

TCVN 7137 : 2002

ISO 13681 : 1995

**THỊT VÀ SẢN PHẨM THỊT – ĐỊNH LƯỢNG NẤM
MEN VÀ NẤM MỐC – KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC**

Meat and meat products — Enumeration of yeasts and moulds —

Colony-count technique

HÀ NỘI – 2002

Lời nói đầu

TCVN 7137 : 2002 hoàn toàn tương đương với ISO 13681 : 1995;

TCVN 7137 : 2002 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F 8 Thịt và sản phẩm thịt biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành.

Thịt và sản phẩm thịt – Định lượng nấm men và nấm mốc – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc

Meat and meat products – Enumeration of yeasts and moulds –

Colony-count technique

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc có trong tất cả các loại thịt và sản phẩm thịt, kể cả thịt gia cầm, bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 20 °C đến 25 °C.

Chú ý – TCVN 4993 - 89 (ISO 7954) [1] khuyến cáo rằng cloramphenicol hoặc oxytetraxyclin là chất kháng sinh. Tuy nhiên, các chất kháng sinh được khuyến cáo này không đủ để kìm hãm các vi khuẩn Gram âm xuất hiện trong thịt, đặc biệt là trong thịt nguyên liệu. Trong các trường hợp bị nhiễm khuẩn nặng, cần bổ sung getamixin để nhận được sự ức chế cần thiết. Vì sự kết hợp của cloramphenicol và gentamixin kìm hãm được một số loài nấm men nhất định, nên kháng sinh oxitetraxiclin là một kháng sinh được lựa chọn.

2 Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn gia súc – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887 : 1983) Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung để chuẩn bị các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100-2 : 1988) Thịt và sản phẩm thịt – Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử - Phần 2 : Chuẩn bị mẫu thử để kiểm tra vi sinh vật.

3 Định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau :

3.1 Nấm men và nấm mốc (yeasts and moulds): Các vi sinh vật tạo thành các khuẩn lạc trong vòng 5 ngày ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C trong các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Cấy sâu trong các đĩa thạch, sử dụng môi trường nuôi cấy chọn lọc chứa trong các đĩa petri, với mẫu cấy là một lượng mẫu thử qui định, nếu sản phẩm ban đầu dạng lỏng, hoặc một lượng dung dịch huyền phù ban đầu, nếu sản phẩm ở dạng khác.

Cấy trên các đĩa khác trong cùng một điều kiện, sử dụng các độ pha loãng thập phân của huyền phù ban đầu.

Chú thích 1 – Nếu cần, để phân biệt giữa nấm men và nấm mốc, thì nên sử dụng cách nuôi cấy bề mặt đĩa thạch. Cũng nên sử dụng phương pháp nuôi cấy bề mặt khi dự kiến là có các nấm men hoặc nấm mốc mẫn cảm với nhiệt.

4.2 Ủ các đĩa chứa các mẫu cấy trên trong điều kiện hiếu khí ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C trong 3 ngày, 4 ngày hoặc 5 ngày.

4.3 Tính số lượng nấm men và nấm mốc có trong một gam hoặc một mililit mẫu từ số khuẩn lạc thu được trên các đĩa đã chọn ở các mức pha loãng cho kết quả có ý nghĩa.

5 Dung dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1 Khái quát

Đối với thực hành phòng thử nghiệm hiện hành, xem TCVN 6404 :1998 (ISO 7218).

5.2 Dung dịch pha loãng

Xem TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887).

5.3 Môi trường thạch của cao nấm men, glucoza và oxitetraoxyclin/gentamixin

5.3.1 Môi trường cơ sở

5.3.1.1 Thành phần

Cao men	5 g
Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)	20 g
Thạch	từ 8 g đến 18 g ¹⁾
Nước	1 000 ml
1) Tùy vào sức đông của thạch	

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên vào nước bằng cách đun sôi.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là 6,6 ở 25 °C, nếu cần.

Chuyển môi trường vào các vật chứa thích hợp (6.6).

Khử trùng 10 phút trong nồi hấp áp lực (6.1) ở 115 °C.

5.3.2 Dung dịch oxytetraxyclin**5.3.2.1 Thành phần**

Oxytetraxyclin ($C_{22}H_{30}N_2O_4$)	50 mg
Nước	25 ml

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan oxytetraxyclin trong nước và lọc để khử trùng dung dịch.

5.3.3 Dung dịch gentamixin**5.3.3.1 Thành phần**

Gentamixin	25 mg ¹⁾
Nước	25 ml
1) Theo qui định của nhà sản xuất về hàm lượng gentamixin thực của bột.	

5.3.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan gentamixin vào nước và lọc để khử trùng dung dịch.

5.3.4 Môi trường hoàn chỉnh

Cho 5 ml dung dịch oxitetraxyclin (5.3.2) và 5 ml dung dịch gentamixin (5.3.3) vào mỗi phần 100 ml môi trường cơ sở vô trùng (5.3.1), đã được làm tan chảy và giữ trong nồi cách thủy (6.4) để ở 47 °C.

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Chú thích 2 – Có thể dùng dụng cụ sử dụng một lần để thay thế cho các dụng cụ thủy tinh nếu nó có các đặc tính kỹ thuật phù hợp.

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và đặc biệt là:

6.1 Thiết bị khử trùng khô (tủ sấy) hoặc khử trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Nồi hấp áp lực có thể hoạt động riêng rẽ hoặc là một phần của thiết bị chung để chuẩn bị và phân phối môi trường.

Xem TCVN 6404 : 1998 (ISO 7218).

6.2 Máy trộn, có khả năng trộn 1 ml hoặc 2 ml mẫu với 9 ml hoặc 18 ml dịch pha loãng trong một ống nghiệm có kích thước thích hợp, để thu được huyền phù đồng nhất và máy hoạt động theo nguyên tắc quay quanh tâm của lượng chứa trong ống.

6.3 Tủ ấm, có khả năng hoạt động ở nhiệt độ từ $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ đến $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.4 Nồi cách thủy, có khả năng hoạt động ở nhiệt độ $47\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.5 pH-met, có độ chính xác trong khoảng $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25 °C.

6.6 Chai hoặc bình cấy mẫu

Có thể sử dụng chai hoặc bình có nắp xoáy bằng kim loại không độc.

6.7 Pipet chia độ, đã hiệu chỉnh để dùng cho xác định vi khuẩn, có dung tích danh định 10 ml và 1 ml, được chia vạch 0,5 ml và 0,1 ml tương ứng và lỗ thoát có đường kính danh định từ 2 mm đến 3 mm.

6.8 Đĩa Petri, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

7 Lấy mẫu

Điều quan trọng là phòng thử nghiệm phải nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc giảm chất lượng trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100 - 1) [2].

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 4833 - 2 : 2002 (ISO 3100 - 2).

Tiến hành kiểm tra mẫu đã xử lý càng sớm càng tốt. Nếu cần, có thể bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ 0 °C đến +2 °C, nhưng không quá 24 h.

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng

Chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng theo TCVN 6507 : 1999 (ISO 6887).

9.2 Cấy và ủ

9.2.1 Lấy hai đĩa Petri vô trùng (6.8). Dùng pipet vô trùng (6.7) chuyển vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử nếu mẫu dạng lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu mẫu ở dạng khác.

9.2.2 Lặp lại qui trình mô tả trong 9.2.1 với các độ pha loãng khác.

9.2.3 Từ chai cấy mẫu (6.6) rót vào mỗi đĩa Petri khoảng 15 ml môi trường thạch của cao men, glucoza và oxitetraxilin/gentamixin (5.3), đã tan chảy và được giữ ở 47 °C trong nồi cách thủy (6.4). Thời gian từ khi kết thúc chuẩn bị mẫu thử đến thời điểm môi trường được rót sang đĩa không quá 15 phút.

Trộn mẫu cấy một cách cẩn thận với môi trường và cho hỗn hợp đông đặc lại bằng cách để các đĩa Petri trên bề mặt phẳng mát nằm ngang.

9.2.4 Lật ngược các đĩa và đặt chúng vào tủ ấm (6.3) để ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C.

9.3 Đếm và chọn các khuẩn lạc

Đếm các khuẩn lạc trên mỗi đĩa sau 3 ngày, 4 ngày và 5 ngày ủ ấm. Sau 5 ngày, giữ lại các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc. Nếu trên các đĩa quá nhiều nấm mốc mọc hoặc khó có thể đếm các khuẩn lạc tách biệt thì ghi lại các số đếm được sau 4 ngày (thậm chí sau 3 ngày) ủ ấm. Khi đó trong báo cáo thử nghiệm nêu rõ thời gian ủ là 3 ngày hoặc 4 ngày.

Nếu cần, tiến hành kiểm tra bằng kính hiển vi để phân biệt các khuẩn lạc nấm men và nấm mốc với các khuẩn lạc của vi khuẩn có kích thước nhỏ.

10 Biểu thị kết quả

10.1 Trường hợp chung

Sử dụng các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc (xem 9.3).

Tính số lượng vi sinh vật trong một gam hoặc một mililit sản phẩm, N , theo công thức sau :

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

trong đó

$\sum C$ là tổng số các khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại;

n_1 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng đầu tiên;

n_2 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại (tức là có nồng độ mẫu thử cao hơn).

Làm tròn các kết quả tính được đến hai chữ số có nghĩa. Như vậy, nếu chữ số sau cùng nhỏ hơn 5 thì số đứng trước số đó không bị thay đổi, còn nếu chữ số sau cùng là 5 hoặc nhỏ hơn 5 thì tăng số đứng trước lên một đơn vị.

Làm tròn tiếp theo cho đến khi thu được hai chữ số có nghĩa.

Lấy kết quả là số lượng vi sinh vật trong một mililit (sản phẩm dạng lỏng) hoặc trong một gam (sản phẩm dạng khác), được biểu thị bằng số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10.

THÍ DỤ

Số đếm trực tiếp của nấm men và nấm mốc cho các kết quả sau (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng đã được ủ) :

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) : 83 khuẩn lạc và 97 khuẩn lạc;

- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) : 33 khuẩn lạc và 28 khuẩn lạc.

Như vậy

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

Làm tròn kết quả như qui định trên ta có 11 000 hoặc $1,1 \times 10^4$ nấm men hoặc nấm mốc trong một mililit hoặc một gam sản phẩm.

10.2 Ước tính các số lượng nhỏ khuẩn lạc

Nếu có hai đĩa của mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (sản phẩm đặc) chứa ít hơn 15 khuẩn lạc, thì tính trung bình số học y của các khuẩn lạc đếm được trên cả hai đĩa.

Biểu thị kết quả như sau :

- đối với sản phẩm dạng lỏng : Số lượng nấm men và nấm mốc có trong một mililit được ước tính là $N_E = y$
- đối với sản phẩm dạng khác : Số lượng nấm men và nấm mốc có trong một gam sản phẩm được ước tính là $N_E = y/d$

trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

10.3 Không có các khuẩn lạc trên các đĩa

Nếu không có các khuẩn lạc trên các đĩa mẫu thử (sản phẩm dạng lỏng) thì số lượng nấm men và nấm mốc trong một mililit sản phẩm được ghi là nhỏ hơn 1.

Nếu không có các khuẩn lạc trên các đĩa của huyền phù ban đầu (sản phẩm dạng khác) thì số lượng nấm men và nấm mốc trong một gam sản phẩm được ghi là nhỏ hơn 10.

11 Độ chụm

Tính riêng về mặt thống kê, trong 95% trường hợp các giới hạn tin cậy của kỹ thuật đếm khuẩn lạc dao động từ $\pm 16\%$ đến $\pm 52\%$ (xem tài liệu tham khảo [3]); đối với các số đếm ít hơn 15 khuẩn lạc trong một đĩa, các giới hạn tin cậy được đưa ra trong phụ lục A. Trên thực tế, có thể gặp phải dao động thậm chí còn lớn hơn, đặc biệt là giữa các kết quả nhận được từ các nhân viên thử nghiệm khác nhau.

12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ rõ

- phương pháp lấy mẫu đã dùng, nếu biết;
- phương pháp đã sử dụng, kể cả số ngày ủ;

TCVN 7137 : 2002

- kết quả thử nghiệm thu được; và
- nêu kết quả cuối cùng thu được, nếu kiểm tra độ lặp lại.

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ ra phương pháp đã sử dụng và kết quả thu được. Cũng phải đề cập đến tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả.

Báo cáo thử nghiệm cũng phải gồm mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.

Phụ lục A

(qui định)

Các giới hạn tin cậy đối với ước tính số lượng nhỏ khuẩn lạc

Các giới hạn tin cậy ở mức 95% về ước tính các số lượng nhỏ, khi số khuẩn lạc còn lại nhỏ hơn 15 :

Số lượng khuẩn lạc ¹⁾	Số lượng vi sinh vật	Giới hạn tin cậy ở mức 95%		Phần trăm lỗi đối với giới hạn	
		Dưới	Trên	Dưới	Trên ²⁾
1	1	<1	3	-97	+457
2	1	<1	4	-88	+261
3	2	<1	4	-79	+192
4	2	1	5	-73	+156
5	2	1	6	-68	+133
6	3	1	6	-63	+118
7	4	2	7	-60	+106
8	4	2	8	-57	+97
9	4	2	9	-54	+90
10	5	2	9	-52	+84
11	6	3	10	-50	+79
12	6	3	10	-48	+75
13	6	3	11	-47	+71
14	7	4	12	-45	+68
15	8	4	12	-44	+65
16	8	5	13	-43	+62
17	8	5	14	-42	+60
18	9	5	14	-41	+58
19	10	6	15	-40	+56
20	10	6	15	-39	+54
21	10	6	16	-38	+53
22	11	7	17	-37	+51
23	12	7	17	-36	+50
24	12	8	18	-36	+49
25	12	8	18	-35	+48
26	13	8	19	-35	+47
27	14	9	20	-34	+46
28	14	9	20	-34	+45
29	14	9	21	-33	+44
30	15	10	21	-32	+43

1) Đếm được trên hai đĩa Petri.

2) Được so sánh với số đếm vi sinh vật (cột 2).

Phụ lục B

(tham khảo)

Tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4993 - 89 (ISO 7954 : 1987) Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung đếm nấm men và nấm mốc. Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25 °C.
 - [2] TCVN 4833 - 1 : 2002 (ISO 3100-1 : 1991) Thịt và sản phẩm thịt – Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử – Phần 1 : Lấy mẫu.
 - [3] Cowell, N.D. and Morisetti, M.D. J. Sci. Fd. Agric., 20, 1969, p. 573.
-