

TCVN 5042-1994

NUỐC GIẢI KHÁT

YÊU CẦU VỆ SINH - PHƯƠNG PHÁP THỬ

SOÁT XÉT LẦN 1

Lời nói đầu

TCVN 5042-1994 được xây dựng trên cơ sở tham khảo các phương pháp thử của ISO, FAO, AOAC, SEV và các tài liệu chuyên ngành khác;

TCVN 5042-1994 thay thế cho TCVN 5042-90;

TCVN 5042-1994 do Trung tâm Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng khu vực I biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị và được Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

NƯỚC GIẢI KHÁT

YÊU CẦU VỆ SINH - PHƯƠNG PHÁP THỬ

Beverages

Hygiene requirements and methods for examination

Tiêu chuẩn này qui định yêu cầu vệ sinh và phương pháp thử đối với các loại nước giải khát có độ cồn thấp (bía, nước giải khát lên men, nước giải khát pha chế có rượu nhẹ ...) và nước giải khát không có cồn (cam, chanh, côca, nước khoáng ngọt...).

1 Yêu cầu vệ sinh

1.1 Chỉ tiêu hóa vệ sinh

1.1.1 Không được sử dụng axit vô cơ (HCl , H_2SO_4 , HNO_3 ...) để pha chế nước giải khát.

1.1.2 Hàm lượng kim loại nặng (mg/l), theo qui định của Bộ y tế (QĐ 505, 4-1992).

1.1.3 Phẩm màu, hương liệu, chất bảo quản, chỉ được sử dụng những loại theo danh mục qui định hiện hành (QĐ 505/BYT).

Không được phép sử dụng những loại phụ gia không rõ nguồn gốc, mất nhãn, bao bì hỏng.

Đối với các phụ gia mới, hóa chất mới, nguyên liệu mới, muốn sử dụng để pha chế, bảo quản nước giải khát, phải xin phép Bộ Y tế.

1.1.4 Chất ngọt tổng hợp (Saccarin, dulsin, cyclamat...): không được sử dụng để pha chế nước giải khát. (Trường hợp sản phẩm dành riêng cho bệnh nhân kiêng đường phải xin phép Bộ y tế và ghi rõ tên đường + mục đích sử dụng trên nhãn).

1.2 Chỉ tiêu vi sinh vật

1.2.1 Đối với nước giải khát không cồn, theo qui định trong bảng 1

| Tên chỉ tiêu | Mức | |
|--|-----------------|---------------|
| | Không đóng chai | Đóng chai |
| 1. Tổng số vi khuẩn hiếu khí, số khuẩn lạc/ml, không lớn hơn | 5.10^4 | 10^2 |
| 2. E. Coli, con/l, không lớn hơn | 3 | Không được có |
| 3. Cl. Perfringens | Không được có | Không được có |
| 4. Vi khuẩn gây nhày, (Leuconostoc) | | Không được có |
| 5. Nấm Men-mốc, số khóm nấm/ml, không lớn hơn | 10^3 | Không được có |
| 6. St. aureus | Không được có | Không được có |

1.2.2 Đối với bia và các loại nước giải khát có độ cồn thấp theo qui định trong bảng 2.

Bảng 2

| Tên chỉ tiêu | Mức | |
|--|-----------------|-----------------|
| | Không đóng chai | Đóng chai (hộp) |
| 1. Tổng số vi khuẩn hiếu khí, số khuẩn lạc/ml, không lớn hơn | 10^3 | 10^2 |
| 2. E. Coli | Không được có | |
| 3. Cl. Perfringens | Không được có | |
| 4. Vi sinh vật gây đục (quan sát bằng mắt) | - | Không được có |
| 5. Nấm men - mốc, số khóm nấm/ml, không lớn hơn | 10^2 | Không được có |
| 6. St. aureus/vi khuẩn gây bệnh đường ruột | Không được có | |

2 Phương pháp thử

2.1 Lấy mẫu

Theo TCVN 5519 - 1991 (ST SEV 5808 - 86).

2.2 Xác định axit vô cơ trong nước giải khát

Nguyên tắc của phương pháp:

Các nước giải khát nhân tạo pha chế từ nước đường với axit hữu cơ (axit xitric, axit tactric hoặc axit lactic) với độ chua toàn phần tính ra axit xitric khoảng 1g/1000ml, có pH trên 2. Nếu cho thêm axit vô cơ như axit clohydric, axit nitric, axit Sunphuric là những loại axit mạnh, pH sẽ giảm. Có thể xác định bằng pH - mét hoặc bằng chỉ thị màu.

2.2.1 Dụng cụ, vật liệu, thuốc thử

- pH - mét, $\pm 0,1$ pH

- Cao lanh sạch: rửa cao lanh với nước cất đun sôi. Kiểm tra nước rửa cho đến trung tính bằng giấy chỉ thị màu vạn năng.

- Dung dịch axit xitric C, 1%

Axit xitric khan 1g

Nước cất vừa đủ 1000ml

- Dung dịch tím Metyl 0,1% trong nước cất.

2.2.2 Tiến hành thử

Sau khi thấy xác định độ chua toàn phần của nước giải khát, tính và điều chỉnh sao cho độ chua (tính theo axit xitric) bằng 0,1%. (Nếu nước giải khát có màu, khử bằng cách lắc 50ml nước giải khát với 1 - 2g cao lanh và lọc, dịch lọc không màu).

| Cho vào ống nghiệm: | Ống 1 | Ống 2 |
|----------------------------|----------|----------|
| Dịch lọc nước giải khát | 20ml | 0 |
| Dung dịch axit xitric 0,1% | 0 | 20ml |
| Dung dịch tím metyl 0,1% | 4-5 giọt | 4-5 giọt |

Dung dịch mẫu cần thử (ống 1) không được có màu xanh lục hơn dung dịch axit xitric 0,1% (ống 2).

- Có thể xác định pH của dịch mẫu và dung dịch đối chứng bằng pH-mét (Nếu cần thiết, xác định định tính các ion Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}).

2.3 Xác định hàm lượng kim loại nặng

Theo qui định hiện hành.

2.4 Xác định phẩm màu

Theo TCVN 5517-1991.

2.5 Xác định chất ngọt tổng hợp (Sacarin, dulcin, cyclamat)

2.5.1 Phương pháp hóa học

2.5.1.1 Nguyên tắc của phương pháp

Dựa vào các phản ứng hóa học đặc trưng của sacarin với sắt III clorua, của cyclamat với Barisunfat trong môi trường axit, của dulcin với axit nitric đặc để phát hiện ra sự có mặt của chúng trong nước giải khát không có cồn.

2.5.1.2 Xác định định tính sacarin

A. Dụng cụ và thuốc thử:

- Phễu chiết, dung tích 250ml
- Ống đong, dung tích 50ml, 25ml
- Bát sứ chịu nhiệt
- Bếp cách thủy
- Ete etylic TK
- Natri hydroxit TK
- Sắt III clorua, dung dịch 2%
- Axit sunfuric, dung dịch 10%
- Axit clohydric TK.

B. Tiến hành thử:

Cho 50ml mẫu thử vào phễu chiết dung tích 250ml, sau đó cho thêm 5ml axit clohydric đặc, 50ml ete etylic để tiến hành chiết sacarin. Phần ete etylic được giữ lại trong phễu chiết, rửa 2 lần, mỗi lần bằng 50ml nước cất. Chuyển phần ete sau khi đã rửa sạch sang bát sứ khô sạch và làm bay hơi trên bếp cách thủy đến gần cạn và để ra ngoài tiếp tục làm bay hơi tự nhiên cho đến khô. Thêm vào cạn thu được 1-2 viên natri hydroxyt, vài giọt nước và đem đun trên bếp điện ở nhiệt độ 200-220°C, sau đó đem làm nguội, hòa tan bằng 10ml nước cất rồi thêm vào đó 15ml axit sunfuric dung dịch 10%, 3-5 giọt sắt III clorua dung dịch 2% nếu có màu tím sẫm chứng tỏ trong mẫu có sacarin.

2.5.1.3 Xác định định tính cyclamat

A. Dụng cụ và thuốc thử:

- Cốc có mỏ, dung tích 250ml
- Ống đong, dung tích 100ml
- Bari clorua TK
- Axit clohydric TK
- Natri-nitrit TK.

B. Tiến hành thử

Cho 100ml mẫu thử vào cốc đốt dung tích 250ml, thêm vào đó 2g bari clorua, 1ml axit clohydric đặc, lắc đều, để yên 5 phút rồi lọc sang cốc khác. Thêm 0,2g natri - nitrit vào dung dịch lọc trên, nếu xuất hiện kết tủa trắng của bari sunfat chứng tỏ mẫu có cyclamat.

2.5.1.4 Xách định định tính dulcin

A. Dụng cụ và thuốc thử

- Tủ sấy điều chỉnh được nhiệt độ $110^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Phễu chiết, dung tích 250ml
- Bát sứ chịu nhiệt
- Ống đong, dung tích 100ml, 50ml
- Axit nitric TK

B. Tiến hành thử

Cho 100ml mẫu thử (kiềm hóa bằng dung dịch NaOH dung dịch 10% nếu cần) vào phễu chiết dung tích 250ml, tiến hành chiết 3 lần mỗi lần 50ml ete etylic. Gộp các phần ete chiết vào một bát sứ sau đó chia làm hai bát để bay hơi ở nhiệt độ phòng rồi sấy khô cạn trong tủ sấy ở nhiệt độ 110°C . Lấy cạn ra để nguội sau đó làm ẩm cạn bằng vài giọt axit nitric, thêm vào đó 1 giọt nước cất, nếu xuất hiện kết tủa màu da cam hoặc màu đỏ gạch chứng tỏ trong mẫu có dulcin.

2.5.2 Phương pháp sắc ký bản mỏng

2.5.2.1 Lấy mẫu

Theo qui định chung đối với nước giải khát.

2.5.2.2 Nội dung của phương pháp

Chiết tách các chất ngọt tổng hợp trong các loại nước giải khát bằng etylaxetat. Cô đặc dung dịch chiết rồi chấm dung dịch này trên bản sắc ký lớp mỏng. Các vết chấm sẽ được nhìn thấy hoặc dưới ánh đèn tử ngoại có bước sóng 254nm hoặc bằng các chất hiện màu.

2.5.2.3 Thiết bị, dụng cụ, thuốc thử

Các loại dụng cụ thiết bị dùng trong phòng thí nghiệm và hóa chất phải là các loại hóa chất TKPT.

- Dụng cụ trải bản mỏng.
- Đèn tử ngoại có bước sóng ngắn (254nm);

- Tấm kính để tráng lớp mỏng có kích thước 20 x 20cm, hoặc dùng bản mỏng tráng sẵn;
- Bếp cách thủy;
- Phễu chiết, dung tích 125ml;
- Ống nghiệm khắc vạch, dung tích 10ml;
- Bình cầu đáy bằng, dung tích 250ml hoặc bình tam giác, dung tích 250ml;
- Bình định mức, dung tích 10ml, 50ml, 100ml;
- Ống đong, dung tích 50ml, 100ml;
- Cốc thủy tinh, dung tích 100ml;
- Micropipet có vạch chia tới μl hoặc ống mao quản;
- Dụng cụ sấy khô bản mỏng (máy sấy tóc cầm tay);
- Axit sunfuric, dung dịch (1:1);
- Natri hydroxit, dung dịch 50%;
- Ete dầu hỏa có điểm sôi 40 - 70°C;
- Etyl axetat TK;
- Hỗn hợp amoniac - nước cất - etanola theo tỷ lệ thể tích (5:5:10);
- Hệ dung môi triển khai:
 - n. butanol - etanola - amoniac - nước theo tỷ lệ thể tích (40:4:1:9);
- Thuốc thử hiện màu:
 - (1)+ Brom, dung dịch 5% (pha trong CCl_4 theo thể tích)
 - (2)+ Fluorescein, dung dịch 0,25 % (pha trong hỗn hợp dimethylfocmami: etanola (1:1)
 - (3)+ N - 1 - Naphthyl - ethylendiamin, 2HCl, dung dịch 2% (pha trong etanola).
- Hỗn hợp chất chuẩn: 5mg Ca cyclamat, 10mg Na sacarin, 4mg dulcin trong 10ml etanola (1 : 1). Cứ 5 μl dung dịch này có 25 μg cyclamat, 5 μg sacarin và 1 μg dulcin.
- Sillicagel H. (Merck) hoặc Adsorbosil.1
- Chuẩn bị bản mỏng: Trộn đều 30g sillicagel H. với 75 - 80ml nước hoặc 35g adsorbosil 1 với 50ml nước. Rải hỗn hợp trên lên 5 tấm kính với kích thước 20 x 20cm, có độ dày lớp mỏng 0,25mm. Làm khô các tấm này trên 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Không làm khô trong tủ sấy. Không bảo quản trong bình hút ẩm. Sử dụng bản mỏng này sau 36 giờ từ khi chuẩn bị.

2.5.2.4 Tiến hành thử

A. Chuẩn bị mẫu và chiết tách chất ngọt tổng hợp

Loại cacbon dioxit (CO_2) trong nước giải khát bằng cách đổ đi đổ lại và lắc hoặc đun nhẹ trên bếp cách thủy. Sau đó lấy 50ml mẫu cho vào phễu chiết dung tích 125ml, thêm cẩn thận 10ml dung dịch axit sunfuric (1 : 1). Để nguội chiết hai lần, mỗi lần 50ml ete dầu hỏa, bỏ lớp ete dầu hỏa. Phần nước được chuyển sang 1

phần chiết thứ hai, thêm 5ml dung dịch natri hydroxit 50%, để nguội, chiết hai lần, mỗi lần 50 ml etyl axetat. Lọc phần chiết etyl axetat qua lớp bông đã được rửa bằng etyl axetat sang một cốc có mỏ. Làm bay hơi trên bếp cách thủy đến còn 5 - 10ml và chuyển sang ống nghiệm có khắc vạch. Làm bay hơi tiếp tục trên bếp cách thủy. Sau đó hòa tan cặn thu được bằng 2,5 ml hỗn hợp amoniac - Nước - etanola (5 : 5 : 10). Đậy kín ống nghiệm, dung dịch này dùng để chấm bản mỏng sắc ký.

B. Tiến hành chấm và chạy sắc ký

Bản mỏng sau khi đã được chuẩn bị theo mục (2.5.2.3) trước khi chấm sắc ký phải cạo sạch lớp silicagen ở cạnh đáy và hai cạnh bên của bản sắc ký với chiều rộng 5mm. Dùng bút chì nhọn và thước kẻ đánh dấu vạch xuất phát cách mép dưới của bản mỏng là 2,5 cm. Dùng micropipet chấm 3 điểm dung dịch mẫu thử và dung dịch chất chuẩn. Các điểm cách mép của bản sắc ký và cách nhau 2,5 cm. Đường kính mỗi vết chấm không được quá 0,5 cm nên mỗi lần chỉ chấm khoảng 1 μ l, làm khô bằng máy sấy tóc rồi lại chấm tiếp cho đến khi hết lượng dung dịch cần phải chấm.

Chấm các vết thử tự như sau:

5 μ l dung dịch chiết của mẫu thử

5 μ l dung dịch chất chuẩn

5 μ l dung dịch chiết của mẫu thử đã được pha loãng gấp đôi bằng hỗn hợp dung dịch (hỗn hợp amoniac - nước - etanola theo phần 2.5.2.5)

Chấm xong để bản mỏng khô trong không khí rồi cho chạy sắc ký.

Chuẩn bị bình sắc ký:

Dùng một tờ giấy lọc đã được tẩm ướt bằng hỗn hợp dung môi triển khai (2.5.2.3), phủ xung quanh thành bình phía trong. Sau đó đổ dung môi triển khai vào bình với độ cao 1 cm, đậy nắp kín bình và để yên 30 phút để có được trạng thái bão hòa dung môi trong bình. Đặt bản mỏng đã chấm mẫu vào bình và đậy nắp lại. Khi lượng nước dung môi đạt độ cao 10 cm (khoảng 1 giờ), nhấc bản mỏng ra, đánh dấu mức dung môi và làm khô bản mỏng trong tủ hút đến khi không nhìn thấy vạch (khoảng 10 phút).

C. Quan sát bản sắc ký

Quan sát bản sắc ký dưới ánh đèn tử ngoại có bước sóng 254nm và khoanh vùng vết saccarin phát huỳnh quang ở $R_f = 0,5$. Sau đó đặt bản sắc ký trong tủ hút phun thuốc thử hiện màu (1) và (2) nhẹ nhàng cho đến khi xuất hiện vết màu hồng của cyclamat ở $R_f = 0,3 - 0,4$. Phun thuốc thử hiện màu (3) lên bản mỏng cho tới khi nền chuyển từ màu hồng sang vàng nhạt và xuất hiện vết dulcin ở $R_f = 0,7$. Vết dulcin có thể có màu hồng nâu hoặc xanh tùy thuộc vào điều kiện phun thuốc thử hiện màu và độ đậm đặc của chất ngọt nhân tạo.

2.6 Xác định các chỉ tiêu vi sinh vật

2.6.1 Chuẩn bị mẫu để kiểm nghiệm theo TCVN 4887 - 89 (ST SEV 3014 - 81) 4.5 và 6.4.

2.6.2 Pha loãng mẫu kiểm nghiệm theo TCVN 4881 - 89 (ISO 6887 - 83).

2.6.3 Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí theo TCVN 5165 - 90.

2.6.4 Phát hiện vi khuẩn gây nhày theo TCVN 5523 - 1991 (ST SEV 5806 - 86).

2.6.5 Xác định tổng số nấm men - mốc theo TCVN 5166 - 90.

2.6.6 Phát hiện trực khuẩn E.Coli

2.6.6.1 Nguyên tắc: nuôi cấy mẫu thử trong một loại môi trường canh thang chọn lọc, ở nhiệt độ $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ trong 24 - 48 giờ. Ria cấy lên bề mặt môi trường thạch chọn lọc nếu thấy các mẫu cấy dương tính (đục, sinh hơi, chuyển màu môi trường). Nhận định sự có mặt của E.Coli trong mẫu thử qua các đặc điểm hình thái và đặc tính sinh hóa (lên men lactoza, sinh hơi, nghiệm pháp IMVIC).

2.6.6.2 Thiết bị dụng cụ

Các loại thông dụng của phòng thử nghiệm vi sinh vật, đảm bảo điều kiện vô trùng.

2.6.6.3 Môi trường dinh dưỡng và thuốc thử (xem phụ lục).

2.6.6.4 Trình tự tiến hành

a) Dùng ống hút vô khuẩn, cấy song hành vào hai ống nghiệm có chứa một trong các môi trường canh thang chọn lọc. (phụ lục: (5) (6)*) mỗi ống 1ml mẫu thử.

Nuôi các ống đã cấy ở nhiệt độ $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ (tủ âm hay bể điều nhiệt) trong thời gian 24-48 giờ.

b) Đọc kết quả sơ bộ. Nếu thấy các mẫu cấy âm tính (trong, không sinh hơi, không chuyển màu môi trường) thì tiếp tục nuôi trong tủ ấm (hay bể điều nhiệt) ở $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ trong 24 giờ nữa.

c) Nếu các mẫu cấy ở trên cho phản ứng dương tính (đục, sinh hơi, chuyển màu môi trường...) thì tiến hành ria cấy lên bề mặt môi trường Endo (phụ lục, (9), nuôi đĩa thạch đã cấy mẫu trong tủ ấm ở 37°C trong 18-24 giờ.

d) Trên bề mặt thạch Endo, nếu xuất hiện các khuẩn lạc điển hình (màu đỏ hoặc hồng, thường thường có ánh kim) tiếp tục tiến hành như sau:

- Nhuộm Gram và soi tiêu bản để quan sát hình thái tế bào vi khuẩn.

+ Nghiệm pháp (IMVIC): Chọn không ít hơn ba khuẩn lạc điển hình (hoặc nghi ngờ), cấy chuyển bằng que cấy, đồng thời, sang các môi trường: nước pepton (phụ lục, 7) để kiểm tra tính sinh indol. (I), môi trường canh thang (8) để thử phản ứng MR và V.P; môi trường thạch ống nghiêng Simmon (10) để kiểm tra khả năng đồng hóa Xitrat (C). Các mẫu cấy trên được nuôi ở nhiệt độ 37°C .

e) Sau 24 giờ, tiến hành thử tính sinh indol bằng cách nhử vào ống nước pepton đã cấy mẫu khoảng 0.2 - 0,3 ml thuốc thử KOVACS (1). Phản ứng là dương tính nếu xuất hiện trên mặt môi trường một lớp màu đỏ; âm tính nếu chỉ có màu vàng nhạt hay màu nâu nhạt.

* Các môi trường nuôi cấy và thuốc thử mang số thứ tự theo phụ lục ở phần cuối tiêu chuẩn.

- Sau 48 giờ, **thử phản ứng M.R và V.P** bằng cách: từ ống canh thang đã nuôi cấy (d, 8). Lấy ra 0,7 ml dịch cấy cho vào **phiến thủy tinh (sú) lõm** (hoặc ống nghiệm nhỏ), thêm 0,1ml dung dịch α - naphthol 5% (trong cồn), 0,1ml dung dịch KOH 40%, vài tinh thể Creatin (nếu có). Để yên trong 2 giờ, phản ứng V.P là dương tính nếu xuất hiện màu hồng.

- Phần dịch cấy còn lại trong ống nghiệm đem thử phản ứng M.R; thêm 5 giọt dung dịch đỏ metyl, nếu môi trường chuyển sang màu đỏ là phản ứng (M.R) dương tính.

- Sau 24-72 giờ, quan sát vết cấy trên ống thạch nghiêng Simmon: nếu không thấy vi khuẩn mọc, không làm chuyển màu môi trường thì phản ứng là âm tính (C). (Phản ứng là dương tính khi môi trường bị chuyển từ màu lục nhạt sang xanh lam).

2.6.6.5 Nhận định và báo cáo kết quả

Mẫu thử được coi là có E.Coli nếu phát hiện trực khuẩn ngắn, Gram âm, không sinh bào tử, lên men lactoza, sinh hơi, và cho phản ứng IMVIC loại (++--) hoặc (-+-).

2.6.6.6 Định lượng E.Coli: sử dụng phương pháp màng lọc (TCVN 2680 - 78, phần 6.2).

2.6.7 Xác định trực khuẩn *Cl. Perfringens* (có thể tiến hành theo TCVN 4991 - 89), nếu đủ điều kiện thiết bị và môi trường, hóa chất).

2.6.7.1 Nguyên tắc

Nuôi cấy 10ml mẫu thử hay dịch pha loãng mẫu thử trong ống môi trường thạch chọn lọc (nuôi cấy sâu), xử lý nhiệt độ ở 80°C trong 10 phút sau khi cấy mẫu, làm lạnh ngay và đưa vào nuôi trong tủ ấm ở 37°C trong 24 - 72 giờ.

Nhận định sự có mặt của *Cl.Perfringens* qua đặc điểm hình thái và tính sinh hóa.

2.6.7.2 Thiết bị, dụng cụ

Các loại thông dụng đối với phòng thử nghiệm vi sinh vật.

2.6.7.3 Môi trường dinh dưỡng và thuốc thử (phụ lục).

2.6.7.4 Cách tiến hành

Dùng ống hút vô khuẩn, hút 10 ml dịch mẫu thử hoặc dịch pha loãng, cấy vào 2 ống môi trường Wilson-Blair (11) hoặc S.P.S. (Sunfite-polynixin-sufadiazine) (12) (đã được đun tan chảy và để nguội đến 45 - 50°C), lắc tròn ống để trộn đều mẫu trong môi trường. Đặt ống đã cấy mẫu vào bể điều nhiệt hoặc đun cách thủy ở 80°C trong thời gian 10 phút, lấy ra làm lạnh ngay dưới vòi nước chảy, hoặc trong tủ lạnh, khi thạch đông, đưa ống mẫu vào nuôi trong tủ ấm ở 37°C trong 24 - 72 h.

Sau 24 giờ đọc kết quả sơ bộ.

Cl.Perfringens tạo nên các khuẩn lạc tròn, màu đen, có đường kính khoảng 1mm trở lên (sau 24 giờ), để lâu các khuẩn lạc sẽ lớn hơn (đường kính 4 - 6mm), có thể xuất hiện các vết nứt hay bọt khí trong cột thạch do hiện tượng sinh hơi.

(Nếu trong môi trường xuất hiện nhiều khuẩn lạc tạp hoặc nghi ngờ, tiến hành thuần khiết giống và kiểm tra tiêu bản qua kính hiển vi, đồng thời tiến hành các phép thử về tính di động, khả năng khử nitrat... (tham khảo TCVN 4991 - 89).

2.6.7.5 Nhận định và báo cáo kết quả

Đánh giá sự có mặt của *Cl.Perfringens* qua việc phát hiện các khuẩn lạc điển hình trong môi trường thạch chọn lọc khi nuôi cấy mẫu thử trong các điều kiện xác định ở trên.

Nha bào (bào tử) *Cl.Perfringens* bền ở nhiệt độ 80°C trong 10 phút, khi phát triển trong môi trường có sulfite có khả năng sinh H₂S làm khuẩn lạc có màu đen.

Cl.Perfringens là vi khuẩn dạng thẳng (que) Gram dương có hình thành bào tử, không di động, và một vài chủng có khả năng khử nitrat.

Có thể tính số lượng *Cl.Perfringens* cho 1ml sản phẩm bằng cách: lấy trung bình cộng của 2 số đếm được ở 2 ống thạch cấy mẫu, chia cho 10 (nếu cấy 10ml mẫu nguyên chất), hoặc tính qui đổi, nếu cấy 10ml từ các dịch pha loãng thập phân của mẫu thử.

2.6.8 Phát hiện tụ cầu khuẩn *St.aureus*

2.6.8.1 Nguyên tắc

Nuôi cấy mẫu thử trong môi trường lỏng tăng sinh chọn lọc, sau đó ria cấy trên bề mặt môi trường thạch chọn lọc trong đĩa Petri. Nuôi mẫu cấy ở 37°C trong 24 - 48 giờ nhận định sự có mặt của *St.aureus* theo các đặc điểm nuôi cấy, hình thái và đặc tính sinh-hóa.

2.6.8.2 Thiết bị và dụng cụ nuôi cấy

Các loại thông dụng của phòng thí nghiệm vi sinh, đảm bảo điều kiện vô trùng.

2.6.8.3 Môi trường dinh dưỡng và thuốc thử (phụ lục).

2.6.8.4 Cách tiến hành

Dùng ống hút vô khuẩn, hút 1ml dịch mẫu thử, cấy vào 2 ống môi trường canh thang tăng sinh chọn lọc (13 hoặc 14) lắc nhẹ để trộn mẫu vào môi trường. Nuôi mẫu cấy trong tủ ấm ở 37°C trong 24 giờ.

Từ các ống đã cấy ở trên, cấy chuyển bằng cách ria cấy lên bề mặt môi trường thạch đĩa (15 a, b) (đã được đổ từ trước và làm khô mặt thạch) sao cho nhận được các khuẩn lạc riêng rẽ.

Nuôi các đĩa thạch này ở tủ ấm 37°C trong 24 - 48 giờ. Trên môi trường thạch Mannit - muối, *St.aureus* hình thành các khuẩn lạc tròn, lồi, bóng, đường kính từ 1 - 3mm. Khuẩn lạc và môi trường xung quanh chúng có màu vàng sáng hoặc hơi sẫm (sau 24 h). Sau 48 giờ, đường kính khuẩn lạc tăng lên, màu khuẩn lạc và môi trường xung quanh trở nên vàng sẫm hơn.

Để khẳng định, chọn vài khuẩn lạc đặc trưng tiến hành làm tiêu bản, nhuộm Gram và soi kính hiển vi, nếu phát hiện hình thái tế bào vi khuẩn điển hình hoặc nghi ngờ, cấy chuyển vào ống môi trường canh thang dextroza (16), nuôi ở 37°C trong 24 giờ để thử phản ứng coagulaza. Sau 24 giờ lấy 0,1ml dịch cấy trên chuyển vào một ống nghiệm nhỏ, có sẵn 0,3 - 0,5ml huyết tương thổ (*) lắc trộn hỗn dịch, đặt vào tủ ấm ở 37°C, cùng với 1 ống nghiệm đối chứng có chứa 0,1ml canh thang vô khuẩn (16) với cùng lượng 0,3 - 0,5ml huyết tương.

(*) Có thể dùng huyết tương thổ (cô đặc) của các hãng hóa chất sinh học, pha chế để sử dụng theo đúng chỉ dẫn của nhà sản xuất. Hoặc dùng huyết tương tách từ máu thỏ, pha loãng 6 lần bằng nước muối sinh lý (8,5%) vô trùng. Kiểm tra chất lượng huyết tương (xem có tụ đông?) trước khi thử phản ứng Coagulaza.

Đọc kết quả sau 2, 4 và 6 giờ. Nếu phản ứng âm tính, giữ các ống nghiệm trên ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ rồi đánh giá kết quả.

St.aureus cho phản ứng Coagulaza dương tính (huyết tương trong ống nghiệm thủ đông lại).

2.6.8.5 Nhận định và báo cáo kết quả

Mẫu thử được coi là có St.aureus khi nuôi cấy trong các điều kiện xác định trên, phát hiện các khuẩn lạc đặc trưng, tiêu bản cho thấy vi khuẩn dạng cầu, Gram dương, sắp xếp hình chùm nho, thành đám hoặc từng cặp, lên men đường manitol làm chuyển màu môi trường chapman từ đỏ sang vàng. Phản ứng coagulaza dương tính.

2.6.9 Xác định vi trùng gây bệnh đường ruột theo TCVN 5518-1991 (ST SEV 6078-87).

Phụ lục

Môi trường dinh dưỡng và thuốc thử xác định các chỉ tiêu vi sinh vật

* Phát hiện vi khuẩn E.Coli

1) Thuốc thử indol (Kovacs)

| | |
|---|---------|
| p-dimetylaminobenzaldehyt | 5,0 g |
| Cồn Amylic (hoặc isoamylic) | 75,0 g |
| axit clohidric (HCl) ρ 20 1,18 đến 1,19 g/ml | 25,0 ml |

Giữ dung dịch trong lọ kín, sẫm màu, tốt nhất ở khoảng 4°C. Thuốc thử phải có màu vàng nhạt hay nâu nhạt.

2) Dung dịch đỏ Metyl

| | |
|----------|--------|
| Đỏ metyl | 0,01 g |
|----------|--------|

Hòa tan trong 30ml cồn 90°, bổ sung nước cất đến 50ml.

3) Dung dịch α - naphtol trong cồn, 5%

4) Dung dịch kali hydroxit 40%

5) Môi trường canh thang EC (môi trường chọn lọc)

| | |
|---|----------|
| Tryptose (hoặc một loại casein hydrolysate) | 20g |
| Lactoza | 5g |
| Muối mật N ^o 3 (oxid, difcô, v.v...) | 1,5g |
| Kali hydrophotphat (K_2HPO_4) | 4,0g |
| Kali dihydrophotphat (KH_2PO_4) | 1,5g |
| Natri clorua (NaCl) | 5,0g |
| Nước cất | 1000,0ml |

Hòa tan các thành phần, đun đến sôi, nếu cần, điều chỉnh pH sao cho cuối cùng là $6,8 \pm 0,1$. Phân phối môi trường vào ống nghiệm 18 x 180mm có ống Durham. Thanh trùng bằng nồi hấp (autoclave) ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút.

6) Môi trường canh thang lacto, - axit aboric

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Pepton | 20g |
| Lactoza | 5g |
| Kali hydrophotphat (K_2HPO_4) | 12,2g |
| Kali dihydrophotphat (KH_2PO_4) | 4,1g |
| Axit boric | 3,25g |
| Nước cất | 1000ml |
| Natri clorua (NaCl) | 5,0g |

Hòa tan các thành phần, nếu cần thiết đun sôi để hòa tan hoàn toàn. Phân phối vào các ống nghiệm có ống Durham. Thanh trùng ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong 15 phút.

7) Nước Pepton (trypton)

| | |
|----------------------|---------|
| Pepton (hay trypton) | 10g |
| Natri Clorua (NaCl) | 5g |
| Nước cất | 1000 ml |

Hòa tan các thành phần, phân phối vào các ống nghiệm, thanh trùng ở $121^\circ C$ trong 15 phút.

8) Môi trường canh thang để thử phản ứng Metyl đỏ (M.R.) và Voges-Proskauer (VP) (Môi trường Clark-lubs)

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Pepton | 5g |
| Glucoza | 5g |
| Kali hydrophotphat (K_2HPO_4) | 5g |
| Nước cất | 1000 ml |

Đun nhẹ, khuấy cho tan hết các thành phần, điều chỉnh sao cho pH cuối cùng là $6,1 \pm 0,1$. Thanh trùng môi trường ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong 15 phút.

9) Môi trường Endô

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| Pepton | 10g |
| Lactoza | 10g |
| Kali hydrophotphat (K_2HPO_4) | 3,5 g |
| Natri sulphit | 2,5 g |
| Thạch bột (aga) | 12 - 15 g (tùy loại chất lượng) |
| Nước cất | 1000 ml |

Đun đến sôi, khuấy để hòa tan các thành phần. Thêm vào môi trường 4ml dung dịch 10% fuchsin base trong cồn etylic 96°. pH cuối cùng của môi trường là 7,5. Thanh trùng ở 121°C trong 15 phút.

10) Môi trường simmon (xitrat)

| | |
|--|-----------|
| Amoni dihydrophotphat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) | 1 g |
| Magie sunphat (MgSO_4) | 0,2 g |
| Kali hydrophotphat (K_2HPO_4) | 1,0 g |
| Natri xitrat | 2,0 g |
| Natri clorua (NaCl) | 5,0 g |
| Thạch (agar) bột | 12 - 15 g |
| Nước cất | 1000 ml |
| Bromothymol xanh | 0,08 g |

Hòa tan các muối vào nước, thêm thạch, đun sôi cho tan hoàn toàn, pH cuối cùng của môi trường là 6,8. Lọc cho trong, nếu cần. Phân phối vào các ống nghiệm. Thanh trùng ở 121°C trong 15 phút. Lấy ra, để hơi nguội, đặt nghiêng ống.

* Môi trường phát hiện vi khuẩn *C. Perfringens*

11) Môi trường Uynxon - Ble (Wilson Blair, cải tiến)

| | |
|--------------------------------|-------------------|
| Cao thịt | 5,0 g |
| Pepton | 10,0 g |
| Natri Clorua (NaCl) | 5,0 g |
| Glucosa | 20,0 g |
| Nước cất | 1000,0 ml |
| Thạch (Aga) (bột) | 15,0 g (tùy loại) |

(Có thể dùng 1000 ml nước thịt cơ bản thay cho thịt cao và nước cất).

Đun sôi và để hòa tan hoàn toàn thành phần. Phân phối vào ống nghiệm 20 x 220 mm, mỗi ống 20 ml môi trường.

Thanh trùng ở 121°C trong 15 phút.

Trước khi sử dụng, đem đun tan chảy.

Thêm vào mỗi ống (bằng thao tác vô trùng) 2,0 ml dung dịch Na_2SO_3 20%.

Và 5 giọt dung dịch phen sắt amoni 5% ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).

12) Môi trường S.P.S (Sulphite-polymyxin-Sulphadiazine) (theo Angoletti)

| | |
|----------------------|----------|
| Pepton (từ casein) | 15,0 g |
| Cao men | 10,0 g |
| Xitrat sắt (III) | 0,5 g |
| Natri sulphite | 0,5 g |
| Polymyxin B Sulphate | 0,01 |
| Sulphadiazin Natri | 0,12 |
| Thạch bột (aga-aga) | 14,0 |
| Nước cất | 1000,0ml |

pH cuối cùng của môi trường là $7,0 \pm 0,1$.

(Trường hợp có sẵn môi trường khô của các hãng hóa chất, có thể dùng thay thế, theo chỉ dẫn của nhà sản xuất).

Các thành phần trên đun tới sôi, khuấy cho tan hết. Phân phối vào ống nghiệm và thanh trùng như môi trường (11).

* Môi trường phát hiện vi khuẩn tụ cầu vàng (St.aureus)

13) Môi trường canh thang muối mặn (tăng sinh chọn lọc)

| | |
|---------------------|-----------|
| Cao thịt | 5,0 g |
| Pepton | 10,0 g |
| Natri Clorua (NaCl) | 75,0 g |
| Nước cất | 1000,0 ml |

(Có thể thay cao thịt và nước cất bằng 1000 ml nước thịt cơ bản).

Chỉnh pH bằng 7,4.

Đun nóng để hòa tan đều các thành phần. Phân phối vào các ống nghiệm 18 x 180 mm. Thanh trùng ở 121°C trong 15 phút.

14) Môi trường canh thang Mannit - muối (tăng sinh chọn lọc).

| | |
|-------------------|--------|
| Pepton panoreatic | 17,0 g |
| Cao men | 3,0 g |
| Mannitol | 10,0 g |

| | |
|---------------------|---------|
| Natri Clorua (NaCl) | 75,0 g |
| Đỏ phenol | 0,025 g |

Hòa tan tới sôi cho tan hết các thành phần, chỉnh pH sao cho cuối cùng pH = $7,4 \pm 0,1$. Phân phối vào các ống nghiệm 18 x 180 mm. Thanh trùng ở 121°C trong 12 phút.

15) Môi trường thạch Mannit-muối (Chapman, cải tiến)

| | |
|-----------------------------|-------------------|
| a) Canh thang muối mặn (13) | 1000 ml |
| Mannitol | 10,0 g |
| Đỏ phenol | 0,025 g |
| Thạch bột (agar) | 15,0 g (tùy loại) |

Dun sôi kỹ cho tan hết thạch, phân phối vào các bình có dung tích thích hợp. Thanh trùng ở 121°C trong 12 phút.

| | |
|-----------------------|-------------------|
| b) Canh thang (14) | 1000 ml |
| Thạch (agar-agar) bột | 15,0 g (tùy loại) |

Phân phối và thanh trùng như trên.

16) Môi trường canh thang dextroza (glucoza)

| | |
|--------------------|-----------|
| Cao thịt | 3,0 g |
| Pepton | 10,0 g |
| Natri Clorua | 5,0 g |
| Dextroza (Glucoza) | 5,0 g |
| Nước cất | 1000,0 ml |

(Có thể dùng 1000 ml nước thịt cơ bản thay chỗ cao thịt và nước cất).

Dun nóng để hòa tan hết các thành phần, chỉnh cho pH cuối cùng là 7,4. Phân phối vào các ống nghiệm 18 x 180 mm. Thanh trùng ở 121°C trong 12 phút.