

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 11039-2:2015

Xuất bản lần 1

**PHỤ GIA THỰC PHẨM -
PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VI SINH VẬT -
PHẦN 2: XÁC ĐỊNH TỔNG SỐ VI SINH VẬT HIẾU KHÍ
BẰNG KỸ THUẬT ĐẾM ĐĨA XOẮN**

*Food additive - Microbiological analyses -
Part 2: Determination of total aerobic count by spiral plate count technique*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 11039-2:2015 được xây dựng trên cơ sở tham khảo JECFA 2006, *Combined compendium of food additive specifications, Volume 4: Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications*;

TCVN 11039-2:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F4 Gia vị và phụ gia thực phẩm biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 11039 *Phụ gia thực phẩm – Phương pháp phân tích vi sinh vật* gồm các phần sau:

- TCVN 11039-1:2015, *Phần 1: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa*;
- TCVN 11039-2:2015, *Phần 2: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa xoắn*;
- TCVN 11039-3:2015, *Phần 3: Phát hiện và định lượng coliform và E. coli bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp chuẩn)*;
- TCVN 11039-4:2015, *Phần 4: Phát hiện và định lượng coliform và E. coli bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp thông dụng)*;
- TCVN 11039-5:2015, *Phần 5: Phát hiện Salmonella*;
- TCVN 11039-6:2015, *Phần 6: Phát hiện và định lượng Staphylococcus aureus bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc*;
- TCVN 11039-7:2015, *Phần 7: Phát hiện và định lượng Staphylococcus aureus bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN)*;
- TCVN 11039-8:2015, *Phần 8: Định lượng nấm men và nấm mốc*.

Phụ gia thực phẩm - Phương pháp phân tích vi sinh vật - Phần 2: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng phương pháp đếm đĩa xoắn

Food additives – Microbiological analyses –

Part 2: Determination of total aerobic count by spiral plate count technique

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng vi sinh vật hiếu khí có trong phụ gia thực phẩm bằng kỹ thuật đếm đĩa xoắn (SPLC).

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Vi sinh vật hiếu khí (aerobic micro-organisms)

Vi khuẩn, nấm men và nấm mốc hình thành khuẩn lạc có thể đếm được, phát triển trong điều kiện hiếu khí theo quy định trong tiêu chuẩn này.

3 Nguyên tắc

Phương pháp này sử dụng đĩa cơ học để cấy mẫu dạng lỏng vào đĩa thạch xoay. Thể tích mẫu được phân phối giảm khi kim cấy di chuyển từ tâm đĩa ra mép đĩa đang xoay. Nồng độ vi sinh vật được xác định bằng cách đếm các khuẩn lạc tại một phần của đĩa Petri, là phần có thể đếm được và chia số đếm này cho thể tích thích hợp. Một lần cấy xác định mật độ vi sinh vật từ 500 đến 500 000 trên mỗi millilit. Đối với các mật độ vi sinh vật cao hơn, có thể pha loãng tiếp.

4 Môi trường cấy và dịch pha loãng

4.1 Dung dịch natri hypoclorit (NaOCl) thương mại, nồng độ khoảng 5 %.

4.2 Dung dịch natri hypoclorit (NaOCl) thương mại, nồng độ 5,25 %.

4.3 Nước pha loãng vô trùng.

4.4 Môi trường thạch để đếm đĩa (PCA)

4.4.1 Thành phần

Trypton	5,0 g
Chất chiết nấm men	2,5 g
Dextrose	1,0 g
Thạch	15 g
Nước	1 000 ml

4.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước. Có thể đun nóng nước để hoà tan các thành phần.

Thêm thạch và đun đến sôi, thỉnh thoảng khuấy cho đến khi tan hết thạch.

Phân phối môi trường vào các ống hoặc bình thủy tinh có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực (5.1) ở 121 °C. Chính pH sao cho sau khi khử trùng, pH đạt $7,0 \pm 0,2$, nếu cần.

5 Thiết bị, dụng cụ

Có thể dùng dụng cụ thủy tinh sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu chúng có các đặc tính thích hợp.

Sử dụng các thiết bị của phòng thử nghiệm vi sinh và cụ thể là:

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

5.2 Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở $35 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

5.3 Đĩa Petri, bằng nhựa hoặc thủy tinh, có chiều cao 15 mm, đường kính 100 mm hoặc 150 mm.

5.4 Pipet, có dung tích danh định 1 ml, 5 ml và 10 ml, được chia vạch đến 0,1 ml.

5.5 pH mét, có độ chính xác $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25 °C.

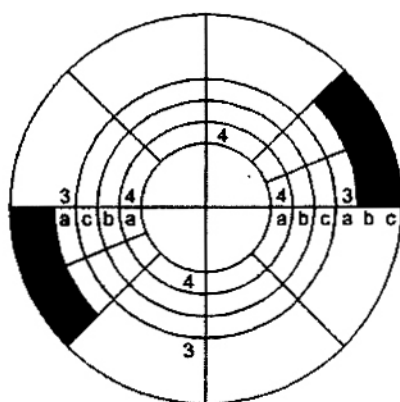
5.6 Nhiệt kế, có thể đo với khoảng nhiệt độ thích hợp.

5.7 Thiết bị cấy xoắn.

5.8 Lưới đếm (xem Hình 1)

Sử dụng cùng lưới đếm cho cả đĩa Petri 100 mm và đĩa Petri 150 mm. Sử dụng màn chắn đối với đĩa 100 mm. Lưới đếm được chia thành tám phần hình quạt bằng nhau; mỗi hình quạt được chia bởi bốn dây cung đánh số 1, 2, 3 và 4 từ mép ngoài của lưới đếm. Các đường kẻ bên trong các hình cung được bổ sung để thuận tiện cho việc đếm. Hình vành khăn là vùng nằm giữa hai dây cung bên trong hình quạt. Số lượng vùng đã đếm (ví dụ: 3) là số hình vành khăn được đếm bên trong một hình quạt. Thiết bị cấy đĩa xoắn sẽ cấy mẫu lên đĩa thạch theo cùng cách thức giữa các lần.

CHÚ THÍCH: Khi các khuẩn lạc được đếm bằng lưới, thể tích mẫu sẽ lớn hơn vì đếm từ mép ngoài về phía tâm đĩa.



Hình 1 – Lưới đếm

5.9 Bẫy chân không, để rút bỏ chất lỏng, gồm chai chân không từ 2 lít đến 4 lít, hoạt động như bầu chứa và nguồn chân không từ 66,7 kPa đến 80,0 kPa (từ 500 mmHg đến 600 mmHg).

5.10 Cốc có mỏ loại nhỏ dùng một lần, dung tích 5 ml.

5.11 Túi polyetylen, dùng để bảo quản các đĩa đã chuẩn bị.

5.12 Xyranh, với đầu tip Luer để chống tắc nghẽn kim.

6 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên có liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu được trộn đều để thu được các phần mẫu thử đồng nhất.

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị đĩa thạch

Sử dụng bộ phân phối vô trùng tự động khi chuẩn bị các đĩa thạch. Thể tích thạch được phân phối vào các đĩa cần giống nhau vì tỉ lệ nhiễm tạp là thấp so với việc rót thạch thủ công trong phòng thử nghiệm. Khi dùng tủ cấy, sử dụng bộ phân phối tự động. Rót các lượng thạch giống nhau vào tất cả các đĩa sao cho thạch có cùng độ dày, để đầu kim của thiết bị cấy xoắn duy trì góc tiếp xúc như nhau. Các đĩa thạch phải bằng phẳng trong quá trình để nguội.

Trước khi đổ đĩa, nên sử dụng phương pháp sau đây: dùng bộ phân phối tự động hoặc rót một lượng thạch cố định (khoảng 15 ml cho đĩa 100 mm; 50 ml cho đĩa 150 mm) đã khử trùng ở nhiệt độ từ 60 °C đến 70 °C vào từng đĩa Petri (5.3). Để cho thạch đông đặc trên bề mặt phẳng và đặt các đĩa đã rót thành từng chồng không nhiều hơn 10 đĩa. Đặt các đĩa thạch đã đặc vào các túi polyetylen (5.12), làm kín túi bằng nhiệt và úp ngược, ở nhiệt độ từ 0 °C đến 4,4 °C. Giữ các đĩa thạch đã rót ở nhiệt độ phòng trước khi cấy.

8.2 Quy trình cấy

Sử dụng thiết bị cấy xoắn (5.7) cấy lên bề mặt đĩa thạch đã chuẩn bị (8.1) để đếm vi sinh vật trong các dung dịch chứa từ 500 đến 500 000 vi sinh vật trên millilit. Trong dài đếm được quy định, không cần sử dụng các chai pha loãng hoặc pipet và các thiết bị phụ trợ khác. Khoảng cách giữa các mẻ là tối thiểu và thời gian để kiểm tra thiết bị là ít hơn 2 min. Thiết bị cấy giảm dần lượng mẫu theo đường xoắn Acsmet lên bề mặt đĩa thạch. Thể tích mẫu của bất kì phần nào của đĩa đều biết trước. Sau khi cấy, các khuẩn lạc mọc dọc theo đường xoắn. Nếu các khuẩn lạc trên một phần của đĩa có khoảng cách thích hợp so với phần khác thì đếm chúng trên lưới đếm (5.8) đã hiệu chuẩn thể tích với diện tích của phần đĩa.

Kiểm tra hàng ngày góc nghiêng của đầu tip và chỉnh lại nếu cần (sử dụng chân không để giữ nắp trên bề mặt đầu tip; đầu tip ở vị trí đúng hướng nếu mặt phẳng của nắp song song và cách bề mặt nền khoảng 1 mm). Cho chất lỏng di chuyển qua hệ thống bằng chân không. Trước khi đưa mẫu vào, làm sạch đầu tip bằng cách tráng bằng dung dịch natri hypoclorit (4.1) trong 1 s, sau đó tráng tiếp bằng nước pha loãng vô trùng (4.3) trong 1 s. Thực hiện bước tráng giữa các lần thực hiện mẫu để giảm thiểu nhiễm chéo. Sau khi tráng, đưa mẫu vào đầu tip của ống teflon bằng chân không, sử dụng van hai chiều. Khi ống teflon và xyranh (5.13) đã chứa đầy mẫu thì đóng van gắn với xyranh. Đặt đĩa thạch lên mặt phẳng, đặt đầu tip lên bề mặt thạch và khởi động motor của thiết bị cấy xoắn (5.7). Trong quá trình cấy, ghi nhãn các nắp đĩa Petri. Sau khi cấy xong, nhấc đầu cấy ra khỏi bề mặt thạch và dùng

thiết bị. Lấy đĩa thạch đã cấy ra và đậy nắp. Di chuyển đầu cấy về vị trí khởi động. Tráng hệ thống bằng hypoclorit (4.1) và nước, sử dụng chân không, sau đó đưa mẫu mới vào. Lật ngược các đĩa và đặt ngay đĩa vào tủ ấm (5.2) trong $48 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ ở $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

8.3 Kiểm soát vô trùng

Kiểm soát sự vô trùng của thiết bị cấy đĩa xoắn sau mỗi dãy mẫu, dùng nước pha loãng vô trùng (4.3) để đổ đĩa.

CHÚ Ý: Các đĩa thạch rút sẵn không được nhiễm khuẩn bề mặt và giữ nhiệt độ của đĩa không thấp hơn nhiệt độ phòng (nếu không, nước có thể tích tụ trên bề mặt thạch). Không được để đĩa quá khô, biểu hiện qua bề mặt thạch óng ánh hoặc có các nếp nhăn lớn. Đĩa thạch không được đọng các giọt nước trên bề mặt hoặc các đĩa thạch có độ dày chênh lệch quá 2 mm, cũng không nên bảo quản đĩa thạch ở nhiệt độ từ $0 \text{ }^\circ\text{C}$ đến $4,4 \text{ }^\circ\text{C}$ quá một tháng. Tốc độ dòng bị giảm qua ống cho thấy có sự tắc nghẽn hoặc có vật cản trong hệ thống. Để làm hết tắc nghẽn, tháo van ra khỏi xyranh (5.13), lắp xyranh bơm tay có ống nối chứa nước và bơm áp suất vào. Dùng etanol để tráng nhằm loại bỏ các chất bám trên thành của hệ thống. Hòa tan các chất bẩn còn sót bằng axit cromic. Tráng kỹ bằng nước sau khi làm sạch.

8.4 Hiệu chuẩn lưới đếm

Lượng mẫu tương ứng trong các phần khác nhau của lưới đếm (5.8), như trong sổ tay kèm theo thiết bị cấy. Diện tích lưới chính xác được kiểm tra bởi nhà sản xuất. Để xác nhận các giá trị này, chuẩn bị 11 nồng độ vi sinh vật trong dải từ 10^6 đến 10^3 tế bào/ml bằng cách pha loãng huyền phù với tỉ lệ 1 : 1 (không dùng dụng cụ dàn mẫu) rồi đổ đĩa. Ủ cả hai nhóm đĩa trong $48 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ ở $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Tính các nồng độ của mỗi độ pha loãng. Đếm các đĩa xoắn theo bề mặt lưới, dùng nguyên tắc đếm 20 (xem 8.5) và ghi lại số đếm khuẩn lạc cùng với diện tích lưới đếm. Mỗi số đếm khuẩn lạc xoắn của diện tích lưới cụ thể được chia cho số vi sinh vật hiếu khí trong 1 ml để có nồng độ vi sinh vật trên đĩa xoắn tương ứng, nêu rõ thể tích mẫu đã đưa vào từng diện tích lưới cụ thể. Thể tích được đưa vào mỗi diện tích lưới, V, tính bằng mililit (ml) theo công thức sau:

$$V = \frac{C_1}{C_2}$$

Trong đó:

C_1 là số khuẩn lạc đếm được trong một diện tích lưới;

C_2 là số đếm vi sinh vật trên mililit.

VÍ DỤ: $C_1 = 31 + 30$ (khuẩn lạc), $C_2 = 4,1 \times 10^4$ vi sinh vật/ml

$$V = \frac{31 + 30}{4,1 \times 10^4} = 0,0015 \text{ ml}$$

8.5 Kiểm tra số đếm đĩa xoắn

Sau khi ủ, đặt đĩa xoắn vào giữa lưới đếm bằng cách điều chỉnh giá đỡ. Chọn hình quạt bất kì và bắt đầu đếm các khuẩn lạc từ mép ngoài của hình vành khăn thứ nhất về phía tâm, đến khi đếm được 20 khuẩn lạc. Kết thúc việc đếm khuẩn lạc còn lại trong hình vành khăn tại điểm đếm đến khuẩn lạc thứ 20. Bất kì khuẩn lạc mọc không đều trong mẫu đều được kiểm soát bằng cách đếm các hình vành khăn tương ứng của hình quạt đối diện và ghi lại kết quả.

9 Tính và biểu thị kết quả

Để ước tính số vi sinh vật, chia số đếm cho thể tích của tất cả hình vành khăn đã đếm.

Ví dụ: Hai hình vành khăn của mỗi hình quạt đã đếm đối diện nhau của đĩa tương ứng 31 và 30 khuẩn lạc. Thể tích mẫu chứa trong các hình vành khăn sẫm màu là 0,0015 ml.

$$\text{Số vi sinh vật} = \frac{31 + 30}{0,0015} = 4,1 \times 10^4 \text{ vi sinh vật/ml}$$

Nếu 4 hình vành khăn của hình quạt chứa ít hơn 20 đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) thì đếm số CFU trên toàn bộ đĩa. Nếu số khuẩn lạc vượt quá 75 trong hình vành khăn thứ hai, thứ ba hoặc thứ tư là hình vành khăn chứa khuẩn lạc thứ 20 thì số vi sinh vật ước tính sẽ thấp vì lỗi trùng lặp do các khuẩn lạc chồng lên nhau. Trong trường hợp này, đếm mỗi hình vành khăn gần kề theo chu vi trong tất cả 8 hình quạt, đếm ít nhất 50 khuẩn lạc, ví dụ nếu 2 hình vành khăn đầu tiên của hình quạt chứa 19 khuẩn lạc và hình vành khăn thứ ba chứa khuẩn lạc thứ 20 và thứ 76 (hoặc lớn hơn) thì đếm các khuẩn lạc trong hình vành khăn thứ nhất và thứ hai liền kề theo chu vi, tại tất cả 8 hình quạt. Tính thể tích chứa trong các hình vành khăn đã đếm của các hình quạt và chia thành số khuẩn lạc.

Khi có ít hơn 20 CFU đếm được trên toàn bộ đĩa thì báo cáo kết quả là "ít hơn 500 số đếm khuẩn lạc ước tính trên mililit". Nếu số khuẩn lạc đếm được lớn hơn 75 ở hình vành khăn thứ nhất của hình quạt thì báo cáo kết quả là "lớn hơn 500 000 số đếm khuẩn lạc ước tính trên mililit". Không đếm các đĩa xoắn phân bố khuẩn lạc không đều do lỗi phân phối. Báo cáo các kết quả của các đĩa này là "sự cố của phòng thử nghiệm". Nếu khuẩn lạc mọc lan rộng trên toàn bộ đĩa thì bỏ đĩa này. Nếu khuẩn lạc mọc lan rộng trên một nửa diện tích đĩa thì chỉ đếm các khuẩn lạc phân bố tốt trên diện tích không mọc lan rộng.

Tính số đếm khuẩn lạc trừ khi phát hiện có mặt các chất ức chế trong mẫu, khuẩn lạc mọc lan rộng quá mức hoặc sự cố của phòng thử nghiệm. Làm tròn số đếm như trên.

Báo cáo các số đếm theo số đếm khuẩn lạc hoặc số đếm khuẩn lạc ước tính trên mililit.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- 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 nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn cũng như các sự cố bất kỳ có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4884:2005 (ISO 4833:2003) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 độ C*
- [2] TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp định lượng vi sinh vật – Phần 1: Đếm khuẩn lạc ở 30 °C bằng kỹ thuật đổ đĩa*
- [3] TCVN 4884-2:2015 (ISO 4833-2:2013) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Phương pháp định lượng vi sinh vật – Phần 2: Đếm khuẩn lạc ở 30 °C bằng kỹ thuật cấy bề mặt*
-