

**TCVN 7902 : 2008**

**ISO 15213 : 2003**

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN  
CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG VI KHUẨN  
KHỬ SULFIT PHÁT TRIỂN TRONG ĐIỀU KIỆN KỶ KHÍ**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs –  
Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria  
growing under anaerobic conditions*

**HÀ NỘI – 2008**



## Lời nói đầu

TCVN 7902:2008 hoàn toàn tương đương với ISO 15213:2003;

TCVN 7902:2008 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.

## **Lời giới thiệu**

Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi nên phương pháp này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể. Trong trường hợp này, có thể sử dụng các phương pháp khác đặc trưng cho từng sản phẩm, nếu hoàn toàn chỉ vì lý do kỹ thuật. Tuy nhiên, cần cố gắng áp dụng phương pháp này khi có thể.

Khi tiêu chuẩn này được soát xét thì cần phải tính đến mọi thông tin liên quan đến phạm vi mà phương pháp đếm đĩa này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch so với phương pháp trong trường hợp các sản phẩm cụ thể.

Việc hài hoà các phương pháp thử có thể không thực hiện được ngay và đối với một vài nhóm sản phẩm có thể tồn tại các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Trong trường hợp có sẵn tiêu chuẩn cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Thông thường khi các tiêu chuẩn đó được soát xét, thì chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với phương pháp đếm đĩa này là vì các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

# Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng vi khuẩn khử sulfit phát triển trong điều kiện kỵ khí

*Microbiology of food and animal feeding stuffs –  
Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria  
growing under anaerobic conditions*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng vi khuẩn khử sulfit phát triển trong điều kiện kỵ khí. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi, và
- cho các mẫu môi trường trong khu vực chế biến và vận chuyển thực phẩm.

## 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. 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.

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

TCVN 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6507–1 (ISO 6887–1), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.

ISO/TS 11133–1, 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

## TCVN 7902:2008

culture media in the laboratory (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và tạo môi trường cấy – Phần 1: Các hướng dẫn chung về đảm bảo chất lượng cho việc chuẩn bị môi trường cấy trong phòng thử nghiệm).

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 3.1

**Vi khuẩn khử sulfit phát triển trong điều kiện kỵ khí** (sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions)

Các vi khuẩn hình thành các khuẩn lạc điển hình có thể đếm được dưới các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

### 4 Nguyên tắc

**4.1** Chuẩn bị hai đĩa (hoặc ống) thạch, sử dụng môi trường sắt sulfit và một lượng xác định của mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu ở dạng lỏng, hoặc một lượng xác định huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác.

Chuẩn bị hai đĩa (hoặc ống) thạch khác, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu, dưới cùng một điều kiện.

**4.2** Ủ ấm các đĩa (hoặc ống) dưới điều kiện kỵ khí ở  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 24 h đến 48 h (đọc kết quả cuối cùng sau 48 h), hoặc có thể ủ ở  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  nếu nghi ngờ có vi khuẩn ưa nhiệt. Đếm các khuẩn lạc màu đen điển hình. Màu đen của các khuẩn lạc và quầng bao quanh là kết quả của việc hình thành sắt (II) sulfua do phản ứng giữa các ion sulfua và sắt hoá trị ba [Fe(III)] có mặt trong môi trường.

**4.3** Tính số lượng vi khuẩn khử sulfit trên mililit hoặc gam mẫu thử từ số lượng khuẩn lạc thu được trên các đĩa (hoặc ống).

### 5 Môi trường nuôi cấy và dịch pha loãng

Về thực hành thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

#### 5.1 Môi trường đếm đĩa: Thạch sắt sulfit

### 5.1.1 Thành phần

|  |                           |
|--|---------------------------|
| Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym                   | 15 g                      |
| Sản phẩm thủy phân đậu tương bằng pancreatic           | 5 g                       |
| Dịch chiết nấm men                                     | 5 g                       |
| Dinatri disulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) | 1 g                       |
| Sắt (III) amoni xytrat                                 | 1 g                       |
| Thạch  | 9 g đến 18 g <sup>a</sup> |
| Nước   | 1 000 ml                  |

<sup>a</sup> Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

### 5.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên trong nước, bằng cách đun nóng.

Chỉnh pH, sao cho sau khi khử trùng pH là  $7,6 \pm 0,2$  ở  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , nếu cần.

Rót môi trường với các lượng 250 ml vào các bình cầu 500 ml.

Nếu tiến hành việc định lượng sử dụng các ống nghiệm (6.5) thì rót 20 ml hoặc 25 ml môi trường vào các ống nghiệm. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở  $121\text{ }^\circ\text{C}$ .

Trước khi sử dụng, đuổi khí môi trường.

## 5.2 Dung dịch pha loãng muối pepton

Xem 5.2.1 của TCVN 6507-1 (ISO 6887-1:1999).

## 6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm vi sinh thông thường [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] và cụ thể như sau:

**6.1 Dụng cụ đông hoá**, dùng cho các mẫu thực phẩm dạng rắn [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

**6.2 Nồi cách thủy**, có khả năng duy trì nhiệt độ ở khoảng từ  $44\text{ }^\circ\text{C}$  đến  $47\text{ }^\circ\text{C}$ .

**6.3 Bình kỵ khí**, có bộ phận tạo môi trường kỵ khí và có cả hệ thống kiểm tra các điều kiện kỵ khí.

**6.4 Tủ ấm**, có khả năng duy trì nhiệt độ ở  $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  và ở  $50\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ , nếu cần.

**6.5 Ống nghiệm**, kích thước 16 mm x 160 mm và **bình cầu** hoặc **chai** có dung tích 500 ml.

## **7 Lấy mẫu**

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn riêng liên quan đến việc lấy mẫu sản phẩm thì các bên liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

## **8 Chuẩn bị mẫu thử**

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), TCVN 6263 (ISO 8261) hoặc theo các tiêu chuẩn cụ thể thích hợp với sản phẩm có liên quan. Nếu không có các tiêu chuẩn cụ thể thì các bên có liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

## **9 Cách tiến hành**

### **9.1 Yêu cầu chung**

Sơ đồ cách tiến hành được nêu trong Phụ lục A.

### **9.2 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng**

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), TCVN 6263 (ISO 8261) hoặc tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm.

Có thể cần xử lý nhiệt dung dịch huyền phù ban đầu để loại các dạng sinh dưỡng của vi khuẩn sinh bào tử và/hoặc không sinh bào tử. Nhiệt độ và thời gian gia nhiệt thay đổi tùy thuộc vào nhu cầu thực tế, từ những hợp chất tạo ra hiệu quả thanh trùng rõ rệt khi hiệu quả hoạt hoá nhiệt vừa phải (ví dụ 75 °C trong 20 min), đến sôi trong vài phút. Trong trường hợp này, kết quả có thể được ghi là số bào tử vi khuẩn khử sulfit phát triển dưới điều kiện kỵ khí.

### **9.3 Nuôi cấy**

Lấy hai đĩa Petri vô trùng. Dùng pipet vô trùng chuyển sang mỗi đĩa 1 ml mẫu thử nếu sản phẩm ở dạng lỏng, hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác.

Lấy hai đĩa Petri vô trùng khác. Dùng pipet vô trùng mới chuyển sang mỗi đĩa 1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất ( $10^{-1}$ ) của mẫu thử nếu sản phẩm ở dạng lỏng, hoặc 1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất của huyền phù ban đầu ( $10^{-2}$ ) nếu sản phẩm ở dạng khác.

Lặp lại quy trình trên với các dung dịch pha loãng tiếp theo, sử dụng mỗi pipet vô trùng mới cho mỗi độ pha loãng.



Rót vào mỗi đĩa Petri khoảng 15 ml thạch sắt sulfite (5.1) đã được làm nguội đến nhiệt độ từ 44 °C đến 47 °C trên nồi cách thủy (6.2). Thời gian tính từ lúc nuôi cấy các đĩa Petri đến khi thêm thạch không được vượt quá 15 min. Trộn cẩn thận dịch cấy với môi trường bằng cách đưa đĩa qua lại theo phương nằm ngang và để yên cho môi trường đông đặc lại.

Sau khi môi trường đã đông đặc, phủ cùng loại môi trường lên đĩa với lượng từ 5 ml đến 10 ml.

Nếu dùng ống nghiệm thì cấy vào hai ống đựng môi trường để ở 44 °C đến 47 °C, mỗi ống 1 ml mỗi dung dịch pha loãng. Trộn nhẹ, không để tạo bọt và để yên cho môi trường đông đặc lại trên nồi cách thủy lạnh (6.2).

Sau khi môi trường đã đông đặc, phủ cùng loại môi trường lên mỗi ống với lượng từ 2 ml đến 3 ml.

#### 9.4 Ủ ấm

Sau khi đã đông đặc, ủ ấm các đĩa Petri trong các bình kỵ khí (6.3) ở 37 °C ± 1 °C trong 24 h đến 48 h.

Nếu nghi ngờ có vi khuẩn ưa nhiệt, thì chuẩn bị một dãy các đĩa Petri thứ hai (xem 9.3). Ủ ấm dãy đĩa này ở 50 °C ± 1 °C.

Trong trường hợp dùng ống, không cần phải ủ trong các bình kỵ khí.

#### 9.5 Đếm khuẩn lạc

Đọc kết quả sau 24 h và 48 h, tùy vào độ đen và tốc độ phát triển của các vi sinh vật. Đếm các khuẩn lạc màu đen, có thể có quầng đen bao quanh được coi là vi khuẩn khử sulfit.

CHÚ THÍCH 1 Có thể xuất hiện quầng đen lan rộng không đặc trưng của môi trường, đặc biệt là khi nuôi cấy trong các ống thạch thay cho các đĩa Petri. Việc phát triển các vi khuẩn kỵ khí, mà chỉ sinh khí hydro (không phải là H<sub>2</sub>S) cũng có thể khử sulfit có mặt dẫn đến làm đen môi trường.

Đếm các khuẩn lạc của vi khuẩn khử sulfit trong mỗi đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc điển hình và chứa ít hơn 300 khuẩn lạc tổng số.

Khi số lượng khuẩn lạc cao, thì một số ống có thể không đếm được. Trong trường hợp này, chỉ có các ống có các khuẩn lạc mọc tách biệt rõ ràng mới dùng để đếm.

CHÚ THÍCH 2 Tiêu chuẩn này chỉ có thể sử dụng để định lượng chỉ *Clostridium*. Sau khi thu được các khuẩn lạc đặc trưng, từ mỗi đĩa lấy năm khuẩn lạc và được dùng để khẳng định chi *Clostridium* bằng các phép thử khẳng định (ví dụ, các phép thử hô hấp, sinh bào tử).

## 10 Biểu thị kết quả và giới hạn tin cậy

Xem phần bổ sung của TCVN 6404 (ISO 7218).

## **11 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

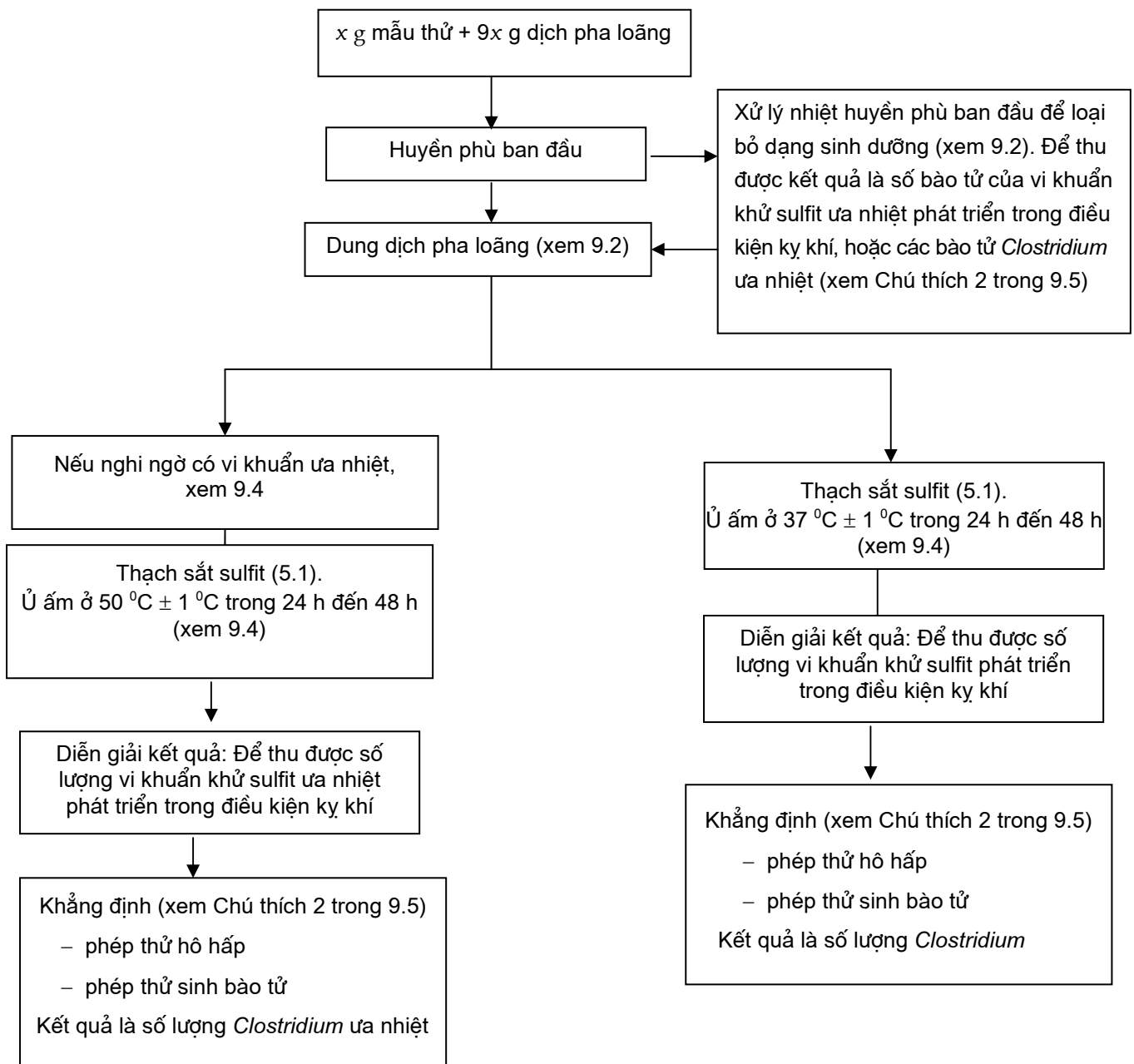
- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, kể cả nhiệt độ ủ ấm, việc sử dụng ống nghiệm và bất kỳ việc xử lý nhiệt nào để diệt vi khuẩn sinh dưỡng;
- d) mọi chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc tùy ý lựa chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) các kết quả thử nghiệm thu được;

Báo cáo kết quả cũng phải nêu rõ nếu các phép thử tiếp theo được thực hiện bởi phòng thử nghiệm chuẩn, hoặc nếu đã thực hiện thì nêu kết quả thu được.

## Phụ lục A

(qui định)

## Sơ đồ cách tiến hành



## Thư mục tài liệu tham khảo

[1] NMKL No. 95:1997, Sulfite-reducing Clostridia – Determination in food <sup>1)</sup>.

---

---

<sup>1)</sup> Phương pháp NMKL soát xét này do Reidar Skjelkvale soạn thảo. Oslo City Food Control Authority, Vestbyvn, 13, N-0976 Oslo, Norway.