

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 5523:1991
ST SEV 5806-86**

**SẢN PHẨM THỰC PHẨM –
PHƯƠNG PHÁP ĐẾM SỐ VI KHUẨN GÂY NHẦY
CHỦNG *LEUCONOSTOC***

Food products –

Method for enumeration of Leuconostoc slime-forming bacteria

HÀ NỘI – 2008

Lời nói đầu

TCVN 5523:1991 phù hợp với ST SEV 5806-86;

TCVN 5523:1991 do Trung tâm Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng khu vực I biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Ủy ban Khoa học Nhà nước (nay là Bộ Khoa học và Công nghệ) ban hành;

Tiêu chuẩn này được chuyển đổi năm 2008 từ Tiêu chuẩn Việt Nam cùng số hiệu thành Tiêu chuẩn Quốc gia theo quy định tại khoản 1 Điều 69 của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật và điểm a khoản 1 Điều 6 Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 1/8/2007 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật.

Sản phẩm thực phẩm –

Phương pháp đếm số vi khuẩn gây nhầy chủng *Leuconostoc*

Food products – Method for enumeration of Leuconostoc slime-forming bacteria

1 Bản chất phương pháp

Phương pháp dựa trên cơ sở cấy một lượng sản phẩm xác định (hoặc mẫu đã pha loãng) trên bề mặt môi trường thạch chọn lọc hoặc nuôi cấy màng lọc (sau khi lọc một thể tích xác định mẫu sản phẩm hoặc mẫu đã pha loãng) trên môi trường thạch chọn lọc ở nhiệt độ $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 5 ngày, đếm những khuẩn lạc điển hình gây nhầy chủng *Leuconostoc* và đếm số lượng của chúng trong 1,0 g (1 cm^3) sản phẩm (hoặc trong một thể tích xác định sản phẩm đã chọn lọc).

2 Mẫu thử

2.1 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu phân tích theo TCVN 4886:1989 (ST SEV 3013-81) và TCVN 4887:1989 (ST SEV 3014-81).

2.2 Phụ thuộc vào đặc thù của mẫu thử và số vi khuẩn gây nhầy chủng *Leuconostoc* cho phép mà sử dụng phương pháp cấy trên bề mặt môi trường hay phương pháp màng lọc.

2.3 Khối lượng (thể tích) mẫu cân dùng để chuẩn bị dung dịch gốc và để lọc qua màng lọc không nhỏ hơn $10,0\text{ g (ml)} \pm 0,1\text{ g (ml)}$.

2.4 Thể tích mẫu dùng để cấy trực tiếp trên bề mặt của môi trường nuôi dưỡng là 0,1 ml hoặc 0,2 ml mẫu hoặc mẫu pha loãng tương ứng.

3 Thiết bị

Để tiến hành thí nghiệm sử dụng thiết bị theo TCVN 4887:1989 (ST SEV 3014-84) với những bổ sung sau đây:

- Hộp petri có đường kính trong $90\text{ mm} \pm 2\text{ mm}$ hoặc $100\text{ mm} \pm 2\text{ mm}$;

TCVN 5523:1991

- Kính hiển vi;
- Phiến kính;
- Que cấy vi khuẩn;
- Tủ ấm đảm bảo giữ được nhiệt độ $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- Bình nón;
- pH-mét.

4 Thuốc thử, dung dịch và môi trường dinh dưỡng

Để tiến hành phân tích sử dụng:

- Dung dịch và thuốc thử để nhuộm Gram theo TCVN 5449:1991 (ST SEV 3833-82);
- Nước chiết thịt;
- Pepton vi sinh;
- Sacaroza;
- Natri clorua (NaCl);
- Thạch;
- Nigrozin, dịch huyền phù 10 %, chuẩn bị như sau: cân 10 g nigrozin, tạo huyền dịch bằng 100 ml nước cất, đun nóng đến $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ trên bếp cách thủy, sau đó lọc;
- Môi trường thạch nuôi dưỡng có sacaroza, chuẩn bị như sau: 3,0 g nước chiết thịt, 10,0 g pepton, 5,0 g natri clorua, 100,0 g sacaroza, 15,0 g thạch, chuyển tất cả vào 1000 ml nước cất, lắc đều theo chu kỳ, đun hỗn hợp đến sôi và tan hoàn toàn các thành phần. Làm nguội dung dịch đến $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ và điều chỉnh độ pH sao cho sau khi khử trùng đạt giá trị $7,1 \pm 0,1$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Rót vào các bình mỗi bình 100 ml hoặc vào các bình khác có dung tích tương ứng và khử trùng trong thời gian 15 min ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lắc trộn đều môi trường và rót vào các hộp petri, bảo quản ở nhiệt độ $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ không quá 14 ngày;

- Dung dịch fucsin bazơ, chuẩn bị như sau:

a) Để chuẩn bị dung dịch đặc, cân 1 g fucsin bazơ hòa tan với 10 ml cồn etylic và 100,0 ml dung dịch phenol 5 %;

b) Để chuẩn bị dung dịch fucsin bazơ pha loãng: Lấy 10 ml dung dịch fucsin bazơ đặc và thêm vào đó 90,0 ml nước cất;

- Tím tinh thể, dung dịch 1 %;
- Hydro peroxit, dung dịch 3 %.

5 Tiến hành thử nghiệm

5.1 Trình tự cấy mẫu lên trên bề mặt môi trường dinh dưỡng được thực hiện như sau: rót môi trường vào các hộp petri, sơ bộ làm khô ở 50 °C trong thời gian 30 min hoặc ở những điều kiện khác phù hợp với TCVN 5521:1991 (ST SEV 3015 -81).

Rót môi trường nuôi dưỡng vào 2 hộp petri, làm khô và cấy song song lên trên từng bề mặt môi trường 0,1 ml hoặc 0,2 ml sản phẩm hoặc sản phẩm đã pha loãng.

Sau khi cấy truyền lên môi trường, dùng que cấy thủy tinh vô trùng dàn đều mẫu trên bề mặt môi trường trong hộp petri, xem TCVN 5521:1991 (ST SEV 3015-81). Đặt mẫu đã cấy, đáy ở phía dưới vào tủ ấm và nuôi dưỡng ở nhiệt độ 22 °C ± 1 °C trong thời gian 5 ngày. Đếm sơ bộ các khuẩn lạc điển hình ở ngày thứ 3 sau khi ủ.

5.2 Lọc màng được tiến hành theo TCVN 5521:1991 (ST SEV 3051-81) sử dụng màng lọc có đường kính lỗ 0,3 µm. Sau khi lọc chuyển phần lọc lên môi trường nuôi dưỡng dày từ 4 mm đến 5 mm trong hộp petri. Ủ mẫu đã cấy, đáy ở dưới vào tủ ấm và nuôi dưỡng ở nhiệt độ 22 °C ± 1 °C trong thời gian 5 ngày. Đếm sơ bộ các khuẩn lạc điển hình ở ngày thứ 3 sau khi ủ.

5.3 Vi khuẩn gây nhầy chủng *Leuconostoc* trên bề mặt của môi trường tạo nên những khuẩn lạc hơi phồng, tròn, nhầy, sau khi trích biệt bằng kim hoặc que cấy vi khuẩn tạo thành những khuẩn lạc có hình sợi nhầy, đôi khi dài vài xentimet.

5.4 Muốn kiểm tra các khuẩn lạc đã phát triển thuộc vi khuẩn gây nhầy chủng *Leuconostoc* phải phân lập không ít hơn 5 khuẩn lạc đặc trưng. Chuẩn bị hóa chất, thuốc thử và nhuộm chúng theo Gram, theo quy định hiện hành.

Vi khuẩn gây nhầy chủng *Leuconostoc* là những khuẩn cầu Gram dương không tạo thành nha bào, có dạng hình cầu hoặc ôvan, phân bố theo từng cặp hoặc từng chuỗi, bao quanh bằng vỏ không bắt màu Gram.

5.5 Từ những khuẩn lạc đã xác định theo 5.4, muốn phát hiện vỏ vi khuẩn, chuẩn bị hóa chất, thuốc thử và nhuộm chúng theo Bury. Muốn vậy trên một phiến kính đã làm sạch mỡ và hơi nóng cho khô, trộn đều một giọt mẫu vi khuẩn với mực đen hoặc dung dịch nigrozin. Dùng phiến kính khác có mài cạnh nhanh chóng chuẩn bị phiến mỏng được đánh dấu và hơi nóng vài lần trên ngọn lửa. Phiến kính được nhuộm màu bằng tím tinh thể hoặc dung dịch fucsin bazơ pha loãng. Rửa cẩn thận trong phép làm khô tấm kính giữa các lớp giấy lọc. Nền thuốc thử nhuộm màu bằng dung dịch mực đen loãng hoặc dung dịch nigrozin. Vi khuẩn nhuộm màu đơn sắc còn vì vi khuẩn không bắt màu.

5.6 Đối với những mẫu cấy đã được kiểm tra về mặt hình thái thì nghiên cứu sự tạo thành men catalaza theo quy định hiện hành.

Các vi khuẩn gây nhầy chủng *Leuconostoc* không tạo thành men catalaza.

6 Đánh giá kết quả thí nghiệm

6.1 Kết quả được đánh giá theo từng mẫu thử riêng biệt.

6.2 Để đếm số vi khuẩn gây nhầy chủng *Leuconostoc* theo 5.1, chọn hộp nào trong đó có 15 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc điển hình đã phát triển.

6.3 Nếu trong 80 % trường hợp, nghĩa là không ít hơn 4 khuẩn lạc trên 5 khuẩn lạc đã được kiểm tra là vi khuẩn gây nhầy chủng *Leuconostoc* thì kết luận là tất cả các khuẩn lạc điển hình đã phát triển trong hộp petri là thuộc giống này. Trong các trường hợp còn lại các vi khuẩn chủng *Leuconostoc* được xác định từ tỉ lệ phần trăm của khuẩn lạc đã được khẳng định trên tổng số khuẩn lạc đặc trưng lấy để kiểm tra.

6.4 Để xác định gây nhầy chủng *Leuconostoc* theo 5.2 có thể chọn các hộp lồng petri trong đó trên màng lọc phát triển không quá 15 khuẩn lạc điển hình.

6.5 Kết quả được xử lý và tính cho 1 g (1 cm³) sản phẩm hoặc thể tích sản phẩm đã lọc được chỉ dẫn trong TCVN 5521:1991 (ST SEV 3015-81).

Phụ lục tham khảo

1. ST SEV 3013-81. Các sản phẩm thực phẩm và gia vị. Thủ tục lấy mẫu để phân tích vi sinh.
 2. ST SEV 3014-81. Các sản phẩm thực phẩm và gia vị. Chuẩn bị mẫu cho phân tích vi sinh.
 3. ST SEV 381581. Các sản phẩm thực phẩm. Nguyên tắc nuôi cấy vi sinh vật và phương pháp xử lý các kết quả thử nghiệm vi sinh.
 4. ST SEV 3833-82. Đồ hộp. Chuẩn bị dung dịch thuốc thử, phẩm màu, chất chỉ thị và môi trường dinh dưỡng sử dụng trong phân tích vi sinh.
 5. ST SEV 3834-82. Đồ hộp. Phương pháp xác định vi sinh vật kiểu khí trung nhiệt và kỵ khí không bắt buộc.
-