

PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG NẤM MEN VÀ NẤM MỐC – KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC TRONG CÁC SẢN PHẨM CÓ HOẠT ĐỘNG NƯỚC ≥ 0.95

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Thị Lê Huyền	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

[illegible]

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.VS.015 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 2/7</p>
---	-----------------------------------	--

A. TỔNG QUAN

I. Phạm vi áp dụng

- Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc sống trong các sản phẩm thực phẩm hoặc trong thức ăn chăn nuôi có hoạt độ nước lớn hơn 0,95 (trứng, thịt, sản phẩm sữa (trừ sữa bột), rau, quả, các loại pate tươi...) bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các sản phẩm dùng cho người hoặc thức ăn chăn nuôi.

II. Tài liệu tham khảo

- Tiêu chuẩn này được tham chiếu theo: *TCVN 8275-1: 2010 (ISO 21527-1:2008)*

III. Nguyên lý phương pháp

- Số lượng nấm men và nấm mốc trong một gam hoặc một mililit mẫu được tính từ số lượng khuẩn lạc thu được trên đĩa thạch chứa môi trường chọn lọc ở các mức pha loãng tạo ra các khuẩn lạc có thể đếm được. Nấm men và nấm mốc được đếm riêng nếu cần.

IV. An toàn phòng thí 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

- Số lượng vi sinh vật trong mẫu tăng rất nhanh trong điều kiện nhiệt độ phòng, dẫn đến cho kết quả không chính xác so với thực tế.
- Để khắc phục ảnh hưởng này, nên thực hiện phân tích mẫu càng sớm càng tốt.
- Nếu không phân tích được ngay thì phải bảo quản mẫu:
 - sản phẩm không dễ phân hủy: nhiệt độ môi trường (từ 18°C đến 27°C);
 - sản phẩm đông lạnh và đông lạnh sâu: dưới -15°C , tốt nhất là dưới -18°C ;
 - các sản phẩm khác dễ phân hủy ở nhiệt độ môi trường, kể cả thực phẩm bị hỏng: từ $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ và phải được phân tích mẫu không quá 24h.

Tham khảo TCVN 6404:2016, TCVN 6507-2 đến TCVN 6507-5

<p>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</p>	<p>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</p>	<p>Mã số: HD.VS.015 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:3/7</p>
---	-----------------------------------	---

B. PHÂN TÍCH

I. Thiết bị và dụng cụ

- Cân kỹ thuật
- Tủ ẩm, có khả năng ủ ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- 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
- Que dàn mẫu

II. Hóa chất và dung dịch hóa chất

a. 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

b. Thạch dichloran-rose bengal chloramphenicol (DRBC) => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06”**

- Môi trường cơ bản

Sản phẩm thủy phân mô động vật hoặc thực vật bằng enzym	5,0 g
D-Glucoza ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	10,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,0 g

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.015 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 4/7
--	----------------------------	--

Magie sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Dichloran (2,6-dicloro-4-nitroanilin)	0,002 g
Rose bengal	0,025 g
Thạch	15 g
Chloramphenicol	0,1 g
Nước cất hoặc nước đã loại ion	1 000 ml

- Chuẩn bị

Hòa các thành phần trên vào nước và hòa tan bằng cách đun sôi, trừ chloramphenicol. Chính pH sao cho sau khi khử trùng pH là $5,6 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Cho thêm 10 ml dung dịch chloramphenicol 1% (nồng độ khối lượng) trong etanol và trộn.

Phân phối môi trường này vào các vật chứa có dung tích thích hợp.

Khử trùng 15 min bằng hấp áp lực ở 121°C .

Làm nguội ngay môi trường trong nồi cách thủy được duy trì ở nhiệt độ từ 44°C đến 47°C và phân phối khoảng 15 ml môi trường vào các đĩa Petri vô trùng.

Để yên cho môi trường đông đặc và làm khô bề mặt thạch, nếu cần.

- Phương pháp bổ sung chlortetracycline clohydric

Việc phát triển quá mức vi khuẩn có thể là một vấn đề (ví dụ: thịt tươi), do đó khuyến cáo sử dụng chloramphenicol (50 mg/l) và chlortetracycline (50 mg/l). Trong trường hợp này, chuẩn bị môi trường cơ bản như trên nhưng chỉ sử dụng 50 mg chloramphenicol rồi phân phối các lượng 100 ml và khử trùng. Đồng thời chuẩn bị dung dịch Chlortetracycline clohydric 0,1 % (khối lượng) trong nước (vì dung dịch này không ổn định nên phải chuẩn bị ngay trước khi sử dụng) và lọc để khử trùng. Ngay trước khi sử dụng, thêm 5 ml dung dịch này một cách vô trùng vào 100 ml môi trường cơ bản và đổ ra đĩa. Không khuyến cáo sử dụng gentamicin vì việc sử dụng gentamicin cho thấy ức chế một số loài nấm men.

- Phương án bổ sung các nguyên tố với lượng vết

Để cho nấm mốc thể hiện hoàn toàn hình thái, cụ thể là sắc tố của chúng, thì cần đến nguyên tố với lượng vết mà có thể không có trong DRBC. Để nhận biết các nấm mốc trên môi trường này, thì thêm dung dịch nguyên tố với lượng vết sau đây với 1 ml trên 1 l môi trường, trước đó đã được hấp áp lực: 1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 100 ml nước cất hoặc nước đã loại ion [1].

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.015 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:5/7
--	----------------------------	---

- Phương án bổ sung Tergitol

Để tránh *Mucoraceae* mọc quá dày trên các đĩa thạch, thì nên bổ sung Tergitol²⁾ (1 ml/l) vào môi trường nuôi cấy.

III. Quy định thực hiện QA/QC

Mẫu blank

Mẫu QC: Sử dụng chủng chuẩn *Aspergillus niger* ATCC 16888 và *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

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 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 này 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:

Dùng pipet vô trùng chuyển 1 ml mẫu thử dạng lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu đối với sản phẩm ở dạng khác cho vào một đĩa thạch DRBC đã được làm khô

Dùng pipet vô trùng mới để chuyển 1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất (10^{-1}) (sản phẩm dạng lỏng) hoặc 1 ml dung dịch pha loãng thập phân 10^{-2} (sản phẩm ở dạng khác) cho vào đĩa thạch DRBC thứ hai.

Có thể lấy lượng 0,3 ml dung dịch pha loãng 10^{-1} của mẫu hoặc mẫu thử dạng lỏng, dàn đều trên ba đĩa.

Lặp lại các thao tác này với các dung dịch pha loãng tiếp theo, sử dụng pipet vô trùng mới cho mỗi dung dịch pha loãng.

Dàn đều dịch lỏng lên khắp bề mặt đĩa thạch bằng que dàn mẫu vô trùng cho đến khi dịch lỏng hấp thụ hết vào môi trường.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.015 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 6/7
--	----------------------------	--

Ủ các đĩa đã chuẩn bị trong môi trường hiếu khí, nắp hướng lên trên, tư thế thẳng đứng trong tủ ẩm ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 5 ngày. Để yên các đĩa thạch trong ánh sáng khuếch tán từ 1 ngày đến 2 ngày, nếu cần.

Nên ủ các đĩa trong túi chất dẻo ở để không làm nhiễm bẩn tủ ẩm trong trường hợp nấm mốc lan ra ngoài đĩa.

3. Đếm khuẩn lạc:

Đếm các đĩa trong khoảng thời gian ủ từ 2 ngày đến 5 ngày. Chọn đếm tất cả các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc. Nếu trên các đĩa có nấm mốc quá nhanh thì có thể đếm các khuẩn lạc sau khi ủ 2 ngày và đếm lại sau khi ủ 5 ngày.

Tiến hành kiểm tra bằng kính hiển vi để phân biệt giữa các tế bào nấm men hoặc nấm mốc và vi khuẩn từ các khuẩn lạc, nếu cần.

Đếm các khuẩn lạc nấm men và các khuẩn lạc/chồi nấm mốc riêng rẽ, nếu cần.

Để nhận biết nấm men và nấm mốc, chọn các vùng phát triển nấm và lấy ra để kiểm tra bằng kính hiển vi hoặc cấy trên môi trường phân lập hoặc nhận dạng thích hợp.

C. TÍNH KẾT QUẢ

Tính số lượng nấm men, nấm mốc có trong một mililit hoặc trong một gam sản phẩm, đơn vị tính là CFU/ml hay CFU/g

$$N = \frac{\sum a}{V \times (n_1 + 0.1n_2) \times d}$$

Trong đó:

C : tổng số các khuẩn lạc mọc trên tất cả các đĩa đã chọn.

V : Thể tích mẫu trên mỗi đĩa (ml)

n_1 : Số lượng các đĩa đã chọn ở độ pha loãng thứ nhất.

n_2 : Số lượng các đĩa đã chọn ở độ pha loãng thứ hai.

d : Hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất đã chọn

D. BẢO ĐẢM KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.015 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 7/7
--	----------------------------	--

Sử dụng chủng chuẩn *Aspergillus niger* ATCC 16888 cho khuẩn lạc màu trắng sau chuyển thành màu đen, chủng chuẩn *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 cho khuẩn lạc màu trắng đục.

Tham khảo hướng dẫn công việc HD.VS.001

E. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Ghi kết quả vào biểu mẫu “BM.VS.015.01

Báo cáo kết quả vào **BM.15.06**