TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 6505 - 3 : 1999
ISO 11866 - 3 : 1997 (E)

SỮA VÀ CÁC SẢN PHẨM SỮA - ĐỊNH LƯỢNG E.COLI GIẢ ĐỊNH - PHẦN 3 : KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 44°C SỬ DỤNG MÀNG LỌC

Milk and milk products – Enumeration of presumptive Escherichia coli – Part 3 – Colony-count technique at 44°C using membranes

HÀ NỘI – 1999

Lời nói đầu

TCVN 6505 - 3 : 1999 hoàn toàn tương đương với ISO 11866 - 3 : 1997(E)

TCVN 6505 - 3 : 1999 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

Sữa và sản phẩm sữa – Định lượng E.Coli giả định – Phần 3 : Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C sử dụng màng lọc

Milk and milk products – Enumeration of presumptive Escherichia coli – Part 3 – Colony-count technique at 44 °C using membranes

1 Phạm vi áp dụng

TCVN 6505 -3 : 1999 (ISO 11866-3) qui định phương pháp định lượng E.coli giả định bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44°C.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng;
- sữa bột, bột whey có đường, buttermilk bột và lactoza;
- casein axit , casein lactic và casein rennet;
- caseinat, whey bột axit;
- phomát và phomát chế biến;
- bơ;
- sản phẩm sữa đông lạnh (bao gồm cả kem lạnh thực phẩm);
- custard, món tráng miệng và váng kem.

Phương pháp này thích hợp đối với các mẫu có số lượng E.Coli giả định dự đoán tương đối cao (nhiều hơn 100 E.Coli trong một gam, hoặc nhiều hơn 10 E.Coli trong một mililít).

CHÚ Ý – Một số loài E.Coli gây bệnh không phát triển ở 44 °C.

2 Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 6264 : 1997 (ISO 6610 : 1992) Sữa và sản phẩm sữa – Định lượng đơn vị vi sinh vật hình thành khuẩn lạc - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 °C.

TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 : 1996) Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc. Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261) Sữa và các sản phẩm sữa – Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật.

3 Định nghĩa

Áp dụng định nghĩa sau đây trong 6505-3 : 1999:

3.1 E.Coli giả định: Là các vi khuẩn ở nhiệt độ 44°C hình thành các khuẩn lạc có màu hồng của indol dương tính trên màng xelulo axetat đặt trên thạch trypton mật dưới các điều kiện qui định trong 6505-3.

4 Nguyên tắc

Việc định lượng E.Coli giả định yêu cầu bốn giai đoạn liên tiếp như sau :

4.1 Khôi phục

Cấy một lượng mẫu thử qui định hoặc huyền phù ban đầu lên màng xelulô axtat đã được cấy trên thạch glutamat khoáng cải tiến, sau đó nuôi ấm ở 37 °C trong 4 h.

Chú thích – Qui trình này cho phép khôi phục lại các E.Coli giả định bị hư hại do bảo quản đông lạnh, làm khô hoặc do các điều kiện lạnh, hoặc hư hại do xử lí nhiệt hoặc do hoá chất. Đồng thời cũng làm giảm nồng độ cao của bất kì cacbon hidrat nào mà có thể lên men có trong mẫu thử, mà điều này có thể làm cản trở việc sinh indol trong giai đoạn phân lập tiếp theo.

4.2 Phân lập

Chuyển các màng ở giai đoạn khôi phục trên thạch glutamat khoáng cải tiến sang thạch trypton mật. Nuôi ấm ở 44 °C từ 18 h đến 2 4 h.

4.3 Phát hiện

Sự có mặt của E.Coli giả định trên màng lọc được chứng minh bằng tính sinh indol từ mỗi khuẩn lạc.

4.4 Tính toán

Tính số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của E.Coli giả định trong một gam hoặc trong một mililit mẫu thử từ số khuẩn lạc indol dương tính thu được trên các màng lọc ở các mức pha loãng đã chọn sao thu được kết quả có ý nghĩa.

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

5.1 Khái quát

Về các phòng thí nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404:1998 (ISO 7218) và TCVN 6263:1997 (ISO 8261).

Đối với môi trường và thuốc thử đã chuẩn bị nhưng không sử dụng ngay, nếu không có qui định khác, phải bảo quản chỗ tối ở nhiệt độ từ 0 °C đến + 5°C không quá 1 tháng trong các điều kiện không làm thay đổi thành phần của chúng.

5.2 Chất pha loãng

Xem TCVN 6263: 1997 (ISO 8261).

5.3 Môi trường nuối cấy và thuốc thử

5.3.1 Môi trường khôi phục : thạch glutamat khoáng cải tiến

5.3.1.1 Thành phần

Natri glutamat	6,35 g
Lactoza	10,0 g
Natri focmat	0,25 g
L(–) Xistin	0,02 g
L(–) Axit aspactic	0,02 g
L(+) arginin	0,024 g
Thiamin	0,001 g
Axit nicotinic	0,001 g
Axit pantothenic	0,001 g
Magiê sunfat ngậm 7 phân tử nước ($MgSO_4.7H_2O$)	0,100 g
Sắt (III) amoni xitrat [1)]	0,010 g
Canxi clorua ngậm 2 phân tử nước ($CaCl_2.2H_2O$)	0,010 g
Dikali hidro phôtphat (K_2HPO_4)	0,90 g
Amoni clorua	2,5 g
Thạch	12 g - 18 g [2)]
Nước	1 000 ml

1) Hàm lượng sắt nhỏ nhất là 15% (m/m).

2) Tuỳ vào sức đông của thạch.

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan amoni clorua trong nước. Cho thêm các thành phần còn lại vào và đun đến sôi.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng pH phải là 6,7 ở 25°C.

Phân phối môi trường này theo các thể tích 100 ml vào các vật chứa thích hợp.

Khử trùng 10 phút ở 115°C trong nồi hấp áp lực (6.1).

5.3.1.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót vào các đĩa Petri vô trùng (6.12) từ 12 ml đến 15 ml môi trường đã làm mát đến khoảng 45 °C và để cho đông đặc lại. Các đĩa này có thể bảo quản từ 0 °C đến + 5 °C đến 4 ngày.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa này trong tủ sấy hoặc trong lò (6.3) ở 50 °C trong 30 phút, tốt nhất là mở nắp và lật sấp đĩa để mặt thạch hướng xuống dưới, hoặc cho đến khi các hạt nhỏ trên mặt của môi trường biến mất.

Chú thích – Thạch nên để đủ khô 15 phút trước khi ria cấy (1 ml).

5.3.2 Môi trường chọn lọc : Thạch mật trypton

5.3.2.1 Thành phần

Trypton	20,0 g
Muối mật	1,5 g
Thạch	từ 12 g đến 18 g (tuỳ vào sức đông của thạch)
Nước	1 000 ml

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước và đun đến sôi. Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng pH phải là 7,2 ở 25°C.

Phân phối môi trường theo các lượng đến 500 ml vào các vật chứa thích hợp. Khử trùng 15 phút ở 121°C trong nồi hấp áp lực (6.1).

5.3.2.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót vào các đĩa Petri vô trùng (6.12) từ 12 ml đến 15 ml môi trường đã làm mát đến khoảng 45 °C và để cho đông đặc lại. Các đĩa này có thể bảo quản từ 0 °C đến + 5 °C đến 4 ngày.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa này trong tủ sấy hoặc trong lò (6.3) ở 50 °C trong 30 phút, tốt nhất là mở nắp và lật sấp đĩa để mặt thạch hướng xuống dưới, hoặc cho đến khi các hạt nhỏ trên mặt của môi trường biến mất.

5.3.3 Thuốc thử phát hiện indol (thuốc thử Vracko và Sherris)

5.3.3.1 Thành phần

4-Dimetylanimobenzaldehyt	5,0 g
Axit clohidric , c (HCl = 1 mol/l)	100 ml

5.3.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan 4-Dimetylanimobenzaldehyt trong axit clohidric, bằng cách đun nóng khi cần thiết. Thuốc thử này có thể bảo quản ở nơi tối từ 0 °C đến +5 °C tối đa là 3 tháng.

6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Đối với các yêu cầu chung, xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218 : 1996) và TCVN 6263 : 1997 (ISO 8261). Dụng cụ thuỷ tinh phải bền khi khử trùng lại.

Sử dụng các thiết bị thí nghiệm vi sinh thông thường và đặc biệt là:

6.1 Nồi hấp áp lực, có thể duy trì nhiệt độ ở 115°C ± 1°C và 121°C ± 1°C.

Về chi tiết xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở 37°C ± 1°C và ở 44°C ± 0,5°C.

6.3 Tủ sấy hoặc lò, được thông gió bằng dòng đối lưu, có thể duy trì nhiệt độ ở 50°C ± 1°C.

6.4 Tủ lạnh (để bảo quản môi trường và thuốc thử đã chuẩn bị), có thể duy trì nhiệt độ từ 0°C đến 5°C.

6.5 Màng xellulô axetat, có cỡ lỗ từ 0,45 µ m đến 1,2 µm và đường kính 85 mm.

6.6 Đèn tia cực tím (UV) sóng dài, có bước sóng từ 360 nm đến 366 nm, có gắn với bộ lọc thích hợp để loại bỏ phóng xạ UV dưới 310 nm.

Bộ kẹp đầu tù vô trùng, có chiều dài khoảng 12 cm.

6.8 pH-met, có độ chính xác đến ± 0,1 đơn vị pH ở 25 °C.

6.9 Pipet, đã hiệu chuẩn để dùng cho vi khuẩn học có dung tích danh định là 1 ml, được chia độ 0,1 ml và miệng có đường kính từ 2 mm đến 3 mm.

6.10 Ống đong, để chuẩn bị môi trường và thuốc thử.

6.11 Chai hoặc bình cầu, để khử trùng và bảo quản môi trường nuôi cấy.

6.12 Đĩa Petri, làm bằng tuỷ tinh hoặc plastic, có đường kính khoảng 90 mm hoặc 100 mm.

6.13 Que cấy gạt, làm bằng thuỷ tinh hoặc plastic, thí dụ như que thuỷ tinh có đường kính khoảng 3,5 mm và dài khoảng 20 cm, uốn vuông góc ở khoảng 3 cm cách một đầu và đầu cắt kia được làm nhẵn bằng cách đốt nóng.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là phòng thí nghiệm phải nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi thành phần trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo phương pháp qui định trong TCVN 6400 1998 (ISO 707).

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6263 :1997 (ISO 8261).

9 Cách tiến hành

Chú thích – Nếu cần kiểm tra độ lặp lại có thoả mãn hay không (xem điều 11), tiến hành hai phép xác định riêng rẽ theo 9.1 đến 9.5.

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

Chuẩn bị phần mẫu thử, huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng đầu tiên) và các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo TCVN 6263 :1997 (ISO 8261).

9.2 Khôi phục

9.2.1 Dùng bộ kẹp vô trùng (6.7) đặt màng xelulô axetat lên mỗi bề mặt đã khô của hai đĩa có chứa thạch glutamat (5.3.1.3) 1 cách vô trùng, chú ý tránh tạo bọt khí ở dưới màng. Dàn đều các màng một cách nhẹ nhàng bằng que gạt vô trùng (6.13).

Dùng pipet vô trùng (6.9), lấy 1 ml mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu cho vào giữa mỗi màng. Dùng que gạt vô trùng (6.13), phết đều chất cấy lên khắp bề mặt của màng, không để tràn khỏi màng.

9.2.2 Dùng một pipet vô trùng khác (6.9), cấy các thể tích bằng nhau của các dung dịch mẫu thử pha loãng tiếp theo hoặc huyền phù ban đầu lên các màng khác, như qui định trong 9.2.1.

9.2.3 Để các đĩa đã nuôi cấy trong tư thế nằm ngang ở nhiệt độ phòng khoảng 15 phút cho đến khi chất cấy ngập vào trong thạch. Nuôi ấm các đĩa này 4 h trong tủ ấm (6.2) để ở 37 °C với các màng/mặt thạch hướng lên trên.

9.3 Chuyển sang môi trường chọn lọc và nuôi ấm

9.3.1 Dùng bộ kẹp vô trùng (6.7) chuyển các màng từ thạch glutamat (5.3.1.3) sang các đĩa thạch trypton - mật (5.3.2.3).

Cảnh báo – Màng ẩm ướt sẽ dính chặt vào mặt thạch. Tránh tạo bọt khí. Không sử dụng que gạt.

9.3.2 Nuôi ấm các đĩa này từ 18 h đến 24 h trong tủ ấm (6.2) để ở 44 °C với các màng/mặt thạch hướng lên trên. Không chồng các đĩa cao quá ba chiếc.

9.4 Phát hiện tính sinh indol do các khuẩn lạc trên màng lọc.

9.4.1 Ghi nhãn trên nắp của mỗi đĩa (9.3.2) cho việc nhận biết.

9.4.2 Dùng pipet lấy 2 ml thuốc thử indol (5.3.3) cho vào đĩa đã mở nắp đặt ở tư thế nằng ngang.

9.4.3 Dùng bộ kẹp vô trùng (6.7) lấy màng ra khỏi mặt thạch tương ứng và cho vào thuốc thử indol. Nếu cần, phải để nghiêng sao cho tất cả bề mặt của màng được thuốc thử indol làm cho ướt. Sau 5 phút, dùng pipet loại bỏ thuốc thử còn lại.

9.4.4 Các khuẩn lạc indol dương tính cho màu hồng trong vài phút. Nếu cần để ổn định, đặt màng này dưới đèn tia cực tím (6.6) trong 30 phút.

9.5 Đếm khuẩn lạc

Đếm các khuẩn lạc indol dương tính (màu hồng) trên các màng, tốt nhất là trên các màng có từ 10 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc màu hồng.

Các chi tiết về kỹ thuật đếm khuẩn lạc xem TCVN 6264 : 1997 (ISO 6610).

10 Tính toán và biểu thị kết quả

10.1 Tính toán

Tính số CFU của E.Coli giả định, N, trong một gam hoặc trong một mililit sản phẩm theo công thức sau :

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

trong đó

$\sum a$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại hai lần pha loãng liên tiếp;

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

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

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

Chú thích

1) Hệ số pha loãng 10^{-2} nghĩa là 10^{-2} g hoặc 10^{-2} ml mẫu thử chưa pha loãng (ở trạng thái lỏng) đã được lấy để thử.

2) Độ pha loãng thấp hơn là độ pha loãng có nồng độ mẫu thử cao hơn.

10.2 Biểu thị kết quả

10.2.1 Làm tròn số kết quả thu được đến hai chữ số có nghĩa. Nếu như, chữ số cuối cùng dưới 5, giữ nguyên chữ số đứng trước; nếu chữ số cuối cùng là 5 hoặc lớn hơn, tăng số đứng trước lên một đơn vị. Tiến hành như vậy cho đến khi thu được hai chữ số có nghĩa.

Lấy kết quả là số đơn vị khuẩn lạc CFU của E.Coli giả định trong 1 mililít (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong 1 gam (sản phẩm dạng khác), biểu thị bằng một số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10.

10.2.2 Nếu có hai đĩa tương ứng với mẫu thử (sản phẩm lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) có chứa ít hơn 10 khuẩn lạc thì báo cáo kết quả như sau:

- ít hơn 10 CFU của E.Coli giả định trong một mililít (sản phẩm lỏng)
- ít hơn 10 x 1/d CFU của E.Coli giả định trong một gam (sản phẩm dạng khác), trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

10.2.3 Nếu tất cả các đĩa đều chứa nhiều hơn 300 khuẩn lạc, thì tính số lượng ước tính từ các đĩa có số khuẩn lạc gần 150 nhất và nhân số này với số nghịch đảo của độ pha loãng cao nhất.

Báo cáo kết quả theo "số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc E.Coli giả định ước tính trong một gam hoặc một mililít ".

10.3 Thí dụ về cách tính

Việc đếm khuẩn lạc E.Coli giả định ở 44°C cho các kết quả sau :

- độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại chứa : 138 và 125 khuẩn lạc
- độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại chứa : 20 và 18 khuẩn lạc.

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0{,}1 n_2)\, d} = \frac{138 + 125 + 20 + 18}{[2 + (0{,}1 \times 2)]10^{-2}} = \frac{301}{0{,}022} = 13\,680$$

Làm tròn kết quả như qui định trong 10.2.1 thu được 14 000 hoặc $1{,}4 \times 10^4$ CFU của E.Coli giả định trong một gam hoặc trong một mililít sản phẩm.

11 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa kết quả thu được từ hai lần thử riêng rẽ, khi sử dụng cùng một phương pháp, phân tích trên cùng nguyên liệu, do cùng một người tiến hành trong cùng một phòng thí nghiệm dùng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được vượt quá 50% của kết quả thấp hơn.

Chú thích

1) Nếu các trường hợp không thỏa mãn yêu cầu về độ lặp lại là 5%, hoặc lớn hơn thì cần xem xét nguồn gốc có khả năng gây ra sai lỗi.

9) Định nghiã về độ lặp lại xem TCVN 4550 : 1988 (ISO 5725).

12 Báo cáo kết quả

Ban báo cáo kết quả phải ghi rõ:

- phương pháp lấy mẫu đã áp dụng, nếu biết;
- phương pháp đã áp dụng;
- kết quả thử thu được; và
- nếu kiểm tra độ lặp lại, ghi quả cuối cùng thu được.

Báo cáo kết quả cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

Báo cáo kết quả cũng bao gồm tất cả các thông tin cần thiết về việc nhận biết hoàn toàn mẫu thử.

Phụ lục A

(tham khảo)

Thư mục

[1] TCVN 6400 : 1998 (ISO 707) Sữa và sản phẩm sữa. Các phương pháp lấy mẫu

[2] ISO 5725-1 : 1994 Độ chính xác của các phương pháp đo và kết quả. Phần 2 – Các nguyên tắc chung và định nghĩa.

[3] ISO 5725-3 : 1994 Độ chính xác của các phương pháp đo và kết quả. Phần 2 – Phương pháp cơ bản để xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo chuẩn.

[4] ISO 6391 Thịt và sản phẩm thịt – Định lượng E.Coli – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 44 °C dùng màng lọc.