



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

SẢN PHẨM THỰC PHẨM

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TỔNG SỐ VI KHUẨN
HIẾU KHÍ

TCVN 5165 - 1990

HÀ NỘI

Cơ quan biên soạn: Viện Dinh dưỡng - Bộ Y tế

Cơ quan đề nghị ban hành: Bộ Y tế

Cơ quan trình duyệt: Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường -
Chất lượng

Cơ quan xét duyệt và ban hành: Ủy ban Khoa học Nhà nước
Quyết định ban hành số 735/QĐ ngày 31 tháng 12 năm 1990

!	SẢN PHẨM THỰC PHẨM	!TCVN 5165-90!
!	Phương pháp xác định tổng số vi	!-----!
!	khuẩn hiếu khí.	!Khuyến khích!
!	Foods	! áp dụng !
!	Method for enumeration of total	! !
!	aerobic bacteria.	! !
!		! !

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp đếm tổng số vi khuẩn hiếu khí trong các loại sản phẩm thực phẩm.

1. Nguyên tắc

Sử dụng kỹ thuật đồ đĩa, đếm khuẩn lạc trên môi trường thạch sau khi ủ hiếu khí ở nhiệt độ $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong thời gian từ 48 đến 72 giờ. Số lượng vi khuẩn hiếu khí trong 1 g hoặc 1 ml mẫu sản phẩm thực phẩm kiểm nghiệm được tính từ số khuẩn lạc đếm được từ các đĩa nuôi cấy theo các đậm độ pha loãng.

2. Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu theo TCVN 4886-89.

Lượng mẫu cân tối thiểu để pha loãng không ít hơn 1ml đối với các sản phẩm lỏng và $10 \pm 0,1$ g đối với các sản phẩm khác.

3. Thiết bị, dụng cụ

- Đĩa petri thủy tinh đường kính 90 - 100 mm ;
- pipet có chia độ loại 1, 5, 10 ml đã tiệt khuẩn;
- nồi cách thủy điều chỉnh được nhiệt độ $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- tủ ấm điều chỉnh được nhiệt độ $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- tủ sấy khô ;
- nồi hấp áp lực ;
- bình thủy tinh dung tích 250 - 500 ml;

- ống nghiệm loại 16 - 160 mm hoặc lớn hơn ;
- pH mét hoặc giấy đo pH.

4. Hóa chất, môi trường

4.1. Hóa chất

- Thạch dùng cho vi sinh vật ;
- Pepton dùng cho vi sinh vật ;
- Natri clorua tinh khiết (NaCl);
- Cao thịt ;
- Cao men;
- trypton ;
- Glucoza tinh khiết ;
- Natri hydrophotphat tinh khiết (Na_2HPO_4);
- Kali dihydrophotphat tinh khiết (KH_2PO_4);
- Natri hydroxit tinh khiết (NaOH), dung dịch 0,1 N. .

4.2. Môi trường

a) Nước dậm pepton

Pepton	10g
NaCl	5g
Na_2HPO_4	9g
KH_2PO_4	1,5g
Nước cất	1000 ml

b) Nước pepton

Pepton	1g
NaCl	8,5g
Nước cất	1000 ml

Cách pha chế : Đun sôi để hòa tan các chất. Để nguội đến $30 \pm 5^\circ\text{C}$. Điều chỉnh pH bằng dung dịch NaOH 0,1 N sao cho sau khi tiệt khuẩn $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$. Rót vào các bình dung tích 250 ml mỗi bình 90 ml, vào các ống nghiệm mỗi ống 9 ml

môi trường. Tiệt khuẩn trong nồi hấp ở nhiệt độ 120°C -15 phút.

Môi trường nếu không dùng ngay, cần được bảo quản nơi khô ráo, trong bóng tối, ở nhiệt độ từ 0 đến 5°C không quá 30 ngày.

c) Môi trường thạch thường glucoza

Pepton	10 g
NaCl	5 g
Cao thịt	5 g
Glucoza	1 g
Thạch	15-20 g
Nước cất	1000 ml

d) Môi trường thạch trypton glucoza

Trypton	5 g
Cao men	2,5 g
glucoza	1 g
Thạch	15-20 g
Nước cất	1000 g

Cách pha chế: Đun nhỏ lửa, khuấy đều để hòa tan các chất đến khi sôi. Để nguội môi trường đến $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$, điều chỉnh pH sao cho sau khi tiệt khuẩn $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$. Rót vào các bình thủy tinh lượng môi trường không quá 1/2 dung tích bình. Tiệt khuẩn trong nồi hấp ở nhiệt độ 120°C -15 phút.

Nếu môi trường sử dụng ngay, để nguội đến $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ở nồi cách thủy, nếu chưa sử dụng thì cần bảo quản ở nơi khô ráo, trong bóng tối với nhiệt độ từ 0 đến 5°C không quá 30 ngày. Trước khi nuôi cấy đun cách thủy cho môi trường nóng chảy và để nguội đến $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

e) Thạch màng

Thạch	5 - 10 g
Nước cất	1000 ml

Dun nhỏ lửa, khuấy đều để hòa tan thạch đến khi sôi. Để nguội môi trường đến $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$, điều chỉnh pH sao cho sau khi tiệt khuẩn $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$. Rót vào các ống nghiệm mỗi ống 4 ml hoặc bình thủy tinh không quá 100 ml môi trường. Tiệt khuẩn trong nồi hấp ở nhiệt độ $120^{\circ}\text{C} - 15$ phút. Sử dụng và bảo quản như mục (d).

5. Các bước nuôi cấy

5.1. Pha loãng mẫu

Pha loãng mẫu theo TCVN 4887-89.

Pha loãng mẫu cho đến khi có được đậm độ pha loãng cần thiết đủ đếm được số khuẩn lạc trên đĩa theo dự tính.

5.2. Đồ đĩa

Đối với một mẫu kiểm nghiệm phải nuôi cấy ít nhất 3 đậm độ, mỗi đậm độ dùng 2 đĩa petri và 1 pipet vô khuẩn riêng.

Lấy 1 ml sản phẩm (lỏng) hoặc dung dịch pha loãng ở những đậm độ khác nhau cho vào giữa từng đĩa petri.

Rót vào từng đĩa 12 - 15 ml môi trường thạch c hoặc d, trộn đảo đều dung dịch mẫu và môi trường bằng cách lắc sang phải và sang trái mỗi chiều 3 lần.

Để các đĩa thạch đông tự nhiên trên mặt phẳng ngang.

Thời gian từ khi bắt đầu pha loãng mẫu đến khi rót môi trường không được quá 30 phút.

Nếu dự đoán trong sản phẩm có chứa vi sinh vật mọc lan trên mặt thạch thì sau khi môi trường đã đông đổ tiếp 4 ml thạch màng lên trên mặt.

5.3. Ủ ấm

Khi thạch đã đông, lật sắp các đĩa petri và để vào tủ ấm ở nhiệt độ $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ từ 48 đến 72 giờ.

Sau 48 giờ tính kết quả sơ bộ bằng cách đếm những khuẩn lạc đã mọc trên các đĩa nuôi cấy, sau 72 giờ tính kết quả chính thức.

6. Tính kết quả

Chọn tất cả các đĩa có không quá 300 khuẩn lạc để tính kết quả. Sự phân bố của các khuẩn lạc trên các đĩa nuôi cấy phải hợp lý: độ pha loãng càng cao thì số khuẩn lạc càng ít. Nếu kết quả không hợp lý, phải tiến hành lại các bước nuôi cấy (5). Tính kết quả như sau:

6.1. Chọn những đĩa có từ 15 đến 300 khuẩn lạc ở các đĩa của 2 đậm độ pha loãng liên tiếp. Nếu chênh lệch các giá trị của 2 đậm độ trên nhỏ hơn hoặc bằng 2 lần, tính số (N) khuẩn lạc vi khuẩn hiếu khí cho 1 g hoặc 1 ml sản phẩm bằng cách tính trung bình cộng tổng số khuẩn lạc của các đĩa trên theo công thức sau:

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

C: Số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn.

n_1, n_2 : Số đĩa ở 2 đậm độ pha loãng liên tiếp đã chọn thứ 1, thứ 2.

d: Hệ số pha loãng của đậm độ pha loãng đã chọn thứ 1.
Làm tròn số kết quả có được, chỉ giữ lại 2 số có nghĩa.

Biểu thị kết quả dưới dạng thập phân giữa 1,0 và 9,9 nhân với 10^n (n là số mũ thích hợp của 10).

Ví dụ: ở đậm độ pha loãng 10^{-2} có 150 và 215 khuẩn lạc;

ở đậm độ pha loãng 10^{-3} có 16 và 25 khuẩn lạc.

$$N = \frac{150 + 215 + 16 + 25}{(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}} = 18480$$

Kết quả: $1,8 \cdot 10^4$ vi khuẩn hiếu khí trong 1 g hoặc 1 ml sản phẩm.

6.2. Nếu chênh lệch các giá trị ở 2 đậm độ pha loãng lớn hơn 2 lần, lấy giá trị của đậm độ pha loãng thấp hơn để tính kết quả.

Ví dụ: ở đậm độ pha loãng 10^{-2} có 180 và 250 khuẩn lạc; ở đậm độ pha loãng 10^{-3} có 60 và 75 khuẩn lạc.

Chọn đậm độ pha loãng thấp hơn (10^{-2}) để tính kết quả.

$$N = \frac{180 + 250}{2 \cdot 10^{-2}} = 21500$$

Kết quả: $2,2 \cdot 10^4$ vi khuẩn hiếu khí trong 1 g hoặc 1 ml sản phẩm.

6.3. Nếu 2 đĩa của sản phẩm lỏng nguyên chất hoặc đậm độ pha loãng ban đầu có ít hơn 15 khuẩn lạc, tính kết quả theo trung bình cộng của các khuẩn lạc đếm được ở cả 2 đĩa tính ra cho 1 g hoặc ml sản phẩm.

Ví dụ: chỉ ở đậm độ pha loãng 10^{-1} của sản phẩm đặc có 12 và 8 khuẩn lạc.

$$N = \frac{12 + 8}{2 \cdot 10^{-1}} = 100$$

Kết quả: $1,0 \cdot 10^2$ vi khuẩn hiếu khí trong 1 g sản phẩm.

6.4. Nếu ở tất cả các đĩa không có khuẩn lạc nào mọc, đánh giá kết quả như sau:

- Ít hơn 1 vi khuẩn hiếu khí trong 1 ml sản phẩm!
 - Ít hơn $1 \frac{1}{d}$ vi khuẩn hiếu khí trong 1 g sản phẩm.
- d: Hệ số pha loãng của đậm độ pha loãng ban đầu (10^{-1}).

7. Báo cáo kết quả.

Trong báo cáo kết quả kiểm nghiệm phải nêu phương pháp đã dùng và cách tính được: số vi khuẩn hiếu khí có trong 1 g hoặc 1 ml sản phẩm kiểm tra.

Sai lệch của phương pháp : trong 95 % trường hợp, sai lệch giới hạn của phương pháp từ 12 đến 37 % .
