

**Số: 150/QĐ-UB**

*TP. Hồ Chí Minh, ngày 03 tháng 06 năm 1988*

## **QUYẾT ĐỊNH**

**Về việc ban hành tiêu chuẩn địa phương về :  
Bột nê-m hỗn hợp  
Phương pháp thử vi sinh  
Ký hiệu 53 TCV 136-88**

### **ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

- Căn cứ Luật Tổ chức Hội đồng nhân dân và Ủy ban nhân dân đã được Quốc hội thông qua ngày 30 tháng 6 năm 1983 ;
- Căn cứ Nghị định số 141/HĐBT ngày 24 tháng 8 năm 1982 của Hội đồng Bộ trưởng ban hành Điều lệ về công tác tiêu chuẩn hóa ;
- Căn cứ Thông tư số 488/KHKT-TT ngày 5 tháng 6 năm 1966 của Ủy ban Khoa học và kỹ thuật Nhà nước về việc xây dựng, xét duyệt, ban hành và quản lý tiêu chuẩn kỹ thuật địa phương của sản phẩm công nghiệp, nông nghiệp ;
- Xét duyệt yêu cầu cần thiết của công tác quản lý kỹ thuật ở thành phố Hồ Chí Minh.
- Theo đề nghị của đồng chí Chủ nhiệm Ủy ban Khoa học và kỹ thuật thành phố Hồ Chí Minh.

## **QUYẾT ĐỊNH**

**Điều 1.** - Nay ban hành kèm theo quyết định này Tiêu chuẩn địa phương về: BỘT NÊM HỖN HỢP – Phương pháp thử vi sinh, ký hiệu 53TCV 136-88.

**Điều 2.** – Tiêu chuẩn này là căn cứ để đánh giá chất lượng, sản phẩm trong phạm vi sản xuất (thuộc các cơ sở quốc doanh, công tư hợp doanh, tập thể và cá thể) cũng như trong lưu thông phân phối.

**Điều 3.** – Các cơ quan quản lý phải đôn đốc, theo dõi, kiểm tra đề nghị khen thưởng những cơ sở thực hiện tốt tiêu chuẩn đã ban hành và xử lý những cơ sở làm ăn gian dối.

**Điều 4.** Tiêu chuẩn này có hiệu lực kể từ ngày ký và được lưu hành trong toàn thành phố.

**Điều 5.** – Các đồng chí Chánh văn phòng Ủy ban nhân dân thành phố, Chủ nhiệm Ủy ban khoa học và kỹ thuật thành phố, Thủ trưởng các Sở, ban, ngành thành phố, Liên hiệp xã thành phố, Chủ tịch Ủy ban nhân dân các quận, huyện và các cơ sở liên quan đến sản xuất và kinh doanh mặt hàng này trong thành phố chịu trách nhiệm thi hành quyết định này.

**T/M ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ**  
**K/T.Chủ tịch**  
**Phó Chủ tịch**

**Đã ký: NGUYỄN VĂN HUẤN**

**TIÊU CHUẨN ĐỊA PHƯƠNG**  
**BỘT NÊM HỖN HỢP**  
**PHƯƠNG PHÁP THỬ VI SINH**  
**53 TCV 136-88**

- Cơ quan biên soạn tiêu chuẩn :

Trung tâm Tiêu chuẩn – Đo lường – Chất lượng khu vực III.

- Cơ quan đề nghị ban hành :

Chi cục Tiêu chuẩn – Đo lường – Chất lượng

- Cơ quan trình duyệt :

Ủy ban Khoa học và kỹ thuật thành phố Hồ Chí Minh.

- Cơ quan xét duyệt và ban hành :

Ủy ban nhân thành phố Hồ Chí Minh.

Quyết định ban hành số : 150/QĐ-UB, ngày 3-6-1988.

**TIÊU CHUẨN ĐỊA PHƯƠNG**

<b>CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM</b> <b>ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH</b>	<b>BỘT NÊM HỖN HỢP</b>	53 TCV 136-88
	Phương pháp thử vi sinh	Có hiệu lực từ :

Tiêu chuẩn này áp dụng cho mặt hàng bột nêm hỗn hợp được sản xuất và lưu thông phân phối trong phạm vi thành phố Hồ Chí Minh.

**1.- Chuẩn bị thử**

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

- Đèn cồn hay đèn gaz.
  - Que cấy các loại.
  - Dao, kéo, thìa, đĩa thủy tinh.
  - Khay men.
  - Ống nghiệm.
  - Đĩa Petri.
  - Pipet 1ml, 2ml, 10ml.
  - Bông thấm nước.
  - Cồn êtylic 70% và 90%.
  - Môi trường các loại dùng kiểm tra vi sinh vật (Xem phục lục đính kèm).
  - Phẩm nhuộm gram.
  - Lọ đựng dung dịch sát khuẩn các pipet đã dùng (sulforonic, Natri hydroxit).
  - Tủ sấy  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .
  - Kính hiển vi.
  - Lame, Lamelle.
  - Cân kỹ thuật 0,1kg
  - Tủ sấy dụng cụ.
  - Nồi hấp (Autoclave).
  - Bếp cách thủy.
- Chú ý* : Toàn bộ dụng cụ kiểm tra phải bảo đảm vô trùng.

### 1.2. Phòng vô trùng.

- Lau chùi phòng, đốt cồn bán trắng men, sau đó mở đèn cực tím 30 phút trước khi tiến hành thử.

### 1.3. Xử lý mẫu kiểm tra.

- Phải kiểm tra độ kín của bao bì và tiến hành dùng cồn lau sạch phía ngoài

bao bì, sau đó đưa mẫu vào phòng kiểm tra.

- Cho 10g bột nê-m đã được cân chính xác đến 0,1g vào 90ml nước cất đã tiệt khuẩn, lắc trộn mẫu pha loãng cho đều. Ta có đậm độ  $10^{-1}$ .

- Nếu cần có thể pha loãng mẫu thành các dung dịch  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ... với nước cất đã tiệt khuẩn.

*Chú ý* : Chỉ chuẩn bị làm mẫu ngay khi tiến hành pha loãng không quá 15 phút .

## **2- Tiến hành thử**

### 2.1. Tổng số vi sinh vật hiếu khí

#### 2.1.1. Môi trường .

- Thạch đếm.
- Nước cất đã tiệt khuẩn.

#### 2.1.2. Nuôi cấy .

Cho vào hai đĩa petri, mỗi đĩa 1ml dung dịch mẫu ở những nồng độ thích hợp (thường cấy 3 nồng độ liên tục). Đổ khoảng 15-20 ml thạch đếm đã đun tan chảy và để nguội đến  $45-50^{\circ}\text{C}$  vào đĩa đã cấy mẫu. Xoay nhẹ theo chiều và ngược chiều kim đồng hồ để dung dịch mẫu được trộn đều trong môi trường nuôi cấy. Để đông tự nhiên lật ngược đĩa petri. Đặt ở tủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$  trong 24 giờ. Đọc kết quả.

#### 2.1.3. Đọc kết quả.

Dùng mắt thường hoặc qua kính phóng đại trong ánh đèn để đếm số khuẩn lạc đã mọc trên đĩa petri. Chỉ chọn các đĩa mà số khuẩn lạc nằm trong khoảng 30-300.

#### 2.1.4. Tính kết quả.

Nhân số khuẩn lạc đếm được với hệ số pha loãng tương ứng. Tính trung bình cộng của số vi sinh vật có ở cùng nồng độ. Sau đó tính 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 1g sản phẩm.

## 2.2. Escherichia Coli.

### 2.2.1. Môi trường

- Canh thang mật bò lục sáng lactose 2%.
- Nước Peptone.
- Thạch thường.
- EMP (hoặc Mac conkey).
- Clark luds.
- Citrate simmons.

### 2.2.2. Nuôi cấy

2.2.2.1. Lấy 1ml nước mẫu vào một ống canh thang mật bò lục sáng lactose 2% để ở 37<sup>0</sup>C trong 24-48 giờ. Quan sát sự lên men đường lactose (sinh hơi hoặc không sinh hơi).

Phân lập tiếp trên thạch đĩa EMP (hoặc Mac conkey). Ủ 37<sup>0</sup>C trong 24-48 giờ. Nếu phát hiện thấy khuẩn lạc có màu xanh đen với ánh kim loại trên môi trường EMP hoặc khuẩn lạc có màu đỏ trên môi trường Mac conkey, tính khuẩn lạc riêng sẽ nhuộm gram để kiểm tra hình thái và cấy để chuyển sang thạch thường. Ủ 37<sup>0</sup>C trong 24-48 giờ. Trên môi trường thạch thường khuẩn lạc nghi ngờ có dạng tròn đều, đường kính 1-2mm, đẹp, trắng, bóng.

### 2.2.2.2. Thực hiện phản ứng IMVIC.

#### 2.2.2.2.1. Phản ứng sinh Indol

Cấy truyền vi khuẩn nghi ngờ từ thạch thường vào nước peptone. Ủ 37<sup>0</sup>C trong 24 giờ. Cho 0.5ml thuốc thử kovac vào nước peptone đã cấy vi khuẩn trên. Phản ứng dương khi có màu tím đỏ xuất hiện trên lớp thuốc thử.

#### 2.2.2.2.2. Phản ứng MR

Cấy truyền vi khuẩn nghi ngờ từ thạch thường vào môi trường Clark luds. Ủ 37<sup>0</sup>c trong 48-96 giờ. Dùng pipet hút 5 ml canh khuẩn Clark luds vào 1 ống nghiệm khác dùng cho phản ứng vặn phòng.

Canh khuẩn còn lại cho 5 giọt metyl đỏ 0,2% vào. Phản ứng dương khi

môi trường có màu đỏ ngay sau khi cho thuốc thử vào.

#### 2.2.2.2.3. Phản ứng VP

##### a) Phương pháp 1

- Cho 5ml dung dịch ammonium sulfat đồng vào 5ml canh khuẩn Clark luds ở phần 2.2.2.2.2.

- Phản ứng dương khi có màu đỏ xuất hiện trong vòng 15-20 phút sau khi cho thuốc thử vào.

##### b) Phương pháp 2

- Cho 5 ml dung dịch ec-naptol 5% và 1ml dung dịch KOH 40% vào 5 ml canh khuẩn Clark lubs ở phần 2.2.2.2.2.

- Phản ứng dương khi có màu đỏ xuất hiện trong vòng 15-20 phút sau khi cho thuốc thử vào.

#### 2.2.2.2.4. Phản ứng Citrate.

Cấy truyền vi khuẩn nghi ngờ từ thạch thường vào môi trường citrate simmons. Đặt ở tủ ấm 37<sup>0</sup>C trong 24 giờ.

Phản ứng dương khi môi trường chuyển sang màu xanh dương.

#### 2.2.3. Kết luận.

Xác định E.Coli nhiễm phân khi phát hiện trực khuẩn gram âm với các tính chất sinh hóa sau:

	<b>Indol</b>	<b>MR</b>	<b>VP</b>	<b>Citrate</b>
E.Coli Type I	+	+	-	-
E.Coli Type II	-	+	-	-

*Chú thích* : Có một vài E.Coli cho phản ứng Indol âm như E.Coli type II.

### 2.3. Staphylococcus aureus

#### 2.3.1. Môi trường

- Môi trường tăng sinh canh thang mặn NaCl 7,5%.
- Môi trường Chapman
- Huyết tương thỏ để thử Coagulaza

#### 2.3.2. Nuôi cấy

Cấy 1ml mẫu pha loãng 1/10 vào môi trường canh thang mặn 7,5% để ở 37<sup>0</sup>C trong 24 giờ.

Cấy chuyển sang thạch Chapman (đổ đĩa petri) bằng phương pháp cấy bia ở 37<sup>0</sup>C trong 24 giờ.

#### 2.3.3. Đọc kết quả.

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

Lên men đường manitol môi trường chapman chuyển từ màu hồng cam sang màu vàng.

Nhuộm gram: Chọn khuẩn lạc riêng rẽ điển hình nhuộm gram tím tụ cầu hình chùm nho, gram dương.

- Tiếp tục làm phản ứng coagulaza

- Hút 5ml huyết tương thỏ vào ống nghiệm 12mm, cho vào ống vài giọt canh trùng hoặc khuẩn lạc nghi vấn đã nuôi cấy 24 giờ, để ủ ấm 37<sup>0</sup>C trong 24 giờ, đọc kết quả sau 6 giờ và sau 24 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 thỏ và vài giọt nước cất đã tiệt trùng. Kết quả dương tính khi huyết tương thỏ đã cấy vi khuẩn bị đông.

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



#### 2.3.4. Kết luận.

Xác định có staphylococcus aureus khi phát hiện tụ cầu gram dương với các tính chất sau :

- Lên men đường manitel
- Làm đông huyết dương.

#### 2.4. Streptococcus faecalis.

##### 2.4.1. Môi trường

- Canh thang axit glucose
- Thạch SF
- Thạch 40% mật
- Canh thang glucose, 6,5% NaCl

##### 2.4.2. Nuôi cấy

2.4.2.1. Lấy 1ml nước mẫu vào canh thang axit glucose, Ủ 37<sup>0</sup>C trong 24-48 giờ sau đó phân lập trên thạch SF. Ủ 37<sup>0</sup>C trong 24 giờ. Trên thạch SF, khuẩn lạc nghi ngờ có dạng tròn, nhỏ, biên đều, bóng trắng và làm môi trường đổi từ màu tím sang màu vàng.

Chọn khuẩn lạc nghi ngờ riêng sẽ nhuộm gram, tìm khuẩn cầu gram dương.

##### 2.4.2.2. Tính chất phát triển trên môi trường có 40% mật.

Lấy chuyển vi khuẩn nghi ngờ từ thạch SF vào môi trường thạch có 40% mật. Ủ 37<sup>0</sup>C trong 24-48 giờ và quan sát sự phát triển của vi khuẩn. Vi khuẩn có khả năng phát triển trên môi trường thạch mật khi có khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường này.

##### 2.4.2.3. Tính chất phát triển trên môi trường 6,5% NaCl.

Lấy chuyển vi khuẩn nghi ngờ từ thạch SF vào môi trường canh thang 6,5% NaCl. Ủ 45<sup>0</sup>C trong 24-48 giờ và quan sát sự phát triển của vi khuẩn. Ở môi trường canh thang này, streptococcus faecalis thường mọc thành những hạt nhỏ, trắng và lắng xuống đáy ống làm môi trường vẫn trong như khi chưa cấy.

### 2.4.3. Kết luận.

Xác định có streptococcus faecalis khi phát hiện chuỗi cầu gram dương với các tính chất sau :

- Phát triển trên môi trường thạch 40% mật
- Phát triển trên canh thang 6,5% NaCl.

### 2.5. Clostridium perfringens.

#### 2.5.1. Môi trường.

- Tarosi.
- Canh thang VF.
- Thạch VF.
- Thạch Wilson Blair.
- Môi trường sữa.

#### 2.5.2. Nuôi cấy.

2.5.2.1. Lấy 1ml nước mẫu vào môi trường tarosi có paraffin đặc cho vào bếp cách thủy 85<sup>0</sup>C trong 15 phút. Ủ 37<sup>0</sup>C trong 24-96 giờ. Quan sát hiện tượng sinh hơi đẩy đĩa parafin lên.

2.5.2.2. Đốt sáng đĩa thủy tinh cho xuyên qua đĩa parafin để phân lập trong thạch VF. Cách phân lập trong thạch VF :

- Dùng pipet nhúng vào canh thang tarosi rồi lấy lần lượt vào 4-6 ống thạch VF (đã đun cách thủy 100<sup>0</sup>C trong 20 phút và làm nguội dưới vòi nước đến 45-54<sup>0</sup>C) làm lạnh ngay dưới vòi nước.

- Ủ 37<sup>0</sup>C trong 24-96 giờ. Tìm các khuẩn lạc hình tim, hình hạt đậu cách mặt thạch từ 2-3cm.

2.5.2.3. Chọn khuẩn lạc nghi ngờ nhuộm gram. Nếu có trực khuẩn gram dương, to, tiếp tục cấy sang canh thang VF. Ủ 37<sup>0</sup>C trong 24 giờ để khảo sát tính chất sinh hóa.

#### 2.5.2.4. Tính chất H<sub>2</sub>S.

Hút 1 ml canh thang VF vào môi trường Wilon Blair đã đun tan chảy thạch và để nguội 45-50<sup>0</sup>C, cho thêm 2ml dung dịch Natri sulfidic 20 và 5 giọt dung dịch phenol 5%. Trộn đều bằng cách lắc ống. Đun cách thủy 75<sup>0</sup>C trong 5 phút. Lấy ra làm đông ngay dưới vòi nước chảy hay để trong tủ lạnh. Sau đó lau khô. Bịt giấy đầu ống để nuôi ở tủ ấm 37<sup>0</sup>C trong 24-72 giờ. Vi khuẩn H<sub>2</sub>S sẽ cho những khuẩn lạc màu đen.

#### 2.5.2.5. Tính chất làm đông sữa.

2.5.2.5.1. Đun cách thủy môi trường sữa ở 100<sup>0</sup>C trong 20 phút. Làm nguội dưới vòi nước chảy ấm 45-50<sup>0</sup>C. Cho vào môi trường từ 1-2 ml dầu parafin.

2.5.2.5.2. Cấy 1ml canh khuẩn VF vào môi trường sữa, chú ý không để bọt khí từ pipet vào môi trường. Ủ 37<sup>0</sup>C trong 24-48 giờ và quan sát hiện tượng đông sữa.

#### 2.5.3. Kết luận.

Xác định có Welchinperfringens khi phát hiện có trực khuẩn gram dương to với các tính chất sinh hóa sau :

- Có khuẩn lạc đặc trưng trong thạch VF.
- Có khả năng sinh H<sub>2</sub>S.
- Có khả năng làm đông sữa.

ỦY BAN NHÂN DÂN THÀNH PHỐ