

**Research Article****Evaluation of the ability to detect *Bacillus cereus* in food of chromogenic agar media RAPID<sup>®</sup> *B.cereus* according to ISO 7932:2004****Vo Thi Nhu Bich<sup>1</sup>, Truong Huynh Anh Vu<sup>2\*</sup>**<sup>1</sup>*Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam*<sup>2</sup>*Center of Analytical Services and Experimentation of Ho Chi Minh City, Vietnam**(Received: 07 Nov 2023; Revised: 19 Dec 2023; Accepted: 10 Jan 2024)***Abstract**

In this study, the ability to detect *Bacillus cereus* of the new chromogenic agar media RAPID<sup>®</sup> *B.cereus* (RBC) was compared with the standard selective culture media Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) recommended by food authorities for isolation, identification, and quantification of *Bacillus cereus*. Two types of media were used to conduct the assessment on five categories of food, including cereals and cereal products; flour and starch; vegetables and vegetable products; milk and dairy products; and confectionery (n = 164). The results of the survey *Bacillus cereus* contamination on RBC (75.61%), MYP (70.12%), of which 46.09% of the samples didn't meet the standards of the Ministry of Health on the maximum allowable limit of *Bacillus cereus* in food. Conducting performance testing of RBC according to ISO 16140-2:2016 with parameters: growth, selectivity, specificity, relative trueness and accuracy profile, the analysis results all met the criteria according to the standard: the development ( $P_R$ ) of the two media were 0.97 and 0.81 respectively; a high level of background microflora was present on the MYP plates while if it was not the case on the RBC plates; both media allowed the detection of *Bacillus cereus* with a difference of 0.14. Compared with the acceptance criteria as prescribed, the categories used in the study were all suitable for assessment in the new media with the accuracy between the two methods being equivalent.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, chromogenic culture media, method validation

---

\* Corresponding author: Truong Huynh Anh Vu (E-mail: [yutha@case.vn](mailto:yutha@case.vn))

Doi: <https://doi.org/0.47866/2615-9252/vjfc.4207>

## Đánh giá khả năng phát hiện *Bacillus cereus* trong thực phẩm bằng môi trường thạch sinh màu Rapid' *B. cereus*

Võ Thị Như Bích<sup>1</sup>, Trương Huỳnh Anh Vũ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Phòng Vi sinh, Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

### Tóm tắt

Trọng tâm của nghiên cứu này là đánh giá khả năng phát hiện *Bacillus cereus* trong thực phẩm bằng môi trường thạch sinh màu RAPID' *B.cereus* (RBC) được so sánh với môi trường thạch chọn lọc tiêu chuẩn Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP). Năm nhóm mẫu thực phẩm được lựa chọn để tiến hành đánh giá, bao gồm: sữa; ngũ cốc; bột và tinh bột; bánh mứt kẹo; rau củ quả (n = 164). Tỷ lệ nhiễm *Bacillus cereus* bằng môi trường RBC và MYP lần lượt là 75,61% (124/164), 70,12% (115/164). Trong đó có 46,09% mẫu không đạt so với tiêu chuẩn của Bộ Y tế quy định về giới hạn tối đa cho phép *Bacillus cereus* trong thực phẩm. Hiệu năng của môi trường thạch RBC và MYP được thử nghiệm với thông số hệ số phát triển ( $0,5 \leq P_R \leq 1,4$ ) và hệ số chọn lọc ( $S_F \geq 2$ ) đạt yêu cầu theo ISO 11133. Môi trường RBC có độ đúng tương đối ( $S_D = 0,14$ ) và độ chính xác ( $\leq 0,125$ ). Với kết quả thu được, chúng tôi nhận định môi trường RBC phù hợp với ISO 7932:2004 và đề xuất sử dụng môi trường thạch RBC để thiết lập qui trình phân tích định lượng *Bacillus cereus* bằng kỹ đồ đĩa/trái bề mặt với nhiệt độ ủ  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  trong  $24 \pm 3$  giờ. Bên cạnh đó, dữ liệu nghiên cứu góp phần cải tiến quy trình phân tích định lượng *Bacillus cereus* nhằm rút ngắn thời gian thử nghiệm, cung cấp kết quả một cách chính xác, từ đó góp phần nâng cao năng lực quản lý nhà nước về vấn đề an toàn thực phẩm trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh nói riêng và cả nước nói chung.

**Từ khóa:** *Bacillus cereus*, môi trường thạch sinh màu, xác nhận giá trị sử dụng phương pháp

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

*Bacillus cereus* thường được tìm thấy trong một số lượng lớn thực phẩm, đồng thời là nguyên nhân gây hàng loạt các vụ ngộ độc trong nước và trên thế giới [1, 2]. Đặc điểm hình thành bào tử là yếu tố giúp chúng đảm bảo sự sống sót qua hầu hết quy trình chế biến [3]. Việt Nam là quốc gia có khí hậu nhiệt đới, điều này tạo điều kiện thuận lợi cho *Bacillus cereus* phát triển và sản sinh độc tố, đặc biệt người tiêu dùng có thói quen sử dụng nhiều sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc từ nông sản. Do đó, việc phát hiện sớm cũng như định lượng *Bacillus cereus* trong nguyên liệu, quá trình chế biến, thành phẩm... là hết sức cần thiết, nhằm đánh giá mỗi nguy một cách toàn diện, góp phần hạn chế rủi ro về an toàn thực phẩm.

Từ nhiều năm qua, *Bacillus cereus* được định lượng bằng kỹ thuật trái đĩa sử dụng thạch MYP kết hợp với sinh hóa theo ISO 7932:2004 [4]. Tuy nhiên, thời gian phân tích thường 3-4 ngày và hạn chế việc xác định khuẩn lạc đặc trưng đối với một số mẫu có hệ vi sinh vật nền cao [3, 5]. Với xu thế ứng dụng khoa học công nghệ, ngày càng nhiều những

phương pháp thử nghiệm trong lĩnh vực sinh học được cải tiến, thay thế nhằm rút ngắn thời gian phân tích, độ nhạy, độ chính xác và độ đặc hiệu được cải thiện một cách đáng kể so với các phương pháp chuẩn truyền thống. Trong đó, môi trường thạch sinh màu là xu hướng lựa chọn để định lượng nhanh *Bacillus cereus* trong vòng 21-24 giờ, không qua bước kháng định bằng sinh hóa. Để các phòng thử nghiệm có cơ sở lựa chọn, áp dụng các phương pháp mới thì việc xác nhận giá trị sử dụng là điều bắt buộc và cần thiết theo ISO 17025. Do vậy, chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu năng, nghiên cứu độ đúng tương đối và chính xác của môi trường thạch sinh màu RBC so với môi trường MYP nhằm định lượng *Bacillus cereus* theo ISO 7932:2004.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng/vật liệu nghiên cứu

#### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Thạch sinh màu Rapid'*B.cereus* của hãng Bio-rad được cung cấp bởi Công ty TNHH Khoa học Hợp Nhất. Mẫu thực phẩm sử dụng trong nghiên cứu được khách hàng gửi tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP.HCM (CASE) 6 tháng đầu năm 2023.

#### 2.1.2. Chủng chuẩn

Nghiên cứu sử dụng các chủng chuẩn sau: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922. Tất cả các chủng được lưu giữ trong các ống Cryobank ở nhiệt độ  $-70^{\circ}\text{C}$  tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP. HCM.

### 2.2. Môi trường, hóa chất

Nghiên cứu sử dụng các môi trường, hóa chất sau: Maximum Recovery Diluent-MRD (Merck/146809), Mannitol Egg Yolk Polymyxin-MYP (Merck/105267), RAPID'*B.cereus*-RBC (Bio-Rad/12007304), Egg Yolk Emulsion 50% (Merck/103784), Selective Supplement (Merck/109875), Tryptone Soya Agar-TSA (Merck/105458), Nutrient Agar-NA (Merck/105450), Blood Agar Base-BA (Merck/110886).

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Khảo sát mức độ nhiễm *Bacillus cereus* của các nhóm thực phẩm

Thực hiện khảo sát 164 mẫu thực phẩm thuộc 5 nhóm khác nhau, trong đó: Nhóm (1) Ngũ cốc và sản phẩm từ ngũ cốc ( $n = 50$ ); Nhóm (2) Bột và tinh bột ( $n = 36$ ); Nhóm (3) Rau củ và sản phẩm từ rau củ ( $n = 31$ ); Nhóm (4) Sữa và sản phẩm từ sữa ( $n = 21$ ); Nhóm (5) Bánh mứt kẹo ( $n = 26$ ) theo ISO 7932:2004 [4] và thử nghiệm các phản ứng sinh hóa để kháng định *Bacillus cereus* dựa vào AOAC 980.31:1981 [6].

#### 2.3.2. Khảo sát hiệu năng môi trường RBC

Hiệu năng của môi trường RBC được đánh giá thông qua hệ số phát triển ( $0,5 \leq P_R \leq 1,4$ ) và độ chọn lọc ( $S_F \geq 2$ ) theo ISO 11133:2014 [7], cụ thể được tiến hành như sau: chuẩn bị dung dịch chủng dương khoảng  $10^2$  (CFU/mL). Trãi 0,1 mL dung dịch chủng đã chuẩn bị đồng thời lên môi trường cần kiểm tra (RBC) và môi trường tham chiếu (TSA). Các đĩa này được ủ ở  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong  $72 \pm 3$  giờ. Sau khi ủ, đếm tổng số khuẩn lạc *Bacillus cereus* mọc trên các đĩa.

Đối với hệ số phát triển của môi trường đề xuất được tính theo công thức sau:

$$P_R = \frac{N_s}{N_0}$$

Trong đó:

$N_s$ : tổng số khuẩn lạc đếm được trên môi trường đề xuất (RBC)

$N_0$ : tổng số khuẩn lạc đếm được trên môi trường tham chiếu (TSA)

Đối với hệ số chọn lọc, chuẩn bị dung dịch chủng âm ở khoảng  $10^4$  đến  $10^6$  (CFU/mL). Cây chủng lên môi trường cần kiểm tra (RBC) và tham chiếu (TSA). Ủ các đĩa ở  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  trong  $72 \pm 3$  giờ, kết quả được tính theo:

$$S_F = D_0 - D_s$$

Trong đó:

$D_0$ : độ pha loãng cao nhất có vi sinh vật phát triển trên môi trường tham chiếu (TSA)

$D_s$ : độ pha loãng cao nhất có vi sinh vật phát triển trên môi trường đề xuất (RBC)

$S_F$ ,  $D_0$  và  $D_s$  được biểu thị bằng đơn vị  $\log_{10}$

### 2.3.3. Nghiên cứu độ đúng tương đối

Nghiên cứu được thực hiện trên 5 nhóm mẫu nhiễm *Bacillus cereus* được khảo sát ở mục 2.3.1 với số lượng mẫu thử nghiệm cụ thể như sau: nhóm 1 ( $n = 40$ ), nhóm 2 ( $n = 28$ ), nhóm 3 ( $n = 20$ ), nhóm 4 ( $n = 17$ ), nhóm 5 ( $n = 19$ ). Dữ liệu kết quả của từng mẫu trên từng nhóm và mỗi mẫu trong tất cả các nhóm được xử lý bằng phương pháp Bland-Altman theo ISO 16140-2:2016 [8].

### 2.3.4. Nghiên cứu độ chính xác

Nghiên cứu được thực hiện trên 5 nhóm mẫu ở mục 2.3.1, với ít nhất 1 kiểu/loại được thử nghiệm, sử dụng 6 mẫu cho mỗi kiểu/loại. Trong số 6 mẫu gây nhiễm *Bacillus cereus*, 2 mẫu mức nhiễm thấp ( $\sim 10^2$  CFU), 2 mẫu nhiễm mức trung bình ( $\sim 10^3$  CFU) và 2 mẫu mức nhiễm cao ( $\sim 10^5$  CFU). Các mức này phải bao gồm toàn bộ dải nhiễm của kiểu/loại mẫu được chọn. Đối với mỗi mẫu, thực hiện 5 lần lặp lại cho 5 phần mẫu thử khác nhau từ cùng một mẫu. Các mẫu sử dụng và mức nhiễm cụ thể tại Bảng 1.

**Bảng 1.** Mẫu sử dụng trong nghiên cứu độ chính xác và mức gây nhiễm tương ứng

Nhóm	Kiểu/loại	Mức gây nhiễm (CFU)
Ngũ cốc và sản phẩm từ ngũ cốc	Ngũ cốc tổ yến	$\sim 300 / \sim 3000 / \sim 300000$
Bột và tinh bột	Bột mì	$\sim 300 / \sim 3000 / \sim 300000$
Rau củ và sản phẩm từ rau củ	Chuối sấy	$\sim 300 / \sim 3000 / \sim 300000$
Sữa và sản phẩm từ sữa	Sữa bột yến mạch	$\sim 300 / \sim 3000 / \sim 300000$
Bánh mứt kẹo	Bánh Chocolate	$\sim 300 / \sim 3000 / \sim 300000$

Tiến hành tính toán giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, ước tính độ chính xác của phương pháp thay thế so với phương pháp chuẩn, giới hạn dung sai dự kiến  $\beta$ -ETI theo ISO 16140-2:2016 [8].

### 2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Microsoft Office Excel. Đối với việc tính toán độ chính xác, sử dụng bảng tính Excel® tại website của ISO <http://standards.iso.org/iso/16140> và chọn tập AP cho nghiên cứu so sánh phương pháp [9].

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Kết quả khảo sát mức độ nhiễm *Bacillus cereus* của các nhóm mẫu thực phẩm

Tỷ lệ nhiễm *Bacillus cereus* ở 5 nhóm mẫu khảo sát được ghi nhận ở mức 70,12% (Hình 1). Cả 5 nhóm mẫu khảo sát đều có tỷ lệ nhiễm *Bacillus cereus* lớn hơn 50,00%. Trong đó, nhóm 1 và 2 có tỷ lệ nhiễm cao nhất, lần lượt là 74,00% và 75,00%. Tham khảo Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT, có 53/115 mẫu khảo sát (46,09%) không đạt về giới hạn cho phép đối với chỉ tiêu *Bacillus cereus* và mẫu có mật độ cao nhất lên đến  $2,9 \times 10^4$  CFU/g. Kết quả khảo sát mức độ nhiễm *Bacillus cereus* của các nhóm mẫu thực phẩm được đưa ra tại Bảng 2.

**Bảng 2.** Kết quả khảo sát mức độ nhiễm *Bacillus cereus* của các nhóm mẫu thực phẩm

TT	Nhóm	Tổng số mẫu	Nhiễm		Không nhiễm	
			Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)
1	Ngũ cốc và sản phẩm từ ngũ cốc	50	37	74,00	13	26,00
2	Bột và tinh bột	36	27	75,00	9	25,00
3	Rau củ và sản phẩm từ rau củ	31	17	54,84	14	45,16
4	Sữa và sản phẩm từ sữa	21	16	76,19	5	23,81
5	Bánh mứt kẹo	26	18	69,23	8	30,77
<b>Tổng</b>		<b>164</b>	<b>115</b>	<b>70,12</b>	<b>49</b>	<b>29,88</b>

Nguyên nhân nhiễm *Bacillus cereus* phổ biến ở các nhóm mẫu này là khả năng cao chúng hình thành bào tử, sau đó gặp điều kiện môi trường thuận lợi, các bào tử phát triển thành các tế bào sinh dưỡng và được nhân lên [10], việc hình thành nội bào tử còn giúp *Bacillus cereus* có khả năng kháng lại với nhiệt độ cao, điều này gây cản trở và khó khăn cho việc tiệt trùng sản phẩm.

### 3.2. Kết quả khảo sát hiệu năng của môi trường RBC

Nhằm mục đích đánh giá hiệu năng của môi trường thạch RBC thì hệ số phát triển ( $P_R$ ) và độ chọn lọc ( $S_F$ ) được lựa chọn để thử nghiệm, chúng tôi tiến hành khảo sát hệ số phát triển của môi trường thạch RBC với chủng *Bacillus cereus* ATCC 11778. Độ chọn lọc và đặc hiệu được khảo sát với các chủng *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Các bước thực hiện và tính toán kết quả như mục 2.3.2. Kết quả thử nghiệm hệ số phát triển ( $P_R$ ) của môi trường RBC và MYP được trình bày ở Bảng 3.

**Bảng 3.** Kết quả thử nghiệm hệ số phát triển ( $P_R$ ) của môi trường RBC và MYP

Chủng vi sinh vật	Số khuẩn lạc phát triển (CFU)			Hệ số phát triển ( $P_R$ )		Tiêu chí	Đánh giá
	RBC	MYP	TSA	RBC	MYP		



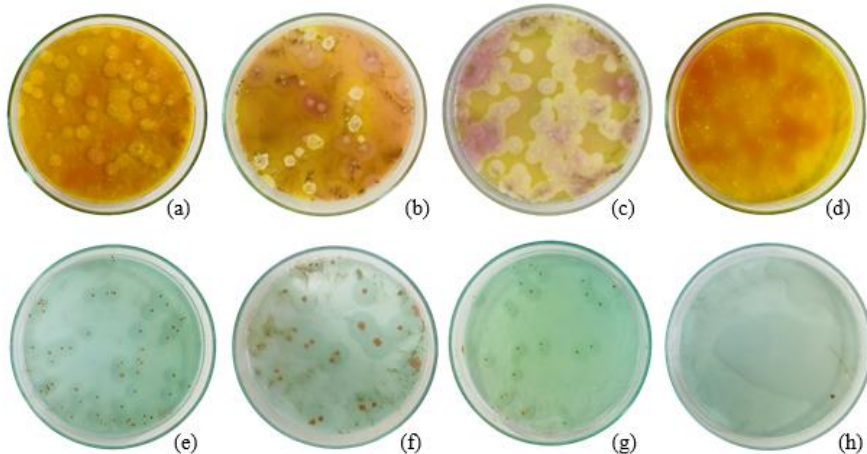
Kết quả thử nghiệm độ chọn lọc ( $S_F$ ) và độ đặc hiệu của môi trường RBC và MYP được trình bày ở Bảng 4.

**Bảng 4.** Kết quả thử nghiệm độ chọn lọc ( $S_F$ ) và độ đặc hiệu của môi trường RBC và MYP

Chủng vi sinh vật	Số khuẩn lạc phát triển (CFU)			Độ chọn lọc ( $S_F$ )		Độ đặc hiệu	
	RBC	MYP	TSA	RBC	MYP	RBC	MYP
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$10^{-1}$ $\log_{10}1,0$	$10^{-1}$ $\log_{10}1,0$	$10^{-4}$ $\log_{10}4,0$	3,0	3,0	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	-	Ức chế hoàn toàn	Khuẩn lạc vàng, không có quang kết tủa

Từ kết quả thu được theo Bảng 3 và 4 cho thấy môi trường thạch RCB có hệ số phát triển, độ chọn lọc, độ đặc hiệu đạt yêu cầu so với tiêu chí chấp nhận. Điều này còn chỉ ra rằng hiệu năng của môi trường thạch RBC hoàn toàn tương đồng với môi trường MYP theo ISO 7932:2004. Ngoài ra, nhóm nghiên cứu còn thực hiện đánh giá trực quan trên 124 mẫu nhiễm tự nhiên (Hình 1). Qua đó cho thấy có nhiều hình dạng khuẩn lạc không đặc trưng *Bacillus cereus* phát triển tốt trên môi trường MYP, ngược lại chúng không xuất hiện trên môi trường RBC đối với các mẫu thực phẩm có hệ vi sinh vật nền cao, các sản phẩm probiotic...

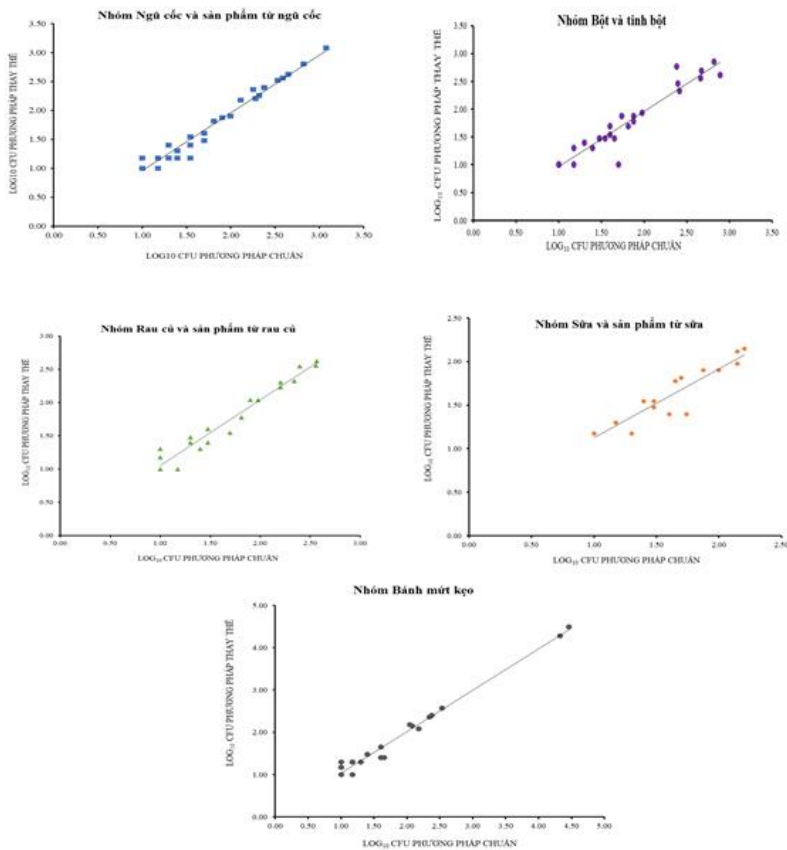
Sự phát triển dày đặc hệ vi sinh vật không phải mục tiêu trên môi trường thạch chọn lọc là yếu tố phổ biến, gây khó khăn trong việc nhận danh và ảnh hưởng đến chất lượng kết quả thử nghiệm không được đảm bảo [11, 12]. Do vậy, việc lựa chọn, đánh giá và sử dụng môi trường chọn lọc có chất lượng trong quá trình kiểm nghiệm vi sinh vật là hết sức cần thiết.



**Hình 1.** Khảo sát độ chọn lọc và độ đặc hiệu của mẫu nhiễm tự nhiên  
(a, b, c, d): Khuẩn lạc phát triển trên môi trường MYP  
(e, f, g, h): Khuẩn lạc phát triển trên môi trường RBC

### 3.3. Kết quả nghiên cứu độ đúng tương đối

Kết quả nghiên cứu độ đúng tương đối được thể hiện lần lượt tại Hình 2.



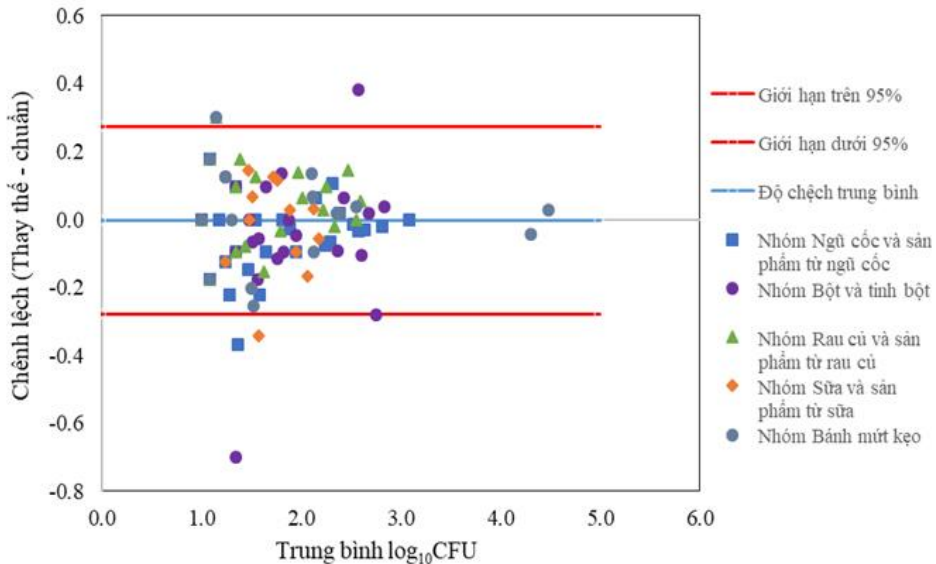
**Hình 2.** Đồ thị điểm kết quả phương pháp chuẩn so với phương pháp thay thế

Đánh giá trực quan nhanh từ Hình 2, cho thấy có sự tương đồng kết quả khảo sát giữa hai môi trường chọn lọc với nhau (nằm sát đường nhận dạng  $y = x$ ). Tiếp tục tính toán chênh lệch trung bình và độ lệch chuẩn của giữa hai phương pháp  $S_D$ , các giới hạn trên và giới hạn dưới cho mỗi nhóm và cho tất cả các nhóm. Kết quả được thể hiện tại Bảng 5.

**Bảng 5.** Tóm tắt việc tính toán các giá trị các nhóm mẫu

Nhóm mẫu	Số lượng mẫu	$\bar{D}$	$S_D$	Giới hạn dưới 95%	Giới hạn trên 95%
Ngũ cốc và sản phẩm từ ngũ cốc	40	-0,04388	0,12286	-0,28468	0,19691
Bột và tinh bột	28	-0,03763	0,17807	-0,38664	0,31138
Rau củ và sản phẩm từ rau củ	20	0,04197	0,11972	-0,19269	0,27663
Sữa và sản phẩm từ sữa	17	0,00703	0,15089	-0,28872	0,30277
Bánh mứt kẹo	19	0,02031	0,13510	-0,24448	0,28509
<b>Tổng</b>	<b>124</b>	<b>-0,00244</b>	<b>0,14133</b>	<b>-0,27944</b>	<b>0,27456</b>

Quan sát trực quan từ đồ thị Bland-Altman (Hình 3) cho thấy 6/124 giá trị dữ liệu nằm ngoài các giá trị giới hạn. So với tiêu chí chấp nhận là có không nhiều hơn 1 trong 20 giá trị dữ liệu sẽ nằm ngoài các giá trị giới hạn, thì phương pháp thay thế phù hợp cho tất cả các loại sản phẩm. Như vậy, qua việc nghiên cứu độ đúng tương đối của phương pháp định lượng nhanh *Bacillus cereus* sử dụng RBC, cả 5 nhóm mẫu đều phù hợp để định lượng trên môi trường RBC. Tuy nhiên, cần đánh giá đối với mẫu nhiễm nhân tạo vì trong mỗi nhóm mẫu đều có sự hiện diện các các mẫu không phù hợp (nằm ngoài đường giới hạn).



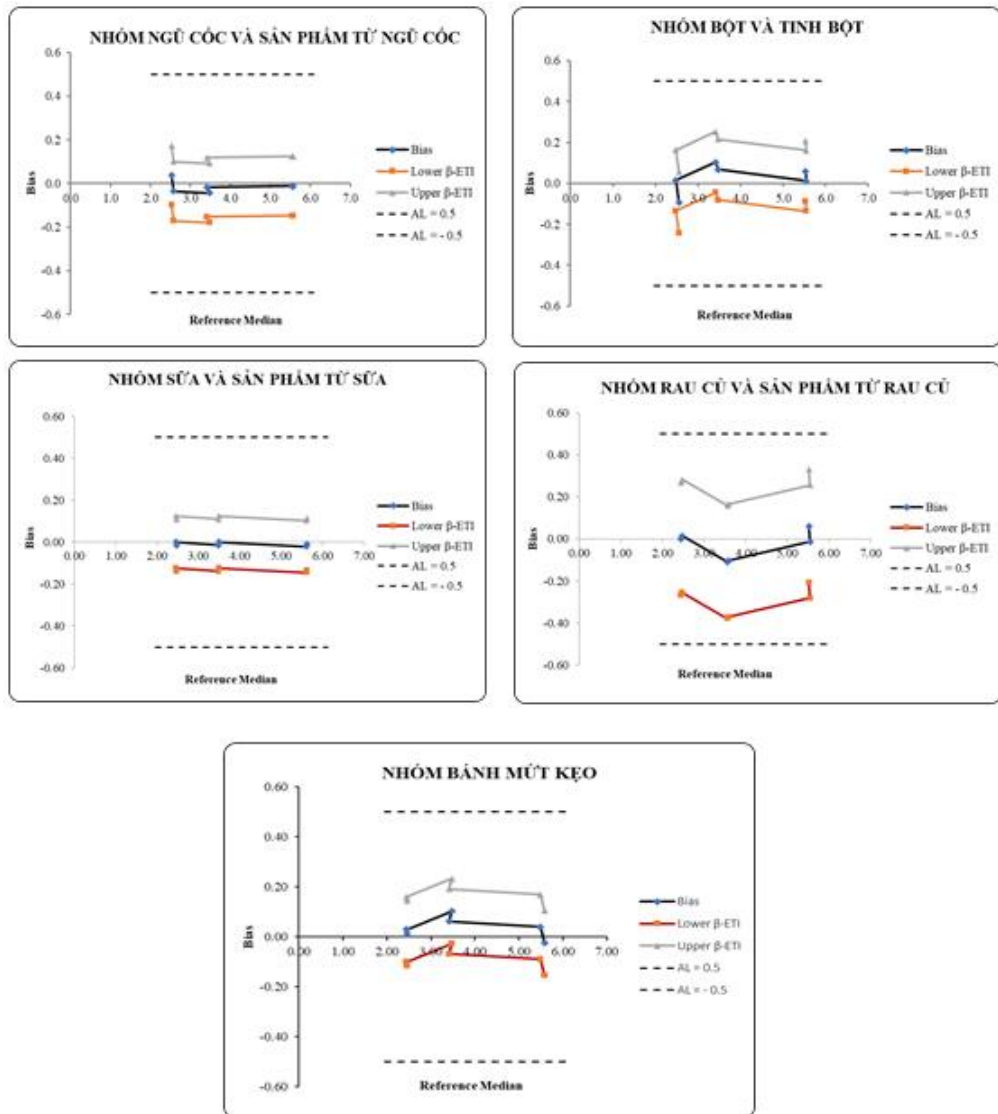
**Hình 3.** Đồ thị chênh lệch Band-Altman đối với tất cả các nhóm mẫu nghiên cứu.

### 3.4. Kết quả nghiên cứu độ chính xác

Nghiên cứu nhằm mục đích so sánh kết quả của phương pháp chuẩn và phương pháp thay thế trong các mẫu gây nhiễm nhân tạo bằng cách phân tích lặp lại của các mẫu trong các nhóm mẫu. Tiến hành chọn ra 6 nhóm mẫu, mỗi nhóm mẫu chọn 1 kiểu/loại, và mỗi kiểu/loại chọn 2 mẫu đã được xác định có kết quả nghiên cứu độ đúng tương đối phù hợp để thực hiện khảo sát. Đối với mỗi nhóm được kiểm tra, ít nhất 1 kiểu/loại phải được thử nghiệm, sử dụng 6 mẫu cho mỗi kiểu/loại. Trong số 6 mẫu gây nhiễm *Bacillus cereus*, 2 mẫu mức nhiễm thấp ( $\sim 10^2$  CFU), 2 mẫu mức nhiễm trung bình ( $\sim 10^3$  CFU) và 2 mẫu mức nhiễm cao ( $\sim 10^5$  CFU). Kết quả tính toán độ chính xác được thể hiện tại Hình 4.

Từ kết quả khảo sát cho thấy, các giới hạn trên và giới hạn dưới ( $\beta$ -ETI) của cả 5 nhóm khi gây nhiễm *Bacillus cereus* ở các nồng độ  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^5$  đều nằm trong các giới hạn chấp nhận. Kết quả nghiên cứu hoàn toàn tương đồng so với dữ liệu xác nhận giá trị sử dụng phương pháp của Bio-Rad (2019) khi tiến hành nghiên cứu trên 7 nhóm với mức bổ sung chủng vào vụn lượ là  $1,0 \times 10^2$ ;  $5,0 \times 10^3$ ;  $1,0 \times 10^5$  CFU/g thì cả 7 nền mẫu thử nghiệm (ngoại trừ nền thủy hải sản) đều nằm trong giới hạn chấp nhận được ( $AL = \pm 0.5$ ) ở cả 2 phương pháp trải hay đổ đĩa [13]. Điều này chứng tỏ đối với các nhóm mẫu nghiên cứu thì độ chính xác của phương pháp thay thế và phương pháp chuẩn là tương đương.





**Hình 4.** Kết quả nghiên cứu độ chính xác trên các nhóm mẫu

#### 4. KẾT LUẬN

Từ những kết quả thu được, việc sử dụng môi trường thạch tạo màu RBC để định lượng nhanh *Bacillus cereus* thay thế môi trường chọn lọc tiêu chuẩn MYP có độ tin cậy cao trên 5 nhóm mẫu được thí nghiệm, đồng thời có nhiều ưu điểm khác như: khuẩn lạc đặc trưng được nhận biết dễ dàng, ức chế hệ vi sinh vật nền... hạn chế sai sót khi đọc/đếm kết quả, từ đó giá trị sử dụng kết quả thử nghiệm được đảm bảo và có tính ổn định cao. Bên cạnh đó, chi phí cũng được từ đó, thời gian phân tích được rút ngắn, giảm thiểu khả năng nhiễm chéo nhờ vào việc lược bỏ một số phản ứng sinh hóa giai đoạn khẳng định; kiểm nghiệm viên hạn chế việc sử dụng và tiếp xúc thường xuyên với kháng sinh. Cần tiếp tục nghiên cứu trên các mẫu nhiễm nhân tạo, mẫu nhiễm tự nhiên có hệ vi sinh vật nền cao, hoạt độ nước thấp, chứa hoạt chất sinh học... như: thức ăn chăn nuôi, vệ sinh công nghiệp, thủy hải sản, thịt tươi sống. Điều này cung cấp dữ liệu góp phần mở rộng phạm vi áp dụng của phương pháp cho mục đích đa dạng sản phẩm.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ môi trường thạch sinh màu Rapid'B.cereus bởi hãng Bio-rad do Công ty TNHH Khoa Học Hợp Nhất phân phối. Cảm ơn các đơn vị, cá nhân tham gia hỗ trợ nghiên cứu nhưng không đóng vai trò là tác giả.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J. L. Schoeni, and A. C. L. Wong, "Bacillus cereus food poisoning and its toxins," *Journal of food protection*, vol. 68, no. 3, pp. 636-648, 2005.
- [2]. Y. B. Park, J. B. Kim, S. W. Shin, J. C. Kim, S. H. Cho, B. K. Lee, and D. H. Oh, "Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea," *Journal of Food Protection*, vol. 72, no 3, pp. 612-617, 2005.
- [3]. J. M. Goepfert, W. M. Spira, and H. U. Kim, "Bacillus cereus: food poisoning organism. A review," *Journal of Food Protection*, vol. 35, no. 4, pp. 213-227, 1972.
- [4]. ISO 7932:2004, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony count technique at 30 degrees C.
- [5]. N. Heini, R. Stephan, M. Ehling-Schulz, and S. Johler, "Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 283, pp. 59-64, 2018.
- [6]. AOAC 980.31:1981, *Bacillus cereus* in foods - Enumeration and confirmation microbiological methods.
- [7]. ISO 11133:2014, Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- [8]. ISO 16140-2:2016, Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
- [9]. International Organization for Standardization, ISO Standards Maintenance Portal, <http://standards.iso.org/iso/16140>.
- [10]. D. Schmid, C. Rademacher, E. E. Kanitz, E. Frenzel, E. Simons, F. Allerberger, and M. Ehling-Schulz, "Elucidation of enterotoxigenic *Bacillus cereus* outbreaks in Austria by complementary epidemiological and microbiological investigations," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 232, pp. 80-86, 2016.
- [11]. J. W. Chon, J. Y. Hyeon, J. H. Park, K. Y. Song, J. H. Kim, and K. H. Seo, "Improvement of mannitol–yolk–polymyxin B agar by supplementing with trimethoprim for quantitative detection of *Bacillus cereus* in foods," *Journal of food protection*, vol. 75, no. 7, pp. 1342-1345, 2012.
- [12]. J. N. Meng, Y. J. Liu, X. Shen, J. Wang, Z. K. Xu, Y. Ding, and Z. L. Xu, "Detection of emetic *Bacillus cereus* and the emetic toxin cereulide in food matrices: Progress and perspectives," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 123, pp. 322-333, 2022.
- [13]. NF VALIDATION, "Validation of alternative analytical methods EN ISO 16140 validation of RAPID'B.cereus method for the enumeration of bacteria from *Bacillus cereus* in food products, animal feed and production environmental samples", 2019.