

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 11396:2016

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM - PHÁT HIỆN VIBRIO
VULNIFICUS - PHƯƠNG PHÁP NHẬN BIẾT AXIT BÉO CỦA
VI KHUẨN BẰNG KỸ THUẬT SẮC KÍ KHÍ**

*Microbiology of foods - Detection of vibrio vulnificus -
Gas chromatographic identification method by microbial fatty acid profile*

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 11396:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 994.06 *Vibrio vulnificus. Gas chromatographic identification method by microbial fatty acid profile;*

TCVN 11396:2016 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 thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Vi sinh vật trong thực phẩm - Phát hiện *Vibrio vulnificus* - Phương pháp nhận biết axit béo của vi khuẩn bằng kỹ thuật sắc ký khí

Microbiology of foods - Detection of Vibrio vulnificus -

Gas chromatographic identification method by microbial fatty acid profile

CẢNH BÁO – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng hoặc các giới hạn qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

Metyl tert-butyl ete và hexan là các chất dễ cháy nổ. Tránh để da tiếp xúc với các dung dịch metyl hóa (axit hóa), dung dịch xà phòng hóa và nước rửa bazo (kiềm). Nếu bị dính thì phải rửa kỹ bằng nước. Thải bỏ các dung môi rửa giải phù hợp với quy định về môi trường.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp nhận biết *Vibrio vulnificus* trong thực phẩm bằng phương pháp phân tích axit béo của vi khuẩn bằng kỹ thuật sắc ký khí.

2 Nguyên tắc

Chủng phân lập được nuôi cấy trên môi trường nhân tạo, trong các điều kiện có kiểm soát, sau đó chuyển phần sinh khối vào ống nghiệm thủy tinh có nắp vận với lớp lót Teflon, để xà phòng hóa các lipid trong tế bào vi khuẩn và giải phóng các axit béo. Axit béo được metyl hóa và các metyl este được phân tích bằng sắc ký khí (GC) trên cột mao quản silica nóng chảy với detector ion hóa ngọn lửa. Hệ thống nhận biết vi khuẩn sẽ định lượng và xác định các thành phần của axit béo và so sánh với thư viện thành phần axit béo của các sinh vật đã biết.

CHÚ THÍCH: Chủng phân lập không cần phải sàng lọc theo nhóm sinh lý hoặc sinh hóa trước khi phân tích.

3 Môi trường và thuốc thử

Chỉ sử dụng thuốc thử loại tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hoặc nước đã khử ion, nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

3.1 Nước pepton kiềm

Hòa 10 g pepton và 20 g natri clorua (NaCl) trong 1 lít nước, đun đến sôi. Phân phối các lượng 3 ml vào các ống nghiệm kích thước 13 mm x 100 mm (4.5). Hấp áp lực 10 min ở nhiệt độ 121 °C. pH cuối cùng phải bằng $8,5 \pm 0,2$.

3.2 Thạch canh thang trypticase đậu tương (TSBA)

3.2.1 Thành phần

Pepton casein	17,0 g
Pepton đậu tương	3,0 g
Natri clorua	5,0 g
Natri hydrophosphat	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Thạch	15 g

3.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trên trong 1 lít nước. Đun sôi 1 min đến 2 min. Hấp áp lực 15 min ở nhiệt độ 121 °C. pH cuối cùng phải bằng $7,3 \pm 0,2$. Phân phối các lượng 20 ml vào các đĩa Petri vô trùng kích thước 100 mm x 15 mm.

3.3 Dung môi dùng cho HPLC, hexan, metanol và methyl tert-butyl ete.

3.4 Dung dịch xà phòng hóa

Cho 150 ml nước và 150 ml metanol vào 45 g natri hydroxit đựng trong chai màu nâu dung tích 1 lít. Khuấy cho hòa tan.

3.5 Dung dịch methyl hóa

Cho 325 ml dung dịch axit clohydric 6,0 M vào 275 ml metanol đựng trong chai màu nâu dung tích 1 lít, cho đến khi tan hoàn toàn.

3.6 Dung dịch chiết

Cho 200 ml methyl tert-butyl ete vào 200 ml hexan đựng trong chai màu nâu dung tích 1 lít, vừa thêm

nước vừa khuấy.

3.7 Dung dịch rửa

Cho 450 ml nước vào 5,4 g natri hydroxit đựng trong chai màu nâu dung tích 1 lít trong khi vẫn khuấy.

3.8 Dung dịch chuẩn, các bộ kit chuẩn hiệu chuẩn 1200, ví dụ của hãng Microbial ID, Inc., Newark, DE 19711, Hoa Kỳ ¹⁾.

4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm và cụ thể như sau:

4.1 Hệ thống nhận dạng vi khuẩn (MIS), ví dụ sản phẩm của Microbial ID, Inc., 125 Sandy Dr, Newark, DE 19713, Hoa Kỳ ¹⁾.

4.2 Máy sắc ký khí (GC), được trang bị detector ion hóa ngọn lửa, bộ lấy mẫu tự động, bộ tích phân và bộ phận xử lý dữ liệu, ví dụ sản phẩm của Hewlett Packard ¹⁾.

Điều kiện hoạt động sau đây được cho là thích hợp:

- Nhiệt độ bộ bơm: 250 °C
- Tỷ lệ chia dòng: 100:1
- Nhiệt độ detector: 300 °C
- Chương trình nhiệt độ lò: 170 °C đến 270 °C với tốc độ tăng 5 °C/min
- Khí: hidro, nitơ có độ tinh khiết 99,995 % và không khí (chất lượng tốt nhất có thể).

4.3 Cột sắc ký khí, mao quản silica nóng chảy chứa 5 % methyl phenyl, liên kết chéo, kích thước 25 m x 0,2 mm với độ dày màng 0,33 µm, ví dụ: Hewlett Packard Co., Avondale, PA 19.311, Hoa Kỳ ¹⁾.

4.4 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 80 °C ± 1 °C và ở nhiệt độ từ 100 °C ± 1 °C.

4.5 Ống nghiệm thủy tinh, kích thước 13 mm x 100 mm, có nắp vặn với lớp lót Teflon.

4.6 Lọ nhỏ có nắp vặn kín, dung tích 2 ml.

4.7 Pipet Pasteur, có thể điều chỉnh các lượng từ 1 ml đến 5 ml.

4.8 Máy trộn quay.

¹⁾ Ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này được đưa ra nhằm tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định sử dụng các sản phẩm này. Có thể sử dụng các sản phẩm tương tự nếu cho kết quả tương đương.

4.9 Máy trộn Vortex.

4.10 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,01 g.

4.11 Bình định mức, dung tích 100 ml, 250 ml và 1000 ml.

4.12 Tủ ẩm, có thể duy trì ở $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.13 Que cấy vòng, 3 mm.

5 Cách tiến hành

5.1 Yêu cầu chung

Tất cả các dụng cụ thủy tinh và nắp đậy phải mới hoặc nếu sử dụng lại thì cần làm sạch cẩn thận trước khi sử dụng. Chỉ để lớp Teflon và phần thủy tinh tiếp xúc với các thuốc thử. Hơ đầu pipet Pasteur dùng một lần trên ngọn lửa, trước khi sử dụng, để hạn chế các pic lạ trong phân tích sắc ký. Tắt lửa và các nguồn nhiệt trước khi sử dụng các thuốc thử. Xử lý các thuốc thử trong tủ hút. Việc kéo dài thời gian hoặc tăng nhiệt độ trong quá trình chiết có thể làm phân hủy các hợp chất cyclopropan và thay đổi các dạng axit béo.

5.2 Chuẩn bị các chủng phân lập, sử dụng chủng mới phân lập hoặc chủng phân lập đã được làm đông lạnh (bảo quản ở $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong nước pepton kiềm (3.1) có chứa 10 % glycerol). Thực hiện bước sau đây trước khi bắt đầu phân tích:

5.2.1 Cấy các chủng phân lập vào nước pepton kiềm (3.1) và ủ 24 h \pm 2 h trong tủ ẩm (4.12) ở $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.2 Cấy vạch trên TSBA (3.2), sử dụng kỹ thuật cấy vạch góc một phần tư:

- a) Dùng que cấy vòng (4.13) lấy đầy canh khuẩn, ria đều lên mặt thạch ở góc một phần tư thứ nhất.
- b) Nghiêng que cấy 90° , chạm hai lần vào góc một phần tư thứ nhất và ria các đường song song cho đến hết phần góc một phần tư thứ hai mà không chạm vào góc một phần tư thứ nhất nữa.
- c) Hơ que cấy trên ngọn lửa và để nguội. Dùng đầu que cấy kéo từ góc một phần tư thứ hai ra hai lần và ria các đường song song đến hết góc một phần tư thứ ba mà không chạm vào góc một phần tư thứ hai nữa.
- d) Lật ngược que cấy (xoay 180°), dùng cạnh khác của đầu que cấy kéo qua góc một phần tư thứ ba hai lần và ria các đường song song đến hết góc một phần tư thứ tư mà không chạm vào góc một phần tư thứ ba nữa.

5.2.3 Ủ các đĩa 24 h \pm 2 h trong tủ ẩm (4.12) ở nhiệt độ $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chuyển một que cấy vòng chứa đầy sinh khối vi khuẩn (khoảng 40 mg) xuống đáy ống nghiệm thủy tinh (4.5).

LƯU Ý: Không lấy quá ít hoặc quá nhiều sinh khối vi khuẩn khi chuẩn bị các axit béo vì có thể làm cho kết quả thu được quá ít hoặc quá nhiều axit béo. Việc sử dụng môi trường và điều kiện nuôi cấy khác có thể gây ra các biến đổi về hình thái khuẩn lạc và sẽ cho kết quả không chính xác.

Nếu không sử dụng ngay thì bảo quản vi khuẩn bằng cách đông khô.

5.3 Chuẩn bị các axit béo của vi khuẩn

CHÚ Ý: Nếu thực hiện sai lệch thì kết quả sẽ kém chính xác.

5.3.1 Xà phòng hóa

Cho 1 ml dung dịch xà phòng hóa (3.4) vào ống đựng sinh khối vi khuẩn (5.2.3). Trộn kỹ huyền phù tế bào 5 s đến 10 s trên máy trộn Vortex (4.9) và làm nóng 5 min trong nồi cách thủy 100 °C (4.4) để dung dịch giải tế bào và giải phóng các axit béo ra khỏi các tế bào lipid. Trộn trên máy trộn Vortex (4.9) và làm nóng 25 min trong nồi cách thủy 100 °C, làm nguội ống dưới vòi nước lạnh. Tiến hành ngay bước metyl hóa (5.3.2).

5.3.2 Metyl hóa

Cho ngay 2 ml dung dịch metyl hóa (3.5) vào ống nghiệm (5.3.1), trộn 5 s đến 10 s trên máy trộn Vortex (4.9) và làm nóng 10 min ở nhiệt độ 80 °C trong nồi cách thủy (4.4), làm nguội ống dưới vòi nước lạnh. Tiến hành ngay bước chiết tiếp theo (5.3.3).

5.3.3 Chiết

Cho 1,25 ml dung dịch chiết (3.6) vào ống nghiệm (5.3.2) để chiết metyl este của axit béo (FAME). Trộn 10 min trên máy trộn quay (4.8). Loại bỏ pha nước phía dưới bằng pipet (4.7). Sau khi chiết và loại bỏ pha nước, bảo quản pha hữu cơ trong tủ lạnh qua đêm.

5.3.4 Rửa pha hữu cơ

Rửa pha hữu cơ 5 min với 3 ml dung dịch rửa (3.7), bằng cách trộn trên máy trộn quay (4.8). Chuyển hai phần ba lớp hữu cơ phía trên sang lọ nhỏ 2 ml (4.6) để phân tích sắc ký khí.

CHÚ Ý: Đảm bảo rằng không có dung dịch rửa trong lớp hữu cơ được chuyển. Lấy ngay lớp hữu cơ, không giữ lâu các phần thử nghiệm trong bước rửa.

5.4 Chuẩn hiệu chuẩn

Chuẩn hiệu chuẩn được kiểm soát bởi phần mềm máy tính MIS (4.1) tích hợp vào hệ thống sắc ký mao quản. Máy tính theo dõi dữ liệu hiệu chuẩn và sử dụng dữ liệu để xác định các pic axit béo trong từng dịch chiết. Phần mềm máy tính kiểm tra kết quả của từng lần bơm hiệu chuẩn theo bảng pic đã

định, trong đó có thời gian lưu dự kiến và số lượng đối với mỗi pic trong phân tích hiệu chuẩn. Để hiệu chuẩn số lượng và bù đối với sự khác biệt pic giữa các axit béo có điểm sôi thấp và điểm sôi cao, sử dụng chuỗi mạch thẳng C9:0 đến C20:0 các methyl este của axit béo. Bổ sung 5 dung dịch axit hydroxy vào chuẩn hiệu chuẩn để phát hiện các lỗi do lớp lót của cổng tiêm mẫu hoặc cột bị suy giảm chất lượng làm cho hình dạng pic bị kém (các pic hydroxy kéo dài ra) hoặc hao hụt diện tích pic axit hydroxy thực tế. Các sai lệch so với các giá trị dự kiến có thể dẫn đến hiệu chỉnh sai.

Sử dụng các thời gian lưu của các FAME trong chất chuẩn hiệu chuẩn để tính các giá trị chiều dài chuỗi tương đương (ECL) được dùng để định danh các pic trong các phép phân tích tiếp theo. MIS tính dữ liệu phân tích hiệu chuẩn bị chệch so với thời gian lưu dự kiến và báo cáo độ lệch chuẩn của sai số theo căn bậc hai của trung bình bình phương (RMS). MIS lặp lại phép phân tích hiệu chuẩn nếu giá trị RMS quá cao. Nếu hệ thống hiệu chuẩn sai sau 2 lần liên tiếp, thì thông báo lỗi được lặp lại và kết quả phân tích mẫu bị hủy bỏ.

Nếu hiệu năng MIS giảm đến mức không thể chấp nhận được, thì có thể xuất hiện pic nhỏ 10,914 ECL, điều này cho thấy sự phân hủy của pic hydroxyl 14:0-3 thành aldehyt 12:0. Pic hydroxyl 14:0-3 có thể giảm xuống dưới 1,00 % hoặc pic hydroxyl 16:0-2 có thể giảm xuống dưới 2,05 %. Nếu xuất hiện các trường hợp này, cần khắc phục bằng cách thay thế lớp lót cổng bơm và màng ngăn, khi khắc phục không được thì thay cột mao quản.

5.5 Hiệu chuẩn cột

Điều chỉnh áp lực đầu vào cột và nhiệt độ hiệu chuẩn lò để bù cho sự thay đổi nhỏ giữa các cột mới và độ trôi qua quá trình sử dụng lâu dài. Sử dụng quy trình nêu trong sổ tay hướng dẫn sử dụng MIS để hiệu chuẩn hệ thống. ECL của các axit béo hydroxy phân cực trên các ECL dự kiến sẽ tạo hệ thống giống với các ECL trong dữ liệu máy tính. Điều này cho phép độ trôi tối đa trong khi nhận biết chính xác các pic.

ECL giữa hai axit béo hydroxyl dao động + 0,0012 khi thay đổi nhiệt độ rửa giải pic là +1 °C. Pic hydroxy đầu tiên (hydroxy 10: 0-2) bị ảnh hưởng nhiều nhất bởi nhiệt độ khởi động và có thể được điều chỉnh bằng cách chỉnh nhiệt độ hiệu chuẩn lò. Pic hydroxy (16: 0-2 hydroxy) rửa giải sau cùng bị ảnh hưởng nhiều nhất bởi vận tốc tuyến tính (dòng) của khí mang và có thể được chỉnh bằng áp lực đầu cột. Xem sổ tay hướng dẫn sử dụng MIS về mô tả điều chỉnh đồng thời áp lực và nhiệt độ để hiệu chỉnh chính xác cột.

Nếu ECL trung bình của pic hydroxy 10:0-2 hoặc pic hydroxy 16:0-2 lệch trên 0,002 so với giá trị đích (tương ứng 11,156 và 17,234) thì lặp lại quy trình vài lần điều chỉnh áp suất hoặc nhiệt độ để thu được giá trị đích. Các giá trị đích ECL đối với các axit hydroxy là nhỏ hơn giá trị của bảng định danh pic 0,001 đơn vị. Điều này làm cho các axit hydroxy rửa giải sớm hơn giá trị ECL 0,001 đơn vị.

5.6 Phân tích

Bơm 2 ml mẫu thử từ lọ nhỏ thu được từ 5.3.4. Cứ sau mười lần bơm mẫu thử thì bơm chất chuẩn hiệu chuẩn. Thời gian lưu của các FAME đã biết được sử dụng để tính ECL của các axit béo có trong mẫu thử. ECL bằng với số nguyên tử cacbon của axit béo bão hòa mạch thẳng hoặc được tính bằng cách nội suy từ công thức toán học đối với các axit béo khác. Số lượng các axit béo của tế bào (CFA) phát hiện được, được tính theo phần trăm của tổng CFA. Cuối mỗi lần phân tích sẽ hiển thị tên và số lượng của các CFA. Chỉ số tương tự (SI, trong phạm vi 0,000 đến 1,000) tính được, biểu thị sự giống nhau giữa thành phần axit béo phân lập cần xác định với thành phần chất phân lập có trong dữ liệu máy tính.

Các axit béo được chiết ra khỏi phần mẫu thử sẽ được định lượng tự động và được nhận biết bằng MIS, sau đó được so sánh với dữ liệu các chủng đối chứng. Các chủng phân lập chưa biết được nhận biết đến chi và loài.

Chất chiết được đựng trong các lọ nhỏ đậy kín dùng cho sắc ký, giữ trong tủ lạnh được vài tuần.

5.7 Diễn giải kết quả

Các chủng phân lập được nhận biết bởi thư viện ATCC như *V. vulnificus* với SI > 0,500 được xếp vào dạng nhận biết rất tốt. Các chủng phân lập được nhận biết là *V. vulnificus* với SI < 0,500 nhưng lớn hơn 0,100 được xếp vào dạng nhận biết tốt. Các chủng phân lập được nhận biết là *V. vulnificus* chỉ khi được nhận biết tốt. Các chủng phân lập không đáp ứng được các tiêu chí trên là âm tính. Lượng các axit béo tương đối có trong phần thử nghiệm từ 80 000 đến 300 000 mV/s. Nếu tổng diện tích < 80 000 mV/s, thì cô đặc phần mẫu thử và thực hiện lại phép phân tích. Nếu tổng số diện tích > 300 000 mV/s, thì pha loãng mẫu thử và phân tích lại.

LƯU Ý: Tránh lấy quá ít hoặc quá nhiều dịch cấy trong quá trình chuẩn bị axit béo.

6 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm ít nhất phải bao gồm các thông tin sau đây:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- c) các kết quả và các đơn vị biểu thị kết quả;
- d) ngày kết thúc thử nghiệm;
- e) mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A
(Tham khảo)

Kết quả thử nghiệm liên phòng về việc nhận biết *Vibrio vulnificus* bằng axit béo

Bảng A.1 – Kết quả thử nghiệm liên phòng về việc nhận biết *Vibrio vulnificus* bằng axit béo

Chỉ thị	Giá trị	Sai số	Giới hạn tin cậy 95 %	
			Giá trị	Dạng
Độ nhạy ^a	0,872	0,0436	0,793	Thấp
Độ đặc hiệu ^b	0,982	0,0182	0,949	Thấp
Dương tính giả ^c	0,010	0,0097	0,028	Cao
Âm tính giả ^d	0,206	0,0484	0,293	Cao

^a Phần dương tính đã biết được thử nghiệm là dương tính;
^b Phần âm tính đã biết được thử nghiệm là âm tính;
^c Phần mẫu thử âm tính nhưng được thử nghiệm là dương tính;
^d Phần mẫu thử dương tính nhưng được thử nghiệm là âm tính.