

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 8128-1 : 2009
ISO/TS 11133-1 : 2009**

Xuất bản lần 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**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs –
Guidelines on preparation and production of culture media –
Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation
of culture media in the laboratory*

HÀ NỘI – 2009

Lời nói đầu

TCVN 8128-1 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO/TS 11133-1 : 2009;

TCVN 8128-1 : 2009 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 8128 (ISO/TS 11133), gồm các tiêu chuẩn sau:

- 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 – 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.*

**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**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs –
Guidelines on preparation and production of culture media –
Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation
of culture media in the laboratory*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đề cập đến thuật ngữ chung liên quan đến đảm bảo chất lượng và qui định các yêu cầu tối thiểu về chuẩn bị môi trường nuôi cấy được dùng để phân tích vi sinh của các sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi.

Tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng cho các môi trường được sử dụng để phân tích vi sinh đối với tất cả các loại nước.

Các yêu cầu này có thể áp dụng cho bốn loại môi trường nuôi cấy được sử dụng và/hoặc để pha chế môi trường nuôi cấy cho các phép phân tích vi sinh:

- môi trường đã pha chế để sử dụng ngay có bán sẵn trên thị trường;
- môi trường cần phải làm tan chảy, bổ sung và phân phối lại;
- môi trường được chuẩn bị từ các thành phần được pha chế theo công thức dạng khô có bán sẵn trên thị trường;
- môi trường được chuẩn bị từ các thành phần riêng biệt.

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 8128 -2 : 2009 (ISO/TS 11133-1 : 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.*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây.

3.1 Yêu cầu chung

3.1.1

Kiểm soát chất lượng (quality control)

<thực phẩm và thức ăn chăn nuôi> Các thao tác kỹ thuật và các hoạt động được sử dụng để thực hiện các yêu cầu chất lượng.

3.1.2

Mê môi trường nuôi cấy (batch of culture media)

Đơn vị môi trường đồng nhất và hoàn toàn có thể truy nguyên liên quan đến một lượng xác định của sản phẩm, bán thành phẩm hoặc sản phẩm cuối cùng, đồng nhất về kiểu loại và chất lượng và đã trải qua các yêu cầu của quá trình sản xuất (kiểm soát quá trình sản xuất) và thử hiệu năng và được sản xuất trong một giai đoạn xác định, có cùng số hiệu sản xuất.

3.1.3

Hiệu năng môi trường nuôi cấy (performance of culture media)

Sự đáp ứng của môi trường nuôi cấy cho các vi sinh vật thử nghiệm dưới các điều kiện xác định.

3.2 Môi trường nuôi cấy

3.2.1

Môi trường nuôi cấy (culture medium)

Sự phối hợp của các chất ở dạng lỏng, bán lỏng hoặc dạng đặc, có chứa các thành phần tự nhiên và/hoặc tổng hợp để giúp cho việc nhân lên (có hoặc không có sự ức chế một số vi sinh vật nhất định), nhận biết hoặc duy trì sự sống của các vi sinh vật.

CHÚ THÍCH Khi được sử dụng cùng với các cụm từ khác thì thường gọi tắt là "môi trường" (ví dụ: môi trường tăng sinh).

3.2.2

Môi trường hoá học xác định (chemically defined medium)

Môi trường nuôi cấy chỉ bao gồm các thành phần hoá chất có cấu trúc phân tử và độ tinh khiết đã biết.

3.2.3

Môi trường hoá học chưa xác định (chemically undefined medium)

Môi trường chưa xác định từng phần (partially undefined medium)

Môi trường nuôi cấy bao gồm toàn bộ hoặc một phần các vật liệu tự nhiên, đã chế biến hoặc không chế biến, có thành phần hoá học chưa được xác định hoàn toàn.

CHÚ THÍCH Các tên gọi đã hài hoà cho các loại thành phần hoá học chưa xác định khác nhau trong môi trường nuôi cấy được qui định trong Phụ lục A.

3.2.4

Môi trường lỏng (liquid medium)

Môi trường nuôi cấy gồm dung dịch lỏng của một hoặc nhiều thành phần.

VÍ DỤ: Nước pepton, canh thang dinh dưỡng.

CHÚ THÍCH 1 Trong một số trường hợp, các hạt rắn được bổ sung vào môi trường nuôi cấy dạng lỏng.

CHÚ THÍCH 2 Môi trường lỏng đựng trong các ống nghiệm, bình hoặc chai thường gọi là "canh thang".

3.2.5

Môi trường đặc (solid medium)

Môi trường bán đặc (semi-solid medium)

Môi trường nuôi cấy chứa các chất làm đông đặc (ví dụ: thạch, gelatin) với các nồng độ khác nhau.

CHÚ THÍCH 1 Vì việc sử dụng rộng rãi môi trường đông đặc bằng thạch, nên thuật ngữ "thạch" thường được dùng cùng nghĩa với môi trường đặc và do đó có liên quan đến các danh từ, ví dụ: "thạch đếm đĩa".

CHÚ THÍCH 2 Môi trường đặc được đổ vào các đĩa Petri thường được gọi là "đĩa thạch". Môi trường đặc được đổ vào các ống nghiệm hoặc lọ nhỏ với tư thế nghiêng khi thạch được rót vào và đông đặc thường được gọi là "thạch nghiêng".

3.2.6

Môi trường vận chuyển (transport medium)

Môi trường để duy trì và bảo quản sự sống cho các vi sinh vật mà không cho phép nhân lên đáng kể trong khoảng thời gian tính từ khi thu thập mẫu đến khi xử lý mẫu ở phòng thử nghiệm.

CHÚ THÍCH Môi trường vận chuyển thường chứa các chất không làm cho các vi sinh vật phát triển thêm nhưng vẫn đảm bảo duy trì chúng, ví dụ: môi trường vận chuyển Amies hoặc Stuart.

TCVN 8128-1 : 2009

3.2.7

Môi trường bảo quản (preservation medium)

Môi trường để duy trì sự sống cho các vi sinh vật trong một khoảng thời gian dài, để bảo vệ chúng khỏi những ảnh hưởng bất lợi mà có thể xuất hiện trong khoảng thời gian bảo quản dài và cho phép phục hồi sau giai đoạn này.

VÍ DỤ: Môi trường trứng Dorset, thạch dinh dưỡng.

3.2.8

Môi trường huyền phù (suspension medium)

Môi trường để tách riêng các vi sinh vật ra khỏi sản phẩm thử nghiệm thành pha lỏng mà không làm phát triển hoặc ức chế vi sinh vật trong khoảng thời gian tiếp xúc.

VÍ DỤ: Dung dịch muối pepton.

CHÚ THÍCH 1 Môi trường huyền phù cũng được dùng cho mục đích pha loãng.

CHÚ THÍCH 2 Môi trường huyền phù thường được gọi là "dịch pha loãng".

3.2.9

Môi trường phục hồi (resuscitation medium)

Môi trường có khả năng làm cho các vi sinh vật bị ức chế và bị tổn thương được phục hồi và khôi phục lại khả năng phát triển bình thường mà không cần phải nhân lên.

VÍ DỤ: Nước đệm pepton.

CHÚ THÍCH Môi trường này cũng được dùng như môi trường tiền tăng sinh.

3.2.10

Môi trường tiền tăng sinh (pre-enrichment medium)

Môi trường tăng sinh (enrichment medium)

Môi trường lỏng thông thường, tùy theo thành phần của chúng, tạo các điều kiện thích hợp đặc biệt cho sự nhân lên của vi sinh vật.

3.2.11

Môi trường tăng sinh chọn lọc (selective enrichment medium)

Môi trường tăng sinh cho phép các vi sinh vật cụ thể nhân lên trong khi lại gây ức chế toàn phần hoặc từng phần sự phát triển của các vi sinh vật khác.

VÍ DỤ: Môi trường Rappaport-Vassiliadis.

3.2.12

Môi trường tăng sinh không chọn lọc (non-selective enrichment medium)

Môi trường tăng sinh này cho phép phát triển nhiều loại vi sinh vật.

VÍ DỤ: Canh thang dinh dưỡng.

3.2.13**Môi trường phân lập** (isolation medium)

Môi trường đặc hoặc bán đặc cho phép phát triển các vi sinh vật.

VÍ DỤ: Thạch đếm đĩa.

3.2.14**Môi trường phân lập chọn lọc** (selective isolation medium)

Môi trường phân lập cho phép phát triển các vi sinh vật đích đặc trưng, trong khi đó lại ức chế các vi sinh vật khác.

VÍ DỤ: Thạch XLD.

3.2.15**Môi trường phân lập không chọn lọc** (non-selective isolation medium)

Môi trường phân lập không dùng cho các vi sinh vật ức chế chọn lọc.

VÍ DỤ: Thạch đếm đĩa.

3.2.16**Môi trường phân biệt** (differential medium)**Môi trường đặc trưng** (characterization medium)

Môi trường cho phép thử nghiệm một hoặc nhiều đặc trưng sinh lý/sinh hoá của các vi sinh vật để nhận biết chúng.

VÍ DỤ: Thạch MacConkey.

CHÚ THÍCH Môi trường phân biệt này có thể được dùng như môi trường phân lập cũng như môi trường phân lập/phân biệt, ví dụ: thạch XLD, thạch TTC lactoza.

3.2.17**Môi trường nhận biết** (identification medium)

Môi trường để tạo ra phản ứng nhận biết đặc trưng mà thường không cần đến bất kỳ phép thử khẳng định nào tiếp.

VÍ DỤ: Thạch esculin mật, thạch TBX.

CHÚ THÍCH Môi trường này có thể được dùng như môi trường phân lập được nói đến như môi trường phân lập/nhận biết.

3.2.18**Môi trường định lượng** (enumeration medium)

Môi trường nuôi cấy chọn lọc hoặc không chọn lọc mà có thể cho phép định lượng các vi sinh vật.

CHÚ THÍCH Môi trường định lượng có thể gồm các đặc tính phục hồi và/hoặc môi trường tăng sinh.

TCVN 8128-1 : 2009

3.2.19

Môi trường khẳng định (confirmation medium)

Môi trường đóng góp một phần hoặc toàn phần để nhận biết hoặc để đặc trưng của các vi sinh vật theo sau giai đoạn phục hồi, phân lập và/hoặc tăng sinh ban đầu.

Ví DỤ: Thạch Kligler.

3.2.20

Môi trường dùng cho nhiều mục đích sử dụng (medium having multiple uses)

Môi trường được định cho một vài chủng loại.

Ví DỤ: Thạch máu là môi trường phục hồi theo 3.2.9, môi trường phân lập theo 3.2.13 và môi trường phân biệt theo 3.2.16 được dùng để phát hiện phân giải máu.

3.2.21

Môi trường sử dụng ngay (ready-to-use medium)

Môi trường dạng lỏng, đặc, bán đặc được đựng sẵn trong hộp dưới dạng để sử dụng ngay hoặc được sử dụng sau khi làm tan chảy lại.

Ví DỤ: Các đĩa, ống nghiệm hoặc vật chứa khác:

- môi trường hoàn chỉnh để sử dụng ngay;
- môi trường cần được làm tan chảy lại, ví dụ: để dùng trong kỹ thuật rót đĩa;
- môi trường cần được làm tan chảy và phân phối lại trước khi sử dụng, ví dụ: được đổ vào các đĩa Petri;
- môi trường cần được làm tan chảy, được bổ sung và phân phối trước khi sử dụng, ví dụ: môi trường TSC, thạch Baird Parker RPF.

3.2.22

Môi trường được chuẩn bị từ các chế phẩm khô có bán sẵn (medium prepared from commercially dehydrated formulations)

Môi trường ở dạng khô cần phải hoàn nước và xử lý trước khi sử dụng.

Ví DỤ: Dạng bột, dạng hạt, sản phẩm đông khô tạo ra một trong hai loại môi trường sau đây:

- môi trường hoàn chỉnh;
- môi trường chưa hoàn chỉnh cần được bổ sung trước khi sử dụng.

3.2.23

Môi trường được chuẩn bị từ các thành phần riêng lẻ (medium prepared from individual components)

Môi trường được chuẩn bị hoàn toàn từ công thức hoàn chỉnh của các thành phần đặc trưng của môi trường đó.

3.3 Vi sinh vật thử nghiệm

3.3.1

Sinh vật thử nghiệm (test organisms)

Vi sinh vật thường được dùng để thử hiệu năng của môi trường nuôi cấy.

CHÚ THÍCH Các vi sinh vật thử nghiệm được xác định tiếp theo nguồn gốc của chúng (xem 3.3.2 đến 3.3.5).

3.3.2

Chủng đối chứng (reference strain)

Vi sinh vật thu được trực tiếp từ một bộ sưu tập chủng cây chính thức và được xác định đến ít nhất là giống và mức loài, được phân loại và mô tả theo các đặc trưng của chúng và tốt nhất là bắt nguồn từ thực phẩm hoặc nước.

3.3.3

Gốc đối chứng (reference stock)

Một dãy các chủng giống hệt nhau riêng rẽ thu được trong phòng thử nghiệm bằng một chủng cây truyền từ chủng đối chứng thu được trong phòng thử nghiệm hoặc có được từ nhà cung cấp.

3.3.4

Chủng cây gốc (stock culture)

Chủng cây truyền ban đầu từ gốc đối chứng.

3.3.5

Chủng cây làm việc (working culture)

Chủng cây truyền ban đầu từ chủng đối chứng hoặc chủng cây gốc hoặc chất chuẩn, đã được chứng nhận hoặc không.

CHÚ THÍCH Chất chuẩn là chất có chứa một lượng các vi sinh vật có khả năng phục hồi ở trạng thái đồng nhất, nồng độ ổn định. Chất chuẩn được chứng nhận là chất chuẩn có nồng độ đã được chứng nhận.

4 Đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

4.1 Hệ thống tài liệu

4.1.1 Tài liệu từ nhà sản xuất hoặc người sản xuất

Nhà sản xuất cần có sẵn các tài liệu sau đây:

- tên môi trường, các thành phần riêng lẻ và các thành phần bổ sung bất kỳ và các mã số sản phẩm;
- số mẻ;
- pH đích của môi trường hoàn chỉnh;

TCVN 8128-1 : 2009

- thông tin bảo quản và hạn sử dụng;
- giấy chứng nhận kiểm soát chất lượng và các vi sinh vật thử nghiệm được sử dụng;
- các kết quả thử nghiệm hiệu năng theo các tiêu chí chấp nhận;
- bảng dữ liệu kỹ thuật;
- dữ liệu an toàn và/hoặc mối nguy khi cần.

4.1.2 Chấp nhận giao sản phẩm

Đối với mỗi mẻ sản phẩm (thành phần hoặc môi trường nuôi cấy), kiểm tra như sau:

- nhận biết sản phẩm;
- tính nguyên vẹn của bao gói;
- hạn dùng của sản phẩm;
- tài liệu được cung cấp.

Ghi lại ngày nhận sản phẩm.

4.2 Bảo quản

4.2.1 Yêu cầu chung

Trong mọi trường hợp, tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất về các điều kiện bảo quản, hạn sử dụng và cách sử dụng.

4.2.2 Quản lý chất lượng và kiểm soát môi trường khô và các thành phần bổ sung

Môi trường dạng bột khô hoặc dạng hạt được chuyển vào các hộp đựng có nắp đậy kín. Các chất bổ sung chọn lọc khác nhau hoặc các chất chẩn đoán được cung cấp ở trạng thái lỏng hoặc đông khô. Việc mua bán sản phẩm cần lập kế hoạch quay vòng định kỳ trong kho (nghĩa là vào trước-ra trước). Duy trì việc kiểm tra:

- kiểm tra niêm phong;
- ghi ngày mở lần đầu tiên;
- nhìn để đánh giá lượng chứa trong hộp đã mở.

Đặc biệt sau khi mở hộp chứa môi, thì chất lượng của môi trường có thể phụ thuộc vào môi trường bảo quản. Chất lượng môi trường khô bị giảm khi thấy có sự thay đổi đặc tính dòng chảy của bột, tính đồng nhất, vón thành mảng, đổi màu .v.v... Môi trường khô đã bị hút ẩm hoặc thấy thay đổi nhiều về hình thức bên ngoài thì phải loại bỏ.

4.2.3 Môi trường sử dụng ngay có bán sẵn trên thị trường

Tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất về các điều kiện bảo quản, hạn sử dụng và cách sử dụng.

4.2.4 Môi trường được chuẩn bị trong phòng thử nghiệm

Thời hạn sử dụng của môi trường là khác nhau, do đó trong các tiêu chuẩn riêng sẽ qui định các điều kiện cụ thể và thời hạn sử dụng của từng loại môi trường.

Bảo quản môi trường trong các điều kiện tránh được mọi thay đổi về thành phần môi trường, tránh ánh sáng và tránh bị khô và bảo quản ở $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, nếu cần. Thông thường khuyến cáo đối với các đĩa thì bảo quản không quá 2 tuần đến 4 tuần và đối với các ống hoặc lọ nhỏ thì không quá 3 tháng đến 6 tháng, trừ khi có qui định trong các tiêu chuẩn riêng hoặc các kết quả kiểm tra xác nhận thời hạn sử dụng của phòng thử nghiệm cho thấy lâu hơn.

Khuyến cáo rằng, môi trường được bổ sung các thành phần không ổn định thì cần được sử dụng trong ngày, trừ khi có qui định trong các tiêu chuẩn riêng hoặc các kết quả kiểm tra xác nhận thời hạn sử dụng của phòng thử nghiệm cho thấy lâu hơn. Môi trường đặc có chứa các chất không ổn định và/hoặc các chất hoạt hoá không được bảo quản với lượng lớn để làm tan chảy lại.

Cần thiết lập hạn sử dụng có hiệu lực cho môi trường được bảo quản. Quan sát mọi dấu hiệu của thay đổi về màu, bay hơi/khô hoặc có vi khuẩn phát triển. Các mẻ môi trường cho thấy các dấu hiệu thay đổi đó thì không được sử dụng.

Trước khi sử dụng hoặc trước khi làm nóng tiếp, khuyến cáo cân bằng nhiệt độ môi trường nuôi cấy đến nhiệt độ môi trường xung quanh.

CHÚ THÍCH Các hướng dẫn đặc biệt về bảo quản môi trường đồ đĩa được nêu trong 4.4.4.

4.3 Chuẩn bị môi trường trong phòng thử nghiệm

4.3.1 Yêu cầu chung

Chuẩn bị chính xác môi trường nuôi cấy là một trong các bước cơ bản trong kiểm tra vi sinh vật và được chú ý đặc biệt.

TCVN 8128-1 : 2009

Chú ý về thực hành tốt phòng thử nghiệm và các hướng dẫn của nhà sản xuất liên quan đến xử lý môi trường khô và các thành phần khác, đặc biệt các thành phần có chứa các vật liệu độc hại, nghĩa là muối mật hoặc các chất chọn lọc khác.

Khi môi trường được chuẩn bị từ các chế phẩm khô có bán sẵn, thì tuân thủ chính xác các hướng dẫn của nhà sản xuất. Ghi lại tất cả các dữ liệu có liên quan, nghĩa là khối lượng/thể tích, pH, ngày chuẩn bị, điều kiện khử trùng, người thực hiện.

Đối với môi trường được chuẩn bị từ các thành phần riêng lẻ, thực hiện chính xác theo công thức và ghi lại tất cả mọi chi tiết và nhận biết đầy đủ (nghĩa là mã và số mẻ) của tất cả các thành phần được sử dụng.

4.3.2 Nước

Độ dẫn điện của nước trong phòng thử nghiệm không được lớn hơn $25 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ (tương đương với điện trở $\geq 0,4 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) ở 25°C , trừ khi có qui định khác.

Sự nhiễm bẩn vi khuẩn không được vượt quá $10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ và tốt nhất nên thấp hơn $10^2 \cdot \text{ml}^{-1}$. Kiểm tra định kỳ nhiễm bẩn vi khuẩn theo ISO 6222 [1] (ủ ở 22°C trong $68 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$) hoặc bằng phương pháp tương đương đã được đánh giá.

4.3.3 Cân và hoàn lại nước

Cân cần thận một lượng thích hợp môi trường khô (chú ý để không hít phải bột, đặc biệt là với môi trường có chứa các chất độc) và khuấy trộn với một lượng nước cần thiết để tránh kết mảng.

4.3.4 Hoà tan và phân tán

Môi trường khô cần được phân tán nhanh bằng cách khuấy từng lúc và lặp lại hoặc khuấy liên tục sau đó đun nóng để hoà tan, nếu cần. Môi trường chứa thạch cần được ngâm trong nước vài phút trước khi làm nóng, khuấy để hoà tan.

4.3.5 Đo và chỉnh pH

Dùng máy đo pH để đo độ pH và chỉnh trước khi khử trùng, nếu cần, sao cho sau khi khử trùng và làm nguội đến 25°C , môi trường có pH đúng yêu cầu trong khoảng $\pm 0,2 \text{ pH}$, trừ khi có qui định khác. Thông thường sử dụng dung dịch natri hydroxit khoảng 40 g/l [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$] hoặc axit clohydric loãng khoảng $36,5 \text{ g/l}$ [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$] để điều chỉnh pH. Việc điều chỉnh này được thực hiện sau khi khử trùng, sử dụng dung dịch đã khử trùng.

CHÚ THÍCH Môi trường có bán sẵn thường cho thấy thay đổi pH trước và sau khi hấp áp lực khác nhau đáng kể. Tuy nhiên, với điều kiện là sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng, chỉnh pH trước khi hấp áp lực là không cần thiết.

4.3.6 Phân phối

Phân phối môi trường vào các hộp chứa thích hợp có thể tích ít nhất 20 % lớn hơn thể tích môi trường.

4.3.7 Khử trùng

4.3.7.1 Yêu cầu chung

Việc khử trùng ướt bằng nhiệt (4.3.7.2) hoặc bằng lọc (4.3.7.3) thường được dùng để khử trùng môi trường nuôi cấy và thuốc thử.

Một số môi trường nhất định không cần phải khử trùng bằng hấp áp lực nhưng có thể được sử dụng sau khi đun sôi. Ví dụ: môi trường Enterobacteriaceae chứa xanh brilliant thường đặc biệt nhạy với nhiệt và ánh sáng và cần được làm nguội nhanh sau khi đun sôi và bảo vệ tránh ánh sáng mạnh. Cũng tương tự, một số thuốc thử có thể được sử dụng mà không cần phải khử trùng (xem tiêu chuẩn thích hợp cụ thể hoặc hướng dẫn của nhà sản xuất).

4.3.7.2 Khử trùng ướt

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Khử trùng ướt được thực hiện trong nồi hấp áp lực hoặc máy chuẩn bị môi trường. Nhìn chung việc hấp áp lực này kéo dài khoảng 15 min ở $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Đối với các thể tích lớn hơn 1000 ml, áp dụng chu kỳ khử trùng khi cần. Trong mọi trường hợp, cần theo hướng dẫn trong tiêu chuẩn cụ thể hoặc các hướng dẫn của nhà sản xuất.

CHÚ THÍCH Việc quá nhiệt cục bộ có thể xuất hiện khi hấp áp lực môi trường với lượng lớn (> 1000 ml). Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Sau khi gia nhiệt cần phải làm nguội môi trường tránh trào. Điều này đặc biệt quan trọng đối với môi trường với các thể tích lớn và đối với các môi trường nhạy, ví dụ: môi trường chứa xanh brilliant.

4.3.7.3 Khử trùng bằng cách lọc

Việc lọc để khử trùng có thể được thực hiện trong các điều kiện chân không hoặc giảm áp suất. Sử dụng thiết bị và các màng lọc vô trùng có đường kính lỗ $0,2\text{ }\mu\text{m}$. Khử trùng các bộ phận khác nhau của thiết bị lọc theo TCVN 6404 (ISO 7218) hoặc sử dụng dụng cụ đã khử trùng trước.

Một số màng lọc có thể giữ lại các protein hoặc các chất khác (như kháng sinh). Để thu được nồng độ đúng, người sử dụng cần làm ướt bộ lọc trước.

4.3.7.4 Kiểm tra

Sau khi hấp áp lực, đun sôi hoặc lọc, cần kiểm tra tất cả các môi trường đặc biệt là pH, màu sắc, độ vô trùng và tính ổn định về vật lý.

4.3.8 Chuẩn bị các chất bổ sung

CẢNH BÁO – Các chất bổ sung được sản xuất có chứa các chất độc, đặc biệt là các chất kháng sinh, cần được xử lý cẩn thận để tránh làm phân tán chất bột mà có thể gây dị ứng hoặc các phản ứng khác cho nhân viên phòng thử nghiệm. Cần phải chú ý và tuân thủ các hướng dẫn của nhà sản xuất khi pha chế các dung dịch.

Không sử dụng các chất bổ sung được pha chế đã hết hạn sử dụng, đối với các dung dịch làm việc của các chất kháng sinh thì sử dụng trong ngày chuẩn bị. Trong các tình huống nhất định, các dung dịch kháng sinh có thể được bảo quản đông lạnh với các lượng thích hợp nhưng không cấp đông lại sau khi đã đông. Khả năng giảm hoạt tính do đông lạnh cần được nhà sản xuất thiết lập hoặc được người sử dụng kiểm tra.

4.4 Chuẩn bị để sử dụng

4.4.1 Làm tan chảy môi trường thạch nuôi cấy

Làm tan chảy môi trường nuôi cấy bằng cách đặt trong nồi cách thủy hoặc bằng cách khác cho kết quả tương tự (ví dụ: dòng hơi qua hấp áp lực). Môi trường trước đó đã được hấp áp lực cần được làm nóng lại trong một thời gian tối thiểu để duy trì chất lượng môi trường. Tránh quá nhiệt và khi đã tan chảy thì lấy môi trường ra. Để ở nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian ngắn, ví dụ: 2 min, tránh làm vỡ thủy tinh.

Làm nguội môi trường tan chảy đến 47 °C đến 50 °C trong nồi cách thủy không chế được nhiệt độ. Thời gian thực tế cần thiết để đạt được 47 °C đến 50 °C phụ thuộc vào loại môi trường, thể tích và số lượng đơn vị để trong nồi cách thủy. Môi trường đã tan chảy thì sử dụng càng nhanh càng tốt, nhưng không nên để quá 4 h. Môi trường chưa được sử dụng không được làm đông đặc lại để sử dụng cho lần sau. Trường hợp môi trường rất nhạy, thì thời gian giữ môi trường tan chảy phải ngắn hơn, theo qui định trong tiêu chuẩn cụ thể có liên quan.

Thiết lập và ghi thành văn bản chế độ điều chỉnh thạch bằng cách cài đặt nhiệt kế trong môi trường thạch trong hộp chứa riêng tương tự như được sử dụng cho môi trường thử nghiệm.

Môi trường được bổ sung vào mẫu cần được chỉnh đến 44 °C đến 47 °C, hoặc theo qui định trong tiêu chuẩn có liên quan.

4.4.2 Loại khí môi trường nuôi cấy

Trước khi sử dụng, làm nóng môi trường trong nồi cách thủy đun sôi hoặc dưới dòng khí 15 min, nơi lỏng nắp; sau khi làm nóng, vặn chặt nắp và làm nguội nhanh đến nhiệt độ làm việc, nếu cần.

4.4.3 Thêm chất bổ sung

Các thành phần không bền nhiệt cần được bổ sung vào môi trường sau khi đã làm nguội đến 47 °C đến 50 °C. Để cho chất bổ sung vô trùng nguội đến nhiệt độ phòng trước khi bổ sung vào môi trường thạch.

Dịch lỏng lạnh có thể làm cho thạch đông lại hoặc tạo thành các lớp vảy trong suốt. Trộn kỹ tất cả các thành phần vào môi trường một cách nhẹ nhàng và trộn kỹ, rồi phân phối vào các hộp chứa cuối cùng càng nhanh càng tốt.

4.4.4 Chuẩn bị và bảo quản môi trường trong các đĩa Petri

Rót môi trường thạch nuôi cấy đã tan chảy vào các đĩa Petri sao cho thu được một lớp dày ít nhất là 3 mm (đối với các đĩa có đường kính 90 mm, 18 ml đến 20 ml thạch thường là đủ) hoặc theo qui định trong tiêu chuẩn có liên quan. Để thạch nguội và đông đặc lại bằng cách đặt các đĩa với nắp đậy trên mặt phẳng mát, nằm ngang. Nếu các đĩa được bảo quản hoặc nếu việc ủ kéo dài quá 48 h hoặc ủ trên 40 °C, thì cần đến một lượng môi trường lớn hơn.

CHÚ THÍCH Trong suốt quá trình ủ, trong một số trường hợp sẽ xảy ra mất nước trên bề mặt thạch nên có thể ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự mất nước là các thành phần của môi trường, lượng môi trường trong các đĩa, kiểu loại tủ ẩm, nghĩa là có quạt hoặc loại khác, độ ẩm của môi trường trong tủ ẩm, vị trí và số lượng đĩa trong tủ ẩm và nhiệt độ ủ.

Sử dụng ngay môi trường đông đặc hoặc bảo quản trong các điều kiện tránh để thành phần của môi trường bị biến đổi, nghĩa là để trong các túi kín (xem 4.2) ở nơi tối và/hoặc trong tủ lạnh ở 5 °C ± 3 °C. Dán nhãn trên đáy hoặc mặt bên của đĩa điền ngày tháng chuẩn bị và/hoặc hạn sử dụng và cách nhận biết. Cách khác có thể sử dụng các hệ thống mã hoá đáp ứng được các yêu cầu này.

Hạn sử dụng của các đĩa đã rót sẽ tăng lên nếu được bảo quản trong các túi bằng chất dẻo hàn kín. Để tránh bị ngưng tụ nước, thì cần làm mát các đĩa trước khi cho vào túi. Không làm khô bề mặt các đĩa thạch trước khi bảo quản lạnh.

Nhìn chung, để nuôi cấy bề mặt môi trường đặc, thì nên làm khô các đĩa, tốt nhất là mở nắp và lật úp các đĩa và đặt vào tủ để ở nhiệt độ 25 °C đến 50 °C hoặc để trong tủ thông khí, cho đến khi không còn các giọt nước trên bề mặt môi trường. Không làm quá khô bề mặt thạch. Các đĩa thạch bán sẵn để sử dụng ngay cần được bảo quản và sử dụng theo các hướng dẫn của nhà sản xuất.

4.5 Loại bỏ môi trường

Môi trường chưa sử dụng và bị nhiễm bẩn phải được loại bỏ theo cách an toàn và đáp ứng được các qui định hiện hành.

5 Bảo quản và duy trì các chủng kiểm chứng

5.1 Yêu cầu chung

Có sẵn một vài phương pháp, ví dụ: đông khô, bảo quản trong các hạt ở âm 70 °C, hoặc sử dụng nitơ lỏng để bảo quản và duy trì tốt tất cả vi sinh vật liên quan đến thực phẩm và vi sinh trong nước. Một phương pháp có thể không thích hợp cho tất cả các chủng.

TCVN 8128-1 : 2009

Sơ đồ về duy trì và chuẩn bị được đưa ra trong Phụ lục B.

5.2 Chủng kiểm chứng từ các nguồn thương mại

Nếu các chủng kiểm chứng thu được từ các bộ sưu tập chuẩn hoặc các nhà cung cấp được chứng chỉ ISO 9000[3] hoặc chứng nhận thích hợp khác và được giữ trong các hộp đựng gốc, thì phải sử dụng và nuôi cấy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.3 Chủng gốc đối chứng được chuẩn bị trong phòng thử nghiệm

Dịch cấy gốc của các chủng đối chứng (xem B.1) dùng cho các mục đích thử hiệu năng phải được duy trì và xử lý theo cách sao cho giảm thiểu khả năng nhiễm bản chéo, biến đổi hoặc thay đổi các tính chất điển hình. Các gốc đối chứng cần được bảo quản với các lượng nhỏ, thường được duy trì ở nhiệt độ đông lạnh sâu ($\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$) hoặc đông khô. Ở nhiệt độ cao hơn thì thời gian bảo quản cần phải giảm.

Các đặc trưng phát triển của chúng cần được lập thành văn bản đầy đủ cho từng môi trường mà trên/trong đó các chủng này được sử dụng như sinh vật thử nghiệm.

Các chủng gốc đối chứng không được dùng để chuẩn bị các chủng đối chứng.

5.4 Chủng cấy gốc

Các chủng cấy gốc thường được chuẩn bị từ các chủng gốc đối chứng đông lạnh sâu hoặc đông khô (xem B.2). Các lượng nhỏ chủng cấy gốc phải được xử lý theo cách sao cho tránh được nhiễm bản chéo chủng gốc đối chứng và/hoặc suy giảm chất lượng của chúng. Các chủng cấy gốc cần được chuẩn bị bằng cách hoà lại một lượng chủng cấy gốc đối chứng trong môi trường không chọn lọc và ủ để tạo ra chủng cấy pha tinh.

Đối với các hệ thống bảo quản có bán sẵn, cần tuân thủ nghiêm ngặt các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các chủng cấy gốc không được dùng để chuẩn bị các chủng đối chứng hoặc chủng gốc đối chứng.

5.5 Chủng cấy làm việc

Các chủng cấy làm việc phải được chuẩn bị từ chủng cấy gốc hoặc gốc đối chứng.

Các chủng cấy làm việc không được dùng để chuẩn bị các chủng đối chứng, gốc đối chứng hoặc chủng cấy gốc.

6 Thử hiệu năng môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh

6.1 Yêu cầu chung

Các qui trình thử hiệu năng được qui định trong TCVN 8128-2 : 2009 (ISO/TS 11133-2 : 2003).

Các hướng dẫn tối thiểu được nêu trong 6.2 và 6.3, trong thực tế, thực phẩm và nước có thể chứa các vi sinh vật bị ức chế. Sự phù hợp của môi trường liên quan đến độ thu hồi các tế bào bị ức chế cần được tính đến.

6.2 Kiểm soát chất lượng vật lý

Xem TCVN 8128-2 : 2009 (ISO/TS 11133-2 : 2003).

6.3 Kiểm soát chất lượng vi sinh

6.3.1 Nhiễm bẩn

Cần kiểm tra một lượng thích hợp của mỗi mẻ về sự nhiễm bẩn.

6.3.2 Vi sinh vật thử nghiệm

Một dãy các vi sinh vật thử nghiệm chỉ nên chứa các vi sinh vật có các đặc tính ổn định đại diện cho các loài và cho thấy có thể tin cậy đối với việc thể hiện hiệu năng tối ưu của môi trường được phòng thử nghiệm chuẩn bị cụ thể. Các vi sinh vật thử nghiệm cần chứa các chủng mà chúng có sẵn trong các bộ sưu tập chuẩn, nhưng cũng có thể bao gồm các chủng đặc trưng do phòng thử nghiệm phân lập. Các đặc trưng nuôi cấy có liên quan của chủng gốc đối chứng cần được kiểm tra và được phòng thử nghiệm ghi lại hoặc chọn chủng mới nếu xuất hiện các đặc trưng không điển hình. Tốt nhất là sử dụng các chủng có nguồn gốc từ thực phẩm hoặc từ nước cho dù không phải tất cả các bộ sưu tập các chủng nuôi cấy đều cung cấp các dữ liệu đó về nguồn gốc xuất xứ của chúng.

Các vi sinh vật thử nghiệm đối với mỗi môi trường có thể bao gồm:

- các chủng dương tính mạnh với các đặc trưng điển hình;
- các chủng dương tính yếu (nghĩa là có bản chất nhạy hơn);
- các chủng cho thấy các đặc trưng âm tính;
- các chủng bị ức chế một phần hoặc toàn phần.

Các vi sinh vật thử nghiệm thích hợp được nêu trong Phụ lục B của TCVN 8128-2 (ISO/TS 11133-2).

CHÚ THÍCH Tài liệu tham khảo [6] mô tả bộ sưu tập đã được đánh giá của các chủng thử nghiệm để đánh giá môi trường.

6.3.3 Môi trường sử dụng ngay và thuốc thử

Các nhà sản xuất Môi trường sử dụng ngay được bán sẵn trên thị trường, đặc biệt nếu đã được chứng nhận phù hợp với ISO 9000[3], phải có sẵn chương trình chất lượng và có thể kèm theo chứng chỉ về chất lượng của môi trường mà họ cung cấp. Trong các điều kiện này, người sử dụng có thể không cần

TCVN 8128-1 : 2009

phải thử nghiệm thêm về môi trường đó nhưng cần đảm bảo rằng các điều kiện bảo quản được duy trì theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đối với môi trường sử dụng ngay có chất bổ sung thì ít nhất nên có phép thử định tính.

6.3.4 Môi trường được chuẩn bị từ các chế phẩm khô có bán sẵn

Đối với môi trường phân lập và môi trường định lượng, thì cần ít nhất là một phép thử bán định lượng. Đối với môi trường thử nghiệm đặc trưng thì chỉ cần phép thử định tính là đủ. Các phép thử định lượng cho độ đảm bảo chất lượng môi trường cao hơn.

Đối với các môi trường không chứa các chất chỉ thị hoặc các chất chọn lọc, thì sử dụng chủng thử nghiệm dương tính đơn lẻ là thích hợp. Đối với các môi trường có chứa các chất chỉ thị hoặc chất chọn lọc, thì các chủng cho thấy chức năng chỉ thị hoặc tính chọn lọc phải được sử dụng. Đối với môi trường phức hợp, nghĩa là có chất bổ sung thì mỗi mẻ cần được kiểm tra với các chủng có các đặc trưng được liệt kê trong 6.3.2.

6.3.5 Môi trường được chuẩn bị từ các thành phần cơ bản riêng rẽ

Khuyến cáo rằng, ngoài các phép thử định tính trong 6.3.4, thì cần tiến hành phép thử định lượng để kiểm tra chiều hướng chất lượng của nguyên liệu cơ bản, năng suất của môi trường và các thủ tục sản xuất trong phòng thử nghiệm.

Phụ lục A
(Tham khảo)

**Thiết kế các thành phần của môi trường nuôi cấy trong các tiêu chuẩn
về phân tích vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi**

A.1 Yêu cầu chung

Việc mô tả hài hoà các thành phần khác nhau trong thành phần cấu thành môi trường nuôi cấy trong các phương pháp chuẩn vi sinh vật được nêu trong A.2 đến A.5.

A.2 Pepton

- sản phẩm thuỷ phân casein bằng enzym¹⁾
- sản phẩm thuỷ phân bột đậu nành bằng enzym
- sản phẩm thuỷ phân mô động vật bằng enzym²⁾
- sản phẩm thuỷ phân tim bằng enzym
- sản phẩm thuỷ phân gelatin bằng enzym
- sản phẩm thuỷ phân mô động vật và thực vật bằng enzym³⁾

A.3 Chất chiết

- sản phẩm chiết từ thịt
- sản phẩm chiết từ não-tim
- sản phẩm từ nấm men

¹⁾ Sản phẩm này bao gồm sản phẩm thuỷ phân peptic của casein, thuỷ phân tryptic của casein và trypton.

²⁾ Sản phẩm này bao gồm pepton thịt, sản phẩm thuỷ phân peptic của thịt và thuỷ phân pancreatic của thịt.

³⁾ Sản phẩm này gồm tryptoza.

TCVN 8128-1 : 2009

- mật bò dùng cho vi khuẩn học
- muối mật
- muối mật số 3.

A.4 Thạch

- thạch dùng cho vi khuẩn học

A.5 Các loại khác

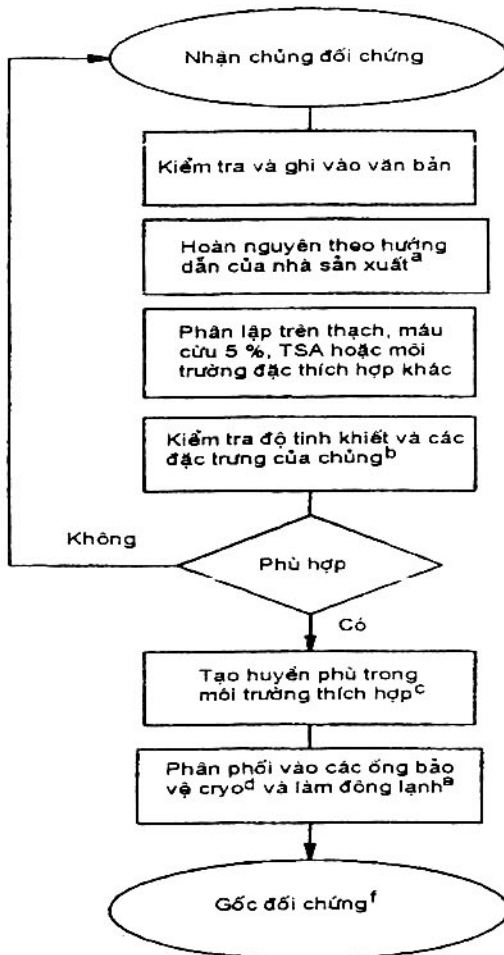
- nhũ tương lòng đỏ trứng
- sữa bột gầy
- dịch thủy phân axit của **casein**.

Phụ lục B

(Tham khảo)

Chuẩn bị chủng gốc đối chứng và dịch cấy làm việc

B.1 Chuẩn bị chủng gốc đối chứng từ chủng đối chứng



a Nhìn chung, tạo huyền phù lại trong canh thang dinh dưỡng và thời gian tiếp xúc để hồi phục

b Kiểm tra hình thái học của các khuẩn lạc và nhuộm Gram hoặc nhận biết sử dụng các phép thử sinh hoá

c Ví dụ: môi trường bảo vệ ở nhiệt độ thấp như TSB được bổ sung glyxerol 10 % đến 15 % thể tích.

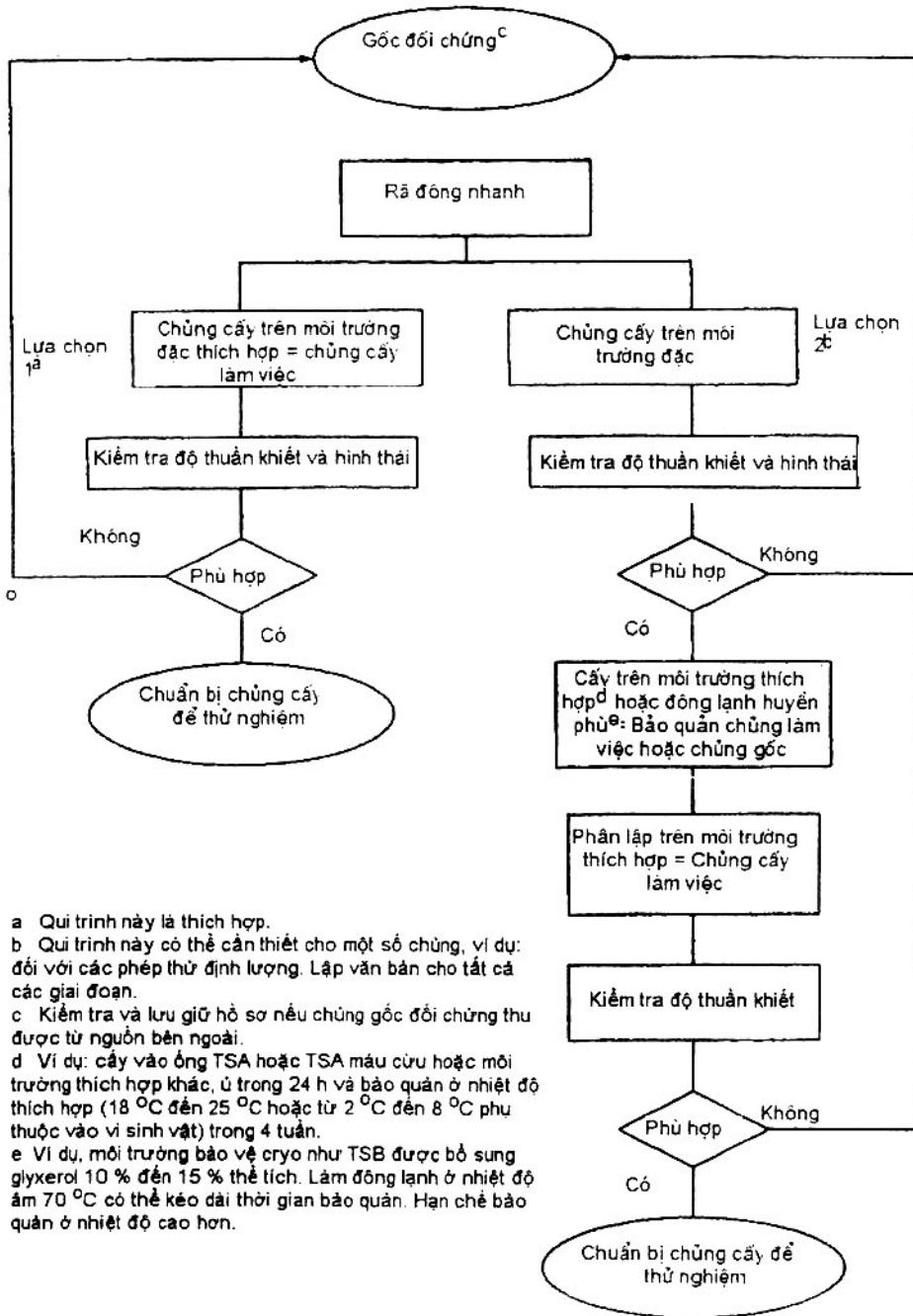
d Các ống cryo có thể chứa các hạt.

e Làm đông lạnh ở nhiệt độ $\leq -70^{\circ}\text{C}$ có thể bảo quản được lâu hơn. Hạn chế bảo quản ở nhiệt độ cao hơn.

f Có thể được sử dụng làm chủng cấy làm việc.

Hình B.1 – Sơ đồ chuẩn bị chủng gốc đối chứng

B.2 Chuẩn bị chủng cây làm việc từ gốc đối chứng



Hình B.2 – Sơ đồ chuẩn bị dịch cây làm việc

Phụ lục C
(Tham khảo)

Đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy – Xử lý sự cố

Bất bình thường	Lý do có thể
Môi trường thạch động đặc không đúng	Quá nhiệt môi trường trong quá trình chuẩn bị pH thấp làm cho thủy phân axit Sử dụng sai khối lượng thạch Thạch không hoá tan hết Trộn các thành phần không đều
pH không đúng	Quá nhiệt môi trường trong quá trình chuẩn bị Chất lượng nước kém Nhiễm bẩn hoá chất từ bên ngoài pH được đo ở nhiệt độ không đúng Máy đo pH hiệu chỉnh bị sai Môi trường khô có chất lượng kém
Màu sắc không bình thường	Quá nhiệt môi trường trong quá trình chuẩn bị Chất lượng nước kém Môi trường khô có chất lượng kém pH không đúng Bị nhiễm bẩn từ bên ngoài
Hình thành kết tủa	Quá nhiệt môi trường trong quá trình chuẩn bị Chất lượng nước kém Môi trường khô có chất lượng kém Kiểm soát pH kém Nếu được chuẩn bị từ các thành phần riêng lẻ thì có tạp chất trong nguyên liệu thô
Ước chế môi trường/Năng suất thấp	Quá nhiệt môi trường trong quá trình chuẩn bị Môi trường khô có chất lượng kém Sử dụng công thức không đúng Chất lượng nước kém Các chất được bổ sung không đúng, ví dụ: cần các thành phần không đúng hoặc ở nồng độ của chất bổ sung bị sai Có tồn dư chất độc trong bình hoặc trong nước
Chọn lọc kém	Quá nhiệt môi trường trong quá trình chuẩn bị Môi trường khô có chất lượng kém Sử dụng công thức không đúng Các chất được bổ sung không đúng, ví dụ: khi môi trường quá nóng hoặc ở nồng độ sai Chất bổ sung bị nhiễm bẩn
Nhiễm bẩn	Khử trùng không đúng cách Kỹ thuật vô trùng kém Chất bổ sung bị nhiễm bẩn

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] ISO 6222. *Water quality — Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*
 - [2] ISO 8199. *Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*
 - [3] TCVN ISO 9000 (ISO 9000) *Hệ thống quản lý chất lượng. Cơ sở và từ vựng*
 - [4] EN 1659. *In vitro diagnostic systems — Culture media for microbiology — Terms and definitions*
 - [5] EN 12322. *In vitro diagnostic medical devices — Culture media for microbiology — Performance criteria for culture media*
 - [6] CORRY. J.E L. CURTIS, G.D.W., BAIRD. R.M., editors. *Handbook of culture media for food microbiology*. 2nd edition. Elsevier, Amsterdam, 2003. 663 p. (*Progress in Industrial Microbiology*. Vol 37.)
-