

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6265:2007

ISO 6611:2004

Xuất bản lần 2

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA - ĐỊNH LƯỢNG ĐƠN VỊ HÌNH
THÀNH KHUẨN LẠC TỪ NẤM MEN VÀ/HOẶC NẤM MỐC -
KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 25 °C**

*Milk and milk products - Enumeration of colony-forming units of yeasts
and/or moulds - Colony-count technique at 25 °C*

HÀ NỘI - 2007

Lời nói đầu

TCVN 6265:2007 thay thế TCVN 6265:1997;

TCVN 6265:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 6611:2004/IDF 94:2004;

TCVN 6265:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm* sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa và sản phẩm sữa – Định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc từ nấm men và/hoặc nấm mốc – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25 °C

*Milk and milk products – Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds –
Colony-count technique at 25 °C*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phát hiện và định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) từ nấm men và/hoặc nấm mốc trong sữa và sản phẩm sữa, bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25 °C.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng;
- sữa bột, whey bột, buttermilk bột và lactoza;
- phomat;
- casein axit, casein lactic và casein rennet;
- caseinat, whey bột axit;
- bơ;
- sản phẩm sữa đông lạnh (bao gồm cả kem lạnh thực phẩm);
- custard, món tráng miệng, cream và sữa lên men.

CHÚ THÍCH Phương pháp này không thích hợp đối với số lượng lớn các nấm men không bền nhiệt (trong phomat tươi). Trong các trường hợp đó thì phương pháp đếm trên bề mặt đĩa thạch là thích hợp hơn.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 6263:2007 (ISO 8261:2001), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật. Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.

3 Định nghĩa

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

3.1

nấm men và nấm mốc (yeasts and moulds)

các vi sinh vật ở 25 °C tạo thành các khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc, dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

4.1 Chuẩn bị các đĩa cấy, sử dụng môi trường cấy chọn lọc và một lượng mẫu thử xác định nếu sản phẩm ban đầu là dạng lỏng, hoặc của huyền phù ban đầu nếu mẫu thử dạng khác.

Chuẩn bị các đĩa khác trong cùng một điều kiện, với các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu.

4.2 Nuôi ấm các đĩa này 5 ngày, trong môi trường hiếu khí ở 25 °C.

4.3 Tính số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) từ nấm men và/hoặc nấm mốc trong 1 gam hoặc 1 mililit mẫu thử, từ số khuẩn lạc thu được trên các đĩa đã chọn ở các mức pha loãng sao cho để thu được kết quả có ý nghĩa.

5 Dịch pha loãng và môi trường cấy

Hướng dẫn chung, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

5.1 Nguyên liệu chính

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

5.1.1 Dịch pha loãng

Đối với dịch pha loãng dùng cho mục đích chung, xem TCVN 6263 (ISO 8261).

5.1.2 Phân phối, khử trùng và bảo quản

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

5.2 Môi trường cao men/dextroza/oxytetracyclin/thạch

5.2.1 Môi trường cơ bản

5.2.1.1 Thành phần

Bột cao men	5,0 g
Dextroza ($C_6H_{12}O_6$)	20,0 g
Thạch	10 g đến 15 g ^a
Nước	900 ml
^a Tùy thuộc vào sức đông của thạch.	

5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần hoặc môi trường hoàn chỉnh khô trong nước, đun nóng nếu cần.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng, pH là 6,6 ở 25 °C.

Khử trùng 15 phút bằng nồi hấp (6.1) ở 121 °C ± 1 °C.

5.2.2 Dung dịch oxytetracyclin hydro clorua

5.2.2.1 Thành phần

Oxytetracyclin hydro clorua ($C_{22}H_{30}O_{11}.HCl$)	50 mg
Nước	50 ml

TCVN 6265:2007

5.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan oxytetracyclin hydro clorua trong nước. Chuẩn bị dung dịch này ngay trước khi sử dụng. Khử trùng dung dịch bằng cách lọc.

5.2.3 Môi trường hoàn chỉnh

5.2.3.1 Thành phần

Dung dịch oxytetracyclin hydro clorua	10 ml
Môi trường cơ bản	90 ml

5.2.3.2 Chuẩn bị

Làm nguội môi trường cơ bản đã khử trùng (5.2.1) đến 45 °C. Ngay trước khi sử dụng, đưa dung dịch oxytetracyclin hydro clorua (5.2.2) về 45 °C và cho 10 ml dung dịch này một cách vô trùng vào 90 ml môi trường cơ bản.

5.3 Môi trường cao men/dextroza/cloramphenicol/thạch

5.3.1 Thành phần

Bột cao men	5,0 g
Dextroza (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20,0 g
Cloramphenicol (C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅)	0,1 g ^a
Thạch	12 g đến 15 g ^b
Nước	1 000 ml

^a Để thu được nồng độ cuối cùng của môi trường là 100 µg/ml.

^b Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần.

Nếu cần, chỉnh pH để sau khi khử trùng, pH là 6,6 ở 25 °C.

Phân phối môi trường thạch này vào các vật chứa thích hợp (6.8).

Khử trùng 15 phút bằng nồi hấp (6.1) ở 121 °C ± 1 °C.

6 Thiết bị, dụng cụ

CẢNH BÁO – Khử trùng tất cả các dụng cụ tiếp xúc với mẫu thử, với dịch pha loãng, với dung dịch hoặc môi trường nuôi cấy phù hợp với 6.1 của TCVN 6263 (ISO 8261).

Có thể dùng các dụng cụ sử dụng một lần để thay cho các dụng cụ thủy tinh có thể sử dụng nhiều lần, nếu phù hợp với các yêu cầu qui định.

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thử nghiệm vi sinh, các thiết bị cần thiết để xử lý mẫu thử và các dung dịch pha loãng theo quy định của TCVN 6263 (ISO 8261) và các loại sau:

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

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, có khả năng thao tác ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

6.4 Pipet chia độ, được nhét bông ở đầu, đã hiệu chỉnh dung tích đến $1\text{ ml} \pm 0,02\text{ ml}$, hoặc $10\text{ ml} \pm 0,2\text{ ml}$, hoặc $11\text{ ml} \pm 0,2\text{ ml}$.

6.5 Nồi cách thủy, có khả năng thao tác ở $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.6 Thiết bị đếm khuẩn lạc, bao gồm một bộ phận chiếu sáng có nền đen, được gắn với một kính lúp có độ khuếch đại 1,5 lần và có một dụng cụ đếm cơ hoặc điện tử.

6.7 pH mét bù nhiệt, có độ chính xác tới $\pm 0,1$ đơn vị pH ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.8 Bình cấy hoặc chai cấy

Có thể dùng chai hoặc bình cầu có nắp xoáy bằng kim loại không độc.

7 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

Trong trường hợp đối với phomat chín có nấm mốc hoặc nấm men phủ kín, thì phải loại bỏ lớp phủ ra khỏi mẫu thử. Trong trường hợp này, phải dùng dao đã khử trùng để loại bỏ lớp vỏ trước khi lấy mẫu.

8 Cách tiến hành

8.1 Khái quát

Để tăng độ chụm của phương pháp, việc chuẩn bị các dung dịch pha loãng phải được chuẩn hoá cẩn thận. Những yếu tố tác động đến độ chụm là:

- kiểu loại thiết bị khuấy trộn;
- thời gian khuấy trộn;
- dịch pha loãng;
- thời gian để cho các hạt to lắng xuống và
- thời gian khuấy cho phép khi chuẩn bị các dung dịch loãng thập phân.

CẢNH BÁO Thực hiện các thao tác vô trùng thông thường. Những thao tác qui định trong 8.2 và 8.3 không được tiến hành dưới ánh nắng mặt trời.

8.2 Chuẩn bị mẫu thử và dung dịch pha loãng ban đầu

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

8.3 Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

8.4 Thời gian tiến hành

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

8.5 Cấy và nuôi ươm

8.5.1 Lấy hai đĩa Petri (6.3) vô trùng. Dùng pipet vô trùng (6.4) cho vào mỗi đĩa 1 ml mẫu thử nếu sản phẩm dạng lỏng hoặc 1 ml huyền phù ban đầu nếu sản phẩm dạng khác.

8.5.2 Lấy thêm hai đĩa Petri vô trùng. Dùng một pipet vô trùng khác cho vào mỗi đĩa 1 ml dung dịch mẫu thử pha loãng 10^{-1} (sản phẩm dạng lỏng) hoặc 1 ml dung dịch pha loãng 10^{-2} (sản phẩm dạng khác)

8.5.3 Nếu cần, lặp lại thao tác này, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo.

8.5.4 Rót vào mỗi đĩa Petri khoảng 15 ml môi trường chứa oxytetracyclin hydro clorua (5.2) hoặc môi trường chứa cloramphenicol (5.3), trước đó đã được làm tan chảy và được duy trì ở 45 °C trên nổi cách thủy (6.5).

8.5.5 Trộn kỹ chất cấy với môi trường bằng cách xoay đĩa Petri và để cho hỗn hợp đông đặc lại bằng cách đặt đĩa này trên một mặt phẳng nằm ngang, mát.

8.5.6 Thời gian từ khi chuẩn bị dung dịch pha loãng thứ nhất đến khi trộn chất cấy với môi trường không được quá 15 phút.

8.5.7 Chuẩn bị đủ số đĩa để kiểm tra độ vô trùng.

8.5.8 Lật ngược các đĩa đã cấy xong (8.5.5) và đặt chúng vào tủ ấm (6.2) (trong khi vẫn để lật úp) ở nhiệt độ 25 °C trong 5 ngày.

Để tránh sự lan rộng, cần phải để phòng như sau:

- phủ thêm một lớp môi trường cấy lên mặt các đĩa cấy sau khi đã đông đặc, hoặc
- nhỏ thêm một giọt glyxerol lên giấy lọc trong nắp của đĩa.

8.5.9 Không chồng quá sáu đĩa lên nhau. Để các chồng đĩa tách xa hẳn nhau cũng như xa thành và nóc tủ ấm.

8.6 Diễn giải

8.6.1 Đếm số khuẩn lạc trên mỗi đĩa. Tránh đếm nhầm các khuẩn lạc mọc bất thường. Nếu cần, phân biệt các khuẩn lạc nấm men và nấm mốc trên cơ sở đặc tính sinh thái. Xem 8.7.

8.6.2 Chỉ giữ lại các đĩa chứa từ 10 khuẩn lạc đến 150 khuẩn lạc. Nếu các phần của đĩa bị nấm mốc che khuất, hoặc nếu khó đếm các khuẩn lạc một cách riêng biệt, thì đếm các khuẩn lạc trên các đĩa có độ pha loãng cao hơn, ngay cả khi số khuẩn lạc có thể ít hơn 10. Khi đó, nên tiến hành theo 9.2.

8.7 Khẳng định

Nhận biết các khuẩn lạc chính xác hoặc còn nghi ngờ bằng cách kiểm tra qua kính hiển vi.

Nếu cần, khẳng định ít nhất là \sqrt{n} các khuẩn lạc xác định bằng kính hiển vi, trong đó n là số khuẩn lạc đếm được.

9 Biểu thị kết quả

9.1 Chỉ giữ lại các đĩa có ít nhất là 10 khuẩn lạc và không nhiều hơn 150 khuẩn lạc.

Tính số CFU từ nấm men và/hoặc nấm mốc, N , trong 1 gam hoặc 1 mililit sản phẩm theo công thức:

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

trong đó

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

n_1 là số đĩa của độ pha loãng thứ nhất có chứa từ 10 đến 150 khuẩn lạc;

n_2 là số đĩa của độ pha loãng thứ hai có chứa từ 10 đến 150 khuẩn lạc;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

Nếu có nhiều hơn hai độ pha loãng có thể đếm được cho kết quả từ 10 đến 150 khuẩn lạc thì công thức phải được sửa đổi, có tính đến những độ pha loãng tiếp theo đó. Với ba độ pha loãng thì theo công thức sau:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d}$$

trong đó

n_3 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ ba, có chứa từ 10 đến 150 khuẩn lạc.

Làm tròn kết quả thu được đến hai chữ số có nghĩa. Khi số cần làm tròn là 5 mà không có chữ số có nghĩa nào đứng theo sau thì làm tròn số đứng trước chữ số 5 cho thành số chẵn. Ví dụ: 28 500 làm tròn thành 28 000 và 11 500 được làm tròn thành 12 000.

Lấy kết quả là số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) của nấm men và/hoặc nấm mốc trong 1 mililit sản phẩm, biểu thị theo số từ 1,0 đến 9,9 nhân với 10^x , trong đó x là lũy thừa tương ứng của 10.

Ví DỤ: Việc đếm CFU từ nấm men và/hoặc nấm mốc cho kết quả như sau (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng đã được ủ):

- ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-2}) được giữ lại chứa 83 và 97 khuẩn lạc;
- ở độ pha loãng thứ hai (10^{-3}) được giữ lại chứa 33 và 28 khuẩn lạc;

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

Làm tròn kết quả theo 9.1 thu được 11 000 hoặc $1,1 \times 10^4$ CFU nấm men và/hoặc nấm mốc trong một gam, hoặc một mililit sản phẩm.

9.2 Nếu có hai đĩa tương ứng với mẫu thử (dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (dạng khác) chứa ít hơn 10 khuẩn lạc thì báo cáo kết quả như sau:

- ít hơn 10 CFU từ nấm men và/hoặc nấm mốc trong một mililit sản phẩm (sản phẩm dạng lỏng).
- ít hơn $10 \times 1/d$ CFU từ nấm men và/hoặc nấm mốc trong một gam sản phẩm (sản phẩm dạng khác), trong đó d là hệ số pha loãng của huyền phù ban đầu.

9.3 Nếu tất cả các đĩa đều chứa nhiều hơn 150 khuẩn lạc, thì tính số lượng ước tính từ các đĩa có số khuẩn lạc gần 150 nhất và nhân số này với số nghịch đảo của độ pha loãng cao nhất. Báo cáo kết quả theo "số lượng ước tính các đơn vị khuẩn lạc từ nấm men và/hoặc nấm mốc trong một gam hoặc một mililit sản phẩm".

10 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm độc lập riêng rẽ, thu được từ hai lần thử, sử dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên vật liệu giống hệt nhau, do cùng một người tiến hành trong cùng một phòng thử nghiệm, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá 30 % kết quả thấp hơn.

Nếu các yêu cầu về độ lặp lại không thoả mãn thì cần xem xét nguồn gốc có khả năng gây sai lỗi.

CHÚ THÍCH Định nghĩa về độ lặp lại, xem TCVN 6910-1 (ISO 5725-1).

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải chỉ ra:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) 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;
- e) kết quả thử nghiệm thu được, hoặc nếu độ lặp lại được kiểm tra thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Thư mục liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
 - [2] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.
 - [3] TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
-