TCVN TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 6404 : 1998
ISO 7218 : 1996 (E)

VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ TRONG THỨC ĂN GIA SÚC –NGUYÊN TẮC CHUNG VỀ KIỂM TRA VI SINH VẬT

Microbiology of food and animal feeding stuffs –
General rules for microbiological examinations

HÀ NỘI - 2005

Lời nói đầu

TCVN 6404 : 1998 hoàn toàn tương đương với ISO 7218 : 1997 (E)

TCVN 6404 : 1998 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.

Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc -

Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật

Microbiology of food and animal feeding stuffs -
General rules for microbiological examinations

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các chỉ dẫn về cách tiến hành kiểm tra vi sinh vật phù hợp với các tiêu chuẩn riêng rẽ.

Mục đích của tiêu chuẩn này là giúp đảm bảo tính hợp thức của công việc kiểm tra nhằm xác định tính đồng nhất của các kỹ thuật chung sử dụng trong kiểm tra ở tất cả các phòng thí nghiệm, giúp đạt được các kết quả đồng nhất tại các phòng thí nghiệm khác nhau và bảo vệ sức khoẻ của nhân viên phòng thí nghiệm bằng cách ngăn ngừa các nguy cơ truyền nhiễm.

Tiêu chuẩn này có thể được sử dụng toàn bộ hoặc từng phần trong việc công nhận phòng thí nghiệm của các cơ quan quốc gia.

2 Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 6887 : 1983, Vi sinh vật học - Hướng dẫn chung về việc chuẩn bị các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vạat.

3 Cơ sở thử nghiệm

3.1 Khu vực thử nghiệm

Các khu vực cần có cho hoạt động đặc thù của phòng thí nghiệm vi sinh vật như sau :

- nơi nhận, nơi bảo quản, nơi chuẩnbị và xử lý mẫu;
- chuẩn bị và khử trùng môi trường nuôi cấy và dụng cụ;
- tiến hành phân tích : cân, ph loãng, cấy, cấy truyền, nuôi ấm, bảo quản các chủng v.v...
- khử nhiễm và làm sạch thiết bị, và xử lý các chất thải sau phân tích.

3.2 Khu vực phụ trợ

Các khu vực thuộc phạm trù này bao gồm :

- lối vào, hành lang, cầu thang, thang máy chở hàng hoặc thang máy;

- khu vực hành chính (thí dụ như : phòng thư ký, văn phòng, phòng tài liệu ..);
- phòng thay áo và nhà vệ sinh;
- phòng văn thư lưu trữ;
- nhà kho.

3.3 Vị trí cơ sở thử nghiệm

Môi trường trong đó tiến hành phân tích vi sinh vật phải không ảnh hưởng đến độ tin cậy của phép phân tích.

Phải chú ý tới vị trí của cơ sở thử nghiệm sao cho tránh nguy cơ tạp nhiễm chéo. Để đạt được điều đó có thể áp dụng nguyên tắc "đường một chiều".

Phải chú ý đảm bảo việc bảo vệ khỏi các điều kiện vượt quá sự cho phép như nhiệt độ, bụi, độ ẩm, hơi nước, tiếng ồn, độ rung, ánh sáng mặt trời chiếu thẳng...

Mặt bằng khu vực phải đủ rộng để giữ được vệ sinh và ngăn nắp. Đối với tất cả các cơ sở thử nghiệm, nên có khoản 20 m^2 diện tích làm việc cho mỗi phân tích viên.

Trong khi tiến hành thử nghiệm, cần chú ý hạn chế việc qua lại khu vực thử nghiệm, chỉ dành cho những người cần thiết để thực hiện thử nghiệm.

Cần có các phòng riêng biệt và/hoặc các khu vực riêng biệt và / hoặc các khu được khoanh vùng riêng dành cho việc :

- nhận mẫu và bảo quản mẫu;
- chuẩn bị mẫu , đặc biệt trong trường hợp nguyên liệu thô (thí dụ như sản phẩm dạng bột có chứa số lượng lớn vi sinh vật);
- thao tác với vi sinh vật gây bệnh (thí dụ Salmonella, Listeria monocytogenes);
- chuẩn bị và khử trùng môi trường nuôi cấy, dụng cụ;
- rửa dụng cụ thuỷ tinh và các dụng cụ khác, cũng như khử nhiễm dụng cụ và môi trường nuôi cấy;
- kiểm tra độ vô trùng của thực phẩm.

Cũng cần cách ly các khu vực sau:

- khu vực dùng để chuẩn bị môi trường nuôi cấy và phòng dùng để khử trùng môi trường nuôi cấy và dụng cụ; và
- khu vực khử nhiễm sau thử nghiệm và khu vực rửa.

Tủ ấm, tủ lạnh và tủ đá có thể đạt được đặt trong các phòng đặc biệt, chuyên dụng.

3.4 Trang bị cho cơ sở thử nghiệm

3.4.1 Cơ sở thử nghiệm phải được trang bị như sau để giảm bớt nguy cơ nhiễm bẩn do bụi kéo theo vi sinh vật:

- tường, trần và sàn nhà phải nhẵn trơn, dễ rửa và chịu được các chất tẩy rửa và các chất khử trùng dùng trong phòng thí nghiệm;
- các đường ống dẫn nước quá nóng ngang qua cơ sở thử nghiệm trừ khi chúng được bọc kín;
- cần lắp hệ thống bảo vệ chống bức xạ mặt trời ở phía ngoài các cửa sổ, trừ một số trường hợp đặc biệt;
- các cửa ra vào và cửa sổ cần được đóng kín khi đang tiến hành thử để ngăn gió lùa; ngoài ra chúng phải được thiết kế sai cho chống được bụi bám và dễ lau rửa.

3.4.2 Nhiệt độ môi trường và chất lượng không khí (mật độ vi sinh vật, độ ẩm, mức bụi toả lan, v.v.) phải tương hợp với tiến trình thử. Để đạt mục đích này nên dùng hệ thống lọc không khí tại đầu vào của luồng khí.

Khi phép thử được tiến hành trong 1 môi trường hơi nhiễm bẩn, thì phòng thử nghiệm phải được trang bị đặc biệt, với một tủ cấy thổi không khí sạch và /hoặc1 tủ an toàn.

Thiết bị này phải phù hợp với các qui định có liên quan.

3.4.3 Mặt bàn và các trang bị của phòng thí nghiệm phải được chế tạo bằng vật liệu nhẵn trơn, không thấm, dễ làm sạch và khử trùng. Để tránh tích bụi, các tủ tường phải được bố trí cao chạm trần, nếu có thể đạt được.

Các trang bị của phòng thí nghiệm phải được thiết kế sao để thuận tiện cho việc lau rửa sàn nhà (thí dụ, các trang bị thử nghiệm có thể di động được).

Các phương tiện bảo quản kín phải thích hợp để bảo quản tài liệu sử dụng khi tiếp xúc với mẫu, môi trường nuôi cấy, hoá chất v.v.

Chú thích - Các tài liệu hoặc sách không dùng thường xuyên nên để bên ngoài khu vực thử nghiệm.

3.4.4 Cơ sở thử nghiệm cần được chiếu sáng tốt và tránh được nhiễu phản xạ. Đặc biệt để tránh ánh sáng mặt trời chiếu thẳng vào các vị trí làm việc và các thiết bị nhạy cảm (đặc biệt là tủ ấm).

3.5 Bảo quản và kiểm tra

Mặt sàn, tường, trần, mặt bàn và các trang bị của phòng thí nghiệm phải được bảo dưỡng thường xuyên và sửa chữa để tranhs nứt ran dẫn đến bụi bẩn có thể tích tụ và gây ra nhiễm bẩn.

Tủ phải được làm vệ sinh và sát trùng sau khi sử dụng. Cần tiến hành kiểm tra thường xuyên về độ nhiễm vi sinh bằng việc xét nghiệm bề mặt làm việc và thành tủ.

Việc kiểm tra thường xuyên tỷ lệ vi sinh vật có mặt được tiến hành với trang bị thông thường. Thí dụ, trong mỗi tủ đặt vài đĩa Petri mở nắp đã chứa 1 môi trường nuôi cấy thạch không chọn lọc (thí dụ [illegible]

Tất cả các dụng cụ kiểm tra phải giữ trong trạng thái làm việc tốt và do bộ phận có thẩm quyền kiểm tra

...ắt buộc hoặc không), các tủ ấm ...n hơn để cân bằng nhiệt độ.

...ọi tình huống các đĩa Petri hoặc ...ồng chồng cao quá sáu đĩa Petri

... hoặc bằng cặp nhiệt điện.

Bảo vệ các thành của tủ ấm tránh ánh sáng mặt trời chiếu thẳng.

Nếu có thể, khi sử dụng bất kỳ loại tủ ấm nào (đối lưu không khí b... không nên để đầy quá bởi vì môi trường nuôi cấy sẽ cần nhiều thời gia...

Khi xếp mẫu vào tủ ấm phải chú ý tới sự lưu thông không khí; trong ... các ống nghiệm để cách các thành trong tủ ấm trong vòng 25 mm. K... và các đĩa phải cách nhau ít nhất 25 mm.

4.6.3 Bảo dưỡng và kiểm tra

Nhiệt độ đồng nhất trong khi làm việc phải được kiểm tra bằng nhiệt k...

Độ chính xác của phép đo nên cao gấp bốn lần độ chính xác yêu cầu...

- các chủng sinh vật.

Xếp đặt trong tủ lạnh và các phòng bảo quản lạnh sao cho duy trì được nhiệt độ đủ thấp, đặc biệt là khi đưa các sản phẩm chưa đông lạnh vào.

4.8.3 Bảo dưỡng và kiểm tra

Mỗi ngày làm việc phải kiểm tra nhiệt độ của từng buồng bằng 1 nhiệt kế hoặc bằng 1 đầu dò lắp cố định. (Xem 4.6.3 về độ chính xác của thiết bị này).

Phải thường xuyên thực hiện các công việc bảo dưỡng sau đây:

- lau bụi ở cánh quạt hoặc ở tấm trao đổi nhiệt phía ngoài;
- làm tan băng;
- làm sạch và sát trùng mặt trong của tủ.

4.9 Bể điều nhiệt

4.9.1 Mô tả

Bể nhiều nhiệt là bể cho phép duy trì 1 nhiệt độ xác định. Khi không có qui định khác, độ chính xác cần đạt đến ± 0,5°C. Nhiệt độ làm việc sẽ được qui định trong từng phương pháp sử dụng.

4.9.2 Tính năng sử dụng

Các tính năng sử dụng chính như sau:

- duy trì môi trường thạch tan chảy vô trùng ở 47°C ± 2°C;
- nuôi ấm môi trường đã cấy ở 1 nhiệt độ không đổi;
- chuẩn bị các dung dịch ban đầu ở 1 nhiệt độ được khống chế (thí dụ, chuẩn bị các huyền phù caseinat đòi hỏi phải duy trì 15 phút trong bể ở nhiệt độ 37°C);
- xử lý các huyền phù ban đầu ở một nhiệt độ khống chế (thí dụ, việc đếm các bào tử có thể cần phải loại bỏ hết các tế bào dinh dưỡng).

Để kiểm tra nhiệt độ chính xác, bể điều nhiệt cần được trang bị 1 bơm nước tuần hoàn và 1 hệ thống điều nhiệt tự động. Việc khuấy trộn chất lỏng này không được gây ra các giọt nhỏ phân tán.

4.9.3 Bảo dưỡng và kiểm tra

Mỗi bể được gắn với một chất tẩ hoặc một cặp nhiệt điện đo lường của hệ thống điều nhiệt tự động.

Trong trường hợp môi trường nuôi cấy đặc biệt mẫn cảm thời gian làm ta chảy phải ngắn, và được qui định trong tiêu chuẩn có liên quan.

7.6 Đuổi không khí trong môi trường nuôi cấy

Nếu cần, ngay trước khi sử dụng, đun nóng môi trường nuôi cấy trong nước sôi hoặc dưới luồng hơi nước nóng trong 15 phút, nút và nắp phải được nới lỏng, sau khi đun nóng đậy chặt nắp và làm nguội nhanh đến nhiệt độ làm việc.

7.7 Chuẩn bị đĩa Petri

Rót môi trường nuôi cấy thạch tan chảy vào các đĩa Petri thành lớp dày ít nhất là 2 mm (thí dụ, đối với đĩa có đường kính 90 mm, thông thường cần 12 ml thạch). Để cho thạch nguội và đông lại bằng cách đặt đĩa lên mặt phẳng nằm ngang, mát.

Sử dụng ngay các đĩa Petri đã chuẩn bị này hoặc bảo quản trong tủ lạnh (4.7), chỗ tối, không quá 1 tuần ở các điều kiện thành phần không bị thay đổi. Trong một vài trường hợp, thời gian này có thể kéo dài hơn hoặc ngắn và được qui định trong tiêu chuẩn liên quan. Nhãn của đĩa Petri theo 7.4.

Sử dụng các đĩa Petri khi đã được làm khô.

Nhìn chung, để cấy lên bề mặt môi trường thạch nuôi cấy, làm khô các đĩa, tốt nhất là mở nắp đĩa đã có thạch và úp mặt đĩa xuống dưới, đặt vào tủ sấy để ở nhiệt độ 25°C đến 50°C, cho đến khi các giọt nước nhỏ biến mất khỏi bề mặt môi trường. Không làm khô môi trường thêm nữa. Đĩa thạch cũng có thể được làm khô trong tủ an toàn laminar-flow trong 30 phút khi đậy nắp một nửa, hoặc để qua đêm khi nắp vẫn đậy kín.

Các đĩa thạch chuẩn bị sẵn có bán trên thị trường: Bảo quản và sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất .

8 Mẫu thí nghiệm

8.1 Lấy mẫu

Điều quan trọng mẫu phải đúng là mẫu đại diện của sản phẩm và không bị hư hỏng hoặc bị thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản.

Lấy mẫu không phải là một phần của tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn riêng đối với sản phẩm liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn riêng thì lấy mẫu theo sự thoả thuận của các bên liên quan.

8.2 Vận chuyển

Việc vận chuyển mẫu tới phòng thí nghiệm phải đảm bảo giữ được mẫu không bị biến đổi do sự có mặt các vi sinh vật. Tốt nhất là nên vận chuyển mẫu tới phòng thí nghiệm bằng phương pháp nhanh nhất.

Đặc biện chú ý đến nhiệt độ bảo quản của các sản phẩm sau đây:

- sản phẩm "bền": nhiệt độ phòng;
- sản phẩm tươi và sản phẩm được giữ lạnh: từ 0°C đến +4°C;
- sản phẩm đông lạnh và cực lạnh: dưới −18°C;
- sản phẩm tiệt trùng và sản phẩm tương tự: từ 0°C đến +4°C;
- sản phẩm "bền" đã hỏng: từ 0°C đến +4°C.

Cảnh báo – Các thực phẩm dễ bị ôi hỏng (thí dụ như nội tạng, cá tươi) phải bảo quản ở nhiệt độ từ 0°C đến +2°C.

Các mẫu "bền" đã hỏng phải được vận chuyển trong bao bì kín để tránh dò rỉ.

8.3 Tiếp nhận và bảo quản

Nhân viên phòng thí nghiệm phải kiểm tra trạng thái của mẫu khi tiếp nhận. Nếu trạng thái không đảm bảo hoặc nếu mẫu không đủ, thông thường phòng thí nghiệm không được nhận mẫu đó. Trong trường hợp đặc biệt, nhân viên phòng thử nghiệm có thể phân tích chúng nhưng phải lưu giữ báo cáo về tính chấp hợp lệ của kết quả.

Mẫu được nhận vào phòng thí nghiệm phải được ghi chép đầy đủ sao cho có thể kiểm soát được suốt qúa trình cho đến khi viết báo cáo thử nghiệm.

Các thông tin sau cần phải ghi:

- ngày nhận mẫu;
- các điểm đặc biệt khi lấy mẫu (ngày lấy mẫu, các điều kiện lấy mẫu v.v);
- tên và địa chỉ của bên yêu cầu;
- đặc trưng của sản phẩm.

Mẫu chờ kiểm tra phải bảo quản ở các điều kiện không làm thay đổi số lượng vi sinh vật có trong mẫu.

Đặc biệt chú ý đến nhiệt độ bảo quản (xem 8.2) và việc kiểm tra hạn cuối của các sản phẩm sau đây:

- sản phẩm bền: càng sớm càng tốt và trước khi hết thời hạn bảo quản;
- sản phẩm tươi và sản phẩm giữ lạnh: trong vòng 24 h sau khi tiếp nhận (nếu cần bảo quản mẫu lâu hơn, cần làm lạnh sâu mẫu càng sớm càng tốt ở nhiệt độ dưới −18°C và ghi vào trong báo cáo kết quả, vì ở một vài sản phẩm nhất định việc làm lạnh thay đổi thành phần của hệ sinh vật);
- sản phẩm tiệt trùng và sản phẩm tương tự: càng sớm càng tốt khi hết hạn bảo quản;
- các mẫu sản phẩm bền đã bị hỏng : càng sớm càng tốt và trước 48h.

8.4 Phần mẫu thử

Để tránh có tạp nhiễm giữa môi trường và phần mẫu thử, nên tiến hành công việc trong phòng thử nghiệm đặc biệt, hoặc trong buồng an toàn. Nếu không làm được điều đó, các sản phẩm biết trước là có rất ít vi sinh vật (thí dụ, sản phẩm tiệt trùng, món ăn đã nấu) bao giờ cũng kiểm tra trước tiên, tiếp theo mới kiểm tra mẫu bị nhiễm cao hơn.

Việc bảo vệ môi trường khỏi bị tạp nhiễm là đặc biệt quan trọng trong quá trình cân và lấy phần mẫu thử từ các sản phẩm dạng bột bị nhiễm cao. Các bước tiến hành này phải thực hiện trong tủ an toàn.

Xử lý mẫu sao cho tránh được bất kỳ nguy cơ lây nhiễm nào. Để đạt được điều đó, phải chú ý như sau:

- Khi không làm việc trong tủ an toàn, tiến hành công việc trong tầm của ngọn lửa;
- đối với sản phẩm bao gói sẵn, lau sạch bên ngoài bao bì bằng etanola 70% tại vị trí sẽ mở; nếu có thể, thì đốt bằng ngọn lửa;
- dụng cụ dùng để mở bao gói (cái mở hộp, kéo,...) phải vô trùng;
- dụng cụ để lấy mẫu (thìa, kẹp, pipet ,...) phải vô trùng ;
- đánh dấu cẩn thận số ký hiệu của mẫu thử trên vật chứa, túi chất dẻo (xem 83) chứa mẫu thử.

8.5 Lưu giữ và huỷ mẫu thí nghiệm

Ngoại trừ đối với các trường hợp đặc biệt, lưu giữ các mẫu thí nghiệm cho đến khi thu được tất cả các kết quả, hoặc lâu hơn nữa nếu thấy cần, và bao gói trong vật đựng vô trùng (thí dụ như túi chất dẻo) và giữ ở nhiệt độ bảo quản của mẫu thử. Các sản phẩm lạnh, tươi nên làm đông lạnh.

Trước khi loại bỏ, khử nhiễm các mẫu thí nghiệm đã lỏng hoặc là mẫu nguy hiểm.

Còn các mẫu thí nghiệm không bị hỏng thì có thể loại bỏ trực tiếp.

9 Kỹ thuật kiểm tra và biểu thị kết quả

9.1 Các biện pháp để phòng về mặt vệ sinh trong quá trình kiểm tra

Chú ý tiến hành công việc trong các điều kiện vô trùng, thí dụ như :

- đảm bảo rằng khu vực làm việc sạch và không có gió lùa (cửa chính và cửa sổ phải đóng lại);
- trước và sau khi làm việc, khử nhiễm bề mặt thao tác bằng chất sát trùng thích hợp;
- đảm bảo rằng trước khi bắt đầu tiến hành công việc tất cả các thứ cần thiết đã được chuẩn bị sẵn;

- trong trường hợp tiến hành trong tủ an toàn, dùng găng tay vô trùng hoặc sát trùng tay, trước khi bắt đầu công việc (thí dụ bằng hỗn hợp polyalcohol) và tránh thao tác chéo, chạm bàn tay với cánh tay;

- khi không làm việc trong tủ an toàn, mở ống nghiệm và chai trong vùng ngọn lửa, giữ ống và chai ở vị trí nghiêng với khả năng có thể;

- thực hiện công việc càng nhanh càng tốt, và không có bất kỳ động tác thừa nào;

- đóng chặt ngay bao bì đựng pipet, đĩa Petri v.v... sử dụng một lần, sau khi lấy ra số lượng cần dùng cho việc kiểm tra.

- khử trùng vòng và kim cấy, v.v... trong ngọn lửa trước và sau khi sử dụng; để tránh phát tán các chất và các vi sinh vật, tốt nhất là dùng buồng đốt (4.13); nếu có thể, dùng vòng và kim cấy vô trùng sử dụng một lần;

- cho pipet, dao trộn, v.v... đã sử dụng vào bình có chứa 1 chất sát trùng thích hợp (thí dụ: dung dịch natri hypoclorit đối với pipet) trước khi tiến hành khử nhiễm (6.6);

- cho các đĩa Petri, môi trường nuôi cấy và tất cả các dụng cụ khác có thể chứa vi sinh vật vào các hộp chuyên dụng trước khi khử nhiễm, tiếp theo là rửa;

- cho các dụng cụ sử dụng một lần vào các vật chứa phù hợp trước khi khử nhiễm hoặc thiêu (6.6);

- ngay lập tức lau, thấm hết các vết nhiễm bẩn hoặc bị tràn ra bằng cách dùng miếng bông gạc, hoặc vật liệu thích hợp khác đã tẩm dung dịch etanola 70 % (V/V) hoặc 1 chất sát trùng khác, sau đó rửa sạch và khử trùng mặt bàn thao tác trước khi tiếp tục công việc.

Cần phải chú ý đặc biệt khi làm việc với các sản phẩm có chứa vi khuẩn gây nhiễm bệnh (Saimonella, Listeria monocytogens ...) hoặc với các chất độc hại, được liệt kê trong các ấn phẩm riêng. Khuyến cáo rằng:

- sử dụng tủ an toàn cho tất cả các thao tác cần thiết để phân tích;
- sử dụng dụng cụ hút cơ học; cấm dùng pipet hút bằng miệng;

Khí sol là 1 nguyên nhân chính gây ra ô nhiễm môi trường và lây nhiễm. Khí sol có thể tạo thành do:

- khi mở các đĩa Petri, ống nghiệm và chai lọ;
- khi dùng máy lắc, xi lanh, máy ly tâm ...;
- khi làm sạch pipet bằng cách thổi;
- khi khử trùng ướt các vòng và kim cấy;

– khi mở ống hàn kín đựng chất cấy đông khô;

Do đó, cần tránh sự tạo khí sol này.

9.2 Chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng

Xem ISO 6887.

Trong trường hợp chuẩn bị huyền phù ban đầu, thời gian từ khi kết thúc việc chuẩn bị đến khi cấy vào môi trường nuôi cấy không được vượt quá 45 phút, trừ khi có qui định riêng trong tiêu chuẩn tương ứng.

9.3 Đếm số lượng sử dụng môi trường đặc

9.3.1 Cấy trong thạch đổ đĩa

Chuẩn bị môi trường (bằng cách đặt trên nồi cách thuỷ để ở 47°C), đĩa Petri, chất lỏng pha loãng và các dung dịch pha loãng cần kiểm tra (phù hợp với 9.2) theo các lượng và các đơn vị tương ứng với phương án cấy được qui định trong tiêu chuẩn có liên quan.

Phân phối các thể tích xác định từ các dung dịch pha loãng cần kiểm tra vào các đĩa Petri (có ghi nhãn). Rót vào mỗi đĩa một lượng môi trường theo qui định trong 7.7. Trộn ngay môi trường tan chảy và chất cấy sao cho có được phân bố đồng nhất vi sinh vật trong môi trường. Đặt các đĩa Petri này trên mặt phẳng nằm ngang, mát để cho nguội và đông đặc lại (thời gian đóng cửa thạch không được quá 10 phút).

Nếu dự kiến có các khuẩn lạc mọc lan (thí dụ: Proteus spp) trong sản phẩm cần kiểm tra, hãy phủ một lớp mỏng thạch không dinh dưỡng vô trùng, hoặc môi trường thạch nhận biết sử dụng trong phân tích lên các đĩa đã đông.

9.3.2 Cấy lên bề mặt

Đưa chất cấy vào giữa đĩa Petri đã ghi nhận trên mặt môi trường thạch nuôi cấy (đã chuẩn bị theo 7.7). Dùng que gạt bằng chất dẻo hoặc bằng thuỷ tinh để dàn đều trên bề mặt môi trường càng nhanh càng tốt cho đến khi không còn thấy chất lỏng trên mặt thạch nữa.

Có thể dùng quả cầu thuỷ tinh để dàn đều.

Trong 1 vài trường hợp (được nêu trong tiêu chuẩn kiên quan), chất cấy có thể được lắng gạn trên 1 màng lọc sau đó mới dàn đều như trên.

9.3.3 Nuôi ấm

Khi không có qui định nào khác, lật ngược ngay các đĩa đã cấy mẫu và đặt thật nhanh vào tủ ấm đã đặt nhiệt độ thích hợp. Nếu xảy ra sự mất nước nhiều (thí dụ, ở nhiệt độ 55°C hoặc lưu thông không khí mạnh), gọi các đĩa vào các túi chất dẻo không kín trước khi nuôi ấm hoặc sử dụng hệ thống có hiệu quả

tương đương. Trong suốt quá trình nuôi ấm, có thể chấp nhận 1 độ biến thiên độ nuôi, thí dụ như khi đặt các đĩa Petri vào tủ hoặc lấy ra khỏi tủ ấm.

Chú ý – Trong các trường hợp nhất định, có thể làm hai đĩa cấy dự phòng bảo quản ở + 2°C để so sánh với các đĩa cấy nuôi ấm khi đếm khuẩn lạc, để tránh nhầm lẫn giữa các hạt sản phẩm kiểm tra với các khuẩn lạc.

Sau khi nuôi ấm, kiểm tra ngay các đĩa nếu có thể. Mặt khác, có thể bảo quản chúng trong tủ lạnh (4.7) tối đa là 24 h, nếu không có qui định nào khác.

9.3.4 Đếm khuẩn lạc

Tiếp theo giai đoạn nuôi ấm được hướng dẫn trong tiêu chuẩn riêng, tiến hành đếm khuẩn lạc trên mỗi đĩa có chứa ít hơn 300 khuẩn lạc (hoặc bất kỳ 1 số lượng nào theo qui định trong tiêu chuẩn riêng).

Chú thích – Trong một vào trường hợp, các khuẩn lạc có thể rất khó đếm (thí dụ, khi có các vi sinh vật mọc lan). Những trường hợp này sẽ được đề cập trong tiêu chuẩn riêng.

9.3.5 Biểu thị kết quả

9.3.5.1 Phương pháp tính toán: Trường hợp chung

Để kết quả có giá trị, nhìn chung, điều cần thiết là thực hiện việc đếm khuẩn lạc trên ít nhất là một đĩa có tối thiểu 15 khuẩn lạc.

Tính số vi sinh vật có mặt trong mẫu thử, N, lấy trung bình từ hai độ pha loãng kế tiếp nhau bằng công thức sau:

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

trong đó

$\sum C$ là tổng các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại từ 2 độ pha loãng liên tiếp, ít nhất có một đĩa chứa 15 khuẩn lạc.

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

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

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

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

Làm tròn số kết quả thu được đến 2 chữ số có nghĩa. Khi số cần làm nhỏ hơn 5 thì số đứng trước nó sẽ không phải thay đổi, khi số cuối cùng là 5 hoặc lớn hơn thì làm tròn số đứng ngay trước nó lên 1 đơn vị, tiếp tục cho đến khi thu được 2 chữ số có nghĩa.

Lấy kết quả là số vi sinh vật có trong 1 mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong 1 gam (sản phẩm dạng khác), biểu thị bằng số từ 1,0 đến 9,9 nhân với 10^x, trong đó x là luỹ thừa tương ứng của 10.

Thí dụ:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0{,}1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1(2 + 0{,}1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{422}{0{,}022} = 19\ 182$$

Làm tròn kết quả như hướng dẫn trên thu được 19 000 hoặc 1,9 x 10^4 vi sinh vật trong một gam sản phẩm.

9.3.5.2 Phương pháp tính: Trường hợp tính toán sau khi xác nhận

Trong trường hợp phương pháp sử dụng đòi hỏi phải nhận dạng, 1 số lượng A được đem xác định (thông thường là 5) từ các khuẩn lạc nuôi cấy trên mỗi đĩa được giữ lại để đếm khuẩn lạc. Sau khi xác nhận, tính toán cho mỗi đĩa số lượng vi sinh vật được xác nhận, a, theo công thức sau:

$$a = \frac{b}{A} C$$

trong đó

b là số khuẩn lạc phù hợp với các đặc tính xác nhận;

C là tổng số khuẩn lạc đếm được.

Làm tròn số đến số nguyên gần nhất như chỉ dẫn trong 9.3.5.1.

Tính số N, của các vi sinh vật đã xác nhận có mặt trong mẫu thử theo công thức đưa ra trong 9.3.5.1, thay $\sum C$ bằng $\sum a$.

Thí dụ:

Khi đếm trực tiếp từ 1 sản phẩm dạng lỏng cho kết quả như sau:

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-3}) được giữ lại : 66 và 80 khuẩn lạc;
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-4}) được giữ lại : 4 và 7 khuẩn lạc;

Đã nuôi cấy:

- đối với 66 khuẩn lạc, 8 khuẩn lạc, 6 trong đó phù hợp với chuẩn, do đó a=50.
- đối với 80 khuẩn lạc, 9 khuẩn lạc, 6 trong đó phù hợp với chuẩn, do đó a=53.
- đối với 7 khuẩn lạc, 5 khuẩn lạc, 4 trong đó phù hợp với chuẩn, do đó a=6.
- đối với 4 khuẩn lạc, tất cả 4 khuẩn lạc đã chứng minh là vi sinh vật cần tìm, do đó a=4.

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0{,}1n_2)d} = \frac{50 + 53 + 6 + 4}{1(2 + 0{,}1 \times 2) \times 10^{-3}} = \frac{113}{2{,}2 \times 10^{-3}} = 51\,364$$

Số lượng vi sinh vật được tìm thấy trong mẫu thử là 5,1 x 10^4 trong một mililit.

9.3.5.3 Số lượng ước tính

9.3.5.3.1 Nếu hai đĩa mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng, độ pha loãng bằng 0) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) có ít hơn 15 khuẩn lạc, thì tính giá trị trung bình số học, của các khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa.

Biểu thị kết quả như sau:

- đối với sản phẩm dạng lỏng: số lượng vi sinh vật ước tính trong mililit N_E= y
- đối với các sản phẩm khác: số lượng vi sinh vật ước tính trong mililit N_E= y/d

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

9.3.5.3.2 Nếu hai đĩa của mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) không chứa khuẩn lạc nào, thì biểu thị kết quả như sau:

- ít hơn 1 vi sinh vật trong mililit (sản phẩm dạng lỏng)
- ít hơn 1/d vi sinh vật trong gam (sản phẩm dạng khác)

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

9.3.6 Giới hạn tin cậy

Để đánh giá tính hợp thức của kết quả và tránh và tránh thể hiện quá chặt chẽ, điều cần thiết phải là xác định khoảng tin cậy đặc trưng cho phân bố thống kê các vi sinh vật trong mẫu thử.

Các sai lệch khác do chính do kỹ thuật, đặc biệt là các sai lệch có liên quan đến lỗi trong pha loãng, mức độ sai lệch này thì khác nhau giữa các phòng thí nghiệm.

9.3.6.1 Trường hợp chung

Với xác suất 95 %, khoảng tin cậy δ, đặc trưng cho sự phân bố vi khuẩn trong mẫu, tính theo công thức sau:

$$\delta = \left[\frac{\sum C}{B} + \frac{1{,}92}{B} \pm \frac{1{,}96\sqrt{\sum C}}{B} \right] \frac{1}{d}$$

khi : $B = V(n_1 + 0{,}1n_2)d$

trong đó

$\sum C$ là tổng các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại;

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

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

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

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

Thí dụ: các trường hợp cực trị (xem bảng 1).

Bảng 1 – Các trường hợp cực trị

Số khuẩn lạc đếm được		Trung bình tính toán	Khoảng tin cậy
Độ pha loãng n	Độ pha loãng n+1		
300	30	300	278 đến 324
30	30		-7% đến +8%
15	1	14	10 đến 20
15	1		-29% đến +43%

Thí dụ 2: Khoảng tin cậy đối với thí dụ trong 9.3.5.1

Với $N = 1,9 \times 10^4$ trong 1 gam đối với 422 khuẩn lạc đếm được, khoảng tin cậy δ là:

$$\delta = \left[\frac{422}{2,2} + \frac{1,92}{2,2} \pm \frac{1,96\sqrt{422}}{2,2}\right] \times \frac{1}{10^{-2}}$$

$$\delta = (191,82 + 0,87 \pm 18,30) \times 10^2$$

Do đó các giới hạn của khoảng tin cậy là:

$$\delta_1 = 1,7 \times 10^4 \text{ và } \delta_2 = 2,1 \times 10^4$$

Trong trường hợp này, các giới hạn của khoảng tin cậy, được biểu thị bằng phần trăm và được tính toán trên các số liệu không làm tròn, là từ -9,1 % đến +10,0 %.

9.3.6.2 Trường hợp sau khi xác nhận

Với xác suất 95%, khoảng tin cậy δ, đặc trưng cho sự phân bố vi khuẩn trong mẫu, tính theo công thức được đưa ra trong 9.3.6.1, khi đó thay $\sum C$ bằng $\sum a$.

Thí dụ: đối với trường hợp đưa ra trong 9.3.2, số N vi sinh vật được tìm thấy là 5,1 x 10^4 trong 1 mililit cho 113 khuẩn lạc còn lại, do đó:

$$\delta = \left[\frac{113}{2,2} + \frac{1,92}{2,2} \pm \frac{1,96\sqrt{113}}{2,2}\right] \times \frac{1}{10^{-3}}$$

$$\delta = (51,36 + 0,87 \pm 9,47) \times 10^3$$

Bởi vậy, các giới hạn khoảng tin cậy là :

$$\delta_1 = 4,3 \times 10^4 \text{ và } \delta_2 = 6,2 \times 10^4$$

9.3.6.3 Các số đếm ước lượng

Các giới hạn tin cậy được đưa ra trong bảng A.1 và A.2 của phụ lục A.

9.4 Đếm với việc sử dụng môi trường lỏng: kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất

Chú thích – Có thể dùng hai hệ thống nuôi cấy. Hệ thống thường hay được sử dụng nhất (được gọi là hệ thống "đối xứng") có cùng số lượng ống nghiệm cho mỗi độ pha loãng, tỷ lệ tích giữa hai độ pha loãng thông thường 1/10. Các hệ thông này được sử dụng đặc biệt khi chỉ cần kiểm tra giới hạn không bị vượt quá và cũng để xác định số lượng vi sinh vật có mặt. Còn có các hệ thống được gọi là hệ thống "không đối xứng" bao gồm các số lượng ống nghiệm khác nhau cho các độ pha loãng khác nhau. Chỉ các hệ thống "đối xứng" có các dung dịch pha loãng thập phân được đề cập trong tiêu chuẩn này.

9.4.1 Nuôi cấy

Nuôi cấy một số lượng bình hoặc ống nghiệm thích hợp với cùng độ pha loãng (thí dụ, ba, năm, hoặc 10 bình cầu hay ống nghiệm) tuỳ theo độ chính xác mong muốn của các kết quả. Theo qui luật chung, kỹ thuật được áp dụng đòi hỏi ba bình hay ống nghiệm cho một độ pha loãng.

Dùng pipet phân phối chất cấy vào các bình hay ống nghiệm tương ứng.

Dùng 1 pipet vô trùng mới cho mỗi độ pha loãng.

9.4.2 Nuôi ấm

Đặt các bình hay ống nghiệm đã cấy mẫu vào tủ ấm, hoặc tốt hơn là đặt vào nồi cách thuỷ kiểm soát được nhiệt độ (4.9).

9.4.3 Giải thích kết quả

9.4.3.1 Chọn độ pha loãng

Chú thích – Huyền phù ban đầu và mẫu thử dạng lỏng cũng được coi là "các dung dịch pha loãng".

Trong trường hợp chung khi ba ống nghiệm hoặc bình trên độ pha loãng đã được nuôi cấy, chọn cho mỗi mẫu cần kiểm tra ba độ pha loãng kế tiếp nhau phù hợp với 9.4.3.1.1, 9.4.3.1.2 hay 9.4.3.1.3.

9.4.3.1.1 Trường hợp 1: Có ít nhất một độ pha loãng cho ba ống nghiệm dương tính (xem bảng 2)

Chọn độ pha loãng cao nhất (nghĩa là có nồng độ mẫu thử nhỏ nhất) cho ba ống nghiệm dương tính, cũng như vậy đối với hai dung dịch pha loãng thấp hơn theo (nghĩa là nồng độ mẫu thử cao hơn 10 lần và 100 lần của dung dịch pha loãng thứ nhất đã chọn). Xem thí dụ 1 và 9.4.3.1.2.

Nếu không có đủ các độ pha loãng tiếp theo từ dung dịch pha loãng nhất cho kết quả ba ống dương tính, thì chọn ba dung dịch pha loãng nhất trong cả loạt ống thử đó (nghĩa là các dung dịch có nồng độ mẫu thử thấp nhất trong dãy) để thay thế. Xem thí dụ 2.

Bảng 2 – Mẫu các kết quả dương tính chọn lọc để tính giá trị MPN

Mẫu	Số ống nghiệm dương tính thu được từ ba ống nghiệm đã cấy các lượng mẫu / ống sau đây [1]					MPN [2]	
	Sản phẩm dạng lỏng 10 ml	1 ml	10^{-1} ml	10^{-2} ml	10^{-3} ml	Sản phẩm dạng lỏng ml^{-1}	Sản phẩm khác g^{-1}
	Các sản phẩm khác 1 g	10^{-1} g	10^{-2} g	10^{-3} g	10^{-4} g		
1	3	3	2	1	0	$1,5 \times 10^{1}$	$1,5 \times 10^{2}$
2	3	3	3	0	–	$2,4 \times 10^{1}$	$2,4 \times 10^{2}$
3	2	2	1	1	0	7,4	$7,4 \times 10^{1}$
4	3	3	0	0	0	2,4	$2,4 \times 10^{1}$
5	2	2	0	1	0	$2,1 \times 10^{-1}$	2,1

1) **Chữ in đậm** : Tổ hợp được chọn.

2) Được tính từ chỉ số MPN cho ba ống nghiệm (bảng B1).

9.4.3.1.2 Trường hợp 2: Không có độ pha loãng nào cho kết quả ba ống dương tính

Trường hợp 1 không thể áp dụng được. Chọn ba độ pha loãng nhất của dãy (các dung dịch này có hàm lượng mẫu thử thấp nhất) có ít nhất một phản ứng dương tính. Xem thí dụ 3. Xem tiếp 9.4.3.1.3.

9.4.3.1.3 Các trường hợp đặc biệt

Trong tất cả các trường hợp, khi có nhiều hơn một trong ba độ pha loãng được chọn theo 9.4.3.1.1 và 9.4.3.1.2 không cho một ống nghiệm dương tính nào, thì chọn độ pha loãng thấp nhất mà không chứa một ống nghiệm dương tính nào (dung dịch có nồng độ mẫu thử cao nhất) và hai độ pha loãng thấp hơn liền trước nó (nghĩa là nồng độ mẫu thử cao hơn 10 lần và 100 lần của độ pha loãng thứ nhất được chọn; xem mẫu 4 và mẫu 5), trừ khi các ống dương tính chỉ tìm thấy ở độ pha loãng thứ nhất chuẩn bị từ mẫu thử. Trong trường hợp cuối cùng này, nếu cần, chọn ba độ pha loãng đầu tiên để tính số có xác suất lớn nhất (MPN), ngay cả khi dãy thử này có hai độ pha loãng không cho ống dương tính nào.

9.4.3.2 Tính số có khả năng lớn nhất (MPN)

9.4.3.2.1 Kiểm tra theo số mẫu được thử bằng dãy số trong bảng B.1, xem kết quả số ống dương tính tương ứng với các độ pha loãng được chọn theo 9.4.3.1, có thể chấp nhận được trên quan điểm thống kế. Khả năng chấp nhận này phụ thuộc vào: số mẫu được kiểm tra và quyết định chấp nhận hay bác bỏ các kết quả thuộc loại 2 và 3 (xem bảng B2).

Do đó, thí dụ chỉ các kết quả loại 1 được chấp nhận, dãy 221 sẽ chỉ được tính đến nếu kiểm tra 10 mẫu từ dãy tương ứng. Mặt khác, khi các kết quả có khả năng ít hơn thuộc loại 2 cũng được chấp nhận, dãy 221 cũng được tính đến trong trường hợp chỉ kiểm tra hai, ba hoặc năm mẫu. Trong mọi trường hợp, nếu dãy 221 là kết quả thử đơn lẻ thì không thể chấp nhận.

9.4.3.2.2 Đối với mỗi dãy coi như có thể chấp nhận được theo 9.4.3.2.1, chỉ số MPN sẽ thu được theo bảng B1.

9.4.4 Biểu thị kết quả

Từ chỉ số MPN (xem 9.4.3.2) của bảng B1, xác định số có khả năng lớn nhất của vi sinh vật theo thể tích bằng công thức sau:

$$C_S = M \frac{F}{V_0} V_S$$

trong đó

C_S là số có khả năng lớn nhất của vi sinh vật có trong thể tích V_S;

M là chỉ số MPN đọc từ bảng 2 đối với độ pha loãng cơ bản V_0;

F là số nghịch đảo của hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng đó, nếu có, từ mẫu thử được lấy làm độ pha loãng cơ bản, sử dụng trong bảng bên (thông thường F = 10, 100, v. v . . .);

V_S là thể tích chuẩn được chọn để biểu thị mật độ vi sinh vật;

V_0 là thể tích độ pha loãng cơ bản;

Trong trường hợp khi độ pha loãng nhỏ nhất được chọn tương ứng với các ống được chuẩn bị từ môi trường nồng độ kép (10 ml chất nuôi cấy), trước hết chia chỉ số MPN cho 10.

Nếu như MPN nhỏ hơn 0,3 vi sinh vật trong 1 mililit (sản phẩm lỏng) hoặc trong 1 gam (sản phẩm khác) và nếu như qui trình này phù hợp đối với số lượng nhỏ vi sinh vật được sử dụng, thì kết quả được biểu thị như sau: ít hơn 1 vi sinh vật trong 1 ml (sản phẩm lỏng) hoặc trong 1 g (sản phẩm khác).

Thí dụ:

Trong trường hợp đối với 1 sản phẩm dạng rắn, chỉ số MPN là 24, ống thứ nhất được chọn tương ứng với việc nuôi cấy 1 ml huyền phù ban đầu (F = 10), C_s trong một gam là:

$$C_s = 24 \times 10 = 2,4 \times 10^2$$

9.4.5 Giới hạn tin cậy

Các giới hạn tin cậy được đưa ra trong bảng MPN (bảng B1).

Dùng kỹ thuật MPN có thể cho các kết quả chênh lệch lớn. Do vậy, các kết quả thu được khi dùng phương pháp này cần sử dụng với sự thận trọng.

9.5 Phương pháp phát hiện

Phương pháp phát hiện là phươn pháp xác định sự có mặt hay không các vi sinh vật nhất định có trong một lượng qui định của sản phẩm.

9.5.1 Nguyên tắc

Nếu không có qui định thì trộn (sản phẩm thể lỏng), hoặc đồng nhất (sản phẩm dạng khác) một lượng *p* của sản phẩm cần thử 9 x *p* ml hoặc g của 1 loại canh thang chọn lọc. Sau khi nuôi ấm, tốt nhất là nuôi trong bể điều nhiệt (4.9), dàn mỏng một vòng dịch cấy thu được lên bề mặt 1 môi trường thạch chọn lọc sao cho các khuẩn lạc mọc phân tách tốt. Sau đó xác nhận 1 số khuẩn lạc thu được sau khi nuôi ấm (thông thường là 5).

Trong một số trường hợp nhất định, tốt nhất nên tiến hành tăng sinh trước trong canh thang chọn lọc, bằng cách tăng sinh trước trong 1 canh thang dinh dưỡng, sao cho các vi sinh vật khó phát triển có thể hồi phục được. Cũng vậy, thỉnh thoảng sử dụng cùng một lúc hai hoặc nhiều canh thang chọn lọc cũng như hai hoặc nhiều môi trường thạch chọn lọc.

9.5.2 Diễn giải kết quả

Nếu như vi sinh vật cần tình được phát hiện, kết quả ghi như sau:

"có mặt trong p ml (thể lỏng) hoặc trong p g (sản phẩm dạng khác) của sản phẩm cần phân tích"

Nếu như vi sinh vật cần tìm không phát hiện thấy, kết quả ghi như sau:

"không có mặt trong p ml (thể lỏng) hoặc trong p g (sản phẩm dạng khác) của sản phẩm cần phân tích"

Không khi nào được khái quát hoá cho lượng cao hơn của sản phẩm.

9.6 Kỹ thuật xác nhận cơ bản

9.6.1 Chuẩn bị giống cấy thuần khiết

9.6.1.1 Khái quát

Bắt đầu chuẩn bị 1 giống cấy thuần khiết bằng cách chọn lọc 1 khuẩn lạc trên hoặc trong môi trường thạch đã nuôi cấy với 1 dịch mẫu thử pha loãng hoặc với 1 giống vi sinh vật.

Sau đó cấy khuẩn lạc đã chọn đó lên môi trường thạch nuôi cấy không chọn lọc. Sau khi nuôi ấm, chọn lấy 1 khuẩn lạc phân lập tốt. Nếu cần, lặp lại thao tác này.

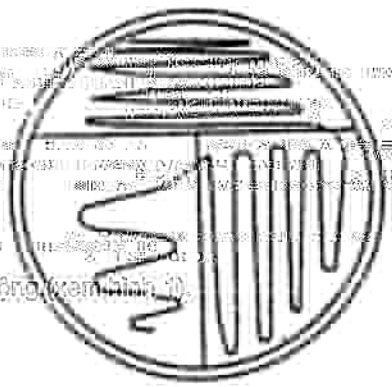
Dùng kỹ thuật nuôi cấy đĩa trong 9.6.2.1. Các phương pháp khác nhau có thể cần đến trong các trường hợp đặc biệt. Đối với các vi sinh vật kị khí, có thể tiến hành theo quí trình trong 9.6.1.2, chú ý giữ mẫu cấy ở môi trường không khí càng ít thời gian càng tốt.

9.6.1.2 Cấy trên đĩa

Lấy một lượng nhỏ trên bề mặt khuẩn lạc phân lập tốt, bằng đầu của 1 vòng que cấy vô trùng. Sau đó đem cấy lên đĩa, nuôi cấy trực tiếp các tế bào trên vòng que cấy (9.6.1.2.10, hoặc sau khi đã chuẩn bị 1 huyền phù của các tế bào (9.6.1.2.2).

9.6.1.2.1 Phương pháp trực tiếp : thí dụ

Dùng que cấy vòng, cấy các vạch sát liền nhau trên 1 vùng khoảng một phần ba bề mặt của môi trường thạch. Khử trùng và để nguội que cấy. Từ mép của vùng đã cấy, vạch một loạt các vạch khác thưa hơn vùng thứ nhất trên một nửa bề mặt còn lại chưa cấy. Lặp lại thao tác này trên phần bề mặt còn trống với các vạch trải rộng (xem hình 1).



Hình 1 – Cấy trên đĩa : phương pháp trực tiếp

Làm khô lam kính.

9.6.2.3 Quan sát và nhận định

Kiểm tra lam kính dưới vật kính dầu có độ phóng đại cao của kính hiển vi (4.12). Các tế bào vi khuẩn có màu xanh lam hoặc màu tím là Gram dương (Gram +); còn có màu từ hồng thẫm đến đỏ là Gram âm (Gram –).

Đối với giống thuần khiết của 1 vài dạng vi khuẩn nhất định, có thể thu được cả hai loại tế bào Gram [illegible]

[illegible] ặc dọn lẻ trên mọi môi trường [illegible]

[illegible] khác trong tiêu chuẩn liên quan, môi trường nuôi cấy [illegible] đun nóng (môi trường máu đã được nấu), [illegible]

[illegible] không chứa bất kỳ nhóm máu nào khi chúng được nuôi [illegible] hàm lượng nhỏ (0,1 %). [illegible] trong không khí 30 giây trước khi thêm hidro peroxit. [illegible]

[illegible] thạch.

Trong mọi trường hợp, khi không có qui định nào [illegible] phải không chứa máu, nếu không sau đó phải đượ[illegible]

Chú thích

1) Một vài vi khuẩn lactic có "men giả catalaza" m[illegible] cấy trong môi trường không có glucoza hoặc có một [illegible]

2) Trong trường hợp của vi khuẩn kỵ khí, mỏ và đế[illegible]

9.6.3.1 Từ canh thang nuôi cấy

[illegible]

9.6.4 Phép thử oxidaza

Phát hiện oxidaza bằng sự đổi màu của 1 hỗn hợp ở thời điểm oxi hoá dưới tác động của enzym này.

9.6.4.1 Thuốc thử

9.6.4.1.1 *Thành phần*

N, N, N', N'-Tetrametyl-p-phenylendiamin dihidroclorua ($C_{10}H_{16}N_2.2HCl$): 1,0 g

Nước cất: 100 ml

9.6.4.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan thuốc thử này trong nước lạnh. Chỉ sử dụng thuốc thử vừa mới chuẩn bị xong.

Có thể sử dụng đĩa hoặc que thử có bán sẵn trên thị trường. Trong trường hợp này, phải theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

9.6.4.2 Kỹ thuật

Làm ẩm một mảnh giấy lọc bằng thuốc thử. Lấy mẫu cấy vi khuẩn thu được từ 1 môi trường thạch bằng que cấy platin hoặc bằng que thuỷ tinh hoặc chất dẻo (dây bằng hợp kim niken/crôm cho dương tính không chính xác) và đặt lên giấy lọc đã làm ẩm.

9.6.4.3 Diễn giải kết quả

Trong trường hợp có oxidaza, sẽ xuất hiện màu tím đến đỏ tía trong khoảng thời gian 5 giây đến 10 giây. Nếu màu sắc không đổi sau 10 giây thì phép thử được coi là âm tính.

9.6.5 Sử dụng dãy chuẩn bị galleries sinh hoá để nhận biết

Có thể dùng galleries sinh hoá có sẵn để nhận biết. Tuy nhiên các galleries thương mại cho độ tin cậy như nhau. Do vậy, phải đánh giá tính năng sử dụng chúng trước khi dùng, đặc biệt nếu chúng không được hợp thức hoá bởi 1 hệ thống độc lập.