

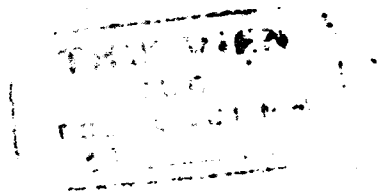
**TCVN**

**TIÊU CHUẨN VIỆT NAM**

**TCVN 5648 - 1992**

**THỦY SẢN KHÔ XUẤT KHẨU**

**PHƯƠNG PHÁP THỬ VI SINH**



**HÀ NỘI - 1992**

## LỜI NÓI ĐẦU

TCVN 5648 - 1992 dựa trên TCVN 5649 - 1992; TCVN 5289 - 90; TCVN 5287 - 90; các tài liệu kỹ thuật của Công ty xuất khẩu Thủy sản và các tài liệu hướng dẫn kỹ thuật của Bộ Thủy sản;

TCVN 5648 - 1992 do Viện Nghiên cứu Hải sản biên soạn, Bộ Thủy sản đề nghị ban hành và được Ủy ban Khoa học Nhà nước ban hành theo Quyết định số 130/QĐ ngày 28 tháng 02 năm 1992.

# THỦY SẢN KHÔ XUẤT KHẨU

## PHƯƠNG PHÁP VI SINH

*Dried aquatic products for export  
Determination of micro-organisms*

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp thử vi sinh đối với các sản phẩm thủy sản khô xuất khẩu.

### 1. LẤY MẪU VÀ CHUẨN BỊ MẪU THỬ

Theo TCVN 5287-90.

### 2. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Kiểm tra tổng số vi khuẩn hiếu khí, *Escherichia Coli*, *Salmonella*, *shigella*, *Staphilococcus aureus* theo TCVN 5289-90.

2.2. Kiểm tra *Clostridium perfringens*, theo TCVN 4991- 89 (ISO 7937-1985)

2.3. Kiểm tra nấm mốc, theo TCVN 5287-90.

2.4. Kiểm tra *Vibrio parahaemolyticus*.

2.4.1. Nguyên tắc chung: *Vibrio parahaemolyticus* là vi trùng có hình dấu phẩy, có khả năng di động, không sinh bào tử, Gram(-). Dựa vào các đặc điểm hình khối, các phản ứng sinh hóa để nhận biết. Dựa vào màu sắc và đặc điểm khuẩn lạc trên môi trường phân lập để đếm số lượng *V. Parahaemolyticus* có trong 1g mẫu thử.

2.4.2. Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử, theo mục 1.

2.4.3. Dụng cụ, hóa chất, môi trường, theo phụ lục.

2.4.4. Tiến hành thử

Lấy 9 - 12 hộp lồng (loại đường kính 9cm), chia thành 3 - 4 nhóm mỗi nhóm 3 hộp, đánh số từ 1 - 4 (theo độ pha loãng của dung dịch mẫu).

Mỗi độ pha loãng dùng một pipet vô trùng, lấy 1ml dịch khuẩn của từng độ pha loãng cho vào từng hộp lồng đã đánh số (chỉ mở nắp chỉ đủ để cấy mẫu, tránh nhiễm khuẩn ngoài vào). Dun chảy môi trường T.C.B.S, để nguội đến 42-45°C, Đổ khoảng 10-15ml vào các hộp lồng đã cấy mẫu. Lắc vòng tròn hộp lồng theo hai chiều ngược

nhau, mỗi chiều 5 vòng để cho môi trường và mẫu trộn đều. Để thạch đông, lật ngược hộp lồng, để trong tủ ấm ở 37°C trong 24 giờ.

#### 2.4.5. Đọc kết quả

Chọn các hộp lồng có khuẩn lạc tròn, nhỏ, màu xanh để đếm. Chỉ đếm những hộp lồng có từ 10-100 khuẩn lạc.

Nhân số khuẩn lạc đếm được trên mỗi hộp lồng với số lần pha loãng tương ứng. Giá trị trung bình cộng của số khuẩn lạc tính được từ các đậm, độ pha loãng khác nhau của cùng một mẫu thử là kết quả tổng số *Vibrio parahaemolyticus* có trong 1g mẫu thử.

#### Chú thích:

Để xác định chính xác sự có mặt của *Vibrio parahaemolyticus* có trong mẫu thử, cần phải tiến hành xác định thêm một số phản ứng sau đây:

- Nhuộm gram: Lấy canh trùng non đã cấy 6 giờ trên môi trường nước pepton kiềm để soi nhuộm, *V. parahaemolyticus* có hình que, hơi cong, Gram (-).

- Thử các phản ứng sinh hóa, theo TCVN 5287-90 (mục 2.7: Phương pháp kiểm tra *Salmonella*).

*V. parahaemolyticus* có các phản ứng sau:

Latoza (-), Glucoza (+), Sacaroza (-), dihydrosunfat (-), sinh hơi (-), ure (+).

- Thử IMVIC, theo TCVN 5287-90 (mục 2.5: Phương pháp kiểm tra *Escherichia coli*).

*V. parahaemolyticus* có các phản ứng:

Indol (+), đỏ methyl (-), V.P (-), Xitrat (+).

- Thử nghiệm pháp Kanagawa : cấy ria thưa vi khuẩn từ khuẩn lạc nghi ngờ trên môi trường T.C.B.S lên mặt thạch môi trường Kanagawa. Nếu xuất hiện vòng tan huyết xung quanh khuẩn lạc, là phản ứng dương tính.

- Thử phản ứng Oxidaza: cho vài giọt các dung dịch P.aminoclimethylanillin Oxalat 1% và X. naphthol 1% vào các khuẩn lạc nghi ngờ. Nếu xuất hiện màu xanh dương thẫm là phản ứng dương tính.

- Thử phản ứng Catalaza : cho 1 ml dung dịch hydroperoxyt ( $H_2O_2$ ) vào canh trùng 24 giờ (đặt ống môi trường trên giá ống nghiệm). Nếu thấy xuất hiện các bọt khí là phản ứng dương tính.

- Thử khả năng chịu mặn trên môi trường nước pepton có các nồng độ muối natriclorua: 2%, 3% và 7%.

*V. parahaemolyticus* có khả năng chịu muối như sau:

- Nồng độ muối Natriclorua 0% (-)

- Nồng độ muối Natriclorua 3% (+)

- Nồng độ muối Natriclorua 7% (+)

## Phụ lục

1. Dụng cụ: Hộp lồng (9cm), ống nghiệm, pipet 1 - 2 ml, và các dụng cụ khác để kiểm tra vi sinh vật.

## 2. Hóa chất:

- P. aminodim thylanilin oxalat 1% trong nước.
- X. naphtol 1% trong cồn 95%.

## 3. Môi trường:

- T.C.B.S (Thiosunfat citrat blue Salt Saccaroza agar): cao nấm men 3g, pepton 10g, natrithiosunfat 10g, natriritrat 10g, mật bò 8g, Saccaroza 20g, natri clorua 10g, sắt xitrat 1g, bromothymol xanh 0,004g, thymol blue 0,04g, agar-agar 14g. Nước cất 1 lít, PH 8,6. Đun khuấy đến sôi cho tan hoàn toàn - phân vào ống nghiệm mỗi ống 10-15ml. Để nguội đến 45 - 50°C (chú ý: không khử trùng bằng autoclave).

- Môi trường nước pepton kiềm: pepton 10g, natriclorua 10g, pH 9,0 - 9,2. Hòa tan các chất trên vào 1 lít nước cất, điều chỉnh pH, phân vào các ống nghiệm 10 - 15ml. Hấp 105 - 110°C trong 15 phút.

- Môi trường thử phản ứng sinh hóa, theo TCVN 5287-90 (mục 2.7 : kiểm tra Salomonella).

- Môi trường Simons citrat, theo TCVN 5287-90 (mục 2.5 : kiểm tra E.coli).

- Môi trường thử nghiệm theo phương pháp Karagawa Cao nấm men 0,5g, pepton, natriclorua 10g, manitol 0,05g, agar - agar 1,5g, tím tinh thể 0,0001g, pH 7,5.

Đan hỗn hợp các chất trên trong 1 lít nước cất. Hấp 105-110°C trong 15 phút. Trước khi dùng cứ 100 ml môi trường (50°C) thêm vào 10 ml huyền phù 20% hồng cầu của người.