

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 5518-1 : 2007

ISO 21528-1 : 2004

VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI -PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG ENTEROBACTERIACEAE - PHẦN 1: PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG BẰNG KỸ THUẬT MPN CÓ TIỀN TĂNG SINH

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment

Lời nói đầu

TCVN 5518-1:2007 thay thế TCVN 5518-91 và TCVN 6847:2001;

TCVN 5518-1:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 21528-1:2004;

TCVN 5518-1:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn 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:

Tiêu chuẩn quốc tế ISO 21528-1 này đưa ra hướng dẫn chung để kiểm tra các sản phẩm không được đề cập đến trong các tiêu chuẩn quốc tế hiện hành và được xem xét bởi các tổ chức chuẩn bị các phương pháp thử vi sinh vật để áp dụng cho thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi. Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi trong lĩnh vực áp dụng 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 các hướng dẫn 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 hòa 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 quốc tế cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Thông thường khi các tiêu chuẩn như vậy 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 các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI -PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG ENTEROBACTERIACEAE - PHẦN 1: PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG BẰNG KỸ THUẬT MPN CÓ TIỀN TĂNG SINH

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp có tiền tăng sinh để phát hiện Enterobacteriaceae. Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- các sản phẩm thực phẩm và thức ăn chăn nuôi và
- các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất và chế biến thực phẩm.

Việc định lượng được thực hiện bằng cách tính số có xác suất lớn nhất (MPN) sau khi ủ ấm ở 37 °C hoặc (30 °C) ¹⁾ trong môi trường lỏng.

Phương pháp này có thể áp dụng:

- khi các vi sinh vật cần tìm đòi hỏi phải phục hồi trước khi tăng sinh và
- khi số lượng vi sinh vật được dự kiến trong khoảng từ 1 đến 100 trên mililit hoặc trên gam mẫu thử.

Điểm hạn chế khi áp dụng tiêu chuẩn này là do độ nhạy của phương pháp gây nên sự dao động lớn của kết quả (xem điều 11).

¹⁾ Nhiệt độ 37°C thường được sử dụng khi định lượng Enterobacteriaceae về chỉ thị vệ sinh. Cách khác nhiệt độ 30°C có thể được chọn khi định lượng Enterobacteriaceae được kiểm soát vì mục đích công nghệ và bao gồm Enterobacteriaceae ưa lạnh

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 ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 6507-1:2005 (ISO 6887-1:1999), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Chuẩn bị mẫu thử, 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.

TCVN 6507-2 (ISO 6887-2), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật - Phần 2: Các nguyên tắc cụ thể chuẩn bị thịt và sản phẩm thịt.

TCVN 6507-3 (ISO 6887-3), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật - Phần 3: Các nguyên tắc cụ thể chuẩn bị các mẫu thủy sản và sản phẩm thủy sản.

TCVN 6507-4 (ISO 6887-4), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật - Phần 4: Các nguyên tắc cụ thể chuẩn bị các sản phẩm khác với sữa và sản phẩm sữa, thịt và sản phẩm thịt, thủy sản và sản phẩm thủy sản.

TCVN 6504 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn chăn nuôi - Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6263:2007 (ISO 8261:2001), Sữa và các 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.

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

ISO/TS 11133-2 : 2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media (Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Hướng dẫn chuẩn bị và tạo môi trường cấy - Phần 2: Các hướng dẫn thực hành về thử tính năng của môi trường cấy).

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1 Enterobacteriaceae (Enterobacteriaceae)

các vi sinh vật hình thành các khuẩn lạc đặc trưng trên thạch glucoza mật đỏ tím và lên men glucoza và các phản ứng oxidaza âm tính khi tiến hành phép thử theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

3.2

phát hiện Enterobacteriaceae (detection of Enterobacteriaceae)

xác định sự có mặt hay không có mặt các vi khuẩn này, trong một lượng sản phẩm cụ thể, khi tiến hành phép thử theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

3.3

định lượng Enterobacteriaceae (enumeration of Enterobacteriaceae)

số có xác suất lớn nhất của Enterobacteriaceae tìm thấy trong một mililit hoặc trong một gam mẫu thử khi tiến hành thử theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Phát hiện Enterobacteriaceae (xem Phụ lục A)

4.1.1 Tiến tăng sinh trong môi trường không chọn lọc

Phần mẫu thử được cấy vào dung dịch nước đệm pepton (BPW), rồi được ủ ở 37 °C (hoặc 30 °C) trong 18 giờ ± 2 giờ.

4.1.2 Tăng sinh trong môi trường lòng chọn lọc

Cấy dịch cấy thu sau khi tiến tăng sinh vào môi trường tăng sinh [canh thang glucozo mật lục sáng có đệm (canh thang EE)], sau đó ủ ở 37 °C (hoặc 30 °C)¹⁾ trong 24 giờ ± 2 giờ.

4.1.3 Phân lập và chọn lọc để khẳng định

Cấy dịch cấy thu được sau khi tăng sinh trong canh thang EE vào môi trường đặc chọn lọc, sau đó ủ ở 37 °C (hoặc 30 °C)¹⁾. Sau 24 giờ ± 2 giờ kiểm tra về sự có mặt hay không có mặt của các khuẩn lạc giả định bằng các đặc trưng của Enterobacteriaceae.

4.1.4 Khẳng định

Các khuẩn lạc Enterobacteriaceae giả định được cấy truyền lên môi trường không chọn lọc và khẳng định bằng các phép thử lên men glucoza và sự có mặt của oxydaza.

4.2 Định lượng bằng kỹ thuật MPN (xem phụ lục B)

4.2.1 Tiềm tăng sinh trong môi trường không chọn lọc

Phần mẫu thử x g được cho vào 9 x ml dung dịch nước đệm pepton (BPW) và đồng hóa. Chuẩn bị một hoặc nhiều dung dịch pha loãng thập phân trong nước đệm pepton (theo mức độ nhiễm dự kiến). Lấy các lượng (10 ml) dung dịch pha loãng ban đầu cho vào ba ống nghiệm. Sau đó, lấy 3 x 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào 9 ml BPW và 3 x 1 ml của mỗi dung dịch pha loãng tiếp theo vào 9 ml BPW. Ủ các ống này ở 37 °C (hoặc 30 °C)¹⁾ trong 18 giờ ± 2 giờ.

4.2.2 Tăng sinh trong môi trường lỏng chọn lọc

Lấy từng ống dịch cấy thu được sau tiềm tăng sinh (ít nhất 3 x 3) cấy vào các ống môi trường tăng sinh lỏng (canh thang EE). Ủ các ống này ở 37 °C (hoặc 30 °C)¹⁾ trong 24 giờ ± 2 giờ.

4.2.3 Phân lập và chọn lọc để khẳng định

Cấy một vòng dịch cấy từ mỗi ống đã ủ thu được sau khi được tăng sinh trong môi trường EE vào môi trường đặc chọn lọc (thạch glucoza mật đỏ tím), sau đó ủ ở 37 °C (hoặc 30 °C). Sau 24 giờ ± 2 giờ kiểm tra về sự có mặt của các khuẩn lạc giả định bằng các đặc trưng của Enterobacteriaceae.

4.2.4 Khẳng định

Các khuẩn lạc Enterobacteriaceae giả định được cấy truyền lên môi trường không chọn lọc sau đó được khẳng định bằng các phép thử lên men glucoza và sự có mặt của oxydaza.

4.2.5 Tính toán

Tính số các xác suất lớn nhất của *Enterobacteriaceae* trên mililit hoặc trên gam mẫu thử bằng cách sử dụng số lượng các ống được thử khẳng định dương tính và tra bảng MPN [xem TCVN 4604 (ISO 7218)].

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

Về thực hành trong phòng thí nghiệm, xem TCVN 4604 (ISO 7218), ISO/TS 11133-1 và ISO/TS 11133-2.

5.1 Dịch pha loãng: nước đệm pepton (BPW)

Xem TCVN 6507-1 : 2005 (ISO 6887-1 : 1999), 5.2.2.

BPW được sử dụng làm môi trường tiềm tăng sinh không chọn lọc đối với phương pháp định lượng

5.2 Môi trường nuôi cấy

5.2.1 Môi trường tăng sinh: Canh thang glucoza mật lục sáng có đệm (canh thang EE)

5.2.1.1 Thành phần

Dịch thủy phân mô động vật bằng enzym	10,0 g
Glucoza	5,0 g
Dinatri hydro phosphat (Na ₂ HPO ₄)	6,45 g
Kali dihydro phosphat (KH ₂ PO ₄)	2,0 g
Mật bò dùng cho khuẩn lạc	20,0 g
Lục sáng (chất lượng vi khuẩn học)	0,0135 g
Nước	1 000 ml

5.2.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi. Không đun nóng môi trường quá 30 phút. Làm nguội nhanh môi trường.

Chỉnh pH sao cho sau khi đun sôi là 7,2 ± 0,2 ở 25 °C, nếu cần.

¹⁾ Nhiệt độ 37 °C thường được sử dụng khi định lượng Enterobacteriaceae về chỉ thị vệ tinh. Cách khác nhiệt độ 30 °C có thể được chọn khi định lượng Enterobacteriaceae được kiểm soát vì mục đích công nghệ và bao gồm Enterobacteriaceae ưa lạnh.

Phân phối môi trường theo các lượng 10 ml vào các ống nghiệm vô trùng có dung tích thích hợp (6.5).

Không khử trùng môi trường.

Môi trường có thể bảo quản đến một tháng ở $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

5.2.1.3 Kiểm tra chất lượng môi trường nuôi cấy

Đối với việc xác định tính chọn lọc và hiệu quả, xem ISO/TS 11133-1. Đối với các tiêu chí thực hiện, xem ISO/TS 11133-2:2003, Bảng B.3.

5.2.2 Thạch glucozo mật đỏ tím (VRBG)

5.2.2.1 Thành phần

Dịch thủy phân mô động vật bằng enzym	7,0 g
Cao men	3,0 g
Muối mật No.3	1,5 g
Glucoza	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Đỏ trung tính	0,03 g
Tím tinh thể (crystal violet)	0,002 g
Thạch	9 g đến 18 g ^{a)}
Nước	1 000 ml

a) Phụ thuộc sức đông của thạch

5.2.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi.

Chỉnh pH sao cho sau khi đun sôi là $7,4 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Phân phối môi trường nuôi cấy này vào các ống nghiệm hoặc bình vô trùng (6.5) có dung tích thích hợp.

Không khử trùng môi trường.

Sử dụng môi trường nấu chảy trong vòng 4 giờ chuẩn bị.

5.2.2.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Chuyển ngay vào mỗi đĩa Petri (6.7) khoảng 15 ml môi trường nuôi cấy đã được làm nguội đến khoảng từ 44°C đến 47°C (6.4) và để cho đông lại.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô mặt thạch, và tốt nhất là mở nắp và để bề mặt thạch úp xuống trong tủ sấy ẩm (6.3) cho đến khi bề mặt thạch được khô.

Nếu chuẩn bị trước, có thể bảo quản các đĩa thạch chưa làm khô này đến 2 tuần ở $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ mà không làm thay đổi các thành phần của chúng.

5.2.2.4 Kiểm tra chất lượng môi trường nuôi cấy

Đối với việc xác định tính chọn lọc và hiệu quả, xem ISO/TS 11133-1. Đối với các tiêu chí thực hiện, xem ISO/TS 11133-2:2003, Bảng B.1.

5.2.3 Thạch dinh dưỡng

5.2.3.1 Thành phần

Cao thịt	3,0 g
Dịch thủy phân mô động vật bằng enzym	5,0 g
Natri clorua	5,0 g
Thạch	9 g đến 18 g ^{a)}
Nước	1 000 ml

a) Phụ thuộc sức đông của thạch

5.2.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là $7,3 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Phân phối môi trường nuôi cấy vào các ống nghiệm hoặc bình vô trùng (6.5) có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 °C.

5.2.3.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Chuyển vào mỗi đĩa Petri (6.7) khoảng 15 ml môi trường nuôi cấy đã được làm tan chảy và nguội đến khoảng 47 °C và để cho đông đặc.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô mặt thạch, và tốt nhất là mở nắp và để bề mặt thạch hướng xuống dưới ở trong tủ ẩm (6.3) cho đến khi bề mặt thạch khô.

Nếu chuẩn bị trước, có thể bảo quản các đĩa thạch chưa làm khô này đến 2 tuần ở 5 °C ± 3 °C mà không làm thay đổi các thành phần của chúng.

5.2.3.4 Kiểm tra chất lượng môi trường nuôi cấy

Đối với việc xác định tính chọn lọc và hiệu quả, xem ISO/TS 11133-1. Đối với các tiêu chí thực hiện, xem ISO/TS 11133-2:2003, Bảng B.6.

5.2.4 Thạch glucoza

5.2.4.1 Thành phần

Dịch thủy phân casein bằng enzym	10,0 g
Cao men	1,5 g
Glucoza	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Bromcrezol tím	0,015 g
Thạch	9 g đến 18 g ^{a)}
Nước	1 000 ml
a) Phụ thuộc sức đông của thạch	

5.2.4.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng, nếu cần.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 7,0 ± 0,2 ở 25 °C, nếu cần.

Phân phối môi trường nuôi cấy vào các ống nghiệm (6.6) có dung tích thích hợp (ví dụ: 10ml môi trường cấy cho các ống nghiệm 16 mm x 160 mm).

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 °C. Để các ống theo phương thẳng đứng.

Môi trường này có thể bảo quản đến một tuần ở 5 °C ± 3 °C.

Để loại bỏ oxy, ngay trước khi sử dụng, làm nóng môi trường trong nước sôi hoặc ở trong nồi hơi nước nóng trong 15 phút, sau đó nhanh chóng làm nguội đến nhiệt độ ủ ấm.

5.3 Thuốc thử oxidaza

5.3.1 Thành phần

<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyl- <i>p</i> -phenylen diamin dihydro clorua	1,0 g
Nước	100 ml

5.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan thành phần trên trong nước lạnh.

Chuẩn bị thuốc thử ngay trước khi sử dụng.

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

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

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

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

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ ẩm, có khả năng hoạt động ở 37 °C ± 1 °C.

6.3 Tủ sấy (được đối lưu không khí) hoặc **tủ ẩm**, có khả năng hoạt động ở nhiệt độ từ 37 °C đến 55 °C.

6.4 Nồi cách thủy, hoặc thiết bị tương tự, có khả năng duy trì nhiệt độ từ 44 °C đến 47 °C.

6.5 Dụng cụ chứa, (ví dụ: chai, ống, bình), thích hợp cho việc khử trùng và bảo quản môi trường cấy.

6.6 Ống nghiệm, có kích thước khoảng 16 mm đến 160 mm và 20 mm đến 200 mm, và các bình hoặc chai có dung tích từ 150 ml đến 500 ml.

6.7 Đĩa petri, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo có đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.8 Que cấy vòng (đường kính khoảng 3 mm) và **que cấy**, bằng platin/iridi hoặc niken/crom, hoặc đĩa thủy tinh, hoặc vòng cấy hoặc kim cấy vô trùng sử dụng một lần.

6.9 Pipet chia độ, dung tích danh định 1 ml được chia độ đến 0,1 ml, có lỗ xả với đường kính thích hợp.

6.10 pH met, có độ chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25 °C.

6.11 Bộ đồng hóa

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là phòng thử nghiệm nhận được mẫu đại diện trung thực và không bị hư hỏng hay biến đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Phương pháp lấy mẫu phải tiến hành theo tiêu chuẩn riêng thích hợp với sản phẩm liên quan. Nếu không có tiêu chuẩn riêng thì các bên liên quan nên thỏa thuận với nhau về vấn đề này.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), TCVN 6507-2 (ISO 6887-2), TCVN 6507-3 (ISO 6887-3), TVCN 6507-4 (ISO 6887-4) hoặc TVCN 6263 (ISO 8261) và/hoặc các tiêu chuẩn cụ thể thích hợp với sản phẩm có liên quan. Nếu không có các tiêu chuẩn cụ thể thì các bên liên quan nên thỏa thuận với nhau về vấn đề này.

9 Cách tiến hành

9.1 Khái quát

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Môi trường nuôi cấy thường được ủ ở 37 °C. Cách khác, có thể sử dụng ²⁾ nhiệt độ ủ là 30 °C.

9.2 Phương pháp phát hiện

9.2.1 Phần mẫu thử và huyền phù ban đầu

Cho phần mẫu thử (x g hoặc x ml) tùy thuộc vào độ nhạy yêu cầu và đồng hóa trong 9x ml nước đệm pepton (5.1). Chuyển một thể tích thích hợp sang ống hoặc dụng cụ chứa vô trùng (6.5) tùy theo giới hạn phát hiện yêu cầu.

9.2.2 Tiềm tăng sinh không chọn lọc

Ủ huyền phù ban đầu (9.2.1) ở 37 °C trong 18 giờ ± 2 giờ.

9.2.3 Tăng sinh chọn lọc

Chuyển 1 ml dịch cấy thu được trong 9.2.2 vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường tăng sinh (5.2.1).

Ủ môi trường đã cấy ở 37 °C trong 24 giờ ± 2 giờ.

Tiếp tục quy trình phân lập và chọn lọc để khẳng định (9.4).

9.3 Phương pháp định lượng (phương pháp MPN)

9.3.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng tiếp theo

Tùy thuộc vào độ chính xác của các kết quả mà cấy cùng một dung dịch pha loãng vào một lượng thích hợp các bình tam giác hoặc ống (ví dụ: ba, năm hoặc mười ống hoặc bình tam giác). Về nguyên tắc, thì các kỹ thuật yêu cầu ba bình hoặc ba ống cho mỗi độ pha loãng.

Về việc chuẩn bị các huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng tiếp theo, sử dụng dịch pha loãng (5.1).

²⁾ Nhiệt độ 37 °C thường được sử dụng khi định lượng Enterobacteriaceae về chỉ thị vệ tinh. Cách khác nhiệt độ 30 °C có thể được chọn khi định lượng Enterobacteriaceae được kiểm soát vì mục đích công nghệ và bao gồm Enterobacteriaceae ưa lạnh.

Để chuẩn bị huyền phù ban đầu, lấy phần mẫu x g hoặc x ml và đồng hóa trong 9 x ml nước đệm pepton (BPW) (5.1). Như vậy sẽ thu được dung dịch pha loãng 1/10.

CHÚ THÍCH 10 ml dung dịch pha loãng 1/10 chứa tương đương 1 g hoặc 1 ml mẫu.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo bằng cách lấy 1 ml của dung dịch pha loãng 1/10 cho vào 9 ml BPW. Lập lại để tạo ra các dung dịch pha loãng thập phân cần thiết tiếp theo.

Chuyển vào ba ống (6.5), mỗi ống 10 ml huyền phù 1/10. Chuyển tiếp 1 ml dịch pha loãng tiếp theo sang mỗi ống chứa 9 ml BPW (xem Phụ lục B).

9.3.2 Tiềm tăng sinh không chọn lọc

Ủ các huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng (tất cả 9 ống) (xem 9.3.1) ở 37 °C trong 18 giờ \pm 2 giờ.

9.3.3 Tăng sinh chọn lọc

Chuyển 1 ml dịch cấy thu được trong 9.3.2 vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường tăng sinh (5.2.1).

Ủ môi trường đã cấy ở 37 °C trong 24 giờ \pm 2 giờ.

9.4 Phân lập và chọn lọc để khẳng định

9.4.1 Phân lập

Lấy một vòng que cấy (6.8) từ các ống môi trường tăng sinh đã ủ ấm (xem 9.2.3) hoặc từ mỗi ống đã ủ (xem 9.3.3) cấy ria lên bề mặt đĩa chứa môi trường chọn lọc (5.2.2) và ủ các đĩa này ở 37 °C trong 24 giờ \pm 2 giờ.

9.4.2 Chọn các khuẩn lạc để khẳng định

Chọn các khuẩn lạc có màu hồng đến màu đỏ hoặc đỏ tía đặc trưng (có hoặc không có quầng tỏa).

Từ mỗi đĩa đã được ủ ấm (9.4.1) trên đó có các khuẩn lạc đặc trưng đã phát triển, chọn một khuẩn lạc đặc trưng tách biệt rõ để thử khẳng định sinh hóa (xem 9.6) sau khi được cấy truyền (xem 9.5).

Nếu có nhiều hơn một hình thái có mặt trong các khuẩn lạc, thì mỗi hình thái chọn một khuẩn lạc để cấy truyền.

Enterobacteriaceae đích thực có thể làm phai màu các khuẩn lạc của chúng hoặc của môi trường. Do đó, khi không có mặt các khuẩn lạc đặc trưng, thì chọn các khuẩn lạc hơi trắng để khẳng định.

9.5 Cấy truyền

Ria lên các đĩa thạch dinh dưỡng (5.2.3) từng khuẩn lạc đã được chọn để thử khẳng định (xem 9.4.2).

Ủ các đĩa này ở 37 °C trong 24 giờ \pm 2 giờ.

Chọn khuẩn lạc được tách biệt rõ từ các đĩa đã ủ ấm để thử khẳng định sinh hóa (xem 9.6).

9.6 Thử khẳng định sinh hóa

9.6.1 Phản ứng oxidaza

Dùng vòng cấy hoặc que cấy bằng platin/iridi hoặc đĩa thủy tinh (6.8), lấy một phần của mỗi khuẩn lạc được tách biệt rõ (9.5) và ria lên giấy lọc đã được làm ẩm bằng thuốc thử oxidaza (5.3) hoặc lên các đĩa bán sẵn. Không dùng vòng cấy hoặc que cấy bằng niken/crom.

Phép thử được coi là âm tính khi màu của giấy lọc đó không chuyển sang màu sẫm trong vòng 10 giây.

Cần theo hướng dẫn của nhà sản xuất đối với các đĩa chế tạo sẵn.

9.6.2 Thử lên men

Dùng que cấy (6.8) lấy cùng một loại khuẩn lạc đã được chọn trong 9.5 mà cho phép thử oxidaza âm tính cấy đâm sâu vào các ống chứa thạch glucoza (5.2.4).

Ủ các ống này ở 37 °C trong 24 giờ \pm 2 giờ.

Nếu màu vàng lan khắp ống thạch, thì phản ứng được coi là dương tính.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Các ống khẳng định dương tính

Nếu có bất kỳ khuẩn lạc điển hình được chọn (9.4.2) từ đĩa cấy truyền (xem 9.4.1) có phản ứng oxidaza âm tính và glucoza dương tính, thì ống nghiệm chứa mẫu cấy truyền đó được coi là dương tính với Enterobacteriaceae.

10.2 Phương pháp phát hiện

Theo các kết quả giải thích (xem 10.1), chỉ rõ sự có mặt hay không có mặt Enterobacteriaceae trong phần mẫu thử của x g hoặc x ml sản phẩm [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

10.3 Phương pháp định lượng: Tính số có xác suất lớn nhất (MPN)

Tính số có xác suất lớn nhất từ số ống dương tính tại mỗi độ pha loãng. Xem TCVN 6404 (ISO 7218), 9.4.

11 Độ chụm

Thực tế cho thấy, kỹ thuật MPN có kết quả dao động rất lớn. Vì vậy các kết quả thu được theo phương pháp này phải hết sức cẩn thận. Giới hạn tin cậy xem TCVN 6404 (ISO 7218), Phụ lục A.

12 Báo cáo thử nghiệm

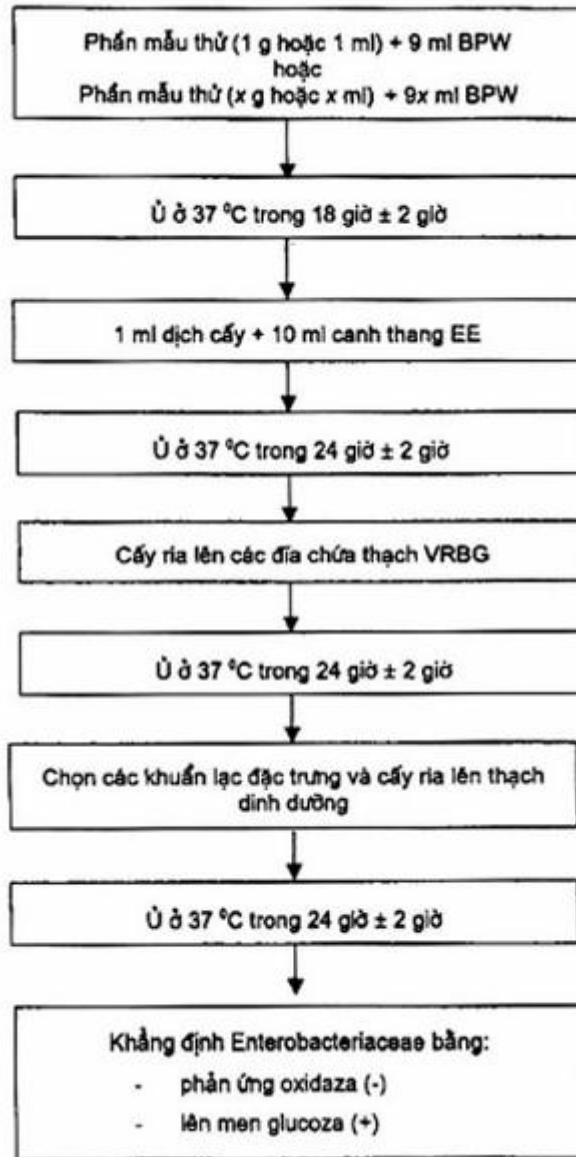
Báo cáo thử nghiệm chỉ ra:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- nhiệt độ ủ ấm đã sử dụng;
- tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- các kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(Qui định)

Sơ đồ qui trình của phương pháp phát hiện



Phụ lục B

(Qui định)

Sơ đồ qui trình đối với kỹ thuật MPN

