

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

BÀI GIẢNG THỰC HÀNH

VI SINH THỰC PHẨM

Niên khóa 2009-2010

MỤC LỤC

- 1. Bài 1: Định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí**
- 2. Bài 2: Định lượng Coliforms bằng phương pháp MPN**
- 3. Bài 3: Định lượng tổng số nấm men và nấm mốc**
- 4. Bài 4: Xây dựng đường tương quan tuyến tính giữa độ đục và mật độ tế bào**
- 5. Bài 5: Lên men rượu vang quả**
- 6. Bài 6: Lên men giấm**
- 7. Một số môi trường thông dụng**
- 8. Tài liệu tham khảo**

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

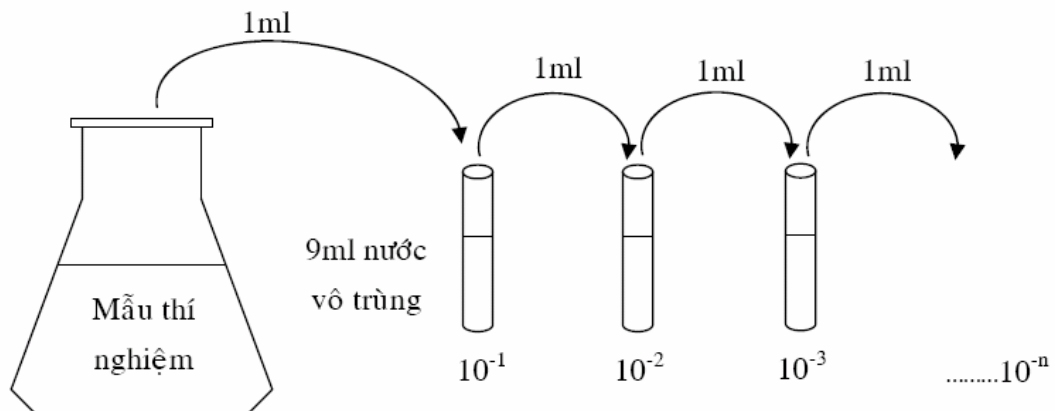
bình hoặc ống nghiệm chứa môi trường chưa sử dụng phải được bảo quản trong tủ lạnh 2 – 8°C. Trước khi sử dụng phải được đun chảy và làm nguội khoảng 45 - 50°C trong bể điều nhiệt.

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. Qui trình phân tích (mẫu dạng lỏng)

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} ...



Cách pha loãng mẫu

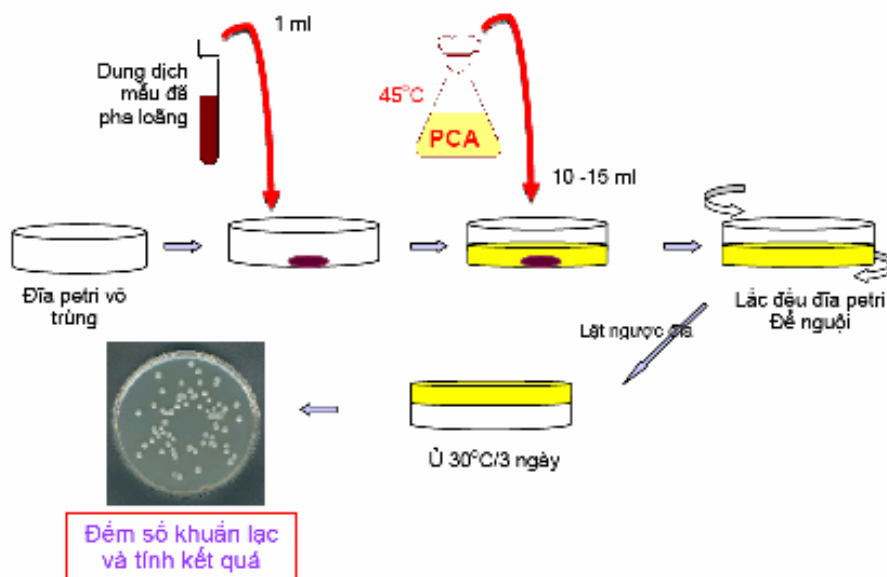
❖ Lưu ý:

- 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)

Đổ hộp (cấy mẫu)

- i. Dùng bút lông dầu ghi chú lên đĩa petri (tên mẫu, ngày tiến hành, độ pha loãng...)
- ii. 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).
- iii. Sau khi cấy, đổ vào mỗi đĩa 10 – 15 ml môi trường PCA đã được đun chảy và ổn định ở 45 - 50°C.
- iv. 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.
- v. Đặt các đĩa trên mặt phẳng ngang và để yên cho môi trường đông đặc hoàn toàn (khoảng 15 phút).
- vi. 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)



Quy trình thực hiện

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 x 10⁷ 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 x 10³ 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

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

BÀI 2

ĐỊNH LƯỢNG COLIFORMS BẰNG PHƯƠNG PHÁP MPN

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 và sinh hơi ở 37°C trong 24 – 48 giờ. Trong thực tế phân tích, *Coliforms* còn được định nghĩa là các vi khuẩn có khả năng lên men sinh hơi trong khoảng 48 giờ khi được ủ ở 37°C trong môi trường lỏng Lauryl Sulfate và môi trường Brilliant Green Lactose 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.

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 -)

2. Phương pháp MPN (Most Probable Number)

Phương pháp MPN (phương pháp số có xác suất cao nhất, số tối khả) còn được gọi là phương pháp pha loãng tới hạn hay phương pháp chuẩn độ. Đây là phương pháp dùng để đánh giá số lượng vi sinh vật theo số lượng vi sinh vật có xác suất lớn nhất hiện diện trong một đơn vị thể tích mẫu. Đây là phương pháp định lượng dựa trên kết quả định tính của một loạt thí nghiệm được lặp lại ở một số độ pha loãng khác nhau. Thông thường, việc định lượng này được thực hiện lặp lại ở 3 lần độ pha loãng bậc 10 liên tiếp, tổng cộng $3 \times 3 = 9$ ống nghiệm.

Qui trình thực hiện định lượng theo phương pháp này là như sau: cho vào ống nghiệm có chứa môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng của đối tượng vi sinh vật cần định lượng một thể tích chính xác dung dịch mẫu ở 3 nồng độ pha loãng bậc 10 liên tiếp (ví dụ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp. Dựa vào kết quả biểu kiến chứng minh sự tăng trưởng của vi sinh vật cần kiểm định trong từng ống nghiệm (thường là các hiện tượng sinh hơi, đổi màu, đục...). Ghi nhận số lượng các ống nghiệm dương tính ở từng độ pha loãng. Sử dụng các số liệu này và dựa vào bảng Mac Crady suy ra mật độ vi sinh vật được trình bày dưới dạng số MPN/100 ml, MPN/1 g mẫu. Độ chính xác của trị số MPN phụ thuộc vào số lượng ống nghiệm lặp lại trong mỗi độ pha loãng: số lượng ống nghiệm lặp lại càng cao thì độ chính xác của trị số vi sinh vật có thể được nuôi cấy trong môi trường lỏng chọn lọc và cho kết quả biểu kiến thích hợp. Ví dụ, môi trường BGBL ở 37°C có thể định lượng nhóm coliforms, cùng môi trường này ở 45°C cho phép định lượng coliforms phân hoặc môi trường Mannitol Salt Broth có thể dùng để định lượng *Staphylococcus*...

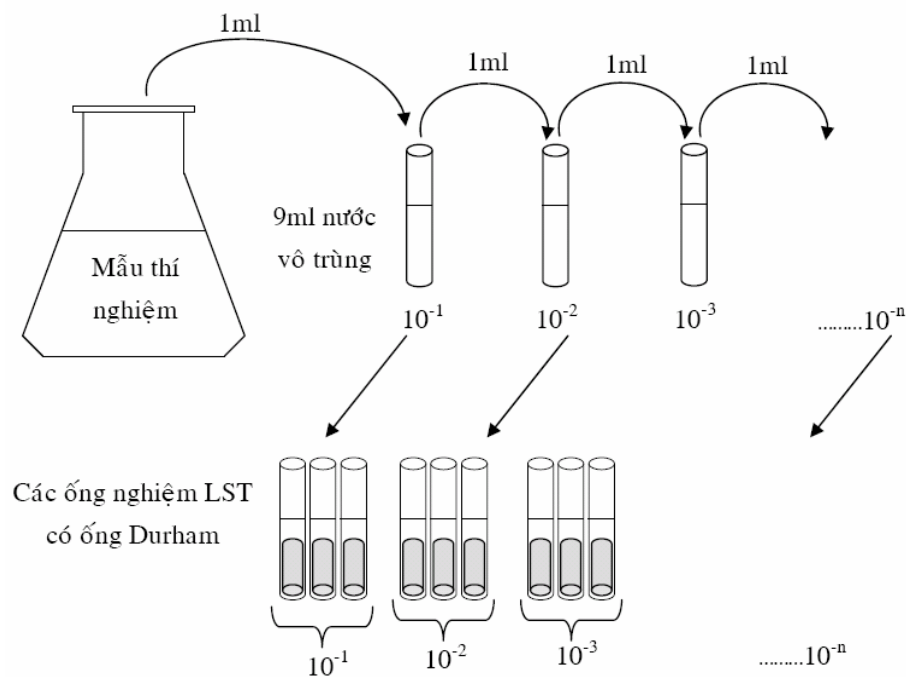
3. Định lượng Coliforms bằng phương pháp MPN

- i Tuần tự cấy 1 ml dịch mẫu đã pha loãng 10^{-1} vào 3 ống nghiệm giống nhau, mỗi ống chứa 10 ml môi trường *LST* và ống Durham úp ngược. Thực hiện tương tự với dịch mẫu đã pha loãng 10^{-2} , 10^{-3} đến 10^{-10} ...Ủ ống nghiệm trong

48 giờ ở 37°C. Ống dương tính là ống có sinh khí (bọt khí trong ống Durham). Ghi nhận số ống dương tính.

- ii Thử nghiệm khẳng định: dùng que cấy vòng chuyển dịch mẫu từ các ống LST dương tính sang các ống chứa môi trường BGBL và ủ ở 37°C trong 48 giờ. Ghi nhận số ống dương tính ứng với mỗi độ pha loãng

Lưu ý: cần loại bỏ các ống nghiệm có chứa bọt khí trong ống Durham sau khi tiết trùng môi trường. Các ống có khả năng hiện diện của Coliforms là các ống dương tính ở cả môi trường LST lẫn BGBL.



Các thao tác chính

4. Lựa chọn các độ pha loãng để tính kết quả

Mỗi mẫu kiểm nghiệm chọn 3 độ pha loãng liên tiếp ứng với 1 trong 3 trường hợp sau sao cho thích hợp. Tiến hành thứ tự theo các trường hợp và các bước (a, b,c...) sau:

Trường hợp 1

- a. Chọn độ pha loãng cao nhất (tức là dịch pha loãng có nồng độ mẫu nhỏ nhất) cho 3 ống dương tính, cùng với hai độ pha loãng cao hơn tiếp theo (tức là độ pha loãng này có nồng độ mẫu là 1/10 và 1/100 của độ pha loãng thứ nhất đã được chọn (xem ví dụ)

- b. Xem trường hợp 3
- c. Nếu các dịch pha loãng tiếp theo ngoài dịch pha loãng cao nhất cũng cho 3 ống dương tính thì chọn tiếp 3 độ pha loãng cao nhất trong cả dãy (tức là những độ pha loãng có nồng độ mẫu nhỏ nhất) (xem bảng 1, ví dụ 2)

✚ Trường hợp 2

- a. Nếu trường hợp 1 không thể áp dụng, chọn 3 độ pha loãng cao nhất trong cả dãy (tức là những độ pha loãng có nồng độ mẫu nhỏ nhất), trong số đó ít nhất thu được 1 kết quả dương tính (xem bảng 1, ví dụ 3)
- b. Xem trường hợp 3

✚ Trường hợp 3 (trường hợp đặc biệt)

Trong tất cả các trường hợp, khi có nhiều hơn một trong 3 độ pha loãng được chọn theo trường hợp 1 và 2 không có ống dương tính, thì hãy chọn độ pha loãng nào có độ pha loãng thấp nhất không có các ống dương tính (tức là độ pha loãng có nồng độ mẫu cao nhất) và 2 độ pha loãng thấp hơn kế tiếp trong dãy pha loãng (tức là có nồng độ mẫu gấp 10 lần và 100 lần độ pha loãng thứ nhất đã chọn), (xem bảng 1, ví dụ 4 & 5), trừ khi các ống dương tính chỉ tìm thấy ở mức pha loãng đầu tiên được chuẩn bị từ mẫu thử. Trong trường hợp cuối cùng này, cần chọn ra 3 độ pha loãng đầu tiên để tính MPN, thậm chí loạt ống này bao gồm 2 độ pha loãng không có ống dương tính nào

Ví dụ lựa chọn các kết quả dương tính đối với việc tính toán MPN

Mẫu	Số ống dương tính
1	3 <u>3</u> <u>2</u> <u>1</u> 0
2	3 <u>3</u> <u>3</u> <u>0</u>
3	2 2 <u>1</u> <u>1</u> <u>0</u>
4	<u>3</u> <u>3</u> <u>0</u> 0 0
5	<u>2</u> <u>2</u> <u>0</u> 1 0
_____ tổ hợp được chọn	

5. Xác định chỉ số MPN

Sử dụng kết quả của phần 4. để tra bảng 2

Kết quả (MPN/ml) = kết quả tra bảng x f/10

f: độ pha loãng thấp nhất được chọn (10^n)

ví dụ:

10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	Tra bảng 2	Kết quả (MPN/ml)
2	0	1	14	$14 \times 10^2 = 1.4 \times 10^3$

Bảng tra MPN dùng cho loạt 3 ống nghiệm ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp

Số ống dương tính			MPN/ml	Số ống dương tính			MPN/ml
0	0	0	-	2	0	0	9
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	2
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6	2	1	1	2
0	1	2	9	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6	2	2	0	21
0	2	1	9	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	4	3	0	0	23
1	0	1	7	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	2	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	2	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1100
1	3	3	29	3	3	3	-

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 *Eucaryote*, 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.

Đa số 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.

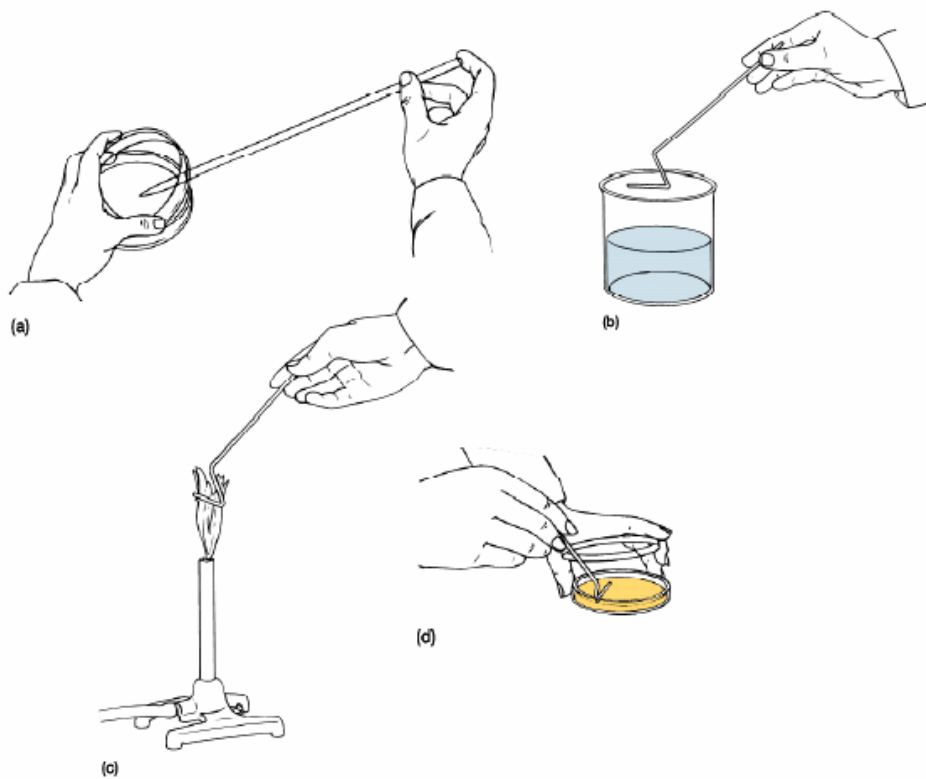
2. Cách tiến hành

- 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.
 - Trải 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 ôi 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, nằm hộp petri nằm trên.



Hình minh họa 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

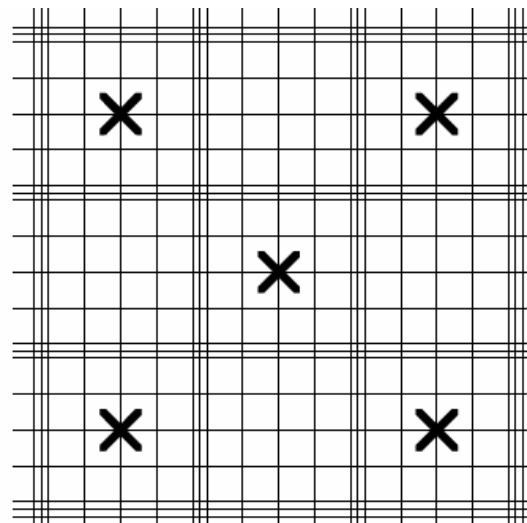
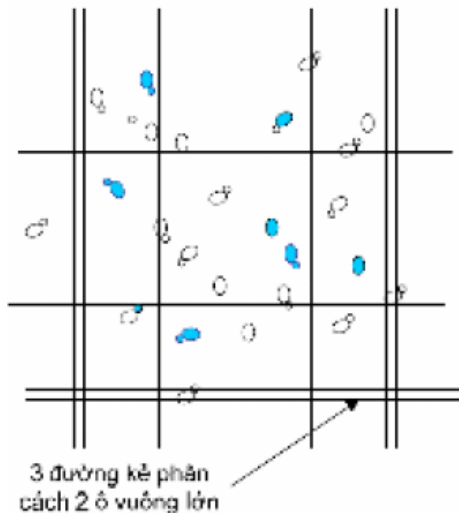
Buồng đếm hồng cầu là một phiến kính dày hình chữ nhật, giữa là phần lõm phẳng, tại đây có kẻ một lưới gồm 400 ô vuông nhỏ có diện tích tổng cộng là 1mm². Bao gồm 25 ô vuông lớn; mỗi ô vuông lớn này gồm có 16 ô vuông nhỏ. Vì thế, diện tích một hình vuông nhỏ là 1/400 mm² và một hình vuông lớn là 1/25 mm².

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 x10 để tìm buồng đếm. Chỉnh thật rõ, sau đó chuyển qua vật kính x40 để đếm
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 bìa 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.



Buồng đếm hồng cầu

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 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

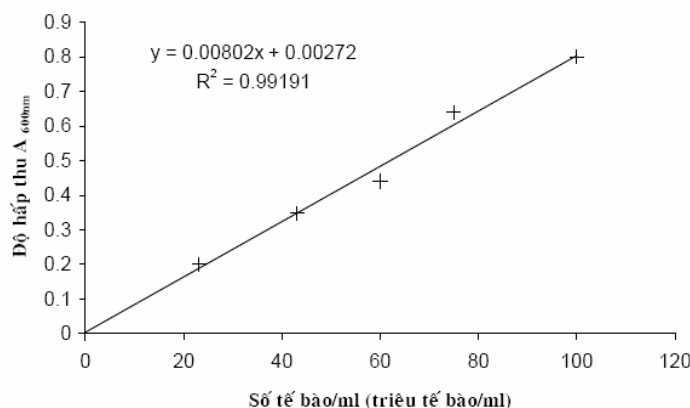
tán chùm ánh sáng tới. Tế bào vi sinh vật cũng là một thực thể nên khi hiện diện trong môi trường cũng làm môi trường trở nên đục. Độ đục của huyền phù tỉ lệ với mật độ tế bào. Trong một giới hạn nhất định của độ đục và mật độ tế bào, có thể xác lập được quan hệ tỉ lệ tuyến tính giữa mật độ tế bào và 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

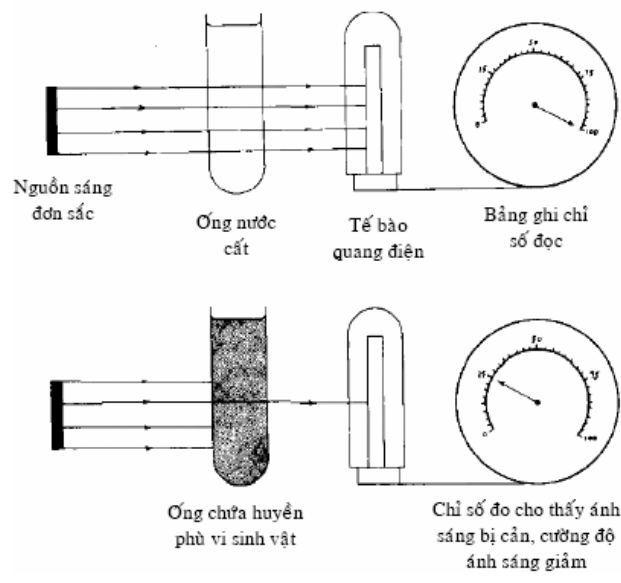
1. Sử dụng 5 độ pha loãng ở trên. Với mỗi độ pha loãng ta đem đi đo ở độ hấp thụ A_{600nm}
2. Ghi nhận kết quả

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 minh họa mối quan hệ tuyến tính giữa độ đục và mật độ tế bào



Hình minh họa nguyên tắc của phương pháp đo độ đục huyền phù vi sinh vật

BÀI 5

LÊN MEN RƯỢU VANG QUẢ

Danh từ *rượu vang quả* được dùng để chỉ loại rượu được lên men từ dịch ép trái cây (nho, dâu, thơm, táo...) của một số chủng nấm men. Rượu vang quả thu được không qua chưng cất, có hương vị thơm ngon của trái cây tự nhiên, có độ cồn nhẹ (10 – 15%) là loại nước giải khát thơm ngon, giàu chất bổ dưỡng, đặc biệt rất thích hợp đối với phụ nữ.

Tùy theo lượng đường khử còn lại trong rượu vang sau khi lên men xong, người ta phân biệt: (a) rượu vang khô: 10 g đường/l, (b) nửa khô: 20 – 30 g đường/l, (c) nửa ngọt: 45 g đường/l, và (d) rượu ngọt: 80 – 110 g đường/l. Trong rượu vang có chứa các acid hữu cơ và vô cơ (acid tarttric, acid malic, acidcitric, acid oxalic...). pH của rượu vang khoảng từ 2.9 – 3.9.

1. Qui trình thí nghiệm

- a. Rửa sạch quả (2~3kg)
- b. Làm dập quả (nho,...) hoặc xay dập (thơm, xoài,...) hoặc cắt thành lát mỏng. Với chuối, nên tiến hành xắt lát và sấy khô trước đó. Với các loại quả khác, ta xay dập, vắt lấy nước quả bằng túi vải lọc.
- c. Cho quả (hoặc dịch quả) vào trong hũ plastic loại 5 L đã rửa sạch (chọn loại có nắp vặn chắc).
- d. Bổ sung thêm nước (1~2 L) sao cho đạt 2/3 thể tích bình chứa.
- e. Bổ sung đường cát trắng sao cho dung dịch đạt nồng độ chất khô 25oBx (khuấy đều để đường tan hoàn toàn).
- f. Điều chỉnh về pH 5.0 (sử dụng giấy quỳ tím và acid citric).
- g. Bổ sung 10 ml môi trường chứa huyền phù *Saccharomyces oviformis* đã qua nhân giống trong 30°C /48 giờ
- h. Kết thúc quá trình lên men chính khi nồng độ chất khô không tiếp tục giảm và hầu như không có sự hình thành bọt khí trong bình lên men (khoảng 5 – 7 ngày). Ta có được *rượu non*.

- i. Lọc bỏ xác quả bằng vải lọc thưa.
- j. Tiến hành quá trình lên men phụ trong các chai plastic (chai pet loại 1.25–1.50 L) ở nhiệt độ 15 – 18°C (ngăn mát tủ lạnh). Thỉnh thoảng mở hé nắp vụn để xả bớt lượng khí CO₂ tích lũy trong chai (phòng tránh phồng/nổ chai)
- k. Sau 7 ngày, lọc bỏ cặn nhiều lần (qua bông gòn loại thấm nước) để có được *rượu sống*.
- l. Tiếp tục ủ *chín* trong các chai plastic như trên ở 15 – 18°C với thời gian vài tháng để có được *rượu vang chín*.

Gợi ý: tùy điều kiện, sinh viên có thể dùng 100% dịch quả (không bổ sung thêm nước) để có được hương vị của rượu tốt hơn. Để có được loại rượu với hương vị tốt, sinh viên nên sử dụng nho và thơm để làm thí nghiệm. Sinh viên có thể sử dụng rượu sống hoặc tiếp tục ủ chín để có rượu vang chín với hương vị tốt hơn

2. Theo dõi quá trình lên men qua một số chỉ tiêu sau

Trong giai đoạn lên men chính:

- a. Nồng độ chất khô (oBx): kiểm tra 2 ngày/lần.
- b. pH.
- c. Sự tạo thành bọt khí bên trong hũ nhựa (ghi nhận kết quả quan sát được).
- d. Độ cồn: mẫu rượu sau khi kết thúc lên men chính được chưng cất và xác định độ cồn bằng phương pháp chuẩn độ (hoặc phương pháp dùng bình tỉ trọng).

Các kết quả được ghi nhận vào bảng biểu và được vẽ đồ thị theo thời gian.

BÀI 6

LÊN MEN GIẤM

Theo khái niệm của Tổ Chức Nông Lương Thế Giới (FAO), giấm được định nghĩa như sau: ‘Giấm (vinegar) là dung dịch acid loãng mà con người có thể sử dụng được thông qua đường tiêu hóa. Giấm phải được sản xuất từ những nguyên liệu có nguồn gốc từ nông nghiệp chứa tinh bột, đường, đầu tiên bằng quá lên men chuyển đường thành rượu sau đó tiếp tục lên men acetic chuyển rượu thành acid acetic (thành phần chủ yếu của giấm). Đây là khái niệm được sử dụng phổ biến nhất trên thế giới cho tới ngày nay.

Một số ứng dụng quan trọng của giấm trong công nghệ thực phẩm là:

- Chất gia vị làm tăng giá trị cảm quan của một số sản phẩm thực phẩm như: sốt, tương cà, tương ớt, mayonaise, salad trộn, rau dầm giấm (dưa chuột dầm giấm, rau cải dầm giấm, hành dầm giấm, hương thảo dầm giấm...)
- Phụ gia bảo quản, khử mùi tanh của thịt cá trước khi chế biến.

Ngày nay, giấm đang được đa dạng hóa từ nhiều nguyên liệu khác nhau. Ở Nhật, ngoài vai trò tăng giá trị cảm quan, người ta còn sản xuất một số loại giấm chức năng như giấm từ gạo lức giàu acid amin, giấm từ củ hành giàu acid amin, K, Mg. Hàng năm, trên thế giới, sản lượng giấm tiêu thụ là rất lớn.

1. Quy trình thí nghiệm

- a. Tiến hành làm rượu vang quả (dứa, nho...) hoặc rượu gạo, rượu nếp than, rượu từ dịch chiết malt ... để thu được rượu non.
- b. Lọc bỏ bã bằng vải lọc
- c. Hiệu chỉnh nồng độ rượu về 5% bằng nước
- d. Bổ sung giống vi khuẩn *Acetobacter aceti* với tỉ lệ 10% - 30%.
- e. Cho phần rượu non đã bổ sung giống vi khuẩn đã lọc vào hũ (nhựa hoặc thủy tinh) sao cho phần rượu chiếm 50 – 70% thể tích vật chứa. Lưu ý, sau khi bổ sung giống nồng độ acid của dịch lên men phải đạt tối thiểu 0.5%
- f. (tính theo acid acetic), nếu chưa đạt phải hiệu chỉnh bằng acid acetic

- g. Để yên trong khoảng 1 tháng. Hàng ngày mở nắp hũ chứa một lần trong khoảng thời gian 1 – 2 phút. Tuyệt đối không được lắc hũ chứa hoặc làm cho lớp váng mỏng bị vỡ hay chìm xuống
- h. Kiểm tra độ acid định kỳ hàng tuần. Nếu đạt nồng độ acid acetic >4.5% là đạt yêu cầu. Ta thu được giấm non.
- i. Lọc kỹ qua một lớp bông gòn thấm nước hoặc ly tâm 5000 rpm trong 15 phút
- j. Cho vào chai thủy tinh và đóng nắp sau đó tiến hành thanh trùng 80 – 90°C (đun cách thủy) trong 15 – 30 phút
- k. Để có được loại giấm ngon ta có thể tiếp tục ủ chín giấm non ở điều kiện 30°C trong 1 – 2 tháng tiếp theo. Sau đó, lọc, đóng chai và thanh trùng như trên.

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 20%	Pepton 0,1%
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 – 50oC, giữ ở nhiệt độ này trong 30 phút. Sau đó nâng nhiệt

độ lên 65 – 68oC, 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 / 15 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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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