

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN PHÂN TÍCH	Mã số: HD.VS.006 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 20/06/2018 Trang:1/9
--	----------------------------	--

**PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG TỔNG SỐ VI SINH VẬT HIẾU KHÍ – ĐẾM
KHUẨN LẠC Ở 30°C BẰNG KỸ THUẬT ĐỔ ĐĨA**

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Lê Thuỳ Quyên	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi format SOP	01/03/2017
2	C	Bổ sung các trường hợp và ví dụ cụ thể tính kết quả	20/06/2018

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.VS.006 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 20/06/2018 Trang:2/9</p>
---	-----------------------------------	---

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

- Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng vi sinh vật trên đĩa thạch bằng cách đếm khuẩn lạc phát triển trong môi trường đặc sau khi ủ trong điều kiện hiếu khí ở 30°C.
- Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các sản phẩm dùng cho người hoặc thức ăn chăn nuôi; các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất, chế biến thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.
- Tiêu chuẩn này áp dụng cho:
 - o Các sản phẩm yêu cầu số lượng khuẩn lạc phát hiện được dưới mức quy định (dưới 10^2 cfu/g hoặc 10^2 cfu/ml đối với dạng lỏng và 10^3 cfu/g đối với dạng rắn).
 - o Các sản phẩm dự kiến có có khuẩn lạc mọc lan che khuất các khuẩn lạc của vi sinh vật khác như sữa và các sản phẩm của sữa có thể chứa *Bacillus* spp. mọc lan

II. Tài liệu tham khảo

- Phương pháp này được tham chiếu theo: *TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013)*

III. Nguyên lý phương pháp

- Trong phương pháp này, tổng số vi sinh vật hiếu khí được xác định bằng cách đếm khuẩn lạc được hình thành trong môi trường Plate Count Agar (PCA) khi ủ trong điều kiện hiếu khí ở 30°C trong 72h.

IV. An toàn Phòng thử nghiệm

- Các phương pháp an toàn phòng thí nghiệm cần được thực hiện nghiêm ngặt như sử dụng áo blouse, găng tay, khẩu trang... khi cần thiết
- Không ăn uống trong phòng thí nghiệm.
- Các môi trường sau khi nuôi cấy phải được hấp tiệt trùng trước khi thải.

V. Bảo quản mẫu

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ

- Cân kỹ thuật
- Tủ ấm, có khả năng ủ ở $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN PHÂN TÍCH	Mã số: HD.VS.006 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 20/06/2018 Trang:3/9
--	----------------------------	--

- Nồi hấp autoclave
- Nồi cách thủy: có thể hoạt động từ 44°C đến 47°C
- Máy dập mẫu Stomacher
- Thiết bị đếm khuẩn lạc
- Máy đo pH
- Đĩa petri
- Pipet 1ml
- Ống nghiệm, bình hoặc chai có dung tích thích hợp và không lớn hơn 500ml

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

1. Dung dịch muối pepton: => Ghi chép vào “BM.VS.002.06**”**

- Pepton từ casein 1.0g
- Natri Clorua 8.5g
- Nước 1000ml
- Hòa tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần.
- Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là 7.0 ± 0.2 ở 25°C, nếu cần.
- Phân phối 9ml hỗn hợp trên vào mỗi ống nghiệm. Đậy nắp các ống nghiệm. Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C

2. Môi trường PCA (Plate Count Agar) => Ghi chép vào “BM.VS.002.06**”**

- Cân môi trường theo quy định của nhà sản xuất. Hoà tan bằng cách đun nóng.
- Khi kiểm tra các sản phẩm sữa, cho 1,0g bột sữa gầy vào 1000ml môi trường cấy. Bột sữa gầy không được chứa các chất gây ức chế.
- Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 7.0 ± 0.2 ở 25°C, nếu cần.
- Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C
- Nếu môi trường được sử dụng ngay thì làm nguội trong nồi cách thủy đến nhiệt độ từ 44°C đến 47°C trước khi sử dụng.
- Nếu không dùng ngay, thì bảo quản nơi tối ở nhiệt độ $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ không quá 3 tháng dưới các điều kiện không làm thay đổi thành phần và đặc tính của nó.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN PHÂN TÍCH	Mã số: HD.VS.006 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 20/06/2018 Trang:4/9
--	----------------------------	--

3. Môi trường phù: => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06”**

- Thạch 15g
- Nước 1000ml
- Cho thạch vào nước và đun đến sôi, thường xuyên khuấy cho đến khi tan hết thạch, hoặc dùng hơi nước trong khoảng 30 phút.
- Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là 7.0 ± 0.2 ở 25°C , nếu cần.
- Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C
- Nếu môi trường được sử dụng ngay thì làm nguội trong nồi cách thủy đến nhiệt độ từ 44°C đến 47°C trước khi sử dụng.
- Nếu không dùng ngay, thì bảo quản nơi tối ở nhiệt độ $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ không quá 3 tháng dưới các điều kiện không làm thay đổi thành phần và đặc tính của nó.

III. Quy định thực hiện QA/QC

- Thực hiện mẫu blank

IV. Quy trình phân tích

1. Chuẩn bị dung dịch pha loãng ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo:

- Dung dịch pha loãng ban đầu: Cân 10g (hoặc 10ml) mẫu cần kiểm tra cho vào bình tam giác có chứa 90ml dung dịch muối pepton đã được khử trùng-> nồng độ pha loãng ban đầu (10^{-1})
- Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo: Hút 1ml dung dịch pha loãng ban đầu (10^{-1}) cho vào ống nghiệm có chứa 9ml dung dịch muối pepton đã được khử trùng-> nồng độ pha loãng 10^{-2}
- → Lặp lại trình tự trên với các dịch pha loãng tiếp theo, sử dụng pipet mới vô trùng đối với mỗi dung dịch pha loãng thập phân, nếu cần.

2. Cấy và ủ:

- Lấy hai đĩa petri vô trùng. Dùng pipet vô trùng cho vào mỗi đĩa 1ml mẫu thử (nếu sản phẩm là chất lỏng) hoặc 1ml dung dịch pha loãng (nếu sản phẩm ở dạng khác)
- Lặp lại trình tự này với các dịch pha loãng tiếp theo, sử dụng pipet mới vô trùng đối với mỗi dung dịch pha loãng thập phân.

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.VS.006 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 20/06/2018 Trang:5/9</p>
---	-----------------------------------	---

- Lưu ý: Chỉ chọn các bước pha loãng tới hạn (ít nhất hai dung dịch pha loãng thập phân liên tiếp) để cấy các đĩa petri sao cho thu được số đếm từ 15 khuẩn lạc đến 300 khuẩn lạc trên mỗi đĩa petri.
- Rót vào mỗi đĩa Petri khoảng từ 12ml đến 15ml môi trường thạch PCA đã được hấp tiệt trùng và làm nguội trong nồi cách thủy đến nhiệt độ từ 44°C đến 47°C
- Lưu ý: Thời gian từ khi chuẩn bị xong mẫu đến khi rót môi trường vào đĩa không được vượt quá 45 phút.
- Trộn cẩn thận dịch cấy với môi trường bằng cách xoay đĩa petri và để cho hỗn hợp đông đặc lại bằng cách đặt các đĩa petri trên bề mặt nằm ngang, mát.
- Sau khi đông đặc hoàn toàn và chỉ khi nào nghi ngờ sản phẩm cần kiểm tra có chứa các vi sinh mà khuẩn lạc của chúng có thể mọc lan trên khắp bề mặt của môi trường, thì rót khoảng 4ml môi trường phủ đã được hấp tiệt trùng và làm nguội trong nồi cách thủy đến nhiệt độ từ 44°C đến 47°C lên bề mặt môi trường đã cấy. Để cho đông đặc như mô tả ở trên.
- Lật ngược các đĩa đã cấy mẫu và đặt vào tủ ấm ở 30°C ± 1°C trong 72h ± 3h. Không xếp chồng cao quá sáu đĩa. Các chồng đĩa cần được tách khỏi nhau và cách xa thành và nóc tủ.

3. Đếm khuẩn lạc:

- Sau giai đoạn ủ qui định, đếm các khuẩn lạc trên các đĩa, sử dụng dụng cụ đếm khuẩn lạc, nếu cần.
- Lưu ý: Các khuẩn lạc chính phải được đếm và tránh đếm nhầm với các hạt không hòa tan hoặc chất kết tủa trên đĩa. Kiểm tra cẩn thận các khuẩn lạc nghi ngờ, khi cần nên dùng kính lúp có độ khuếch đại lớn hơn để phân biệt các khuẩn lạc với tạp chất lạ.
- Các khuẩn lạc mọc lan rộng được coi là các khuẩn lạc đơn lẻ. Nếu ít hơn một phần tư đĩa mọc dày lan rộng, thì đếm các khuẩn lạc trên phần đĩa còn lại và tính số tương ứng cho cả đĩa. Nếu quá một phần tư đĩa bị mọc dày lan rộng thì loại bỏ đĩa và không đếm.

C. TÍNH KẾT QUẢ

- Tính số lượng tổng số vi sinh vật hiếu khí có trong một mililit hoặc trong một gam sản phẩm, đơn vị tính là CFU/ml hay CFU/g.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN PHÂN TÍCH	Mã số: HD.VS.006 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 20/06/2018 Trang:6/9
--	----------------------------	--

- Trường hợp 1: Nếu có 1 hộp petri có số khuẩn lạc dao động trong khoảng 25-250 hoặc chỉ có 1 độ pha loãng với 2 hộp petri có số khuẩn lạc dao động từ 25-250 Công thức tính :

$$N = \frac{C1+C2}{2 \times d}$$

Trong đó:

N- số khuẩn lạc có trong 1mL mẫu huyền phù ban đầu

C1, C2 – số khuẩn lạc đếm được trên 2 hộp petri ở độ pha loãng đã chọn

d- hệ số pha loãng mẫu

- Ví dụ 1: Tính số khuẩn lạc có trong 1 mL mẫu ban đầu, biết số liệu thí nghiệm như sau:

Hệ số pha loãng	Số khuẩn lạc đếm được	
	Hộp petri 1	Hộp petri 2
10^{-1}	40	20
10^{-2}	6	3

Số khuẩn lạc trong 1 mL mẫu ban đầu là: $N = \frac{40+20}{2 \times 10^{-1}} = 3.102 \text{ khuẩn lạc / mL}$

Trường hợp 2: Ở 2 độ pha loãng liên tiếp, các hộp petri có số khuẩn lạc dao động từ 25-250. Khi đó, ta phải tính kết quả cho từng độ pha loãng.

- Nếu kết quả thu được ở 2 độ pha loãng liên tiếp chênh lệch nhau 2 lần hoặc nhỏ hơn, ta tính như sau:

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0.1 \cdot n2) \times d}$$

Trong đó:

N- số khuẩn lạc có trong 1 mL mẫu huyền phù ban đầu

C- số khuẩn lạc đếm được trên các hộp petri đã chọn

n1, n2 – số hộp petri ở hai độ pha loãng liên tiếp đã chọn

d- hệ số pha loãng mẫu

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN PHÂN TÍCH</p>	<p>Mã số: HD.VS.006 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 20/06/2018 Trang:7/9</p>
---	-----------------------------------	---

Ví dụ 2.1:

- Ở độ pha loãng 10^{-2} , số khuẩn lạc đếm được trên 2 hộp petri là 151 và 215. Suy ra, số khuẩn lạc trong 1 mL mẫu ban đầu là:

$$N = \frac{151+215}{2 \cdot 10^{-2}} = 1,8 \cdot 10^4 \text{ khuẩn lạc/mL}$$

- Ở độ pha loãng 10^{-3} , số khuẩn lạc đếm được trên 2 hộp petri là 25 và 31. Suy ra, số khuẩn lạc trong 1 mL mẫu ban đầu là:

$$N = \frac{25+31}{2 \cdot 10^{-3}} = 2,8 \cdot 10^4 \text{ khuẩn lạc/mL}$$

- Vì chênh lệch giữa $1,8 \cdot 10^4$ và $2,8 \cdot 10^4$ không lớn hơn 2 lần, nên kết quả cuối cùng như sau:

$$N = \frac{151+215+25+31}{(2+0,12) \cdot 10^{-2}} = 1,9 \cdot 10^4 \text{ khuẩn lạc/mL}$$

- Nếu kết quả thu được ở 2 độ pha loãng liên tiếp chênh lệch nhau lớn hơn 2 lần, ta sử dụng độ pha loãng nhỏ hơn để tính

Ví dụ 2.2:

- Ở độ pha loãng 10^{-2} , số khuẩn lạc đếm được trên 2 hộp petri là 180 và 250. Suy ra, số khuẩn lạc trong 1mL mẫu ban đầu là:

$$N = \frac{180+250}{2 \cdot 10^{-2}} = 2,2 \cdot 10^4 \text{ khuẩn lạc/mL}$$

- Ở độ pha loãng 10^{-3} , số khuẩn lạc đếm được trên 2 hộp petri là 60 và 75. Suy ra, số khuẩn lạc trong 1mL mẫu ban đầu là:

$$N = \frac{60+75}{2 \cdot 10^{-3}} = 6,8 \cdot 10^4 \text{ khuẩn lạc/mL}$$

- Vì chênh lệch giữa $2,2 \cdot 10^4$ và $6,8 \cdot 10^4$ lớn hơn 2 lần, nên ta sẽ sử dụng độ pha loãng nhỏ hơn 10^{-2} để tính kết quả. Số khuẩn lạc có trong 1mL mẫu ban đầu sẽ là $2,2 \cdot 10^4$

Trường hợp 3: Tất cả các hộp petri đều có số khuẩn lạc nhỏ hơn 25. Khi đó, ta sẽ chọn hệ số pha loãng thấp nhất để tính kết quả.

Ví dụ 3: kết quả thí nghiệm thu được như sau:

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN PHÂN TÍCH	Mã số: HD.VS.006 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 20/06/2018 Trang:8/9
--	----------------------------	--

Hệ số pha loãng	Số khuẩn lạc đếm được	
	Hộp petri 1	Hộp petri 2
10^{-1}	20	15
10^{-2}	3	2

Chọn hệ số pha loãng thấp nhất là 10^{-1} . Số khuẩn lạc có trong 1mL mẫu ban đầu là:

$$N = \frac{20+15}{2.10^{-1}} = 1.8.10^2 \text{ khuẩn lạc/mL}$$

Trường hợp 4: Tất cả các hộp petri đều có số khuẩn lạc lớn hơn 250. Khi đó, ta sẽ chọn hệ số pha loãng cao nhất để tính.

Ví dụ 4: Kết quả thí nghiệm như sau:

Hệ số pha loãng	Số khuẩn lạc đếm được	
	Hộp petri 1	Hộp petri 2
10^{-4}	2550	2800
10^{-5}	260	300

Chọn hệ số pha loãng cao nhất là 10^{-5} . Số khuẩn lạc có trong 1mL mẫu ban đầu là:

$$N = \frac{260+300}{2.10^{-5}} = 2.8.10^7 \text{ khuẩn lạc/mL}$$

Trường hợp 5: Không có khuẩn lạc nào mọc trên tất cả các hộp petri. Khi đó, ta sẽ ghi kết quả là có ít hơn ($1 \times \frac{1}{d}$) khuẩn lạc. Trong đó, d là hệ số pha loãng thấp nhất.

Ví dụ 5: Hệ số pha loãng mẫu lần lượt là 10^{-3} , 10^{-5} và 10^{-7} . Sau khi nuôi cấy không thấy có khuẩn lạc nào phát triển trên tất cả các hộp petri. Ta ghi kết quả như sau: $< 1.10^{-3}$ khuẩn lạc trong 1mL mẫu ban đầu.

D. BẢO ĐẢM KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

- Mẫu blank không phát hiện tổng vi sinh vật hiếu khí

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

- Biểu thị kết quả vào biểu mẫu **BM.VS.006.03**

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN PHÂN TÍCH	Mã số: HD.VS.006 Lần ban hành: 03 Ngày ban hành: 20/06/2018 Trang:9/9
--	----------------------------	--

- Báo cáo kết quả vào biểu mẫu **BM.15.06**