

<b>CÔNG TY TNHH MTV</b> <b>KHOA HỌC CÔNG</b> <b>NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.VS.012 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:1/6
--	----------------------------	--

**PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG *COLIFORM* TRONG THỰC PHẨM- 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>01/03/2017</b>

<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.012 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 2/6</p>
---	-----------------------------------	---

## **A. TỔNG QUAN**

### **I. Phạm vi áp dụng**

- Phương pháp định lượng *Coliforms* trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc trên môi trường đặc sau khi ủ ở 37 °C

### **II. Tài liệu tham khảo**

- Phương pháp tham chiếu theo: TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2007)

### **III. Nguyên lý phương pháp**

- Chuẩn bị hai môi trường đặc chọn lọc, và lấy một lượng mẫu thử theo quy định nếu sản phẩm ban đầu là chất lỏng, hoặc lấy một lượng huyền phù ban đầu theo quy định nếu các sản phẩm ở dạng khác.
- Sử dụng các dung dịch huyền phù ban đầu hoặc dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử cấy vào hai đĩa cho mỗi dung dịch pha loãng, trong cùng một điều kiện.
- Ủ các đĩa này ở 37 °C trong 24 h
- Tính số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của *Coliforms* trên gam hoặc trên mililit mẫu

### **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

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.VS.012 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:3/6
--	----------------------------	--

- Và phải được phân tích mẫu không quá 24h.
- Tham khảo TCVN 6404:2016, TCVN 6507-2 đến TCVN 6507-5

## **B. PHÂN TÍCH**

### **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
- Máy đo pH
- Pipet 1ml
- Đĩa petri
- Ống nghiệm, bình hoặc chai có dung tích thích hợp và không lớn hơn 500ml
- Ống durham

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

2. Môi trường Violet red bile agar (VRB) : ề Ghi chép vào **BM.VS.002.06**

- Cân môi trường theo quy định của nhà sản xuất, hòa 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.012 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:4/6
--	----------------------------	--

- Chỉnh pH sao cho sau khi đun sôi pH bằng  $7,4 \pm 0,2$  ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , đun đến sôi và thỉnh thoảng khuấy cho tan hết.
- Làm nguội môi trường trong nồi cách thủy ở nhiệt độ  $44^{\circ}\text{C}$  đến  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Không đun môi trường quá lâu cũng như đun lại, không khử trùng trong nồi áp lực và cần kiểm tra độ vô trùng của môi trường tại thời điểm sử dụng.
- Sử dụng môi trường trong vòng 4 h sau khi chuẩn bị.

### 3. Môi trường Brilliant-green bile lactose broth (BGBL)

- Cân môi trường theo quy định của nhà sản xuất.
- Hòa tan môi trường trong nước bằng cách đun nóng nhẹ trên nồi cách thủy (nếu cần).
- Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng là  $7,2 \pm 0,2$  ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Chuyển 10 ml môi trường vào từng ống nghiệm chứa các ống durham. Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Các ống durham không được chứa bọt khí sau khi khử trùng.

### 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. Xử lý và bảo quản mẫu

- Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi thành phần trong quá trình vận chuyển và bảo quản.
- Tham khảo TCVN 6404:2006

#### 2. 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 peptone 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 dây dung dịch pha loãng thập phân thích hợp cho việc cấy trong môi trường.

#### 3. Cấy và ủ

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.VS.012 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:5/6
--	----------------------------	--

- Dùng pipet vô trùng chuyển 1ml mẫu thử (nếu mẫu thử ở dạng lỏng) hoặc 1ml dung dịch pha loãng ban đầu ( $10^{-1}$ ) (nếu sản phẩm ở dạng khác) vào hai đĩa petri vô trùng.
- Lặp lại quy trình trên cho các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, sử dụng một pipet mới vô trùng cho mỗi độ pha loãng.
- Rót vào mỗi đĩa petri khoảng 15 ml môi trường VRB mà trước đó đã được làm nguội đến khoảng từ 44°C đến 47°C trên nồi cách thủy (thời gian tính từ khi phân phối dịch cấy và đĩa đến khi rót môi trường không được quá 15 phút).
- Đồng thời chuẩn bị một đĩa với 15 ml môi trường để kiểm tra độ vô trùng.
- Trộn cẩn thận dịch cấy với môi trường và để yên cho hỗn hợp đông lại, để các đĩa petri trên mặt phẳng mát nằm ngang.
- Sau khi môi trường đông đặc hoàn toàn, rót khoảng 4 ml môi trường VRB ở 44 °C đến 47 °C lên bề mặt của môi trường và để cho đông đặc hoàn toàn.
- Lật ngược các đĩa và để vào tủ ẩm để ở 37°C trong khoảng từ 24 ± 2h.

#### 4. Đếm các đơn vị hình thành khuẩn lạc

- Sau thời gian ủ quy định, chọn các đĩa Petri có từ 10 khuẩn lạc trở lên đến 150 khuẩn lạc ghi chép **BM.VS.012.02**
- Đếm các khuẩn lạc *Coliform* điển hình (khuẩn lạc màu đỏ ánh tím có đường kính 0,5 mm hoặc lớn hơn đôi khi có vùng mật tủa hơi đỏ bao quanh). Các khuẩn lạc này không cần phải thử khẳng định tiếp.
- Đếm từng loại khuẩn lạc không điển hình khác (kích thước nhỏ, không có quầng, màu đỏ nhạt,...) sau đó thực hiện khẳng định tiếp theo.
- *Về bề ngoài của vùng mật tủa hơi đỏ bao quanh các khuẩn lạc phụ thuộc vào loại coliform và chất lượng của môi trường.*

#### 5. Thử khẳng định

- Cấy năm khuẩn lạc của từng loại không điển hình cho vào các ống nghiệm chứa môi trường BGBL đã chuẩn bị trước. Ủ các ống nghiệm này trong tủ ẩm hoặc 37 °C trong 24±2 h.
- Các ống nghiệm cho kết quả dương tính (có chứa *Coliform*) khi các ống Durham cho thấy có sinh khí..

<b>CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ</b>	<b>HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC</b>	Mã số: HD.VS.012 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:6/6
--	----------------------------	--

### **C. TÍNH KẾT QUẢ**

- Tính số lượng khuẩn lạc của co có mặt trong mẫu thử trên mililit hoặc trên gam sản phẩm từ hai độ pha loãng liên tiếp sử dụng công thức:

Trong đó:

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

- o  $\sum a$ : Tổng số các khuẩn lạc điển hình và không điển hình (cho kết quả dương tính trên môi trường BGBL).
  - o  $n_1$ : số đĩa được giữ lại tại độ pha loãng thứ nhất
  - o  $V$ : thể tích dịch cấy đã dùng trên mỗi đĩa, tính bằng mililit
  - o  $n_2$ : là số đĩa được giữ lại tại độ pha loãng thứ hai.
  - o  $d$ : hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại (  $d = 1$  trong trường hợp các mẫu ở dạng lỏng khi mẫu thử được cấy trực tiếp)
- Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa.

### **D. BẢO ĐẢM KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM**

- Sử dụng chủng dương Escherichia coli ATCC 2592 cho khuẩn lạc màu đỏ tía có vùng mật bao quanh có phản ứng BGBL (+)
- Tham khảo hướng dẫn công việc HD.VS.001

### **E. BÁO CÁO KẾT QUẢ**

- Ghi kết quả vào biểu mẫu **BM.VS.012.02**
- Báo cáo kết quả vào **BM.15.06**