

TRƯỜNG CAO ĐẲNG LƯƠNG THỰC THỰC PHẨM
KHOA CÔNG NGHỆ SINH HỌC
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ VI SINH

BÀI THỰC HÀNH

KIỂM NGHIỆM VI SINH

NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Trình độ: Cao đẳng

Tổng số giờ thực hành: 30 giờ

Đà Nẵng, năm 2015

Bài 1

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ TRONG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Nêu được những nội qui phòng thí nghiệm vi sinh vật;
- Trình bày được quy trình tiến hành xử lý và bao gói các loại dụng cụ nuôi cấy vi sinh vật;
- Trình bày được phương pháp và chế độ khử trùng dụng cụ nuôi cấy vi sinh vật;
- Vận hành được tủ sấy để khử trùng các dụng cụ;
- Tiến hành các thao tác xử lý và bao gói các loại dụng cụ theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và có ý thức bảo vệ thiết bị.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Nguyên tắc chung

- Các loại dụng cụ dùng để nuôi cấy vi sinh vật phải đạt độ trung tính, thật sạch và trong, không bị nứt mẻ.
- Dụng cụ được bao gói phải đảm bảo thật sạch và khô.
- Bao gói phải thật kín và cẩn thận để dụng cụ sau khi khử trùng vẫn đảm bảo sự vô trùng trong lớp giấy gói và lấy ra sử dụng dễ dàng.
- Sau khi khử trùng cần phải đảm bảo sự vô trùng tuyệt đối cho các dụng cụ.

2. Hoá chất và dụng cụ

*** Hoá chất**

- Dung dịch sulfurbicromate
- Cồn 90⁰
- Xà phòng
- Chlorine 3%

*** Dụng cụ**

- | | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| - Ống nghiệm | - Đĩa petri |
| - Pipet (1 - 10 - 20 ml) | - Bình tam giác (100 - 250 - 500 ml) |
| - Đũa thủy tinh | - Que cấy vòng |
| - Cối, chày sứ | - Que cấy trang |
| - Cốc thủy tinh | - Phễu thủy tinh |

- Bóp cao su
- Ống không thấm nước
- Rổ nhựa
- Ống đong
- Giấy báo
- Dao nhỏ

3. Phương pháp rửa dụng cụ

* Ống nghiệm

- Đối với các ống nghiệm cũ đã bị nhiễm khuẩn:
 - + Khử trùng ở 121°C trong 15 phút.
 - + Lấy ra và đổ các vật phẩm trong ống nghiệm đi.
 - + Ngâm ống nghiệm vào nước ấm.
 - + Rửa ống nghiệm
 - + Sấy khô trong tủ ẩm ở $40 - 50^{\circ}\text{C}$.
- Đối với các ống nghiệm không nhiễm khuẩn hay chứa các vi khuẩn không gây bệnh: không phải hấp khử trùng và tiến hành rửa như trên.

* Đĩa petri

- Đặt ngửa đĩa petri trong lòng bàn tay trái.
- Tay phải dùng giẻ chấm xà phòng xát vào hai mặt của đĩa, các khe ở chân đĩa và thành đĩa.
- Rửa nước 2 - 3 lần.
- Úp nghiêng các đĩa trong rổ nhựa cho thật khô.
- Sấy khô trong tủ ẩm ở $40 - 50^{\circ}\text{C}$.

* Pipet

- Dùng que hoặc dây thép nhỏ rút nút bông ở đầu lớn pipet ra.
- Khử trùng ở 121°C trong 15 phút.
- Ngâm vào dung dịch sulfurbicromate trong 24 giờ.
- Xát kỹ hai đầu và phần ngoài pipet bằng giẻ với nước xà phòng.
- Dùng nước xả ngược để thông cặn pipet.
- Cắm pipet trên giá, đầu nhọn để lên trên.

* Phiến kính

- Đối với phiến kính cũ (đã dùng làm tiêu bản)
 - + Làm sạch mỡ hay vaseline trên phiến kính bằng cách ngâm trong dung dịch sulfurbicromate trong 48 giờ.
 - + Ngâm phiến kính vào nước xà phòng và đun sôi trong 1 giờ.
 - + Rửa nước, để ráo.
 - + Ngâm phiến kính vào cồn 90° trong 2 giờ.
 - + Lau khô chúng bằng vải mịn rồi sấy khô.
- Đối với phiến kính mới: cần kiểm tra độ pH và xử lý để đạt độ trung tính.

* **Các dụng cụ thủy tinh khác:** gồm phễu, chai, lọ, cối sứ, bình tam giác...

- Dùng giẻ với nước xà phòng đặc lắc kỹ để rửa phần trong dụng cụ.
- Rửa nước nhiều lần cho thật sạch và để ráo.

* **Nút và ống cao su**

- Phân loại các dụng cụ này theo kích thước to, nhỏ, tốt, xấu, sạch hay bẩn.

- Ngâm từng loại riêng vào nước ấm ($50 - 80^{\circ}\text{C}$) trong 3 - 4 giờ.
- Rửa nước nhiều lần.
- Phơi nắng 2 - 3 giờ rồi cất đi dùng dần.

4. Phương pháp bao gói dụng cụ

Việc bao gói dụng cụ gồm hai khâu:

- *Làm nút bông:* cho các ống nghiệm, bình tam giác, pipet,...
- *Bao gói:* cho hầu hết các dụng cụ thủy tinh.

* **Cách làm nút bông**

- Đối với các ống nghiệm:
 - + Lấy một miếng bông không thấm nước cuộn lại.
 - + Dùng khúc tre ấn vào đoạn giữa cuộn bông.

Yêu cầu:

- + Nút có kích thước, độ chặt vừa phải.
- + Đầu nút tròn, phần ngoài lớn hơn phần trong ống nghiệm.
- + Lấy nút ra hay đóng vào dễ dàng.
- Đối với các bình tam giác, chai, lọ có kích thước lớn: cách làm tương tự nhưng lượng bông sử dụng phải nhiều hơn.
- Đối với các pipet: dùng một sợi dây thép nhỏ nhét một ít bông vào đầu lớn của pipet.

* **Cách bao gói dụng cụ**

- Đối với các dụng cụ sau khi làm nút bông, cần được bao gói phần có nút bông bằng giấy dầu hay giấy báo để khi hấp khử trùng nút bông không bị ướt, đảm bảo điều kiện vô trùng tốt hơn. Cách làm như sau:

- + Cắt các băng giấy hình chữ nhật với kích thước tùy theo dụng cụ cần bao gói.
- + Quấn băng giấy quanh đầu có nút bông.
- + Gập ống giấy sát vào nút bông ở mặt trước và hai bên.
- + Gập nốt phần giấy còn lại và cài sâu vào trong.

Yêu cầu:

- + Phần giấy bao ngoài phải chặt kín.
- + Bao bằng giấy dầu với dụng hấp ướt.

- + Bao bằng giấy báo với dụng cụ sấy khô khi khử trùng.
- Đối với các dụng cụ như: pipet, đĩa petri, que gạt,...phải dùng giấy bao kín toàn bộ.

5. Phương pháp khử trùng

Thường sử dụng phương pháp khử trùng bằng sức nóng khô (khử trùng bằng tủ sấy).

Cách tiến hành:

- Các dụng cụ khử trùng cần được bao gói cẩn thận và xếp vào tủ sấy.
- Bật công tắc điện để tủ hoạt động.
- Điều chỉnh nhiệt độ và thời gian khử trùng theo yêu cầu (165 - 170°C trong 1,5 - 2 giờ).
- Nhiệt độ và thời gian mong muốn sẽ được duy trì nhờ bộ phận điều khiển tự động.
- Tắt tủ sấy, để nguội tới 60°C mới mở tủ lấy dụng cụ ra. Tránh mở tủ lấy dụng cụ khi nhiệt độ tủ còn cao sẽ làm dụng cụ thủy tinh dễ bị nứt vỡ.
- Các dụng cụ sau khi sấy mà giấy bao có màu hơi vàng là đạt yêu cầu.

Bài 2.

PHÂN TÍCH TỔNG SỐ VI KHUẨN HIẾU KHÍ TRONG THỰC PHẨM

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày được quy trình phân tích tổng số vi khuẩn hiếu khí trong thực phẩm;
- Pha chế được môi trường dinh dưỡng và các loại dung dịch sử dụng trong phân tích tổng số vi khuẩn hiếu khí;
- Tiến hành các thao tác xử lý mẫu, pha loãng và cấy mẫu theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác;
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược chỉ tiêu

Vi sinh vật hiếu khí là những vi sinh vật phát triển để hình thành khuẩn lạc trong điều kiện có sự hiện diện của oxy phân tử.

Tổng số vi sinh vật hiếu khí hiện diện trong mẫu chỉ thị mức độ vệ sinh của thực phẩm, 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 và bảo quản thực phẩm.

Sự tăng trưởng của vi sinh vật trong thực phẩm đạt đến mật độ 10^6 CFU/g(ml) dẫn đến biến đổi chất lượng, là ranh giới để phân biệt thực phẩm có dấu hiệu hư hỏng hay không. Một vài trường hợp số lượng 10^6 CFU/g(ml) chưa có dấu hiệu hư hỏng rõ ràng về mặt hóa học.

2. Môi trường và hóa chất

Môi trường sử dụng là Plate Count Agar (PCA) có pH $7,0 \pm 0,2$. Môi trường được pha chế, phân phối vào trong các bình thủy tinh hay trong các ống nghiệm và hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Các bình hoặc ống nghiệm chứa môi trường chưa sử dụng được bảo quản trong tủ lạnh $2 - 8^{\circ}\text{C}$. Trước khi sử dụng môi trường phải được đun chảy và làm nguội dưới 45°C trong bể điều nhiệt.

Môi trường PCA:

Peptone:	5,0g
Meat extract:	2,5g

Glucose: 1,0g
Agar: 16,0g
Nước cất vừa đủ: 1000ml
pH = 6,8 – 7,0

Ngoài môi trường trên, còn có thể sử dụng cả môi trường khác như Tryptose Glucose Agar, Nutrient Agar.

Dung dịch nước muối pepton SPW (Saline Pepton Water) dùng pha loãng chứa 8,5g NaCl và 1g pepton trong 1000ml nước. Dung dịch này được chứa trong các bình chứa 0,5 - 1 lít, hấp khử trùng và được phân phối thành các thể tích chính xác 9ml vào trong các ống nghiệm vô trùng.

3. Quy trình phân tích

3.1. Chuẩn bị mẫu nước trước khi phân tích

Trước khi tiến hành phân tích, chúng ta phải thực hiện việc đồng nhất mẫu. Đối với mẫu dạng rắn dùng các dụng cụ như kéo, kẹp đã được khử trùng cân chính xác 10g (hay 25g) mẫu vào trong bao PE. Tất cả thao tác tiếp theo cần phải tiến hành trong điều kiện vô trùng. Thêm vào lượng mẫu này 90ml (hay 225ml) dung dịch pha loãng SPW. Thực hiện đồng nhất mẫu bằng máy đập mẫu (stomacher).

Thời gian đập mẫu phụ thuộc vào tính chất cơ lý của mẫu, nhưng không quá 2,5 phút. Trong trường hợp không có máy đập mẫu thực hiện thao tác đồng nhất mẫu như sau: xát nhuyễn mẫu bằng cối chày sứ trong điều kiện vô trùng. Lắc đều mẫu với 90ml (hay 225ml) dung dịch pha loãng SPW đã khử trùng, tốc độ lắc 130 - 140rpm trong 5 - 10 phút.

Đối với mẫu dạng lỏng, hút 10ml (hoặc 25ml) cho vào bình tam giác chứa 90ml (hay 225ml) nước SPW đã được hấp khử trùng, lắc đều. Sau khi được làm đồng nhất bằng một trong các phương pháp như trên, dung dịch mẫu thu được có độ pha loãng là 10 lần so với ban đầu.

Dịch mẫu đồng nhất được tiếp tục pha loãng theo dãy thập phân bằng cách dùng pipet vô trùng (hoặc pipetman với đầu tip vô trùng) chuyển 1ml dịch mẫu vào ống nghiệm chứa 9ml dung dịch pha loãng. Trộn mẫu trong ống nghiệm cho đồng nhất bằng máy vortex hay dùng pipet hút đảo dịch mẫu lên xuống 5-10 lần. Dung dịch mẫu này có độ pha loãng là 10^{-2} . Sau đó sử dụng cùng pipet hoặc pipetman có đầu tip chuyển 1ml dịch mẫu này vào ống nghiệm thứ 2 chứa dung dịch pha loãng và thao tác tương tự để có dịch mẫu với độ pha loãng 10^{-3} . Tiếp tục thực hiện tương tự để có các độ pha loãng thập phân theo cho đến độ pha loãng cần thiết.

Lưu ý nếu pipet hoặc đầu tip pipetman nguy cơ bị nhiễm trong quá trình thao tác (chạm tay, chạm mặt ngoài ống nghiệm, mặt ngoài bình chứa...), cần phải thay pipet hoặc đầu tip vô trùng khác.

3.2. **Cấy mẫu**

Chọn 2 hay 3 độ pha loãng liên tiếp dự kiến chứa 25-250 tế bào vi sinh vật trong 1ml để cấy lên đĩa petri. Dùng pipet vô trùng hoặc pipetman với đầu tip vô trùng chuyển 1ml dịch mẫu pha loãng đã chọn vào giữa đĩa petri vô trùng.

Tương ứng với mỗi độ pha loãng cấy ít nhất 2-3 đĩa (tức là thực hiện 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°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 cho thạch đông đặc. Lật ngược và ủ các đĩa trong tủ ẩm ở nhiệt độ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong 72 giờ. Nhiệt độ và thời gian ủ có thể thay đổi theo quy định của tiêu chuẩn.

3.3. **Tính kết quả**

Đếm tất cả số các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa sau khi ủ. Chọn các đĩa có số đếm từ 25 - 250 để tính kết quả. Mật độ tổng vi khuẩn hiếu khí trong 1g hay 1ml mẫu được tính như sau :

$$A \text{ (CFU/g hay CFU/ml)} = \frac{N}{N_1 V f_1 + \dots + n_i V f_i}$$

Trong đó : A số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1g hay

1ml 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 thứ i

4. **Kết luận và nhận xét**

Bài 3.

PHÂN TÍCH TỔNG SỐ NẤM MEN VÀ NẤM MỐC TRONG THỰC PHẨM

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày được quy trình phân tích tổng số nấm men và nấm mốc trong thực phẩm;
- Pha chế được môi trường dinh dưỡng và các loại dung dịch sử dụng trong phân tích tổng số nấm men và nấm mốc;
- Tiến hành các thao tác xử lý mẫu, pha loãng và cấy mẫu theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác;
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược chỉ tiêu

Nấm mốc là vi nấm dạng sợi, sinh sản bằng bào tử hoặc khuẩn ty. Nấm men là những tế bào đơn tính phát triển theo kiểu nảy chồi, thỉnh thoảng có thể tồn tại ở dạng khuẩn ty giả trong đó các tế bào kết nhau thành chuỗi. Đơn vị hình thành khuẩn lạc của nấm mốc và nấm men là mầm để tạo nên một khuẩn lạc khi nuôi cấy trong môi trường. Mầm có thể là một bào tử, một tế bào hay một đoạn của khuẩn ty.

2. Nguyên tắc

Xác định số lượng nấm men, nấm mốc (CFU/g) bằng kỹ thuật pha loãng và đổ đĩa, sau đó mẫu được cấy vào môi trường YGC và nuôi ở $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, trong thời gian 3 - 5 ngày, đếm số khuẩn lạc nấm men và nấm mốc.

3. Môi trường và hóa chất

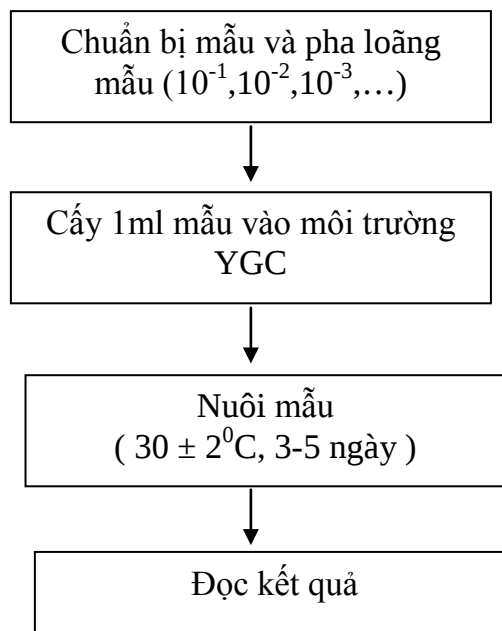
Môi trường YGC:

- | | |
|--------------------|--------|
| - Yeast Extract: | 5,0g |
| - Glucose: | 20,0g |
| - Chloramphenicol: | 0,1g |
| - Agar: | 16,0g |
| Nước cất vừa đủ: | 1000ml |

pH = 5,6 – 6,0

4. Quy trình phân tích tổng số nấm men, nấm mốc

4.1. Quy trình



4.2. Thuyết minh quy trình

4.2.1. Chuẩn bị và pha loãng mẫu

Cân 10g mẫu thực phẩm cho vào 90ml dung dịch nước muối sinh lý vô trùng. Đồng nhất mẫu bằng máy đập mẫu khoảng 30 giây, tiến hành pha loãng mẫu thập phân với các nồng độ pha loãng thập phân liên tiếp (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ...).

4.2.2. Cấy mẫu

* Chuẩn bị môi trường

- Pepton: 10 g
- Glucose: 40 g
- Thạch: 15-20 g
- Nước cất: 1000 ml

pH = 5,6 - 6,2

Cách pha chế môi trường: Hoà tan các chất sau khi cân trong nước, đun nhỏ lửa, khuấy đều cho tan hoàn toàn. Cho vào các bình tam giác dung tích 250 ml, mỗi bình chứa 150 ml, làm nút bông, bao gói. Hấp khử trùng trong nồi hấp 121°C trong thời gian 15-20 phút.

* Cấy mẫu

Dùng pipet vô trùng hút 1ml mẫu ở mỗi nồng độ pha loãng cho vào mỗi đĩa petri. Chúng ta tiến hành mỗi nồng độ như vậy với 3 đĩa petri để xác định tổng số lượng nấm men và nấm mốc.

4.2.3. Đổ đĩa

Đun nóng chảy hoàn toàn môi trường để nguội đến 45⁰C, rót vào hộp petri mỗi hộp 15-20ml môi trường, trộn đều sản phẩm đã pha loãng với môi trường bằng cách xoay đĩa petri qua phải và qua trái mỗi chiều 2 đến 3 lần. Để đĩa thạch đông tự nhiên trên mặt phẳng ngang.

4.2.4. Nuôi mẫu

Sau khi các đĩa thạch đã đông tự nhiên ở nhiệt độ phòng, lật ngược đĩa thạch và đem nuôi ở 30 ± 2⁰C, trong 3 đến 5 ngày.

4.2.5. Tính kết quả

Số lượng nấm men, nấm mốc sống lại được có trong 1g mẫu thực phẩm được tính theo công thức:

$$M = \frac{\sum \frac{c \times d}{n}}{N}$$

Trong đó:

M: Số lượng nấm men, nấm mốc sống lại được có trong 1g mẫu

c: Tổng số khuẩn lạc đếm được ở các đĩa petri cùng một độ pha loãng

d: Độ pha loãng

n: Số đĩa trong một độ pha loãng

N: Độ pha loãng

5. Kết luận và nhận xét

Bài 4.

PHÂN TÍCH CHỈ TIÊU *E. COLI* TRONG THỰC PHẨM

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày được quy trình phân tích chỉ tiêu *E. coli* trong thực phẩm;
- Pha chế được các loại môi trường dinh dưỡng và những dung dịch sử dụng trong phân tích chỉ tiêu *E. coli*;
- Tiến hành các thao tác xử lý mẫu, pha loãng, cấy mẫu và tăng sinh theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác;
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược về chỉ tiêu

E.coli là loài vi sinh vật thuộc nhóm *Coliform* phân, có hình que, gram âm, di động, có khả năng lên men và tạo acid và sinh hơi từ đường lactose ở 44⁰C hay nhiệt độ thấp hơn, có khả năng sinh indol ở 44⁰C và 37⁰C, có phản ứng Voges Proskauer âm tính, không có khả năng sử dụng citrate như nguồn carbon duy nhất.

Cấy một thể tích xác định các nồng độ pha loãng thích hợp lên môi trường chọn lọc. Sau khi ủ ở 44⁰C trong khoảng thời gian 24 giờ, đếm các khuẩn lạc có hình dạng đặc trưng của *Coliform*. Xác nhận các khuẩn lạc đã đếm bằng các phản ứng sinh hoá. *E. coli* có các phản ứng sinh hoá đặc trưng như sau: indol dương tính, methyl red dương tính; Vogesproskauer âm tính và citrat âm tính.

2. Nguyên tắc

Số lượng *E. coli* được xác định bằng phương pháp MPN. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc mẫu được pha loãng thành dãy nồng độ thập phân trong các ống nghiệm chứa môi trường thích hợp, ủ và đọc số ống cho kết quả dương tính. Dãy số thể hiện số ống nghiệm cho kết quả dương tính từ các nồng độ pha loãng được tra theo bảng MPN để xác định số có xác suất cao nhất của tổng số vi khuẩn trong 1g mẫu.

3. Môi trường và hóa chất

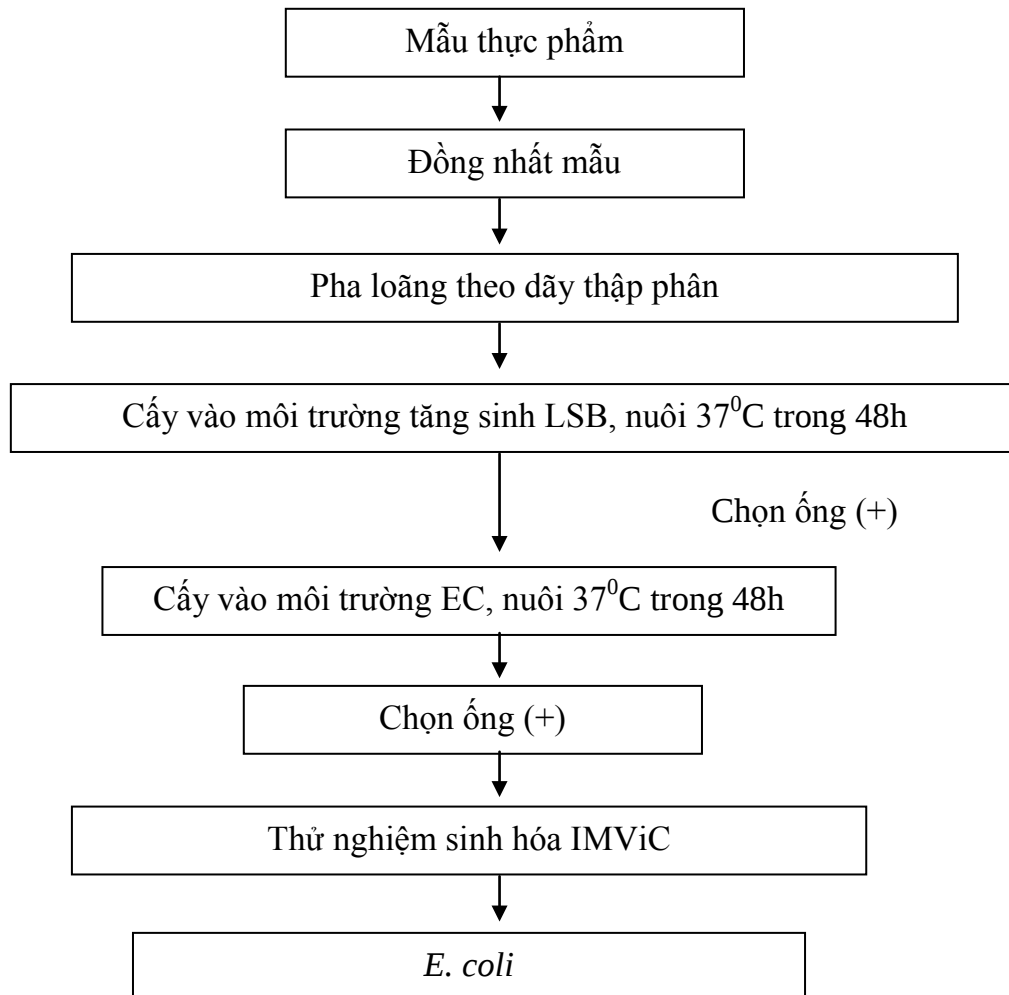
Môi trường tăng sinh LSB

Canh EC

Thuốc thử Metyl Red

4. Quy trình định lượng

4.1. Sơ đồ quy trình định lượng



4.2. Thuyết minh quy trình

4.2.1. Chuẩn bị mẫu

Mẫu thực phẩm phải được phân tích trong 24h kể từ khi lấy.

4.2.2. Đồng nhất mẫu

Cân 25g mẫu, nghiền nát bằng cối chày sứ đã được khử trùng, sau đó cho vào 225ml nước cất đã khử trùng và tiến hành lắc ở 140rpm.

4.2.3. Pha loãng mẫu

Sử dụng pipet đã khử trùng hút 1ml mẫu cho vào ống nghiệm chứa 9ml nước cất đã khử trùng để được nồng độ pha loãng 10^{-2} , tiếp tục hút 1ml mẫu ở nồng độ 10^{-2} cho vào ống nghiệm chứa 9ml nước cất đã khử trùng khác để được nồng độ pha loãng 10^{-3} .

Ta được 3 nồng độ pha loãng liên tiếp 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

4.2.4. Cấy vào môi trường tăng sinh LSB

* Chuẩn bị môi trường tăng sinh LSB

Tryptone: 20g	Lactose: 5g
NaCl : 5g	KH ₂ PO ₄ : 2,75g
K ₂ HPO ₄ : 2,75g	Sulfate lauryl: 0,1g
Nước cất: 1000ml	pH: 6,8

Dùng pipet hút 15ml môi trường cho vào 1 ống nghiệm, làm 15 ống như vậy, dùng các ống nghiệm có cùng kích thước. Sau đó cho ống Durham vào và lật úp ống Durham lại và đem đi khử trùng ở 121⁰C/20 phút.

* Tiến hành cấy

Với mỗi nồng độ ta hút 1ml mẫu cho vào từng ống nghiệm chứa môi trường LSB, tiến hành với 5 ống nghiệm cho mỗi nồng độ. Làm nút bông, bao gói và đem nuôi ở 37⁰C trong 48 giờ.

4.2.5. Cấy vào môi trường EC

* Chuẩn bị môi trường EC

Trypticase: 20g	Lactose: 5g
Muối mật : 1,5g	NaCl : 5g
K ₂ HPO ₄ : 4g	KH ₂ PO ₄ : 1,5g
pH = 6,8	

Dùng pipet hút 15ml môi trường cho vào 1 ống nghiệm, làm 15 ống như vậy, dùng các ống nghiệm có cùng kích thước. Sau đó cho ống Durham vào và lật úp ống Durham lại và đem đi khử trùng ở 121⁰C/20 phút.

Sau 2 ngày kiểm tra các ống nghiệm chứa môi trường tăng sinh, chọn những ống (+), tức là những ống có sinh khí làm đẩy ống Durham nổi lên. Sử dụng những ống (+) đã chọn cấy vào môi trường EC, ở mỗi nồng độ hút 1ml mẫu cho vào ống nghiệm chứa môi trường EC, tiến hành với 5 ống nghiệm cho mỗi nồng độ. Làm nút bông, bao gói và đem nuôi ở 37⁰C trong 48 giờ.

4.2.6. Thử nghiệm Metyl Red (MR)

Sau 2 ngày nuôi, ta đem ra và quan sát để chọn ống (+), tức là những ống có sinh khí làm đẩy ống Durham nổi lên. Với những ống (+) ta có thể khẳng định trong mẫu có chứa *coliforms chịu nhiệt*, tuy nhiên để chắc chắn hơn ta có thể tiến hành phản ứng thử nghiệm sinh hóa IMViC, cụ thể là sử dụng thuốc thử Methyl Red.

* Nguyên tắc:

Thử nghiệm MR nhằm phân biệt vi sinh vật dựa trên sự khác biệt về khả năng tạo ra và duy trì các sản phẩm biến dưỡng có tính acid bền trong môi trường trong quá trình lên men glucose. Chỉ thị đỏ Methyl Red giúp phân biệt nồng độ ion H⁺ hiện diện trong môi trường sau khi vi sinh vật lên men glucose. Chỉ thị này có màu thay đổi khác nhau tùy dãy pH hay nồng độ ion H⁺ : màu đỏ khi pH < 4,4, màu cam trong vùng pH = 5 - 5,8 và màu vàng khi pH > 6.

* Tiến hành:

Thử nghiệm được thực hiện trong các ống môi trường lỏng glucose phosphate. Hút một lượng nhỏ mẫu từ ống (+) đã chọn cho vào ống môi trường trên ủ ở 37⁰C trong khoảng 2 - 5 ngày. Thêm vài giọt thuốc thử đỏ Methyl Red vào trong ống nghiệm dịch nuôi cấy và đọc kết quả ngay.

5. Kết luận và nhận xét

Bài 5.

PHÂN TÍCH CHỈ TIÊU *COLIFORMS* TRONG THỰC PHẨM

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày được quy trình phân tích chỉ tiêu *Coliforms* trong thực phẩm;
- Pha chế được môi trường dinh dưỡng và các loại dung dịch sử dụng trong phân tích chỉ tiêu *Coliforms*;
- Tiến hành các thao tác xử lý mẫu, pha loãng và cấy mẫu theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác;
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược về chỉ tiêu

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 canh Lauryl Sulphate và canh Brilliant Green Lactose Bile Salt.

Nhóm *Coliforms* gồm 4 giống là: *Escherichia* với 1 loài duy nhất là *E. coli*, *Citrobacter*, *Klebsiella* và *Enterobacter*. Tính chất sinh hoá đặc trưng của nhóm này được thể hiện qua các thử nghiệm Indol (I), Methyl 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 thời gian 24 giờ khi được ủ ở 44°C trong môi trường canh 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 canh Trypton. *Coliforms* phân là một thành phần của hệ vi sinh ruột đường ở người và các 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 trong môi trường.

- *E. coli* là *Coliforms* phân cho kết quả thử nghiệm IMViC là ++-- (Indol +, Methyl Red +, Voges-Proskauer -, Citrate -).

2. Nguyên tắc

Mẫu đã được đồng nhất hoá được cấy một lượng nhất định lên môi trường thạch chọn lọc thích hợp chứa lactose. Đếm số khuẩn lạc lên men lactose và sinh acid sau khi ủ ở $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24-48 giờ. Ngoài lactose môi trường chọn lọc cho *Coliforms* còn chứa muối mật ức chế vi khuẩn gram dương và chất chỉ thị pH như neutra red, crystal violet. Trên môi trường này khuẩn lạc *Coliforms* có màu đỏ đến màu đỏ đậm, đường kính lớn hơn 0,5mm, xung quanh khuẩn lạc có vùng tủa của muối mật. Việc khẳng định được thực hiện bằng cách nuôi cấy trên môi trường canh chọn lọc như BGBL.

Để định lượng *Coliforms* phân, thực hiện tương tự nhưng thay đổi nhiệt độ ủ là 44°C . Mật độ *Coliforms* hay *Coliforms* phân được tính dựa trên số lượng khuẩn lạc điển hình đếm được, tỷ lệ khẳng định và độ pha loãng mẫu trước khi cấy vào đĩa.

3. Môi trường và hóa chất

* Môi trường Violet Red Bile Agar (VRB):

- Cao nấm men:	3,0g
- Pepton:	7,0g
- Muối mật:	1,5g
- NaCl:	5,0g
- Lactose:	10,0g
- Neutral red:	0,03g
- Crystal violet:	0,002g
- Agar:	16,0g
Nước cất vừa đủ:	1000ml

pH = 7,2 - 7,4

* Môi trường canh Brilliant Green Bile Lactose Broth (BGBL) được phân phối 10ml vào mỗi ống nghiệm vô trùng chứa một ống durham úp ngược. Chúng ta phải kiểm tra các ống sau khi hấp để đảm bảo không có bọt khí trong ống durham.

- Lactose:	10,0g
- Pepton:	10,0g
- Brilliant green:	0,2g
- Nước cất:	1000ml

pH = 7,2 – 7,4

3. Qui trình cấy mẫu

Mẫu được đồng nhất hoá và pha loãng tương tự như phần định lượng tổng số vi khuẩn hiếu khí. Chuyển 1ml dịch pha loãng mẫu đã chọn vào đĩa petri. Bổ sung vào mỗi đĩa đã cấy mẫu khoảng 15 - 20ml môi trường VBR đã được đun chảy và làm nguội ở 45°C . Lắc tròn đĩa petri xuôi và ngược chiều kim đồng hồ,

mỗi chiều 3-5 lần để trộn đều dịch mẫu với môi trường. Chờ cho môi trường trong đĩa đông đặc, lật ngược đĩa và ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24 - 48 giờ.

Thực hiện trên mẫu ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp sao cho mỗi đĩa sẽ xuất hiện

từ 10-100 khuẩn lạc và lặp lại ít nhất 2 đĩa ứng với nồng độ pha loãng.

*** Thử nghiệm khẳng định *Coliforms***

Trong trường hợp mẫu có chứa các nguồn carbon khác không phải lactose, để tránh các trường hợp vi sinh vật sử dụng các nguồn carbon trong mẫu lên men và tạo khuẩn lạc có hình dạng tương tự *Coliforms* cần thực hiện thêm bước khẳng định như sau: chọn ít nhất 5 khuẩn lạc nghi ngờ, dùng que cấy vòng cấy chuyển sang các ống nghiệm chứa môi trường BGBL, nuôi ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 24 - 48 giờ.

Kết quả khẳng định là (+) khi vi khuẩn tăng làm đục môi trường và sinh hơi trong ống Durham. Tính tỷ lệ khẳng định là tỷ số giữa số khuẩn lạc cho kết quả (+) với số khuẩn lạc được dùng trong thử nghiệm khẳng định *Coliforms*.

4. Tính kết quả

Số lượng *Coliforms* tổng số được tính như sau:

$$A \text{ CFU/g(ml)} = \frac{N}{n \times V \times f} \times R$$

Trong đó: N: số lượng khuẩn lạc *Coliforms* đã đếm

V: thể tích mẫu cấy vào đĩa

n: số lượng đĩa cấy cho một mẫu

f: độ pha loãng của mẫu

R: tỉ lệ xác nhận của *Coliforms*

5. Kết luận và nhận xét

Bài 6.

PHÂN TÍCH CHỈ TIÊU *STAPHYLOCOCCUS* TRONG THỰC PHẨM

Mục tiêu: Sau khi học xong bài này, sinh viên có khả năng:

- Trình bày được quy trình phân tích chỉ tiêu *Staphylococcus* trong thực phẩm;
- Pha chế được các loại môi trường dinh dưỡng và những dung dịch sử dụng trong phân tích chỉ tiêu *Staphylococcus*;
- Tiến hành các thao tác xử lý mẫu, pha loãng, cấy mẫu và tăng sinh theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

Thời gian thực hành: 5 giờ

Nhóm thực hành: 15 - 20 học sinh/sinh viên

Địa điểm thực hành: Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh

Nội dung bài thực hành:

1. Sơ lược về chỉ tiêu

Staphylococcus aureus là vi khuẩn hiếu khí hay kỵ khí tùy tiện, hình cầu, gram dương có thử nghiệm coagulase, phản ứng DNase, photphase (+), có khả năng lên men và sinh acid từ manitol, trehalose, sucrose.

Tất cả các dạng *S. aureus* đều mẫn cảm với novobiocine, có khả năng tăng trưởng trong môi trường chứa đến 15% NaCl. Một số dòng có khả năng tăng trưởng làm tan máu trong môi trường thạch máu. *S. aureus* có thể nhiễm vào thực phẩm qua con đường tiếp xúc với người thao tác trong quá trình chế biến thực phẩm. Sự hiện diện với mật độ cao của *S. aureus* trong thực phẩm chỉ thị điều kiện vệ sinh và kiểm soát nhiệt độ kém của quá trình chế biến.

2. Nguyên tắc

Staphylococcus aureus được xác định trên cơ sở của đặc điểm tăng trưởng và phản ứng đông huyết tương của các dòng thuần từ các khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường phân lập.

3. Môi trường và hóa chất

- Môi trường Mannitol Salt Broth (MSB): Môi trường dùng để phân tích định tính *S. aureus* hay trong định lượng bằng phương pháp MPN.
 - Cao thịt: 1g
 - Polypeptone: 10g
 - NaCl: 75g
 - Mannitol: 10g

- Phenol Red: 0,025g
 - Nước: 1000ml
- pH: 7,4

Cách pha chế: Hòa tan các hóa chất đã cân trong nước, khuấy cho tan hoàn toàn, dùng pipet hút 10ml môi trường cho vào ống nghiệm, lắc đều, làm nút bông bao gói và đem đi hấp khử trùng ở 121⁰C/15 phút.

Môi trường thạch Baird Parker Agar (BPA)

Tryptone: 10g

Cao thịt: 5g

Cao nấm men: 1g

Sodium pyruvate: 10g

Glycine: 12g

Lithium chloride.6H₂O: 5g

Agar: 20g.

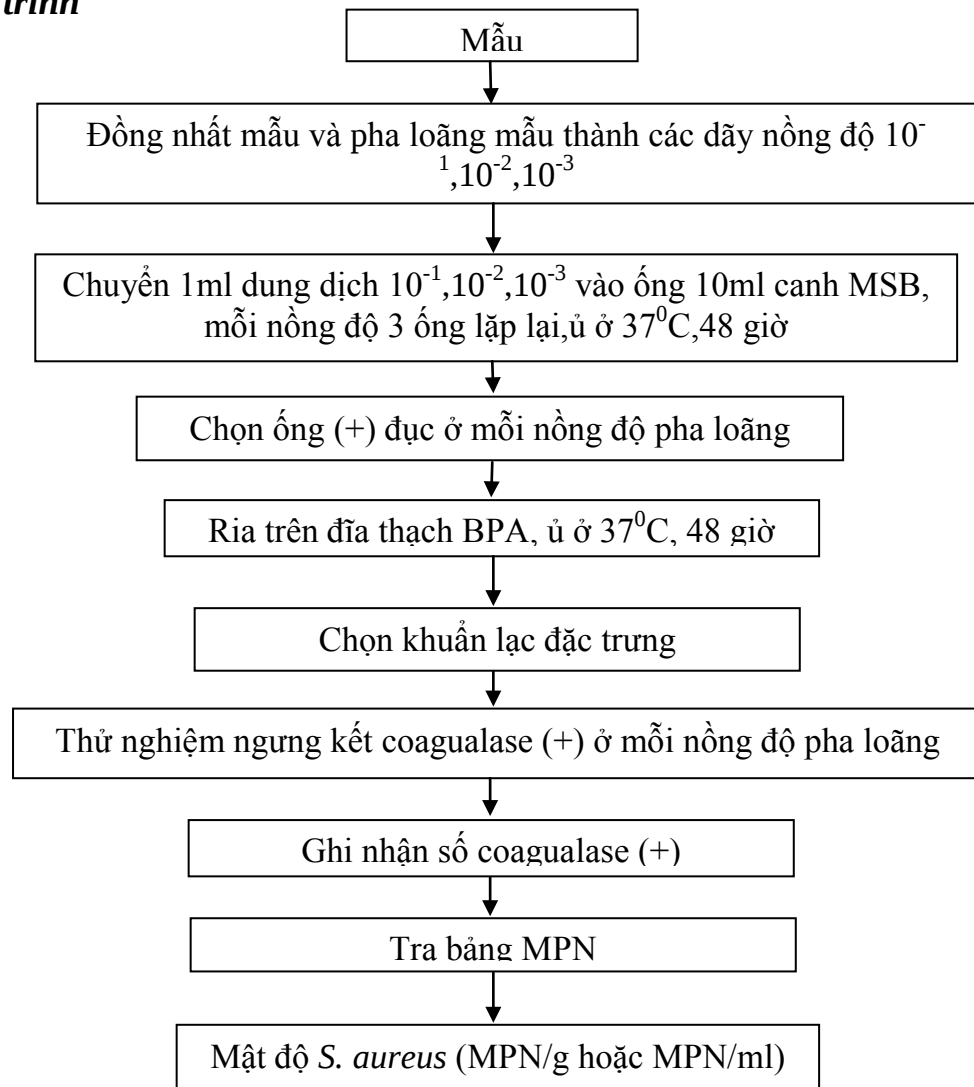
Nước: 1000ml

pH= 7 ± 0,2

Cách pha chế: Hòa tan các chất đã cân xong trong nước, đun nhỏ lửa, khuấy đều cho tan hoàn toàn. Cho vào bình tam giác 250ml, mỗi bình chứa 150ml. Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121⁰C trong 15 phút.

4. Quy trình định lượng

4.1. Quy trình



4.2. Thuyết minh quy trình

4.2.1. Chuẩn bị mẫu

Cân 10g mẫu cho vào 90ml dung dịch nước muối sinh lý. Đồng nhất mẫu bằng máy đập mẫu khoảng 15 - 30 giây, tiến hành pha loãng mẫu thập phân với 3 nồng độ pha loãng thập phân liên tiếp (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Tùy theo yêu cầu về độ chính xác của kết quả phân tích, có thể sử dụng phương pháp MPN với hệ thống 9 ống nghiệm, hay hệ thống 15 ống nghiệm.

4.2.2. Cấy mẫu vào canh MSB

Chuyển 1ml dung dịch 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} vào ống 10ml canh MSB, mỗi nồng độ có 3 ống lặp lại, ủ ở 37°C , 48 giờ. Chọn các ống (+) có vi sinh vật phát triển làm đục môi trường để tiến hành phân lập khuẩn lạc đơn trên BPA.

4.2.3. Phân lập khuẩn lạc đơn trên BPA

Dùng kỹ thuật cấy ria lên đĩa thạch BPA, ủ ở 37°C , 48 giờ. Chọn khuẩn lạc đặc trưng: tròn lồi, đen bóng, có quầng trong và quầng sáng xung quanh, đôi khi chỉ xuất hiện 1 trong 2 quầng. Chọn khuẩn lạc đặc trưng của *S. aureus* trên BPA để thử nghiệm sinh hóa coagulase.

4.2.4. Thử nghiệm sinh hóa coagulase

* Nguyên tắc: Các loài thuộc giống *Staphylococcus* có khả năng tiết ra môi trường enzyme coagulase có tác dụng làm kết tụ các thành phần của huyết tương, tạo thành các khối đông làm đông huyết tương.

* Phương pháp tiến hành: Huyết tương người hay thỏ đông khô thương phẩm được dùng cho thử nghiệm này. Cho vào ống nghiệm 0,5ml huyết tương người hay thỏ không pha loãng, bổ sung 0,5ml dịch nuôi cấy chủng thuần hoặc một lượng lớn sinh khối khuẩn lạc. Xoay nhẹ ống để trộn đều vi sinh vật. Ủ ống thử nghiệm ở 37°C trong 4 giờ. Quan sát, ghi nhận sự ngưng kết sau mỗi 30 phút. Tiếp tục ủ đến 24 giờ nếu không thấy xuất hiện khối kết tụ.

4.2.5. Đọc kết quả: (+) có sự kết tụ; (-) không có sự kết tụ, hỗn hợp vẫn đồng nhất.

5. Kết luận và nhận xét

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bộ Thủy sản (2004), *Sổ tay kiểm nghiệm vi sinh thực phẩm thủy sản*, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
- [2]. Ths. Nguyễn Tiến Dũng (2007), *Bài giảng Phương pháp kiểm nghiệm vi sinh vật trong thực phẩm*, Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
- [3]. Ths. Lê Thùy Linh (2010), *Thực hành phân tích vi sinh thực phẩm*, trường đại học công nghiệp thực phẩm thành phố Hồ Chí Minh
- [4]. Lê Minh Tâm (2007), *Phương pháp phân tích một số chỉ tiêu vi sinh cơ bản trong thực phẩm*, Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh
- [5]. Trần Linh Thuốc (2007), *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. Nhà xuất bản Giáo dục.