

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 5518-1991

(SE 557 6076-87)

THỨC PHẨM

PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ XÁC ĐỊNH SỐ
VI KHUẨN HỌ ENTEROBACTERIACEAE

HÀ NỘI

LỜI NÓI ĐẦU

TCVN 5518-1991 phù hợp với ST SEV 6076-87

TCVN 5518-1991 do Trung tâm Tiêu chuẩn-Đo lường-Chất lượng khu vực 1 biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị và được Ủy ban Khoa học Nhà nước ban hành theo quyết định số 613/QĐ ngày 8 tháng 10 năm 1991.

THỰC PHẨM

Phương pháp phát hiện và xác định
lượng vi khuẩn họ enterobacteriaceae

FOODSTUFFS

Methods for the detection and enumeration of
enterobacteriaceae

Tiêu chuẩn này qui định những phương pháp phát hiện và xác định số vi khuẩn họ Enterobacteriaceae có trong thực phẩm. Tiêu chuẩn này phù hợp với ST SEV 6076-87.

1. ĐỊNH NGHĨA

Vi khuẩn họ Enterobacteriaceae là vi khuẩn hình que, gram âm, lên men glucoza và tạo phản ứng oxydaza âm tính.

2. QUI ĐỊNH CHUNG

Khi có số lượng vi khuẩn Enterobacteriaceae ít hơn 15 trong 1cm^3 và nhiều hơn 3 trong 100cm^3 mẫu thử lỏng, hay là ít hơn 150 trong 1 gam và nhiều hơn 3 trong 10 gam mẫu thử ở trạng thái khác thì áp dụng phương pháp xác định số có xác suất lớn nhất. Khi số lượng vi khuẩn họ Enterobacteriaceae, lớn hơn 15 trong 1cm^3 mẫu thử lỏng hoặc nhiều hơn 150 trong 1 gam mẫu thử đặc, thì áp dụng phương pháp cấy vào môi trường aga trong hộp petri. Khi phát hiện họ Enterobacteriaceae trong một lượng mẫu nhất định áp dụng phương pháp tăng sinh sơ bộ.

3. NỘI DUNG CỦA PHƯƠNG PHÁP

3.1. Phương pháp xác định số có xác suất lớn nhất dựa trên cơ sở cấy sản phẩm và các đậm độ pha loãng của chúng trong các ống nghiệm có môi trường lỏng chọn lọc, ủ ấm ở điều kiện hiếu khí ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 24 ± 3 giờ.

3.2. Phương pháp xác định số lượng vi khuẩn, trong môi trường đặc dựa trên việc cấy thực phẩm hoặc các đậm độ pha loãng của chúng vào môi trường thạch chẩn đoán chọn lọc, ủ ấm ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 24 giờ.

3.3. Phương pháp phát hiện vi khuẩn dựa trên việc cấy một lượng sản phẩm thực phẩm xác định trong ống nghiệm có môi trường lỏng không chọn lọc, tăng sinh sơ bộ, ủ ấm ở $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 18 ± 2 giờ, cấy truyền sang môi trường lỏng phân lập và cấy truyền tiếp trên bề mặt môi trường agar chẩn đoán chọn lọc có glucoza.

4. MẪU THỬ

4.1. Mẫu thử được lấy và chuẩn bị kiểm nghiệm theo TCVN 4886-89 (ST SEV 3013-14) và 4887-89 (ST SEV 3014-81).

4.2. Khối lượng (thể tích) của mẫu kiểm nghiệm dùng để chuẩn bị dung dịch pha loãng ban đầu không được ít hơn $10,0 \pm 0,1\text{g}(\text{cm}^3)$. Nếu cấy trực tiếp vào môi trường agar chẩn đoán thì lấy $1,0\text{cm}^3$ mẫu lỏng hoặc $1,0\text{cm}^3$ huyền dịch gốc (mẫu ở dạng khác). Nếu cấy vào môi trường lỏng không chọn lọc để tăng sinh sơ bộ thì lấy không ít hơn $1\text{g}(\text{cm}^3)$ mẫu thử.

5. DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ

Để tiến hành kiểm nghiệm mẫu dùng những dụng cụ và thiết bị theo TCVN 4887-89 (ST SEV 3014-89) và thêm :

- 1- Cân thí nghiệm;
- 2- Nồi hấp;
- 3- Bếp cách thủy;
- 4- pH mét với độ chính xác $\pm 0,1$;
- 5- Tủ ấm ở $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- 6- Hộp petri có đường kính trong là $90 \pm 2\text{mm}$ hoặc $100 \pm 2\text{mm}$;
- 7- Ống nghiệm có kích thước (16x160)mm và (20 x 20)mm
- 8- Pipét 1cm^3 và 10cm^3 .
- 9- Que cấy;
- 10- Que cấy có đầu bằng platin hoặc là dũa thủy tinh;
- 11- Kim cấy

6. THUỐC THỬ, DUNG DỊCH, MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG

Để tiến hành kiểm nghiệm cần có :

- 1- Pepton;
- 2- Tropton hoặc dịch thủy ngân casein bằng men;
- 3- Chiết thịt (cao thịt)

- 4- Chiết nấm men khô (cao men)
- 5- Natriclorua (NaCl)
- 6- Glucoza
- 7- Kalidihydrophotphat (KH_2PO_4)
- 8- Dinatrihydrophotphat khan (Na_2HPO_4)
- 9- Dinatri hydrophotphat ngậm 12 phân tử nước
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

10- Muối mật số 3 (Natritorocolat)

11- Mật bò khô

12- Aga

13- Tím tinh thể, dung dịch 1% và 0,1% pha chế như sau :
1,0g bột thuốc nhuộm, hoà tan trong 80cm^3 nước cất đã đun nóng tới 60°C , khuấy liên tục trong ống đong có nút mài. Sau khi làm nguội định mức trong bình định mức đến 100cm^3 . Từ dung dịch gốc đó pha loãng thêm bằng nước cất với tỷ lệ 1 : 9 đối với môi trường mục 6.20, cả hai loại dung dịch đó bảo quản trong lọ màu ở nhiệt độ phòng không quá 3 tháng.

14- Cồn etylic 96%

15- Đỏ trung tính, dung dịch 1% trong cồn. Pha chế như sau : cho 1,0g bột đỏ trung tính vào bình định mức và thêm từ từ cồn etylic 96% đến 100cm^3 đồng thời khuấy trộn liên tục. Dung dịch được bảo quản trong bình màu sẫm, kín ở nhiệt độ phòng không quá 3 tháng.

16- Dung dịch lục sáng (xanh brilliant), dung dịch 0,5% pha chế như sau : cho 0,5g lục sáng vào bình định mức và rót nước cất đến 100cm^3 . Dung dịch bảo quản trong lọ kín có màu tối ở nhiệt độ phòng không quá 3 tháng.

17- Dung dịch đỏ bromocresol 1%. Pha chế như sau :

Cho 1,0g đỏ bromocresol hoà tan trong 5cm^3 dung dịch Natri hidroxit 4% và định mức bằng nước cất tới 100cm^3 . Bảo quản dung dịch trong lọ kín có màu tối ở nhiệt độ phòng không quá 3 tháng.

18- Nước pepton có đậm. Pha chế như sau :

10,0g pepton; 5,0 Natriclorua; 9,0 g Natri Dinatrihidro-
photphat; 1,5g Kalidihydrophotphat. Hoà tan trong 1000cm^3 nước

cất đã đun sôi. Hỗn hợp được làm nguội tới $45-55^{\circ}\text{C}$ và chỉnh sao cho sau khi thanh trùng có độ pH đạt $7,0 \pm 0,1$ ở 25°C . Môi trường được phân phối vào các ống nghiệm, mỗi ống $9,0 \text{ cm}^3$ và vào các bình nếu cần thể tích lớn hơn. Thanh trùng trong 20 phút ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Bảo quản, môi trường không quá 7 ngày ở $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

19- Canh thang glucoza có đậm với xanh Brillant và mật pha chế như sau :

19.1. Canh thang loãng : 10,0g pepton; 5,0g glucoza; 6,5g dinatrihidrophotphat; 2,0 g kali dihidrophotphat; 20,0g mật bò khô; $3,0 \text{ cm}^3$ dung dịch xanh Brillant. Hoà tan trong 1000 cm^3 nước cất trong khoảng thời gian không quá 30 phút, nhanh chóng làm nguội tới $45-55^{\circ}\text{C}$ và chỉnh pH sao cho pH đạt khoảng $7,2 \pm 0,1$ ở 25°C . Môi trường không thanh trùng ở nồi hấp mà phân phối vào những ống nghiệm vô trùng có kích thước $16 \times 160 \text{ mm}$; mỗi ống 10 cm^3 .

19.2. Canh thang đặc : pha chế như chỉ dẫn ở trên nhưng mỗi thành phần lấy số lượng gấp đôi và phân phối vào ống nghiệm vô trùng có kích thước $20 \times 200 \text{ mm}$.

20. Thạch glucoza - Tím tinh thể - đỏ trung tính - muối mật. Pha chế như sau :

20.1. Môi trường cơ bản : 7,0g pepton; 3,0g cao men; 5,0g natri clorua; 15,0g aga, hoà tan trong 1000 cm^3 nước cất sôi. Hỗn hợp được làm nguội tới $45-55^{\circ}\text{C}$ và điều chỉnh độ pH sao cho sau khi khử trùng pH đạt $7,4 \pm 0,1$ ở 25°C . Môi trường cơ bản được thanh trùng 15 phút ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Bảo quản trong lọ kín không quá 30 ngày ở $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

20.2. Môi trường chuẩn bị từ môi trường cơ bản :

1000 cm^3 môi trường cơ bản đã đun tan chảy được bổ sung 10,0g glucoza; 1,5g muối mật; $2,0 \text{ cm}^3$ dung dịch tím tinh thể 1%; 3,0g dung dịch đỏ trung tính trong cồn 1%; hỗn hợp trên đun nóng trên bếp cách thủy ở nhiệt độ $85-95^{\circ}\text{C}$ trong 20-30 phút. Thỉnh thoảng khuấy đều.

20.3. Chuẩn bị, môi trường từ tất cả các thành phần tức là không chuẩn bị môi trường cơ bản đã chuẩn bị riêng. Hoà tan tất cả các thành phần của môi trường đã cho ở trên với nước cất đang sôi hoặc hơi thoát nước. Hỗn hợp được làm nguội tới $45 - 55^{\circ}\text{C}$ và

chỉnh độ pH sao cho pH đạt $7,4 \pm 0,1$ ở 25°C . Môi trường không thanh trùng trong nồi hấp, môi trường đặc không đem đun chảy. Môi trường được chuẩn bị theo mục 20.2 hoặc 20.3 dùng để cấy trong thạch phải sử dụng ngay trong ngày pha chế. Môi trường pha chế theo mục 20.2 và 20.3 sử dụng để cấy trên bề mặt thạch được rót vào hộp petri, bảo quản không quá 3 ngày ở $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

21. Môi trường thạch. Pha chế như sau :

5,0g pepton; 3,0g chiết thịt 15,0 - 18,0g aga, hoà tan trong 1000 cm^3 nước cất sôi. Hỗn hợp được làm nguội tới $45-55^{\circ}\text{C}$. Môi trường được thanh trùng 20 phút ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Chính độ pH sao cho pH đạt $7,0 \pm 0,1$ ở 25°C . Rót vào hộp petri bảo quản không quá 7 ngày ở $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

22. Môi trường thạch glucoza : pha chế như sau :

10,0 g tripton hoặc dịch thủy phân casein bằng men, 1,5g chiết thịt bì, 5,0g Natriclorua; 10,0g glucoza; 1,5 cm^3 dung dịch đỏ bromocresol và 15,0g aga. Hoà tan trong 1000 cm^3 nước cất sôi. Hỗn hợp được làm nguội tới $45-55^{\circ}\text{C}$ và chỉnh pH để đạt pH là $7,0 \pm 0,1$ ở 25°C . Phân phối môi trường vào ống nghiệm mỗi ống khoảng $7,8\text{ cm}^3$, thanh trùng 20 phút ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ và để đông lại theo phương thẳng đứng. Bảo quản không quá 7 ngày ở $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Trước khi cấy làm tan thạch ống trên bếp cách thủy và để nguội tới $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

23. Dung dịch N,N,N', N' tetrametyl-para - phenilendiamin dihydroclorua 1%. Pha chế như sau :

1,0g thuốc thử hoà tan trong 100 cm^3 , nước cất ở nhiệt độ $10-15^{\circ}\text{C}$. Dung dịch được pha chế ngay trước khi sử dụng.

24. Giấy chỉ thị màu và các thuốc thử khác để thử oxidazo.

25. Dung dịch và thuốc nhuộm gram theo qui định hiện hành.

7. TRÌNH TỰ THỬ

7.1. Xác định số có xác suất lớn nhất của vi khuẩn họ Enterobacteriaceae.

7.1.1. Tùy thuộc vào số lượng khuẩn lạc Enterobacteriaceae

giả định trong mẫu thử và tùy thuộc vào đậm độ mẫu thử để nuôi cấy theo qui định hiện hành. Sử dụng canh thang glucoza có xanh brilliant và mật theo mục 6.19.

7.1.2. Môi trường đã cấy ủ ấm ở $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 3 giờ.

7.1.3. Với mỗi ống dương tính (môi trường vẫn đục hoặc biến màu) cấy truyền lên bề mặt của môi trường chẩn đoán có glucoza theo mục 6.20. trong hộp petri và phân bố các vạch cấy sao cho các khuẩn lạc mọc riêng rẽ tách rời nhau. Môi trường đã cấy ủ ấm $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 3 giờ.

7.1.4. Với mỗi môi trường thạch đã cấy và ủ ấm theo mục 7.1.3. có những khuẩn lạc điển hình có màu hồng hoặc đỏ (có vùng kết tủa hoặc không kết tủa), hoặc ó những khuẩn lạc không màu và nhầy (có vùng kết tủa hoặc không kết tủa) với đường kính không nhỏ hơn 0,5mm, chọn tùy ý 5 khuẩn lạc như vậy để phân lập tiếp theo mục 7.4.1. và làm các thử nghiệm sinh hoá khẳng định tiếp theo trong mục 7.4.3.

7.2. Xác định số lượng vi khuẩn họ Enterobacteriaceae bằng phương pháp cấy trên bề mặt thạch trong hộp petri.

7.2.1. Tùy thuộc vào số lượng giả định vi khuẩn họ Enterobacteriaceae trong mẫu thử và tùy thuộc vào độ đậm đặc của mẫu thử cấy theo qui định hiện hành dùng môi trường thạch glucoza - muối mật số 3 - đỏ trung tính - tím tím thể theo mục 6.20.

Mẫu thử được pha loãng từ những dung dịch pha loãng sao cho trên mỗi hộp petri mọc từ 15 đến 150 khuẩn lạc điển hình. Cấy từng 1cm^3 mẫu thử lỏng và các dung dịch pha loãng của nó hoặc từng 1cm^3 huyền dịch gốc (đối với mẫu thử ở dạng khác) và các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo song song vào hai hộp petri. Rót $10 \pm 1\text{cm}^3$ môi trường đã đun tan và làm nguội tới $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ không chậm quá 15 phút sau khi cấy. Nhanh tay trộn đều môi trường với dung dịch mẫu bằng cách xoay tròn và để đông đặc trên mặt phẳng ngang. Môi trường đã cấy và để đông đặc như trên, rót tiếp $(15 \pm 2)\text{cm}^3$ môi trường đã làm nguội tới $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ lên trên.

7.2.2. Sau khi lớp môi trường phía trên đông đặc lật ngược hộp lồng và ủ ấm ở $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 3 giờ.

7.2.3. Đếm các hộp petri có từ 15 đến 150 khuẩn lạc điển hình theo mục 7.1.4. Từ những hộp petri này lấy 5 khuẩn lạc tùy ý để phân lập tiếp theo mục 7.4.1. và làm tiếp phản ứng sinh hoá theo mục 7.4.3. để khẳng định.

7.3. Phát hiện vi khuẩn họ Enterobacteriaceae

7.3.1. Mẫu thử với khối lượng không ít hơn 1g (cm^3) đem cấy trong nước pepton có đậm theo mục 6.18 với tỷ lệ 1:9 và ủ ấm ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 18 ± 2 giờ.

7.3.2. Giống nhận được ở 7.3.1. đem cấy truyền 1cm^3 sang ống nghiệm có canh thang glucoza đậm có mật và Brillant xanh loãng (6.19.1) và ủ ấm ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 24 ± 3 giờ.

7.3.3. Sau đó thực hiện tiếp theo mục 7.1.3 và 7.1.4.

7.4. Khẳng định khuẩn.

7.4.1. Phân lập : mỗi khuẩn lạc đã được chọn để khẳng định đem cấy truyền bằng kim cấy lên trên bề mặt aga theo mục 6.21. Sao cho có thể có được các khuẩn lạc mọc riêng biệt. Để môi trường đã cấy vào tủ ấm ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 24 ± 3 giờ.

7.4.2. Trong trường hợp còn hồ nghi về khuẩn lạc điển hình, được phép nhuộm gram theo qui định hiện hành và soi kính hiển vi.

Khuẩn lạc họ Enterobacteriaceae là loại khuẩn hình que gram âm.

7.4.3. Thử nghiệm sinh hoá và đọc kết quả.

7.4.3.1. Phản ứng oxydazo :

Lấy một phần khuẩn lạc riêng biệt có được ở mục (7.4.1) bằng kim cấy platin hoặc đũa thủy tinh lên tờ giấy lọc đã thấm thuốc thử theo mục 6.2.3. Nếu xuất hiện màu đỏ tía đến 10 giây là phản ứng dương tính. Phản ứng âm tính điển hình đối với họ Enterobacteriaceae là màu không đổi.

Cho phép thử nghiệm oxydazo thực hiện bằng việc sử dụng giấy chỉ thị màu và các phản ứng khác theo mục 6.24. Trong trường hợp này vi khuẩn thuộc họ Enterobacteriaceae, được xét theo biểu hiện của phản ứng mà tài liệu tương ứng chỉ dẫn.

7.4.3.2. Lên men glucoza.

Một phần khuẩn lạc tách riêng nhận được ở mục 7.4.1. đem cấy

trích sâu trong cột thạch đứng (6.22), ủ ấm ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 24 ± 3 giờ. Sự lên men glucoza đặc trưng cho khuẩn họ Enterobacteriaceae biểu hiện bằng màu vàng của môi trường dọc theo đường trích, khuẩn mọc khỏe kèm theo sinh khí hoặc không sinh khí dẫn tới làm rạn nứt cột thạch.

Sự xuất hiện màu vàng ở phần trên cột môi trường aga hoặc chỉ ở trên bề mặt môi trường thì không được tính vì đó không phải đặc trưng đối với vi khuẩn họ Enterobacteriaceae. Đó có thể là kết quả sự tăng trưởng của vi khuẩn loài Acinetobacter. Đó là loại khuẩn hình que, gram âm, hiếu khí bắt buộc, phản ứng oxydazo âm tính.

8. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ

8.1. Kết quả được đọc theo từng mẫu riêng biệt.

8.2. Phương pháp số có xác suất lớn nhất của vi khuẩn họ Enterobacteriaceae xác định theo số lượng ống nghiệm dương tính theo qui định hiện hành. Những ống nghiệm dương tính là những ống nghiệm được xác nhận theo mục 7.4 cho dù có 1 khuẩn lạc.

8.3. Bằng phương pháp cấy vào môi trường aga trong hộp petri (theo mục 7.2.3) số lượng vi khuẩn họ Enterobacteriaceae được xác định dựa trên số khuẩn lạc điển hình đã được xác nhận như sau :

Khi có 80% khuẩn lạc điển hình (không ít hơn 4/5) khẳng định theo mục 7.4, để đếm số lượng vi khuẩn họ Enterobacteriaceae trong 1g hoặc 1 cm^3 mẫu thử, cần tính tất cả các khuẩn lạc điển hình đã mọc trên hộp petri.

Trong những trường hợp còn lại số lượng vi khuẩn họ Enterobacteriaceae được xác định bằng tỷ lệ phần trăm số khuẩn lạc đã phân lập so với số khuẩn lạc đã lấy để phân lập.

Xử lý kết quả và tính toán trên 1g (cm^3) mẫu thử, ghi chép kết quả theo qui định hiện hành.

8.4. Vi khuẩn họ Enterobacteriaceae được coi là phát hiện ra trong mẫu phân tích khi xác định được dù chỉ một khuẩn lạc theo cách xác nhận ở mục 7.4 và ghi "phát hiện" hoặc "chưa phát hiện".

Phụ lục

ĐỘ CHÍNH XÁC CỦA CÁC PHƯƠNG PHÁP

Những giới hạn thống kê tin cậy được của phương pháp xác định số có xác suất lớn nhất của vi sinh vật đối với xác suất 95% và 99% theo qui định hiện hành.

Độ chính xác thống kê qui định cho 95% trường hợp xác định số lượng vi khuẩn họ Enterobacteriaceae bằng phương pháp nuôi cấy trong môi trường aga ở hộp petri có từ 15-150 khuẩn lạc điển hình là từ $\pm 16\%$ đến 52%. Xác định số lượng sơ bộ vi khuẩn họ Enterobacteriaceae trong $1g(cm^3)$ thực phẩm.

Khi có ít hơn 15 khuẩn lạc điển hình người ta xác định sơ bộ số lượng vi khuẩn họ Enterobacteriaceae trong $1g (cm^3)$ thực phẩm với điều kiện là những khuẩn lạc điển hình đó mọc trong môi trường nuôi cấy mẫu thử lỏng hoặc từ dịch pha loãng 10^{-1} của mẫu thử ở trạng thái khác, và đã xác định được là khuẩn lạc đó thuộc vi khuẩn họ Enterobacteriaceae.

Khi tính toán số lượng sơ bộ vi khuẩn họ Enterobacteriaceae, trong $1g (cm^3)$ thực phẩm, lấy số trung bình các khuẩn lạc đã xác nhận từ hai hộp petri cấy song song làm tròn đến số lớn hơn gần nhất.