

TCVN 5375-1991

SẢN PHẨM ONG

Yêu cầu vi sinh và phương pháp kiểm tra

LỜI NÓI ĐẦU

TCVN 5375-1991 do Cục Chăn nuôi và Thú y , Bộ Nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn-Đo lường Chất lượng đề nghị và được Ủy ban Khoa học Nhà nước ban hành theo quyết định số 343/QĐ ngày 11 tháng 6 năm 1991.

SẢN PHẨM ONG

Yêu cầu vi sinh và phương pháp
kiểm tra

Honey- Bee Products. Micro biological
requirements and examination methods

Tiêu chuẩn này qui định những yêu cầu vi sinh và phương pháp kiểm tra, áp dụng cho các sản phẩm ong, bao gồm mật ong, phấn hoa và sữa chúa tự nhiên.

1. Yêu cầu vi sinh.

Yêu cầu vi sinh vật đối với sản phẩm ong được trình bày trong bảng sau:

! TT !	! Tên chỉ tiêu !	! Mức, số khuẩn lạc trong 1 sản phẩm !
! 1 !	! Tổng số vi khuẩn hiếu khí không lớn hơn !	! 15.000 !
! 2 !	! E. Coli !	! Không cho phép có !
! 3 !	! Vi khuẩn kỵ khí sinh H ₂ S !	! -nt- !
! 4 !	! Salmonella !	! -nt- !
! 5 !	! Staphylococcus aureus !	! -nt- !
! 6 !	! Nấm mốc : !	! !
! !	! - Mật ong và sữa chúa tự nhiên !	! Không cho phép !
! !	! - Phấn hoa: không lớn hơn !	! 100 !
! 7 !	! Nấm men: không lớn hơn !	! 1.000 !

2. Phương pháp kiểm tra:

2.1. Lấy mẫu: theo TCVN 5261-90

2.2. Xử lý mẫu:

Tại phòng thí nghiệm, mẫu sản phẩm ong được đưa vào buồng vô trùng và pha loãng trực tiếp bằng cách dùng hai bình cầu, cho vào mỗi

bình 10 gam($\pm 0,1$ gam)mẫu sản phẩm cần kiểm tra(với mẫu là phần hou thì có thể pha loãng bằng cách dùng viên bi thủy tinh),sau đó thêm vào mỗi bình 90ml nước cất và lắc cho tan hoàn toàn(ta thu được nồng độ pha loãng cơ sở là 1/10).Đem một trong 2 bình trên đun sôi 10 phút,sau đó bù lại phần nước đã bay hơi cho đủ 100ml dung dịch.Bình này dùng để kiểm tra sự có mặt của các vi khuẩn kỵ khí.

Từ nồng độ pha loãng 1/10,tiếp tục pha loãng để có một nồng độ pha loãng nữa bằng cách:dùng pipét vô trùng hút 1ml dung dịch ban đầu sang ống nghiệm thứ 2,cho thêm 9ml nước cất vào và trộn đều.Như vậy ta thu được nồng độ pha loãng 1/100.

Bằng phương pháp trên,tiếp tục pha loãng để có được các nồng độ tiếp theo là 1/1.000;1/10.000...

Chú thích:trong trường hợp kiểm tra đánh giá chất lượng sản phẩm,phải dùng 2 dãy môi trường,mỗi dãy gồm 2 ống nghiệm hoặc 2 đĩa petri môi trường cho 1 nồng độ pha loãng.

2.3. Thiết bị,dụng cụ:

- Thiết bị xử lý không khí(buồng vô trùng,đèn tử ngoại hoặc tủ Laminar);

- Máy sấy khô,có thể duy trì ở $165-170^{\circ}\text{C}$;

- Bếp cách thủy(Bain Marie);

- Máy hấp uốt(Antoclave),có thể duy trì ở $121 \pm 2^{\circ}\text{C}$;

- Tủ ấm;

- Máy đo pH;

- Tủ lạnh;

- Cân kỹ thuật;

- Kính hiển vi hai mắt;

- Kính lúp;

- Các loại que cấy vi trùng và nấm mốc;

- Cốc đong 50;100;250;1.000ml;

- Bình cầu đáy bằng 100 ; 250;500ml;

- Ống nghiệm thủy tinh tiêu chuẩn;

- Đĩa petri;

- Pipet các loại 1;2;5ml;

- Đèn cồn;

2.4. Hoá chất và môi trường:

- Natri hydroxyt, dung dịch 1N;
- Axit clohydric, dung dịch 1N;
- Môi trường thạch thường;
- Môi trường canh thang gan;
- Môi trường thạch Sabouraud dextroza;
- Môi trường thạch Czapek-dox;
- Môi trường Rose-bengal cloramphenicol;
- Dung dịch fucxin 4%;

Chú thích:

+ Vật liệu của các loại dụng cụ thủy tinh phải đảm bảo chịu nhiệt độ trong trường hợp hấp sấy khử trùng nhiều lần không bị nứt, vỡ.

+ Tất cả các loại dụng cụ thủy tinh trước khi sử dụng phải được hấp khử trùng bằng nồi hấp ướt ở 121°C trong 20 phút hoặc sấy khử trùng bằng tủ sấy ở 165-170°C trong 30 phút.

+ Điều chỉnh độ pH của môi trường bằng dung dịch natrihydroxyt 1N hoặc dung dịch axit clohydric 1N.

2.5. Tiến hành kiểm tra:

Việc kiểm tra các chỉ tiêu vi sinh vật đối với sản phẩm ong được thực hiện trong buồng vô trùng hoặc trên tủ Laminar, nhằm đảm bảo cho mẫu không bị nhiễm khuẩn.

2.5.1. Kiểm tra tổng số vi khuẩn hiếu khí:

Từ mỗi nồng độ pha loãng của mẫu sản phẩm ong cần kiểm tra (điều 2.2), dùng pipet vô trùng hút 1ml và nhỏ đều vào các đĩa petri, đổ thêm vào mỗi đĩa một lượng 15 ml môi trường thạch thường đã được hâm nóng ở 45°C. Để yên các đĩa petri cho thạch đông cứng lại và ủ trong tủ ấm ở 37°C trong 24 đến 48 giờ, sau đó lấy ra đếm số khuẩn lạc trong các đĩa petri. Tính tổng số (X) vi khuẩn hiếu khí có trong 1gam sản phẩm theo công thức:

$$X = \frac{\text{Số khuẩn lạc trung bình đếm được}}{1} \times \frac{1}{\text{Khối lượng mẫu thử}} \times \frac{1}{\text{Bội số pha loãng}}$$

2.5.2. Kiểm tra E. Coli

TCVN 5375-1991

Theo TCVN 5155-90

2.5.3. Kiểm tra *Staphylococcus aureus*:

Theo TCVN 4830-89(ISO 6888-1983)

2.5.4. Kiểm tra vi khuẩn kỵ khí sinh H_2S :

Dùng pipet vô trùng hút 2 ml dung dịch mẫu sản phẩm ong cần kiểm tra(trong bình đã đun sôi và pha loãng ở các nồng độ khác nhau). Cấy vào 3 ống môi trường canh thang gan(đã gạn bỏ nước). Để các ống vào bếp cách thủy ở $80^{\circ}C$ trong 15 phút, sau đó lấy ra, đổ lên phía trên các ống này mỗi ống một lượng là 15 ml thạch(đã hâm nóng ở $45^{\circ}C$) và làm nguội nhanh bằng cách để tất cả vào tủ lạnh hoặc ngâm vào nước lạnh. Ủ các ống trên trong tủ ấm ở $37^{\circ}C$ trong 72 giờ.

Đánh giá kết quả:

Kết quả dương tính được xác định khi các ống trên có hiện tượng sinh khí H_2S làm nứt thạch ở phía trên. Môi trường nuôi cấy biến màu đen và có mùi hôi thối.

2.5.5. Kiểm tra *Salmonella*:

Theo TCVN 4829-89(ISO 6579-1981)

2.5.6. Nấm mốc và nấm men:

Dùng pipet vô trùng hút 1 ml dung dịch mẫu cần kiểm tra(đã pha loãng ở các nồng độ khác nhau), nhỏ đều vào các đĩa petri(d :90 x 120mm). Đổ lên phía trên một lượng 15ml môi trường thạch Savouraud dextroza(pH:4,5-5,0) đã hâm nóng đến $45^{\circ}C$ và để yên các đĩa trên đến khi thạch đông, lật ngược đĩa petri và ủ trong tủ ấm ở $26-30^{\circ}C$ trong 24 đến 48 giờ.

Đánh giá kết quả: sau 48 giờ nuôi cấy, lấy các đĩa petri ra và dùng kính lúp phát hiện và đếm số bào tử nấm mốc và nấm men mọc trên các đĩa môi trường. Căn cứ vào màu sắc của các bào tử, kết hợp với việc phiết kính nhuộm bằng dung dịch fucxin 4% và soi dưới kính hiển vi xem đặc điểm hình thái và cấu tạo để nhận dạng các chủng nấm sinh độc tố.

Chú thích: Có thể dùng môi trường thạch Czapek-dox hoặc thạch Rose-bengalchloramphenicol để tiếp tục phân lập, xác định các chủng nấm mốc hoặc nấm men gây bệnh.

CÁC LOẠI MÔI TRƯỜNG

1. Môi trường thạch thường:

- Cao thịt ; 5,0g
- Pepton ; 15,0g
- Natri clorua ; 5,0g
- Thạch ; 25,0g
- Nước cất vừa đủ ; 1.000ml

Điều chỉnh pH; 7,4- 7,6, sau đó hấp khử trùng bằng nồi hấp ướ ở 121°C trong 30 phút.

2. Môi trường canh thang gan:

- Thịt bò xay nhỏ ; 180,0g
- Gan bò xay ; 500,0g
- Axit clohydric 37% ; 75,0 ml
- Pepsin vyang hiệu giá 200 : 10g
- Nước cất vừa đủ ; 9.000ml

Ư các thành phần trên trong nồi men, giữ ở nhiệt độ 40-50°C trong 18-24 giờ, sau đó đun trong 30 phút ở nhiệt độ 80°C, điều chỉnh pH; 7,4, lọc và hấp khử trùng trong nồi hấp ướ ở 121°C trong 30 phút.

3. Môi trường thạch Sabouraud dextroza:

- Mycological pepton ; 10,0 g
- Dextroza ; 40,0 g
- Thạch ; 15,0 g
- Nước cất vừa đủ ; 1.000 ml

Điều chỉnh pH: 5,2- 5,5, sau đó lắ cho tan hoàn toàn và hấp khử trùng bằng nồi hấp ướ ở 121°C trong 30 phút

4. Môi trường thạch Czapek - dox ;

- Sacaroza ; 30,0 g
- Natri nitrat ; 2,0 g
- Natri clorua ; 0,5 g

- Magie glyxerophotphat ; 0,5g
- Sắt sunphat ; 0,01 g
- Kali dihydrophotphat ; 1,0 g
- Thạch ; 20,0 g
- Nước cất vừa đủ ; 1.000 ml

Điều chỉnh pH ; $6,8 \pm 0,2$, và đun sôi cho tan hoàn toàn sau đó hấp khử trùng bằng nồi hấp ước ở 121°C trong 30 phút.

5. Môi trường thạch Rose-bengal cloramphenicol:

- Mycological pepton ; 5,0 g
- Dextroza ; 10,0 g
- Dikali hydrophotphat ; 1,0 g
- Magie sunphat ; 0,5 g
- Rose bengal ; 0,05 g
- Thạch ; 15,5 g
- Nước cất vừa đủ ; 1.000 ml

Điều chỉnh pH; $7,2 \pm 0,2$, đun sôi cho tan toàn bộ, sau đó hấp khử trùng bằng nồi hấp ước ở 121°C trong 30 phút. Để nguội còn 50°C cho thêm 100 mg cloramphenicol và lắc nhẹ cho hoà tan.