

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 6554 : 1999

ISO 7698 : 1990

**NGŨ CỐC ĐẬU ĐỖ VÀ CÁC SẢN PHẨM
TỪ NGŨ CỐC VÀ ĐẬU ĐỖ - ĐẾM VI KHUẨN,
NẤM MEN VÀ NẤM MỐC**

*Cereals, pulses and derived products -
Enumeration of bacteria, yeasts and moulds*

HÀ NỘI - 1999

Lời nói đầu

TCVN 6554 : 1999 hoàn toàn tương đương với ISO 7698 : 1990

TCVN 6554 : 1999 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F1 Ngũ cốc và đậu đỗ biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

Ngũ cốc, đậu đỗ và các sản phẩm từ ngũ cốc và đậu đỗ - Đếm vi khuẩn, nấm men và nấm mốc

Cereals, pulses and derived products - Enumeration of bacteria, yeasts and moulds

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp đếm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc trong ngũ cốc, đậu đỗ và các sản phẩm nhận được trực tiếp từ chúng (bột mì, các hạt, cám, v.v.)

Cần áp dụng các tiêu chuẩn hướng dẫn chung đặc biệt là ISO 7954¹ do tiểu ban kỹ thuật 9, vi sinh vật biên soạn thuộc ISO /TC 34, Nông sản thực phẩm.

Cần tham khảo ISO 7218² về thực hành phòng thí nghiệm tốt đối với việc kiểm tra vi sinh vật.

Chú thích 1 - Do bản chất của nấm men và nấm mốc, việc đếm số lượng chúng có những sai lệch nhất định.

2 Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 5451 : 91 (ISO 950), Ngũ cốc - Lấy mẫu (dạng hạt)

ISO 2170:1980, Ngũ cốc và đậu đỗ - Lấy mẫu sản phẩm dạng nghiền

TCVN : 1999 ISO 6887:1983, Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về chuẩn bị dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh.

3 Định nghĩa

Với mục đích của tiêu chuẩn này áp dụng các định nghĩa sau

3.1 Vi khuẩn: Các vi sinh vật ưa ấm, hiếu khí hoặc kỵ khí không bắt buộc ở 30° C phát triển trong và trên bề mặt môi trường thạch với các điều kiện mô tả của tiêu chuẩn này.

3.2 Nấm men: Vi sinh vật hiếu khí ưa ấm, ở 25 C khi sử dụng môi trường thạch nấm với các điều kiện của tiêu chuẩn này, sẽ:

a) trên bề mặt của môi trường, phát triển thành các khuẩn lạc tròn sáng hoặc khuẩn lạc nhẵn mỏng có mép viền đều đặn và bề mặt khuẩn lạc lồi nhiều hoặc ít, hoặc

b) trong môi trường nuôi cấy phát triển thành các khuẩn lạc hình hạt đậu hay hình tròn.

TCVN 6554 : 1999

3.3 Mốc: Vi sinh vật thể sợi, hiếu khí, ưa ẩm trên bề mặt môi trường thạch với các điều kiện mô tả của tiêu chuẩn này, thường phát triển thành các khuẩn lạc dẹt hoặc khối sợi nhỏ lan toả, thông thường ở dạng quả có màu hoặc có cấu trúc bào tử.

4 Nguyên tắc

4.1 Chuẩn bị các cặp đĩa rót có chứa một lượng xác định huyền phù ban đầu mỗi một trong 2 môi trường nuôi cấy (5.3.1 và 5.3.2).

Chuẩn bị các đĩa khác theo cùng một điều kiện, sử dụng các dung dịch pha loãng một phần mười từ huyền phù ban đầu.

4.2 Nuôi hiếu khí các đĩa chứa môi trường thạch để đếm vi khuẩn (5.3.1) ở 30° C trong 3 ngày.

nuôi hiếu khí các đĩa chứa môi trường thạch để đếm nấm men và nấm mốc (5.3.2) ở 25 ° C trong 3 ngày, 4 ngày, hoặc 5 ngày.

4.3 Tính số vi khuẩn từ số khuẩn lạc mọc trên các đĩa môi trường thạch nuôi cấy được (5.3.1)

Tính số nấm men và/hoặc mốc từ số khuẩn lạc mọc trên các đĩa thạch nuôi cấy đã được chọn (5.3.2)

5 Nước pha loãng, môi trường nuôi cấy và các vật liệu khác

5.1 Các nguyên liệu cơ bản

Để tăng độ tái lập của kết quả, tốt nhất nên dùng môi trường khô hoàn chỉnh hoặc các thành phần cơ bản khô để chuẩn bị môi trường nuôi cấy và môi trường pha loãng. Đồng thời có thể sử dụng các thuốc thử pha sẵn bán trên thị trường. Cần phải tuân theo một cách nghiêm ngặt các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các hoá chất sử dụng phải là loại tinh khiết phân tích.

Nước sử dụng phải là nước cất hoặc nước đã khử ion và không chứa các chất có thể gây ức chế sự phát triển vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men, nấm mốc) theo điều kiện thử ở đây. Nếu môi trường nuôi cấy và nước pha loãng không sử dụng ngay thì phải bảo quản trong chỗ tối ở nhiệt độ từ 0° C đến +5° C không quá một tháng trong điều kiện sao cho thành phần của nó không bị thay đổi.

5.2 Chất pha loãng

Dung dịch pepton - natri clorua, xem TCVN : 1999 (ISO 6887)

Chú thích 2 – Để tăng tính đồng nhất của huyền phù bào tử, có thể thêm tác nhân hoạt động bề mặt như este oleic sorbitol (Tween 80) với nồng độ 0,033 g trên mỗi lít dung dịch pha loãng.

5.3 Môi trường nuôi cấy

5.3.1 Môi trường thạch để đếm vi khuẩn

Thành phần

trypton ^{1) 1)}	5,0 g
cao men khô	2,5g
dextro khan	1,0 g
thạch	9 đến 18 g ²⁾
nước	1000ml

Chú thích 3 – Nếu cần có thể thêm chất ức chế như actidion (xycloheximit) natamycin (pimarixin) vào môi trường nuôi cấy này với hàm lượng 0,1g/l để ngăn nấm men phát triển.

chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô vào nước bằng cách đun nóng. Nếu cần điều chỉnh pH sao cho sau khi thanh trùng có pH bằng 7 ở 25⁰ C.

Phân phối môi trường vào các ống nghiệm (6.9) mỗi ống 15ml hoặc vào các bình, hoặc chai (6.9) có dung tích thích hợp, dung tích của bình hoặc chai phải gấp đôi lượng cho vào.

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121⁰ C ± 1⁰ C trong 20 phút. Nếu sử dụng môi trường ngay thì làm nguội trước khi sử dụng trong nồi cách thủy ở nhiệt độ 45 ± 0,5⁰ C.

Nếu không, trước khi bắt đầu kiểm tra vi sinh vật, để tránh bị chậm khi rót thạch, cần làm nóng chảy hoàn toàn môi trường trong nồi cách thủy đang sôi, sau đó làm nguội trong nồi cách thủy ở 45 ± 0,5⁰ C trước khi sử dụng.

5.3.2 Môi trường thạch để đếm nấm men nấm mốc (môi trường thạch - cloramphenicol - dextro - cao men)

Thành phần

Cao men	5 g
dextro (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20 g
cloramphenicol (C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅)	0,1 g
thạch	9 đến 18 g ²⁾
nước	1000ml

Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước bằng cách đun sôi. Nếu cần điều chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng có pH bằng 6,6 ở 25⁰ C

1) Thuật ngữ này hiện nay chỉ một số nhà sản xuất môi trường sử dụng. Có thể sử dụng bất kỳ sự phân huỷ nào của casein nào cho kết quả so sánh.

2) Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

TCVN 6554 : 1999

Phân phối môi trường vào các dụng cụ chứa (6.9) có dung tích thích hợp.

Khử trùng môi trường trong nồi hấp áp lực (6.1) ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

Nếu môi trường được sử dụng ngay thì làm nguội trước khi sử dụng trong nồi cách thủy (6.7) ở nhiệt độ $45^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Nếu không, trước khi bắt đầu kiểm tra vi sinh vật, để tránh bị chậm khi rót thạch cần làm tan chảy hoàn toàn môi trường trong nồi cách thủy đang sôi, sau đó làm nguội trong nồi cách thủy ở $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trước khi sử dụng.

Chú thích 4 – Có thể thay cloramphenicol bằng oxytetraxilin ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{11}$). trong trường hợp này chuẩn bị môi trường cơ bản như mô tả ở trên nhưng bỏ qua cloramphenicol. Phân ra từng lượng 100 ml và khử trùng. Chuẩn bị dung dịch nước 0,1% (m/m) hydroclorua oxytetraxilin và thanh trùng bằng cách lọc. Ngay trước khi sử dụng, thêm 10 ml dung dịch vô khuẩn này vào 100ml môi trường cơ bản đã được làm tan chảy và giữ ở $45^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Chú thích 5 - Có thể sử dụng dụng cụ thủy tinh dùng một lần thay cho đồ thủy tinh dùng lại được, nếu nó đáp ứng được yêu cầu.

Sử dụng các thiết bị dụng cụ thông thường của phòng thí nghiệm vi sinh vật và đặc biệt là:

6.1 Thiết bị dùng để khử trùng khô (tủ sấy) hoặc khử trùng ướt (Nồi hấp) (Nồi hấp có thể hoạt động riêng hoặc có thể là một phần của thiết bị dùng để chuẩn bị và phân phối môi trường.)

Khử trùng mọi thiết bị dụng cụ tiếp xúc với chất pha loãng, môi trường nuôi cấy hoặc với mẫu, đặc biệt đối với dụng cụ bằng chất dẻo, chỉ trừ các dụng cụ đã được khử trùng, bằng một trong các phương pháp sau đây:

- trong tủ sấy (6.1) ở nhiệt độ 170°C đến 175°C ít nhất 1 giờ,
- trong nồi hấp (6.1) ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ít nhất 20 phút.

6.2 Thiết bị nghiền trộn

Theo ISO 6887, sử dụng một trong các thiết bị sau:

- Máy nghiền trộn quay**, tốt nhất nên dùng loại có bộ điều khiển ở phía trên có số vòng quay trong khoảng 8000 đến 45000 vòng / phút có cốc chứa mẫu bằng kim loại hoặc bằng thủy tinh có nắp đậy kín, bền với điều kiện khử trùng.
- Máy nghiền trộn kiểu nhu động (Stomacher)**, có túi chất dẻo thanh trùng

Chú thích 6 – Dung tích của cốc hoặc túi chất dẻo phải đủ lớn để mẫu được trộn đều với lượng dịch pha loãng tương ứng. Nồi chung dung tích của nó cần phải bằng 2 lần thể tích của mẫu và thể tích của dịch pha loãng.

6.3 Máy trộn kiểu vortex để trộn chất chứa trong ống nghiệm, bình hoặc chai (các dịch pha loãng từ huyền phù ban đầu).

6.4 Tủ ấm có thể giữ được nhiệt độ $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.5 Đĩa petri, đường kính 90mm đến 100 mm.

6.6 Pipet chia độ, được hiệu chuẩn dùng cho mục đích kiểm tra vi sinh, dung tích danh nghĩa 10 ml và 1 ml được chia độ đến 0,5 ml và 0,1 ml, có lỗ thoát 2 mm đến 3 mm.

6.7 Nồi cách thủy hoặc thiết bị tương tự có thể duy trì được nhiệt độ $45 \pm 0,5^{\circ} \text{C}$.

6.8 pH-met chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25°C .

6.9 Ống nghiệm đường kính 20mm x 200 mm hoặc bình hoặc chai dung tích 0,5 và 1lít

7 Lấy mẫu

Tiến hành lấy mẫu theo TCVN 5451 : 91(ISO 950) hoặc ISO 2170 tùy từng trường hợp

Lượng mẫu phòng thí nghiệm phải lớn hơn khối lượng của phần mẫu thử cần thiết để phân tích theo bảng 1 (9.1) và để có thể phân tích lại khi cần thiết. Nếu mẫu không thể phân tích ngay sau khi đưa đến phòng thí nghiệm thì phải bảo quản ở 10°C tối đa 48 giờ. Điều này phải ghi vào trong biên bản thử. Mẫu không phải bảo quản ở điều kiện đông lạnh.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Lắc kỹ mẫu thí nghiệm trước khi lấy mẫu để thử

Chú thích 7 – Do bản chất của sản phẩm thuộc đối tượng tiêu chuẩn này vi sinh vật thường phân bố không đồng đều trong mẫu thử do đó khi cần đánh giá chính xác nên tiến hành xác định trên các mẫu riêng biệt ít nhất là trên 3 mẫu và tốt nhất là trên 5 mẫu thử.

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử

Cân chính xác đến 0,1g lượng mẫu thử quy định trong bảng 1 vào

- Cốc của máy trộn quay (6.2 a) đối với sản phẩm loại 1 hoặc
- Túi chất dẻo của máy Stomacher (6.2 b) đối với sản phẩm loại 2.

Bảng 1

Loại	Sản phẩm	Khối lượng phần mẫu thử, g	Thể tích dịch pha loãng, ml
1	Các loại hạt	40	360
2	Các sản phẩm nghiền nhỏ (bột, cám, bột nghiền...)	20	180

9.2 Chuẩn bị dung dịch huyền phù ban đầu

Thêm lượng thể tích dung dịch pha loãng tương ứng theo bảng 1 vào phần mẫu thử (9.1)

Để phần mẫu thử tiếp xúc với dịch pha loãng trong 30 phút. Sau đó hoặc

- a) cho máy trộn quay (6.2 a) chạy với thời gian sao cho tổng số vòng quay từ 15000 đến 20000 vòng (ngay cả đối với máy quay chậm nhất thời gian này cũng không được vượt quá 2,5 phút), hoặc
- b) Vận hành máy Stomacher (6.2 b) trong 2 phút.

9.3 Chuẩn bị các dung dịch pha loãng

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng theo ISO 6887.

Trước mỗi lần lấy phần mẫu thử để nuôi cấy, nên dùng máy trộn kiểu vortex (6.3) để khuấy kỹ chất chứa trong ống thử.

9.4 Cấy

9.4.1 Lấy 4 đĩa Petri vô trùng (6.5). Dùng pipet vô trùng lấy vào mỗi đĩa 1 ml huyền phù ban đầu (có độ pha loãng 10^{-1}) (9.2).

9.4.2 Lấy 4 đĩa Petri vô trùng khác. Dùng 1 pipet mới vô trùng cho vào mỗi đĩa 1 ml dung dịch 10^{-2} (9.3).

Lặp lại quy trình này sử dụng các dịch pha loãng tiếp theo tùy theo yêu cầu (xem 9.6.1 và 9.6.2).

9.4.3 Cho vào mỗi nhóm 4 đĩa , 2 đĩa thứ nhất mỗi đĩa 15 ml môi trường thạch 5.3.1, 2 đĩa thứ 2 mỗi đĩa 15 ml môi trường thạch 5.3.2.

Trộn kỹ một cách cẩn thận môi trường với các dịch nuôi cấy và để đĩa ở vị trí mặt phẳng nằm ngang ở chỗ mát cho đông đặc.

Đồng thời chuẩn bị 2 đĩa đối chứng ,đĩa thứ nhất chứa khoảng 15 ml môi trường thạch 5.3.1 và đĩa còn lại chứa khoảng 15 ml môi trường thạch 5.3.2, để kiểm tra độ vô trùng của chúng.

9.5 Nuôi cấy

9.5.1 Vi khuẩn

Lật ngược các đĩa chứa môi trường thạch 5.3.1 và đặt vào trong tủ ấm (6.4) đã chỉnh nhiệt độ ở $30^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ trong 3 ngày.

9.5.2 Nấm men và nấm mốc

Đặt các đĩa với phần nắp ở trên hoặc lật ngược đĩa chứa môi trường thạch 5.3.2 trong tủ ấm (6.4) được chỉnh nhiệt độ ở $25^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ trong 5 ngày.

9.6 Biểu thị

9.6.1 Đếm số khuẩn lạc vi khuẩn

Kiểm tra các đĩa sau khi nuôi ấm theo thời gian quy định (9.5.1).

Tiến hành đếm số khuẩn lạc ở mỗi đĩa chứa môi trường thạch 5.3.1, chứa không quá 300 khuẩn lạc. Điều cần thiết là một trong các đĩa này chứa ít nhất 15 khuẩn lạc.

9.6.2 Đếm số bào tử nấm men và/hoặc nấm mốc

Tính số khuẩn lạc trên mỗi đĩa sau 3 ngày, 4 ngày và 5 ngày ủ ấm. Sau 5 ngày giữ lại các đĩa có ít hơn 150 khuẩn lạc. Nếu đĩa có nhiều nấm mốc mọc, hoặc khó đếm các khuẩn lạc phân tách tốt thì giữ lại số đếm sau 4 ngày thậm chí sau 3 ngày nuôi cấy. Trong trường hợp này thời gian ủ 3 hoặc 4 ngày cần phải công bố trong báo cáo thử.

Phân biệt khuẩn lạc nấm men và nấm mốc nhờ kiểm tra đại thể. Tuy nhiên trong những trường hợp không rõ ràng thì tiến hành kiểm tra dưới kính hiển vi "các khuẩn lạc": khuẩn lạc nấm men nói chung gồm có tế bào dạng trứng hoặc dạng tròn, trong đó thấy có các dạng sợi.

Nếu cần, tiến hành phân tích hiển vi để phân biệt các khuẩn lạc nấm men nấm mốc với các khuẩn lạc vi khuẩn theo tính chất sinh thái học của chúng.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Tính toán

10.1.1 Tính số vi sinh vật, tức là số vi khuẩn nấm men và/hoặc nấm mốc trên 1 gam sản phẩm theo công thức

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

trong đó

$\sum C$ là tổng các khuẩn lạc trên tất cả các đĩa được đếm và giữ lại ở 2 nồng độ kế tiếp nhau

d là dịch pha loãng mà từ đó nhận được số đếm thứ nhất (ví dụ 10^{-2});

n_1 là số đĩa được đếm và giữ lại ở dịch pha loãng thứ nhất;

n_2 là số đĩa được đếm và giữ lại ở dịch pha loãng thứ hai;

TCVN 6554 : 1999

10.1.2 Làm tròn kết quả nhận được ở 10.1.1 đến 2 chữ số có nghĩa. Khi số làm tròn là 5 và không có số có nghĩa tiếp theo thì làm tròn ngay đến số bên trái: thí dụ 28500 thì làm tròn đến 28000; 11500 thì làm tròn đến 12000.

10.1.3 Biểu thị kết quả dưới dạng từ 1,0 và 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là lũy thừa của 10.

Nếu không có khuẩn lạc nào trên đĩa cấy từ huyền phù đầu tiên (9.4.1), số vi sinh vật, tức là vi khuẩn, nấm men và/ hoặc nấm mốc trên một gam sản phẩm được báo cáo là nhỏ hơn 10.

10.2 Thí dụ tính toán

Đếm nấm men nấm mốc cho kết quả sau: (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng đã được nuôi ấm)

Dịch pha loãng 10^{-2} : 105 khuẩn lạc và 97 khuẩn lạc

Dịch pha loãng 10^{-3} : 18 và 23 khuẩn lạc

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{105 + 97 + 18 + 23}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{243}{0,022}$$

Làm tròn kết quả theo quy định ở 10.1.2 thành 11000.

Từ đó số nấm men và nấm mốc trên một gam sản phẩm được định lượng là $1,1 \times 10^4$.

10.3 Độ chính xác

Vì lý do thống kê, trong 95% các trường hợp độ tin cậy của phương pháp này dao động từ $\pm 16\%$ đến $\pm 52\%$. Trên thực tế thậm chí có sự chênh lệch lớn hơn đặc biệt kết quả thu được từ các nhà sinh vật học khác nhau.

11 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả cần chỉ ra phương pháp đã sử dụng, thời gian ủ ấm, cũng như phương pháp biểu thị kết quả. Báo cáo cũng cần đề cập đến bất kỳ thao tác nào không quy định trong tiêu chuẩn này cũng như các thao tác được coi là tùy ý hoặc các sự cố có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo cần bao gồm các thông tin cần thiết để nhận biết mẫu một cách đầy đủ.

Phụ lục A

(tham khảo)

Thư mục

- [1] ISO 7954 : 1987, Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung đếm nấm men nấm mốc -Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25^o C.
- [2] TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 : 1996), Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về kiểm tra vi sinh vật
- [3] COWELL và MORISETTI,J. Sci Food agric, 1969 (Vol .20),p.573.
- [4] TCVN 4884 - 89 (ISO 4833) , Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung đếm vi sinh vật - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30^o C.
-