

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 11039-8:2015

Xuất bản lần 1

**PHỤ GIA THỰC PHẨM -
PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VI SINH VẬT -
PHẦN 8: ĐỊNH LƯỢNG NẤM MEN VÀ NẤM MỐC**

*Food additive - Microbiological analyses -
Part 8: Enumeration of yeasts and moulds*

HÀ NỘI - 2015

Lời nói đầu

TCVN 11039-8:2015 được xây dựng trên cơ sở tham khảo JECFA 2006, *Combined compendium of food additive specifications, Volume 4: Analytical methods, test procedures and laboratory solutions used by and referenced in the food additive specifications*;

TCVN 11039-8:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F4 Gia vị và phụ gia thực phẩm biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 11039 Phụ gia thực phẩm – Phương pháp phân tích vi sinh vật gồm các phần sau:

- TCVN 11039-1:2015, *Phần 1: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa*;
- TCVN 11039-2:2015, *Phần 2: Xác định tổng số vi sinh vật hiếu khí bằng kỹ thuật đếm đĩa xoắn*;
- TCVN 11039-3:2015, *Phần 3: Phát hiện và định lượng coliform và E. coli bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp chuẩn)*;
- TCVN 11039-4:2015, *Phần 4: Phát hiện và định lượng coliform và E. coli bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (Phương pháp thông dụng)*;
- TCVN 11039-5:2015, *Phần 5: Phát hiện Salmonella*;
- TCVN 11039-6:2015, *Phần 6: Phát hiện và định lượng Staphylococcus aureus bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc*;
- TCVN 11039-7:2015, *Phần 7: Phát hiện và định lượng Staphylococcus aureus bằng kỹ thuật đếm số có xác suất lớn nhất (MPN)*;
- TCVN 11039-8:2015, *Phần 8: Định lượng nấm men và nấm mốc*.

Phụ gia thực phẩm - Phương pháp phân tích vi sinh vật - Phần 8: Định lượng nấm men và nấm mốc

*Food additives - Microbiological analyses -
Part 8: Enumeration of yeasts and moulds*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc trong phụ gia thực phẩm.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

2.1

Nấm men (yeast)

Vi sinh vật hiếu khí ưa ấm, ở nhiệt độ 25 °C dưới các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này, phát triển thành các khuẩn lạc tròn, bóng hoặc mờ trên bề mặt môi trường thạch nấm, thường có mép viền đều và bề mặt lồi ít hoặc lồi nhiều.

CHÚ THÍCH Nấm men trong môi trường, nhất là trên bề mặt môi trường phát triển thành các khuẩn lạc tròn, hình hạt đậu.

2.2

Nấm mốc (mould)

Vi sinh vật dạng sợi nhỏ hiếu khí ưa ấm, ở nhiệt độ 25 °C dưới các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này, phát triển thành các mầm/chồi mọc lan như lông tơ hoặc đệt hoặc thành các khuẩn lạc trên bề mặt môi trường thạch nấm, thường có màu trái cây hoặc có cấu trúc mang bào tử.

CHÚ THÍCH Nấm mốc trong môi trường, nhất là trên bề mặt môi trường có thể phát triển thành các khuẩn lạc tròn, hình hạt đậu.

3 Nguyên tắc

3.1 Chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.

3.2 Ủ các đĩa đã cấy trong điều kiện hiếu khí ở 25 °C ± 1 °C trong 5 ngày.

3.3 Đếm các khuẩn lạc/các chồi, khẳng định việc nhận dạng các khuẩn lạc nghi ngờ bằng kính phóng đại hoặc kính hiển vi (để phân biệt các khuẩn lạc của nấm men với các khuẩn lạc của vi khuẩn), nếu cần.

3.4 Số lượng nấm men và nấm mốc trong một gam mẫu được tính từ số lượng khuẩn lạc/chồi/mầm thu được trên các đĩa đã chọn ở các mức pha loãng tạo ra các khuẩn lạc có thể đếm được. Nấm men và nấm mốc được đếm riêng, nếu cần.

4 Môi trường cấy, dịch pha loãng và thuốc thử

4.1 Thạch dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) (xem A.1).

4.2 Thạch dichloran 18 % glycerol (DG18) (xem A.2).

4.3 Thạch đếm đĩa (PCA) (xem A.3).

Thêm chloramphenicol vào môi trường với nồng độ 100 mg/l. Môi trường này không thích hợp khi nấm mốc mọc lan rộng.

4.4 Các dung dịch kháng sinh.

4.5 Nước đệm pepton, 0,1 %.

5 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Có thể dùng dụng cụ thủy tinh sử dụng một lần thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần nếu chúng có các đặc tính thích hợp.

Sử dụng các thiết bị của phòng thử nghiệm vi sinh và cụ thể là:

5.1 Thiết bị trộn hoặc máy đập mẫu (stomacher).

5.2 Đĩa Petri.

5.3 Pipet vô trùng.

5.4 Tủ ấm, có thể duy trì ở nhiệt độ 25 °C.

5.5 Que cấy vòng, vô trùng.

5.6 Que cấy gạt, bằng thủy tinh được uốn cong một đầu, vô trùng.

5.7 Thiết bị đếm khuẩn lạc, loại cơ học hoặc điện tử, có nguồn sáng thích hợp, đĩa lưới và bộ đếm.

5.8 Dụng cụ đo pH.

5.9 Nồi cách thủy, có thể duy trì ở nhiệt độ 45 °C ±1 °C.

6 Lấy mẫu

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Xem tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm. Nếu chưa có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên có liên quan nên thoả thuận với nhau về vấn đề này.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Mẫu được trộn đều để thu được các phần mẫu thử đồng nhất.

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị dung dịch pha loãng

Cân 25 g hoặc 50 g phần mẫu thử đã chuẩn bị (Điều 7).

CHÚ THÍCH: Thông thường, cỡ mẫu lớn hơn sẽ tăng độ tái lập và cho phương sai nhỏ hơn so với cỡ mẫu nhỏ hơn.

Thêm lượng thích hợp nước pepton 0,1 % (4.5) vào mẫu đã cân để đạt độ pha loãng 10^{-1} , sau đó đồng hóa 2 min trong máy đập mẫu (5.1). Cách khác, trộn trong thời gian từ 30 s đến 60 s nhưng hiệu quả kém hơn. Chuẩn bị các dung dịch pha loãng 1 : 10 thích hợp trong nước pepton 0,1 %. Thông thường, các độ pha loãng đến 10^{-6} là thích hợp.

8.2 Nuôi cấy

8.2.1 Phương pháp cấy gạt

Dùng pipet vô trùng (5.3) nhỏ 0,1 ml mỗi dung dịch pha loãng (8.1) vào các đĩa thạch DRBC (4.1) đã chuẩn bị, cấy gạt bằng que cấy thủy tinh cong vô trùng (5.6). Thạch DG18 (4.2) thích hợp hơn với mẫu thử có hoạt độ nước thấp hơn 0,95. Cấy đồng thời ba đĩa cho mỗi độ pha loãng.

8.2.2 Phương pháp đổ đĩa

Sử dụng pipet nút bông vô trùng (5.3) để chuyển 1 ml phần dung dịch mẫu thử pha loãng (8.1) vào các đĩa Petri 15 mm x 100 mm (5.2) bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, đã ghi nhãn. Trong vòng từ 1 min đến 2 min, đổ vào mỗi đĩa từ 20 ml đến 25 ml môi trường thạch DG18 (4.2) đã ổn định nhiệt độ. Trộn đều bằng cách xoay nhẹ đĩa theo chiều kim đồng hồ sau đó ngược chiều kim đồng hồ, cẩn thận để tránh dây lên nắp đĩa.

TCVN 11039-8:2015

Cách khác, dung dịch pha loãng có thể để dưới đáy đĩa (đặc biệt nếu mẫu chứa hàm lượng tinh bột cao và đĩa làm từ chất dẻo) và có thể không cần trộn đồng nhất. Cấy đồng thời ba đĩa cho mỗi độ pha loãng, sử dụng các pipet miệng rộng. Thời gian từ khi chuẩn bị dung dịch mẫu thử pha loãng ban đầu đến khi rót vào đĩa cuối cùng không được quá 20 min, tốt nhất là 10 min.

Ủ các đĩa nơi tối ở 25 °C. Không chồng các đĩa cao quá 3 đĩa và không lật úp đĩa. Để yên các đĩa cho đến khi đọc kết quả.

8.3 Đếm đĩa

Đếm các đĩa sau 5 ngày kể từ khi ủ. Nếu không có vi sinh vật phát triển sau 5 ngày thì ủ thêm 48 h. Không đếm các khuẩn lạc trước khi kết thúc thời gian ủ quy định bởi vì việc di chuyển đĩa có thể dẫn đến sự phát triển thứ cấp từ các bào tử rơi xuống làm sai lệch số đếm cuối cùng. Đếm các đĩa chứa từ 10 đến 150 khuẩn lạc. Nếu chủ yếu là nấm men mọc thì thường đếm các đĩa chứa 150 khuẩn lạc. Tuy nhiên, nếu nấm mốc có số lượng đáng kể thì tùy theo loại nấm mốc, giới hạn số đếm cao như thế này có thể được giảm đi theo phán đoán của người phân tích.

9 Biểu thị kết quả

Báo cáo kết quả theo số đơn vị hình thành khuẩn lạc CFU/g hoặc CFU/ml dựa trên số đếm trung bình của dãy ba đĩa thử. Làm tròn số đếm đến hai chữ số có nghĩa. Nếu chữ số có nghĩa thứ ba là 5 hoặc cao hơn thì làm tròn lên chữ số cao hơn (ví dụ 456 ≈ 460, 455 ≈ 460); nếu chữ số có nghĩa thứ ba là 4 hoặc thấp hơn thì làm tròn xuống (ví dụ 454 ≈ 450).

Nếu các đĩa từ tất cả các độ pha loãng đều không có khuẩn lạc thì báo cáo là số đếm nấm men và nấm mốc (MYC) ít hơn 1 lần so với độ pha loãng thấp nhất đã sử dụng.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy chọn cũng như các sự cố bất kỳ có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(Quy định)

Thành phần và chuẩn bị môi trường cấy và thuốc thử**A.1 Thạch Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC)****A.1.1 Thành phần**

Glucose	10 g
Pepton dùng cho vi sinh vật	5 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1 g
Magie sulfat ngậm 7 phân tử nước ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Dung dịch Rose bengal (5 % khối lượng/thể tích)	0,5 ml
Dung dịch dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilin) (0,2 % khối lượng/thể tích trong etanol)	1 ml
Chloramphenicol	0,1 g
Thạch	15 g
Nước cất	1 lít

A.1.2 Chuẩn bị

Trộn các thành phần, đun để hòa tan thạch và khử trùng bằng cách hấp áp lực ở 121 °C trong 15 min. pH cuối cùng phải đạt 5.6. Giảm nhiệt độ xuống 45 °C ± 1 °C trong nồi cách thủy và đổ đĩa.

A.1.3 Chuẩn bị kháng sinh bổ sung

Các kháng sinh được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nấm để ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Nên sử dụng chloramphenicol vì kháng sinh này bền khi hấp áp lực. Do đó, việc chuẩn bị môi trường sẽ dễ hơn và nhanh hơn vì lược bỏ bước lọc. Nồng độ khuyến cáo đối với kháng sinh này là 100 mg/l môi trường.

Nếu vi khuẩn mọc quá dày thì chuẩn bị môi trường bằng cách thêm 50 mg chloramphenicol/l trước khi hấp áp lực và 50 mg chlortetracycline/l khi môi trường này ổn định nhiệt độ, ngay trước khi đổ vào đĩa.

Chuẩn bị dung dịch gốc bằng cách hòa tan 0,1 g chloramphenicol trong 40 ml nước cất; cho dung dịch này vào 960 ml hỗn hợp môi trường trước khi hấp áp lực. Khi sử dụng cả chloramphenicol và chlortetracycline thì thêm 20 ml dung dịch gốc chloramphenicol nêu trên vào 970 ml môi trường trước khi hấp áp lực. Sau đó, chuyển bị dung dịch gốc chlortetracycline bằng cách hòa tan 0,5 g kháng sinh vào 100 ml nước cất và lọc để khử trùng. Cho 10 ml dung dịch này vào 990 ml môi trường đã hấp áp

TCVN 11039-8:2015

lực và ổn định nhiệt độ. Làm lạnh trong tối và sử dụng các dung dịch còn lại trong một tháng. Các dung dịch gốc cần được đưa về nhiệt độ phòng trước khi cho vào môi trường đã ổn định nhiệt độ.

A.2 Thạch dichloran 18 % glycerol (DG18)

A.2.1 Thành phần

Glucose	10 g
Pepton dùng cho vi sinh vật	5 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1 g
Magie sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Dichloran (0,2% khối lượng/thể tích trong etanol)	1 ml
Chloramphenicol	0,1 g
Thạch	15 g
Nước cất	1 lít

A.2.2 Chuẩn bị

Trộn các thành phần và đun cách thủy để hòa tan thạch, thêm nước cất đến 1 000 ml. Thêm 220 g glycerol và khử trùng bằng cách hấp áp lực ở 121 °C trong 15 min. pH cuối cùng phải đạt 5,6 và hoạt độ nước cuối cùng đạt $a_w = 0,955$.

CHÚ THÍCH 1: Môi trường này dùng cho các mục đích chung để định lượng nấm mốc và thích hợp nhất khi a_w của mẫu thử thấp hơn hoặc bằng 0,95. Hoạt độ nước thấp của môi trường sẽ làm giảm số lượng vi khuẩn và các loại nấm sẽ phát triển nhanh.

CHÚ THÍCH 2: Khi định lượng đồng thời nấm men và nấm mốc thì cần dùng thạch DRBC (A.1).

A.3 Môi trường thạch để đếm đĩa (PCA)

A.3.1 Thành phần

Trypton	5,0 g
Chất chiết nấm men	2,5 g
Dextrose	1,0 g
Thạch	15 g
Nước cất	1 000 ml

A.3.2 Chuẩn bị

Đun nóng nước để hòa tan các thành phần. Phân phối môi trường vào các ống hoặc bình thủy tinh có dung tích thích hợp. Khử trùng 15 min trong nồi hấp áp lực ở 121 °C. pH cuối cùng $7,0 \pm 0,2$.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 8275-1:2010 (ISO 21527-1:2008) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước lớn hơn 0,95*
 - [2] TCVN 8275-2:2010 (ISO 21527-2:2008) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95*
 - [3] TCVN 7852:2008 *Thực phẩm – Đếm nấm men và nấm mốc bằng phương pháp màng khô có thể hoàn nước (Phương pháp Petrifilm™)*
 - [4] TCVN 5750:1993 *Thức ăn chăn nuôi – Phương pháp xác định nấm men và nấm mốc*
-