

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ SÀI GÒN
KHOA CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

BÀI GIẢNG THỰC HÀNH HỆ HCDH

PHÂN TÍCH THỰC PHẨM 2

Năm học 2010-2011

MỤC LỤC

Nội quy phòng thí nghiệm

Bài 1: Định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí

Bài 2: Định lượng Coliforms bằng môi trường đặc trưng

Bài 3: Định lượng tổng số nấm men và nấm mốc

Bài 4: Xây dựng đường tương quan tuyến tính giữa độ đục và mật độ tế bào

Phụ lục: Một số môi trường thông dụng

Tài liệu tham khảo

NỘI QUI PHÒNG THÍ NGHIỆM

Một số vi sinh vật được sử dụng trong các bài thí nghiệm có thể gây bệnh cho người và động vật, vì thế các nội qui được ban hành để ngăn ngừa nguy cơ nhiễm bệnh cho sinh viên và cán bộ phòng thí nghiệm. Bất kỳ cá nhân nào không tuân thủ tốt các nội qui hay gây nguy hại cho người khác đều không được phép vào phòng thí nghiệm. Khi có bất kỳ thắc mắc nào cần phải yêu cầu sự hướng dẫn của giáo viên hoặc cán bộ phòng thí nghiệm.

1. Các qui định chung

- + Sinh viên vào phòng thí nghiệm phải mặc trang phục bảo hộ (áo khoác trắng) có bảng tên (thẻ sinh viên)
- + Sinh viên phải tham dự 100% các buổi thí nghiệm
- + Sinh viên phải đến đúng giờ, nếu đến trễ quá 15 phút, sinh viên không được phép vào phòng thí nghiệm và được xem như vắng mặt không lý do
- + Nếu vì bất kỳ lý do bất khả kháng nào sinh viên không tham dự được buổi thí nghiệm, sinh viên phải báo trước (hoặc vào buổi thí nghiệm) cho cán bộ các trách nhiệm (ĐT: 38505520, bấm tiếp số nội bộ. PTN Công nghệ sinh học: 318 hoặc PTN Chất lượng: 317)
- + Khi làm hư hỏng các trang thiết bị/dụng cụ của phòng thí nghiệm, sinh viên có nghĩa vụ phải hoàn trả lại
- + Sinh viên phải đọc kỹ bài trước khi vào thí nghiệm và không được mang tài liệu thí nghiệm vào phòng
- + Khi làm đổ/tràn các dung dịch hoặc làm bể dụng cụ thủy tinh phải báo cáo cho cán bộ phòng thí nghiệm và xin ý kiến giải quyết.
- + Sinh viên phải nắm vững các thao tác vô trùng.
- + Giảm thiểu sự hình thành khí dung khi thao tác.
- + Rửa tay trước và sau khi thí nghiệm.
- + Không được ăn/uống/nghe nhạc/đọc sách-báo trong phòng thí nghiệm.
- + Đọc kỹ các nội qui/qui định có ở cửa phòng thí nghiệm.
- + Vệ sinh bàn/ghế/kệ và các dụng cụ trước và sau khi thí nghiệm.
- + Đổ bỏ rác thải đúng qui định.
- + Không ngậm các đồ dùng (viết, kiếng...) trong miệng hay gắn vào tai.
- + Đọc và ký tên vào các qui định/nội qui để chắc chắn sinh viên đã đọc và hiểu.
- + Trả đầy đủ dụng cụ sau khi hoàn thành xong bài thí nghiệm. Dụng cụ phải được rửa sạch.
- + Vệ sinh phòng thí nghiệm theo yêu cầu của người phụ trách

2. Các yêu cầu an toàn

- + Cột tóc, mặc các phục trang bảo hộ (áo khoác trắng, găng tay chống nhiệt...) và dùng dụng cụ/thiết bị đúng lúc, đúng nơi.
- + Nghiêm cấm dùng miệng hút pipette.

3. Trong các tình huống khẩn cấp

+ Lưu ý vị trí các trang bị cấp cứu khi cần (dụng cụ y tế, bình cứu hỏa, vòi nước, điện thoại và số điện thoại cấp cứu).

+ Báo cáo các tình huống khẩn cấp ngay lập tức cho giáo viên hướng dẫn hoặc cán bộ phòng thí nghiệm.

+ Bình tĩnh khi có tình huống khẩn cấp.

PTN Chất Lượng Thực Phẩm

BÀI 1

ĐỊNH LƯỢNG TỔNG SỐ VI KHUẨN HIẾU KHÍ

1 Định nghĩa và nguyên tắc

Vi khuẩn hiếu khí là những vi khuẩn tăng trưởng và hình thành khuẩn lạc trong điều kiện có sự hiện diện của oxi phân tử. Tổng số vi khuẩn hiếu khí hiện diện trong mẫu chỉ thị mức độ vệ sinh của thực phẩm. Chỉ số này được xác định bằng phương pháp đếm khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch dinh dưỡng trong một lượng mẫu xác định trên cơ sở xem 1 khuẩn lạc là sinh khối phát triển từ một tế bào hiện diện trong mẫu và được biểu diễn dưới dạng một đơn vị hình thành khuẩn lạc (*Colony Forming Unit, CFU*), trong 1 đơn vị khối lượng thực phẩm. Chỉ số này có một số tên gọi khác nhau như sau: số vi sinh vật hiếu khí (*Aerobic Plate Count, APC*), tổng số đếm trên đĩa (*Total Viable Count, TPC*), tổng số vi sinh vật sống (*Total Viable Count, TVC*), số đếm đĩa chuẩn (*Standard Plate Count, SPC*)

Quy trình phân tích bao gồm các bước cân mẫu, đồng nhất mẫu, pha loãng thành các dãy nồng độ thập phân, chuyển và phân phối đều một thể tích xác định mẫu lên trên bề mặt môi trường rắn trong đĩa petri bằng phương pháp trải hộp (*spread plate*) hay đổ hộp (*pour plate*). Ủ ở điều kiện nhiệt độ và thời gian qui định.

Phương pháp đổ hộp được sử dụng phổ biến trong các phòng kiểm nghiệm vi sinh. Điều kiện nhiệt độ và thời gian ủ thay đổi tùy theo yêu cầu phân tích và qui định của từng quốc gia. Tiêu chuẩn của nhiều quốc gia qui định ủ ở 30°C trong 3 ngày.

Chỉ tiêu tổng số vi sinh vật hiếu khí được dùng để đánh giá chất lượng của mẫu về vi sinh vật, nguy cơ hư hỏng, thời hạn bảo quản của sản phẩm, mức độ vệ sinh trong quá trình chế biến, bảo quản sản phẩm.

2 Môi trường và hóa chất

Môi trường sử dụng là *Plate Count Agar (PCA)* có pH 7.0 ± 0.2 . Môi trường được pha chế, phân phối vào các bình thủy tinh và hấp tiệt trùng ở 121°C trong 15 phút.

Các bình hoặc ống nghiệm chứa môi trường chưa sử dụng phải được bảo quản trong tủ lạnh 2 – 8°C. Trước khi sử dụng phải được đun chảy và làm nguội khoảng 45 – 50°C trong bể điều nhiệt.

Nước cất được chứa trong các bình thủy tinh và hấp trùng ở 121°C trong 15 phút. Sau đó phải được bảo quản trong tủ lạnh 2 – 8°C.

3 Quy trình phân tích (mẫu dạng lỏng)

3.1. Chuẩn bị mẫu trước khi phân tích

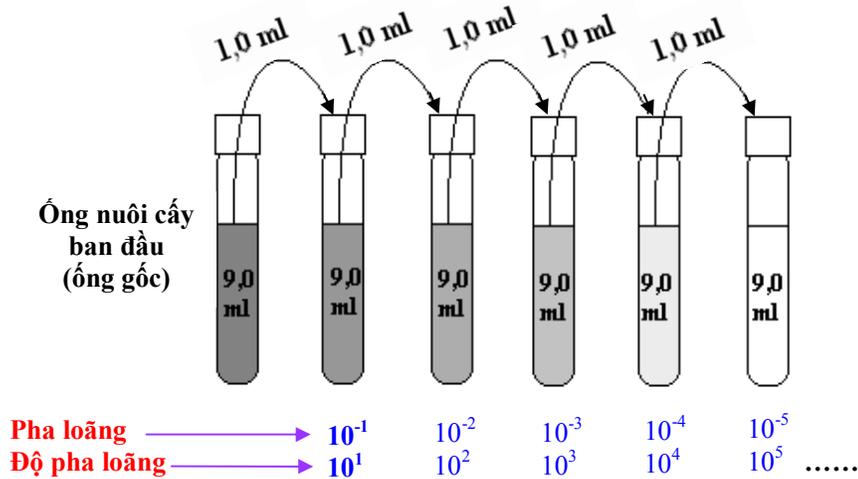
Mẫu được pha loãng theo dãy thập phân bằng cách dùng pipet vô trùng chuyển 1ml mẫu vào ống nghiệm chứa 9ml nước vô trùng. Trộn mẫu thật kỹ. Dung dịch này có độ pha loãng 10^{-1} . Tiếp tục chuyển 1 ml mẫu từ độ pha loãng 10^{-1} sang ống nghiệm chứa 9 ml nước vô trùng thứ 2. Trộn mẫu thật kỹ. Dung dịch này có độ pha loãng 10^{-2} . Tiếp tục tiến hành tương tự để có các độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} ...

***Lưu ý:**

+ Pipet có nguy cơ bị nhiễm trong quá trình thao tác (chạm tay, chạm mặt ngoài ống nghiệm, mặt ngoài bình chứa...), cần phải thay pipet vô trùng khác.

+ Các thao tác tiến hành trong điều kiện vô trùng (sử dụng đèn cồn)

+ Các dụng cụ (pipet, đĩa petri...) phải được tiệt trùng trước khi sử dụng (sấy ở 150°C/3 giờ)



3.2. Đổ hộp (cấy mẫu)

- Dùng bút lông dầu ghi chú lên đĩa petri (tên mẫu, ngày tiến hành, độ pha loãng...)
- Dùng pipet vô trùng chuyển 1 ml dịch mẫu pha loãng vào giữa đĩa petri. Tương ứng với mỗi độ pha loãng thực hiện ít nhất 2 – 3 đĩa (tức là 2 – 3 lần lặp lại).
- Sau khi cấy, đổ vào mỗi đĩa 10 – 15 ml môi trường PCA đã được đun chảy và ổn định ở 45 - 50°C.
- Trộn đều dịch mẫu với môi trường bằng cách xoay tròn đĩa petri xuôi và ngược chiều kim đồng hồ, mỗi chiều 3 – 5 lần ngay sau khi đổ môi trường.
- Đặt các đĩa trên mặt phẳng ngang và để yên cho môi trường đông đặc hoàn toàn (khoảng 15 phút).
- Ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C trong 48 – 72 giờ (48 giờ lấy kết quả sơ bộ, 72 giờ lấy kết quả chính thức)

❖ **Lưu ý:** khi ủ phải để hộp petri ở trạng thái lật úp (phần môi trường ở trên, phần nắp nằm bên dưới)



❖ Cách tính kết quả

Đếm tất cả số khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa sau khi ủ. Chọn các đĩa có số khuẩn lạc đếm được từ 25 – 250 để tính toán. Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí:

$$A \text{ (CFU/g hay CFU/ml)} = \frac{N}{n_1 V f_1 + \dots + n_i V f_i}$$

Trong đó:

A: số tế bào (CFU) vi khuẩn trong 1ml (hay trong 1 g) mẫu

N: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn

N_i: số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ *i*

V: thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa

f_i: độ pha loãng tương ứng

Làm tròn kết quả có được, chỉ giữ lại 2 số có nghĩa và biểu thị kết quả dưới dạng thập phân giữa 1.0 và 9.9 nhân với 10ⁿ (n là số mũ)

Trường hợp có khuẩn lạc vi sinh vật mọc loang, mỗi vết loang được tính là 1 khuẩn lạc. Nếu số khuẩn lạc loang chiếm hơn 1/3 đĩa thì phải ghi nhận điều này và đánh dấu kết quả nhận được.

❖ **TRƯỜNG HỢP ĐẶC BIỆT:**

- ❖ Nếu ở độ pha loãng cao nhất trong dãy các ống nghiệm nói trên, số khuẩn lạc đếm được trên 1 đĩa > 250: ví dụ ở 10^{-5} (độ pha loãng cao nhất) có số khuẩn lạc đếm được > 250, kết quả được ghi là : $> 2.5 \times 10^7$ CFU/ml
- ❖ Nếu ở độ pha loãng thấp nhất trong dãy các ống nghiệm nói trên, số khuẩn lạc đếm được trên 1 đĩa < 250: ví dụ nồng độ 10^{-2} (độ pha loãng thấp nhất) có số khuẩn lạc đếm được < 25, kết quả được ghi là: $< 2.5 \times 10^3$ CFU/ml

Ví dụ: ta thu được kết quả sau

Nồng độ pha loãng	10^{-3}	10^{-4}
Đĩa 1	235	26
Đĩa 2	246	21

$$A = \frac{235 + 246 + 26}{2 \times 1 \times 10^{-3} + 1 \times 1 \times 10^{-4}} = 241429 = 2.4 \times 10^5 \text{ (CFU/ml)}$$

BÀI 2

ĐỊNH LƯỢNG COLIFORMS BẰNG MÔI TRƯỜNG ĐẶC TRƯNG

1. Định nghĩa *Coliforms*, *Coliforms* chịu nhiệt, *Coliforms* phân

Coliforms là những trực khuẩn gram âm không sinh bào tử, hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý, có khả năng lên men lactose sinh acid, aldehyde và sinh hơi ở 37°C trong 24 – 48 giờ, đặc biệt có khả năng mọc được trên môi trường có muối mật (*Bile Salt*). Nhóm *Coliforms* hiện diện rộng rãi trong tự nhiên, trong ruột người và động vật. *Coliforms* được xem là nhóm vi sinh vật chỉ thị: số lượng hiện diện của chúng trong thực phẩm, nước hay có loại môi trường được dùng để chỉ thị khả năng hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng khi số *Coliforms* của thực phẩm cao thì khả năng hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác cũng cao. Tuy nhiên, mối liên hệ giữa vi sinh vật gây bệnh và vi sinh vật chỉ thị này vẫn còn nhiều tranh cãi. Nhóm *Coliforms* gồm 4 giống: *Escherichia* với 1 loại duy nhất là *E.coli*, *Citrobacter*, *Clebsiella*, *Enterobacter*. Tính chất sinh hoá đặc trưng của nhóm này được thể hiện qua các thử nghiệm indol (I), Methy Red (MR), Voges-Proskauer (VP) và Citrate (iC) thường được gọi tóm tắt chung là IMViC.

Coliforms chịu nhiệt là những *Coliforms* có khả năng lên men lactose sinh hơi trong khoảng 24 giờ khi ủ ở 44°C trong môi trường lỏng EC. *Coliforms* phân (faecal coliforms hay *E.coli* giả định) là *Coliforms* chịu nhiệt có khả năng sinh indole khi được ủ khoảng 24 giờ ở 44.5°C trong môi trường lỏng Trypton. *Coliforms* phân là một thành phần của hệ vi sinh đường ruột ở người và động vật máu nóng khác và được sử dụng để chỉ thị mức độ vệ sinh trong quá trình chế biến, bảo quản, vận chuyển, thực phẩm, nước uống cũng như để chỉ thị sự ô nhiễm phân trong mẫu môi trường. *E.coli* là *Coliforms* phân cho kết quả thử nghiệm IMViC là ++-- (Indol +, Methyl Red +, Voges-Proskauer -, Citrate -)

Cách xác định dựa vào nguyên tắc sau: cấy một lượng quy định mẫu thử (đã được pha thành dãy thập phân liên tiếp) vào môi trường đặc trưng VRBL ủ ở 35-37°C trong 24-48h. Đếm số khuẩn lạc đặc trưng và biểu thị thành số coliform trong 1g hoặc 1ml mẫu.

2. Cách tiến hành:

2.1 Nuôi cấy

Chuẩn bị môi trường VRBL ở 45°C.

Pha loãng mẫu thành dãy thập phân và tiến hành phương pháp đổ đĩa như bài 1 với môi trường VRBL

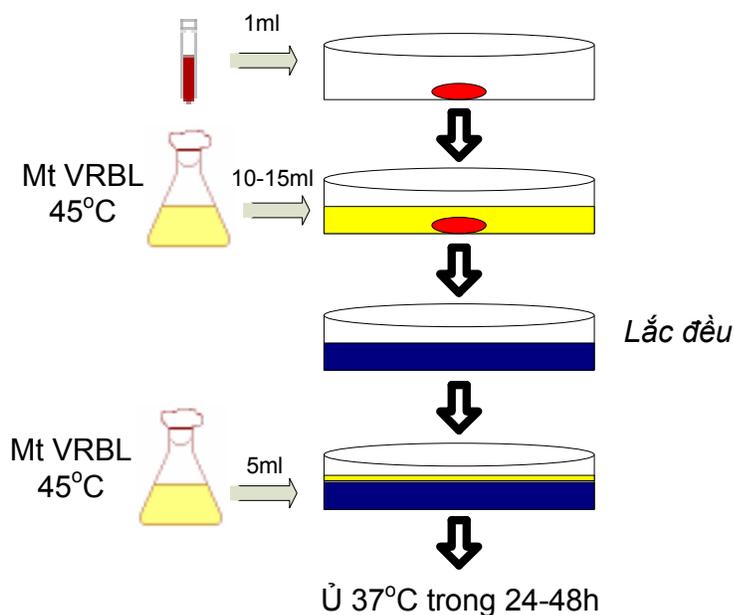
Đổ 1 đĩa môi trường VRBL nhưng không chứa mẫu để kiểm tra độ vô trùng của môi trường

Sau khi tất cả các đĩa đã đông đặc, đổ thêm 4-5 ml môi trường VRBL ở 45°C tráng phủ kín bề mặt đĩa và để đông đặc

Ủ trong tủ cấy với nhiệt độ 35 hoặc 37°C trong 24-48h

2.2 Đọc kết quả:

Sau 24 giờ các khuẩn lạc đặc trưng có màu đỏ tía, đường kính 0,5 mm hoặc hơn, đôi khi bị bao quanh bởi một vùng mật kết tủa hơi đỏ.



2.3 Tính kết quả:

* Trường hợp chung:

Giữ lại các đĩa chứa từ 15-150 khuẩn lạc đặc trưng giữa hai độ pha loãng liên tiếp (có một đĩa chứa ít nhất 15 khuẩn lạc đặc trưng). Số coliform trong 1g (hoặc 1ml) mẫu được tính như sau:

$$X = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

ΣC : Tổng các khuẩn lạc đặc trưng trên các đĩa được giữ lại

n_1 : số đĩa được giữ lại với độ pha loãng đầu

n_2 : số đĩa được giữ lại với độ pha loãng tiếp theo

d : hệ số pha loãng của độ pha loãng đầu

* Trường hợp mỗi đĩa chứa ít hơn 15 khuẩn lạc đặc trưng:

Số coliform vẫn được tính theo công thức trên

* Trường hợp số nhỏ

Nếu 2 đĩa ứng với dạng huyền phù ban đầu đều chứa ít hơn 15 khuẩn lạc đặc trưng thì kết quả có thể xem như sau:

X: ít hơn 15 coliform/ml (các sản phẩm ở thể lỏng)

X: ít hơn 150 coliform/g (các sản phẩm không ở thể lỏng)

* Trường hợp không có khuẩn lạc đặc trưng:

Nếu 2 đĩa ứng với dạng huyền phù ban đầu đều không chứa khuẩn lạc đặc trưng nào thì kết quả có thể xem như sau:

X: ít hơn 1 coliform/ml (sản phẩm lỏng)

X: ít hơn 10 coliform/g (sản phẩm dạng rắn)

BÀI 3

ĐỊNH LƯỢNG TỔNG SỐ NẤM MEN VÀ NẤM MỐC

1. Định nghĩa và nguyên tắc

Nấm men và nấm mốc là nhóm vi sinh vật rất đa dạng, cho đến nay có hơn 4 trăm ngàn loài nấm men và nấm mốc đã được mô tả. Chúng thuộc nhóm *Eukaryote*, có vách tế bào là lớp vỏ chitin. Nấm men và nấm mốc là các vi sinh vật dị dưỡng, chúng tiêu thụ nguồn carbon hữu cơ được cung cấp từ môi trường bên ngoài tế bào.

Hầu hết nấm mốc và nấm men thuộc nhóm *mesophiles*, một số ít thuộc nhóm *psychrophiles*, hoặc *thermophiles*. Hầu hết nấm men và nấm mốc phát triển trong môi trường có hoạt độ nước từ 85% trở lên, một số ít loài có thể tăng trưởng trong môi trường có hoạt độ nước 60 – 70%. Nấm mốc và nấm men tăng trưởng được trong khoảng pH từ 2.0 – 9.0, trong đó pH thích hợp nhất là 4.0 – 6.5. Đa số nấm men và nấm mốc đều thuộc nhóm hiếu khí bắt buộc, một số có thể phát triển trong điều kiện vi hiếu khí. Một số loài có thể tiếp nhận oxi nguyên tử từ cơ chất, nhưng dù ở dạng nào, oxi vẫn là nguyên tố cần thiết cho quá trình phát triển của nấm mốc và nấm men.

Trong thực phẩm, sự hiện diện và sinh trưởng của chúng có thể làm thay đổi các tính chất của thực phẩm (màu sắc, mùi vị...), gây hư hỏng và có thể tạo thành một số độc tố gây ngộ độc thực phẩm.

Mật độ nấm mốc và nấm men trong mẫu được xác định chung dưới dạng tổng số nấm men và nấm mốc bằng các kỹ thuật pha loãng, trải đĩa và đếm khuẩn lạc trên môi trường *Dichloran Glycerol Agar*, hay *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)*. Môi trường *Dichloran Glycerol Agar* được sử dụng cho các loại thực phẩm có hàm lượng nước thấp (thực phẩm khô, ngũ cốc, tiêu..., các loại thực phẩm có dầu, có hàm lượng đường/muối cao). Môi trường *DRBC* được sử dụng cho các mẫu có hàm lượng nước cao (sữa, các sản phẩm từ sữa, đồ hộp, các loại rau quả...). Đối với các mẫu có mật độ nấm mốc thấp, các môi trường thường được sử dụng là *Malt Extract Agar (MEA)*, *Potato Dextrose Agar (PDA)* chứa 40ppm chloramphenicol hay chlortetracycline.

2. Cách tiến hành

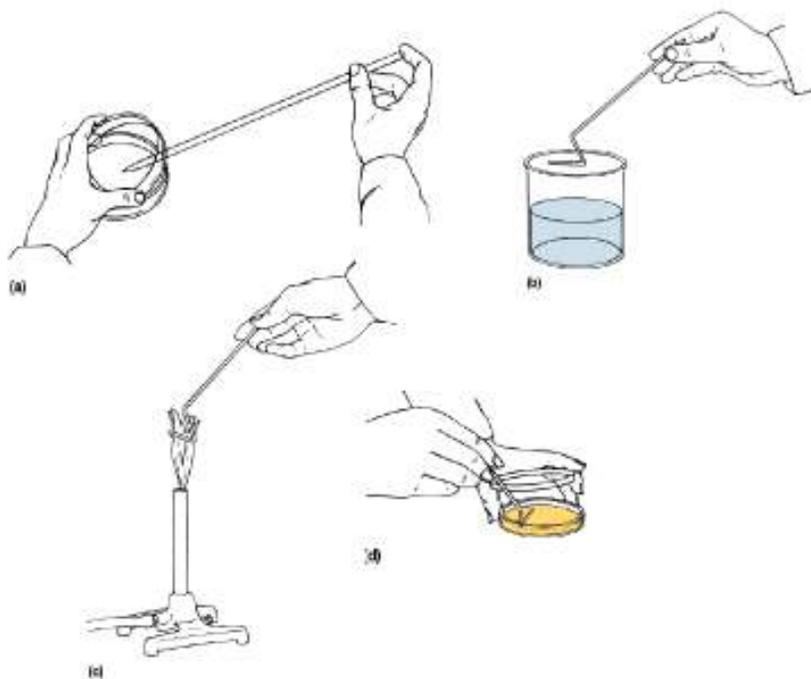
- a. Tiến hành pha loãng thập phân mẫu ban đầu
- b. Sử dụng kỹ thuật trải đĩa để tiến hành xác định chỉ tiêu tổng số nấm men, nấm mốc trong mẫu
 - ✓ Ghi nhãn lên đĩa petri (tên mẫu, tên kỹ thuật viên, ngày...)
 - ✓ Đổ môi trường vào trong đĩa petri (khoảng 15ml). Chờ cho môi trường đông đặc hoàn toàn (khoảng 15 phút)
 - ✓ Dùng pipette cho 0.1 ml mẫu vào chính giữa đĩa thạch
 - ✓ Nhúng que thủy tinh hình L vào một cốc chứa ethanol. Sau đó gõ nhẹ que thủy tinh vào thành cốc để loại bớt ethanol thừa
 - ✓ Khẽ đưa que thủy tinh gần ngọn lửa đèn ethanol để làm bốc cháy que thủy tinh. Làm nguội bằng cách chạm que thủy tinh vào phần nắp bên trong đĩa thạch.

- ✓ Trãi mẫu vi sinh vật sao cho mẫu dàn đều khắp bề mặt môi trường thạch.
- ✓ Nhúng que thủy tinh vào ethanol, gõ nhẹ vào cốc và đốt cháy que thủy tinh.
- ✓ Lặp lại thao tác với đĩa thạch kế tiếp. Tương ứng với mỗi độ pha loãng thực hiện ít nhất 2 – 3 đĩa (tức là 2 – 3 lần lặp lại).
- ✓ Tiến hành nuôi cấy trong tủ ủ vi sinh ở 30°C trong 5 – 7 ngày
- ✓ Tiến hành quan sát hình thái đại thể của khuẩn lạc, đếm số khuẩn lạc nấm men/nấm mốc và ghi nhận lại kết quả.

3. Đọc kết quả

- a. Tương tự bài “Định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí”
- b. Đọc kết quả từ ngày 5 – 7

❖ *Lưu ý: trong thời gian ủ, nấm mốc có thể tạo bào tử và phát tán vào trong môi trường nuôi cấy, tạo thành khuẩn lạc mới. Để hạn chế hiện tượng này, trong suốt thời gian ủ, không được chạm tay hoặc di chuyển các đĩa cho đến khi đếm kết quả. Mặt khác, khi tiến hành đếm khuẩn lạc cần hạn chế việc mở đĩa để tránh sự phát tán của bào tử vào không khí, gây nhiễm vào mẫu hay môi trường nuôi cấy khác. Các đĩa khi đem ủ phải để mặt thạch nằm phía dưới, nắp hộp petri nằm trên.*



Kỹ thuật trải đĩa

BÀI 4

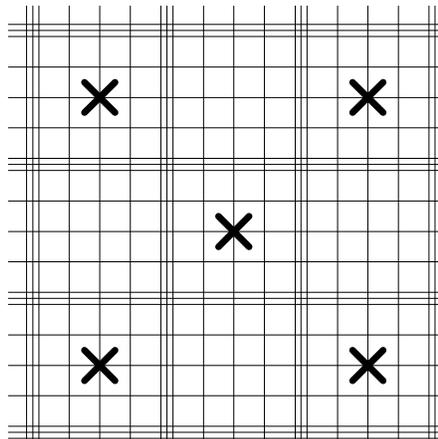
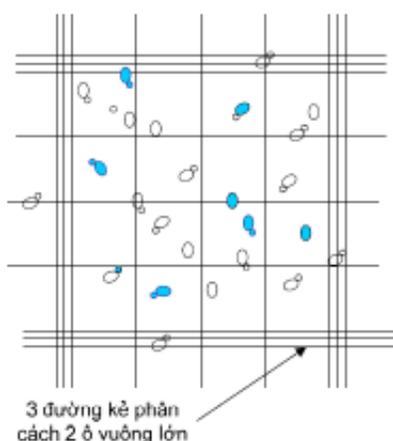
XÂY DỰNG ĐƯỜNG TƯƠNG QUAN TUYẾN TÍNH GIỮA ĐỘ ĐỤC VÀ MẬT ĐỘ TẾ BÀO

1. Định lượng trực tiếp tế bào bằng buồng đếm

Có thể sử dụng buồng đếm để định lượng vi sinh vật có kích thước tế bào lớn như nấm men, bào tử nấm mốc... với độ phóng đại x100 đến x400. Với tế bào vi khuẩn, do kích thước nhỏ, nên phải sử dụng buồng đếm Petroff-Hasser. Phương pháp đếm trực tiếp còn giúp quan sát được hình thái tế bào... Kết quả đếm được là tổng số tế bào có trong mẫu, không phân biệt được tế bào còn sống hay tế bào chết (chỉ phân biệt tế bào nấm men chết khi tiến hành nhuộm với dung dịch methylen blue)

Cấu tạo buồng đếm hồng cầu

- Buồng đếm hồng cầu là một phiến kính dày hình chữ nhật, giữa là phần lõm phẳng, tại đây có kẻ một lưới gồm 400 ô vuông nhỏ có diện tích tổng cộng là 1mm^2 . Bao gồm 25 ô vuông lớn; mỗi ô vuông lớn này gồm có 16 ô vuông nhỏ. Vì thế, diện tích một hình vuông nhỏ là $1/400\text{mm}^2$ và một hình vuông lớn là $1/25\text{mm}^2$.



Buồng đếm hồng cầu

Cách tiến hành

1. Pha loãng huyền phù tế bào vi sinh vật thành 5 độ pha loãng liên tiếp (sao cho trong mỗi ô lớn có từ 10 – 50 tế bào).
2. Lắc mạnh dịch huyền phù tế bào (đã pha loãng), dùng pipet Pasteur để hút dịch huyền phù này.
3. Đậy buồng đếm bằng một phiến kính mỏng
4. Nhẹ nhàng dùng đầu pipet (có một giọt huyền phù vi sinh vật), đặt vào cạnh buồng đếm (nơi tiếp giáp với phiến kính mỏng). Dịch huyền phù sẽ đi vào buồng đếm nhờ cơ chế mao dẫn. Buồng đếm được chuẩn bị đúng khi chỉ có vùng không gian nằm giữa lá kính và buồng đếm được điền bởi dịch huyền phù tế bào, còn các rãnh chung quanh thì không bị dính ướt.

5. Di chuyển nhẹ nhàng khung đếm để dịch huyền phù tràn đầy các khoang. Khi đó, dịch nằm trong khoang có độ dày khoảng 0.1mm
6. Đặt buồng đếm lên kính hiển vi, sử dụng vật kính x4 để tìm buồng đếm. Sau đó, lần lượt chuyển sang các vật kính x10 và x40 để quan sát.
7. Điều chỉnh cường độ ánh sáng bằng cửa sập để có thể quan sát rõ ràng cả tế bào lẫn các đường kẻ. Tùy vào số lượng tế bào mà có thể chọn cách đếm tất cả các tế bào có trong ô trung tâm hay chỉ đếm các tế bào có trong một số ô vuông lớn đại diện. Thông thường ta chọn 1 ô trung tâm và 4 ô nằm ngoài bia hoặc 5 ô theo đường chéo (các ô đánh dấu X)
8. Bắt đầu đếm tế bào sau khi nhỏ giọt dịch từ 3 – 5 phút; phải đếm các tế bào nằm trên 2 đường kẻ kề nhau được chọn của từng ô.

2. Định lượng bằng phương pháp đo độ đục

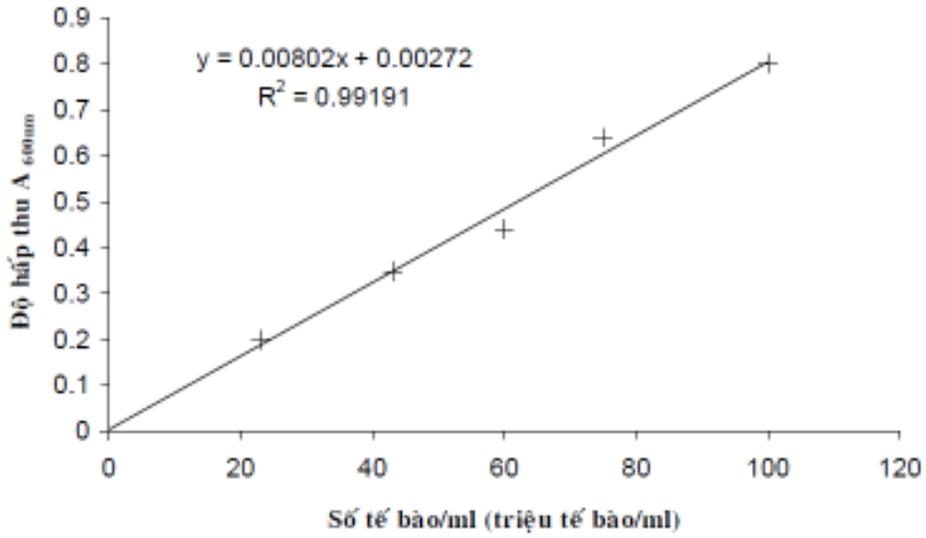
Mật độ vi sinh vật có thể được xác định một cách gián tiếp thông qua đo độ đục. Khi một pha lỏng có chứa nhiều phần tử không tan thì sẽ hình thành một hệ huyền phù và có độ đục bởi các phần tử hiện diện trong môi trường lỏng cản ánh sáng, làm phân tán chùm ánh sáng tới. Tế bào vi sinh vật cũng là một thực thể nên khi hiện diện trong môi trường cũng làm môi trường trở nên đục. Độ đục của huyền phù tỉ lệ với mật độ tế bào. Trong một giới hạn nhất định của độ đục và mật độ tế bào, có thể xác lập được quan hệ tỉ lệ tuyến tính giữa mật độ tế bào và độ đục. Do vậy, có thể định lượng mật độ tế bào một cách gián tiếp thông qua đo độ đục bằng máy quang phổ kế ở các bước sóng từ 550 – 610nm. Trong trường hợp này, trước tiên cần phải thiết lập được đường quan hệ tuyến tính giữa độ đục và mật độ tế bào bằng cách sử dụng một số huyền phù tế bào có độ đục xác định và mật độ tế bào của mỗi huyền phù được xác định bằng một phương pháp trực tiếp khác, ví dụ như phương pháp đếm khuẩn lạc, phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm...

Cách tiến hành

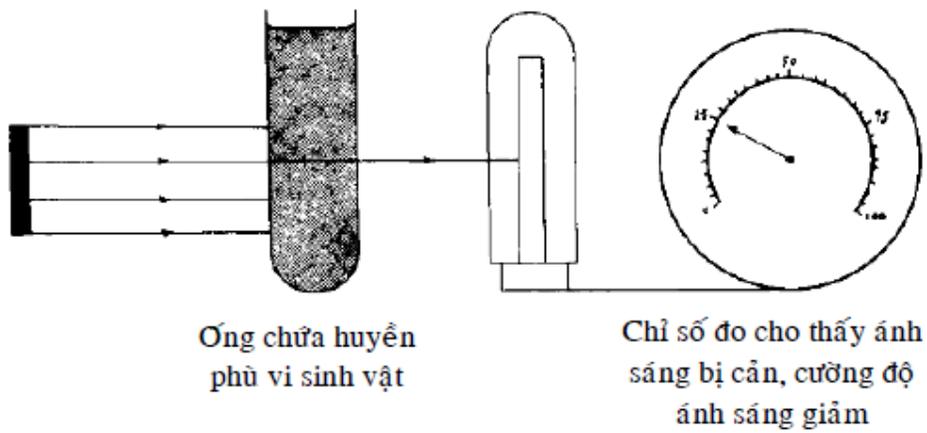
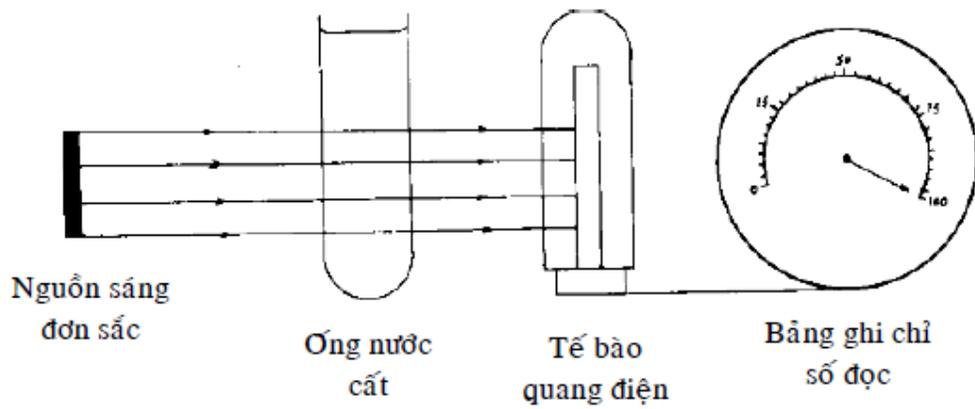
1. Sử dụng 5 độ pha loãng ở trên. Với mỗi độ pha loãng ta đem đi đo ở độ hấp thụ A_{600nm}
2. Ghi nhận kết quả

3. Xây dựng đường chuẩn

Với 5 độ pha loãng từ huyền phù tế bào vi sinh vật ban đầu, ta thu được 5 kết quả số lượng tế bào vi sinh vật bằng buồng đếm hồng cầu và 5 giá trị A_{600nm} . Sử dụng các kết quả này để vẽ đồ thị xy với trục tung là giá trị A_{600nm} và trục hoành là số lượng tế bào vsv đếm được.



Đồ thị mối quan hệ giữa độ đục và mật độ tế bào



Minh họa phương pháp đo độ đục huyền phù vi sinh vật

MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG THÔNG DỤNG

❖ **M1** (môi trường giá đậu đường)

Cân 100g giá đậu (đã rửa sạch), thêm 1000ml nước. Đun sôi 30 phút. Lấy phần dịch trong. Thêm nước cho đủ 1000ml. bổ sung thêm glucose với hàm lượng 5% (w/v)

❖ **M2** (môi trường khoai tây đường cám): 1000ml

Khoai tây cắt nhỏ, rửa sạch, cân lấy 300g. Thêm 500ml nước, đun sôi 30 phút. Lọc lấy nước trong. Cân 100g cám, thêm 500ml nước, đun sôi 30 phút. Lọc lấy nước trong. Trộn 2 loại dịch lọc trên và thêm sucrose 5% (w/v). Bổ sung nước cho đủ 1000ml.

Khoai tây 30%	Cám 10%
Sucrose 5%	Nước đủ 1000ml

❖ **M3** (môi trường Sabouraud): 1000ml

Pepton 1%	Glucose 4%
Agar 2%	Nước đủ 1000ml

pH 5.6 – 6.0

❖ **M4** (môi trường Hansen)

Glucose 5%	Pepton 1%
K ₂ HPO ₄ 0.3%	MgSO ₄ .7H ₂ O 0.2%
Agar 2%	Nước đủ 1000ml

❖ **M5** (môi trường Potato Dextrose Agar)

Để chuẩn bị chất chiết khoai tây, đun sôi 200g khoai tây xắt lát, không gọt vỏ với 1000ml nước trong 30 phút. Lọc qua vải thưa, giữ lại phần dịch, đó là chất chiết khoai tây. Trộn với các thành phần khác rồi đun sôi để hoà tan (đối với môi trường Potato dextrose salt: chuẩn bị như môi trường M5 rồi thêm: 7.5% NaCl)

Chất chiết khoai tây 20% (v/v)	Dextrose 2%
Agar 2%	Nước đủ 1000ml

❖ **M6** (môi trường thạch malt)

Lấy 250g malt, nghiền nhỏ, hoà vào 1000ml nước cất. Dùng đũa thủy tinh khuấy đều và gia nhiệt từ từ, đến 45 – 50°C, giữ ở nhiệt độ này trong 30 phút. Sau đó nâng nhiệt độ lên 65 – 68°C, có khuấy, cho đến khi quá trình đường hóa xảy ra hoàn toàn (không thấy màu xanh xuất hiện khi thử dịch cháo với dung dịch Lugol). Lọc tách bã qua vải thô (hay bông gòn thấm nước), đem hấp phần dịch 121°C / 30 phút, lấy ra để lắng. Lọc bỏ kết tủa, pha loãng để đạt 6 – 8° Brix, thêm 2% agar, đun và khuấy đều cho đến khi thạch tan hết. Cho môi trường thạch vào các dụng cụ chứa, hấp tiệt trùng 121°C / 15 phút.

❖ **M7** (môi trường BGBL 2% Broth – dạng pha sẵn)

Peptic digest of animal tissue 1%
Lactose 1%
Oxygall 2%

Brilliant green 0.0133g/L

Dùng 40g hỗn hợp pha sẵn để pha thành 1000ml môi trường.

- ❖ **M8** (môi trường Plate Count Agar – ATCC medium 1048): 1000ml
 - Agar 150 g
 - Yeast extract 2.5
 - Pancreatic digest of casein 5 g
 - Glucose 1.0g

- ❖ **M9** (môi trường LST - Lauryl Sufate Broth/Lauryl Tryptose Broth): 1000ml
 - Pancreatic digest of casein 20 g
 - Lactose 5 g
 - NaCl 5 g
 - K₂HPO₄ 2.75 g
 - KH₂PO₄ 2.75 g
 - Sodium lauryl sufate 0.1 g
 - pH 6.8 ± 0.2 Nước Đủ 1000ml

- ❖ **M10** (Môi trường VRBL- Crystal Violet neutral Red Bile Lactose agar):
 - Pepton 7g
 - Yeast Extract 3g
 - Lactose 10g
 - NaCl 5g
 - Muối mật 1,5g
 - Neutral Red 0,03g
 - Crystal Violet 0,002g
 - Agar 15g
 - Nước đến 1000 ml

Hòa tan các thành phần trên trong nước, để yên vài phút, đặt lên bếp đun sôi và khuấy đều, để sôi 2-5 phút. Làm nguội đến 45°C để sử dụng.

Chú ý:

- Không để sôi quá lâu
- Không được tiệt trùng môi trường
- Môi trường phải được sử dụng trong vòng 3 giờ sau khi pha chế xong

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm* – Trần Linh Thước – Nhà xuất bản Giáo dục, 2003
2. *Thực tập Vi sinh vật học thực phẩm* – Nguyễn Đức Lượng, Nguyễn Chúc, Lê Văn Việt Mẫn – Đại học Bách Khoa TP.HCM
3. *Thí nghiệm Vi sinh vật học thực phẩm* – Lê Văn Việt Mẫn, Lại Mai Hương – Nhà xuất bản Đại học quốc gia TP.HCM, 2006
4. *Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food* – Ronald M. Atlas – CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006
5. *Laboratory Manual of Food Microbiology for Ethiopian health and Nutrition Research Institute* – Dr. Ciira Kiiyukia – Unido project, 2003
6. *Food Microbiology Laboratory Manual* – Professor Nagendra Shah – School of Molecular Sciences Victoria University, 2004