

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.014</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2017 Trang:1/8
--	----------------------------	---

## PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG ENTEROBACTERIACEAE – KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC

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

### THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
<b>1</b>		Thay đổi format SOP	<b>04/01/2017</b>

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.014</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2017 Trang:2/8
--	----------------------------	---

## **A. TỔNG QUAN**

### **I. Phạm vi áp dụng**

- Phương pháp định lượng Enterobacteriaceae bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc trên môi trường đặc sau khi ủ ấm ở 37°C có thể áp dụng cho các sản phẩm thực phẩm và thức ăn chăn nuôi và các mẫu môi trường trong khu vực sản xuất và chế biến thực phẩm.

### **II. Tài liệu tham khảo**

- Tiêu chuẩn này được tham chiếu theo: *ISO 21528-2 : 2017*; TCVN 5518-2:2007

### **III. Nguyên lý phương pháp**

- Trong phương pháp này, vi khuẩn Enterobacteriaceae được xác định bằng cách đếm khuẩn lạc được hình thành trong môi trường chứa thạch glucoza mật đỏ tím (VRBG) khi ủ ở 37°C trong 24h ± 2h và được khẳng định bằng các phép thử lên men glucoza và kiểm tra sự có mặt của oxidaza

### **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 °C ± 2 °C và phải được phân tích mẫu không quá 24h.
- Tham khảo TCVN 6404:2016, TCVN 6507-2 đến TCVN 6507-5

## **B. PHÂN TÍCH**

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.014</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2017 Trang:3/8
--	----------------------------	---

### **I. Thiết bị và dụng cụ**

- Cân kỹ thuật
- Tủ ẩm, có khả năng ủ ở  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Nồi hấp autoclave
- Nồi cách thủy: có thể hoạt động từ  $44^{\circ}\text{C}$  đến  $47^{\circ}\text{C}$
- Máy đập 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**

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. Thạch glucoza mật đỏ tím (VRBG) => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06 ”**

#### ***Thành phần***

Dịch thủy phân mô động vật bằng enzym	7,0 g
Cao nấm men	3,0 g
Muối mật No.3	1,5 g
Glucoza	10,0 g
Natri clorua	5,0 g

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.014</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2017 Trang:4/8
--	----------------------------	---

Đỏ trung tính	0,03 g
Tím tinh thể (crystal violet)	0,002 g
Thạch	9 g đến 18 g
Nước	1. 000 ml

### ***Chuẩn bị***

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun sôi.

Chỉnh pH sao cho sau khi đun sôi là  $7,4 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ , nếu cần.

Phân phối môi trường nuôi cấy này vào các ống nghiệm hoặc bình vô có dung tích không lớn hơn 500 ml.

Không khử trùng môi trường.

Chuẩn bị môi trường này ngay trước khi sử dụng. Môi trường nấu chảy được dùng trong vòng 4 h.

c. Thạch dinh dưỡng => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06**

### ***Thành phần***

Cao thịt	3,0 g
Dịch thủy phân mô động vật bằng enzym	5,0 g
Natri clorua	5,0 g
Thạch	9 g đến 18 g
Nước	1 000 ml

### ***Chuẩn bị***

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là  $7,3 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ .

Phân phối môi trường nuôi cấy vào các ống nghiệm hoặc bình vô trùng có dung tích không lớn hơn 500 ml.

Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở  $121^{\circ}\text{C}$

Chuyển vào mỗi đĩa Petri khoảng 15 ml môi trường sau khi đã khử trùng đã được làm tan chảy và làm nguội đến khoảng  $47^{\circ}\text{C}$  và để cho đông đặc.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.014</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2017 Trang:5/8
--	----------------------------	---

Ngay trước khi sử dụng, làm khô mặt thạch, và tốt nhất là mở nắp và để bề mặt thạch hướng xuống dưới ở trong tủ ẩm cho đến khi bề mặt thạch khô.

Nếu chuẩn bị trước, có thể bảo quản các đĩa thạch chưa khô này đến 2 tuần ở  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  mà không làm thay đổi các thành phần của chúng.

d. Thạch glucoza => Ghi chép vào **“BM.VS.002.06**

***Thành phần***

Dịch thủy phân casein bằng enzyme	10,0 g
Cao nấm men	1,5 g
Glucoza	10,0 g
Natriclorua	5 g
Bromcresol tía	0,015
Thạch	9 đến 18 g
Nước	1000ml

***Chuẩn bị***

Hòa tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước bằng cách đun nóng.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là  $7,0 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ .

Phân phối môi trường nuôi cấy vào các ống nghiệm hoặc bình cầu vô trùng có dung tích thích hợp.

Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở  $121^{\circ}\text{C}$ . Để các ống theo phương thẳng đứng.

Môi trường này có thể bảo quản đến 1 tuần ở  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Ngay trước khi sử dụng, làm nóng môi trường trong nước sôi hoặc luồng hơi nước trong 15 min, sau đó nhanh chóng làm nguội đến nhiệt độ ủ ấm.

e. Thuốc thử oxidaza

***Thành phần***

<i>N,N,N',N'</i> - Tetrametyl- <i>p</i> -phenylendiamin dihydroclorua	1,0 g
Nước	100 ml

***Chuẩn bị***

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.014</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2017 Trang:6/8
--	----------------------------	---

Hòa tan thành phần trên trong nước lạnh.

Chuẩn bị thuốc thử ngay trước khi sử dụng.

Có thể sử dụng các đĩa hoặc que thử có bán sẵn. Trong trường hợp này, cần theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

### **III. Quy định thực hiện QA/QC**

Mẫu blank

Mẫu QC: Sử dụng chứng dương *Escherichia coli* ATCC 25922

### **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:**

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 huyền phù ban đầu (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.

-> 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 10ml môi trường thạch VRBG đã được chuẩn bị và làm nguội trong nồi cách thủy đến nhiệt độ từ 44°C đến 47°C

Lưu ý: Thời gian tính từ khi rót môi trường vào đĩa Petri và cấy không được quá 15 phút.

Trộn cẩn thận dịch cấy với môi trường bằng chuyển động ngang và để môi trường đông đặc, để các đĩa Petri trên mặt phẳng, mát.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.014</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2017 Trang: 7/8
--	----------------------------	--

Sau khi hỗn hợp đông đặc, phủ lên trên một lớp dày khoảng 15 ml môi trường VRBG đã chuẩn bị, để ngăn ngừa vi khuẩn mọc lan rộng và để đảm bảo điều kiện nửa kỵ khí.

Để đĩa đông đặc sau đó lật ngược các đĩa Petri đã chuẩn bị và ủ trong tủ ấm để ở 37°C trong 24 h ± 2 h.

### 3. Đếm khuẩn lạc

Các khuẩn lạc đặc trưng có màu hồng đến màu đỏ hoặc đỏ tía (có hoặc không có quầng tỏa)

Sau giai đoạn ủ quy định, đếm các khuẩn lạc trên các đĩa, chọn tất cả các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc. Từ các đĩa này, chọn các đĩa đại diện cho các độ pha loãng liên tiếp, nếu có thể

Chọn năm khuẩn lạc điển hình và khẳng định

### 4. Cấy truyền

Ria cấy lên các đĩa thạch dinh dưỡng từng khuẩn lạc đã được chọn để thử khẳng định.

Ủ các đĩa này ở 37°C trong 24 h ± 2 h.

Chọn khuẩn lạc được tách biệt rõ từ các đĩa đã ủ ấm để thử khẳng định sinh hóa

### 5. Khẳng định sinh hóa

#### a. Phản ứng oxidaza

Dùng que cấy vòng hoặc que cấy hoặc đĩa thủy tinh, lấy một phần của mỗi khuẩn lạc được tách biệt rõ và ria cấy lên giấy lọc đã được làm ẩm bằng thuốc thử oxidaza hoặc lên các đĩa bán sẵn (không dùng que cấy vòng hoặc que cấy bằng niken/crom)

Phép thử được coi là âm tính khi màu của giấy lọc đó không chuyển sang màu sẫm trong vòng 10 s (cần theo hướng dẫn của nhà sản xuất đối với các đĩa có bán sẵn)

#### b. Thử lên men

Dùng que cấy lấy cùng một loại khuẩn lạc đã được chọn mà cho phép thử oxidaza âm tính cấy đâm sâu vào các ống chứa thạch glucoza.

Ủ các ống này ở 37°C trong 24 h ± 2 h.

Nếu màu vàng lan rộng khắp ống thạch, thì phản ứng được coi là dương tính.

### C. TÍNH KẾT QUẢ

Các khuẩn lạc cho âm tính oxidaza và dương tính glucoza được khẳng định là Enterobacteriaceae.

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: <b>HD.VS.014</b> Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 04/01/2017 Trang:8/8
--	----------------------------	---

Tính số lượng vi khuẩn Enterobacteriaceae 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:

a : tổng số các khuẩn lạc được chọn mọc trên đĩa thạch.

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 chứng dương Escherichia coli ATCC 25922 vi khuẩn Enterobacteriaceae cho khuẩn lạc đặc trưng có màu hồng đến màu đỏ có quanh tua cho oxidase (-), glucose (+)

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

#### **E. BÁO CÁO KẾT QUẢ**

Ghi kết quả vào **BM.VS.014.01**

Báo cáo kết quả vào **BM.15.06**