

**TCVN 6262-1 : 1997**  
**ISO 5541-1 : 1986 (E)**

**SỮA VÀ CÁC SẢN PHẨM SỮA –**  
**ĐỊNH LƯỢNG COLIFORM**  
**PHẦN 1: KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 30°C**

*Milk and milk products – Enumeration of Coliforms*  
*Part 1 : Colony count technique at 30°C*

## Lời nói đầu

TCVN 6262-1 : 1997 hoàn toàn tương đương với ISO 5541-1 : 1986 (E)

TCVN 6262-1 : 1997 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

# Sữa và các sản phẩm sữa – Định lượng Coliform

## Phần 1 – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C

*Milk and milk products – Enumeration of Coliforms*

*Part 1 - Colony count technique at 30°C*

### 1 Phạm vi và lĩnh vực áp dụng

Phần này của tiêu chuẩn qui định phương pháp định lượng Coliform bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng;
- sữa bột, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat có đường, bột bơ lỏng và lactoza;
- casein axit, casein lactic và casein rennet;
- caseinat, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat axit;
- phomat và phomat chế biến;
- bơ;
- sản phẩm sữa đông lạnh (bao gồm cả kem lạnh thực phẩm);
- custard, món tráng miệng và váng kem.

Phương pháp này thích hợp đối với các mẫu dự tính có số lượng Coliform lớn (trên 100 Coliform trong một gam, hoặc 10 Coliform trong một mililit).

Chú thích – Đối với các mẫu có số lượng Coliform nhỏ hơn (ít hơn 100 Coliform trong một gam hoặc 10 Coliform trong một mililit) xem TCVN 6262-2 : 1997 (ISO 5541-2).

### 2 Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 707 Sữa và các sản phẩm sữa – Các phương pháp lấy mẫu.

## TCVN 6262-1 : 1997

ISO 4832 Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về đếm Coliform – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C.

TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261) Sữa và các sản phẩm sữa – Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh.

### 3 Định nghĩa

Áp dụng định nghĩa sau đây cho phần này của tiêu chuẩn:

Coliform: Là các vi khuẩn ở nhiệt độ 30°C tạo thành các khuẩn lạc đặc trung và có thể lên men lactoza kèm theo sự sinh hơi trong các điều kiện thao tác đã mô tả.

### 4 Nguyên tắc

4.1 Trộn một phần mẫu thử xác định, hoặc một loạt dung dịch mẫu pha loãng theo hệ thập phân với môi trường nuôi cấy trong đĩa Petri và phủ bằng một lớp môi trường đó lên bề mặt.

4.2 Nuôi ấm ở 30°C trong 24 giờ.

4.3 Đếm các khuẩn lạc đặc trung, và nếu thấy cần thiết, khẳng định khuẩn lạc bằng tính lên men lactoza, cho thấy sinh hơi.

4.4 Tính số Coliform có trong một mililit hoặc có trong một gam mẫu nguyên chất.

### 5 Chất pha loãng và môi trường

#### 5.1 Nguyên liệu chính

Để làm tăng độ tái lập của kết quả, nên sử dụng các thành phần chính khô, hoặc các môi trường hoàn chỉnh khô để chuẩn bị các chất pha loãng và các môi trường nuôi cấy. Cần tuân thủ nghiêm ngặt các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các hoá phẩm sử dụng phải đạt chất lượng phân tích.

Nước sử dụng phải là nước được cất bằng dụng cụ thủy tinh hoặc sử dụng nước đã khử ion. Nước này không được chứa các chất có thể ức chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật trong các điều kiện thử đã nêu. Điều này phải được kiểm tra định kỳ, đặc biệt khi sử dụng nước khử ion.

Dùng các dung dịch natri hidroxit và axit clohidric (nồng độ  $\approx 0,1$  mol/l) để điều chỉnh pH của chất pha loãng và môi trường nuôi cấy.

#### 5.2 Chất pha loãng dùng cho mục đích chung

##### 5.2.1 Dung dịch pepton/muối

Chú thích – Dung dịch pepton/muối là chất pha loãng do tổ chức ISO chọn dùng cho mục đích chung.

*Thành phần*

Pepton	1,0 g
Natri clorua	8,5 g
Nước	1 000 ml

*Chuẩn bị*

Hoà tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần. Chính pH, sao cho sau khi khử trùng, pH là  $7,0 \pm 0,1$ , ở  $25^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2.2 Dung dịch Ringer nồng độ một phần tư

*Thành phần*

Natri clorua (NaCl)	2,25 g
Kali clorua (KCl)	0,105 g
Canxi clorua khan ( $\text{CaCl}_2$ )	0,06 g
Natri hidro cacbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	0,05 g
Nước	1 000 ml

*Chuẩn bị*

Hoà tan các muối trong nước. Chính pH sao cho sau khi khử trùng, pH là  $6,9 \pm 0,1$ , ở  $25^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2.3 Dung dịch pepton

*Thành phần*

Pepton	1,0 g
Nước	1 000 ml

*Chuẩn bị*

Hoà tan pepton trong nước. Điều chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là  $7,0 \pm 0,1$ , ở  $25^{\circ}\text{C}$ .

## 5.2.4 Dung dịch đệm photphát

*Thành phần*

Kali dihidro photphát ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	42,5 g
Nước	1 000 ml

*Chuẩn bị*

Hoà tan muối trong 500 ml nước. Điều chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là  $7,2 \pm 0,1$ , ở  $25^{\circ}\text{C}$ . Pha loãng tới 1 000 ml. Bảo quản dung dịch gốc này từ  $0^{\circ}\text{C}$  đến  $5^{\circ}\text{C}$ .

Thêm 1,00 ml dung dịch này vào 1 000 ml nước.

### 5.3 Chất pha loãng dùng cho các mục đích riêng biệt

5.3.1 Dung dịch natri xitrat (dùng đối với trường hợp phomat, phomat chế biến và sữa sấy màng).

#### *Thành phần*

Trinatri xitrat ngậm 2 phân tử nước ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 20 g

Nước 1 000 ml

#### *Chuẩn bị*

Hoà tan muối trong nước bằng cách đun nóng từ 45°C đến 50°C. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là  $7,5 \pm 0,1$ , ở 25°C.

5.3.2 Dung dịch dikali hydrophotphat (dùng đối với trường hợp phomat, phomat chế biến, casein, casein axit, bột casein lactic, casein rennet, caseinat, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat axit và sữa sấy màng).

#### *Thành phần*

Dikali hidro photphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 20 g

Nước 1 000 ml

#### *Chuẩn bị*

Hoà tan muối trong nước bằng cách đun nóng từ 45°C đến 50°C. Chỉnh pH. Đối với dung dịch pha loãng ban đầu của casein axit và casein lactic, sau khi khử trùng pH phải là  $8,4 \pm 0,1$ , ở 25°C. Còn đối với các caseinat, phomat, phomat chế biến, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat axit, và sữa sấy màng, sau khi khử trùng pH phải là  $7,5 \pm 0,1$ , ở 25°C.

### 5.4 Phân phối, khử trùng và bảo quản chất pha loãng

Phân phối chất pha loãng (5.2 hoặc 5.3) dùng cho độ pha loãng ban đầu vào các bình hoặc các chai (6.4). Phân phối chất pha loãng dùng cho các độ pha loãng thập phân tiếp theo (5.2) vào các ống nghiệm hoặc các lọ (6.6). Lượng được phân phối sau khi khử trùng chứa trong mỗi bình hoặc chai phải chứa 90 ml chất pha loãng, hoặc một bội số của 90 ml, và mỗi ống nghiệm hoặc lọ (6.6) phải chứa 9,0ml chất pha loãng, hoặc một bội số của 9,0 ml (hoặc các lượng khác theo yêu cầu). Đậy nắp các ống nghiệm, bình cầu hoặc các chai.

Khử trùng bằng hấp áp lực ở  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  trong 15 phút (đối với các thể tích lớn hơn có thể phải hấp lâu hơn). Nếu chất pha loãng không sử dụng ngay, bảo quản ở chỗ tối từ 0°C đến 5°C, nhưng không quá 1 tháng trong các điều kiện không làm thay đổi thể tích hoặc thành phần của chúng.

## 5.5 Môi trường nuôi cấy

### 5.5.1 Thạch mật, lactoza, tím, đỏ (VRBL), (môi trường đặc chọn lọc)

#### Thành phần

Pepton	7,0 g
Cao men	3,0 g
Lactoza ( $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ )	10 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Muối mật	1,5 g
Đỏ trung tính	0,03 g
Tím tinh thể	0,002 g
Thạch	12 - 18 g (tùy hãng sản xuất)
Nước	1 000 ml

#### Chuẩn bị

Tiến hành như sau để giữ được tính chọn lọc và tính đặc thù của môi trường này: hoà các thành phần trên, hoặc môi trường hoàn chỉnh khô như trên vào nước và để yên trong vài phút. Tiếp theo trộn mạnh hỗn hợp và chỉnh pH, sao cho sau khi đun sôi pH là  $7,4 \pm 0,1$ , ở  $25^\circ C$ . Vừa đun môi trường đến sôi thỉnh thoảng vừa khuấy đều, có thể dùng một loại máy khuấy nào đó. Giữ môi trường sôi trong 2 phút. Phân phối môi trường thành từng lượng 100 - 150 ml vào các bình nón vô trùng (6.5). Làm nguội ngay môi trường trong bể điều nhiệt (6.15) ở  $45^\circ C \pm 1^\circ C$ .

Tránh đun môi trường quá nóng hoặc quá lâu (hoặc đun lại). Do đó không khử trùng môi trường bằng hấp áp lực và nên kiểm tra độ vô trùng của môi trường khi sử dụng (xem 8.5.1). Chỉ sử dụng môi trường này trong vòng 3 giờ sau khi chuẩn bị xong.

### 5.5.2 Môi trường canh thang lactoza - mật - lục sáng, môi trường khẳng định

#### Thành phần

Pepton	10 g
Lactoza ( $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$ )	10 g
Mật bò khô	20 g
Lục sáng	0,0133 g
Nước	1 000 ml

*Chuẩn bị*

Hoà các thành phần trên, hoặc môi trường khô trong nước và đun đến sôi.

Nếu thấy cần thiết, chỉnh pH sao cho sau khi đun sôi, pH là  $7,2 \pm 0,1$ , ở  $25^{\circ}\text{C}$ .

Phân phối môi trường thành từng lượng 10 ml vào các ống nghiệm (6.7) có chứa các ống Durham lộn ngược (6.8).

Khử trùng trong nồi hấp (6.1) ở  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong 15 phút. Các ống Durham nói trên không được chứa các bọt khí sau khi thanh trùng.

## 6 Thiết bị và dụng cụ

Chú thích – Có thể dùng các dụng cụ sử dụng một lần để thay cho các dụng cụ thủy tinh có thể sử dụng nhiều lần, nếu như nó phù hợp với các yêu cầu qui định. Dụng cụ thủy tinh tái sử dụng phải có độ bền tốt khi khử trùng lặp lại và phải trở về mặt hoá học.

Sử dụng các thiết bị thí nghiệm vi sinh thông thường và các dụng cụ đặc biệt sau:

6.1 Thiết bị để khử trùng khô (lò nung), hoặc thiết bị để khử trùng ướt (nồi hấp áp lực) (nồi hấp có thể dùng riêng rẽ hoặc dùng như một phần của thiết bị dùng để chuẩn bị và phân phối môi trường). Thiết bị tiếp xúc với chất pha loãng, mẫu thử, hoặc dung dịch pha loãng, ngoài thiết bị đã khử trùng sẵn, đều phải được khử trùng bằng một trong các phương pháp sau:

- a) giữ trong lò từ  $170^{\circ}\text{C}$  đến  $175^{\circ}\text{C}$  không ít hơn 1 giờ;
- b) giữ trong nồi hấp áp lực ở  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  không ít hơn 20 phút.

### 6.2 Thiết bị đóng hoá mẫu

Có thể sử dụng một trong các thiết bị sau đây:

- a) máy trộn quay, có tần số quay từ 8 000 đến 45 000 vòng trên phút, có cốc đựng mẫu bằng thủy tinh hoặc bằng kim loại gắn với nắp, chịu được các điều kiện khử trùng;
- b) máy trộn kiểu nhu động, có các túi bằng chất dẻo vô trùng;
- c) cối và chày.

Chú thích – Các cốc đựng mẫu, túi bằng chất dẻo hoặc bộ cối chày phải có đủ dung tích để trộn mẫu với lượng chất pha loãng thích hợp. Nói chung, thể tích của vật đựng phải gấp đôi thể tích của mẫu thử cộng với chất pha loãng.

6.3 Máy khuấy, có khả năng khuấy - trộn 1 ml hoặc 2 ml mẫu thử (trọng trường hợp mẫu dạng lỏng), hoặc các dung dịch pha loãng thập phân với 9 ml, hoặc 18 ml chất pha loãng trong ống nghiệm có kích thước thích hợp, để thu được chất huyền phù đồng nhất, và có nguyên tắc vận hành dựa trên chuyển động quay lệch tâm lượng chứa trong ống nghiệm (máy trộn Vortex).



- 6.4 Bình chứa, có đủ dung tích để chứa 90 ml chất pha loãng dùng để tạo huyền phù gốc, hoặc các bội số của 90 ml, và còn có khoảng trống để trộn.
- 6.5 Các bình chứa, dung tích 150 ml - 250 ml để đựng môi trường thạch pepton - mật - tím - đỏ trung tính (5.5.1).
- 6.6 Ống nghiệm (hoặc bình cầu hoặc lọ nhỏ), có dung tích đủ để chứa 10 ml mẫu thử (hoặc bội số của 10ml, nếu thấy cần) (khi mẫu dạng lỏng) hoặc dung dịch pha loãng ban đầu (đối với các trường hợp khác) hoặc các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo và còn có khoảng trống phía trên để trộn.
- 6.7 Ống nghiệm có dung tích 20 ml để đựng canh thang lục sáng mật lactoza (5.5.2).
- 6.8 Ống Durham có kích thước phù hợp với các ống nghiệm (6.7).
- 6.9 Pipet (được nhét bông ở đầu), dung tích danh định là 1 ml và có lỗ thoát có đường kính từ 2 mm đến 3 mm.
- Chú thích – Chỉ sử dụng các pipet có đầu còn nguyên vẹn, tốt nhất là loại chia vạch rõ để dễ nhìn khi hút mẫu.
- 6.10 Pipet chia độ ((được nhét bông ở đầu) có dung tích lớn, thí dụ: 10 ml hoặc 20 ml.
- Chú thích – Chỉ sử dụng các pipet có đầu còn nguyên vẹn, tốt nhất là loại chia vạch rõ để dễ nhìn khi hút mẫu.
- 6.11 Đĩa Petri bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo có đường kính từ 90 mm đến 100 mm.
- 6.12 Bi thủy tinh, có đường kính khoảng 6 mm.
- 6.13 pH mét, có độ chính xác tới  $\pm 0,1$  đơn vị ở nhiệt độ  $25^{\circ}\text{C}$ .
- 6.14 Cân, có khoảng cân phù hợp và có độ chính xác nằm trong giới hạn 1% khối lượng được cân.
- 6.15 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- 6.16 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- 6.17 Tủ ấm, có khả năng duy trì nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ở bất kỳ điểm nào trong tủ.

## 7 Lấy mẫu

Xem ISO 707.

## 8 Cách tiến hành

Chú thích

- 1) Các thao tác mô tả trong các điều từ 8.1 đến 8.5 không được tiến hành dưới ánh sáng trực tiếp của mặt trời.
- 2) Luôn luôn phải chú ý đảm bảo vô trùng.

**8.1 Chuẩn bị mẫu thử và dung dịch pha loãng ban đầu**

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng sao để thu được các đĩa có số khuẩn lạc lớn hơn 10, nếu có thể, và ít hơn 150.

Để tránh làm ảnh hưởng các vi sinh vật do thay đổi nhiệt độ đột ngột, nhiệt độ của chất pha loãng trong quá trình thao tác mô tả dưới đây luôn phải gần bằng nhiệt độ của mẫu thử, trừ khi có qui định khác.

**8.1.1 Sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng**

Trộn mẫu thử thật kỹ sao cho các vi sinh vật phân bố càng đều càng tốt, bằng cách đảo chiều lọ chứa liên tục 25 lần. Cần phải tránh tạo bọt hoặc để bọt tan hết. Khoảng thời gian từ khi trộn đến khi lấy phần mẫu thử không được quá 3 phút.

Dùng pipet lấy 1 ml mẫu thử và cho vào 9 ml chất pha loãng (5.2) (hoặc lấy 10 ml mẫu thử cho vào 90ml chất pha loãng hoặc lấy 11 ml mẫu thử cho vào 99 ml chất pha loãng). Lắc dung dịch pha loãng ban đầu này (thí dụ, lắc 25 lần với khoảng di động là 300 mm, trong khoảng 10 giây). Như vậy thu được dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

**8.1.2 Sữa bột, bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat có đường, bột bơ loãng và lactoza;**

Trộn kỹ lượng chứa trong lọ kín bằng cách lắc và đảo chiều liên tục. Nếu mẫu thử đựng trong lọ kín còn nguyên, quá đầy khó trộn kĩ được thì chuyển sang một lọ chứa to hơn. Trộn đều. Mở nắp, dùng dao trộn lấy phần mẫu thử theo yêu cầu và tiến hành theo chỉ dẫn dưới đây. Đóng nắp hộp lại ngay.

Hâm nóng chai chứa 90 ml chất pha loãng thích hợp tới  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong nồi cách thuỷ (6.15).

Cân 10 g mẫu thử cho vào một bình thuỷ tinh thích hợp (thí dụ như cốc có mỏ) và trút dần bột vào lọ pha loãng có chứa chất pha loãng thích hợp (5.2 hoặc, nếu cần đối với sữa sấy màng dùng chất pha loãng 5.3.1 hoặc 5.3.2 ở  $\text{pH } 7,5 \pm 0,1$ ). Cách khác, cân 10 g mẫu thử cho trực tiếp vào lọ có chứa chất pha loãng.

Để hoà tan, xoay từ từ lọ cho bột thấm ướt và sau đó lắc lọ 25 lần với khoảng di động là 300 mm, trong khoảng 10 giây. Có thể dùng máy trộn kiểu nhu động (6.2.b) để thay cho việc lắc.

Đặt lọ này vào nồi cách thuỷ trong 5 phút và thỉnh thoảng lắc. Như vậy thu được dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

Chú thích – Để hoà tan được tốt hơn, đặc biệt đối với sữa sấy màng nên sử dụng bi thuỷ tinh (6.12). Nếu sử dụng thì phải cho vào lọ trước khi khử trùng.

### 8.1.3 Phomat và phomat chế biến

Cân 10 g phomat hoặc phomat chế biến trong đĩa. Chuyển vào cốc chứa của máy trộn quay (6.2.a), hoặc 1 túi đựng của máy trộn kiểu nhu động (6.2.b), hoặc cho vào cối nghiền (6.2.c).

Khi dùng máy trộn quay hoặc máy trộn kiểu nhu động cho thêm 90 ml chất pha loãng (5.2, 5.3.1, hoặc 5.3.2 ở pH  $7,5 \pm 0,1$ ). Trộn cho đến khi phomat phân tán đều (từ 1 phút đến 3 phút). Tốt nhất là phải đảm bảo nhiệt độ của quá trình khuếch tán không vượt quá  $40^{\circ}\text{C}$ , và trong mọi trường hợp không để nhiệt độ vượt quá  $45^{\circ}\text{C}$ . Để cho bột tan hết. Khi dùng cối để nghiền thì cho thêm lượng chất pha loãng tối thiểu và trộn bằng chày để thu được bột nhào đồng nhất không vón cục. Thêm phần chất pha loãng còn lại của tổng 90 ml. Như vậy, thu được dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

### 8.1.4 Casein axit, casein lactic và casein rennet

Cân 10 g sản phẩm trong đĩa. Chuyển vào 1 lọ pha loãng có chứa bi thủy tinh (6.12) và 90 ml chất pha loãng dikali hidro photphat (5.3.2) ở pH 8,4 đối với trường hợp axit casein, casein lactic.

Để yên 15 phút và sau đó tăng nhiệt độ lên  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong nồi cách thủy (6.16).

Giữ lọ này ở  $37^{\circ}\text{C}$  thêm 15 phút nữa và lắc mạnh từng đợt. Như vậy thu được dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ .

Chú thích – Không nên sử dụng máy trộn quay (6.2.a) hoặc máy trộn kiểu nhu động (6.2.b) vì sẽ tạo nhiều bọt.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

### 8.1.5 Caseinat và bột của dịch tách ra khi sản xuất phomat axit

Cân 10 g sản phẩm vào đĩa. Rót thật chậm lên bề mặt của 90 ml chất pha loãng dikali hirophotphat (5.3.2) ở pH  $7,5 \pm 0,1$  trong lọ pha loãng, lắc hỗn hợp sau mỗi lần rót.

Cách khác, cho sản phẩm khô vào một thể tích tối thiểu chất pha loãng và khuấy bằng đũa thủy tinh để thu được khối bột nhào đồng nhất không vón cục. Thêm phần chất pha loãng còn lại của tổng 90 ml chất pha loãng.

Để yên 15 phút và sau đó tăng nhiệt độ lên  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong nồi cách thủy (6.16). Giữ lọ ở  $37^{\circ}\text{C}$  thêm 15 phút nữa. Trộn kỹ hỗn hợp bằng máy trộn quay (6.2.a), hoặc máy trộn kiểu nhu động (6.2.b). Để cho bột tan hết trước khi tiếp tục tiến hành. Như vậy thu được dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

### 8.1.6 Bơ

Cho mẫu thử vào 1 bình chứa đặt trong nồi cách thủy ở  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (6.15). Khuấy cho chóng tan chảy và để cho đến khi mẫu thử vừa tan hết. Lắc và dùng pipét đã sấy nóng đến  $45^{\circ}\text{C}$  để lấy 10 ml cho vào bình

có chứa 90ml chất pha loãng (5.2). Trước mỗi lần lấy phải lắc. Có thể dùng máy trộn kiểu nhu động (6.2.b) để trộn. Như vậy thu được dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ .

Cách khác, chỉ sử dụng pha nước để pha loãng như sau:

Lấy 50 g phần mẫu thử (có chứa khoảng 8 ml nước) và thêm 42 ml chất pha loãng (5.2.3) đã được hâm nóng đến  $45^{\circ}\text{C}$ . Đặt bình chứa vào nồi cách thủy ở  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (6.15) cho đến khi bơ tan hết. Lắc đều và để cho tách pha không quá 15 phút. Dùng pipet hút lớp phía dưới đáy; 1 ml này tương đương với 1 g bơ.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

#### 8.1.7 Sản phẩm sữa đông lạnh (bao gồm cả kem lạnh)

Tiến hành như trường hợp đối với bơ (8.1.6) (cách thứ nhất) nhưng dùng nồi cách thủy ở nhiệt độ không vượt quá  $37^{\circ}\text{C}$  (6.16). Nhiệt độ của mẫu thử không được vượt quá  $37^{\circ}\text{C}$ . Như vậy thu được dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ .

#### 8.1.8 Custard, món tráng miệng, sữa lên men và váng kem

Cân 10 g sản phẩm cho vào 1 bình (6.4) có chứa bi thủy tinh (6.12).

Đối với custard, món tráng miệng và váng kem ngọt, thêm 90 ml chất pha loãng (5.2) và lắc cho tan. Đối với sữa lên men và váng kem chua sử dụng chất pha loãng 5.2 hoặc 5.2.3, ở pH  $7,5 \pm 0,1$ . Có thể sử dụng máy trộn kiểu nhu động (6.2.b). Như vậy thu được dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.2.

#### 8.2 Các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Dùng pipet sạch lấy 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào 1 ống nghiệm khác chứa 9 ml chất pha loãng vô trùng, không để pipet tiếp xúc với chất pha loãng. Mỗi lần pha loãng phải sử dụng một pipet mới.

Cách khác, lấy 10 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào 1 lọ chứa 90 ml chất pha loãng vô trùng, hoặc 11 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào lọ chứa 99 ml chất pha loãng vô trùng. Trong cách tiến hành bình thường, nếu cần dung dịch pha loãng  $10^{-3}$ , lấy 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào 99 ml chất pha loãng vô trùng.

Trộn cẩn thận, hoặc bằng cách dùng pipet sạch hút thả 10 lần, hoặc dùng máy trộn cơ học (6.3) trong khoảng từ 5 giây đến 10 giây để thu được dung dịch pha loãng  $10^{-2}$ . Phải chọn tốc độ quay của máy trộn cơ học sao cho chất lỏng tạo thành dòng khi xoáy dâng cao từ 20 mm đến 30 mm trên thành bình chứa.

Khi cần, lặp lại các thao tác này sử dụng dung dịch pha loãng  $10^{-2}$  và các dung dịch pha loãng tiếp theo để thu được các dung dịch pha loãng  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , v.v., cho đến khi thu được số lượng vi sinh thích hợp (xem 8.1).

Khi lấy tỷ lệ 10 ml cộng 90 ml, 11 ml cộng 99 ml, hoặc 1 ml cộng 99 ml thì lắc bằng tay (thí dụ, 25 lần với khoảng di động là 300 mm trong khoảng 10 giây).

### 8.3 Thời gian thao tác

Khoảng thời gian từ lúc bắt đầu cân đo phần mẫu thử hoặc từ lúc kết thúc việc chuẩn bị dung dịch pha loãng ban đầu và cho đến khi trộn các dung dịch cấy với môi trường không được quá 15 phút, trừ khi có qui định khác.

### 8.4 Cấy mẫu

Dùng 2 đĩa Petri cho sản phẩm dạng lỏng và / hoặc cho mỗi dung dịch mẫu pha loãng được chọn (xem 8.1).

Dùng một pipet cho vào mỗi đĩa 1 ml sản phẩm lỏng, hoặc 1 ml từ dung dịch mẫu pha loãng thích hợp. Chạm đầu mút của pipet vào một điểm khô ráo trong đĩa. Sử dụng một pipet mới cho mỗi độ pha loãng.

### 8.5 Rót thạch (môi trường nuôi cấy)

8.5.1 Rót vào mỗi đĩa Petri đã cấy mẫu khoảng 12 ml môi trường VRBL (5.5.1)  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (xem chú thích).

Trộn ngay bằng cách xoay đĩa Petri để thu được sự phân bố đồng đều các khuẩn lạc sau khi nuôi. Để yên cho thạch đông lại trên một mặt phẳng nằm ngang, mát.

Chuẩn bị một đĩa đối chứng với 12 ml môi trường để kiểm tra độ vô trùng.

Chú thích - Để kiểm tra nhiệt độ của môi trường xem có đúng  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  hay không, nên đặt một nhiệt kế trong dung dịch thạch 1.5% (m/m) được rót vào một cốc chứa riêng biệt với các dung dịch chứa môi trường. Dung dịch kiểm tra nhiệt độ này cần phải đun nóng và làm nguội bằng cách thức giống như đối với mẫu thử.

8.5.2 Sau khi môi trường đã đông lại, rót thêm lên bề mặt đĩa khoảng 4 ml môi trường VRBL (5.5.1) ở nhiệt độ  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  để yên cho đông lại.

### 8.6 Nuôi ấm

Nuôi các đĩa vừa cấy ở tư thế ngược. Không xếp chồng quá 6 đĩa, các đĩa không được để sát nhau và sát các vách và nóc tủ ấm.

Nuôi ở nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , trong 24 giờ  $\pm$  2 giờ.

### 8.7 Đọc kết quả

Sau khi nuôi lấy ra, chỉ giữ lại các đĩa có hơn 10 và ít hơn 150 khuẩn lạc. Đếm các khuẩn lạc đồ thăm, có đường kính ít nhất 0,5 mm, đặc trưng cho nhóm coliform. Tiến hành khẳng định sau thời hạn nuôi theo 8.8, các khuẩn lạc nghi ngờ có thể đợi xem thêm, đặc biệt trong các sản phẩm sữa có chứa các

loại đường không phải là lactoza. Tính số khuẩn lạc trong 1 gam hoặc trong 1 mililit, có tính đến kết quả thử nghiệm khẳng định nếu có thực hiện, theo công thức trong 9.2.

### 8.8 Thử khẳng định

Chích cấy 5 khuẩn lạc từ mỗi loại, nếu có thể được vào các ống canh thang lactoza - mật - lục sáng (5.5.2) và nuôi ở nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong 24 giờ  $\pm$  2 giờ. Các khuẩn lạc, từ đó có thể cho thấy sự sinh hơi trong các ống Durham được coi là coliform.

Tính số khuẩn lạc coliform trên từng đĩa từ / hoặc phần trăm khuẩn lạc coliform được khẳng định, hoặc số khuẩn lạc từ mỗi loại có trong đĩa.

## 9 Biểu thị kết quả

9.1 Giữ lại để tính toán, các đĩa có nhiều hơn 10 và ít hơn 150 khuẩn lạc.

9.2 Số coliform có trong 1 mililit (mẫu dạng lỏng) hoặc trong 1 gam (các sản phẩm khác) theo công thức :

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

trong đó

- $\Sigma C$  là tổng số khuẩn lạc coliform đếm được theo 8.7 hoặc 8.8;
- $n_1$  là số đĩa Petri được giữ lại theo 8.7 của độ pha loãng đầu tiên được tính;
- $n_2$  là số đĩa được chọn theo 8.7 của độ pha loãng thứ hai;
- $d$  là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng đầu tiên được chọn để tính.

9.3 Để biểu thị số coliform, làm tròn kết quả thu được theo 9.2 đến hai chữ số có nghĩa. Nếu kết quả có số tận cùng là 5, làm tròn bằng cách lấy số chẵn cho chữ số kế liền bên trái.

Chú thích - Nếu có nhiều hơn hai độ pha loãng được sử dụng trong tính toán, công thức trên cần phải sửa đổi để lấy được số đếm của độ pha loãng tiếp theo đó.

Do vậy, đối với trường hợp lấy kết quả từ 3 độ pha loãng, số khuẩn lạc có trong 1 mililit hoặc trong 1 gam tính như sau:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3) d}$$

trong đó

- $n_3$  là số đĩa trong đợt pha loãng lần 3 có chứa từ 10 đến 300 khuẩn lạc.

9.4 Nếu như số khuẩn lạc đếm được vượt quá 150, thì tính số khuẩn lạc ước lượng trên các đĩa có số khuẩn lạc xấp xỉ 150 và nhân với số nghịch đảo của hệ số pha loãng. Ghi kết quả theo "số Coliform ước lượng trong một mililit hay trong một gam".

9.6 Kết quả có thể biểu thị theo một số trong khoảng 1,0 và 9,9 nhân với  $10^x$ , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10.

## 10 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng và kết quả thu được, chỉ rõ phương pháp biểu thị đã dùng. Nó cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong phần này của tiêu chuẩn, hoặc tùy ý, cùng với tất cả các tình huống bất thường mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo kết quả cũng bao gồm mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử.

---