

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6846:2007

ISO 7251:2005

Xuất bản lần 3

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN
CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ
ĐỊNH LƯỢNG *ESCHERICHIA COLI* GIẢ ĐỊNH –
KỸ THUẬT ĐẾM SỐ CÓ XÁC SUẤT LỚN NHẤT**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method
for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* –
Most probable number technique*

HÀ NỘI – 2007

Lời nói đầu

TCVN 6846:2007 thay thế TCVN 6846:2001 và TCVN 6505-1:1999;

TCVN 6846:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 7251:2005;

TCVN 6846:2007 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 cẩn trọng áp dụng phương pháp này khi có thể.

Khi tiêu chuẩn quốc tế ISO 7251 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 hòa 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 quốc tế như vậy 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.

**Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi –
Phương pháp phát hiện và định lượng *Escherichia coli* –
giả định – Kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method
for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* –
Most probable number technique*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn chung để phát hiện và định lượng *Escherichia coli* (*E.coli*) giả định bằng kỹ thuật nuôi cấy môi trường lỏng và tính số có xác suất lớn nhất (MPN) sau khi ủ ở 37 °C, rồi ủ ở 44 °C. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm dùng cho con người và thức ăn chăn nuôi;
- các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất và xử lý thực phẩm.

CẢNH BÁO – Một số chủng *E.coli* gây bệnh không phát triển được ở 44 °C.

Hạn chế của tiêu chuẩn này là phải chấp nhận độ biến động lớn về kết quả do độ nhạy của phương pháp (xem điều 10).

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 6507-1 (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.

TCVN 6507-2 (ISO 6887-2), 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 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thịt và sản phẩm thịt.

TCVN 6507-3 (ISO 6887-3), 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 3: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thuỷ sản và sản phẩm thuỷ sản.

TCVN 6507-4 (ISO 6887-4), 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 4: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các sản phẩm khác với sữa và sản phẩm sữa, thịt và sản phẩm thịt, thuỷ sản và sản phẩm thuỷ sản.

TCVN 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn chăn nuôi – 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 và tạo môi trường cấy – Phần 1: Các hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng cho việc chuẩn bị môi trường 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 và tạo môi trường cấy – Phần 2: Các hướng dẫn thực hành về thử tính năng của môi trường cấy).

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

E.coli giả định (presumptive *Escherichia coli*)

vi khuẩn lên men lactoza có sinh khí ở 44 °C và sinh indol từ tryptophan ở 44 °C, khi tiến hành theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

3.2

định lượng *E.coli* giả định (enumeration of presumptive *Escherichia coli*)

số có xác suất lớn nhất *E.coli* trên mililit hoặc gam mẫu thử khi phép thử được tiến hành theo phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Phương pháp phát hiện

4.1.1 Cấy một lượng qui định huyền phù ban đầu của mẫu thử vào môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc.

4.1.2 Ủ ống nghiệm ở 37 °C đến 48 giờ. Sau 24 giờ và 48 giờ kiểm tra ống về sự sinh khí.

4.1.3 Nếu thấy ống nghiệm mờ, đục, hoặc sinh khí thì cần cấy truyền sang ống nghiệm có chứa môi trường lỏng chọn lọc (canh thang EC).

4.1.4 Ủ ống nghiệm thu được trong 4.1.3 ở 44 °C đến 48 giờ. Sau 24 giờ và 48 giờ, kiểm tra các ống về sự sinh khí.

4.1.5 Nếu ống nghiệm thu được trong 4.1.4 cho thấy sinh khí thì cần cấy truyền sang ống nghiệm có chứa nước pepton không chứa indol.

4.1.6 Ủ ống nghiệm thu được trong 4.1.5 ở 44 °C trong 48 giờ. Kiểm tra ống nghiệm về sự sinh indol do sự phân huỷ của tryptophan trong pepton.

4.1.7 Các ống nghiệm cho thấy mờ đục, hoặc sinh khí trong môi trường tăng sinh lỏng (4.1.1) và khi được cấy truyền có sinh khí trong canh thang EC và sinh indol trong nước pepton ở 44 °C được coi là các ống có chứa *E.coli* giả định. Các kết quả được chỉ rõ là "có mặt" hoặc "không có mặt" *E.coli* giả định trong x g hoặc x ml sản phẩm.

4.2 Phương pháp định lượng

4.2.1 Cấy một lượng qui định huyền phù ban đầu vào ba ống nghiệm đựng môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc nồng độ kép.

4.2.2 Cấy một lượng qui định huyền phù ban đầu vào ba ống nghiệm đựng môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc nồng độ đơn.

Sau đó, trong cùng điều kiện, cấy một lượng qui định của các dung dịch pha loãng thập phân của huyền phù ban đầu vào ba ống nghiệm khác đựng môi trường nồng độ đơn.

4.2.3 Ủ ấm các ống môi trường nồng độ đơn và nồng độ kép ở 37 °C đến 48 giờ. Sau 24 giờ đến 48 giờ kiểm tra các ống nghiệm về sự sinh khí.

4.2.4 Từ mỗi ống môi trường nồng độ kép cho thấy mở, đục hoặc sinh khí, từ mỗi ống đựng môi trường nồng độ đơn cho thấy sinh khí, được cấy truyền vào ống nghiệm đựng môi trường lỏng chọn lọc (canh thang EC).

4.2.5 Ủ các ống thu được trong 4.2.4 ở 44 °C trong 48 giờ. Sau 24 giờ đến 48 giờ, kiểm tra các ống nghiệm về sự sinh khí.

4.2.6 Mỗi ống nghiệm thu được trong 4.2.5 cho thấy sinh khí được cấy truyền sang ống nghiệm chứa nước pepton không chứa indol.

4.2.7 Ủ các ống thu được trong 4.2.6 ở 44 °C đến 48 giờ. Kiểm tra các ống nghiệm về sự sinh indol do sự phân huỷ của tryptophan trong pepton.

4.2.8 Xác định số có xác suất lớn nhất của *E.coli* giả định theo bảng MPN (xem phụ lục A) ứng với số lượng ống đựng môi trường nồng độ đơn và nồng độ kép và sau khi cấy truyền có sinh khí trong môi trường (EC) và sinh indol trong nước pepton ở 44 °C.

5 Dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

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

5.1 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), còn đối với các sản phẩm sữa thì xem TCVN 6263 (ISO 8261).

5.2 Môi trường tăng sinh chọn lọc (Canh thang lauryl sunfat)

5.2.1 Thành phần

	a) Môi trường nồng độ kép	b) Môi trường nồng độ đơn
Thuỷ phân mô thực vật và động vật bằng enzym	40,0 g	20,0 g
Lactoza	10,0 g	5,0 g
Dikali monohydro phosphat (K_2HPO_4)	5,5 g	2,75 g
Kali dihidro phosphat (KH_2PO_4)	5,5 g	2,75 g
Natri clorua	10,0 g	5,0 g
Natri lauryl sunfat [$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$]	0,2 g	0,1 g
Nước	1 000 ml	1 000 ml

5.2.2 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 khử trùng là $6,8 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Phân phôi từng lượng 9 ml môi trường này vào các ống nghiệm có kích thước 16 mm x 160 mm (6.4) chứa các ống Durham (6.6) đối với môi trường nồng độ đơn và 10 ml vào các ống thử có kích thước 18 mm x 180 mm hoặc 20 mm x 200 mm (6.4) chứa các ống Durham (6.6) với môi trường nồng độ kép.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121°C .

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

5.3 Canh thang EC (môi trường chọn lọc)

5.3.1 Thành phần

Dịch thuỷ phân casein bằng enzym	20,0 g
Lactoza	5,0 g
Muối mật (bile salts) số 3*	1,5 g
Dikali monohydro phosphat (K_2HPO_4)	4,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,5 g
Natri clorua	5,0 g
Nước	1 000 ml

* Xem tài liệu tham khảo [1].

5.3.2 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 khử trùng là $6,8 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Phân phôi từng lượng môi trường 10 ml vào các ống có kích thước 16 mm x 160 mm (6.4) chứa các ống Durham (6.6).

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121°C .

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

5.3.3 Kiểm tra để đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

Kiểm tra tính năng của môi trường nuôi cấy, xem ISO/TS 1113-1 và ISO/TS 1113-2.

5.4 Nước pepton, không chứa indol

5.4.1 Thành phần

Dịch thuỷ phân casein bằng enzym	10,0 g
Natri clorua	5,0 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, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,3 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Phân phối từng lượng môi trường từ 5 ml đến 10 ml vào các ống nghiệm có kích thước 16 mm x 160 mm (6.4).

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121°C .

5.5 Thuốc thử Indol (Thuốc thử Kovacs)

5.5.1 Thành phần

4-Dimethylaminobenzaldehyd	5,0 g
2-Metyl butan-1-ol hoặc pentan-1-ol	75,0 ml
Axit clohydric (ρ_{20} 1,18 đến 1,19 g/ml)	25,0 ml

5.5.2 Chuẩn bị

Hoà tan 4-Dimethylaminobenzaldehyd trong cồn bằng cách đun nhẹ trong nồi cách thuỷ, duy trì ở nhiệt độ khoảng từ 50°C đến 55°C .

Làm nguội và thêm axit.

Bảo quản tránh ánh sáng và giữ ở nhiệt độ khoảng 4°C [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Thuốc thử phải có màu vàng nhạt hoặc nâu nhạt.

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng các loại để dùng ngay có bán sẵn.

6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

CHÚ THÍCH 1 Có thể dùng thiết bị, dụng cụ dùng một lần thay cho việc sử dụng lại các dụng cụ thuỷ tinh nếu chúng có các qui định kỹ thuật tương tự.

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm phân tích vi sinh thông thường, cụ thể là:

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

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.3 Nồi cách thuỷ, có khả năng duy trì ở $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.4 Các ống nghiệm, có kích thước khoảng $16\text{ mm} \times 160\text{ mm}$, $18\text{ mm} \times 180\text{ mm}$ và $20\text{ mm} \times 200\text{ mm}$.

6.5 Que cấy vòng, bằng platin/iriđi hoặc niken/crom có đường kính khoảng 3 mm hoặc các vòng lấy mẫu $10\text{ }\mu\text{l}$ vô trùng sử dụng một lần.

6.6 Các ống Durham, có kích thước thích hợp dùng cho các ống nghiệm (6.4).

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

6.8 pH met, chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25°C và có thể đọc đến $0,01$ đơn vị pH.

7 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể cho sản phẩm liên quan 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 về vấn đề này.

9 Cách tiến hành

9.1 Phương pháp phát hiện

9.1.1 Phần mẫu thử và huyền phù ban đầu

Xem phần thích hợp của TCVN 6507 (ISO 6887) tùy thuộc vào sản phẩm có liên quan, hoặc TCVN 6404 (ISO 7218).

Cho 1 ml huyền phù ban đầu vào 9 ml canh thang lauryl sunfat nồng độ đơn [5.2.1 b)] (tức là $0,1\text{ g}$ hoặc $0,1\text{ ml}$ mẫu) hoặc 10 ml huyền phù ban đầu cho vào 10 ml canh thang lauryl sunfat nồng độ kép [5.2.1 a)] (tức là 1 g hoặc 1 ml mẫu)]. Đối với các thể tích của các phần mẫu thử lớn hơn, thì chuẩn bị huyền

phù ban đầu bằng cách cho x ml hoặc x g vào $9x$ ml dịch pha loãng [xem TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc TCVN 6263 (ISO 8261)], sau đó cho toàn bộ huyền phù ban đầu vào $90x$ ml canh thang lauryl sunfat nóng độ đơn [5.2.1 b)]. Ví dụ, cho 5 ml hoặc 5 g mẫu thử vào 45 ml dịch pha loãng, và cho toàn bộ huyền phù ban đầu này vào 450 ml canh thang lauryl sunfat nóng độ đơn [5.2.1 b)], hoặc cho phần mẫu thử vào một thể tích tương tự của canh thang lauryl sunfat nóng độ kép [5.2.1 a]).

9.1.2 Ủ môi trường tăng sinh chọn lọc (canh thang lauryl sunfat)

Ủ các ống canh thang lauryl sunfat nóng độ đơn hoặc nóng độ kép (5.2) trong tủ ấm (6.2) ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ ± 2 giờ. Nếu ở giai đoạn này không sinh khí cũng như không bị mờ đục làm cản trở việc quan sát sự sinh khí thì ủ tiếp đến 48 giờ ± 2 giờ.

CHÚ THÍCH Đối với giáp xác và nhuyễn thể, thi thời gian ủ có thể đến 48 giờ ± 2 giờ.

Đối với một số sản phẩm sữa (ví dụ như casein), thi ống Durham có thể bị dính vào đáy của ống môi trường tăng sinh chọn lọc. Nếu sau thời gian ủ 48 giờ thấy mờ đục nhưng không sinh khí thi cấy tiếp vào canh thang EC và tiến hành theo phương pháp mô tả trong 9.1.3.

9.1.3 Cấy và ủ môi trường chọn lọc (canh thang EC)

Sau khi ủ môi trường nóng độ kép [5.2.1 a)] theo 9.1.2, nếu quan sát thấy mờ đục hoặc sinh khí, hoặc sau khi ủ môi trường nóng độ đơn [5.2.1 b)] theo 9.1.2 nếu quan sát thấy sinh khí, thi cấy một vòng (6.5) dịch cấy này vào canh thang EC (5.3) và ủ trên nồi cách thuỷ (6.3) hoặc đặt trong tủ ấm (6.2) ở 44°C trong 24 giờ ± 2 giờ. Nếu ở giai đoạn này không thấy sinh khí trong canh thang EC (5.3), thi kéo dài thời gian ủ sao cho tổng thời gian ủ là 48 giờ ± 2 giờ.

CHÚ THÍCH Đối với giáp xác và nhuyễn thể, thi tổng thời gian ủ không quá 24 giờ ± 2 giờ.

9.1.4 Cấy và ủ môi trường nước pepton

Sau khi đã ủ theo 9.1.3, nếu quan sát thấy sinh khí, cấy vào nước pepton (5.4), đã được làm ấm trước đến 44°C một vòng (6.5) dịch cấy. Ủ 48 giờ ± 2 giờ ở 44°C .

9.1.5 Kiểm tra về sự sinh indol

Thêm 0,5 ml thuốc thử indol (5.5) vào các ống chứa nước pepton (5.4) đã được ủ theo 9.1.4.

Trộn kỹ và kiểm tra sau 1 phút. Nếu trong pha cồn có màu đỏ chứng tỏ có indol.

9.1.6 Diễn giải

Môi trường tăng sinh chọn lọc được cấy theo 9.1.2 mà cho thấy (sau khi cấy truyền và ủ theo 9.1.3 và 9.1.4) có sự sinh khí trong ống nghiệm dung canh thang EC và sinh indol trong ống nước pepton thì được coi là dương tính.

9.2 Phương pháp định lượng

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

Xem phần thích hợp của TCVN 6507 (ISO 6887) tùy thuộc vào sản phẩm có liên quan, hoặc TCVN 6404 (ISO 7218).

Chuẩn bị đủ số lượng các dung dịch pha loãng để đảm bảo rằng tất cả các ống của độ pha loãng cuối cùng sẽ cho kết quả âm tính.

9.2.2 Cấy và ủ môi trường tăng sinh chọn lọc (canh thang lauryl sunfat)

9.2.2.1 Chuẩn bị một dây ba ống nghiệm đối với mỗi độ pha loãng. Đối với động vật giáp xác hoặc các sản phẩm đặc biệt khác và/hoặc khi yêu cầu các kết quả có độ chính xác cao hơn thì cần phải ủ một dây năm ống nghiệm (xem Phụ lục A).

9.2.2.2 Lấy ba ống nghiệm môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ kép [5.2.1a)]. Dùng pipet vô trùng (6.7) chuyển vào mỗi ống nghiệm 10 ml huyền phù ban đầu. Các phần thử nghiệm này tương ứng với 1 g mẫu thử trên một ống.

9.2.2.3 Lấy ba ống nghiệm môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ đơn [5.2.1b)]. Dùng pipet mới vô trùng (6.7) chuyển vào mỗi ống nghiệm 1 ml huyền phù ban đầu. Các phần thử nghiệm này tương ứng với 0,1 g mẫu trên một ống.

9.2.2.4 Đối với mỗi độ pha loãng tiếp theo (bằng 0,01 g, 0,001 g, v.v...mẫu thử trên một ống), thì tiến hành tiếp theo 9.2.2.3. Sử dụng mỗi pipet vô trùng mới cho một độ pha loãng. Trộn cẩn thận dịch cấy và môi trường.

9.2.2.5 Ủ các ống nghiệm môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ kép đã được cấy theo 9.2.2.2 và các ống nghiệm môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ đơn đã được cấy theo 9.2.2.3 và 9.2.2.4 trong tủ ấm (6.2) ở 37 °C trong 24 giờ ± 2 giờ. Nếu trong giai đoạn này không sinh khí cũng không bị mờ đục thì ủ tiếp đến 48 giờ ± 2 giờ.

Đối với giáp xác và nhuyễn thể, thì thời gian ủ có thể đến 48 giờ ± 2 giờ.

Đối với một số sản phẩm sữa (ví dụ như casein), thì ống Durham có thể bị dính vào đáy của ống môi trường tăng sinh chọn lọc. Nếu sau thời gian ủ 48 giờ thấy mờ đục nhưng không sinh khí thì cấy tiếp vào canh thang EC (5.3) và tiến hành theo phương pháp như mô tả trong 9.2.3.

9.2.3 Cấy truyền và ủ môi trường chọn lọc (canh thang EC)

9.2.3.1 Đối với mỗi ống nghiệm đựng môi trường nồng độ kép được ủ theo 9.2.2.5 thấy mờ đục hoặc sinh khí, và đối với mỗi ống nghiệm đựng môi trường nồng độ đơn được ủ theo 9.2.2.5 cho thấy sinh khí thì cấy truyền một vòng cấy (6.5) sang ống nghiệm đựng canh thang EC (5.3).

9.2.3.2 Ủ các ống đã được cấy theo 9.2.3.1 trong nồi cách thuỷ (6.3) hoặc để trong tủ ấm (6.2) ở 44 °C trong 24 giờ ± 2 giờ. Nếu ở giai đoạn này không thấy sinh khí trong canh thang EC (5.3), thì kéo dài thời gian ủ sao cho tổng thời gian ủ là 48 giờ ± 2 giờ.

Đối với giáp xác và nhuyễn thể, thì thời gian ủ được giới hạn đến 24 giờ ± 2 giờ.

9.2.4 Cấy và ủ môi trường nước pepton

Sau khi đã ủ theo 9.2.3.2, nếu quan sát thấy sinh khí, thì cấy vào ống nghiệm đựng nước pepton (5.4), đã được làm ấm trước đến 44 °C một vòng (6.5) dịch cấy. Ủ 48 giờ ± 2 giờ ở 44 °C.

9.2.5 Kiểm tra về sự sinh indol

Thêm 0,5 ml thuốc thử indol (5.5) vào các ống chứa nước pepton (5.4) đã được ủ theo 9.2.4.

Trộn kỹ và kiểm tra sau 1 phút. Nếu trong pha cồn có màu đỏ chứng tỏ có mặt indol.

9.2.6 Diễn giải

Các ống đựng môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ đơn [5.2.1.b)] hoặc môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ kép [5.2.1.a)] được ủ theo 9.2.2 cho thấy (sau khi cấy truyền và ủ theo 9.2.3 và 9.2.4) có sự sinh khí trong ống đựng canh thang EC và sinh indol trong ống nước pepton thì được coi là dương tính.

Đối với mỗi độ pha loãng, đếm số lượng ống dương tính của môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ đơn [5.2.1.b)] và môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ kép [5.2.1.a)].

10 Biểu thị kết quả

10.1 Phương pháp phát hiện

Theo diễn giải các kết quả (9.1.6), báo cáo sự có mặt hay không có mặt *E.coli* giả định trong phần mẫu thử được tính theo khối lượng bằng gam hoặc theo thể tích bằng mililit.

10.2 Phương pháp định lượng

Xem Phụ lục A.

VÍ DỤ: Sử dụng mẫu dạng rắn và ba ống, trong 95 % các trường hợp, giới hạn tin cậy biến động từ 13 *E.coli* giả định đến 200 *E.coli* giả định trên gam đối với MPN $7,4 \times 10$ *E.coli* giả định trên gam, và từ 4 *E.coli* giả định đến 99 *E.coli* giả định trên gam đối với MPN $2,4 \times 10$ *E.coli* giả định trên gam.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác khác với quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tuỳ ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(qui định)

Bảng MPN**A.1 Tính MPN sử dụng ba ống nghiệm**

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

A.2 Tính MPN sử dụng năm ống nghiệm

Xem bảng A.1.

Bảng A.1 – Bảng MPN đổi 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* khi số lượng mẫu (đối với lô) được thử nghiệm là					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	0,00	0,65	0,00	0,93			
0	1	0	0,18	2	2	0,01	0,65	0,00	0,93			
0	1	1	0,36	3	3	0,07	0,99	0,02	1,40			
0	2	0	0,37	3	2	0,07	0,99	0,02	1,40			
0	2	1	0,55	0	0	0,17	1,40	0,09	2,10			
0	3	0	0,56	0	3	0,17	1,40	0,09	2,10			
1	0	0	0,20	1	1	0,02	0,99	0,01	1,40			
1	0	1	0,40	2	1	0,07	1,00	0,02	1,40			
1	0	2	0,60	0	0	0,17	1,40	0,09	2,10			
1	1	0	0,40	1	1	0,07	1,10	0,03	1,40			
1	1	1	0,61	3	2	0,17	1,40	0,09	2,10			
1	1	2	0,81	0	0	0,33	2,20	0,20	2,80			
1	2	0	0,61	2	1	0,18	1,40	0,09	2,10			
1	2	1	0,82	3	3	0,33	2,20	0,20	2,80			
1	3	0	0,83	3	3	0,33	2,20	0,20	2,80			
1	3	1	1,0	0	0	0,3	2,2	0,2	2,8			
1	4	0	1,1	0	0	0,3	2,2	0,2	2,8			
2	0	0	0,45	1	1	0,08	1,4	0,04	2,10			
2	0	1	0,68	2	1	0,18	1,50	0,09	2,10			
2	0	2	0,91	0	3	0,33	2,20	0,20	2,80			
2	1	0	0,68	1	1	0,19	1,70	0,10	2,30			
2	1	1	0,92	2	1	0,33	2,20	0,20	2,80			
2	1	2	1,2	0	0	0,4	2,5	0,2	3,4			
2	2	0	0,93	1	1	0,34	2,20	0,20	2,80			
2	2	1	1,2	3	2	0,4	2,5	0,2	3,4			

Bảng A.1 (tiếp theo)

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
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

Bảng A.1 (kết thúc)

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									

CHÚ THÍCH Các kết quả này được dựa trên Tài liệu tham khảo [2].

▪ Về việc giải thích các cấp hạng, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Microbiology in foods, 1988, Vol.1, p.280, University of Toronto Press; Toronto, Canada.
 - [2] DE MAN, J.C. MPN tables, corrected. Eur. J. Appl. Biotechnol., 1983, 17, pp. 301-305.
-