

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8104 : 2009

ISO 17792 : 2006

Xuất bản lần 1

**SỮA, SẢN PHẨM SỮA VÀ
CÁC CHỦNG KHỞI ĐỘNG ƯA ẤM –
ĐỊNH LƯỢNG VI KHUẨN LACTIC LÊN MEN XITRAT –
KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 25 °C**

*Milk, milk products and mesophilic starter cultures –
Enumeration of citrate-fermenting lactic acid bacteria –
Colony-count technique at 25 °C*

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8104 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 17792 : 2006;

TCVN 8104 : 2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12
Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường
Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa, sản phẩm sữa và các chủng khởi động ưa nhiệt ấm – Định lượng vi khuẩn lactic lên men xitrat – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25 °C

Milk, milk products and mesophilic starter cultures – Enumeration of citrate-fermenting lactic acid bacteria – Colony-count technique at 25 °C

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các phương pháp định lượng vi khuẩn lactic lên men xitrat sử dụng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25 °C.

Phương pháp này có thể áp dụng cho các chủng cấy gốc từ sữa và sản phẩm sữa có chứa các vi sinh vật có đặc tính trên.

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 2230 (ISO 565), Sàng thử nghiệm – Lưới kim loại đan, tấm kim loại đột lỗ và lưới đột lỗ bằng điện – Kích thước lỗ danh nghĩa.

TCVN 6263 (ISO 8261), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật.

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.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Vi khuẩn lên men xitrat (citrate-fermenting bacteria)

Vi khuẩn lactic lên men đồng hình và lên men dị hình có khuẩn lạc hình hạt đậu với đường kính từ 0,5 mm đến 1,2 mm trong môi trường chọn lọc chứa xitrat và các chất chỉ thị đặc biệt được quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Các chủng vi khuẩn lactic ưa nhiệt ấm lên men xitrat quan trọng nhất bao gồm các loài sau đây:

a) Đối với lactococci:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*;

quan sát qua kính hiển vi: các vi khuẩn lactococcus là những tế bào hình cầu hoặc hình trứng (từ 0,4 µm đến 1,0 µm), xuất hiện thành từng cặp hoặc từng chuỗi; chúng không sinh bào tử, Gram dương, không di động và catalaza âm tính.

b) Đối với vi khuẩn leuconostoc:

- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*;
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*;
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*;
- *Leuconostoc latis*;

quan sát về bề ngoài qua kính hiển vi: các vi khuẩn leuconostoc nói chung là những tế bào hình cầu hoặc hình hạt đậu (từ 0,4 µm đến 0,5 µm), xuất hiện thành từng cặp hoặc từng chuỗi; chúng không sinh bào tử, Gram dương, không di động và catalaza âm tính.

4 Nguyên tắc

4.1 Dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử được nuôi cấy trong:

a) Môi trường Nickels và Leesment [4] cải biến [3], được ủ hiếu khí ở nhiệt độ 25 °C trong 72 h, sau đó đếm số vi khuẩn lên men xitrat (các quầng) và số vi khuẩn không lên men xitrat (không có quầng). Sau đó bổ sung X-gal rồi cách ủ hiếu khí ở nhiệt độ phòng trong 24 h để phân biệt *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (khuẩn lạc trắng có quầng) và các chủng vi khuẩn leuconostoc (khuẩn lạc xanh lam có hoặc không có quầng bao quanh).

b) Môi trường Nickels và Leesment [4] có bổ sung vancomycin, rồi được ủ hiếu khí ở nhiệt độ 25 °C trong 3 đến 5 ngày, để định lượng leuconostoc.

4.2 Khuẩn lạc được đếm và khẳng định bằng các phép thử phù hợp.

4.3 Số lượng vi sinh vật đặc trưng trên mỗi gam mẫu thử được tính theo số khuẩn lạc thu được trên đĩa ở các độ pha loãng để thu được kết quả có nghĩa.

5 Dung dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1 Yêu cầu chung

Chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

Các phép thử để xác định khả năng phù hợp của nước cho các ứng dụng vi sinh đã được công bố^[2].

CẢNH BÁO – Một số thuốc thử có độc tính và/hoặc nguy hiểm và có thể gây dị ứng khi hít phải và tiếp xúc với da.

5.2 Vật liệu cơ bản

Xem TCVN 6263 (ISO 8261) và TCVN 6404 (ISO 7218).

5.3 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

5.4 Môi trường nuôi cấy

5.4.1 Môi trường Nickels và Leesment + X-gal^[3]

CHÚ THÍCH Vấn đề chính khi sử dụng môi trường Nickels và Leesment cải biến là vi khuẩn không lên men khó sinh trưởng. Khi các vi khuẩn không lên men này phát triển mạnh có kích thước quá nhỏ nên dễ bị nhầm lẫn với các phân tử canxi xitrat không hoà tan.

5.4.1.1 Môi trường cơ bản

5.4.1.1.1 Thành phần

Sản phẩm phân huỷ casein bằng trypsin	20,0 g
Chất chiết nấm men	5,0 g
Gelatin	2,5 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	5,0 g
Lactoza (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	5,0 g
Natri clorua (NaCl)	4,0 g
Trinatri xitrat ngậm hai phân tử nước (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O)	2,0 g
Thạch	(12,0 đến 15,0) g ^a
Nước vừa đủ	1 000 ml

^a Phụ thuộc vào sức đông của thạch.

5.4.1.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan từng thành phần trên trong nước. Đun nóng huyền phù thu được đến sôi trong khi khuấy liên tục để hoà tan hết các thành phần. Trộn kỹ các phần đã hoà tan. Thêm nước vừa đủ 1 000 ml.

Phân phối môi trường vào các ống và khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min. Nếu cần, chỉnh pH bằng cách sử dụng thuốc thử điều chỉnh pH (5.5) và máy đo pH (6.7), sao cho sau khi khử trùng pH từ 6,6 đến 6,7.

5.4.1.2 Dung dịch canxi lactat

5.4.1.2.1 Thành phần

Canxi lactat ngậm năm phân tử nước ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	8,0 g
Nước	100 ml

5.4.1.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan canxi lactat ngậm năm phân tử nước trong nước bằng cách đun nóng. Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min.

5.4.1.3 Huyền phù canxi xitrat

5.4.1.3.1 Thành phần

Tricanxi dixitrat ngậm bốn phân tử nước ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Ca}_3\text{O}_{14} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	13,3 g
Cacboxymetylxenluloza (CMC)	0,8 g
Nước vừa đủ	100 ml

5.4.1.3.2 Chuẩn bị

Nghiền canxi dixitrat ngậm bốn phân tử nước, đã được lọc qua rây có kích thước lỗ danh định 0,8 mm [xem TCVN 2230 (ISO 565)], và CMC trong cùng một cối nghiền.

Thêm từ từ nước đã được làm ấm ở nhiệt độ khoảng $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến 100 ml. Trộn hỗn hợp thu được trong 10 min và lọc chân không với lớp vải bông. Khử trùng huyền phù đã lọc trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min.

CHÚ THÍCH Khoảng 30 % canxi xitrat bị thất thoát trong quá trình lọc.

5.4.1.4 Huyết thanh chủng khởi động

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy chủng khởi động bằng cách cấy chủng khởi động L-, D- hoặc LD- ở nhiệt độ $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 24 h trong sữa gầy hoặc sữa gầy pha lại đã được khử trùng trong nồi hấp áp lực.

Lọc qua giấy lọc và khử trùng dịch lọc ở nhiệt độ $115\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min. Gạn lắng để loại bỏ phần cặn và khử trùng 200 ml dịch lọc một lần nữa.

5.4.1.5 Dung dịch X-gal

CẢNH BÁO – X-gal và NMP là các chất độc và phải được xử lí trong tủ hút.

5.4.1.5.1 Thành phần

5-brom-4-clo-3-indolyl- β -D-galactopyranozid (X-gal)	400 mg
N-metyl-2-pyrolidon (NMP)	100 ml

5.4.1.5.2 Chuẩn bị

Hoà tan X-gal trong NMP và khử trùng bằng cách lọc (xem 6.13) qua phễu lọc Durapore $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (ví dụ của Millipore)¹⁾. Bảo quản dung dịch ở $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4.1.6 Môi trường hoàn chỉnh

5.4.1.6.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.4.1.1)	900 ml
Dung dịch canxi lactat (5.4.1.2)	100 ml
Huyền phù canxi xitrat (5.4.1.3)	50 ml
Huyết thanh chủng cấy gốc (5.4.1.4)	100 ml

5.4.1.6.2 Chuẩn bị

Ngay trước khi sử dụng, làm tan chảy môi trường cơ bản (5.4.1.1) trên nồi cách thuỷ đang sôi. Sau khi làm tan chảy, đưa môi trường cơ bản về nhiệt độ khoảng $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Làm ấm sơ bộ dung dịch canxi lactat (5.4.1.2), huyền phù canxi xitrat (5.4.1.3) và huyết thanh chủng cấy gốc (5.4.1.4) trên nồi cách thuỷ (6.6) ở nhiệt độ từ $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trong điều kiện vô trùng, thêm từng thành phần này vào môi trường cơ bản đã tan chảy và trộn.

¹⁾ Millipore là tên của một nhà sản xuất sản phẩm có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này, ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm trên.

5.4.2 Môi trường Nickels và Leesment⁽⁴⁾ bổ sung vancomycin

5.4.2.1 Môi trường cơ bản

Xem 5.4.1.1.

5.4.2.2 Dung dịch canxi lactat

Xem 5.4.1.2.

5.4.2.3 Huyền phù canxi xitrat

Xem 5.4.1.3.

5.4.2.4 Huyết thanh chủng cây gốc

Xem 5.4.1.4.

5.4.2.5 Dung dịch vancomycin (2 % thể tích)

CẢNH BÁO – Vancomycin có thể gây dị ứng khi hít phải và tiếp xúc với da. Phụ nữ có thai và đang cho con bú không được làm việc với thuốc thử này.

5.4.5.5.1 Thành phần

Vancomycin	360 mg đến 440 mg
Nước	20 ml

5.4.2.5.2 Chuẩn bị

Hoà tan vancomycin trong nước cất và lọc để khử trùng.

Dung dịch vancomycin có thể bền được một tuần khi được bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 7 °C hoặc bốn tuần khi được bảo quản ở -20 °C.

5.4.2.6 Môi trường hoàn chỉnh

5.4.2.6.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.4.1.1)	900 ml
Dung dịch canxi lactat (5.4.1.2)	100 ml
Huyền phù canxi xitrat (5.4.1.3)	50 ml
Huyết thanh chủng cây gốc (5.4.1.4)	100 ml
Dung dịch vancomycin (5.4.2.5)	11,5 ml

5.4.2.6.2 Chuẩn bị

Trước khi sử dụng, làm tan chảy môi trường cơ bản (5.4.1.1) trên nồi cách thủy sau đó làm nguội về nhiệt độ khoảng 48 °C đến 50 °C.

Làm ấm sơ bộ dung dịch canxi lactat (5.4.1.2), huyền phù canxi xitrat (5.4.1.3) và huyết thanh chủng cấy gốc (5.4.1.4) tới nhiệt độ từ 48 °C đến 50 °C. Trong điều kiện vô trùng, thêm từng phần này vào môi trường cơ bản đã tan chảy.

Ngay trước khi sử dụng, thêm 11,5 ml dung dịch vancomycin (5.4.2.5). Trộn kĩ và sử dụng môi trường vừa chuẩn bị này trong vòng 5 min.

5.5 Thuốc thử điều chỉnh pH

5.5.1 Natri hydroxit (NaOH), khoảng 0,1 mol/l.

5.5.2 Axit clohydric (HCl), khoảng 0,1 mol/l.

5.5.3 Axit axetic (CH₃COOH), băng.

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường, các thiết bị, dụng cụ cần thiết để chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng được quy định trong TCVN 6263 (ISO 8261) và cụ thể như sau:

6.1 Tủ ấm, có thể hoạt động ở nhiệt độ 25 °C ± 1 °C.

6.2 Máy trộn, loại nhu động (dạng túi) với các bình chứa bằng nhựa vô trùng, hoặc máy trộn quay có thể hoạt động với tần số nhỏ nhất 20 000 min⁻¹, với các bình chứa bằng thủy tinh hoặc kim loại vô trùng có dung tích thích hợp.

6.3 Bộ khuấy trộn dùng cho ống nghiệm, ví dụ máy trộn Vortex.

6.4 Thiết bị đếm khuẩn lạc, gồm một hệ thống chiếu sáng trên nền màu tối phù hợp với thấu kính khuếch đại sử dụng với độ phóng đại gấp 1,5 lần, và bộ đếm cơ hoặc điện tử.

6.5 Thấu kính, độ phóng đại từ 8 lần đến 10 lần.

6.6 Nồi cách thủy, có thể hoạt động ở nhiệt độ từ 48 °C đến 50 °C.

6.7 Máy đo pH, có bù nhiệt, có thể đo chính xác đến ± 0,1 đơn vị pH ở 25 °C.

TCVN 8104 : 2009

6.8 Chai pha loãng, dung tích 150 ml đến 250 ml, hoặc **ống nghiệm**, đường kính 18 mm, dài 180 mm, có nắp đậy thích hợp hoặc nút bằng cao su hay vật liệu tổng hợp.

6.9 Bình hoặc chai, dung tích 150 ml đến 250 ml, và **ống nghiệm**, dung tích khoảng 20 ml, để đựng môi trường nuôi cấy.

6.10 Pipet tự động, có đầu tip vô trùng, hoặc **pipet chia độ**, đầu tip được hiệu chuẩn, có thể phân phối các thể tích là $1 \text{ ml} \pm 0,02 \text{ ml}$, $10 \text{ ml} \pm 0,2 \text{ ml}$ và $11 \text{ ml} \pm 0,2 \text{ ml}$.

Có thể sử dụng pipet làm bằng vật liệu tổng hợp đã được khử trùng thay cho pipet thủy tinh.

6.11 Đĩa Petri, đường kính là 90 mm và 140 mm, làm bằng thủy tinh hoặc nhựa trong không màu, có chiều sâu tối thiểu 10 mm. Đáy đĩa petri không có gì bất thường gây cản trở cho việc đếm khuẩn lạc.

6.12 Bộ dàn mẫu thủy tinh.

6.13 Dụng cụ lọc để khử trùng

Khử trùng thiết bị sẽ tiếp xúc với mẫu thử, dịch pha loãng, các dung dịch hoặc môi trường nuôi cấy theo TCVN 6263 (ISO 8261)

7 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc không bị biến đổi chất lượng trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

8 Chuẩn bị mẫu thử và cấy

8.1 Chuẩn bị mẫu thử và phần mẫu thử

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

CẢNH BÁO AN TOÀN – Trước khi mở bình chứa chủng cấy gốc hoặc các sản phẩm sữa, cần làm sạch bề mặt xung quanh vị trí lấy mẫu, nhằm loại bỏ bất kỳ vật liệu có thể làm nhiễm bẩn mẫu thử. Vùng này có thể được lau bằng cồn 70 % (thể tích) để tránh nhiễm bẩn tiếp theo. Mở bình chứa trong điều kiện vô trùng.

Trong suốt giai đoạn chuẩn bị mẫu, điều quan trọng là không chỉ thu được dịch pha loãng đồng nhất (xem 6.2 và 6.3) mà còn thu cả các đoạn ngắn của các chuỗi vi sinh vật thành các tế bào đơn hoặc các đoạn ngắn, sao cho kết quả được biểu thị theo tổng số khuẩn lạc sống có thể có trong một gam sản phẩm, có tính tái lập và đại diện.

8.2 Kiểm tra bằng kính hiển vi

Tiến hành kiểm tra sơ bộ bằng kính hiển vi đối với một vài đốm bản của chất lỏng hoặc dung dịch pha loãng thứ nhất của các mẫu dạng rắn và khô [xem TCVN 6263 (ISO 8261)], để lựa chọn dung dịch pha loãng thích hợp cần dùng.

8.3 Chuẩn bị dung dịch pha loãng ban đầu

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

Lưu ý rằng thời gian tính từ khi cấy dung dịch pha loãng và rót vào các đĩa Petri không được vượt quá 15 min [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

8.4 Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

8.5 Nuôi cấy

Dùng pipet vô trùng (6.10) chuyển vào hai đĩa Petri (6.11) mỗi đĩa 1 ml của mỗi dung dịch pha loãng thích hợp.

Để định lượng các loài cầu khuẩn lên men xitrat (9.1) khác nhau, dùng các đĩa Petri có đường kính 140 mm. Để định lượng các loài vi khuẩn leuconostoc (9.2), dùng các đĩa Petri có đường kính 90 mm.

9 Cách tiến hành

9.1 Định lượng các chủng cầu khuẩn lên men xitrat khác nhau

9.1.1 Ủ ấm

Rót 15 ml đến 20 ml môi trường Nickels và Leesment hoàn chỉnh (5.4.2.6) vào đĩa Petri đường kính 140 mm (6.11). Ngay sau khi rót xong trộn kỹ dịch chủng cấy với môi trường bằng cách quay đĩa Petri. Để yên đĩa Petri cho hỗn hợp đông đặc trên mặt phẳng nằm ngang, mát.

Sau khi hỗn hợp đông đặc, thêm tiếp 4 ml đến 5 ml môi trường hoàn chỉnh lên trên để ngăn cản khuẩn lạc mọc lan khi thêm dung dịch X-gal (9.1.2).

Ủ ấm các đĩa Petri đã chuẩn bị, rồi lật úp các đĩa và để trong tủ ấm (6.1) ở nhiệt độ 25 °C trong 72 h. Trong trường hợp vi khuẩn lactic không lên men xitrat (chủng cấy typ O) thì ủ ấm đĩa Petri ở nhiệt độ 25 °C trong 5 ngày. Không chồng cao quá 6 đĩa Petri. Các chồng đĩa này phải để cách xa nhau và cách xa đỉnh và thành của tủ ấm.

9.1.2 Đọc trên đĩa Petri và đếm khuẩn lạc

Đọc lần thứ nhất: sau khi ủ ấm, chọn các đĩa Petri có chứa khoảng 30 khuẩn lạc đến 300 khuẩn lạc và kiểm tra tất cả các đĩa bằng dụng cụ thích hợp (6.4 và 6.5). Chọn ra các đĩa có quang sáng rộng chứa

TCVN 8104 : 2009

vài khuẩn lạc đại diện. Trong các trường hợp này, không thể xác định được khuẩn lạc nào tạo ra quang sáng.

Sau khi chọn, đếm tất cả các khuẩn lạc có hoặc không có quang sáng. Đếm riêng và đánh dấu tất cả các khuẩn lạc có quang sáng. Sau khi đếm, dùng bộ dàn mẫu bằng thủy tinh vô trùng (6.12) để dàn 1,5 ml dung dịch X-gal (5.4.1.5) lên bề mặt các đĩa Petri. Ủ ấm đĩa này ở nhiệt độ phòng để bên trong tủ hốt trong 24 h.

Đọc lần thứ hai: sau khi ủ ấm lần thứ hai, đọc tất cả các khuẩn lạc màu xanh lam, có hoặc không có quang sáng.

9.1.3 Đặc tính chẩn đoán

Các loài khuẩn lạc leuconstoc màu xanh, có hoặc không có quang sáng. Các khuẩn lạc *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* màu trắng có quang sáng. Các khuẩn lạc *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* và *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* có màu trắng, không có quang sáng.

CHÚ THÍCH Một số lactobacilli, pediococci và các chủng *Streptococcus thermophilus* có thể cũng tạo các khuẩn lạc màu xanh lam. Nhiều lactobacilli và pediococci có thể sử dụng xitrat và tạo ra các quang sáng. Một trong số đó cũng có thể sinh axit xung quanh khuẩn lạc đủ để hoà tan xitrat và gây ra dương tính giả. Điều này thường xảy ra đối với các mẫu phomat. Có thể khẳng định điều này bằng cách kiểm tra với kính hiển vi hoặc thử nghiệm tiếp.

9.2 Định lượng leuconostoc

9.2.1 Ủ ấm

Rót 12 ml đến 15 ml môi trường Nickels và Leesment hoàn chỉnh bổ sung vancomycin (5.4.2.6) vào đĩa Petri đường kính 90 mm (6.11). Ngay sau khi rót xong trộn kĩ dịch cấy với môi trường bằng cách xoay đĩa Petri. Để yên đĩa Petri cho hỗn hợp đông đặc trên mặt phẳng nằm ngang, mát.

Lật úp các đĩa petri đã chuẩn bị và để trong tủ ấm (6.1) ở nhiệt độ 25 °C trong 5 ngày. Không chồng cao quá sáu đĩa Petri. Các chồng đĩa này phải để cách xa nhau và cách xa đỉnh và thành bên của tủ ấm [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

9.2.2 Đọc đĩa Petri

Sau khi ủ ấm, chọn các đĩa Petri có chứa khoảng 30 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc và đếm tất cả các khuẩn lạc.

9.3 Kháng định

Chọn khuẩn lạc từ các đĩa để đếm sao cho số được lấy phải là căn bậc hai của số khuẩn lạc đếm được. Nhuộm màu các khuẩn lạc này theo phương pháp Gram và khẳng định rằng chúng là các chuỗi cầu khuẩn hoặc song cầu khuẩn catalaza âm tính, Gram dương và không sinh bào tử.

CHÚ THÍCH Hầu hết các vi khuẩn lactobacilli nhóm 2 và pediococci là các vi khuẩn bền với vancomycin.

10 Tính toán và biểu thị kết quả

10.1 Tính toán

10.1.1 Sử dụng các số đếm từ các đĩa thông thường (đường kính 90 mm) chứa khoảng 30 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc và trên các đĩa rộng (đường kính 140 mm) chứa khoảng 30 khuẩn lạc đến 300 khuẩn lạc.

10.1.2 Tính số lượng từng vi sinh vật đặc trưng, N , trong một gam, theo công thức sau:

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

trong đó:

$\sum c$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa, như trong 10.1.1;

n_1 là số đĩa được đếm ở độ pha loãng thấp hơn;

n_2 là số đĩa được đếm ở độ pha loãng cao hơn;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng cho các số đếm cao hơn.

Trong trường hợp có nhiều hơn hai độ pha loãng đếm được, sửa đổi công thức tính bằng cách bổ sung độ pha loãng tiếp theo vào công thức tính.

Theo đó với ba độ pha loãng, tính toán N theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 \times n_2 + 0,01 \times n_3) \times d}$$

trong đó:

n_3 là số đĩa được đếm ở độ pha loãng thứ ba.

10.2 Biểu thị kết quả

10.2.1 Làm tròn kết quả thu được theo 10.1.2 đến hai chữ số có nghĩa. Đối với số có ba chữ số, làm tròn chữ số thứ ba đến số 0 gần nhất. Nếu chữ số thứ ba là 5, làm tròn về giá trị dưới nếu hai chữ số đầu là số chẵn, và làm tròn lên giá trị trên nếu hai chữ số đầu là số lẻ.

TCVN 8104 : 2009

VÍ DỤ Làm tròn :

- 234 thành 230,
- 235 thành 240,
- 225 thành 220, và
- 245 thành 240.

10.2.2 Nếu chỉ có các số đếm nhỏ hơn 10, thì báo cáo là số vi sinh vật trong mỗi gam là "nhỏ hơn $10 \times 1/d'$ ", trong đó d' là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thấp nhất.

10.2.3 Nếu chỉ có các số đếm lớn hơn 300, thì tính số đếm ước lượng trên các đĩa theo số đếm gần 300 nhất và nhân với nghịch đảo của giá trị tương ứng với độ pha loãng lớn nhất. Báo cáo là "nhỏ hơn số vi sinh vật ước lượng được trên mỗi gam".

10.2.4 Biểu thị kết quả thử nghiệm theo số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa của 10.

10.2.5 Tổng số các vi khuẩn lactic lên men xitrat đặc trưng, N_b , tính trên gam sản phẩm theo công thức sau:

$$N_b = N_L + N_I$$

trong đó

N_L là số *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* trên một gam, tính được trong 10.1.2;

N_I là số vi khuẩn leuconostoc trên một gam, tính được trong 10.1.2.

10.3 Ví dụ tính toán

Giả sử rằng số đếm vi khuẩn lactic lên men xitrat trong môi trường cho kết quả như sau (hai đĩa Petri trên mỗi độ pha loãng được ủ ấm) :

- độ pha loãng 10^{-5} : 295 khuẩn lạc và 245 khuẩn lạc
- độ pha loãng 10^{-6} : 33 khuẩn lạc và 40 khuẩn lạc

Khi đó:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \times d} = \frac{295 + 245 + 33 + 40}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-5}} = \frac{613}{2,2 \times 10^{-5}} = 278,6 \times 10^5$$

Theo 10.2.1, thì N bằng 280×10^5 . Do đó số vi khuẩn hoặc chủng lactic lên men xitrat ước lượng được là: $2,8 \times 10^7$ CFU (đơn vị hình thành khuẩn lạc) trên mỗi gam.

11 Độ chụm

Đối với độ lặp lại, kinh nghiệm cho thấy nếu như chênh lệch giữa kết quả cao hơn với kết quả thấp hơn của hai phép thử độc lập trên cùng mẫu thử thường vượt quá 30 %, thì người phân tích cần kiểm tra quy trình để xác định nguồn gốc của sai lỗi. Xem TCVN 6404 (ISO 7218) để biết thêm thông tin về giới hạn tin cậy của các phương pháp vi sinh vật.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- 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;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
- [2] Marth, E.H. *Standard Method for the Examination of Dairy Products*, 15th edition. American Public Health Association, Washington DC, USA, 1984
- [3] Vogensen, K.F., Karst, T., Larsen, J.J., Kringelum, B., ELLEKAER, D. and Waagner Nielsen, E. Improved direct differentiation between *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* and *Streptococcus cremoris*/*Streptococcus lactis* on agar. *Milchwissenschaft*, 42, 1987, pp.646-648
- [4] Nickels, Von C. and Leesment, H. Methode zur Differenzierung und quantitativen Bestimmung von Saureweckerbakterien. *Milchwissenschaft*, 19,1964, pp. 374-378
-