



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

V I S I N H V Ậ T H Ọ C

Hướng dẫn chung về cách pha chế  
các dung dịch pha loãng  
để kiểm nghiệm vi sinh vật

TCVN 4881 - 89

Hà Nội

Cơ quan biên soạn :

Trung tâm Tiêu chuẩn-Đo lường-Chất lượng  
khu vực I  
Tổng cục Tiêu chuẩn-Đo lường-Chất lượng.

Cơ quan đề nghị ban hành và trình duyệt :

Tổng cục Tiêu chuẩn-Đo lường-Chất lượng.  
Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước.

Cơ quan xét duyệt và ban hành :

Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước

Quyết định ban hành số 695/QĐ ngày 25 tháng 12 năm 1989

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

Nhóm B

VI SINH VẬT HỌC		TCVN
Hướng dẫn chung về cách pha chế các dung dịch pha loãng để kiểm nghiệm vi sinh vật		4881 - 89
		(ISO 6687-1983)
Микробиология.	Microbiology-General	
Основное руководство по приготовлению растворов для микробиологического исследования.	guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination	Khuyến khích áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định những chỉ dẫn chung cho việc chuẩn bị các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật hiếu khí ở các sản phẩm dành cho người và động vật.

Tiêu chuẩn này hoàn toàn phù hợp với ISO 6687-1983.

I. ĐỊNH NGHĨA

1.1. Huyền phù ban đầu hay dung dịch pha loãng đầu tiên là dung dịch hay nhũ tương thu được sau khi cân hoặc đong một lượng sản phẩm kiểm tra (hoặc của một mẫu xét nghiệm đã được điều chế từ sản phẩm đó) trộn đều (sử dụng máy trộn nếu cần với các điều kiện thích hợp) với một lượng chất pha loãng gấp 9 lần (xem điều 3). Để cho các mảnh lớn lắng xuống, nếu có.

Chú thích: Trong một vài trường hợp, đặc biệt là với các sản phẩm cho huyền phù ban đầu (1 + 9) quá nhớt hoặc quá đặc, thì thêm nhiều chất pha loãng hơn, và nên lưu ý điều này khi thực hiện các thao tác tiếp theo, cũng như khi báo cáo kết quả.

1.2. Các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo:

Các huyền phù hoặc các dung dịch thu được bằng cách

trộn đều một thể tích xác định của huyền phù ban đầu (1.1) với một thể tích của chất pha loãng gấp 9 lần. Và lặp lại động tác này cho mỗi dung dịch pha loãng đã được chuẩn bị như vậy cho tới khi có được một loạt dung dịch pha loãng thập phân thích hợp để cấy vào môi trường dinh dưỡng.

### 1.3. Tiêu chuẩn riêng biệt :

là một tiêu chuẩn hay một tài liệu hướng dẫn mô tả việc kiểm tra một sản phẩm (hoặc nhóm sản phẩm) riêng biệt để phát hiện hay đếm một loại vi sinh vật (hoặc nhóm vi sinh vật) riêng biệt và/ hoặc mô tả đặc điểm chung của việc lấy mẫu, và/ hoặc việc chuẩn bị các mẫu thử .

## II . NGUYÊN TẮC

Chuẩn bị huyền phù ban đầu (1.1) sao cho có được sự phân bố đồng đều tới mức có thể của các vi sinh vật trong phân mẫu thử .

### Lượng mẫu cần

Chuẩn bị, nếu cần, các dung dịch pha loãng thập phân (1.2) nhằm giảm bớt số lượng vi sinh vật trong mỗi đơn vị thể tích, để cho sau khi nuôi cấy có thể quan sát được sự phát triển của chúng (trong ống nghiệm hoặc bình) hoặc đếm được các khuẩn lạc (trên đĩa thạch).

Số lượng thích hợp của vi sinh vật nói chung thường là :

a) Với kỹ thuật MPN, cấy 3 ống nghiệm :

1 vi sinh vật trong 10 ml của dung dịch pha loãng thập phân cao nhất .

b) Với kỹ thuật đếm khuẩn lạc : 30 - 300 khuẩn lạc, (với một vài nhóm, ví dụ : coliforms, thì từ 15 - 150 khuẩn lạc ) .

### III . CHẤT PHA LOÃNG

#### 3.1. Nguyên liệu cơ bản

Để tăng độ lặp lại của kết quả, nên dùng các thành phần cơ bản khô, hoặc một loại chế phẩm hoàn chỉnh khô để pha chế chất pha loãng, phải tuân theo nghiêm ngặt chỉ dẫn của nhà sản xuất .

Các hoá chất phải có chất lượng tinh khiết phân tích . Nước sử dụng là nước cất từ thiết bị thủy tinh, hoặc nước đã khử ion. Nước cất không được có các chất có thể ức chế vi sinh vật phát triển, trong điều kiện thí nghiệm. Cần định kỳ kiểm tra nước, đặc biệt trong trường hợp nước khử ion.

#### 3.2. Thành phần

Sử dụng chất pha loãng có thành phần sau (1)

Pepton	1,0 g
Natri clorua	8,5 g
Nước cất	1000 ml

(Trong một vài trường hợp, có thể dùng các loại nước pha loãng khác thích hợp hơn để pha loãng các sản phẩm đặc biệt, nên tham khảo tiêu chuẩn riêng).

#### 3.3. Pha chế

Hoà tan các thành phần trên vào nước, nếu cần, có thể đun nóng. Chính pH sao cho sau khi tiệt trùng, pH là 7,0 ở 25°C.

#### 3.4. Phân chia chất pha loãng

Phân chất pha loãng (3.2) vào các ống nghiệm, hoặc các lọ (4.5) (cho các dung dịch pha loãng thập phân) hoặc vào các bình hay lọ (4.4) (cho huyền phù ban đầu, trong trường hợp

1) Mục của TCVN 4882-89 (ISO 4631), TCVN 4883-89 (ISO 4632) và TCVN 4884-89 (ISO 4633) sẽ được sửa đổi cho phù hợp

sản phẩm không phải là chất lỏng - xem mục 7.1.2) có dung tích thích hợp với một lượng sao cho sau khi tiệt trùng, mỗi ống nghiệm hay lọ nhỏ chứa 9,0 ml, hoặc một bộ số của 9,0 ml chất pha loãng, và mỗi bình hay lọ lớn chứa 90 ml hoặc một bộ số của 90 ml (hoặc các lượng khác, theo yêu cầu). Đậy nút các ống nghiệm, bình, hay lọ lại.

Tiệt trùng bằng nồi hấp áp lực (Autoclave), ở  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , trong 20 phút.

Nếu chưa sử dụng ngay chất pha loãng cần bảo quản ở nơi tối, với nhiệt độ từ 0 đến  $-5^{\circ}\text{C}$  không quá 1 tháng dưới các điều kiện không cho phép xảy ra bất kỳ sự thay đổi nào về thể tích và thành phần bên trong.

Chú thích : Nếu cần phải đếm một vài nhóm vi sinh vật nhất định, sử dụng các môi trường nuôi cấy khác nhau, có thể phân chia tất cả chất pha loãng (hoặc một vài lượng) thành các lượng lớn hơn 9,0 ml, kích thước của các ống nghiệm, bình và lọ cần tương ứng.

#### IV . THIẾT BỊ VÀ DỤNG CỤ THUYẾT TINH

Chú thích : Có thể sử dụng các thiết bị ở dạng vô trùng sẵn, hoặc là các dụng cụ thuyết tinh có thể sử dụng lại nếu như có các quy cách thích hợp. Dụng cụ thuyết tinh phải là loại có khả năng chịu được tiệt trùng lặp lại và phải trở về mặt hoá học.

Các thiết bị được dùng thuộc loại thông thường của phòng thí nghiệm vi sinh và đặc biệt là :

4.1. Thiết bị để khử trùng khô (tủ sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp áp lực).

(Mỗi bộ áp lực hoạt động một cách riêng biệt, hoặc là 1 bộ phận của 1 thiết bị dùng cho việc pha chế và phân

chia các môi trường) .

Các thiết bị sẽ tiếp xúc với chất pha loãng, mẫu thử, hay các dung dịch pha loãng, trừ thiết bị đã được vô trùng sẵn (túi chất dẻo, pipet chất dẻo) đều phải được tiệt trùng bằng 1 trong các phương pháp sau đây :

a) Bằng cách giữ ở 170 đến 175°C trong thời gian không ít hơn 1 giờ, ở tủ sấy .

b) Bằng cách giữ ở  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  trong thời gian không ít hơn 20 phút trong nồi hấp áp lực.

4.2. Thiết bị pha-trộn (cùng cho các sản phẩm không phải là chất lỏng - xem điều 7.1.2).

Sử dụng một trong các loại dưới đây :

a) Máy trộn-quay, có tần số quay từ 8000 đến 45000 vòng/phút, có các bình chứa bằng thủy tinh hay kim loại nên có nắp đậy, chịu được các điều kiện tiệt trùng.

b) Dụng cụ pha trộn kiểu nhu động (Stomacher) với các túi chất dẻo đã vô trùng.

Chú thích : các bình chứa hoặc các túi chất dẻo này cần có dung tích đủ để cho mẫu thử được trộn một cách thích đáng với lượng chất pha loãng thích hợp. Nội dung thể tích của dụng cụ chứa phải bằng khoảng 2 lần thể tích của mẫu thử cộng với chất pha loãng .

#### 4.3. Dụng cụ trộn

Có thể trộn 1 hoặc 2 ml mẫu thử (trường hợp các sản phẩm ở dạng lỏng) hoặc của một dung dịch pha loãng có nồng độ cao hơn, trong một ống nghiệm có kích thước phù hợp với 9 hoặc 18 ml chất pha loãng, để thu được một huyền phù đồng nhất, và hoạt động trên nguyên tắc quay lệch tâm các chất trong ống nghiệm (loại dụng cụ trộn Vortex) .

#### 4.4. Bình hoặc lọ

Có dung tích đủ chứa 90 ml chất pha loãng, dùng cho huyền phù ban đầu hoặc chứa các bội số của 90 ml (trường hợp các sản phẩm không phải là chất lỏng, xem điều 7.1.2)

#### 4.5. Ống nghiệm (bình hoặc lọ)

Có dung tích đủ chứa, và có dư một khoảng trống phía trên để dễ trộn, 10 ml (hoặc một bội số của 10 ml nếu cần) mẫu thử (dạng lỏng) hoặc 10 ml huyền phù ban đầu (trong các trường hợp khác), hoặc 10 ml các dung dịch pha loãng tập phân khác.

4.6. Các Pipet (nhét bông ở đầu) có dung tích 1 ml, (hoặc 2 ml, nếu cần - xem ghi chú ở điều 3.4) và có lỗ chảy ra đường kính 2 - 3 mm .

4.7. Các pipet chia độ (nhét bông ở đầu) có dung tích lớn, ví dụ 10 hoặc 20 ml .

4.8. Máy đo pH - chính xác tới  $\pm 0,1$  đơn vị pH .

#### 4.9. Cân

Có khả năng thích hợp, và có thể cân chính xác đến 0,01 g (trường hợp sản phẩm không phải là chất lỏng).

### V . LẤY MẪU

Thực hiện việc lấy mẫu theo các tiêu chuẩn riêng thích hợp về sản phẩm kiểm tra. Nếu không có, thì nên có sự thoả thuận giữa các bên có liên quan về việc lấy mẫu .

### VI . CHUẨN BỊ MẪU THỬ

Chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn riêng phù hợp với sản phẩm kiểm tra. Nếu chưa có, thì nên có sự thoả thuận về vấn đề này giữa các bên có liên quan.



## VII . CÁCH TIẾN HÀNH

Chú thích : Đối với một vài sản phẩm nào đó có thể cần phải lưu ý đặc biệt khi chuẩn bị huyền phù ban đầu  
Ví dụ :

- Sử dụng nhiệt độ tăng dần để tạo huyền phù bột sữa, cao, gelatin...
- Điều chỉnh pH của mẫu
- Hoàn nguyên các sản phẩm khô và phục hồi các vi sinh vật đã bị hư hại khi thực hiện các biện pháp xử lý khác nhau và trong quá trình bảo quản sản phẩm thực phẩm.

Các lưu ý này phải được đề cập đến trong tiêu chuẩn riêng áp dụng cho sản phẩm đang kiểm tra.

## 7.1. Lượng mẫu cần

Phần mẫu thử, và huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng đầu tiên).

Sử dụng trình tự được mô tả trong mục 7.1.1, trong các trường hợp sau :

- Đối với các mẫu là chất lỏng không nhớt (nước, sữa nước giải khát v.v...), trong đó vi sinh vật được phân bố đồng nhất hoặc là dễ bị đồng nhất hoá bởi các biện pháp cơ học (lắc,...).

- Đối với phần chất lỏng của một hỗn hợp không đồng nhất, được coi là đủ đại diện cho toàn bộ mẫu (ví dụ: pha nước của mỡ đông vật hay chất béo thực vật).

Trong tất cả các trường hợp còn lại, và trường hợp có nghi vấn, thì sử dụng trình tự được mô tả ở mục 7.1.2.

Để tránh làm hư hại các vi sinh vật do thay đổi nhiệt độ đột ngột, thì nhiệt độ của chất pha loãng khi tiến hành thí nghiệm cần phải xấp xỉ nhiệt độ của mẫu (hử (xem điều 6)

### 7.1.1. Các mẫu lỏng (có thể lấy ra bằng pipet)

Lắc mẫu thử (xem điều 6) bằng tay, thực hiện 25 lần lên xuống với độ rộng khoảng 30 cm trong 7 giây hay tốt hơn là sử dụng một thiết bị lắc cơ học chuẩn để đảm bảo các vi sinh vật được phân bố đồng đều. Lấy ra 1 ml bằng 1 pipet (4.6) và đưa phần mẫu thử này vào 9 ml chất pha loãng (3.4) tránh chạm pipet vào dịch pha loãng (xem ghi chú ở điều 3.4) .

Cần thận trộn phần mẫu trên với chất pha loãng bằng cách hút 10 lần với một pipet sạch khác, hoặc bằng dụng cụ trộn cơ học (4.3) trong 5 - 10 giây. Tần số quay của dụng cụ này sẽ được chọn sao cho chất lỏng - khi cuộn xoay - dâng lên cách mép của lọ chứa khoảng 2 - 3 cm .

Chú thích : Đối với một số sản phẩm quần thể vi sinh vật có thể được phân tán có hiệu quả hơn bằng cách trộn cơ học so với thao tác bằng pipet, vì vậy cho các kết quả khác nhau rõ rệt, thì tiêu chuẩn riêng về sản phẩm đó chỉ nên giới thiệu một trong các trình tự tiến hành đã nêu, tốt hơn cả là sử dụng dụng cụ trộn cơ học. Điều kiện của việc sử dụng dụng cụ này cần được xác định một cách chính xác .

### 7.1.2. Các mẫu khác

Cân chính xác tới 0,01 g, cho vào một bình chứa của máy trộn quay (4.2.a) hoặc 1 bao chất dẻo (trường hợp dùng stomacher - 4.2.b), một khối lượng m (thông thường là 10 g, hoặc một bội số của 10 g) của mẫu thử (xem điều 6) đủ cho tất cả các thử nghiệm và tất cả các dung dịch pha loãng tiếp theo - theo yêu cầu trong tiêu chuẩn riêng về sản phẩm kiểm tra .

Thêm một thể tích chất pha loãng, tính bằng mililit,

bằng 9 x m chất pha loãng (3.4) (xem ghi chú ở điều 1.1), ở nhiệt độ thích hợp.

Bật máy trộn-quay trong một thời gian đủ để máy cho tổng số vòng quay là 15000-20000. Thậm chí với máy có tốc độ chậm nhất thì thời gian này cũng sẽ không quá 2,5 phút.

Cho stomacher hoạt động trong 1 - 2 phút, tùy tính chất của sản phẩm (xem ghi chú 2).

Để cho các mảnh to lắng xuống, nếu cần, trong khoảng 15 phút sau đó chuyển một lượng nhất định từ lớp trên của huyền phù này vào một ống, bình hay chai để nuôi cấy (4.5) bằng một pipet lớn (4.7) (nếu có một lớp chất bảo, thì lấy mẫu thử từ phần nước).

Lượng mẫu lấy ra này cần đủ cho mọi xét nghiệm và các dung dịch pha loãng tiếp theo.

Nếu chỉ lấy ra một phần từ huyền phù ban đầu để cấy hoặc để pha loãng hơn, thì có thể bỏ qua việc chuyển nói trên.

#### Chú thích :

1) Dụng cụ stomacher có thể không thích hợp với một vài sản phẩm (ví dụ : với các loại sản phẩm có những mảnh nhỏ nhọn sắc, hoặc có các thành phần không dễ làm vỡ, gãy) Chỉ nên sử dụng nó khi đã có căn cứ (các số liệu, các thử nghiệm so sánh) cho thấy là kết quả thu được không sai khác đáng kể so với khi sử dụng một máy trộn-quay.

2) Lưu ý được rút ra từ thực tế là : đối với một vài sản phẩm nào đó, đặc biệt là các loại ngũ cốc, thì thời gian nêu trên là không thích hợp cho các loại vi sinh vật như nấm men và nấm mốc.

Trong trường hợp này, dụng cụ stomacher lại cho tốc độ phục hồi (tái sinh) lớn hơn so với máy trộn-quay. Sử dụng stomacher trong 10 phút và nên tránh sự phân ly vì

một vài loại men, một nào đó có thể bị mất khỏi lớp chất lỏng bề mặt .

### 7.2. Các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Chú thích : khi xét nghiệm có hay không có một loại vi sinh vật nào đó trong 0,1 ml hay 0,1 g sản phẩm, không cần chuẩn bị các dung dịch pha loãng dưới đây :

Chuyển, bằng một pipet sạch (hoặc nếu hỗn hợp huyền phù ban đầu thu được bằng cách dùng một pipet, thì có thể dùng chính pipet đó) 1 ml từ huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng 1 + 9 đầu tiên ( $10^{-1}$ ), hoặc vào một ống nghiệm khác có chứa 9 ml chất pha loãng vô trùng ở nhiệt độ thích hợp, tránh chạm pipet vào chất pha loãng (xem ghi chú điều 1.1 và 3.4) .

Trộn kỹ, bằng cách hút lên-xuống 10 lần với 1 pipet mới hoặc bằng dụng cụ trộn (4.3) trong 5 - 10 giây, để có được dung dịch pha loãng  $10^{-2}$  . Tần số quay của máy trộn được chọn sao cho chất lỏng này khi cuộn xoáy, dâng lên cách mép lọ chứa khoảng 2 - 3 cm .

Nếu cần, lặp lại các thao tác này, sử dụng dung dịch pha loãng  $10^{-2}$  và các dung dịch pha loãng tiếp theo để thu được các dung dịch pha loãng  $10^{-3}$  và  $10^{-4}$ , vv... cho tới khi có được số lượng vi sinh vật thích hợp (xem điều 2)

### 7.3. Lặp lại các thao tác khác nhau

Tuyệt nhiên một loạt các thao tác đã mô tả trong điều 7.1 và 7.2 với số lần cần thiết (một lần, hai lần, vv...) theo tiêu chuẩn riêng về sản phẩm .

Chú thích : qua thống kê, người ta đã xác minh được là để giảm bớt sự biến động của các kết quả khi sử dụng

kỹ thuật đếm khuẩn lạc, tốt hơn là nên lặp lại các thao tác khác nhau với những phần mẫu riêng từ mẫu thử hơn là gấp đôi số đĩa được cấy từ mỗi ống nghiệm của một cấy dung dịch pha loãng .

#### 7.4. Thời hạn thực hiện quy trình

Nói chung, các dung dịch pha loãng nên chuẩn bị từ mẫu thử ngay trước khi phân tích, chúng sẽ được sử dụng để cấy vào môi trường dinh dưỡng trong vòng 30 phút kể từ khi pha chế .

---