

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 7138:2013

**THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT –
ĐỊNH LƯỢNG PSEUDOMONAS SPP. GIẢ ĐỊNH**

*Meat and meat products –
Enumeration of presumptive Pseudomonas spp.*

Hà Nội - 2013

Lời nói đầu

TCVN 7138:2013 thay thế TCVN 7138:2002;

TCVN 7138:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 13720:2010;

TCVN 7138:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F8
Thịt và sản phẩm thịt biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường
Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thịt và sản phẩm thịt – Định lượng *Pseudomonas* spp. giả định

*Meat and meat products – Enumeration of presumptive *Pseudomonas* spp.*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng *Pseudomonas* spp. giả định có trong thịt và sản phẩm thịt, kể cả thịt gia cầm.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau 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, bổ sung (nếu có).

TCVN 6404 (ISO 7218), *Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn chăn nuôi – Nguyên tắc chung về 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, 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*

TCVN 6507-2 (ISO 6887-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu thịt và sản phẩm thịt*

TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 1: Hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng đối với việc chuẩn bị môi trường nuôi cấy trong phòng thử nghiệm*

TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy – Phần 2: Các hướng dẫn thực hành về thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

***Pseudomonas* spp. giả định** (presumptive *Pseudomonas* spp.)

Vi khuẩn ở 25 °C tạo thành các khuẩn lạc trong thạch natri cephalothin fusidat-cetrimide (CFC) và có phản ứng oxidase dương tính khi được thử nghiệm theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

Chuẩn bị dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân từ phần mẫu thử.

Cấy lên bề mặt môi trường thạch đặc chọn lọc CFC một lượng quy định của huyền phù ban đầu từ mẫu thử.

Chuẩn bị các đĩa khác trong cùng điều kiện cấy, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân của huyền phù ban đầu.

Ủ các đĩa đã cấy ở 25 °C trong 44 h ± 4 h.

Khẳng định các khuẩn lạc *Pseudomonas* spp. bằng phép thử oxidase (dương tính).

Tính số lượng *Pseudomonas* spp. giả định có trong một mililit hoặc trong một gam mẫu từ số khuẩn lạc đã khẳng định trên đĩa.

5 Dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1 Yêu cầu chung

Về thực hành phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218); về việc chuẩn bị và thử nghiệm môi trường: xem TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1) và TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2).

5.2 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) và TCVN 6507-2 (ISO 6887-2).

5.3 Thạch natri cephalothin fusidat-cetrimide (xem Tài liệu tham khảo [3])**5.3.1 Môi trường cơ bản****5.3.1.1 Thành phần**

Sản phẩm thủy phân gelatin bằng enzym	16,0 g
Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	10,0 g
Kali sulfat (K_2SO_4)	10,0 g
Magie clorua ($MgCl_2$)	1,4 g
Thạch ^a	12,0 g đến 18,0 g
Nước	1 000 ml

^a Khối lượng được dùng phụ thuộc vào độ đông của thạch.

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần cơ bản trên hoặc môi trường cơ bản khô trong nước, đun đến sôi.

Chỉnh pH bằng dụng cụ đo pH (6.4) sao cho sau khi khử trùng pH là $7,2 \pm 0,2$ ở $25^\circ C$, nếu cần.

Phân phối môi trường cơ bản vào các bình hoặc các chai có dung tích thích hợp (6.6).

Khử trùng môi trường trong nồi hấp áp lực (6.1) 15 min ở $121^\circ C$.

5.3.2 Dung dịch ức chế

Không giữ các dung dịch ức chế quá 7 ngày ở nhiệt độ $5^\circ C \pm 3^\circ C$.

5.3.2.1 Dung dịch cephalothin**5.3.2.1.1 Thành phần**

Muối natri cephalothin	0,1 g
Nước	100 ml

5.3.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan cephalothin trong nước rồi khử trùng bằng cách lọc.

TCVN 7138:2013

5.3.2.2 Dung dịch natri fusidat

5.3.2.2.1 Thành phần

Natri fusidat	0,1 g
Nước	100 ml

5.3.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan natri fusidat trong nước rồi khử trùng bằng cách lọc.

5.3.2.3 Dung dịch cetrimide

5.3.2.3.1 Thành phần

Cetrimide ^a	0,1 g
Nước	100 ml
^a Hỗn hợp chủ yếu gồm tetradecyltrimethylammonium bromua, cùng với hàm lượng nhỏ hơn của dodecyltrimethylammonium bromua và cetrimonium (hexadecyltrimethylammonium) bromua .	

5.3.2.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan cetrimide trong nước rồi khử trùng bằng cách lọc.

5.3.3 Môi trường hoàn chỉnh

5.3.3.1 Thành phần

	Thể tích ml	Nồng độ cuối cùng µg/ml
Môi trường cơ bản (5.3.1)	100	–
Dung dịch cephalothin (5.3.2.1)	5	50
Dung dịch natri fusidat (5.3.2.2)	1	10
Dung dịch cetrimide (5.3.2.3)	1	10

5.3.3.2 Chuẩn bị

Cho các dung dịch chất ức chế vào môi trường cơ bản đã được làm nguội trong nồi cách thủy (6.3) đến $47\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ và trộn cẩn thận.

5.3.4 Chuẩn bị các đĩa thạch CFC

Rót khoảng 15 ml môi trường hoàn chỉnh (5.3.3) vào các đĩa Petri vô trùng (6.8) và để cho đông lại.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch theo TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1).

Nếu được chuẩn bị trước thì các đĩa thạch chưa khô không được để quá 4 tuần ở nhiệt độ $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.5 Thử hiệu năng

Xác định năng suất và tính chọn lọc theo TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1). Thử hiệu năng của thạch CFC theo các phương pháp và tiêu chí nêu trong TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2).

5.3.5.1 Năng suất

Ủ: ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$

Chủng: *Pseudomonas fluorescens* WDCM 00115¹⁾ hoặc
Pseudomonas fragi WDCM 00116¹⁾

Môi trường chuẩn: Môi trường thạch của sản phẩm thủy phân casein đậu tương (TSA)

Phương pháp kiểm chứng: Định lượng

Tiêu chí: Hệ số năng suất $P_R \geq 0,5$

5.3.5.2 Tính chọn lọc

Ủ: ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$

Chủng: *Escherichia coli* WDCM 00013¹⁾

Phương pháp kiểm chứng: Định lượng

Tiêu chí: Ức chế toàn bộ

¹⁾ Tham khảo chủng đối chứng sẵn có trong catalo (đã được xem xét vào ngày 19 tháng 7 năm 2010) trên [http://www.wfcc.nig.ac.jp/WDCM Reference Strain Catalogue](http://www.wfcc.nig.ac.jp/WDCM%20Reference%20Strain%20Catalogue) về thông tin số lượng chủng thu thập và các chi tiết có liên quan.

5.4 Thuốc thử để phát hiện oxidase

5.4.1 Thành phần

<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyl- <i>p</i> -phenylenediamin dihydroclorua	1,0 g
Nước	100 ml

5.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan thuốc thử trong nước ngay trước khi sử dụng.

Có thể sử dụng các đĩa lòng hoặc que gạt có bán sẵn trên thị trường. Khi đó, cần tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất.

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường (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).

6.2 Tủ ẩm, có khả năng duy trì nhiệt độ $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ $47\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4 Máy đo pH, có thể đo chính xác đến $\pm 0,05$ đơn vị pH.

6.5 Que cấy, bằng hợp kim platin-iridi hoặc vòng cấy vô trùng sử dụng một lần.

6.6 Ống nghiệm, chai hoặc bình, có dung tích thích hợp.

6.7 Pipet xả hết, vô trùng, dung tích danh nghĩa 1 ml, được chia vạch 0,1 ml, phù hợp với yêu cầu loại A trong TCVN 7150 (ISO 835)^[1] hoặc pipet tự động phù hợp với yêu cầu trong ISO 8655-2^[2] với các đầu tip vô trùng.

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

6.9 Que gạt, bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo, ví dụ que bằng thủy tinh dài 200 mm và có đường kính khoảng 3,5 mm, một đầu được uốn vuông góc dài khoảng 30 mm và các đầu được làm nhẵn bằng nhiệt.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nếu chưa có tiêu chuẩn về phương pháp lấy mẫu thì các bên có liên quan cần thỏa thuận về phương pháp lấy mẫu.

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) và TCVN 6507-2 (ISO 6887-2) và/hoặc tiêu chuẩn cụ thể có liên quan. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể thì các bên có liên quan cần thỏa thuận về phương pháp chuẩn bị mẫu.

9 Cách tiến hành

9.1 Phân 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 6507-2 (ISO 6887-2).

9.2 Cấy và ủ

9.2.1 Sử dụng một đĩa cho mỗi độ pha loãng đối với ít nhất hai dung dịch pha loãng liên tiếp, phù hợp với TCVN 6404 (ISO 7218). Nếu chỉ thực hiện với một độ pha loãng thì sử dụng hai đĩa.

9.2.2 Lấy một đĩa thạch CFC (5.3.4). Dùng pipet (6.7) chuyển 0,1 ml huyền phù ban đầu sang đĩa thạch này.

Lấy một đĩa thạch CFC khác. Dùng pipet vô trùng khác chuyển vào đĩa 0,1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất của huyền phù ban đầu.

Lặp lại các thao tác trên đối với các dung dịch pha loãng tiếp theo, dùng pipet vô trùng mới cho mỗi dung dịch pha loãng thập phân.

9.2.3 Dùng que gạt mẫu vô trùng (6.9) để dàn đều chất lỏng trên bề mặt đĩa thạch cho đến khô hẳn.

9.2.4 Lật ngược các đĩa đã chuẩn bị và ủ trong tủ ấm (6.2) ở nhiệt độ $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$.

9.3 Đếm và chọn các khuẩn lạc

Sau khi kết thúc thời gian ủ quy định, đếm số khuẩn lạc trên từng đĩa và giữ lại các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc.

Từ mỗi đĩa được giữ lại để khẳng định (9.4), chọn ngẫu nhiên năm khuẩn lạc, bao gồm tất cả các dạng khuẩn lạc.

9.4 Kháng định

9.4.1 Phản ứng oxidase

Làm ẩm mảnh giấy lọc bằng thuốc thử oxidase (5.4.2). Dùng que cấy bằng hợp kim platin-iridi hoặc vòng cấy bằng chất dẻo (vòng cấy bằng niken-crom sẽ cho kết quả dương tính giả) (6.5) để lấy mẫu từ khuẩn lạc đã chọn cho lên giấy lọc đã được làm ẩm.

Nếu có mặt oxidase thì trong khoảng từ 5 s đến 10 s sẽ cho màu tím đến màu đỏ tía. Nếu sau 10 s mà màu sắc không đổi thì phép thử được coi là âm tính.

Kháng định kết quả bằng các kiểm chứng dương tính và kiểm chứng âm tính. Ví dụ về các chủng kiểm chứng thích hợp là *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00025²⁾ (kiểm chứng dương tính), *Escherichia coli* WDCM 00013²⁾ (kiểm chứng âm tính).

9.4.2 Diễn giải kết quả

Các khuẩn lạc cho phản ứng oxidase dương tính được coi là các khuẩn lạc *Pseudomonas spp.* giả định.

10 Biểu thị kết quả

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ các thông tin sau:

- a) mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- c) kết quả thử nghiệm thu được;
- d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.

²⁾ Tham khảo chủng đối chứng sẵn có trong catalo (đã được xem xét vào ngày 19 tháng 7 năm 2010) trên [http://www.wfcc.nig.ac.jp/WDCM Reference Strain Catalogue](http://www.wfcc.nig.ac.jp/WDCM%20Reference%20Strain%20Catalogue) về thông tin số lượng chủng thu thập và các chi tiết có liên quan.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 7150:2007 (ISO 835:2007), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ*
 - [2] ISO 8655-2, *Piston-operated volumetric apparatus – Part 2: Piston pipettes*
 - [3] MEAD, G.C and ADAMS, B.W.A selective medium for the rapid isolation of *Pseudomonas* associated with poultry meat spoilage. *Br. Poult. Sci*, 18, 1977, pp. 661-670.
-