TCVN

T I Ê U C H U Ẩ N Q U Ố C G I A

TCVN 7903 : 2008
ISO 21871 : 2006

Xuất bản lần 1

VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG NHỎ *BACILLUS CEREUS* GIẢ ĐỊNH – PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ KỸ THUẬT TÍNH SỐ CÓ XÁC SUẤT LỚN NHẤT

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the determination of low number of presumptive Bacillus cereus – Most probable number technique and detection method

HÀ NỘI – 2008

Lời nói đầu

TCVN 7903:2008 hoàn toàn tương đương với ISO 21871:2006;

TCVN 7903:2008 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 quốc tế 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.

Xuất bản lần 1

Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp xác định số lượng nhỏ *Bacillus cereus* giả định – Phương pháp phát hiện và kỹ thuật tính số có xác suất lớn nhất

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the determination of low number of presumptive Bacillus cereus – Most probable number technique and detection method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện hoặc định lượng số lượng nhỏ *Bacillus cereus* giả định bằng kỹ thuật tính số có xác suất lớn nhất. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho:

– các sản phẩm dùng cho con người và thức ăn chăn nuôi;

– 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 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), 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.

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

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 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)

ISO/TS 11133–2, 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 sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

3.1

***Bacillus cereus* giả định** (presumptive *Bacillus cereus*)

Vi sinh vật hình thành các khuẩn lạc điển hình hoặc không điển hình trên bề mặt môi trường cấy chọn lọc và cho phản ứng khẳng định dương tính dưới các điều kiện được qui định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Đối với mục đích thử nghiệm thực tế, thì định nghĩa về *Bacillus cereus* giả định được dùng làm cơ sở cho quy trình, không mô tả riêng các chủng *Bacillus cereus*. Cụ thể, phép thử khẳng định là không đủ để phân biệt giữa *Bacillus cereus* và các loài của *Bacillus* khác có liên quan gần gũi nhưng thường ít gặp như *Bacillus weihenstephanensis, Bacillus anthracis, Bacillus thuringiensis, Bacillus mycoides* và *Bacillus pseudomycoides.*

4 Nguyên tắc

4.1 Phương pháp định lượng

4.1.1 Cấy một lượng qui định dung dịch pha loãng ban đầu (huyền phù ban đầu) vào ba ống nghiệm đựng môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc nồng độ kép [5.3.1.1 a)].

4.1.2 Cấy một lượng qui định dung dịch pha loãng ban đầu (huyền phù ban đầu) vào ba ống nghiệm đựng môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc nồng độ đơn [5.3.1.1 b)]. Sau đó, trong cùng điều kiện, cấy các lượng qui định các dung dịch pha loãng thập phân của dung dịch pha loãng ban đầu (huyền phù ban đầu) vào ba ống nghiệm khác đựng môi trường tăng sinh chọn lọc nồng độ đơn [5.3.1.1 b)].

4.1.3 Ủ ấm các ống môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc nồng độ đơn và nồng độ kép (5.3) ở 30 ^{0}C trong 48 h.

4.1.4 Nuôi cấy môi trường đặc chọn lọc (5.4 hoặc 5.5) từ môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc (5.3).

4.1.5 Ủ ấm môi trường đặc chọn lọc (5.4 hoặc 5.5) từ 18 h đến 48 h ở 37 ^{0}C (5.4) hoặc ở 30 ^{0}C (5.5) và kiểm tra các đĩa về sự có mặt của các khuẩn lạc cho thấy có các đặc trưng của *Bacillus cereus* giả định.

4.1.6 Khẳng định các khuẩn lạc nghi ngờ bằng phép thử tan máu (9.1.5.3) hoặc kiểm tra bằng kính hiển vi (9.1.5.4).

4.1.7 Tính số có xác suất lớn nhất của *Bacillus cereus* giả định trên gam hoặc mililit mẫu từ các dung dịch pha loãng đã chọn bằng cách đối chứng với các bảng số có xác suất lớn nhất.

4.2 Phương pháp phát hiện

4.2.1 Cấy một lượng qui định huyền phù ban đầu của mẫu thử vào môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc (5.3).

4.2.2 Ủ ống nghiệm ở 30 ^{0}C trong 48 h.

4.2.3 Nuôi cấy môi trường đặc chọn lọc (5.4 hoặc 5.5) từ môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc (5.3).

4.2.4 Ủ ấm môi trường đặc chọn lọc (5.4 hoặc 5.5) trong 18 h đến 48 h ở 37 ^{0}C (5.4) hoặc ở 30 ^{0}C (5.5) và kiểm tra các đĩa về sự có mặt của các khuẩn lạc cho thấy các đặc trưng của *Bacillus cereus* giả định.

4.2.5 Khẳng định các khuẩn lạc nghi ngờ bằng phép thử tan máu (9.1.5.3) hoặc kiểm tra hình thể bằng kính hiển vi (9.1.5.4).

4.2.6 Kết quả ghi là "có mặt" hoặc "không có mặt" *Bacillus cereus* giả định trên gam hoặc mililit sản phẩm.

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

5.1 Yêu cầu chung

Về thực hành các phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 (ISO 7218), ISO/TS 11133-1 và ISO/TS 11133-2.

5.2 Dịch pha loãng

Xem tất cả các phần của TCVN 6507 (ISO 6887), TCVN 6263 (ISO 8261) và bất kỳ tiêu chuẩn cụ thể nào khác liên quan đến sản phẩm cần kiểm tra.

5.3 Môi trường tăng sinh chọn lọc lỏng: Canh thang polymyxin đậu tương trypton (TSPB) (xem [1])

5.3.1 Môi trường cơ bản

5.3.1.1 Thành phần

	a) Môi trường nồng độ kép	b) Môi trường nồng độ đơn
Sản phẩm thuỷ phân casein bằng enzym	34,0 g	17,0 g
Sản phẩm thuỷ phân đậu tương bằng enzym	6,0 g	3,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g	5,0 g
Glucoza	5,0 g	2,5 g
Dikali hydro phosphat [K_2HPO_4]	5,0 g	2,5 g
Nước	1 000 ml	1 000 ml

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh trong nước bằng cách đun nóng và lắc. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 7,3 ± 0,2 ở 25 ^{0}C, nếu cần.

Phân phối môi trường theo các lượng 10 ml [môi trường nồng độ kép (5.3.1.1 a)] và 9 ml [môi trường nồng độ đơn (5.3.1.1 b)] vào các ống nghiệm có dung tích thích hợp [ví dụ: 16 mm x 160 mm (6.7)]

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) 15 min ở nhiệt độ 121 ^{0}C.

5.3.2 Dung dịch polymyxin B sulfat

5.3.2.1 Thành phần

Polymyxin B sulfat	500 000 đơn vị (tương đương với khoảng 0,05 g)
Nước	50 ml

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan polymyxin B sulfat trong nước. Lọc để khử trùng.

5.3.3 Môi trường hoàn chỉnh

Ngay trước khi sử dụng, cho 200 µl (môi trường nồng độ kép) hoặc 100 µl (môi trường nồng độ đơn) dung dịch polymyxin B sulfat (5.3.2) vào mỗi ống đựng môi trường cơ bản (5.3.1).

5.3.4 Kiểm tra hiệu năng của việc đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

Về định nghĩa tính chọn lọc và khả năng phát triển, xem ISO/TS 11133-2. Đối với việc kiểm tra hiệu quả của canh thang polymyxin đậu tương trypton xem Bảng 1.

Bảng 1 – Kiểm tra hiệu năng của canh thang polymyxin đậu tương trypton (TSPB)

Chức năng	Ủ ấm	Chủng kiểm chứng	Phương pháp kiểm chứng	Tiêu chí	Phản ứng đặc trưng
Khả năng phát triển	48 h ở 30 ^{0}C	*B.cereus* ATCC 11778 hoặc chủng giống như đã đăng ký trong các bộ sưu tập khác	Bán định lượng	≥ 10 cfu trên PEMBA hoặc MYP	Các khuẩn lạc đặc trưng trên PEMBA hoặc MYP (xem 5.4.5 hoặc 5.5.6)
Tính chọn lọc	48 h ở 30 ^{0}C	*E.coli* ATCC 25922 hoặc 8739 hoặc chủng giống như đã đăng ký trong các bộ sưu tập khác	Bán định lượng	Ức chế toàn bộ	–

5.4 Môi trường đặc chọn lọc: Thạch xanh bromothymol mannitol lòng đỏ trứng pyruvat polymyxin (PEMBA) (xem [2])

5.4.1 Môi trường cơ bản

5.4.1.1 Thành phần

Sản phẩm thuỷ phân casein bằng enzym	1,0 g
D-Mannitol	10,0 g
Natri pyruvat	10,0 g
Magie sulfat, $MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
Natri clorua	2,0 g
Dinatri hydro phosphat (Na_2HPO_4)	2,5 g
Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	0,25 g
Xanh bromothymol	0,12 g
Thạch	9 g đến 18 g[a]
Nước	940 ml

[a] Tuỳ thuộc vào sức đông của thạch.

5.4.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường cơ bản hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng và lắc.

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

Khử trùng trong nồi hấp áp lực (6.1) 15 min ở nhiệt độ 121 ^{0}C.

5.4.2 Dung dịch polymyxin B sulfat

Chuẩn bị theo 5.3.2.

5.4.3 Dung dịch nhũ tương lòng đỏ trứng

Sử dụng các quả trứng gà tươi, sạch có vỏ nguyên vẹn. Rửa sạch quả trứng bằng bàn chải và dung dịch chất tẩy rửa. Tráng rửa dưới vòi nước, ngâm 30 s trong dung dịch etanol 70 % phần thể tích rồi để khô. Sử dụng quy trình vô trùng làm vỡ quả trứng, tách riêng lòng đỏ và lòng trắng bằng cách chuyển qua chuyển lại lòng đỏ trứng từ nửa vỏ quả này sang nửa vỏ khác. Cho lòng đỏ trứng vào ống đong vô trùng và cho thêm bốn phần thể tích nước vô trùng. Chuyển vào bình cầu vô trùng (6.7) và trộn mạnh.

Làm nóng hỗn hợp 2 h trên nồi cách thuỷ (6.4) ở 47 ^{0}C. Rồi để yên từ 18 h đến 24 h ở 3 ^{0}C $\pm$ 2 ^{0}C để hình thành kết tủa.

Thu lấy phần nhũ tương nổi phía trên một cách vô trùng.

Nhũ tương có thể được bảo quản ở 3 ^{0}C $\pm$ 2 ^{0}C không quá 72 h.

Cả hai môi trường đặc chọn lọc trong tiêu chuẩn này được chuẩn bị trước từ 20 % nhũ tương lòng đỏ trứng như mô tả trong [3]. Nhũ tương lòng đỏ trứng sẵn để sử dụng có bán trên thị trường, trong một số trường hợp có nồng độ khác nhau. Có thể sử dụng các nhũ tương đó. Tuy nhiên, cần theo chỉ dẫn của nhà sản xuất, đặc biệt là hạn sử dụng. Ngoài ra, cần tuân theo các bước để đảm bảo rằng nhũ tương đó là thích hợp cho việc sử dụng làm môi trường nuôi cấy trong 5.4 và 5.5.

5.4.4 Môi trường hoàn chỉnh (thạch PEMBA)

5.4.4.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.4.1)	940 ml
Dung dịch polymyxin B sulfat (5.4.2)	10 ml
Nhũ tương lòng đỏ trứng (5.4.3)	50 ml

5.4.4.2 Chuẩn bị

Làm tan chảy và làm nguội môi trường cơ bản trên nồi cách thuỷ (6.4) ở 47 ^{0}C.

Làm nóng các thành phần khác đến cùng nhiệt độ và sau đó thêm từng phần một trong khi vẫn khuấy.

5.4.4.3 Chuẩn bị các đĩa thạch

Chuyển vào các đĩa Petri (6.9) các lượng khoảng 12,5 ml môi trường hoàn chỉnh và để cho đông đặc.

CHÚ THÍCH Lượng thường dùng là 15 ml nhưng vì các lý do kỹ thuật [2] mà thay bằng 12,5 ml.

Các đĩa này trước khi để khô, có thể bảo quản ở 3 ^{0}C $\pm$ 2 ^{0}C đến 4 ngày.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa, tốt nhất tháo bỏ nắp ra và úp bề mặt thạch xuống, đặt trong tủ sấy hoặc tủ ấm (6.2) để ở 25 ^{0}C đến 50 ^{0}C cho đến khi bề mặt thạch khô.

5.4.5 Kiểm tra hiệu năng của việc đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

Về định nghĩa tính chọn lọc và khả năng phát triển, xem ISO/TS 11133-2. Đối với việc kiểm tra hiệu năng của thạch xanh bromothymol mannitol lòng đỏ trứng pyruvat polymixin (PEMBA) xem Bảng 2.

Bảng 2 – Kiểm tra hiệu năng của thạch xanh bromothymol mannitol lòng đỏ trứng pyruvat polymixin (PEMBA)

Chức năng	Ủ ấm	Chủng kiểm chứng	Phương pháp kiểm chứng	Tiêu chí	Phản ứng đặc trưng
Khả năng phát triển	18 h đến 48 h ở 37 ^{0}C	*B.cereus* ATCC 11778 hoặc chủng giống như đã đăng ký trong các bộ sưu tập khác	Định lượng	Phát triển tốt	Các khuẩn lạc màu hồng có vòng kết tủa
Tính chọn lọc	18 h đến 48 h ở 37 ^{0}C	*E.coli* ATCC 25922 hoặc 8739 hoặc chủng giống như đã đăng ký trong các bộ sưu tập khác	Định lượng	Ức chế toàn bộ	–

5.5 Môi trường đặc chọn lọc: Thạch polymixin lòng đỏ trứng mannitol (MYP) (xem [4])

5.5.1 Môi trường cơ bản

5.5.1.1 Thành phần

Dịch chiết thịt	1,0 g
Sản phẩm thuỷ phân casein bằng enzym	10,0 g
D-Mannitol	10,0 g
Natri clorua (NaCl)	10,0 g
Đỏ phenol	0,025 g
Thạch	9 g đến 18 g[a]
Nước	900 ml
[a] Tuỳ thuộc vào sức đông của thạch.	

5.5.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng và lắc.

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

Phân phối các lượng môi trường 90 ml vào các bình cầu (6.7) có dung tích thích hợp.

Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực (6.1) ở nhiệt độ 121 ^{0}C.

5.5.2 Dung dịch polymyxin B sulfat

Chuẩn bị theo 5.3.2.

5.5.3 Dung dịch nhũ tương lòng đỏ trứng

Chuẩn bị theo 5.4.3.

5.5.4 Môi trường hoàn chỉnh (thạch MYP)

5.5.4.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.5.1)	90,0 ml
Dung dịch polymyxin B sulfat (5.5.2)	1,0 ml
Dung dịch nhũ tương lòng đỏ trứng (5.5.3)	10,0 ml

5.5.4.2 Chuẩn bị

Làm tan chảy và làm nguội môi trường cơ bản trên nồi cách thuỷ (6.4) ở 47 ^{0}C.

Làm nóng các thành phần khác đến cùng nhiệt độ và sau đó thêm từng phần một trong khi vẫn khuấy.

5.5.5 Chuẩn bị các đĩa thạch

Rót vào các đĩa Petri vô trùng (6.9) các lượng khoảng 15 ml đến 20 ml môi trường hoàn chỉnh (5.5.4) và để cho đông đặc.

Các đĩa này trước khi để khô, có thể bảo quản ở 3 ^{0}C $\pm$ 2 ^{0}C đến 4 ngày.

Ngay trước khi sử dụng, làm khô các đĩa, tốt nhất tháo bỏ nắp ra và úp bề mặt thạch xuống, đặt trong tủ sấy hoặc tủ ấm (6.2) để ở 25 ^{0}C đến 60 ^{0}C cho đến khi bề mặt thạch khô.

5.5.6 Kiểm tra hiệu năng của việc đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

Về định nghĩa tính chọn lọc và khả năng phát triển, xem ISO/TS 11133-2. Đối với việc kiểm tra hiệu năng của thạch polymixin lòng đỏ trứng mannitol (MYP) xem Bảng 3.

Bảng 3 – Kiểm tra hiệu năng của thạch polymixin lòng đỏ trứng mannitol (MYP)

Chức năng	Ủ ấm	Chủng kiểm chứng	Phương pháp kiểm chứng	Tiêu chí	Phản ứng đặc trưng
Khả năng phát triển	24 h đến 48 h ở 30 ^{0}C	*B.cereus* ATCC 11778 hoặc chủng giống như đã đang ký trong các bộ sưu tập khác	Định lượng	Phát triển tốt	Các khuẩn lạc màu ngọc lam có vòng kết tủa
Tính chọn lọc	48 h ở 30 ^{0}C	*E.coli* ATCC 25922 hoặc 8739 hoặc chủng giống như đã đang ký trong các bộ sưu tập khác	Định lượng	Ức chế toàn bộ	–

5.6 Dung dịch nhuộm màu để nhận dạng bằng kính hiển vi

5.6.1 Dung dịch oxalat xanh malachit

5.6.1.1 Thành phần

Oxalat xanh malachit	5,0 g
Nước	100 ml

5.6.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan oxalat xanh malachit trong nước.

5.6.2 Dung dịch Sudan đen B

5.6.2.1 Thành phần

Sudan đen B	0,3 g
Etanol, 70 % (phần thể tích)	100 ml

5.6.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan Sudan đen B trong etanol.

5.6.3 Xylen.

5.6.4 Dung dịch safranin

5.6.4.1 Thành phần

Safranin	0,5 g
Nước	100 ml

5.6.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan safranin trong nước.

5.7 Thạch máu cừu

5.7.1 Môi trường cơ bản

5.7.1.1 Thành phần

Sản phẩm thuỷ phân casein bằng enzym	15 g
Sản phẩm thuỷ phân đậu tương bằng enzym	5 g
Natri clorua (NaCl)	5 g
Thạch	từ 9 g đến 18 g [a]
Nước	1 000 ml
a Tuỳ thuộc vào sức đông của thạch.	

5.7.1.2 Chuẩn bị

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

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 7,3 ± 0,2 ở 25 ^{0}C, nếu cần.

Phân phối vào các bình cầu (6.7) và khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 121 ^{0}C.

5.7.2 Máu cừu đã khử sợi máu

5.7.3 Môi trường hoàn chỉnh

5.7.3.1 Thành phần

Môi trường cơ bản (5.7.1)	100 ml
Máu cừu đã khử sợi máu (5.7.2)	5 ml đến 7 ml

5.7.3.2 Chuẩn bị

Sau khi nguội đến 47 ^{0}C, bổ sung máu cừu đã khử sợi máu (5.7.2) vào môi trường cơ bản (5.7.1). Trộn đều.

Rót các phần khoảng 15 ml môi trường hoàn chỉnh (5.7.3) vào các đĩa Petri vô trùng (6.9) và để cho đông đặc.

6 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

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

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

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ sấy hoặc **tủ ấm,** được thông gió đối lưu để làm khô các đĩa thạch, có thể duy trì ở nhiệt độ từ 25 ^{0}C đến 50 ^{0}C.

6.3 Tủ ấm, có thể duy trì ở nhiệt độ ở 30 ^{0}C ± 1 ^{0}C hoặc 37 ^{0}C ± 1 ^{0}C.

6.4 Nồi cách thuỷ, có khả năng duy trì ở 47 ^{0}C ± 2 ^{0}C và khoảng 80 ^{0}C.

6.5 Que cấy vòng, bằng platin/iridi hoặc niken/crom hoặc bằng chất dẻo có đường kính khoảng 3 mm.

6.6 Máy đo pH, chính xác đến ± 0,1 đơn vị pH ở 25 ^{0}C.

6.7 Các ống nghiệm, có các kích thước với dung tích thích hợp trên 20 ml (ví dụ: 16 mm x 160 mm), và các **bình cấy** để khử trùng và bảo quản môi trường nuôi cấy.

6.8 Máy trộn vortex.

6.9 Đĩa Petri, bằng thuỷ tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100 mm hoặc 140 mm, nếu cần.

6.10 Pipet chia vạch, dung tích danh định 10 ml và 1 ml, được chia vạch tương ứng 0,5 ml và 0,1 ml.

6.11 Kính hiển vi, có vật kính dầu.

6.12 Phiến kính hiển vi bằng thuỷ tinh, khoảng 76 mm x 26 mm.

6.13 Giấy lọc lỗ nhỏ, ví dụ: loại Whatman No.41®[1].

6.14 Bình cầu, có kích thước thích hợp dùng cho phương pháp phát hiện nếu cần kiểm tra các thể tích mẫu thử lớn hơn (xem 9.2.2).

---

[1] Whatman No.41 là một ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, còn ISO không ấn định phải sử dụng chúng.

7 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

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

9 Cách tiến hành

9.1 Phương pháp định lượng

9.1.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng

Xem phần thích hợp của TCVN 6507 (ISO 6887) tùy thuộc vào sản phẩm có liên quan, hoặc TCVN 6263 (ISO 8261).

CHÚ THÍCH Để định lượng các bào tử *Baclillus cereus* giả định, cần làm nóng dung dịch pha loãng ban đầu ở 80 ^{0}C trong 10 min trên nồi cách thuỷ (6.4).

9.1.2 Cấy và ủ

Cấy vào một dãy ba ống nghiệm chứa môi trường nồng độ kép [5.3.1.1 a)] mỗi ống 10 ml dung dịch pha loãng ban đầu (huyền phù ban đầu) và trộn các phần mẫu thử với môi trường sử dụng dụng cụ trộn ống thử nghiệm (6.8). Các phần mẫu thử này tương ứng với 1 g mẫu trên ống.

Cấy vào một dãy ba ống nghiệm chứa môi trường nồng độ đơn [5.3.1.1 b)] mỗi ống 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu (huyền phù ban đầu) (bằng 0,1 g mẫu trên ống) hoặc của các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo (bằng 0,01 g, 0,001 g, ...mẫu thử trên ống) và trộn các phần mẫu thử với môi trường sử dụng dụng cụ trộn ống thử nghiệm (6.8).

Ủ các đĩa đã cấy trong tủ ấm (6.3) ở 30 ^{0}C trong 48 h $\pm$ 4 h.

9.1.3 Cấy truyền

Sau khi trộn kỹ ống nghiệm bằng dụng cụ trộn ống (6.8) dùng vòng que cấy (6.5) cấy vạch dịch cấy từ mỗi ống lên bề mặt thạch xanh bromothymol mannitol lòng đỏ trứng pyruvat polymyxin (PEMBA) (5.4) hoặc thạch polymyxin lòng đỏ trứng mannitol (MYP) (5.5).

Ủ các đĩa đã cấy cùng với nắp đậy ở 37 ^{0}C (PEMBA) hoặc ở 30 ^{0}C (MYP) trong 18 h đến 24 h. Nếu các khuẩn lạc chưa được rõ ràng thì ủ tiếp các đĩa này thêm 24 h. Nếu sử dụng PEMBA thì việc ủ thêm có thể tiến hành ở nhiệt độ phòng.

9.1.4 Chọn các đĩa

9.1.4.1 Yêu cầu chung

Sau khi ủ xong, kiểm tra các đĩa về sự có mặt của các khuẩn lạc điển hình hoặc không điển hình.

9.1.4.2 Khuẩn lạc điển hình

Trên **PEMBA**, các khuẩn lạc điển hình của *Bacillus cereus* giả định có kích thước từ 2 mm đến 5 mm, có viền ngoài không đều, rời rạc và giống hình rễ có bề mặt phản chiếu, có màu xanh ngọc lam đến xanh biếc, có thể có tâm khuẩn lạc màu xám trên nền xanh và có quầng kết tủa (phản ứng của lòng đỏ trứng) rộng đến 5 mm.

Trên **MYP,** các khuẩn lạc điển hình của *Bacillus cereus* giả định có kích thước từ 2 mm đến 5 mm và rời rạc. Chúng có màu hồng trên nền đỏ thẫm và có quầng kết tủa bao quanh (phản ứng của lòng đỏ trứng) rộng đến 5 mm.

9.1.4.3 Khuẩn lạc không điển hình

Nếu các đĩa có một lượng lớn hệ vi sinh nền mà lên men mannitol, thì độ màu đặc trưng của các khuẩn lạc và của nền có thể bị giảm hoặc không nhìn thấy được. Ngoài ra, một số chủng *Bacillus cereus* giả định chỉ phản ứng nhẹ lòng đỏ trứng hoặc hoàn toàn không phản ứng. Trong các trường hợp đó và trong mọi trường hợp nghi ngờ, thì các khuẩn lạc này cần được gửi đi để khẳng định.

9.1.5 Khẳng định

9.1.5.1 Yêu cầu chung

Các khuẩn lạc điển hình (9.1.4.2) và các khuẩn lạc không điển hình (9.1.4.3) trên PEMBA hoặc MYP phải được khẳng định bằng phép thử tan máu trên thạch máu cừu. Cách khác, các khuẩn lạc điển hình(9.1.4.2) và các khuẩn lạc không điển hình (9.1.4.3) trên PEMBA (nhưng không trên MYP) có thể được khẳng định bằng kiểm tra qua kính hiển vi.

9.1.5.2 Chọn và tinh sạch các khuẩn lạc để khẳng định

Từ mỗi đĩa đã chọn trong 9.1.4 chọn lấy ba khuẩn lạc. Nếu trên đĩa có ít hơn ba khuẩn lạc thì lấy tất cả các khuẩn lạc có mặt. Khẳng định các khuẩn lạc này theo quy định trong 9.1.5.3 hoặc 9.1.5.4.

Nếu trên các đĩa có các khuẩn lạc mọc quá dày và không thể chọn được khuẩn lạc tách biệt rõ, thì lấy từng phần khuẩn lạc từ ba điểm và cấy vạch lên các đĩa chứa môi trường đặc chọn lọc (5.4 hoặc 5.5). Ủ trong tủ ấm (6.3) ở 37 ^{0}C (PEMBA) hoặc 30 ^{0}C (MYP) trong 18 h đến 24 h. Từ mỗi đĩa chọn ít nhất một khuẩn lạc tách biệt tốt. Khẳng định các khuẩn lạc này theo 9.1.5.3 hoặc 9.1.5.4.

9.1.5.3 Khẳng định bằng phép thử tan máu trên thạch máu cừu (MYP hoặc PEMBA)

Cấy vạch các khuẩn lạc đã chọn (9.1.4.2 hoặc 9.1.4.3) từ MYP hoặc PEMBA lên bề mặt thạch máu cừu (5.7) theo cách sao cho các khuẩn lạc mọc tách biệt tốt phát triển.

Ủ ở 30 ^{0}C trong 24 h và đọc phản ứng thử tan máu.

Mỗi khuẩn lạc được bao quanh bởi quầng sáng được coi là dương tính với thử tan máu.

9.1.5.4 Khẳng định bằng kiểm tra qua kính hiển vi (PEMBA)

9.1.5.4.1 Nhuộm màu

Chuyển một số phần từ tâm của khuẩn lạc trong trường hợp các dịch cấy được 24 h hoặc từ phía ngoài nếu các khuẩn lạc được cấy lâu hơn, sử dụng vòng que cấy (6.5) sang phiến kính hiển vi đã tẩy nhờn (6.12) và nghiền trong một giọt nước nhỏ. Để khô trong không khí và cố định bằng nhiệt nóng. Sau đó nhuộm màu các bào tử trên nồi nước sôi có dung dịch xanh malachit (5.6.1). Sau 2 min, tráng rửa lượng thuốc nhuộm dư bằng nước, làm khô phiến kính và phủ lên một lớp Sudan đen B (5.6.2) để nhuộm chất béo trong tế bào. Để phản ứng xảy tra trong 15 min, rồi rửa bằng xylen (5.6.3), làm khô bằng giấy lọc (6.13) và nhuộm lại bằng dung dịch safranin (5.6.4) để nhuộm các túi bào tử. Sau 20 s, đổ lượng thuốc nhuộm dư, tráng bằng nước và để khô trong không khí.

9.1.5.4.2 Kiểm tra bằng kinh hiển vi

Kiểm tra phiến kính dưới kính hiển vi (6.11) sử dụng dầu. Thông thường các tế bào dạng trực khuẩn lớn của *Bacillus cereus* giả định được sắp xếp theo chuỗi và có chiều dài từ 4 μm đến 5 μm, rộng từ 1 μm đến 1,5 μm và chứa các lượng lớn chất béo trong tế bào được nhuộm màu đen. Các bào tử màu xanh có thể ở trung tâm hoặc ở gần cuối, nhưng chúng không bao giờ làm phình các túi bào tử màu đỏ.

9.2 Phương pháp phát hiện

9.2.1 Phần mẫu thử và huyền phù ban đầu

Xem phần thích hợp của TCVN 6507 (ISO 6887) tùy thuộc vào sản phẩm có liên quan, hoặc TCVN 6263 (ISO 8261).

9.2.2 Cấy và ủ

Cho 1 ml huyền phù ban đầu vào 9 ml canh thang nồng độ đơn TSPB (5.3) (nghĩa là 0,1 g hoặc 0,1 ml mẫu thử) hoặc 10 ml huyền phù ban đầu vào 10 ml canh thang nồng độ kép (5.3) (nghĩa là 1 g hoặc 1 ml mẫu thử . Đối với các thể tích lớn hơn của phần mẫu thử, thì chuẩn bị huyền phù ban đầu bằng cách cho xml hoặc xg vào 9x ml dịch pha loãng [xem phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887) hoặc TCVN 6263 (ISO 8261)] rồi thêm toàn bộ huyền phù ban đầu vào 90x ml canh thang nồng độ đơn TSPB (5.3) (nghĩa là thêm 5 ml hoặc 5 g mẫu vào 45 ml dịch pha loãng, và cho toàn bộ huyền phù ban đầu này vào 450 ml canh thang nồng độ đơn TSPB).

Ủ ống đã cấy (6.7) hoặc bình cầu (6.14) trong tủ ấm (6.3) ở 30 ^{0}C trong 48 h $\pm$ 4 h.

9.2.3 Cấy truyền

Sau khi trộn kỹ, nếu có thể thì sử dụng máy trộn Vortex (6.8), dùng que cấy vòng (6.5) cấy vạch dịch cấy từ ống hoặc bình lên bề mặt thạch xanh bromothymol mannitol lòng đỏ trứng pyruvat polymyxin (PEMBA) (5.4) hoặc thạch polymyxin lòng đỏ trứng mannitol (MYP) (5.5). Sau đó tiến hành theo 9.1.3, từ đoạn thứ hai.

9.2.4 Chọn các đĩa

Tiến hành theo 9.1.4.

9.2.5 Khẳng định

Tiến hành theo 9.1.5.

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Phương pháp định lượng để xác định số có xác suất lớn nhất (MPN)

Đối với mỗi độ pha loãng môi trường tăng sinh lỏng chọn lọc đã được cấy (9.1.2), ghi lại số lượng ống nghiệm có mặt *Bacillus cereus* giả định đã được khẳng định (9.1.5). Chỉ rõ các ống này là các ống dương tính.

Xem TCVN 6404 (ISO 7218) về xác định số có xác suất lớn nhất (MPN) và cách biểu thị kết quả.

10.2 Phương pháp phát hiện

Theo phần diễn giải kết quả, báo cáo có mặt hay không có mặt *Bacillus cereus* giả định trong phần mẫu thử, nêu rõ tính theo gam hay mililit mẫu thử.

11 Báo cáo thử nghiệm

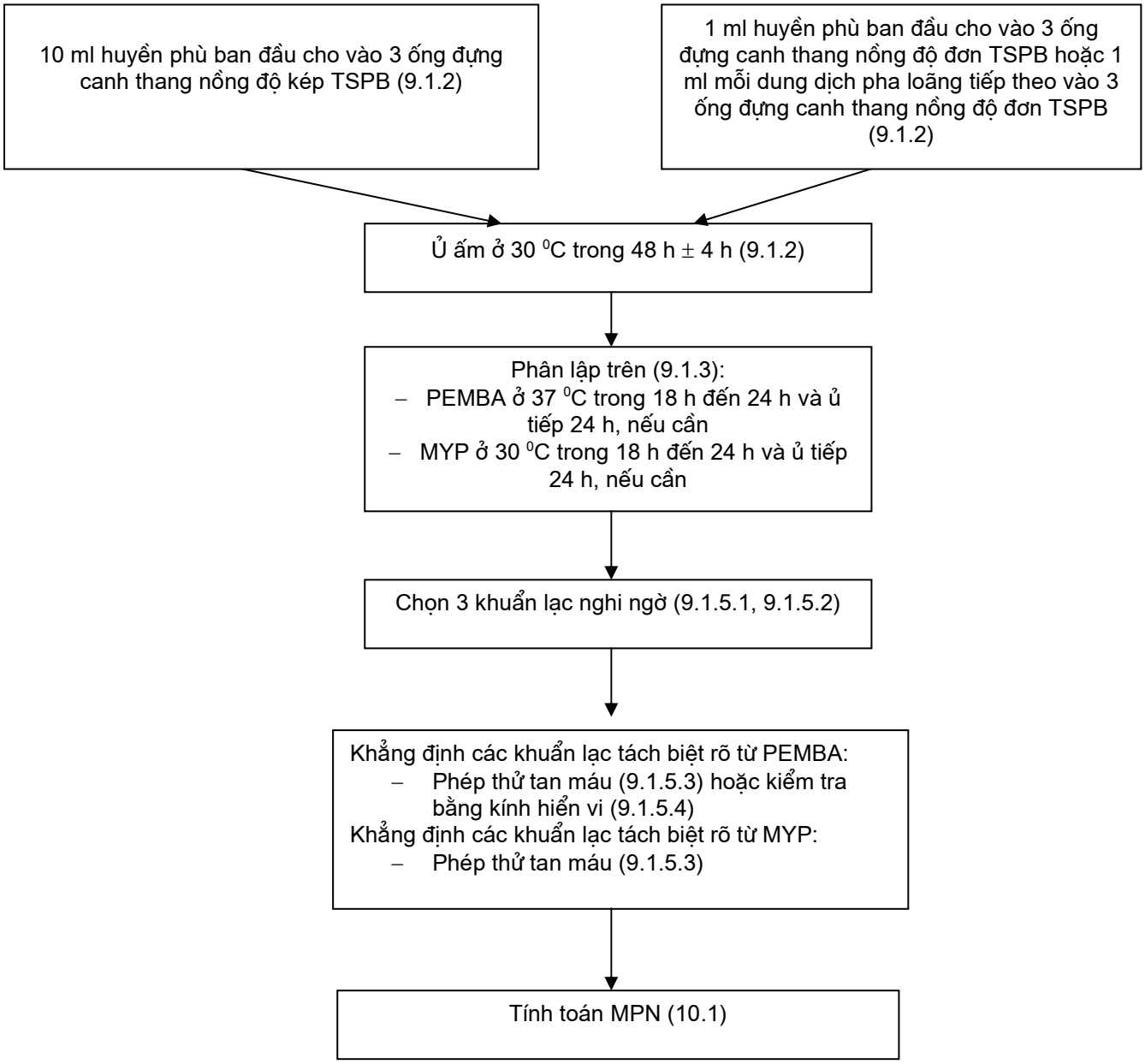
Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ phương pháp thử nghiệm đã sử dụng (phát hiện hay định lượng, môi trường đã dùng) và kết quả thử nghiệm thu được; nêu rõ phương pháp biểu thị kết quả. Báo cáo thử nghiệm cũng đề cập đến mọi chi tiết thao tác khác với quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tuỳ ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

Phụ lục A

(qui định)

Sơ đồ quy trình định lượng



Thư mục tài liệu tham khảo

[1] LANCETTE, GA. And HARMON, S.M. Enumeration and confirmation of Bacillus cereus in foods: collabarative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., **63**, 1980, pp. 581-586.

[2] HALBROOK, R. and ANDERSON, J.M.An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of Bacillus cereus in fooda. Can.J.Microbiol., **26**, 1980, pp. 753-759.

[3] BILLING, E. and LUCKHURST, E.R.A simplified method for the prepration of egg yolk media. J.Appl. Bact., **20**, 1957, p.90

[4] MOSSEL, DAA., KOOPMAN, M.J. and JONGERIUS, E. Enumeration of Bacillus cereus in foods. Appl. Microbiol., **15**, 1967, pp. 650-653.