

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6261:2007

ISO 6730:2005

Xuất bản lần 2

**SỮA - ĐỊNH LƯỢNG ĐƠN VỊ HÌNH THÀNH
KHUẨN LẠC TỪ CÁC VI SINH VẬT ƯA LẠNH -
KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 6,5 °C**

*Milk – Enumeration of colony-forming units of psychrotrophic
microorganisms – Colony-count technique at 6,5 °C*

HÀ NỘI - 2007

Lời nói đầu

TCVN 6261:2007 thay thế TCVN 6261:1997;

TCVN 6261:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 6730:2005/ IDF 101:2005;

TCVN 6261:2007 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 và Công nghệ công bố.

Sữa – Định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc từ các vi sinh vật ưa lạnh – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 6,5 °C

*Milk – Enumeration of colony-forming units of psychrotrophic microorganisms –
Colony-count technique at 6,5 °C*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) từ các vi sinh vật ưa lạnh trong sữa nguyên liệu và sữa đã xử lý nhiệt, bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 6,5 °C.

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 6263:2007 (ISO 8261:2001), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6404:2007 (ISO 7218:1996, Amd.1:2001), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6507-1:2005 (ISO 6887-1:1999), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, 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.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

vi sinh vật ưa lạnh (psychrotrophic microorganisms)

các vi khuẩn, nấm men và nấm mốc dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này tạo thành các khuẩn lạc đếm được.

4 Nguyên tắc

4.1 Chuẩn bị các đĩa nuôi cấy, sử dụng môi trường nuôi cấy và một lượng mẫu thử xác định. Chuẩn bị các đĩa khác trong cùng một điều kiện, với các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử.

4.2 Ủ các đĩa này 10 ngày, trong môi trường hiếu khí ở 6,5 °C.

4.3 Tính số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) từ các vi sinh vật trong 1 mililit mẫu thử từ số khuẩn lạc thu được trên các đĩa đã chọn ở các mức pha loãng sao cho thu được kết quả có ý nghĩa.

5 Dung dịch pha loãng và môi trường cấy

5.1 Khái quát

Hướng dẫn chung, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

5.2 Nguyên liệu chính

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

5.3 Dung dịch pha loãng dùng cho mục đích chung

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

5.4 Phân phối, khử trùng và bảo quản

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

5.5 Môi trường cấy

5.5.1 Thành phần

Trypton	5,0 g
Cao men	2,5 g
Glucosa ngậm 1 phân tử nước ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	1,0 g
Sữa bột gầy ^a	1,0 g
Thạch	10 g đến 15 g ^b
Nước	1 000 ml
^a - Sữa bột gầy không chứa các chất gây ức chế. Điều này có thể được chứng minh bằng các phép thử so sánh sử dụng sữa bột gầy đã biết trước không chứa các chất gây ức chế.	
^b Tùy thuộc vào khả năng đông của thạch	

5.5.2 Chuẩn bị

5.5.2.1 Chuẩn bị môi trường hoàn chỉnh khô thương phẩm

Tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất, nhưng trong mọi trường hợp, phải cho thêm sữa bột gầy ngay cả khi nhà sản xuất coi việc thêm như vậy là không cần thiết.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng, pH là 7,0 ở 25 °C.

5.5.2.2 Pha chế từ các thành phần chính khô

Hoà tan và phân tán trong nước theo trình tự sau: cao men, trypton, glucoza và cuối cùng là sữa bột gầy.

CHÚ THÍCH 1 Nước được hâm nóng sẽ giúp cho việc hoà tan tốt hơn.

Cho thêm thạch và đun sôi, khuấy đều cho đến khi thạch tan hoàn toàn, hoặc đun nóng bằng hơi nước trong khoảng 30 phút. Nếu dung dịch không trong thì lọc qua giấy lọc.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng, pH là 7,0 ở 25 °C.

5.5.2.3 Phân phối, khử trùng và bảo quản

Phân phối môi trường này vào các ống nghiệm (6.9) với các lượng từ 12 ml đến 15 ml trong mỗi ống, hoặc vào bình cầu hoặc chai (6.9) với các lượng từ 100 ml đến 150 ml.

Khử trùng 15 phút bằng nổi hấp (6.1) ở $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Nếu môi trường dùng ngay thì làm nguội đến 45 °C trên nổi cách thuỷ (6.5). Nếu không dùng ngay, trước khi bắt đầu tiến hành thử nghiệm vi sinh, để tránh mọi sự chậm trễ khi rót môi trường, làm tan chảy hoàn toàn môi trường trên nổi cách thuỷ (6.6) sau đó làm nguội đến 45 °C trên nổi cách thuỷ (6.5). (Xem 8.5.4).

Bảo quản môi trường đã chuẩn bị ở nơi tối tại nhiệt độ từ 0 °C đến + 5 °C không quá 3 tháng.

Để kiểm tra nhiệt độ của thạch, nên đặt một nhiệt kế vào một lượng dung dịch 15 g/l thạch được đựng trong một bình riêng biệt giống hệt loại bình để đựng môi trường. Việc đun nóng và làm nguội đối với dung dịch kiểm tra nhiệt độ này phải được thực hiện tương tự như đối với môi trường nuôi cấy.

6 Thiết bị, dụng cụ

CHÚ Ý – Phải khử trùng tất cả các dụng cụ tiếp xúc với mẫu thử, với chất pha loãng, với dung dịch hoặc môi trường nuôi cấy phù hợp với TCVN 6263:2007 (ISO 8261:2001).

Có thể dùng các dụng cụ sử dụng một lần để thay cho các dụng cụ thuỷ tinh có thể sử dụng nhiều lần, nếu phù hợp với các yêu cầu qui định.

TCVN 6261:2007

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thử nghiệm vi sinh, các thiết bị cần thiết để xử lý mẫu thử và các dung dịch pha loãng theo quy định của TCVN 6263:2006 (ISO 8261:2001) và các loại sau:

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

Xem TCVN 6404:2007 (ISO 7218:1996, Amd 1:2001).

6.2 Tủ ấm, có khả năng duy trì ở $6,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3 Đĩa Petri, bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.4 Pipet chia độ, được nhét bông ở đầu, đã hiệu chỉnh đến $1\text{ ml} \pm 0,02\text{ ml}$, hoặc $10\text{ ml} \pm 0,2\text{ ml}$, hoặc $11\text{ ml} \pm 0,2\text{ ml}$.

6.5 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì ở $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.6 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì ở nhiệt độ trên $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.7 Thiết bị đếm khuẩn lạc, bao gồm một bộ phận chiếu sáng có nền đen, được gắn với một kính lúp có độ khuếch đại 1,5 lần và có một dụng cụ đếm cơ hoặc điện tử.

6.8 pH mét bù nhiệt, có độ chính xác tới $\pm 0,1$ đơn vị pH ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.9 Ống nghiệm, có dung tích khoảng 20 ml (hoặc bình hoặc chai có dung tích thích hợp) và các bình cầu hoặc chai có dung tích từ 150 ml đến 250 ml dùng để khử trùng và bảo quản môi trường cấy.

Có thể dùng chai hoặc bình cầu có nắp xoáy bằng kim loại không độc.

7 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

8 Cách tiến hành

8.1 Khái quát

Để tăng độ chụm của phương pháp, việc chuẩn bị các dung dịch pha loãng cần phải được chuẩn hoá cẩn thận. Các yếu tố tác động đến độ chụm là:

- kiểu loại thiết bị khuấy trộn;

- thời gian khuấy trộn;
- chất pha loãng;
- thời gian để cho các hạt to lắng xuống và
- thời gian cho phép khi chuẩn bị các dung dịch loãng thập phân.

CHÚ Ý – Phải thực hiện các thao tác vô trùng thông thường. Các thao tác qui định trong 8.2 và 8.3 không được tiến hành dưới ánh nắng mặt trời.

8.2 Chuẩn bị mẫu thử và dung dịch pha loãng ban đầu

Xem 8.2 của TCVN 6263:2007 (ISO 8261:2001).

8.3 Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Xem TCVN 6507-1:2005 (ISO 6887-1:1999) và 8.3 của TCVN 6263:2007 (ISO 8261 : 2001).

Có thể dùng các dãy dung dịch pha loãng khác (ví dụ: dung dịch pha loãng ban đầu của 10 ml mẫu thử trong 90 ml chất pha loãng hoặc 11 ml mẫu thử trong 99 ml chất pha loãng). Độ chính xác và độ chụm của phương pháp sẽ lớn hơn khi sử dụng một lượng lớn hơn của mẫu thử và chất pha loãng.

8.4 Thời gian tiến hành

Xem TCVN 6507-1:2005 (ISO 6887-1:1999).

8.5 Cấy và ủ

8.5.1 Lấy hai đĩa Petri (6.3) vô trùng. Dùng pipet vô trùng (6.4) cho vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử.

8.5.2 Lấy thêm hai đĩa Petri vô trùng. Dùng một pipet vô trùng khác cho vào mỗi đĩa 1 ml dung dịch mẫu thử pha loãng 10^{-1} .

8.5.3 Nếu cần, lặp lại thao tác này, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo.

8.5.4 Kiểm tra nhiệt độ của môi trường cấy (5.5) để đảm bảo không vượt quá 46 °C.

Nếu nhiệt độ của môi trường cấy lớn hơn 46 °C thì có thể làm hư hại hoặc giết chết các vi sinh vật ưa lạnh trong mẫu thử. Nếu cảm thấy bất kỳ có sự hư hại nào, thì phải giãn rộng đĩa và ủ ở nhiệt độ thấp.

Rót vào mỗi đĩa Petri khoảng 12 ml đến 15 ml môi trường nuôi cấy (5.5).

Nếu dùng 15 ml mà không thu được sự phân bố đều của các vi sinh vật thì nên dùng 20 ml.

8.5.5 Trộn thật đều dịch cấy với môi trường bằng cách xoay đĩa Petri và để cho hỗn hợp đông đặc bằng cách đặt các đĩa Petri này trên một mặt phẳng nằm ngang, mát.

8.5.6 Thời gian từ khi chuẩn bị dung dịch pha loãng thứ nhất đến khi trộn chất cấy với môi trường không được quá 15 phút.

8.5.7 Chuẩn bị đủ số đĩa kiểm soát để kiểm tra độ vô trùng.

8.5.8 Lật ngược các đĩa đã cấy xong và đặt chúng vào tủ ấm (6.2) để ở 6,5 °C trong 10 ngày.

Để tránh sự lan rộng, cần phải để phòng như sau:

- phủ thêm một lớp môi trường cấy lên mặt các đĩa cấy sau khi đã đông đặc, hoặc
- nhỏ thêm một giọt glyxerol lên giấy lọc trong nắp của đĩa.

8.5.9 Không chồng quá 6 đĩa lên nhau. Để các chồng đĩa tách xa hẳn nhau cũng như xa thành và nóc tủ ấm.

8.6 Diễn giải

8.6.1 Đếm số khuẩn lạc trên mỗi đĩa (xem 9.1), sử dụng thiết bị đếm khuẩn lạc (6.7).

Kiểm tra các đĩa này dưới ánh sáng dịu. Điều này rất quan trọng vì những chấm khuẩn lạc nhỏ cũng phải được đếm, nhưng điều cơ bản là kỹ thuật viên phải tránh đếm nhầm các hạt nhỏ không tan hoặc hạt kết tủa trong đĩa với các khuẩn lạc nhỏ. Kiểm tra thật cẩn thận các chấm còn nghi ngờ, dùng kính lúp có độ khuếch đại cao hơn để phân biệt được các khuẩn lạc với các chất lạ, nếu cần.

8.6.2 Những khuẩn lạc mọc lan được xem là những khuẩn lạc đơn lẻ. Nếu các khuẩn lạc mọc lan nhưng ít hơn 1/4 bề mặt đĩa thì đếm những khuẩn lạc trên phần còn lại của đĩa và tính số lượng tương ứng cho toàn đĩa. Nếu lan rộng hơn 1/4 bề mặt đĩa thì loại bỏ đĩa đó.

9 Biểu thị kết quả

9.1 Chỉ giữ lại các đĩa có ít nhất là 10 khuẩn lạc và không nhiều hơn 300 khuẩn lạc.

Tính số CFU từ các vi sinh vật, N , trong 1 mililit sữa theo công thức:

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

trong đó

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

n_1 là số đĩa của độ pha loãng thứ nhất được giữ lại có chứa từ 10 đến 300 khuẩn lạc;

n_2 là số đĩa của độ pha loãng thứ hai được giữ lại có chứa từ 10 đến 300 khuẩn lạc;

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

9.2 Nếu có nhiều hơn hai độ pha loãng có thể đếm được cho kết quả từ 10 đến 300 khuẩn lạc thì công thức phải được sửa đổi, có tính đến các độ pha loãng tiếp theo. Với ba độ pha loãng thì theo công thức sau:

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

trong đó

n_3 là số đĩa ở độ pha loãng thứ ba được giữ lại, có chứa từ 10 khuẩn lạc đến 300 khuẩn lạc.

9.3 Làm tròn kết quả thu được đến hai chữ số có nghĩa. Khi số cần làm tròn là 5 mà không có chữ số có nghĩa nào đứng theo sau thì làm tròn số đứng trước chữ số 5 cho thành số chẵn. Ví dụ: 28 500 làm tròn thành 28 000 và 11 500 được làm tròn thành 12 000.

Lấy kết quả là số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) từ các vi sinh vật ưa lạnh trong 1 mililit sữa, biểu thị theo số từ 1,0 đến 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10.

VÍ DỤ: Việc đếm CFU vi sinh vật cho kết quả như sau (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng đã được ủ):

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

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19182$$

Làm tròn kết quả như hướng dẫn trên thu được 19 000 hoặc $1,9 \times 10^4$ CFU vi sinh vật ưa lạnh trong một mililit sữa.

9.4 Nếu có hai đĩa tương ứng với mẫu thử chứa ít hơn 10 khuẩn lạc, thì báo cáo kết quả là "ít hơn $10 \times 1/d$ CFU vi sinh vật ưa lạnh trong một mililit sữa", trong đó d là hệ số pha loãng của độ pha loãng thấp nhất.

TCVN 6261:2007

9.5 Nếu tất cả các đĩa đều chứa nhiều hơn 300 khuẩn lạc, thì tính số lượng ước tính từ các đĩa có số khuẩn lạc gần 300 nhất và nhân số này với số nghịch đảo của độ pha loãng cao nhất. Báo cáo kết quả theo "số lượng ước tính các đơn vị khuẩn lạc vi sinh vật ưa lạnh trong một mililit sữa".

10 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên vật liệu giống hệt nhau, do cùng một người tiến hành trong cùng một phòng thử nghiệm, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá 30 % kết quả thấp hơn.

Nếu có nhiều hơn hoặc bằng 5 % các trường hợp không thoả mãn các yêu cầu về độ lặp lại thì cần xem xét nguồn gốc có khả năng gây sai lệch.

CHÚ THÍCH Định nghĩa về độ lặp lại, xem TCVN 6910-1 (ISO 5725-1).

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ ra:

- 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 đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu độ lặp lại được kiểm tra thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
- [2] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.
- [3] TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
-