

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 7924-1:200**

**ISO 16649-1:200**

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM  
VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP  
ĐỊNH LƯỢNG *ESCHERICHIA COLI* DƯƠNG TÍNH  
 $\beta$ -GLUCURONIDAZA – PHẦN 1: KỸ THUẬT ĐẾM  
KHUẨN LẠC Ở 44 °C SỬ DỤNG MÀNG LỌC VÀ  
5-BROMO-4-CLO-3-INDOLYL  $\beta$ -D-GLUCURONID**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 1: Colony-count technique at 44 °C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide*

HÀ NỘI - 2008

## Lời nói đầu

TCVN 7924 -1:2008 hoàn toàn tương đương với ISO 16649-1:2001;

TCVN 7924-1:2008 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu biến soạn*, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

TCVN 7924:2008 (ISO 16649) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Escherichia coli dương tính β-glucuronidaza*, bao gồm các phần sau:

- TCVN 7924-1:2008 (ISO 16649-1:2001) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Escherichia coli dương tính β-glucuronidaza – Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng màng lọc và 5-bromo-4-clo-3-indolyl-β-D-glucuronid;*
- TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Escherichia coli dương tính β-glucuronidaza – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl-β-D-glucuronid;*
- TCVN 7924-3:2008 (ISO/TS 16649-3:2005) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng Escherichia coli dương tính β-glucuronidaza – Phần 3: Kỹ thuật tính số có xác suất lớn nhất sử dụng 5-bromo-4-clo-3-indolyl-β-D-glucuronid.*

## 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 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. 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 định lượng *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza****– Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng màng lọc  
và 5-bromo-4-clo-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronid**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 1: Colony-count technique at 44 °C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide*

**1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza trong phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi. Phương pháp này sử dụng kỹ thuật đếm khuẩn lạc sau giai đoạn phục hồi sử dụng các màng lọc và ủ ở 44 °C trên môi trường đặc có chứa thành phần tạo sắc để phát hiện enzym  $\beta$ -glucuronidaza.

**CẢNH BÁO – Một số chủng *Escherichia coli* không phát triển được ở 44 °C và cụ thể là các *Escherichia coli* âm tính  $\beta$ -glucuronidaza như *Escherichia coli* O157 sẽ không phát hiện được.**

**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 công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố 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 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 3.1

**Escherichia coli dương tính β-glucuronidaza** ( $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli*)

Vì khuẩn ở nhiệt độ 44 °C hình thành các khuẩn lạc màu xanh điển hình trên môi trường trypton-mặt-glucuronid (TBX) trong các điều kiện được qui định trong tiêu chuẩn này.

#### 3.2

**Định lượng *Escherichia coli* dương tính β-glucuronidaza** (enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli*)

Việc xác định số lượng các đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của *Escherichia coli* dương tính β-glucuronidaza được tính trên mililit hoặc trên gam mẫu, khi phép thử và việc tính toán được thực hiện theo quy định trong tiêu chuẩn này.

## 4 Nguyên tắc

4.1 Cấy một lượng xác định của mẫu thử hoặc một lượng xác định của huyền phù ban đầu lên các màng xenluloza được phủ trên thạch glutamat khoáng cải biến (MMGA), sau đó ủ ở 37 °C trong 4 h.

Sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu cấy vào hai đĩa đối với mỗi độ pha loãng, trong cùng một điều kiện.

4.2 Để phân lập, chuyển các màng từ giai đoạn phục hồi trên MMGA sang thạch trypton-mặt-glucuronid (TBX), rồi ủ ở 44 °C trong 18 h đến 24 h.

4.3 Số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của *Escherichia coli* dương tính β-glucuronidaza trên gam hoặc trên mililit mẫu được tính từ số lượng CFU có màu xanh điển hình (xem điều 10).

## 5 Dịch pha loãng và môi trường cấy

Đối với các phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007).

### 5.1 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần xác định.

### 5.2 Môi trường cấy

#### 5.2.1 Môi trường phục hồi: Thạch glutamat khoáng cải biến (MMGA)

### 5.2.1.1 Thành phần

Natri glutamat	6,35 g
Lactoza	10,0 g
Natri fommat	0,25 g
L-(+)-xystin	0,02 g
L-(+)-axit aspartic	0,02 g
L-(+)-arginin	0,024 g
Thiamin	0,001 g
Axit nicotinic	0,001 g
Axit pantothenic	0,001 g
Magie sunfat ngậm bảy phân tử nước ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,100 g
Sắt (III) amoni xytrat <sup>a</sup>	0,010 g
Canxi clorua ngậm hai phân tử nước ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	0,010 g
Dikali hydro phosphat ( $K_2HPO_4$ )	0,900 g
Amoni clorua	2,5 g
Thạch	9 g đến 18 g <sup>b</sup>
Nước	1 000 ml

<sup>a</sup> Hàm lượng sắt ít nhất là 15 % (phần khối lượng).

<sup>b</sup> Tuỳ thuộc vào sức đông của thạch.

### 5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan amoni clorua trong nước. Cho thêm các thành phần khác vào và đun đến sôi.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng pH phải là  $6,7 \pm 0,2$ , ở  $25^{\circ}C$ .

Chuyển các lượng đến 500 ml môi trường này sang các vật chứa thích hợp (6.10).

Khử trùng 10 min ở nhiệt độ  $115^{\circ}C$  trong nồi hấp áp lực (6.1).

### 5.2.1.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót các lượng từ 12 ml đến 15 ml môi trường này vào các đĩa Petri vô trùng (6.11) và để cho đông đặc.

Làm khô các đĩa thạch [xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007)]. Các đĩa này có thể bảo quản được đến 5 ngày ở  $3^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ .

Các đĩa thạch cần phải đủ khô để hơi nước không xuất hiện trong 15 min khi dàn dịch cấy (1 ml).

## 5.2.2 Môi trường chọn lọc: Thạch trypton-mật-glucuronid (TBX)

### 5.2.2.1 Thành phần

Sản phẩm thuỷ phân casein bằng enzym	20,0 g
Muối mêt No.3	1,5 g
Axit 5-bromo-4-clo-3-indolyl-β-D-glucuronid (BCIG)	144 µmol <sup>a</sup>
Dimetyl sulfoxit (DMSO) <sup>b</sup>	3 ml
Thạch	9 g đến 18 g <sup>c</sup>
Nước	1 000 ml

<sup>a</sup> Ví dụ: 0,075 g muối xylohexylamonii.

<sup>b</sup> Dimetyl sulfoxit là rất độc khi hít hoặc tiếp xúc phải. Cần sử dụng trong tủ hút khói. Vì độc tính đó nên nhà sản xuất khuyến cáo dùng dung dịch pha loãng.

<sup>c</sup> Phụ thuộc vào sức đông của thạch.

### 5.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan BCIG trong dimetyl sulfoxit hoặc trong dung dịch loãng theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Hòa tan tất cả các thành phần trên trong nước và đun đến sôi.

Chỉnh pH để sau khi khử trùng pH phải là  $7,2 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Khử trùng 15 min ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$  trong nồi hấp áp lực (6.1).

### 5.2.2.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Tiến hành theo 5.2.1.3.

## 6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường [xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007)] và cụ thể như sau:

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

6.2 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  và  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

6.3 Tủ sấy hoặc buồng sấy thông gió, có thể duy trì nhiệt độ từ  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  đến  $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , hoặc tủ thổi không khí.

6.4 Tủ lạnh (dùng để bảo quản môi trường đã chuẩn bị), có thể duy trì nhiệt độ ở  $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**6.5 Màng vô trùng hoặc không gây ức chế**, bằng xenlulo axetat hoặc este hỗn hợp của xenoxylo, có cỡ lỗ từ 0,45 µm đến 1,2 µm hoặc đường kính 85 mm.

**6.6 Bộ kẹp đầu tù**, vô trùng, dài khoảng 12 cm.

**6.7 Máy đo pH**, có độ chính xác đến  $\pm 0,1$  đơn vị pH.

Nguồn đo tối thiểu là 0,01 đơn vị pH. Máy đo pH được gắn với hệ thống cân bằng nhiệt bằng tay hoặc tự động.

**6.8 Pipet xả hết (đầu thổi)**, miệng rộng và dung tích danh định 1 ml, được chia vạch 0,1 ml.

**6.9 Ống đồng**, có dung tích thích hợp để chuẩn bị môi trường.

**6.10 Bình, ống nghiệm hoặc chai**, có dung tích thích hợp để khử trùng và bảo quản môi trường cấy.

**6.11 Đĩa Petri**, đường kính khoảng 90 mm.

**6.12 Bộ dàn mẫu**, bằng thuỷ tinh hoặc chất dẻo, ví dụ: que bằng thuỷ tinh, đường kính khoảng 3,5 mm, dài 20 cm, được uốn vuông góc tại một đầu dài khoảng 3 cm và đầu cuối được làm nhẵn bằng cách đốt nóng.

## 7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi thành phần trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên tự thỏa thuận về vấn đề này.

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên tự thỏa thuận về vấn đề này.

## 9 Cách tiến hành

### 9.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng tiếp theo

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm cần xác định.

## 9.2 Phục hồi

**9.2.1** Dùng bộ kẹp đầu tù vô trùng (6.6), đặt màng xenlulo axetat (6.5) lên bề mặt khô của hai đĩa thạch MMGA (5.2.1.3), chú ý không để lẫn bọt khí vào trong màng lọc. Dùng bộ dàn mẫu vô trùng (6.12) để dàn phẳng màng, nếu cần.

Dùng pipet vô trùng (6.8), lấy 1 ml mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu cho vào giữa màng. Dùng bộ dàn mẫu vô trùng, dàn đều dịch cấy trên khắp bề mặt màng, tránh để tràn khỏi màng.

**9.2.2** Lặp lại quy trình trong 9.2.1 với các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, nếu cần, dùng pipet vô trùng khác và que dàn mẫu vô trùng khác cho mỗi dung dịch pha loãng.

**9.2.3** Để các đĩa đã cấy theo phương nằm ngang ở nhiệt độ phòng trong khoảng 15 min cho đến khi dịch cấy đã ngấm sâu vào trong thạch. Ủ ấm các đĩa này  $4\text{ h} \pm 1\text{ h}$  trong tủ ấm (6.2) ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  với màng/mặt thạch hướng lên trên.

## 9.3 Chuyển sang môi trường chọn lọc và ủ ấm

**9.3.1** Sau khi phục hồi, dùng bộ kẹp vô trùng (6.6), chuyển các màng từ MMGA (môi trường phục hồi) sang các đĩa thạch đựng môi trường TBX (5.2.2.3).

**CẢNH BÁO – Màng ẩm ướt sẽ dính vào bề mặt thạch. Tránh để lẫn bọt khí. Không sử dụng bộ dàn mẫu.**

**9.3.2** Ủ ấm các đĩa này từ 18 h đến 24 h trong tủ ấm (6.2) ở nhiệt độ  $44^\circ\text{C}$  và không quá  $45^\circ\text{C}$ , với màng/mặt thạch hướng lên trên. Không chồng các đĩa quá ba lớp.

## 9.4 Đếm các đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU)

Sau giai đoạn ủ ấm quy định (9.3.2), đếm các CFU điển hình của *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza trên mỗi đĩa thạch chứa ít hơn 150 CFU điển hình và ít hơn 300 CFU tổng số (điển hình và không điển hình).

Nếu dịch cấy không thể tách riêng và không thể quan sát được các khuẩn lạc điển hình, thì các đĩa chứa 0 CFU điển hình cần được xem xét theo các phương pháp tính khác nhau như trong điều 10.

## 10 Biểu thị kết quả

### 10.1 Yêu cầu chung

Việc tính toán trong 10.2 cần tính đến các trường hợp thường gấp nhất khi tiến hành theo thực hành phòng thử nghiệm tốt. Cũng có một số trường hợp đặc biệt nhưng cũng hiếm khi xảy ra (ví dụ như số

lượng CFU rất khác nhau giữa hai đĩa từ cùng một dung dịch pha loãng, hoặc các tỷ lệ khác nhau nhiều từ một hệ số pha loãng giữa các đĩa từ hai độ pha loãng liên tiếp). Các kết quả đếm cần được người phân tích có năng lực kiểm tra, giải thích và kết quả đó cũng có thể bị loại bỏ.

## 10.2 Tính toán

Để có kết quả đúng, cần đếm các CFU điển hình trên ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 15 CFU màu xanh điển hình.

Tính  $N$ , số lượng CFU của *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza có mặt trong mẫu thử trên mililit hoặc trên gam sản phẩm bằng công thức (1):

$$N = \frac{\sum a}{V \times (n_1 + 0,1 n_2) \times d} \quad (1)$$

trong đó

$\sum a$  là tổng các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại sau hai độ pha loãng liên tiếp, có ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 15 CFU màu xanh;

$n_1$  là số đĩa được giữ lại tại độ pha loãng thứ nhất;

$V$  thể tích dịch cấy đã dùng trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

$n_2$  là số đĩa được giữ lại tại độ pha loãng thứ hai;

$d$  hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại [ $d = 1$  trong trường hợp (các mẫu ở dạng lỏng) mẫu thử được cấy trực tiếp].

Làm tròn các kết quả đến hai chữ số có nghĩa [xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007)].

Lấy kết quả là số lượng *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza trên mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trên gam (sản phẩm dạng khác) được biểu thị theo số nguyên đến hai chữ số có nghĩa (dưới 100) hoặc theo số từ 1,0 đến 9,9 nhân luỹ thừa của 10.

## 10.3 Ước tính các số lượng nhỏ

10.3.1 Nếu có hai đĩa [của mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc của huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) hoặc của độ pha loãng thứ nhất được cấy hoặc được giữ lại] chứa ít hơn 15 CFU điển hình, thi tính  $N_E$  số CFU của *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza có mặt trong mẫu thử là trung bình của hai đĩa song song theo công thức (2):

$$N_E = \frac{\sum c}{V \times n \times d} \quad (2)$$

trong đó

$\sum c$  là tổng các CFU điển hình đếm được trên hai đĩa;

$V$  thể tích dịch cấy đã dùng trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

$n$  là số đĩa được giữ lại (trong trường hợp này  $n = 2$ );

$d$  hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại [ $d = 1$  trong trường hợp (các mẫu ở dạng lỏng) khi mẫu thử được cấy trực tiếp].

Làm tròn các kết quả đến hai chữ số có nghĩa [xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007)].

Biểu thị kết quả như sau:

- số lượng *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza ước tính trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm dạng khác):  $N_E = Y$ .

**10.3.2** Nếu hai đĩa [của mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) hoặc từ độ pha loãng thứ nhất đã cấy hoặc giữ lại] không chứa CFU điển hình nào, thì biểu thị kết quả như sau:

- ít hơn  $1/d$  *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza trong mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong gam (sản phẩm dạng khác);

trong đó  $d$  là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu hoặc độ pha loãng thứ nhất đã cấy hoặc giữ lại [ $d = 1$  khi sử dụng sản phẩm dạng lỏng (mẫu thử) không cần pha loãng].

**10.3.3** Nếu tất cả các CFU điển hình hoặc không điển hình trên hai đĩa ở độ pha loãng thứ nhất  $d$ , chứa nhiều hơn 300 CFU màu xanh có thể nhìn thấy, hoặc nếu trên hai đĩa ở độ pha loãng tiếp theo  $d_2$  chứa ít hơn 300 khuẩn lạc, không có CFU điển hình nào cần đếm, thì biểu thị kết quả như sau:

- ít hơn  $1/d_2$  và nhiều hơn  $1/d$ , *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza có trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm dạng khác);

trong đó  $d$ , và  $d_2$  là các hệ số pha loãng tương ứng với các dung dịch pha loãng  $d$ , và  $d_2$ .

**10.3.4** Nếu tất cả các CFU điển hình hoặc không điển hình trên hai đĩa ở độ pha loãng thứ nhất  $d$ , chứa nhiều hơn 300, không có CFU điển hình có thể nhìn thấy, hoặc nếu trên hai đĩa ở độ pha loãng tiếp theo  $d_2$  chứa ít hơn 300 khuẩn lạc, không có CFU điển hình cần đếm, thì biểu thị kết quả như sau:

- ít hơn  $1/d_2$  các CFU của *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza có trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm dạng khác);

trong đó  $d_2$  là các hệ số pha loãng tương ứng với dung dịch pha loãng  $d_1$ .

#### 10.4 Phương pháp tính toán: Các trường hợp đặc biệt

**10.4.1** Trong trường hợp, trên hai đĩa ở độ pha loãng  $d_1$  chứa lớn hơn 150 CFU điển hình, trên hai đĩa ở độ pha loãng tiếp theo  $d_2$  chứa ít hơn 15 CFU điển hình:

- nếu số lượng CFU điển hình trên từng đĩa ở độ pha loãng  $d_1$  nằm trong khoảng từ 150 đến 167 (giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với giá trị trung bình bằng 150 CFU), thì sử dụng phương pháp tính đối với trường hợp chung (10.2);
- nếu số lượng CFU điển hình trên từng đĩa ở độ pha loãng  $d_1$  nhiều hơn 167 (giới hạn trên của khoảng tin cậy đối với giá trị trung bình bằng 150 CFU), thì chỉ tính đến kết quả của số đếm của độ pha loãng  $d_2$  và thực hiện tiếp với việc đếm số lượng nhỏ (10.3).

**10.4.2** Trong trường hợp, số đếm các CFU điển hình trên mỗi đĩa đối với tất cả các độ pha loãng đã được cấy có nhiều hơn 150, thì biểu thị kết quả như sau:

- nhiều hơn 150/d *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza có trong mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc gam (sản phẩm dạng khác).

trong đó  $d$  là hệ số pha loãng của dung dịch pha loãng đã cấy sau cùng.

**10.4.3** Trong trường hợp chỉ có hai đĩa từ độ pha loãng thấp nhất (nồng độ cao nhất) chứa ít hơn 150 CFU điển hình, thì tính số  $N'$  các *Escherichia coli* dương tính  $\beta$ -glucuronidaza có mặt trong mẫu thử là trung bình số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa, sử dụng công thức (3):

$$N' = \frac{\sum c}{V \times n \times d} \quad (3)$$

trong đó

$\sum c$  là tổng số khuẩn lạc điển hình đếm được trên hai đĩa, có ít nhất một đĩa chứa tối thiểu là 15 CFU điển hình;

$V$  là thể tích dịch cấy đã cấy trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

$n$  là số đĩa được giữ lại (trong trường hợp này  $n = 2$ );

$d$  là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng được giữ lại.

Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa [xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007)].

## 10.5 Các giới hạn tin cậy

Xem TCVN 6404:2008 (ISO 7218:2007).

## 11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu rõ:

- mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, vien dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các điều kiện thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tuỳ ý, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.
- kết quả thử nghiệm thu được, nêu rõ phương pháp biểu thị đã sử dụng; và
- nếu đáp ứng được yêu cầu về độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] BLAZKO N. Evaluation of the  $\beta$ -glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide in a 24 hour direct plating method for *Escherichia coli*. *J. Food Protection*, 51. p. 402.
  - [2] DAUARE J.M., CAMPBELL D.R and JOHNSON R.W Simplified ~~direct~~ plating method for enhanced recovery of *Escherichia coli* in food. *Journal of Food Science* 50. 1985, pp 1736-1737. 1746.
  - [3] DELISE G.L. and LEY A. Rapid detection of *Escherichia coli* in urine samples by a new chromogenic  $\beta$ -glucuronidase assay. *J. Clin. Microbiol*, 27. 1989, pp. 778-779.
  - [4] KILIAN M. and BULOW P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases. *Ada Pathol. Microbiol. Scand.*, Sect. B. 84. 1976. pp. 245-251.
  - [5] KILIAN M. and BULOW P. Rapid identification of Enterobacteriaceae. Use of a  $\beta$ -glucuronidase detecting agar medium (PGUA agar) for the identification of *Escherichia coli* in primary cultures of urine samples. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Sect. B. 87, 1979. pp. 271-276.
  - [6] LEY A.N . BOWERS R.J. and WOLFE S. Indoxyl- $\beta$ -D-glucuronide, a novel chromogenic reagent for the specific detection and enumeration of *Escherichia coli* in environmental sample. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 1988. pp. 690-693.
  - [7] MANAFI M. and KNEIFEL W. A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in water. *Zentralbl. Hyg.* 189, 1989, pp. 225-234.
  - [8] OGOCN L.D. and WATT A.J. An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 13, 1991, pp. 212-215.
  - [9] RESTAINO L., FRAMPTON E.W. and LYON R.H. Use of chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-GLUC) for enumeration of *Escherichia coli* on 24 hours from ground beef. *J Food Protection*. 53 (6). 1990. pp. 508-510.
  - [10] WATKINS W.O., RIPPEY S.C., CLAVET C.R., KELLY-REITZ D.J. and BURKHARDT W. Novel compound for identifying *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*. 54. 1988, pp. 1874-1875
-