

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 5522:1991**

**ST SEV 5805-86**

**SẢN PHẨM THỰC PHẨM – PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH  
SỐ VI KHUẨN CHỦNG *LACTOBACILLUS***

*Food products –*

*Method for enumeration of Lactobacillus bacteria*

**HÀ NỘI – 2008**

## Lời nói đầu

TCVN 5522:1991 phù hợp với ST SEV 5805-86;

TCVN 5522:1991 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 xác định số vi khuẩn chủng *Lactobacillus*

*Food products – Method for enumeration of Lactobacillus bacteria*

### 1 Bản chất của phương pháp

Phương pháp dựa trên việc nuôi cấy một lượng sản phẩm nhất định hoặc mẫu pha loãng của nó trong môi trường thạch thường hoặc môi trường dinh dưỡng lỏng, nuôi dưỡng các mẫu cấy này ở  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 5 ngày hoặc ở  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 3 ngày, đếm các khuẩn lạc điển hình và tính số lượng chúng trong 1 g ( $\text{cm}^3$ ) trong môi trường chọn lọc rắn hoặc đếm số có xác suất cao nhất của chúng trong môi trường lỏng.

### 2 Lấy mẫu

**2.1** Mẫu để phân tích được lấy và chuẩn bị theo TCVN 4887:1989 (ST SEV 3014-81) và TCVN 5525:1991 (ST SEV 3015-81).

**2.2** Khối lượng (thể tích) mẫu cân dùng để chuẩn bị mẫu pha loãng ban đầu phải lấy không ít hơn  $10,0\text{ g (cm}^3) \pm 0,1\text{ g (cm}^3)$ , còn để cấy trực tiếp trong môi trường dinh dưỡng, không ít hơn  $1\text{ g (cm}^3)$ .

### 3 Dụng cụ, thiết bị

Các dụng cụ và thiết bị qui định trong TCVN 4887:1989 (ST SEV 3014-81) được sử dụng để phân tích, ngoài ra thêm:

- Nồi hấp để tiệt trùng các môi trường dinh dưỡng;
- Tủ ấm, đảm bảo giữ nhiệt ở  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  và  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Tủ cấy kỵ khí;
- Bơm chân không;
- Hộp cấy vi sinh có đường kính trong  $90\text{ mm} \pm 2\text{ mm}$  hoặc  $100\text{ mm} \pm 2\text{ mm}$ ;

## **TCVN 5522:1991**

- Pipet dung tích 1 ml và 10 ml;
- Kính hiển vi;
- Phiến kính thủy tinh;
- Giá để ống nghiệm;
- Que cấy vi sinh.

### **4 Thuốc thử, dung dịch và môi trường dinh dưỡng**

- Pepton.
- Tripton.
- Dịch chiết nấm men.
- D-glucoza.
- Tvin-80.
- Natri axetat.
- Amoni xitrat.
- Triamoni xitrat.
- Axit axetic băng.
- Kali dihydro phosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).
- Dikali hydro phosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).
- Magie sulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).
- Mangan sulfat ( $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).
- Mangan sulfat ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).
- Sắt sulfat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).
- Natri clorua ( $\text{NaCl}$ ).
- Thạch dùng cho vi sinh.
- Các dung dịch để nhuộm màu theo Gram, theo TCVN 5449:1991 (ST SEV 3833-82).
- Hydro peroxit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dung dịch 3 %.
- Paraphin lỏng.

- Dung dịch muối-pepton theo TCVN 4887:1989 (ST SEV 3014-81).
- Axit socbic, dung dịch kiểm, chuẩn bị như sau:

Hòa tan 1,0 g axit socbic trong 100 ml dung dịch natri hydroxit 1 N. Dung dịch nhận được được tiệt trùng bằng phương pháp lọc theo TCVN 4887:1989 (ST SEV 3014-81).

- Môi trường Rogoz lỏng, chuẩn bị như sau: cho vào bình định mức dung tích 1 l: 10,0 g tripton; 5,0 g dịch chiết nấm men; 20,0 g D-glucoza; 1,0 ml tvin-80; 6,0 g kali dihydro phosphat; 2,0 g amoni xitrat; 25,0 g natri axetat; 1,32 ml axit axetat băng; 0,575 g magie sulfat; 0,12 g mangan sulfat ( $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ ); 0,034 g sắt sulfat, thêm nước cất đến vạch định mức. Hòa tan các chất bằng cách đun trên bếp cách thủy tinh và điều chỉnh sao cho sau khi tiệt trùng pH của dung dịch đạt  $5,4 \pm 0,1$  ở  $25^\circ C$ . Rót môi trường vào các ống nghiệm đã tiệt trùng theo từng lượng 10 ml và tiệt trùng trong nồi hấp ở  $121^\circ C \pm 1^\circ C$  trong 15 min. Các ống nghiệm đựng môi trường được bảo quản ở  $4^\circ C \pm 1^\circ C$ , không quá 30 ngày.

- Môi trường thạch Rogoz: chuẩn bị như môi trường Rogoz lỏng và thêm từ 15 g đến 18 g thạch. Sau khi hòa tan các thành phần, rót môi trường vào các bình đã tiệt trùng và tiệt trùng trong nồi hấp ở  $121^\circ C \pm 1^\circ C$  trong 15 min. Môi trường đã chuẩn bị được bảo quản ở  $4^\circ C \pm 1^\circ C$  không quá 30 ngày.

- Môi trường MRS lỏng, chuẩn bị như sau: cho vào bình định mức dung tích 1 l: 10,0 g pepton; 4,0 g chất dịch chiết nấm men; 20,0 g glucoza; 8,0 g nước thịt; 1,0  $cm^3$  tvin-80; 2,0 g kali dihydro phosphat; 5,0 g natri axetat; 2,0 g triamoni xitrat; 0,2 g magie sulfat; 0,05 g mangan sulfat ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ), thêm nước cất đến vạch định mức, hòa tan các chất bằng cách đun nhẹ trên bếp cách thủy và điều chỉnh sao cho sau khi tiệt trùng pH của dung dịch là  $6,2 \pm 0,1$  ở  $25^\circ C$ . Rót từng lượng 10 ml môi trường vào các ống nghiệm đã được tiệt trùng và tiệt trùng trong nồi hấp ở  $121^\circ C \pm 1^\circ C$  trong 15 min. Các ống nghiệm đựng môi trường dinh dưỡng được bảo quản ở  $4^\circ C \pm 1^\circ C$  không quá 30 ngày.

- Môi trường thạch MRS: chuẩn bị như môi trường MRS lỏng, có thêm từ 15 g đến 18 g thạch. Sau khi hòa tan các thành phần, rót môi trường vào các bình đã được tiệt trùng và tiệt trùng trong nồi hấp ở  $121^\circ C \pm 1^\circ C$  trong 15 min. Bảo quản môi trường đã chuẩn bị ở  $4^\circ C \pm 1^\circ C$  không quá 30 ngày.

Khi cần thiết, để tăng tính chọn lọc, sau khi tiệt trùng cho thêm 1 ml dung dịch kiểm của axit socbic vào 1000 ml môi trường thạch hoặc lỏng.

## 5 Tiến hành phân tích

### 5.1 Xác định số lượng vi khuẩn chủng *Lactobacillus* trên các môi trường thạch Rogoz hoặc MRS

**5.1.1** Từ mẫu được lấy theo Điều 2 chuẩn bị mẫu ban đầu và dãy mẫu pha loãng 10 lần để có thể xác định số lượng vi khuẩn chủng *Lactobacillus* dự đoán trước trong 1,0 g (ml) sản phẩm xét nghiệm.

## TCVN 5522:1991

**5.1.2** Từ mẫu hoặc các mẫu đã được pha loãng tương ứng cấy từng lượng 1,0 ml song song vào 2 hộp petri; rót  $13 \text{ cm}^3 \pm 2 \text{ cm}^3$  môi trường thạch nóng chảy đã làm nguội đến  $45 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  vào mẫu trên. Nhanh chóng khuấy kĩ các chất chứa trong hộp và để cho thạch đông lại.

**5.1.3** Mẫu cấy được ủ trong điều kiện hạn chế thâm nhập oxy ở  $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  trong 5 ngày hoặc ở  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  trong 3 ngày.

Việc hạn chế thâm nhập oxy được thực hiện theo một trong các cách sau đây:

**5.1.3.1** Rót lên môi trường dinh dưỡng đã đóng rắn một lớp thứ hai, khoảng 5 ml; môi trường thạch nóng chảy đã làm lạnh đến  $45 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  rồi để yên cho thạch đông lại.

**5.1.3.2** Đặt các hộp cấy vi sinh vào tủ cấy kỵ khí, đóng tủ lại và dùng máy hút chân không tạo chân không từ 86,6 kPa đến 93,3 kPa.

**5.1.3.3** Đặt các hộp cấy vi sinh vào môi trường khí chứa 95 % khí nitơ và 5 % khí cacbonic.

**5.1.3.4** Khi không có sự thống nhất trong việc đánh giá chất lượng sản phẩm thì việc nuôi cấy được tiến hành trong môi trường khí theo 5.1.3.3.

## **5.2 Xác định số vi khuẩn chủng *Lactobacillus* có xác suất lớn nhất trong môi trường lỏng Rogoz hoặc MRS**

**5.2.1** Từ các mẫu đã được lấy theo Điều 2, chuẩn bị mẫu ban đầu và một dãy các mẫu pha loãng 10 lần, sao cho mẫu pha loãng cuối cùng phải cho kết quả âm tính.

**5.2.2** Lấy  $1,0 \text{ cm}^3$  từ tất cả các mẫu pha loãng cấy song song vào 3 ống nghiệm đã chứa sẵn  $10 \text{ cm}^3$  môi trường Rogoz hoặc MRS. Việc hạn chế thâm nhập oxy được thực hiện bằng cách rót vào mỗi ống nghiệm chứa môi trường một lượng paraffin lỏng đã tiệt trùng đủ để tạo thành lớp paraffin dày khoảng 2 cm.

**5.2.3** Ủ các mẫu cấy cho đến khi xuất hiện các dấu hiệu phát triển nhưng không quá 5 ngày ở  $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  và không quá 3 ngày ở  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**5.2.4** Các ống nghiệm được coi là dương tính nếu trong đó xuất hiện sự vẩn đục của môi trường.

**5.2.5** Để khẳng định rằng các vi sinh vật đã phát triển là thuộc chủng *Lactobacillus*, từ các ống nghiệm dương tính tiến hành cấy chuyển sang môi trường dinh dưỡng thạch bằng que cấy vi sinh sao cho có được sự phát triển của các khuẩn lạc biệt lập. Việc nuôi cấy tiến hành theo 5.2.3.

**5.3** Vi khuẩn chủng *Lactobacillus* trên môi trường đông đặc tạo thành các khuẩn lạc không màu đường kính từ 1 mm đến 3 mm có hình dạng thấu kính hoặc hình sao. Để khẳng định các khuẩn lạc trưởng thành là thuộc chủng *Lactobacillus*, tiến hành kiểm tra không ít hơn 5 khuẩn lạc điển hình theo cách sau:

1. Nhuộm màu Gram theo qui định hiện hành. Vi khuẩn chủng *Lactobacillus* là trực khuẩn Gram dương tạo thành các chuỗi xích ngắn hoặc dài.
2. Thử trên catalaza theo qui định hiện hành. Vi khuẩn chủng *Lactobacillus* là vi khuẩn catalaza âm.

## 6 Đánh giá kết quả phân tích

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

**6.2** Khi nuôi cấy trên môi trường thạch Rogoz hoặc MRS, để đếm số vi khuẩn chủng *Lactobacillus* phải chọn các hộp petri mà trong đó có từ 15 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc đặc trưng phát triển.

**6.3** Nếu trong 80 % trường hợp, tức là không ít hơn 4 khuẩn lạc trong số 5 khuẩn lạc được khẳng định là thuộc chủng *Lactobacillus* thì tất cả các khuẩn lạc đặc trưng phát triển trong hộp thì coi là thuộc nhóm này.

Trong các trường hợp còn lại, số vi khuẩn chủng *Lactobacillus* được xác định từ tỉ lệ phần trăm của khuẩn lạc đã được khẳng định trên tổng số khuẩn lạc đặc trưng được lấy để kiểm tra.

**6.4** Khi cấy trong môi trường Rogoz lỏng hoặc MRS lỏng, số vi khuẩn chủng *Lactobacillus* có xác suất cao nhất được xác định theo số lượng các ống nghiệm có kết quả dương tính.

**6.5** Kết quả được xử lý, tính cho 1 g (cm<sup>3</sup>) sản phẩm và ghi lại theo TCVN 5591:1991 (ST SEV 3015-81).

---