

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 8899:2012
ISO/TS 11059:2009**

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA –
PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG *PSEUDOMONAS* SPP.**

Milk and milk products – Method for the enumeration of Pseudomonas spp.

HÀ NỘI – 2012

Lời nói đầu

TCVN 8899:2012 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 11059:2009;

TCVN 8899:2012 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm tổ chức biên soạn,
Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định,
Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa và sản phẩm sữa – Phương pháp định lượng *Pseudomonas* spp.

Milk and milk products – Method for the enumeration of Pseudomonas spp.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng *Pseudomonas* spp. có trong sữa và các sản phẩm sữa. Phương pháp này cho phép phân lập được tất cả *Pseudomonas* spp. ưa lạnh sinh sắc tố và không sinh sắc tố.

Tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng cho các mẫu môi trường trong sản xuất sữa.

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 thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật*

TCVN 8128-1:2009 (ISO/TS 11133-1:2009), *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 8128-2:2009 (ISO/TS 11133-2:2003), *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.*

TCVN 8899:2012

ISO 6887-5, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products (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 5: Các nguyên tắc cụ thể đối với sữa và sản phẩm sữa).*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

***Pseudomonas* spp.** (*Pseudomonas* spp.)

Các loài vi khuẩn thuộc giống *Pseudomonas* tạo thành các khuẩn lạc trong thạch penicillin và pimaricin (PPA) ở 25 °C có các đặc tính hóa sinh như mô tả, khi tiến hành các phép thử theo quy định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

Cấy lên bề mặt môi trường nuôi cấy chọn lọc đặc một lượng xác định của mẫu thử nếu sản phẩm dạng lỏng hoặc một lượng xác định của huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác. Trong các điều kiện tương tự, cấy các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu.

Ủ các đĩa đã cấy trong 48 h ở nhiệt độ 25 °C trong điều kiện hiếu khí.

Tính lượng *Pseudomonas* trong một millilit hoặc trong một gam mẫu từ số khuẩn lạc thu được trên các đĩa ở các mức pha loãng được chọn sao cho kết quả có ý nghĩa và sau khi khẳng định các khuẩn lạc được chọn bằng phép thử oxidaza và phép thử lên men glucoza.

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 8128-1 (ISO/TS 11133-1) và TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2).

5.2 Dịch pha loãng

Xem ISO 6887-5.

5.3 Thạch penicillin và pimaricin (PPA)

5.3.1 Môi trường cơ bản

5.3.1.1 Thành phần

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

^a Tùy thuộc vào cường độ gel của thạch.

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là $7,2 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^\circ\text{C}$, nếu cần. Phân phối môi trường cơ bản vào các bình hoặc các chai có dung tích thích hợp. Khử trùng môi trường trong nồi hấp áp lực (6.1) ở $121\text{ }^\circ\text{C}$ trong 15 min.

5.3.2 Dung dịch ức chế

5.3.2.1 Dung dịch penicillin

5.3.2.1.1 Thành phần

Thành phần	Khối lượng
Penicillin G, muối kali	10^6 IU
Nước	10 ml

5.3.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan penicillin trong nước và lọc để khử trùng.

Dung dịch penicillin này khi được bảo quản ở $5\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$ thì có thể bền được một tuần hoặc khi được làm đông lạnh các lượng nhỏ ở $-20\text{ }^\circ\text{C}$ thì có thể bền được 6 tháng.

TCVN 8899:2012

5.3.2.2 Dung dịch pimarinic

5.3.2.2.1 Thành phần

Thành phần	Khối lượng
Pimaricin (natamycin)	0,1 g
Nước	10 ml

5.3.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan pimarinic trong nước. Khử trùng bằng hấp áp lực (6.1) ở 110 °C trong 20 min.

Pimaricin không bền trong dung dịch và cần được bảo quản tránh ánh sáng. Do đó, cần sử dụng dung dịch này trong ngày chuẩn bị. Cách khác, có thể bảo quản đông lạnh dung dịch này với các lượng nhỏ ở -20 °C trong 6 tháng.

5.3.3 Môi trường hoàn chỉnh

5.3.3.1 Thành phần

Thể tích	Nồng độ cuối cùng
Môi trường cơ bản 100 ml	–
Dung dịch penicillin 0,1 ml	100 000 IU/l
Dung dịch pimarinic 0,1 ml	0,01 g/l

5.3.3.2 Chuẩn bị

Trong điều kiện vô trùng, bổ sung các dung dịch chất ức chế vào môi trường cơ bản đã được làm tan chảy và được duy trì ở 44 °C đến 47 °C. Trộn cẩn thận môi trường hoàn chỉnh mới được chuẩn bị này.

5.3.4 Chuẩn bị các đĩa thạch PPA

Chuẩn bị và làm khô các đĩa thạch, theo TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1). Nếu đã chuẩn bị trước, thì các đĩa này có thể giữ ở 5 °C ± 3 °C nơi tối trong không quá một ngày.

5.3.5 Thực hiện phép thử để kiểm soát chất lượng

5.3.5.1 Năng suất

Ủ: 25 °C ± 1 °C trong 48 h ± 2 h

Chủng: *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 hoặc

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Môi trường đối chứng: Môi trường thạch từ dịch thủy phân casein đậu tương (TSA)

Phương pháp kiểm tra: Định lượng

Chuẩn cứ: Tỷ lệ năng suất, $P_R > 0,5$ và các khuẩn lạc không đặc trưng.

5.3.5.2 Tính chọn lọc

Ủ: $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ trong 48 h \pm 2 h

Chủng: *Escherichia coli* ATCC 25922 hoặc

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Phương pháp kiểm tra: Định tính

Chuẩn cứ: Ước chế hoàn toàn

5.4 Thạch dinh dưỡng

5.4.1 Thành phần

Thành phần	Khối lượng
Chất chiết thịt	3,0 g
Sản phẩm phân hủy mô động vật bằng enzym	5,0 g
Thạch	từ 12,0 đến 18,0 g ^a
Nước	1 000 ml
^a Tùy vào cường độ gel của thạch	

5.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần khô hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là $7,0 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^\circ\text{C}$, nếu cần. Phân phối môi trường vào các ống nghiệm hoặc các chai có dung tích thích hợp. Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) ở $121\text{ }^\circ\text{C}$ trong 15 min.

5.4.3 Chuẩn bị các đĩa thạch dinh dưỡng

Chuẩn bị, làm khô và bảo quản các đĩa thạch dinh dưỡng, theo TCVN 8128-1 (ISO/TS 11133-1).

5.4.4 Thực hiện phép thử để kiểm soát chất lượng

Các chi tiết về năng suất như sau:

Ủ: $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ trong 24 h \pm 2 h

TCVN 8899:2012

Chủng: *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 hoặc
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853,
Escherichia coli ATCC 25922 hoặc
Staphylococcus aureus ATCC 25923

Môi trường đối chứng: Môi trường thạch từ sản phẩm phân hủy casein đậu tương (TSA)

Phương pháp kiểm tra: Định lượng

Chuẩn cứ: Tỷ lệ năng suất, $P_R > 0,7$ và các khuẩn lạc không đặc trưng.

5.5 Thạch glucoza

5.5.1 Thành phần

Thành phần	Khối lượng
Sản phẩm phân hủy casein bằng enzym	10,0 g
Chất chiết nấm men	1,5 g
Natri clorua	5,0 g
Glucoza	10,0 g
Bromocresol tía	0,015 g
Thạch	từ 12,0 g đến 18,0 g ^a
Nước	1 000 ml

^a Tùy vào cường độ gel của thạch

5.5.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần khô hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi, nếu cần. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Phân phối môi trường với các lượng 10 ml vào các ống nghiệm (6.5). Khử trùng thạch glucoza trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121°C trong 15 min. Để các ống nghiệm theo tư thế thẳng đứng.

Ngay trước khi sử dụng, gia nhiệt bằng nước sôi hoặc dòng hơi nước trong 15 min. Sau đó nhanh chóng đưa về nhiệt độ ủ.

5.5.3 Thực hiện phép thử để kiểm soát chất lượng

5.5.3.1 Phép thử dương tính

Ủ: $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$

Chủng: *Escherichia coli* ATCC 25922

Phương pháp kiểm tra: Định tính

Chuẩn cứ: Dương tính

5.5.3.2 Phép thử âm tính

Ủ: $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 h \pm 2 h

Chủng: *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 hoặc
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Phương pháp kiểm tra: Định tính

Chuẩn cứ: Âm tính

5.6 Thuốc thử phát hiện oxidaza

5.6.1 Thành phần

Thành phần	Khối lượng
<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyl- <i>p</i> -phenylenediamin dihydrochlorua	1,0 g
Nước	100 ml

5.6.2 Chuẩn bị

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

Có thể sử dụng thuốc thử có bán sẵn trên thị trường và phải tuân thủ hướng dẫn của nhà sản xuất.

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ 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).

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

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

6.3 Máy đo pH.

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

TCVN 8899:2012

6.4 Que cấy vòng, bằng platin-iridi hoặc bằng chất dẻo vô trùng, đường kính khoảng 3 mm hoặc **dây** cùng chất liệu hoặc **đũa thủy tinh**.

CHÚ THÍCH: Không sử dụng que cấy vòng bằng niken-crom trong phép thử oxidaza (xem 8.4.2).

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

6.6 Pipet chia độ xả hết, dung tích 1 ml, được chia vạch 0,1 ml phù hợp với loại A trong TCVN 7150 (ISO 835)^[2], hoặc **pipet tự động** như quy định trong ISO 8655-2^[3], sử dụng với các đầu tip vô trùng dùng một lần.

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

6.8 Que gạt, bằng thủy tinh hoặc bằng chất dẻo, thí dụ cán cầm bằng đũa thủy tinh dài 200 mm và có đường kính khoảng 3,5 mm, một đầu dài khoảng 30 mm được uốn vuông góc và đầu mút được làm nhẵn bằng nhiệt.

7 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707) ^[1].

Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể nào liên quan đến việc lấy mẫu của sản phẩm có liên quan thì các bên tự thỏa thuận về vấn đề này.

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân

Chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân theo ISO 6887-5.

8.2 Cấy và ủ

8.2.1 Lấy hai đĩa thạch PPA (5.3.4). Dùng pipet vô trùng (6.6) chuyển vào mỗi đĩa 0,1 ml mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu. Lấy một đĩa PPA khác. Dùng pipet vô trùng (6.6) chuyển vào đĩa mới vô trùng này 0,1 ml dung dịch pha loãng thập phân thử nhất.

Lặp lại các thao tác này với các độ pha loãng tiếp theo, dùng pipet vô trùng mới cho mỗi độ pha loãng.

8.2.2 Dùng que gạt mẫu vô trùng (6.8) để dàn đều chất lỏng trên bề mặt đĩa thạch cho đến khô.

8.2.3 Lật úp các đĩa đã chuẩn bị (8.2.2) cho bề mặt thạch xuống phía dưới rồi để trong tủ ẩm (6.2) ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 48 h \pm 2 h.

8.3 Đếm và chọn 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 chọn ngẫu nhiên năm khuẩn lạc để thử khẳng định theo 8.4.

8.4 Thử khẳng định

8.4.1 Cấy truyền

Ria cấy từ mỗi khuẩn lạc đã chọn lên các đĩa thạch dinh dưỡng (5.4.3) để khẳng định.

Ủ các đĩa này trong tủ ẩm (6.2) ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong khoảng từ 24 h đến 48 h. Trên mỗi đĩa đã ủ chọn lấy một khuẩn lạc phân lập tốt để thử khẳng định đặc tính sinh hoá.

8.4.2 Phản ứng oxidaza

Làm ẩm mảnh giấy lọc bằng thuốc thử oxidaza (5.6.2). Dùng dây platin-iridi hoặc đũa thủy tinh hoặc đũa bằng chất dẻo (6.4) lấy một ít khuẩn lạc bôi lên mảnh giấy lọc đã được làm ẩm (que cấy bằng niken/crom sẽ cho kết quả dương tính giả).

Trong trường hợp có mặt oxidaza, màu tím đậm đến màu đỏ tía sẽ xuất hiện trong khoảng từ 5 s đến 30 s. Nếu sau 30 s mà màu sắc không đổi thì phép thử được coi là âm tính.

8.4.3 Lên men glucoza

Dùng que cấy (6.4), cấy đâm sâu các khuẩn lạc được lấy từ thạch dinh dưỡng vào các ống thạch glucoza (5.5.2). Nới lỏng nút bông và ủ các ống thạch này ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 h \pm 3 h.

Phép thử được coi là âm tính (không lên men glucoza) khi thấy có vi khuẩn phát triển nhưng môi trường không chuyển màu vàng. Một số chủng *Pseudomonas* có thể làm bề mặt thạch chuyển màu vàng do oxi hóa glucoza.

8.4.4 Giải thích kết quả: các khuẩn lạc

Các khuẩn lạc có phản ứng oxidaza dương tính và không lên men glucoza được coi là khuẩn lạc *Pseudomonas*.

TCVN 8899:2012

9 Biểu thị kết quả

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

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 đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- c) kết quả thử nghiệm thu được;
- d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.*
 - [2] TCVN 7150 (ISO 835), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ.*
 - [3] ISO 8655-2, *Piston-operated volumetric apparatus – Part 2: Piston pipettes.*
-