



<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: HD.VS.019 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 2/7</p>
---	-----------------------------------	---

## **A. TỔNG QUAN**

### **I. Phạm vi áp dụng**

Phương pháp áp dụng để định lượng *Bacillus cereus* giả định có khả năng mọc được trên đĩa thạch bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30 °C.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- Các sản phẩm dùng cho con người và thức ăn chăn nuôi.
- Các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất và xử lý thực phẩm.

### **II. Tài liệu tham khảo**

Tiêu chuẩn này được tham chiếu theo: TCVN 4992:2005 (ISO 7932:2004)

### **III. Nguyên lý phương pháp**

Trong cùng một điều kiện, cấy các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu lên bề mặt của môi trường cấy đặc chọn lọc (dùng hai đĩa cho mỗi độ pha loãng). Ủ các đĩa trong điều kiện hiếu khí ở 30°C và kiểm tra sau 18h và 48h.

Tính số lượng *B.cereus* trong một mililit hoặc trong một gam mẫu từ số lượng khuẩn lạc khẳng định thu được trên các đĩa ở các độ pha loãng đã chọn sao cho kết quả có ý nghĩa và được khẳng định theo phép thử quy định

### **IV. 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 °C ± 2 °C

Và phải được phân tích mẫu không quá 24h.

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

### **V. 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

<p><b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b></p>	<p><b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b></p>	<p>Mã số: HD.VS.019 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 3/7</p>
---	-----------------------------------	---

Không ăn uống trong phòng thí nghiệm.

Các môi trường sau khi nuôi cấy phải được hấp tiệt trùng trước khi thải.

## **B. PHÂN TÍCH**

### **I. Thiết bị và dụng cụ**

- a. Cân kỹ thuật
- b. Tủ ấm, có khả năng ủ ở  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- c. Nồi hấp autoclave
- d. Nồi cách thủy: có thể hoạt động từ  $44^{\circ}\text{C}$  đến  $47^{\circ}\text{C}$
- e. Máy đập mẫu Stomacher
- f. Thiết bị đếm khuẩn lạc
- g. Máy đo pH
- h. Đĩa petri
- i. Pipet 0,1 ml và 1ml
- j. Que tráng thủy tinh
- k. Ống nghiệm, bình hoặc chai có dung tích thích hợp và không lớn hơn 500ml

### **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  $7.0 \pm 0.2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , 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  $121^{\circ}\text{C}$

- b. Môi trường MYP => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06 ”**

- Môi trường cơ bản:

Cân 43g môi trường trong 900ml nước chưng cất (tùy theo nhà sản xuất). Hoà tan bằng cách đun nóng.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.VS.019 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 4/7
--	----------------------------	---

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C.

- Dung dịch nhũ tương lòng đỏ trứng (nồng độ khoảng 20%)

- Dung dịch Polymyxin B:

Polymyxin B sunfat                      10<sup>6</sup> IU

Nước    100 ml

- Hòa tan Polymyxin B sunfat trong nước. Lọc để khử trùng.

- Môi trường MYP hoàn chỉnh:

Môi trường cơ bản                      90 ml

Dung dịch polymyxin B                      1.0ml

Nhũ tương lòng đỏ trứng (20%)                      5.0ml

Dung dịch nhũ tương lòng đỏ trứng                      10.0 ml

Làm tan chảy môi trường cơ bản, sau đó làm nguội trong nồi cách thủy đến khoảng 47°C. Thêm lần lượt từng dung dịch còn lại đã được làm ấm ở 47°C, lắc kỹ sau khi thêm từng dung dịch.

Đổ từ 15 ml đến 20 ml môi trường hoàn chỉnh sang các đĩa Petri vô trùng và để cho đông đặc. Các đĩa có thể được bảo quản đến 4 ngày ở nhiệt độ 5 °C ± 3 °C trước khi làm khô. Ngay trước khi sử dụng cần làm khô các đĩa, tốt nhất tháo bỏ nắp ra và úp bề mặt thạch xuống, đặt trong tủ sấy hoặc tủ ẩm để ở 37 °C cho đến khi bề mặt thạch khô.

#### c. Môi trường thạch huyết cừu => **“BM.VS.002.06”**

- Môi trường cơ bản:

Pepton proteoza hoặc pepton tương đương                      15 g

Sản phẩm thủy phân gan                      2,5 g

Cao nấm men                                      5 g

Natri clorua (NaCl)                              5 g

Thạch    15 g

Nước    1 000 ml

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi. Chính pH sao cho sau khi khử trùng là 7,0 ± 0,2 ở 25 °C, nếu cần. Phân phối vào các bình cầu và khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121 °C.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC	Mã số: HD.VS.019 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 5/7
---	---------------------	---

- Huyết cừu khử sợi huyết
- Môi trường hoàn chỉnh

Môi trường cơ bản	100 ml
Huyết cừu đã khử sợi huyết	5 ml đến 7 ml

Sau khi làm nguội đến nhiệt độ từ 44 °C đến 47 °C, bổ sung huyết cừu đã khử sợi huyết vào môi trường cơ bản và trộn đều

Rót các phần ít nhất 12 ml môi trường hoàn chỉnh sang các đĩa Petri và để cho đông đặc.

### **III. Quy định thực hiện QA/QC**

Làm mẫu blank

Mẫu QC: Sử dụng chủng chuẩn *Bacillus cereus* ATCC 10876

### **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 25g (hoặc 25ml) mẫu cần kiểm tra cho vào bình tam giác có chứa 225ml 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 cho vào ống nghiệm có chứa 9ml dung dịch muối pepton đã được khử trùng-> nồng độ pha loãng  $10^{-2}$

-> Lặp lại các thao tác này với các độ pha loãng tiếp theo cho đến khi thu được các dãy dung dịch pha loãng thập phân thích hợp cho việc cấy trong môi trường.

#### **2. Cấy và ủ:**

- Dùng pipet vô trùng hút 0.1ml mẫu thử (nếu sản phẩm là chất lỏng) hoặc 0.1ml dung dịch pha loãng (nếu sản phẩm ở dạng khác) vào đĩa thạch MYP đã được làm khô bề mặt.
- Đối với một số sản phẩm nhất định, tốt nhất để ước tính *B.cereus* với số lượng nhỏ, là tăng các giới hạn phát hiện lên 10 lần bằng cách kiểm tra 1,0 ml mẫu thử nếu sản phẩm ban đầu ở dạng lỏng, hoặc 1,0 ml huyền phù ban đầu nếu sản phẩm ở dạng khác. Phân phối 1 ml dịch cấy lên bề mặt của đĩa petri lớn (140 mm) hoặc lên khắp bề mặt của ba đĩa nhỏ (90 mm) chứa thạch MYP đã làm khô bề mặt.
- 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.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.VS.019 Lần ban hành: 01 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 6/7
--	----------------------------	---

=> Lưu ý: Chỉ chọn 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.

- Sử dụng dụng cụ dàn mẫu dàn chất cấy cẩn thận càng nhanh càng tốt, lên mặt đĩa thạch, cố gắng không chạm vào mép đĩa.
- Lật ngược các đĩa và đặt vào tủ ẩm ở 30°C trong khoảng từ 18h đến 24h. Nếu không thể nhìn thấy rõ các khuẩn lạc thì ủ các đĩa thêm 24 h trước khi đếm.
- Đếm các khuẩn lạc *B.cereus* giả định trên mỗi đĩa. Các khuẩn lạc giả định là các khuẩn lạc lớn, màu hồng và thường được bao quanh bởi một vùng kết tụ.

### 3. **Khẳng định:**

- Từ mỗi đĩa chọn lấy 5 khuẩn lạc điển hình
- Nếu trên các đĩa, khuẩn lạc mọc quá dày và không thể chọn các khuẩn lạc phân lập tốt, thì cấy rìa năm khuẩn lạc giả định lên các đĩa đựng môi trường hoàn chỉnh. Để từ 18 h đến 24 h trong tủ ẩm ở 30 °C.
- Cấy rìa, cấy đâm sâu hoặc chấm các khuẩn lạc đã chọn lên mặt thạch huyết cừu theo cách sao cho thể hiện được tốt phản ứng hồng cầu.
- Ủ ở 30 °C trong 24 h ± 2 h và giải thích phản ứng hồng cầu.

### **C. TÍNH KẾT QUẢ**

- Tính số lượng *B.cereus* đã được nhận dạng có mặt trong sản phẩm, đơn vị tính CFU/ml hay CFU/g:

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

Trong đó:

$\Sigma a$  : Tổng số các khuẩn lạc *B.cereus* có khuẩn lạc màu hồng được bao quanh bởi một vùng kết tụ và phản ứng tan máu trên đĩa thạch máu

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**

Sử dụng chủng chuẩn *Bacillus cereus* ATCC 10876 cho khuẩn lạc *B.cereus* có khuẩn lạc màu hồng được bao quanh bởi một vùng kết tủa và phản ứng tan máu trên đĩa thạch máu

Mẫu blank: âm tính hoặc không có

Dựa vào hướng dẫn công việc **HD.VS.001**

### **E. BÁO CÁO KẾT QUẢ**

Ghi kết quả vào biểu mẫu **BM.VS.019.01**

Báo cáo kết quả vào **BM.15.06**