^{-2} tương ứng với mẫu thử) cùng tiến hành theo 9.2.2. Dùng một pipet mới vô trùng cho mỗi một dịch pha loãng. Trộn cẩn thận mẫu cấy và môi trường.

9.2.4 Để các ống môi trường nồng độ kép (9.2.1) trong tủ ấm (6.2) ở nhiệt độ ở 30°C, 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$

9.2.5 Để các ống môi trường nồng độ đơn (9.2.2 và 9.2.3) trong tủ ấm (6.2) ở 30°C, 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, nếu không thấy sinh khí hoặc không bị đục thì để thêm trong tủ ấm đến $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ và quan sát tiếp các hiện tượng trên (sinh khí hoặc đục).

9.3 Phép thử khẳng định

9.3.1 Dùng vòng que cấy (6.3) cấy chất nuôi cấy vào các ống môi trường thử khẳng định (5.4) vào các ống đã được ủ ấm ở 9.2.4. Đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ ở 30°C, 35°C hoặc 37°C (theo thoả thuận) trong $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ hoặc nếu không sinh khí ở giai đoạn này thì nuôi ấm đến $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

9.3.2 Tiến hành theo cùng một trình tự đối với các ống đã được ủ ấm từ 9.2.5 có biểu hiện sinh khí hoặc bị đục, khi quan sát lần thứ nhất (tức là sau $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ hoặc sau $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$).

²⁾ Giả sử rằng đối với mỗi dây pha loãng sử dụng tổ hợp ba ống nghiệm. Đối với một số sản phẩm cần đến kết quả có độ chính xác cao hơn thì cần phải cấy các dây pha loãng mỗi dây gồm 5 ống (xem bảng B.2)

9.4 Diễn giải kết quả

Với mỗi độ pha loãng, tính tổng số ống sinh khí quan sát được ở 9.3 (tức là các ống dương tính) sau $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ và $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ (nếu có).

10 Biểu thị kết quả

10.1 Lựa chọn các độ pha loãng³⁾

Mỗi mẫu xét nghiệm chọn ba độ pha loãng liên tiếp ứng với một trong ba trường hợp sau sao cho thích hợp:

10.1.1 Trường hợp 1 – Có ít nhất một độ pha loãng cho ba ống dương tính

Chọn độ pha loãng cao nhất (tức là dịch pha loãng có nồng độ mẫu nhỏ nhất) cho ba ống dương tính, cùng với hai độ pha loãng cao hơn kế tiếp (tức là độ pha loãng này có nồng độ mẫu là 1/10 và 1/100 của độ pha loãng thứ nhất đã được chọn) (xem bảng 1, thí dụ 1).

Xem 10.1.3.

Nếu các dịch pha loãng tiếp theo ngoài dịch pha loãng cao nhất cũng cho ba ống dương tính thì chọn tiếp ba độ pha loãng cao nhất trong cả dãy (tức là những độ pha loãng có nồng độ mẫu nhỏ nhất) (xem bảng 1, thí dụ 2).

10.1.2 Trường hợp 2 – Không có độ pha loãng nào cho ba ống dương tính

Trường hợp 1 không thể áp dụng. Chọn ba độ pha loãng cao nhất trong dãy pha loãng (tức là những độ pha loãng có nồng độ mẫu nhỏ nhất), trong số đó ít nhất thu được một kết quả dương tính (xem bảng 1, thí dụ 3).

Xem 10.1.3.

10.1.3 Các trường hợp đặc biệt

Trong tất cả các trường hợp khi có nhiều hơn một trong ba độ pha loãng được chọn theo 10.1.1 và 10.1.2 không cho ống dương tính, thì hãy chọn từ các độ pha loãng này độ pha loãng thấp nhất không cho các ống dương tính (tức là độ pha loãng có nồng độ mẫu cao nhất) và hai độ pha loãng thấp hơn kế tiếp trong dãy pha loãng (tức là có nồng độ mẫu gấp 10 lần và 100 lần độ pha loãng thứ nhất đã chọn), (xem bảng 1, thí dụ 4 & 5), trừ khi các ống dương tính chỉ tìm thấy ở mức pha loãng đầu tiên được chuẩn bị từ mẫu thử trong trường hợp cuối cùng này cần chọn ra ba độ pha loãng đầu tiên để tính MPN thậm chí loạt ống này bao gồm hai độ pha loãng không cho các ống dương tính nào.

Xem thí dụ trong bảng 1.

³⁾ Trong trường hợp này, huyền phù ban đầu, và nếu cần, mẫu thử được coi là dịch pha loãng.

10.2 Xác định chỉ số MPN

10.2.1 Dựa trên số mẫu được xét nghiệm trên mỗi lô, dùng bảng B.1 hoặc B.2 kiểm tra xem tần suất ống dương tính tương ứng với độ pha loãng được chọn phù hợp với 10.1 có thể chấp nhận về mặt thống kê hay không. Khả năng chấp nhận phụ thuộc cả vào số mẫu được xét nghiệm và việc quyết định chấp nhận có hoặc không chấp nhận các kết quả ở cấp hạng 2.

Thí dụ: Nếu chỉ chấp nhận kết quả cấp hạng 1, tần suất 221 chỉ có thể được chấp nhận khi 10 mẫu (từ lô hàng liên quan) được xét nghiệm. Tuy nhiên, nếu kết quả cấp hạng 2 nhỏ hơn cũng có thể được chấp nhận, thì tần suất 221 cũng có thể chấp nhận khi chỉ có 2, 3 hoặc 5 mẫu được xét nghiệm. Tuy nhiên, khi dãy số 221 là kết quả của xét nghiệm đơn lẻ thì không được chấp nhận.

10.2.2 Đối với mỗi dãy số tìm thấy có thể chấp nhận theo 10.2.1, sẽ thu được chỉ số MPN từ bảng B.1 hoặc B.2.

Bảng 1 – Thí dụ lựa chọn các kết quả dương tính đối với việc tính toán MPN

Mẫu	Số ống dương tính nhận được từ 3 ống được ủ ấm đối với số mẫu được nuôi cấy trên ống ¹⁾						MPN ²⁾	
	Sản phẩm lỏng Các sản phẩm ở dạng khác	10 ml 1 g	1 ml 10 ⁻¹ g	10 ⁻¹ ml 10 ⁻² g	10 ⁻² ml 10 ⁻³ g	10 ⁻³ ml 10 ⁻⁴ g	Sản phẩm lỏng ml ⁻¹	Các sản phẩm ở dạng khác g ⁻¹
1		3	3	2	1	0	1,5 x 10 ¹	1,5 x 10 ²
2		3	3	3	0		2,4 x 10 ¹	2,4 x 10 ²
3		2	2	1	1	0	7,4	7,4 x 10 ¹
4		3	3	0	0	0	2,4	2,4 x 10 ¹
5		2	2	0	1	0	2,1 x 10 ⁻¹	2,1

1) —————, tổ hợp được chọn.
2) Được tính toán từ cách sử dụng chỉ số MPN cho 3 ống (bảng B.1).

10.3 Tính số có xác suất lớn nhất (MPN)

Số coliform trên mililit hoặc trên gam của sản phẩm được tính bằng cách nhân chỉ số MPN (xem 10.2) với số đảo của độ pha loãng thấp nhất được chọn (tức là dịch pha loãng có nồng độ mẫu cao nhất).

Khi độ pha loãng thấp nhất được chọn tương ứng với các ống được chuẩn bị với môi trường nồng độ kép (tức là cấy với 10 ml), thì trước hết hãy chia số chỉ số MPN cho 10.

Biểu thị kết quả theo một con số từ 1,0 đến 9,9 nhân với 10^x, trong đó x là số mũ của 10.

10.4 Độ chụm

Có thể cho kết quả với dao động lớn với kỹ thuật MPN. Do đó kết quả nhận được theo phương pháp này cần phải sử dụng hết sức thận trọng.

TCVN 4882 : 2001

Giới hạn tin cậy cho ở bảng B.1 và bảng B.2

Thí dụ: Đối với mẫu đặc trong 95% trường hợp giới hạn tin cậy dao động từ 13 đến 200 coliform trong 1 g đối với MPN bằng $7,4 \times 10^1$ coliform trong 1 g, và từ 4 đến 99 coliform trong 1 g đối với MPN bằng $2,4 \times 10^1$ coliform trong 1 g.

11 Báo cáo thử nghiệm

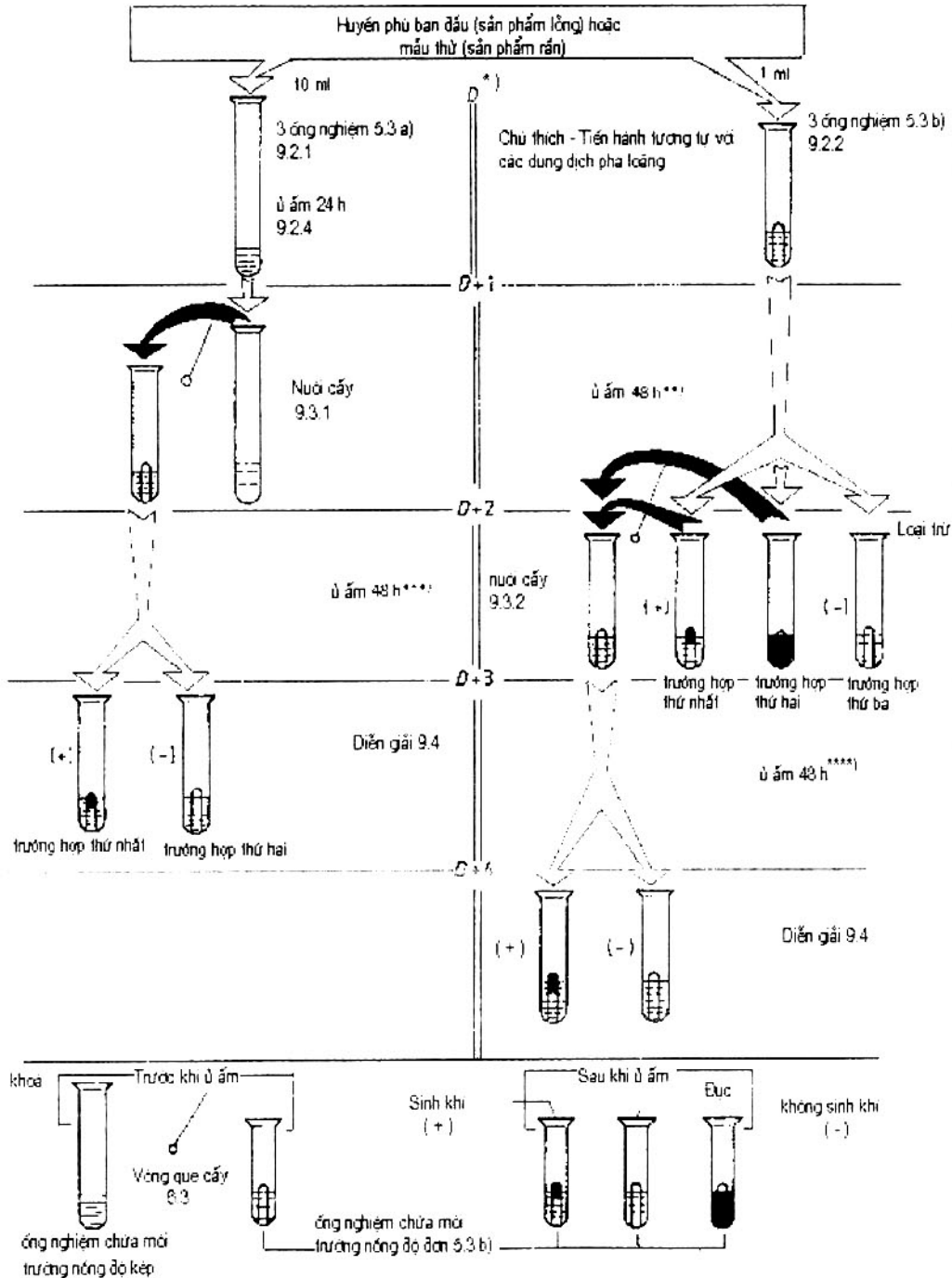
Báo cáo thử nghiệm cần qui định rõ phương pháp đã sử dụng, mục đích của phép thử (phục vụ công nghệ hay bảo vệ sức khỏe), nhiệt độ ủ ấm và kết quả thử thu được. Báo cáo thử nghiệm cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như các sự cố ảnh hưởng đến các kết quả thử.

Báo cáo thử nghiệm bao gồm tất cả các thông tin cần thiết để nhận biết mẫu một cách đầy đủ.

Phụ lục A

(Quy định)

Sơ đồ qui trình (xem điều 9)



^{*)} D = ngày
^{**)} hoặc có thể 24 h (xem 9.2.5)
^{***)} hoặc có thể 24 h (xem 9.3.1)
^{****)} hoặc có thể 24 h (xem 9.3.2)

Phụ lục B

(Qui định)

Bảng MPN⁴⁾

Bảng B.1 – Bảng MPN đối với 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) và 3 x 0,01 g (ml)

Số kết quả dương tính			Chỉ số MPN	Cấp hạng ¹⁾ khi số mẫu (lô) được thử					Giới hạn tin cậy			
				1	2	3	5	10	≥ 95%	≥ 95%	≥ 99%	≥ 99%
0	0	0	<0,30						0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	1	0,30	3	2	2	2	1	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	1	1	1	1	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	3	3	3	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	2	2	2	1	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0	0	0	3	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	1	1	1	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	2	1	1	1	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0	0	3	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	1	1	1	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	3	2	2	2	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	2	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	1	1	1	1	0,15	3,50	0,7	4,60
2	0	1	1,4	2	1	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2,0	0	3	3	3	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	1	1	1	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	2	1	1	1	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	1	1	1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0	0	0	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	1	1	1	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	1	1	1	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	3	2	2	2	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	1	1	1	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1	1	1	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3	1	3	16	0	0	0	3	3	3	38	2	52

⁴⁾ See de Man, J.C. MPN tables corrected Eur.J. Appl. Biotechnol, 1983. Vol 17, pp 301-305.

Bảng B.1 (Tiếp theo)

3	2	0	9.3	1	1	1	1	1	1.8	36.0	1.2	43.0
3	2	1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3	2	3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3	3	0	24	1	1	1	1	1	4	99	3	152
3	3	1	46	1	1	1	1	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3	3	3	>110									

1) Xem bảng B.3 để hiểu cấp hạng.

Bảng B.2 – Bảng MPN đối với 5 x 1 g (ml), 5 x 0,1 g (ml) và 5 x 0,01 g (ml)

Số kết quả dương tính			Chỉ số MPN	Cấp hạng ¹⁾ với số mẫu (của lô) được thử					Giới hạn tin cậy			
				1	2	3	5	10	> 95%	> 95%	> 99%	> 99%
0	0	0	<0,18						0,00	0,65	0,00	0,93
0	0	1	0,18	2	2	2	1	1	0,00	0,65	0,00	0,93
0	1	0	0,18	2	2	2	1	1	0,01	0,65	0,00	0,93
0	1	1	0,36	3	3	3	2	2	0,07	0,99	0,02	1,40
0	2	0	0,37	3	2	2	2	1	0,07	0,99	0,02	1,40
0	2	1	0,55	0	0	0	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
0	3	0	0,56	0	3	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1	0	0	0,20	1	1	1	1	1	0,02	0,99	0,01	1,40
1	0	1	0,40	2	1	1	1	1	0,07	1,00	0,02	1,40
1	0	2	0,60	0	0	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1	1	0	0,40	1	1	1	1	1	0,07	1,10	0,03	1,40
1	1	1	0,61	3	2	2	2	1	0,17	1,40	0,09	2,10
1	1	2	0,81	0	0	0	0	3	0,33	2,20	0,20	2,80
1	2	0	0,61	2	1	1	1	1	0,18	1,40	0,09	2,10
1	2	1	0,82	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1	3	0	0,83	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1	3	1	1,0	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
1	4	0	1,1	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
2	0	0	0,45	1	1	1	1	1	0,08	1,4	0,04	2,10
2	0	1	0,68	2	1	1	1	1	0,18	1,50	0,09	2,10
2	0	2	0,91	0	3	3	3	3	0,33	2,20	0,20	2,80
2	1	0	0,68	1	1	1	1	1	0,19	1,70	0,10	2,30
2	1	1	0,92	2	2	1	1	1	0,33	2,20	0,20	2,80
2	1	2	1,2	0	0	3	3	3	0,4	2,5	0,2	3,4
2	2	0	0,93	1	1	1	1	1	0,34	2,20	0,20	2,80
2	2	1	1,2	3	3	2	2	2	0,4	2,5	0,2	3,4
2	2	2	1,4	0	0	0	0	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2	3	0	1,2	3	2	2	2	1	0,4	2,5	0,2	3,4
2	3	1	1,4	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2	4	0	1,5	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
3	0	0	0,78	1	1	1	1	1	0,21	2,20	0,12	2,80
3	0	1	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,2	0,2	2,9
3	0	2	1,3	3	3	3	2	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3	1	0	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,5	0,2	3,4
3	1	1	1,4	2	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3	1	2	1,7	3	3	3	3	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3	2	0	1,4	1	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3	2	1	1,7	2	2	2	1	1	0,7	3,9	0,5	5,1
3	2	2	2,0	0	3	3	3	3	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	0	1,7	2	2	1	1	1	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	1	2,1	3	3	3	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	2	2,4	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3	4	0	2,1	3	3	2	2	2	0,7	4,0	0,5	5,2
3	4	1	2,4	0	3	3	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3	5	0	2,5	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	0	0	1,3	1	1	1	1	1	0,4	3,4	0,3	4,4
4	0	1	1,7	1	1	1	1	1	0,5	3,4	0,4	4,4
4	0	2	2,1	3	2	2	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
4	0	3	2,5	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	1	0	1,7	1	1	1	1	1	0,6	3,9	0,4	5,1
4	1	1	2,1	1	1	1	1	1	0,7	4,1	0,5	5,3
4	1	2	2,6	3	3	2	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4	1	3	3,1	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	0	2,2	1	1	1	1	1	0,7	4,8	0,5	6,1

Bảng B.2 (Tiếp theo)

4	2	1	2,6	2	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	2	3,2	3	3	3	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	3	3,8	0	0	0	0	3	1,3	10,0	0,9	14,7
4	3	0	2,7	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	3	1	3,3	2	2	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	3	2	3,9	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4	4	0	3,4	2	2	1	1	1	1,3	10,0	0,9	14,7
4	4	1	4,0	3	3	2	2	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4	4	2	4,7	0	0	0	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
4	5	0	4,1	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4	5	1	4,8	0	0	3	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
5	0	0	2,3	1	1	1	1	1	0,7	6,6	0,5	9,4
5	0	1	3,1	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
5	0	2	4,3	3	2	2	2	1	0,3	10,0	0,9	14,7
5	0	3	5,8	0	0	0	3	3	2,1	14,9	1,4	20,0
5	1	0	3,3	1	1	1	1	1	1,0	10,0	0,7	14,7
5	1	1	4,6	1	1	1	1	1	1,4	11,3	0,9	14,7
5	1	2	6,3	2	2	1	1	1	2,1	14,9	1,4	20,0
5	1	3	8,4	3	3	3	3	2	3,4	11,0	2,1	27,0
5	2	0	4,9	1	1	1	1	1	1,5	14,9	0,9	20,0
5	2	1	7,0	1	1	1	1	1	2,2	16,8	1,4	23,0
5	2	2	9,4	2	2	1	1	1	3,4	22,0	2,1	28,0
5	2	3	12	3	3	2	2	2	3	24	2	32
5	2	4	15	0	0	0	0	3	6	35	4	45
5	3	0	7,9	1	1	1	1	1	2,3	22,0	1,5	27,0
5	3	1	11	1	1	1	1	1	3	24	2	32
5	3	2	14	1	1	1	1	1	5	35	3	45
5	3	3	17	3	2	2	2	1	7	39	4	51
5	3	4	21	3	3	3	3	2	7	39	4	51
5	4	0	13	1	1	1	1	1	3	35	3	45
5	4	1	17	1	1	1	1	1	6	39	4	51
5	4	2	22	1	1	1	1	1	7	44	4	57
5	4	3	28	2	1	1	1	1	10	70	6	92
5	4	4	35	2	2	2	1	1	10	70	6	92
5	4	5	43	0	0	3	3	3	15	106	9	150
5	5	0	24	1	1	1	1	1	7	70	4	92
5	5	1	35	1	1	1	1	1	10	106	6	150
5	5	2	54	1	1	1	1	1	15	166	10	223
5	5	3	92	1	1	1	1	1	23	253	15	338
5	5	4	160	1	1	1	1	1	40	460	20	620
5	5	5	>160									

1) Xem bảng B.3 để hiểu cấp hạng.

Bảng B.3 – Giải thích các cấp hạng về kết quả

Trước khi bắt đầu thử nghiệm cần quyết định xem sẽ chấp nhận cấp hạng nào, nghĩa là chỉ cấp hạng 1, 1 và 2 hoặc thậm chí 1, 2 và 3. Việc quyết định dựa trên các kết quả là hết sức quan trọng, chỉ chấp nhận kết quả của cấp hạng 1 hoặc tối đa kết quả của cấp hạng 1 và cấp hạng 2. Kết quả của cấp hạng 0 cần được xem xét hết sức cẩn thận.

Cấp hạng	Định nghĩa
1	Khi số lượng vi sinh vật trong mẫu bằng số MPN tìm được, thì kết quả nằm trong số có khả năng thu được cao nhất. Hầu như chỉ có 5% khả năng nhận được kết quả nhỏ hơn giá trị nhỏ nhất ở cấp hạng này.
2	Khi số lượng vi sinh vật trong mẫu bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số có khả năng thu được ít hơn cả giá trị nhỏ nhất trong cấp hạng 1, nhưng tối đa chỉ có 1% khả năng thu được một kết quả có thể thấp hơn kết quả nhỏ nhất ở cấp hạng này.
3	Khi số lượng vi sinh vật trong mẫu bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số có khả năng thu được ít hơn cả giá trị nhỏ nhất trong cấp hạng 2, nhưng tối đa chỉ có 0,1% khả năng thu được kết quả có thể thấp hơn giá trị nhỏ nhất ở cấp hạng này.
0	Khi số lượng vi sinh vật trong mẫu bằng số MPN tìm được, thì kết quả là một trong số có khả năng thu được ít hơn cả giá trị nhỏ nhất trong cấp hạng 3, chỉ có 0,1% khả năng thu được một kết quả ở cấp hạng này, nếu như không có một sai sót nào.

Cảnh báo – Giới hạn tin cậy cho trong bảng B.1 và bảng B.2 chỉ là giá trị trung bình nhằm cung cấp một số ý tưởng về ảnh hưởng của sai lệch thống kê đối với các kết quả. Ngoài ra, còn có những nguồn sai lệch khác mà đôi khi còn quan trọng hơn.