



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TÔM VÀ MỰC ĐÔNG LẠNH

CHỈ TIÊU VI SINH VẬT

TCVN 4186 — 86

HÀ NỘI — 1986

TÔM VÀ MỰC ĐÔNG LẠNH

Chỉ tiêu vi sinh vật

Холодильный рак и
холодильная каракатица
микробиологические
показатели

Frozen shrimp and
cuttle fish (or squid).
Microbiological speci-
fications

**TCVN
4186-86**

**Có hiệu lực
từ 1-1-1987**

1. CHỈ TIÊU VI SINH VẬT

1.1. Về các chỉ tiêu vi sinh vật, tôm và mực đông lạnh phải theo đúng các quy định trong bảng dưới đây :

Tên chỉ tiêu	Mức trong 1 g sản phẩm
1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí không lớn hơn	50 000
2. Escherichia coli	không cho phép
3. Staphylococcus aureus	không cho phép
4. Salmonella, Shigela	không cho phép
5. Số trực khuẩn Coli (coliform) không lớn hơn	200

2. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Dụng cụ, hóa chất và môi trường kiểm nghiệm

Máy nghiền hoặc cối nghiền có bi thủy tinh ;

Đèn cồn hoặc đèn khí (gaz) ;

Que cấy các loại ;

Dao, kéo, panh, thìa nhôm to, nhỏ,

Khay men hoặc thép không rỉ 350 × 250 mm ;

Ống nghiệm các loại 12 ; 16 và 18 mm ;

Đĩa petri ;

Pipet các loại 1; 2; 5 và 10 ml;

Pipet pattrơ;

Bông thấm nước;

Cồn etylic 70 và 90°;

Môi trường các loại dùng kiểm tra vi sinh vật;

Các hóa chất đã quy định trong kiểm tra vi sinh vật hải sản;

Lọ đựng dung dịch sát trùng sunfocromic, natrihydroxyt để
bỏ các pipet đã dùng;

Các loại tủ ấm có nhiệt độ 37 và $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$;

Kính hiển vi và các dụng cụ để nhuộm, soi tiêu bản;

Cân kỹ thuật;

Tủ sấy;

Tủ hấp vô trùng (autoclave).

Chú thích: Toàn bộ dụng cụ kiểm nghiệm phải bảo đảm vô trùng

2.2. Lấy mẫu: theo TCVN 2068 - 77.

2.3. Chuẩn bị mẫu

2.3.1. Xử lý mẫu kiểm tra

Mẫu thủy sản đưa về phòng thí nghiệm được mở ra cho vào các khay vô trùng, đưa vào buồng vô trùng để pha mẫu trực tiếp và tiến hành kiểm nghiệm.

2.3.2. Chọn và pha loãng mẫu để nuôi cấy vi sinh vật.

Dùng dụng cụ vô trùng cắt chọn mẫu hải sản (trên mỗi mẫu cắt từ 4 hoặc 5 điểm khác nhau. Lượng mẫu ban đầu lấy khoảng 50 đến 100 g cho vào cối sứ vô trùng nghiền nát.

Cân 10 g mẫu đã nghiền nát cho vào bình tam giác (erlenmeyer) có 90 ml dung dịch nước muối sinh lý (NaCl 8,5 %) có bi thủy tinh, lắc đều, để lắng cặn. Dung dịch mẫu này được coi là có đậm độ pha loãng 10^{-1}

Tùy theo mức độ nghi vấn hải sản nhiễm bẩn ở các cơ sở sản xuất khác nhau (kinh nghiệm) cần pha loãng thêm các đậm độ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ...

Mục đích pha loãng nhằm làm thế nào để khi nuôi cấy ở mỗi đĩa petri chỉ mọc khoảng 30—300 khuẩn lạc.

Lắc đều các mẫu pha loãng để chuẩn bị nuôi cấy vi sinh vật.

2.4. Kiểm tra tổng số vi sinh vật hiếu khí.

2.4.1. Dùng thạch thường đun nóng chảy, đổ vào các đĩa petri, để nguội đến 45°C , cấy sản phẩm và lắc nhẹ để trộn đều. Mỗi lần kiểm tra phải nuôi cấy 3 đậm độ pha loãng mẫu, mẫu đậm độ cấy 1 ml dung dịch vào 15—20 ml thạch thường để trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C , đọc kết quả sau 24 giờ.

2.4.2. Nuôi cấy vi sinh vật;

Tốt nhất nên dùng mỗi pipet cho một đậm độ pha loãng, nếu ít pipet có thể dùng một pipet hút sản phẩm nuôi cấy nhưng phải tôn trọng nguyên tắc cấy từ đậm độ loãng đến đậm độ đặc. Dung dịch nuôi cấy phải được nhỏ vào trung tâm đĩa petri. Từ lúc nhỏ dung dịch nuôi cấy đến khi đổ thạch, không để lâu quá 15 phút. Thạch được đun nóng chảy và để nguội đến 45°C .

Sau khi đổ thạch lắc nhẹ đĩa petri cho dung dịch nuôi cấy và thạch trộn đều sau đó lắc vòng tròn theo chiều kim đồng hồ 5 vòng và lắc ngược lại 5 vòng (trên mặt bàn nuôi cấy). Để thạch nguội cho vào tủ ấm 37°C trong thời gian 24 giờ.

2.4.3. Đọc kết quả.

Dùng mắt thường hoặc kính lúp có độ phóng đại 2—3 lần để đếm khuẩn lạc mọc trên các đĩa petri. Chỉ đếm số khuẩn lạc trên các đĩa có từ 30—300 khuẩn lạc.

Nhân số khuẩn lạc đếm được với hệ số pha loãng tương ứng. Trung bình cộng của số vi sinh vật từ các nồng độ nuôi cấy là kết quả tổng số vi sinh vật hiếu khí có trong 1 gr sản phẩm đông lạnh.

2.5. Kiểm tra trực khuẩn coli (coliform)

2.5.1. Dùng thạch Tundo, Istrati, V.B.L.R, Desoxycyclate, lactose.

Phương pháp phát hiện giống như mục 2.4.

2.5.2. Nuôi cấy vi sinh vật

Tùy mức độ nhiễm bẩn của mẫu để quyết định sử dụng các đậm độ pha loãng khác nhau. Nhất thiết không dùng 1 đậm độ pha loãng để nuôi cấy.

Dùng pipet hút 1 ml dung dịch pha loãng được chọn, đổ ra đĩa petri, đổ 15–20 ml thạch đã đun và để nguội ở 45°C, lắc đều. Để các đĩa petri vào tủ ấm ở 37°C trong thời gian 24–48 giờ.

2.5.3. Đọc kết quả

Các khuẩn lạc vi sinh vật mọc ở đĩa Endo có màu đỏ, có hoặc không có ánh kim, hoặc các khuẩn lạc mọc trên đĩa Istrati có màu vàng đều được coi là trực khuẩn coli.

Đếm số khuẩn lạc coliform: Nhân số khuẩn lạc coliform đếm được trên mỗi đĩa thạch với nồng độ pha loãng tương ứng rồi lấy trung bình cộng của các nồng độ khác nhau để tính tổng số coliform trong 1 g mẫu. Nhuộm gram 1 số khuẩn lạc có màu trong các đĩa thạch để xác định những vi sinh vật gram âm và kết luận.

2.6. Kiểm tra E.coli

2.6.1. Phương pháp định tính:

2.6.1.1 Dùng: Canh thang mật bò lục sáng lactose 2 %;

Nước pepton;

Thạch Endo, Istrati, V.B.L.R., Desoxycholate lactose;

Thạch Simmons (natri xitrat).

2.6.1.2 Nuôi cấy vi sinh vật:

Nhỏ vài giọt mẫu vào một ống canh thang mật bò lục sáng lactose 2 % để ở 44°C trong 24 giờ, đọc kết quả sơ bộ căn cứ vào sự lên men đường lactose (sinh hơi hoặc không sinh hơi).

Nhuộm gram.

Cấy truyền sang một ống nước pepton (để thử Indol), một đĩa thạch Istrati (hoặc Endo, V.B.L.R...) một ống thạch Simmons và giữ ở 44°C trong 24 giờ.

2.6.1.3 Đọc kết quả (Test Mackezie): có mặt của E.coli:

Canh thang mật bò lục sáng lactose 2 % : (+);

Trực khuẩn gram âm;

Indol (+)

Thạch Istrati: trên các vết cấy có khuẩn lạc màu vàng;

Thạch Endo: Trên các vết cấy có khuẩn lạc màu đỏ (có hoặc không có ánh kim);

Thạch Simmons: khuẩn lạc màu xanh lục (-).

BẢNG PHÂN BIỆT CÁC E.COLI CÓ NGUỒN GỐC TỪ PHÂN

Vi sinh vật	Lactose	Indol	Simmons	Ghi chú
E.Coli	có hơi	+	-	E.coli phân
E.Coli	không hơi	+	-	E.coli phân
E.Coli intermedium	có hơi	+ hay -	+	Không từ phân
E.Coli freundi	có hơi	+ hay -	+	nt
Aerobacter	có hơi	-	+	nt

Chú thích: Có thể tiếp tục làm các phản ứng liên kết với những kháng huyết thanh đặc hiệu.

2.6.2. Kiểm tra định lượng

2.6.2.1 Dùng: Canh thang mật bò lức sáng lactose 2 % ;

Nước pepton ;

Thạch Simmons ;

Thạch Istrati, Endo, V.B.L.R.

2.6.2.2. Nuôi cấy vi sinh vật ;

Mỗi mẫu hải sản kiểm tra dùng 9 ống canh thang mật bò lức sáng lactose 2 % cứ 3 ống nuôi cấy một đậm độ pha loãng, để tủ ấm $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ.

Căn cứ sự lên men đường lactose (sinh hơi hoặc không sinh hơi) nhuộm gram xem có phải là trực khuẩn gram âm không. Cứ mỗi ống canh thang mật bò lức sáng lactose 2 % dương tính được cấy truyền sang một đĩa thạch Istrati hoặc Endo, một ống pepton và một ống thạch Simmons, để ở $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong 24 giờ. Đánh giá sự có mặt của E.coli dựa theo Test Mac kenzie. Cụ thể tính số lượng E.coli theo bảng Maccrady :

BẢNG MACCRADY

Số ống dương tính			Ước lượng số coli	Số ống dương tính			Ước lượng số coli
Nguyên chất	1/10	1/100		Nguyên chất	1/10	1/100	
0	0	0	0,0	2	2	1	3,0
0	0	1	0,3	2	2	2	3,5
0	1	0	0,3	2	2	3	4,0
0	1	1	0,6	2	3	0	3,0
0	2	0	0,6	2	3	1	2,5
1	0	0	0,4	2	3	2	4,5
1	0	1	0,7	3	0	0	2,5
1	0	2	1,1	3	0	1	4,0
1	1	0	0,7	3	0	2	6,5
1	1	1	1,1	3	1	0	4,5
1	2	0	1,1	3	1	1	7,5
1	2	1	1,5	3	1	2	11,5
1	3	0	1,6	3	1	3	16,5
2	0	0	0,9	3	2	0	9,5
2	0	1	1,4	3	2	1	15,0
2	0	2	2,0	3	2	2	20,0
2	1	0	1,5	3	2	3	30,0
2	1	1	2,0	3	3	0	25,0
2	1	2	3,0	3	3	1	45,0
2	2	0	2,0	3	3	2	110,0
				3	3	3	140,0

Bảng trên đây dùng để tính kết quả với các đậm độ pha loãng:
nguyên chất; 1/10 và 1/100.

2.7. Kiểm tra Staphylococcus Aureus:

2.7.1. Môi trường:

Môi trường tăng sinh: Canh thang mặn NaCl;

Môi trường Chapmana;

Huyết tương thử để thử coagulaza,

2.7.2 Nuôi cấy vi sinh vật:

Cấy 10ml mẫu pha loãng 1/10 vào môi trường canh thang
mặn NaCl để ở 37° C trong 24 giờ.

Cấy chuyển sang thạch Chapmana (đồ đĩa petri) bằng phương pháp cấy rửa để ở 37°C trong 24 giờ.

2.7.3. Đọc kết quả

Chọn khuẩn lạc vàng da cam thể Smooth (tròn nhẵn, bờ đều);

Lên men đường mannit

Nhuộm gram: Khuẩn lạc tụ cầu hình chùm nho;

Tiếp tục làm phản ứng Coagulaza:

Hút 0,5 ml huyết tương thả vào ống nghiệm 12 mm, cho vào ống vài giọt canh trùng hoặc khuẩn lạc nghi vấn đã nuôi cấy 24 giờ, để tủ ấm nhiệt độ 37°C thời gian 24 giờ, đọc kết quả sau 6 giờ.

Chú thích: Thí nghiệm phải kèm theo 2 ống nghiệm đối chứng:

— Một ống đối chứng âm tính không có vi khuẩn mà chỉ cấy với huyết tương thô và vài giọt nước muối sinh lý (NaCl 8,5%). Kết quả dương tính được xác định khi huyết tương thô đã cấy vi khuẩn bị động. Phản ứng DNA có thể thay thế phản ứng Coagulaza

— Một ống nghiệm đối chứng đã cấy tụ cầu khuẩn gây bệnh chuẩn có sẵn trong phòng thí nghiệm)

2.8. Kiểm tra *Salmonella*; *shigella*, *Vibrio parahemolyticus*; *Vibrio cholerae*: Theo thường quy kiểm nghiệm của Bộ Y tế nước CH — XHCN Việt Nam.