

VI SINH VẬT HỌC	TCVN	
Hướng dẫn chung đếm nấm men và nấm mốc	4993-89	
Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25°C	(ISO	
Микробиология. Общее руководство для счёта дрожневых грибок. Техника счёта колонии при 25°C.	Microbiology. General guidance for enumeration of yeasts and moulds - Colony count technique at 25°C	7954-1987) Khuyến khích áp dụng

Tiêu chuẩn này hướng dẫn chung việc đếm nấm men và nấm mốc trong thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25°C

Tiêu chuẩn này hoàn toàn phù hợp với ISO 7954 - 1987

I . ĐỊNH NGHĨA

Nấm men và nấm mốc là những vi sinh vật tạo ra những khuẩn lạc ở 25°C trong môi trường chọn lọc phù hợp với phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này .

II . NGUYÊN TẮC PHƯƠNG PHÁP

2.1 Dùng môi trường nuôi chọn lọc quy định và 1 lượng mẫu thử quy định, nếu sản phẩm ban đầu là chất lỏng, hoặc một lượng huyền phù ban đầu, nếu sản phẩm có dạng khác để đổ đĩa .

Chuẩn bị các đĩa khác trong cùng điều kiện bằng cách sử dụng các dụng dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc huyền phù ban đầu .

2.2. Nuôi cấy hiếu khí các đĩa ở 25°C trong 3, 4 hoặc 5 ngày.

2.3. Tính số nấm men và nấm mốc trên gam hoặc trên

mililit mẫu thử theo số khuẩn lạc xác định được trên đĩa ở độ pha loãng đã chọn sao cho đạt được kết quả có ý nghĩa .

III . CHẤT PHA LOÃNG VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI

3.1. Vật liệu cơ bản

Để tăng độ lặp lại của kết quả cần sử dụng các vật liệu cơ bản khan hoặc môi trường hoàn chỉnh khan để chuẩn bị môi trường nuôi . Cần tuân thủ chặt chẽ hướng dẫn của người sản xuất .

Hoá chất sử dụng phải đảm bảo độ tinh khiết phân tích

Nước sử dụng phải là nước cất hoặc nước được khử ion và không chứa các chất ức chế sự phát triển nấm men và nấm mốc trong điều kiện thử nghiệm .

Máy đo pH (4.4) có bộ bù nhiệt .

Trong trường hợp không sử dụng ngay chất pha loãng hoặc môi trường nuôi, nếu không có các quy định khác, cần bảo quản chúng trong tối ở 0 - 5°C tối đa không quá 1 tháng trong điều kiện không làm thay đổi thành phần của chúng.

3.2. Chất pha loãng

Xem TCVN 4881-89 (ISO 6887) và các tiêu chuẩn khác liên quan tới sản phẩm cần kiểm nghiệm .

3.3. Môi trường thạch - Chất chiết nấm men - dectroza cloramphenicol .

Do tính chất của nấm men và nấm mốc việc đếm này có thể không chính xác .

Thành phần môi trường quy định trong bản Bảng

Thành phần	Lượng
Chất chiết nấm men	5 g
Dectroza ($C_6H_{12}O_6$)	20 g
Cloramphenicol ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$)	0,1 g [*]
Thạch	12 - 15 g ^{**}
Nước	1000 ml

*. Để thu được nồng độ cuối cùng của 100 µg/ml môi trường.

** . Theo hướng dẫn của người sản xuất .

Dun sôi để hoà tan các thành phần trên vào trong nước. Nếu cần thiết, điều chỉnh độ pH sao cho ngay sau tiệt trùng đạt 6,6. Cho môi trường thạch vào bình (4.5) thích hợp. Tiệt trùng môi trường ở $121 \pm 1^\circ C$ trong 15 phút .

Chú thích : có thể thay thế cloramphenicol bằng oxytetraxilin ($C_{22}H_{30}N_2O_{11}$). Trong trường hợp này cần chuẩn bị môi trường cơ bản như đã trình bày ở trên (trừ cloramphenicol, lấy từng phần 100 ml và tiệt trùng). Cũng chuẩn bị một dung dịch hydroclorua oxytetraxilin 0,1 % (khối lượng) trong nước và tiệt trùng bằng lọc. Ngay trước khi sử dụng cho thêm 10 ml dung dịch vô trùng này vào 100 ml môi trường cơ bản được làm chảy trước và để được giữ ở $45^\circ C$.

IV . THIẾT BỊ VÀ DỤNG CỤ THUỶ TINH

Chú ý : Nên sử dụng các thiết bị sẵn có hơn là các dụng cụ thuỷ tinh nếu có các thông số kỹ thuật thích hợp

Các thiết bị thí nghiệm vi sinh thông thường và cụ

thế là :

4.1. Thiết bị tiệt trùng khô (tủ sấy) hoặc tiệt trùng ướt (nồi hấp) (nồi hấp hoạt động độc lập hoặc là một bộ phận của thiết bị chung để chuẩn bị và phân phối môi trường).

Tiệt trùng các thiết bị sẽ tiếp xúc với môi trường môi, các chất pha loãng hoặc mẫu, đặc biệt các dụng cụ bằng chất dẻo (trừ các dụng cụ đã vô trùng được cung cấp) theo một trong các phương pháp sau :

- a) Trong tủ sấy ở $170 - 175^{\circ}\text{C}$ không ít hơn 1 h .
- b) Trong nồi hấp ở $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ không ít hơn 20 phút.

4.2. Tủ ẩm có khả năng giữ ở $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.3. Bếp cách thủy có khả năng giữ ở $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.4. Máy đo pH có bộ bù nhiệt với độ chính xác $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25°C .

4.5. Chai hoặc bình .

Chú thích : Cần sử dụng chai hoặc bình có nút vặn kim loại không độc .

4.6. Pipet khắc độ chuyên dùng trong kiểm nghiệm vi khuẩn có dung tích định mức 10 ml và 1 ml với vạch chia tương ứng là 0,5 và 0,1 ml và đầu hút có đường kính danh nghĩa 2 - 3 mm .

4.7. Đĩa Petri có đường kính 90 - 100 mm

V . LẤY MẪU VÀ CHUẨN BỊ MẪU

Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu theo các tiêu chuẩn về sản phẩm cần thử.

Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì cần có sự thoả

thuận giữa các bên hữu quan .

VI . TIẾN HÀNH THỬ

6.1. Phần mẫu thử, huyền phù ben dầu và các dung dịch pha loãng. Xem TCVN 4881-89 (ISO 6887) và các tiêu chuẩn khác liên quan tới sản phẩm cần thử .

Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể thì cần có sự thoả thuận giữa các bên hữu quan .

6.2. Cây và môi

6.2.1. Sử dụng 2 đĩa Petri (4.7) vô trùng. Dùng pipet (4.6) vô trùng lấy 1 ml mẫu thử (nếu sản phẩm là chất lỏng) hoặc 1 ml huyền phù (nếu sản phẩm có dạng khác) lần lượt cho vào từng đĩa.

6.2.2. Sử dụng tiếp 2 đĩa petri nữa. Dùng pipet vô trùng khác lấy 1 ml dung dịch pha loãng 10^{-1} lần lượt cho vào từng đĩa (nếu sản phẩm là chất lỏng) hoặc 1 ml dung dịch pha loãng 10^{-2} (nếu sản phẩm có dạng khác).

Nếu cần, lặp lại thao tác trên với các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo .

6.2.3. Từ bình (4.5) lấy thêm khoảng 15 ml môi trường thạch - chất chiết nấm men - dectroza - cloramphenicol (3.3) làm lỏng và đã được giữ ở $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong bếp cách thủy (4.3) rồi lần lượt cho vào từng đĩa Petri. Thời gian từ khi kết thúc chuẩn bị huyền phù ben dầu (hoặc dung dịch pha loãng 10^{-1} , nếu là sản phẩm lỏng) đến khi rót môi trường vào đĩa không quá 15 phút .

Trộn cẩn thận chất môi cấy với môi trường và để đông đặc lại bằng cách đặt đĩa Petri trên 1 mặt phẳng mát nằm ngang .

Chuẩn bị đĩa kiểm tra chứa 15 ml môi trường để kiểm tra độ tiệt trùng.

6.2.4. Úp các đĩa và đặt chúng vào tủ ấm (4.2) ở $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.3. Đọc kết quả.

Đếm số khuẩn lạc trên các đĩa sau khi nuôi 3, 4 và 5 ngày.

Sau 5 ngày, giữ lại các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc. Nếu nấm mốc phủ kín trên các đĩa hoặc khó đếm được các khuẩn lạc tách biệt hẳn thì giữ lại số đếm được sau khi nuôi 4 ngày hoặc thậm chí 3 ngày. Trong trường hợp này, cần ghi lại thời gian nuôi là 3 hoặc 4 ngày vào biên bản.

Nếu cần có thể kiểm tra bằng kính hiển vi để phân biệt các khuẩn lạc của nấm men và nấm mốc với khuẩn lạc của vi khuẩn dựa vào các hình thái của chúng.

VII. BIỂU THỊ KẾT QUẢ

7.1. Tính kết quả

7.1.1. Sử dụng số đếm được từ các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc.

7.1.2. Số nấm men và nấm mốc, X, trên gam hoặc trên mililit được tính theo công thức :

$$X = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) \cdot d}$$

trong đó

$\sum C$ - tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa ;
 n_1 - số đĩa đếm được ở dung dịch pha loãng thứ nhất ;

n_2 - số đĩa đếm được ở dung dịch pha loãng thứ hai;
 d - độ pha loãng cho số đếm thứ nhất (ví dụ 10^{-2})

7.1.3. Làm tròn kết quả tính được trong 7.1.2 tới 2 chữ số có ý nghĩa. Nếu số được làm tròn là 5 mà không có tiếp những chữ số có ý nghĩa thì cần làm tròn để chữ số kế ngay phía bên trái là số chẵn.

Ví dụ 28.500 được làm tròn thành 28.000

11.500 được làm tròn thành 12.000

7.1.4. Kết quả được biểu thị dưới dạng 1 số nằm giữa 1,0 và 9,9 nhân với 10^X , trong đó X là số mũ của 10.

Nếu không có khuẩn lạc trên đĩa huyền phù ban đầu (5.1), nếu sản phẩm bán đầu là đặc, thì số nấm men và nấm mốc trên 1 gam sản phẩm được tính là nhỏ hơn 10.

Nếu không có khuẩn lạc trên đĩa mẫu thử, nếu sản phẩm bán đầu là chất lỏng (6.1) thì số nấm men và nấm mốc trên 1 mililit sản phẩm được tính là nhỏ hơn 1.

7.2. Ví dụ tính kết quả

Số đếm nấm men và nấm mốc có thể cho kết quả như sau (mỗi 2 đĩa Petri đối với mỗi độ pha loãng)

Độ pha loãng 10^{-2} : 83 và 97 khuẩn lạc

Độ pha loãng 10^{-3} : 33 và 28 khuẩn lạc

$$X = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d} = \frac{83+97+33+28}{2+(0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}} \cdot \frac{241}{0,022} = 10954$$

Làm tròn kết quả như quy định trong 7.1.3 sẽ được kết quả cuối cùng là 11.000. Do đó số nấm men và nấm mốc trên gam hoặc trên mililit sẽ là $1,1 \cdot 10^4$.

7.3. Độ chính xác

Do các nguyên nhân thống kê nên trong 95 % trường hợp khoảng tin cậy của phương pháp này dao động từ $\pm 16\%$ đến $\pm 52\%$. Trong thực tế khoảng dao động thậm chí có thể còn rộng hơn, đặc biệt là đối với các kết quả do các kiểm nghiệm viên vi sinh khác nhau tính được.

VIII . BIÊN BẢN THỬ

Trong biên bản thử cần ghi rõ :

- Phương pháp sử dụng;
 - Thời gian nuôi ;
 - Kết quả ;
 - Phương pháp biểu thị kết quả ;
 - Các chi tiết không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc tự lựa chọn có thể ảnh hưởng tới kết quả ;
 - Các chi tiết cần thiết để xác định mẫu .
-