

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 5521:1991

ST SEV 3015-81

**SẢN PHẨM THỰC PHẨM –
NGUYÊN TẮC NUÔI CẤY VI SINH VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP
XỬ LÝ CÁC KẾT QUẢ KIỂM NGHIỆM VI SINH**

*Food products – Principles for culturing microorganisms
and methods for expressing microbiology test results*

HÀ NỘI – 2008

Lời nói đầu

TCVN 5521:1991 phù hợp với ST SEV 3015-81;

TCVN 5521:1991 do Trung tâm Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng khu vực I biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Ủy ban Khoa học Nhà nước (nay là Bộ Khoa học và Công nghệ) ban hành;

Tiêu chuẩn này được chuyển đổi năm 2008 từ Tiêu chuẩn Việt Nam cùng số hiệu thành Tiêu chuẩn Quốc gia theo quy định tại khoản 1 Điều 69 của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật và điểm a khoản 1 Điều 6 Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 1/8/2007 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật.

Sản phẩm thực phẩm – Nguyên tắc nuôi cấy vi sinh vật và phương pháp xử lý các kết quả kiểm nghiệm vi sinh

Food products – Principles for culturing microorganisms and methods for expressing microbiology test results

1 Các nguyên tắc chung về nuôi cấy

1.1 Việc nuôi cấy cho phép phát hiện hoặc đếm vi sinh vật một số chủng nhất định và các nhóm sinh lý hay các nhóm phân loại.

1.2 Việc nuôi cấy được tiến hành trên các môi trường dinh dưỡng trong những điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng của một số vi sinh vật xác định.

1.3 Để phát hiện các vi sinh vật, cho vào môi trường dinh dưỡng một lượng mẫu cần hay mẫu đã pha loãng hoặc các tế bào vi sinh vật đọng lại trên màng lọc.

1.4 Để xác định các tính chất sinh lý hoặc các thuộc tính phân loại của vi sinh vật, sử dụng trình tự nuôi cấy một hoặc nhiều giai đoạn bao gồm sự phát triển của vi sinh vật trong các môi trường không chọn lọc giàu dinh dưỡng, môi trường chọn lọc hoặc chẩn đoán chọn lọc.

1.5 Kết quả nuôi cấy được xác định định tính hoặc định lượng. Số lượng vi sinh vật được tính theo kết quả đếm các khuẩn lạc trên môi trường đông đặc hay theo số lượng các ống nghiệm có dấu hiệu phát triển của vi sinh vật trong môi trường lỏng.

2 Các phương pháp nuôi cấy

2.1 Lượng vật liệu nuôi cấy

2.1.1 Khi dùng phương pháp nuôi cấy chìm, lấy 1 cm³ sản phẩm lỏng hoặc mẫu pha loãng trộn đều với môi trường dinh dưỡng nóng chảy.

2.1.2 Khi dùng phương pháp cấy bề mặt, lấy 0,1 cm³ hoặc 0,2 cm³ sản phẩm lỏng hoặc mẫu pha loãng cho lên trên bề mặt môi trường đông đặc.

TCVN 5521:1991

2.1.3 Để phát hiện các vi sinh vật và xác định thuộc tính phân loại của chúng lấy 50 g (cm³) sản phẩm cấy vào môi trường lỏng. Khi xác định số lượng vi sinh vật lấy khoảng 100 cm³ sản phẩm lỏng hoặc sản phẩm pha loãng cấy vào môi trường lỏng.

2.1.4 Vật liệu để cấy được lấy bằng các dụng cụ đã khử trùng và cho vào bình đã khử trùng hoặc cấy vào môi trường dinh dưỡng, tuân thủ các nguyên tắc vô trùng. Việc khử trùng các dụng cụ được tiến hành theo TCVN 4886:1989 (ST SEV 3013-81).

2.2 Độ pha loãng mẫu cân

2.2.1 Độ pha loãng mẫu cân để cấy trên môi trường đặc được chọn sao cho nhận được số lượng chung các khuẩn lạc phát triển trong hộp petri dao động trong khoảng từ 30 đến 300, số lượng khuẩn lạc thuộc các nhóm riêng biệt (thí dụ: coliform) từ 15 đến 150, nấm mốc từ 5 đến 50.

2.2.2 Độ pha loãng mẫu để cấy vào các môi trường lỏng được chọn sao cho ít nhất trong ống nghiệm có độ pha loãng lớn nhất không có vi sinh vật.

2.3 Phương pháp cấy chìm trong môi trường đông đặc

2.3.1 Cho song song vào hai hộp petri một lượng sản phẩm lỏng hoặc mẫu pha loãng, sau đó không quá 15 min rót môi trường dinh dưỡng nóng chảy đã được làm nguội đến nhiệt độ phòng $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ vào hộp. Chiều cao lớp môi trường dinh dưỡng phải đạt từ 4 mm đến 5 mm.

2.3.2 Trộn nhanh và đều môi trường dinh dưỡng với vật liệu cấy bằng cách lắc tròn các hộp petri sao cho môi trường không trào ra ngoài hoặc dính lên nắp hộp. Sau khi môi trường đã nguội đặt sấp hộp đã cấy vào tủ ẩm.

2.4 Phương pháp cấy trên bề mặt môi trường rắn

2.4.1 Rót môi trường vào hộp petri và sau khi nguội, cho hong khô. Để tách nước khỏi bề mặt môi trường mở nắp hộp, úp sấp xuống và giữ trong 30 min ở $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc trong các điều kiện khác đảm bảo cho việc bay hơi nước ngưng tụ nhưng không làm nhiễm khuẩn.

2.4.2 Cho sản phẩm lỏng hoặc mẫu đã pha loãng lên bề mặt môi trường đã hong khô, nhanh chóng dàn đều khắp bề mặt bằng đũa thủy tinh uốn cong.

2.4.3 Hong khô bề mặt đã được cấy bằng cách giữ hộp vị trí nằm ngang trong 15 min.

2.5 Phương pháp cấy trong môi trường lỏng

2.5.1 Cho vào bình hoặc các ống nghiệm đã có sẵn môi trường dinh dưỡng một lượng sản phẩm xác định hoặc mẫu đã pha loãng từ 2 lần đến 10 lần. Khi xác định số lượng vi sinh vật, cấy sản phẩm (hoặc) mẫu pha loãng trên môi trường dinh dưỡng sao cho tỷ lệ số lượng vật liệu cấy cho trước vẫn được giữ nguyên.

2.5.2 Theo kết quả nuôi cấy trong môi trường lỏng trong các trường hợp đã được chỉ dẫn ở các tiêu chuẩn về phương pháp phân tích các nhóm hoặc các chủng vi sinh vật tương ứng, tính số vi sinh vật có xác suất cao nhất trong sản phẩm.

2.6 Phương pháp sử dụng màng lọc

2.6.1 Màng lọc được sử dụng để phân tích các sản phẩm lỏng để lọc hoặc các sản phẩm tạo thành dung dịch ưu trương hoặc dung dịch có áp suất thẩm thấu cao. Không sử dụng màng lọc để phân tích các sản phẩm huyền phù và các dịch nghiền đồng nhất của sản phẩm vì sẽ làm nhiễm bẩn các lỗ của màng lọc trong quá trình lọc. Chất lỏng có chứa một lượng không lớn các hạt lơ lửng được lọc qua hai giai đoạn. Trước tiên lọc qua màng lọc có đường kính lỗ trung bình là 4 μm để loại các hạt. Sau đó lọc qua màng lọc mà đường kính và kích thước lỗ được chọn phù hợp với các chỉ tiêu xác định. Cả hai màng lọc được nuôi cấy trong các điều kiện như nhau. Nếu lọc dung dịch ưu trương, dung dịch có áp suất thẩm thấu cao hoặc dung dịch chứa các chất kháng khuẩn thì các vi sinh vật sau khi tách khỏi dung dịch đọng lại trên màng lọc được rửa bằng nước cất hoặc dung dịch muối-pepton.

2.6.2 Khi dùng màng lọc cần tuân thủ các điều kiện sau đây:

1. Chọn màng lọc với kích thước lỗ có thể giữ lại trên nó số lượng chủ yếu các vi sinh vật thuộc các chủng và nhóm xác định. Để giữ lại được vi khuẩn thường sử dụng màng lọc có đường kính lỗ trung bình là 0,3 μm .
2. Kiểm tra màng lọc bằng mắt xem có khuyết tật cơ học không và để tránh làm xây xát màng lọc phải dùng kẹp không có răng gắp.
3. Bảo quản màng lọc ở trạng thái khô.
4. Trước khi sử dụng phải làm sạch màng lọc khỏi các cặn dung môi, các bọt khí và cặn bẩn còn lại bằng cách đun sôi 3 lần trong nước cất hoặc khử trùng.
5. Dùng máy ZETS, dụng cụ CROBAR hoặc các dụng cụ khác để lọc chất lỏng.
6. Phần dụng cụ tiếp xúc với dịch lọc phải được khử trùng hoặc đun trong nước sôi.
7. Cẩn thận mặt sàng lọc ướt, vô trùng lên đệm làm bằng vật liệu xốp hoặc lên lưới của màng lọc, quay mặt màng lọc lên trên.
8. Quá trình lọc được kết thúc vào thời điểm hết nước trên mặt màng lọc.

2.6.3 Để có thể đếm được khuẩn lạc trên màng lọc, cấy trong môi trường đông đặc, trước đó lọc qua nó một lượng chất lỏng đủ để nhận được các khuẩn lạc biệt lập.

Lượng sản phẩm lỏng hoặc dung dịch cần thiết phải lọc để phát hiện các chủng hoặc nhóm vi sinh vật xác định phải được quy định trong các Tiêu chuẩn về phương pháp phân tích các chủng hoặc nhóm vi sinh vật tương ứng.

TCVN 5521:1991

Khi lọc dung dịch ưu trương hoặc dung dịch có áp suất thẩm thấu cao cần pha loãng hoặc dung dịch muối-pepton theo một tỷ lệ sao cho lọc dung dịch đã pha loãng một cách dễ dàng.

2.6.4 Ngay sau khi kết thúc quá trình lọc, màng lọc được chuyển sang môi trường dinh dưỡng rắn hoặc lỏng. Trên môi trường đông đặc màng lọc được đặt mặt dưới xuống sao cho nó tiếp xúc hoàn toàn với bề mặt môi trường. Sau đó, giữ các mẫu cấy trong tủ ấm ở điều kiện phù hợp với các chỉ tiêu xác định.

2.6.5 Đánh giá kết quả

Sự có mặt của một số chủng hoặc nhóm vi sinh vật xác định trên màng lọc, cấy trong môi trường lỏng được xác định theo các dấu hiệu đặc trưng phát triển của vi sinh vật trong môi trường này hoặc theo kết quả nuôi cấy chất lỏng trên môi trường chẩn đoán chọn lọc hoặc môi trường chẩn đoán. Khi đếm số khuẩn lạc vi sinh vật trên màng lọc cấy trong các môi trường đặc cần chú ý đến hình thái tương ứng và phản ứng màu đặc thù của các khuẩn lạc thuộc các chủng và nhóm vi sinh vật xác định. Để tính số lượng vi sinh vật trên đơn vị khối lượng (thể tích) sản phẩm, lấy số lượng khuẩn lạc nhân với hệ số pha loãng và chia cho thể tích chất lỏng đã được lọc.

3 Các phương pháp xử lý kết quả nuôi cấy

3.1 Các phương pháp tính kết quả nuôi cấy

3.1.1 Trong các mẫu nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng đặc bằng phương pháp chìm hay trên bề mặt:

- 1- Khi xác định tổng số của vi sinh vật sống thì đếm tất cả các khuẩn lạc đã phát triển.
- 2- Khi xác định số lượng vi sinh vật thuộc các nhóm phân loại nhất định trên môi trường chọn lọc thì đếm các khuẩn lạc đặc trưng về hình thái cho các nhóm đã phát triển.
- 3- Khi xác định số lượng các chủng hoặc nhóm vi sinh vật nhất định trên môi trường chẩn đoán hoặc chẩn đoán chọn lọc thì đếm các khuẩn lạc có hình thái đặc trưng thể hiện qua phản ứng màu đặc trưng với chất chỉ thị có trong môi trường.
- 4- Khuẩn lạc được đếm bằng mắt hoặc dùng kính lúp phóng đại 6 lần hay thiết bị chuyên dùng cho việc đếm khuẩn lạc.

3.1.2 Sự có mặt các vi sinh vật sống trong môi trường lỏng được xác định theo độ vẩn đục của môi trường, sự xuất hiện kết tủa, tạo khí, màng hoặc sự phát triển vi sinh vật trong các lần cấy chuyển trên môi trường dinh dưỡng đặc.

Sự có mặt vi sinh vật thuộc các nhóm sinh lý hay phân loại được xác định theo sự thay đổi màu sắc chất chỉ thị, sự tạo khí từ những chất nhất định và các dấu hiệu khác đặc trưng cho sự trao đổi chất của nhóm vi sinh vật đã phát hiện.

3.2 Các phương pháp tính số lượng vi sinh vật

3.2.1 Khuẩn lạc trên môi trường đặc được đếm trong từng mẫu cấy song song có cùng độ pha loãng. Theo kết quả đếm được tính giá trị trung bình số học của khuẩn lạc trong tất cả mẫu cấy cùng độ pha loãng.

Để đếm, dùng các mẫu cấy có độ pha loãng mà trong đó số khuẩn lạc tương ứng với quy định trong điều 2.2.1 của tiêu chuẩn này. Nếu số khuẩn lạc không phải của một mà của hai độ pha loãng liên tục cùng đáp ứng yêu cầu trong điều 2.2.1 của tiêu chuẩn này thì tính số lượng vi sinh vật trong sản phẩm theo kết quả đếm khuẩn lạc trong từng độ pha loãng riêng biệt rồi lấy giá trị trung bình số học của chúng. Nếu các kết quả nhận được khác nhau nhiều hơn hai lần thì kết quả của nuôi cấy được đánh giá theo kết quả trong mẫu cấy có độ pha loãng lớn nhất.

Số lượng vi sinh vật trong 1 cm³ (1 g) sản phẩm được tính bằng cách nhân giá trị trung bình của số khuẩn lạc với hệ số pha loãng mẫu và chia số này cho lượng vật liệu nuôi cấy (khối lượng, thể tích, diện tích).

Kết quả nhận được được làm tròn số như sau:

Đến số chia hết cho 5, nếu giá trị trung bình số học của số vi sinh vật ít hơn 100.

Đến số chia hết cho 20 nếu giá trị trung bình số học của số vi sinh vật lớn hơn 100 và tận cùng bằng số 5.

Đến số chia hết cho 10, nếu giá trị trung bình số học của số vi sinh vật lớn hơn 100 và không tận cùng bằng số 5.

Kết quả tính toán được biểu thị bằng số: $1,0 \dots 9,9 \times 10^n$.

Nếu số khuẩn lạc phát triển trong các mẫu cấy trong môi trường đặc ít hơn số dự tính theo 2.2.1 thì kết quả được biểu thị như sau:

Số lượng vi sinh vật ít hơn M hoặc ít hơn $M \times C$

trong đó

M – số khuẩn lạc ít nhất tương ứng với quy định trong 2.2.1.

C – giá trị nghịch đảo của hệ số pha loãng.

3.2.2 Để đếm số vi sinh vật trong môi trường lỏng theo phương pháp số có xác suất cao nhất phải cấy song song vào 3 ống nghiệm mẫu được pha loãng không ít hơn 3 độ pha loãng thập phân liên tục.

Số có xác suất cho nhất được tính từ số ống nghiệm có kết quả dương tính thuộc các nhóm mẫu theo 3 độ pha loãng thập phân liên tục.

Tài liệu tham khảo

1. TCVN 4886:1989 (ST SEV 3013-81) Sản phẩm thực phẩm và gia vị – Trình tự lấy mẫu để phân tích vi sinh vật.

