

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 7906:2008

ISO 15214:1998

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN
CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG
VI KHUẨN AXIT LACTIC ƯA NHIỆT TRUNG BÌNH –
KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 30 °C**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the
enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 °C*

HÀ NỘI - 2008

Lời nói đầu

TCVN 7906:2008 hoàn toàn tương đương với ISO 15214:1998;

TCVN 7906:2008 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13
Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn
Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi nên phương pháp này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể. Trong trường hợp này, có thể sử dụng các phương pháp khác đặc trưng cho từng sản phẩm, nếu hoàn toàn chỉ vì lý do kỹ thuật. Tuy nhiên, cần cố gắng áp dụng phương pháp này khi có thể.

Khi tiêu chuẩn này được soát xét thì cần phải tính đến mọi thông tin liên quan đến phạm vi mà phương pháp đếm đĩa này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch so với phương pháp trong trường hợp các sản phẩm cụ thể.

Việc hài hoà các phương pháp thử có thể không thực hiện được ngay và đối với một vài nhóm sản phẩm cụ thể có thể tồn tại các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Trong trường hợp có sẵn tiêu chuẩn quốc tế cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Thông thường khi các tiêu chuẩn như thế được soát xét, thì chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với phương pháp đếm đĩa này là vì các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi Phương pháp định lượng vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 °C

Microbiology of food and animal feeding stuffs –

Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria –

Colony-count technique at 30 °C

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình bằng cách đếm các khuẩn lạc phát triển trong môi trường đặc sau khi ủ 3 ngày ở 30 °C.

CHÚ THÍCH Đối với một số loại thực phẩm, có một số vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt hoặc ưa lạnh thì nhiệt độ nuôi cấy phải khác với 30 °C. Tuy nhiên, không phải tất cả các vi khuẩn axit lactic đều mọc trên thạch MRS ở pH 5,7 và một số mọc rất yếu.

Các hạn chế của phương pháp được nêu trong lời giới thiệu và trong chú thích ở trên, tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình (mesophilic lactic acid bacteria)

Vi sinh vật tạo thành các khuẩn lạc trong môi trường chọn lọc đặc ở 30 °C (MRS ở pH 5,7), dưới các điều kiện thử nghiệm qui định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Chuẩn bị hai đĩa Petri chứa thạch MRS ở pH 5,7. Cấy lên bề mặt²⁾ hoặc đổ đĩa một lượng xác định mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu ở dạng lỏng hoặc một lượng xác định của huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác.

4.2 Cấy các cặp đĩa khác, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu, dưới cùng một điều kiện.

Ủ các đĩa này ở 30 °C trong 72 h.

4.3 Tính số vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình (3.1) trên một gam hoặc một mililit mẫu thử từ số khuẩn lạc thu được trong 4.2 trong các đĩa đã chọn và đã được khẳng định.³⁾

5 Dịch pha loãng và môi trường cấy

5.1 Yêu cầu chung

Về thực hành phòng thử nghiệm, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

5.2 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

CHÚ THÍCH Không phải lúc nào nước đệm pepton cũng cho phép phục hồi được hết vi khuẩn axit lactic (xem Phụ lục A, [1], [2], [3]).

5.3 Môi trường nuôi cấy: môi trường MRS (de Man, Rogosa và Sharpe) ở pH 5,7 (xem [4])

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng các môi trường có bán sẵn. Tuy nhiên, chú ý rằng những dao động về thành phần và pH có thể xuất hiện giữa các sản phẩm của các nhà sản xuất khác nhau, do đó có thể cho các kết quả khác với các kết quả thu được khi sử dụng môi trường qui định trong tiêu chuẩn này.

²⁾ Xem chú thích 1 trong 9.2

³⁾ Xem chú thích 2 trong 9.3

5.3.1 Thành phần

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	10,0 g
Dịch chiết thịt	10,0 g
Dịch chiết nấm men	4,0 g
Triamoni xitrat $[(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]$	2,0 g
Natri axetat (CH_3COONa)	5,0 g
Magie sulfat ngậm bảy phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
Mangan sulfat ngậm bốn phân tử nước ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,05 g
Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	2,0 g
Glucoza ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	20,0 g
Polyoxyetylen sorbitan monooleat (Tween 80)	1,08 g
Thạch	12 g đến 18 g ¹⁾
Nước	1 000 ml

¹⁾ Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.3.2 Chuẩn bị

5.3.2.1 Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi.

Sử dụng máy đo pH (6.7) để đo, chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $5,7 \pm 0,1^4)$ ở 25 °C.

Chuyển môi trường vào các chai có dung tích thích hợp.

Khử trùng 15 min bằng nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 °C.

Nếu môi trường này được sử dụng ngay thì làm nguội trên nồi cách thủy (6.5) đến nhiệt độ khoảng 47 °C hoặc bằng kỹ thuật khác mà cũng cho kết quả tương tự, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Nếu không sử dụng ngay, để tránh chậm trễ khi rót môi trường trước khi kiểm tra vi sinh, thì làm tan chảy hoàn toàn môi trường trên nồi cách thủy đun sôi (6.6), rồi làm nguội trên nồi cách thủy (6.5) đến nhiệt độ khoảng 47 °C.

5.3.2.2 Nếu có nguy cơ nhiễm nấm men (ví dụ như xúc xích khô), thì bổ sung axit sorbic vào môi trường thạch MRS như sau:

⁴⁾ Để giá trị pH thấp dưới 5,6 thì dung sai là $\pm 0,1$ thay vì $\pm 0,2$ như thông thường.

TCVN 7906:2008

Hoà tan 1,4 g axit sorbic trong khoảng 10 ml dung dịch natri hydroxit 1 mol/l. Lọc để khử trùng. Cho dung dịch này vào 1000 ml thạch MRS đã khử trùng đã được làm nguội đến 47 °C. Độ pH cuối cùng của môi trường này phải bằng $5,7 \pm 0,1$ ở 25 °C.

6 Thiết bị, dụng cụ thủy tinh

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thử nghiệm vi sinh [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] và cụ thể như sau:

6.1 Thiết bị khử trùng khô (tủ sấy) hoặc thiết bị khử trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, có khả năng duy trì ở nhiệt độ $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.3 Đĩa Petri, bằng chất dẻo hoặc thủy tinh, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.4 Pipet chia độ xả hết, dung tích danh định 10 ml và 1 ml, được chia vạch tương ứng 0,5 ml và 0,1 ml.

6.5 Nồi cách thủy, hoặc thiết bị tương tự, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $47 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.6 Nồi cách thủy đun sôi.

6.7 Máy đo pH, có thể đọc chính xác đến 0,01 đơn vị pH ở 25 °C, có thể đo chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn riêng về lấy mẫu sản phẩm có liên quan thì các bên tự thỏa thuận về vấn đề này.

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc bị biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo các tiêu chuẩn cụ thể thích hợp với sản phẩm có liên quan. Nếu không có các tiêu chuẩn cụ thể thì các bên có liên quan nên thỏa thuận với nhau về vấn đề này.

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng

Chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng, theo TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

9.2 Cấy và ủ

CHÚ THÍCH 1 Cấy lên bề mặt kết hợp với việc ủ trong các điều kiện kỵ khí hoặc vi hiếu khí có thể được sử dụng thay cho qui trình đổ đĩa được mô tả. Có thể sử dụng bình nén để có được các điều kiện thích hợp.

CHÚ THÍCH 2 Cũng có thể sử dụng môi trường MRS hai lớp.

9.2.1 Lấy hai đĩa Petri vô trùng (6.3). Dùng pipet vô trùng (6.4) chuyển sang mỗi đĩa 1 ml mẫu thử nếu sản phẩm ở dạng lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác.

Lấy tiếp hai đĩa Petri vô trùng khác. Dùng pipet vô trùng mới chuyển sang mỗi đĩa 1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất của mẫu thử nếu sản phẩm ở dạng lỏng hoặc 1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất của huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác.

Lặp lại qui trình này với các dung dịch pha loãng tiếp theo, sử dụng pipet vô trùng mới cho mỗi dung dịch pha loãng thập phân.

CHÚ THÍCH Nếu dự đoán có số lượng vi khuẩn axit lactic cao thì có thể chỉ cấy các dung dịch pha loãng cần thiết để có thể định lượng theo trường hợp chung (xem 10.1).

9.2.2 Rót vào mỗi đĩa Petri khoảng 15 ml môi trường MRS (5.3) đã được chuẩn bị và được làm nguội đến 47 °C trên nồi cách thuỷ (6.5).

Trộn kỹ dịch cấy với môi trường và để yên cho hỗn hợp đông đặc.

9.2.3 Lật úp các đĩa thạch đã chuẩn bị xong và ủ trong tủ ấm (6.2) để ở 30 °C trong 72 h ± 3 h.

Tránh làm khô thạch trong quá trình ủ sao cho môi trường không trở nên quá bị ức chế.

9.3 Đếm khuẩn lạc

Sau thời gian ủ qui định (xem 9.2.3), đếm các khuẩn lạc trên mỗi đĩa (xem các chú thích 1 và chú thích 2).

Giữ lại các đĩa ít hơn 300 khuẩn lạc và ít nhất một đĩa chứa nhiều hơn 15 khuẩn lạc ở hai độ pha loãng liên tiếp.

CHÚ THÍCH 1 Một số *Leuconostoc* spp. sinh lượng lớn các khuẩn lạc lớn mà có thể cản trở việc phát triển các khuẩn lạc khác làm cho định lượng không chính xác số lượng vi khuẩn axit lactic.

TCVN 7906:2008

CHÚ THÍCH 2 Do khả năng phát triển các vi sinh vật khác khác với vi khuẩn axit lactic trên môi trường MRS như mô tả trong 9.2, mà trong một số trường hợp có thể cần phải khẳng định các khuẩn lạc thu được trong 9.2 bằng các kỹ thuật đơn giản (như nhuộm Gram hoặc bằng phép thử catalaza). Nếu sử dụng qui trình như vậy thì cần phải nêu trong báo cáo thử nghiệm.

10 Tính toán và biểu thị kết quả

10.1 Trường hợp chung

Tính số lượng vi khuẩn axit lactic chịu nhiệt trung bình, N , có trong mẫu thử là trung bình của hai độ pha loãng liên tiếp, theo công thức sau đây:

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

trong đó

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa ở hai độ pha loãng liên tiếp, ít nhất một đĩa chứa ít nhất 15 khuẩn lạc;

V là thể tích dịch cấy trên mỗi đĩa, tính bằng mililit;

n_1 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất;

n_2 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại.

Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Lấy kết quả là số lượng vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình trong một mililit (đối với sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm dạng khác), được biểu thị theo số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa của 10.

VÍ DỤ

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2) d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19182$$

Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa ta có 19000 hoặc $1,9 \times 10^4$ vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình trong một gam sản phẩm.

10.2 Ước tính số lượng thấp

10.2.1 Nếu có hai đĩa của mẫu thử (sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc của mức pha loãng của huyền phù ban đầu (sản phẩm ở dạng khác) chứa ít hơn 15 khuẩn lạc, thì tính giá trị trung bình, y , của các khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa.

Biểu thị các kết quả như sau:

- đối với các sản phẩm dạng lỏng: số ước tính của vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình trong một mililit $N_E = y$;
- đối với các sản phẩm dạng khác: số ước tính của vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình trong một gam $N_E = y/d$.

trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

10.2.2 Nếu có hai đĩa của mẫu thử (sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc của mức pha loãng của huyền phù ban đầu (sản phẩm ở dạng khác) không chứa khuẩn lạc nào thì biểu thị các kết quả như sau:

- ít hơn 1 vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng);
- ít hơn $1/d$ vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt trung bình trong một gam (sản phẩm dạng khác).

trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

11 Giới hạn tin cậy

Để tính các khoảng tin cậy, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được;
- hoặc nếu độ lặp lại được kiểm tra thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Thư mục liệu tham khảo

- [1] HARTMAN, P.A. and HUNTSBERGER, D.V. Influence of subtle differences in planting procedure on bacterial counts of prepared frozen foods. *J*
- [2] YAY-WILLIAMS, D.J. Report of discussion on the effect of the diluent on the recovery of bacteria *J. Appl. Bacterol.*, **26**, 1963, p. 398.
- [3] KING, W.L., and HURTS, A.A note on the survival of some bacteria in the different diluents. *J. Appl. Bacterol.*, **26**, 1963, p. 504.
- [4] Pharmacopoeia of Culture media of Food Microbiology: de De Man, Rogosa and Sharpe agar with sorbic acid (MRS-S agar). *Int.J.Food Microbiol.*, **5**, 1987, pp. 230-232.