



TRUNG TÂM KIỂM ĐỊNH HÀNG HOÁ VNIQ
VNIQ 貨品検定中心
VIETNAM INSPECTION & QUARANTINE

QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG NẤM MEN VÀ NẤM MỐC BẰNG KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC




MÃ SỐ : VNIQ.B.SOP04

LẦN BAN HÀNH : 01

NGÀY BAN HÀNH : 21/07/2025

SỐ TRANG : 08

ĐÃ KIỂM SOÁT
CONTROL
Ngày 21 Tháng 7 Năm 2025

	Người biên soạn	Người thẩm xét	Người phê duyệt
Chữ ký			
Họ và tên	Phạm Việt Hoàng	Nguyễn Đức Hiếu	Nguyễn Quang Khởi
Chức danh	Thủ nghiệm viên Phòng Vi sinh	Trưởng phòng Vi sinh	Giám đốc Trung tâm
Ngày	20/07/2025	20/07/2025	21/07/2025

1. MỤC ĐÍCH

Quy trình này quy định phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc sống bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm thực phẩm.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

Quy trình này quy định phương pháp định lượng nấm men ưa ẩm thấu còn sống và nấm mốc ưa khô trong các sản phẩm thực phẩm hoặc trong thức ăn chăn nuôi có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95 [quả khô, bánh ngọt, mứt, thịt khô, cá muối, ngũ cốc, đậu đỗ và sản phẩm đậu đỗ, bột mì, quả hạch, gia vị ... (Phụ lục A)] bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Quy trình này không áp dụng cho các sản phẩm khô có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,60 (đậu đỗ khô, sản phẩm hạt có dầu, gia vị, cây đậu, các loại hạt, đồ uống tan nhanh dạng bột, thức ăn chăn nuôi dạng khô ...) và không cho phép định lượng các bào tử nấm mốc. Việc nhận biết cũng như việc kiểm tra các hệ nấm của thực phẩm về độc tố không nằm trong phạm vi của quy trình này. Phương pháp qui định trong quy trình này không thích hợp để định lượng nấm ưa khô mặn (nghĩa là *Polypaecilum pisce*, *Basipetospora halophila*) mà có thể tìm thấy trong cá khô.

3. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- TCVN 8275-2:2010: Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc - Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95.

- ISO 21527-2:2008: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95.

4. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

4.1. Định nghĩa, thuật ngữ

- **Nấm men (yeast):** Vi sinh vật hiếu khí ưa ẩm, ở nhiệt độ 25°C dưới các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này, phát triển thành các khuẩn lạc tròn, bóng hoặc mờ trên bề mặt môi trường thạch nấm, thường có mép viền đều và bề mặt lồi ít hoặc lồi nhiều.

- **Nấm mốc (mould):** Vi sinh vật dạng sợi nhỏ hiếu khí ưa ẩm, ở nhiệt độ 25°C dưới các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này, phát triển thành các mầm/chồi mọc lan như lông tơ hoặc dẹt hoặc thành các khuẩn lạc trên bề mặt môi trường thạch nấm, thường có màu trái cây hoặc có cấu trúc mang bào tử.

- **Chồi (propagule)/Mầm (germ):** Thực thể sống có thể phát triển trong môi trường dinh dưỡng. Ví dụ: Tế bào sinh dưỡng, nhóm các tế bào, bào tử, cụm bào tử hoặc một đoạn hệ sợi nấm.

- *Nấm men ưa ẩm ướt (osmophilic yeast)/Nấm mốc ưa khô (xerophilic mould)*:
Nấm có khả năng phát triển ở hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95.

4.2. Chữ viết tắt

- Không áp dụng.

5. NỘI DUNG

5.1. Nguyên tắc

- Chuẩn bị các đĩa nuôi cấy bề mặt, sử dụng môi trường nuôi cấy chọn lọc quy định. Tùy chọn vào số lượng khuẩn lạc dự kiến, sử dụng lượng xác định của mẫu (nếu sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (nếu sản phẩm ở dạng khác), hoặc các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu/huyền phù. Có thể chuẩn bị các đĩa bổ sung trong cùng điều kiện, sử dụng các dung dịch thập phân của mẫu thử hoặc các huyền phù ban đầu.

- Ủ các đĩa đã cấy trong điều kiện hiếu khí ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 5 ngày. Các đĩa thạch có thể được để trong ánh sáng khuếch tán từ 1 ngày đến 2 ngày, nếu cần.

- Đếm các khuẩn lạc/các chồi, khẳng định việc nhận dạng các khuẩn lạc nghi ngờ bằng kính phóng đại hoặc kính hiển vi (để phân biệt các khuẩn lạc của nấm men với các khuẩn lạc của vi khuẩn), nếu cần.

- Số lượng nấm men và nấm mốc trong một gam hoặc một mililit mẫu được tính từ số lượng khuẩn lạc/chồi/mầm thu được trên các đĩa đã chọn ở các mức pha loãng tạo ra các khuẩn lạc có thể đếm được. Nấm men và nấm mốc được đếm riêng, nếu cần.

5.2. Môi trường cấy và hóa chất, thuốc thử

Thành phần và việc chuẩn bị thuốc thử và môi trường nuôi cấy được thực hiện theo hướng dẫn VNIQ.B.HD12 và/hoặc theo hướng dẫn của nhà sản xuất bao gồm các môi trường thuốc thử:

- Môi trường nuôi cấy: Thạch dicloran glycerol 18 % (DG18)
- Dung dịch pha loãng: Canh thang nước pepton 0,1 % và nước muối peptone

Việc thử nghiệm hiệu năng môi trường thuốc thử được thực hiện theo quy định của tiêu chuẩn tham chiếu và TCVN 8128 (ISO 11133). Chi tiết tại hướng dẫn VNIQ.B.HD12.

5.3. Thiết bị và dụng cụ

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

- Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Pipet xả hết, vô trùng, dung dịch danh nghĩa 1 ml, được chia vạch 0,1 ml.
- Nồi cách thủy, hoặc dụng cụ tương tự, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 44°C đến 47°C .
- Máy đo pH, có độ chính xác 0,1 đơn vị pH ở 25°C .

- Chai, bình và ống nghiệm, để đun sôi và bảo quản môi trường nuôi cấy và pha loãng dung dịch.
- Đĩa Petri vô trùng, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.
- Kính hiển vi, để phân biệt nấm men với các tế bào vi khuẩn (có trường sáng, độ khuếch đại từ 250 lần đến 1.000 lần).
- Que dàn mẫu, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo (đường kính nhỏ hơn 2 mm và dài 80 mm). Đường kính không được vượt quá 2 mm để giảm thiểu lượng mẫu dính vào que khi kết thúc dàn mẫu.
- Kính khuếch đại hai thị kính, để phân biệt các khuẩn lạc/tế bào nấm men và nấm mốc (khuếch đại từ 6,5 lần đến 50 lần).

5.4. Các bước tiến hành

5.4.1. Phần mẫu thử và huyền phù ban đầu

- Chuẩn bị phần mẫu thử, huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng ban đầu) và các dung dịch pha loãng theo TCVN 6507 (tất cả các phần), TCVN 6404 (ISO 7218), TCVN 6263 (ISO 8261) và tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm.
- Khuyến cáo sử dụng canh thang nước pepton 0,1% làm dịch pha loãng, trừ việc chuẩn bị mẫu thử cụ thể. Do các bào tử lắng xuống nhanh trong pipet, nên để pipet ở tư thế nằm ngang (không để đứng) khi được làm đầy bằng một thể tích của huyền phù hoặc dung dịch pha loãng thích hợp. Lắc huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng để tránh các phần tử có chứa vi sinh vật lắng xuống.
- Nhìn chung, để chuẩn bị huyền phù ban đầu, cho x g hoặc x mL phần mẫu thử vào 9x mL hoặc 9x g dung dịch pha loãng thích hợp, để thu được tỉ lệ của phần mẫu thử và môi trường pha loãng là 1/10 (khối lượng/thể tích hoặc thể tích/thể tích).

5.4.2. Cấy và ủ

5.4.2.1. Dùng pipet vô trùng chuyển 0,1 ml mẫu thử dạng lỏng hoặc 0,1 ml huyền phù ban đầu đối với sản phẩm ở dạng khác cho vào một đĩa thạch DG18.

Dùng pipet vô trùng chuyển 0,1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất (10^{-1}) (sản phẩm dạng lỏng) hoặc 0,1 ml dung dịch pha loãng thập phân 10^{-2} (sản phẩm ở dạng khác) cho vào một đĩa thạch DG18 (5.2.1) thứ hai.

Để thuận tiện cho việc định lượng các lượng nhỏ nấm men và nấm mốc, có thể lấy các lượng đến 0,3 ml dung dịch pha loãng 10^{-1} của mẫu hoặc của mẫu thử dạng lỏng, dàn đều trên ba đĩa.

Lặp lại các thao tác này với các dung dịch pha loãng tiếp theo, sử dụng pipet vô trùng mới cho mỗi dung dịch pha loãng.

Đối với các loại thực phẩm dạng hạt hoặc rắn, ví dụ: quả hạch, hoặc hạt ngũ cốc, thì khuyến cáo đổ đĩa trực tiếp. Các mẫu thuộc các loại sản phẩm này được khử trùng bề mặt trong dung dịch natri hypoclorit 0,35 % (1000 µg/g) với thời gian tiếp xúc 2 min, sau đó được tráng rửa bằng nước cất vô trùng, làm khô trên giấy vô trùng rồi cho lên môi trường đông đặc.

5.4.2.2. Dàn đều dịch lỏng lên khắp bề mặt đĩa thạch bằng que dàn mẫu vô trùng cho đến khi dịch lỏng hấp thụ hết vào môi trường.

Có thể sử dụng kỹ thuật cấy bằng phương pháp đổ đĩa nhưng trong trường hợp này sự tương đương của các kết quả phải được đánh giá bằng cách so sánh với kết quả được cấy trên bề mặt đĩa và có thể không phân biệt sự khác nhau của nấm men và nấm mốc. Phương pháp cấy bề mặt đĩa có thể cho kết quả định lượng cao hơn. Kỹ thuật dàn đĩa tạo điều kiện cho các tế bào tiếp xúc tối đa với oxi của không khí và tránh mọi nguy cơ bị bất hoạt do nhiệt của các chồi nấm. Các kết quả có thể phụ thuộc vào từng loại nấm.

5.4.2.3. Ủ các đĩa đã chuẩn bị trong môi trường hiếu khí, nắp hướng lên trên, tư thế thẳng đứng trong tủ ẩm ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 5 ngày đến 7 ngày. Để các đĩa thạch trong ánh sáng khuếch tán từ 1 ngày đến 2 ngày, nếu cần.

Nếu nghi ngờ có mặt *Xeromyces bisporus* thì ủ các đĩa trong 10 ngày.

Khuyến cáo ủ các đĩa trong túi chất dẻo để không làm nhiễm bẩn tủ ẩm trong trường hợp nấm mốc lan ra ngoài đĩa.

5.4.3. Đếm và chọn các khuẩn lạc để khẳng định

Đếm các đĩa trong khoảng thời gian ủ từ 2 ngày đến 5 ngày. Chọn các đĩa chứa ít hơn 150 khuẩn lạc/chồi/mầm và đếm chúng. Nếu trên các đĩa có nấm mốc quá nhanh thì có thể đếm các khuẩn lạc/chồi/mầm sau khi ủ 2 ngày và đếm lại sau khi ủ 5 ngày.

CHÚ THÍCH: Các phương pháp định lượng nấm men và đặc biệt là nấm mốc là không chính xác, vì chúng là một hỗn hợp của hệ sợi nấm và các bào tử vô tính và hữu tính. Số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc phụ thuộc vào mức độ phân đoạn của sợi nấm và tỷ lệ các bào tử có thể mọc trên môi trường đổ đĩa.

CHÚ THÍCH: Thường xuất hiện sự không tuyến tính của các số đếm từ các đĩa dung dịch pha loãng; nghĩa là các dung dịch pha loãng 10 lần của mẫu thường không cho các kết quả nhỏ hơn 10 lần về số đếm khuẩn lạc thu được trên các môi trường đổ đĩa. Điều này là do sự phân đoạn của hệ sợi nấm và việc tách các cụm bào tử trong quá trình pha loãng làm ức chế cạnh tranh khi các lượng lớn khuẩn lạc có mặt trên các đĩa.

CẢNH BÁO - Các bào tử nấm mốc phân bố trong không khí rất mạnh, nên cần thao tác với các đĩa Petri cẩn thận để tránh làm phát triển các khuẩn lạc vệ tinh mà có thể cho ước tính kết quả quá cao.

Tiến hành kiểm tra bằng kính khuếch đại hai thị kính hoặc bằng kính hiển vi để phân biệt giữa các tế bào nấm men hoặc nấm mốc và vi khuẩn từ các khuẩn lạc, nếu cần.

Đếm các khuẩn lạc nấm men và các khuẩn lạc/chồi nấm mốc riêng rẽ, nếu cần.

Để nhận biết nấm men và nấm mốc, chọn các vùng phát triển nấm và lấy ra để kiểm tra bằng kính hiển vi hoặc cấy trên môi trường phân lập hoặc nhận dạng thích hợp.

5.4.4. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- Mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.
- Phương pháp lấy mẫu nếu biết.
- Phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn quy trình này.
- Tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong quy trình này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng đến kết quả.
- Kết quả thử nghiệm thu được, nêu rõ phương pháp biểu thị kết quả.
- Kết quả được thể hiện trên biểu mẫu B.SOP04.BM01.

6. LƯU TRỮ HỒ SƠ

Thực hiện hướng dẫn này cần lưu giữ hồ sơ, nơi lưu, thời gian lưu theo Quy trình kiểm soát hồ sơ VNIQ.QM.QT07.

7. PHỤ LỤC

VNIQ.B.SOP04	: Quy trình Định lượng nấm men và nấm mốc bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc
B.SOP04.BM01	: Biên bản kiểm nghiệm



TRUNG TÂM KIỂM ĐỊNH HÀNG HOÁ VNIQ
VNIQ 貨品検定中心
VIETNAM INSPECTION & QUARANTINE

PHỤ LỤC A

(Tham khảo)

CÁC VÍ DỤ VỀ HOẠT ĐỘ NƯỚC THEO CHẤT NỀN

Bảng A.1 đưa ra các ví dụ về hoạt độ nước theo các sản phẩm cần phân tích.

Bảng A.1 – Hoạt độ nước a_w theo các chất nền

Hoạt độ nước a_w	Các mẫu thực phẩm/chất nền
$\geq 0,95$	Thực phẩm rất dễ bị hỏng (rau, quả, thịt, cá tươi và đóng hộp), sữa xúc xích đã nấu, bánh mì, thực phẩm chứa đến 4 % sacaroza hoặc 7 % NaCl (muối)
$\geq 0,91$	Phomat cứng như Cheddar, thịt hun khói, nước quả cô đặc chứa 55 % sacaroza hoặc 12 % NaCl (muối)
$\geq 0,87$	Xúc xích lên men, bánh ngọt xốp, phomat khô, margarine, thực phẩm chứa 65 % sacaroza hoặc 15 % NaCl (muối)
$\geq 0,80$	Nước quả cô đặc, sữa đặc, xirô, bột mì, bánh có hàm lượng đường cao, đậu đỗ có độ ẩm từ 15 % đến 17 %
$\geq 0,75$	Mứt, mứt nhuyển, quả ngâm đường, bánh hạnh nhân, kẹo dẻo, bánh ngọt
$\geq 0,65$	Bột yến mạch có độ ẩm 10 %, mứt, mật mía, quả hạch
$\geq 0,60$	Quả khô có độ ẩm từ 15 % đến 20 %, caramel, kẹo sữa toffee, mật ong, đậu đỗ ép, thức ăn cho chó, thực phẩm dạng hạt, đậu đỗ và sản phẩm đậu đỗ
$\geq 0,50$	Mì sợi có độ ẩm 12 %, gia vị có độ ẩm 10 %
$\geq 0,40$	Bột trứng nguyên quả có độ ẩm 5 %, kẹo nuga
$\geq 0,30$	Bánh quy, cracker, vỏ bánh mì có độ ẩm từ 3 % đến 5 %, nước chấm dạng khô
$\geq 0,03$	Sữa bột nguyên chất có độ ẩm từ 2 % đến 3 %, bột súp, cà phê hòa tan.

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 8275-2 : 2010

ISO 21527-2 : 2008

ĐÃ KIỂM SOÁT

CONTROL

Ngày 02 Tháng 07 Năm 2025

VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG NẤM MEN VÀ NẤM MỐC – PHẦN 2: KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC TRONG CÁC SẢN PHẨM CÓ HOẠT ĐỘ NƯỚC NHỎ HƠN HOẶC BẰNG 0,95

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95

Lời nói đầu

TCVN 8275-2 : 2010 cùng với TCVN 8275-1 : 2010 thay thế TCVN 4993 : 1989, TCVN 6554 : 1999 và TCVN 7137 : 2002;

TCVN 8275-2 : 2010 hoàn toàn tương đương với ISO 21527-2 : 2008;

TCVN 8275-2 : 2010 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 Phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 8275 (ISO 21527) gồm các tiêu chuẩn sau:

- TCVN 8275-1 : 2010 (ISO 21527-1 : 2008), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước lớn hơn 0,95*;
- TCVN 8275-2 : 2010 (ISO 21527-2 : 2008), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95*.

VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN CHĂN NUÔI – PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG NẤM MEN VÀ NẤM MỐC – PHẦN 2: KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC TRONG CÁC SẢN PHẨM CÓ HOẠT ĐỘ NƯỚC NHỎ HƠN HOẶC BẰNG 0,95

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95

CẢNH BÁO – Việc định lượng nấm mốc phải được thực hiện hết sức thận trọng để bảo vệ người thao tác và tránh lây nhiễm các bào tử nấm cho môi trường.

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp định lượng nấm men ưa ẩm thấu còn sống và nấm mốc ưa khô trong các sản phẩm thực phẩm hoặc trong thức ăn chăn nuôi có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95 [quả khô, bánh ngọt, mứt, thịt khô, cá muối, ngũ cốc, đậu đỗ và sản phẩm đậu đỗ, bột mì, quả hạch, gia vị ... (Phụ lục A)] bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 25 °C ± 1 °C [3].

Tiêu chuẩn này không áp dụng cho các sản phẩm khô có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,60 (đậu đỗ khô, sản phẩm hạt có dầu, gia vị, cây đậu, các loại hạt, đồ uống tan nhanh dạng bột, thức ăn chăn nuôi dạng khô ...) và không cho phép định lượng các bào tử nấm mốc [3]. Việc nhận biết cũng như việc kiểm tra các hệ nấm của thực phẩm về độc tố không nằm trong phạm vi của tiêu chuẩn này. Phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này không thích hợp để định lượng nấm ưa khô mặn (nghĩa là *Polypaecilum pisce*, *Basipetospora halophila*) mà có thể tìm thấy trong cá khô.

2. Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6263 (ISO 8261), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và 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 chăn nuôi – Nguyên tắc chung về kiểm tra vi sinh vật*.

TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật*.

TCVN 8128 (ISO/TS 11133) (tất cả các phần), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Hướng dẫn chuẩn bị và sản xuất môi trường nuôi cấy*.

TCVN 8275-1 : 2010 (ISO 21527-1 : 2008), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước lớn hơn 0,95.*

3. Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa nêu trong TCVN 8275-1 (ISO 21527-1) và thuật ngữ định nghĩa sau:

Nấm men ưa ẩm ướt (osmophilic yeast)

Nấm mốc ưa khô (xerophilic mould)

Nấm có khả năng phát triển ở hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95.

4. Nguyên tắc

4.1. Chuẩn bị các đĩa nuôi cấy bề mặt, sử dụng môi trường nuôi cấy chọn lọc qui định. Tùy thuộc vào số lượng khuẩn lạc dự kiến, sử dụng lượng mẫu xác định (nếu sản phẩm dạng lỏng) hoặc huyền phù ban đầu (nếu sản phẩm ở dạng khác), hoặc các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu/huyền phù.

Có thể chuẩn bị các đĩa bổ sung trong cùng điều kiện, sử dụng các dung dịch pha loãng thập phân của mẫu thử hoặc của huyền phù ban đầu.

4.2. Ủ các đĩa đã chuẩn bị trong điều kiện hiếu khí ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong khoảng từ 5 ngày đến 7 ngày. Các đĩa thạch có thể được để yên trong ánh sáng khuếch tán từ 1 ngày đến 2 ngày, nếu cần.

4.3. Đếm các khuẩn lạc/các chồi, khẳng định việc nhận dạng các khuẩn lạc nghi ngờ bằng kính phóng đại hoặc kính hiển vi (để phân biệt các khuẩn lạc của nấm men với khuẩn lạc của vi khuẩn), nếu cần.

4.4. Số lượng nấm men và nấm mốc trong một gam hoặc một mililit mẫu được tính từ số lượng khuẩn lạc/chồi/mầm thu được trên các đĩa đã chọn ở các mức pha loãng này tạo nên các khuẩn lạc có thể đếm được. Nấm men và nấm mốc được đếm riêng, nếu cần.

5. Dịch pha loãng và môi trường nuôi cấy

Về thực hành thử nghiệm tiến hành, xem TCVN 8128 (ISO/TS 11133) (tất cả các phần).

5.1. Dịch pha loãng

5.1.1. Yêu cầu chung

Xem TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), TCVN 6263 (ISO 8261) và tiêu chuẩn cụ thể có liên quan đến sản phẩm.

Khuyến cáo sử dụng dịch pha loãng có chứa đủ lượng chất tan [ví dụ: từ 20 % đến 35 % (khối lượng) dung dịch glycerol hoặc D-glucosa] để giảm thiểu sốc thẩm thấu đối với các tế bào nấm men ưa ẩm ướt và nấm mốc ưa khô khi chuẩn bị một dãy các dung dịch pha loãng trước khi đổ đĩa [1], [3].

CHÚ THÍCH Có thể bổ sung các tác nhân hoạt động bề mặt như natri poly (oxyetylen) sorbatitanmonooleat¹⁾ [0,05 % (nồng độ khối lượng)] vào dịch pha loãng để giảm các mảng bào tử nấm và bào tử dính [3].

Khuyến cáo sử dụng canh thang nước pepton 0,1 % (nồng độ khối lượng) làm dịch pha loãng, trừ khi chuẩn bị mẫu thử cụ thể.

5.1.2. Thành phần của canh thang nước pepton 0,1 % (nồng độ khối lượng)

Sản phẩm thủy phân mô động vật hoặc thực vật bằng enzym	1,0 g
Nước	1 000 ml

5.1.3. Chuẩn bị canh thang nước pepton 0,1 % (nồng độ khối lượng)

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

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là $7,0 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nếu cần.

5.2. Môi trường nuôi cấy

5.2.1. Thạch dicloran glycerol 18 % (nồng độ khối lượng) (DG 18) [4], [5], [6]

5.2.1.1. Thành phần

Sản phẩm thủy phân casein bằng enzym	5,0 g
D-Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	10,0 g

¹⁾ Tween 80 là một ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo điều kiện thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, ISO không ấn định phải sử dụng chúng.

Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,0 g
Magie sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Dichloran (2,6-dicloro-4-nitroanilin)	0,002 g
Glycerol khan	220 g
Thạch	Từ 12 g đến 15 g ^a
Chloramphenicol	0,1 g
Nước cất hoặc nước đã loại ion	1 000 ml
^a Tùy vào sức đông của thạch	

5.2.1.2. Chuẩn bị

5.2.1.2.1. Yêu cầu chung

Hòa các thành phần trên vào nước và đun sôi để hòa tan hoàn toàn, trừ chloramphenicol. Chỉnh pH (6.4) sao cho sau khi khử trùng pH là $5,6 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

Cho 10 ml dung dịch chloramphenicol 1 % (nồng độ khối lượng) vào etanol và trộn. Phân phối môi trường này với các lượng vào các vật chứa có dung tích thích hợp (6.5). Khử trùng 15 min bằng hấp áp lực ở 121°C .

Làm nguội ngay môi trường trong nồi cách thủy (6.3) được duy trì ở nhiệt độ từ 44°C đến 47°C . Làm nguội đến dưới 50°C và phân phối các lượng 15 ml vào các đĩa Petri vô trùng (6.6).

Để yên cho môi trường đông đặc và làm khô bề mặt thạch theo TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 8128 (ISO/TS 11133) (tất cả các phần), nếu cần.

Sử dụng ngay hoặc bảo quản nơi tối theo TCVN 8128 (ISO/TS 11133) (tất cả các phần) cho đến khi sử dụng.

CẢNH BÁO – Không để môi trường tiếp xúc với ánh sáng, vì khi tiếp xúc với ánh sáng có thể sinh ra các sản phẩm gây độc cho tế bào mà có thể làm ảnh hưởng đến kết quả định lượng.

5.2.1.2.2. Phương án bổ sung chlortetracycline clohydric

Việc phát triển quá nhiều vi khuẩn có thể là một vấn đề, do đó khuyến cáo sử dụng chloramphenicol (50 mg/l) và chlortetracycline (50 mg/l). Trong trường hợp này, chuẩn bị môi trường cơ bản như trên nhưng chỉ sử dụng 50 mg chloramphenicol rồi phân phối các lượng 100 ml và khử trùng. Do tính không ổn định của dung dịch nên cần chuẩn bị dung dịch mới chlortetracycline clohydric 0,1 % (khối lượng) trong nước và lọc để khử trùng. Ngay trước khi sử dụng, thêm 5 ml dung dịch này một cách vô trùng vào 100 ml môi trường cơ bản và đổ ra đĩa. Không khuyến cáo sử dụng gentamicin vì việc sử dụng gentamicin cho thấy ức chế một số loài nấm men [3].

5.2.1.2.3. Phương án bổ sung các nguyên tố với lượng vết

Để cho nấm mốc thể hiện hoàn toàn hình thái, cụ thể là sắc tố của chúng, nên cần đến nguyên tố với lượng vết mà có thể không có trong DG18. Để nhận biết các nấm mốc trên môi trường này, thì thêm dung dịch nguyên tố với lượng vết sau đây với 1 ml trên 1 l môi trường cơ bản, trước đó đã được hấp áp lực: 1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 100 ml nước cất hoặc nước đã loại ion [2].

5.2.1.3. Thử nghiệm hiệu năng đảm bảo chất lượng môi trường nuôi cấy

5.2.1.3.1. Yêu cầu chung

DG18 là môi trường đặc. Năng suất và tính chọn lọc của môi trường cần được thử nghiệm theo TCVN 8128 (ISO/TS 11133) (tất cả các phần) theo các yêu cầu sau đây:

5.2.1.3.2. Năng suất

Ủ: 5 ngày ở $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

Chủng: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763
Wallemia sebi ATCC 42694
Aspergillus restrictus ATCC 42693
Eurotium rubrum ATCC 42690
hoặc các chủng tương đương trong các bộ sưu tập nấm khác

Môi trường chuẩn: mẻ môi trường SDA (thạch Sabouraud D-glucosa) đã được đánh giá hiệu lực

Phương pháp kiểm tra: định lượng

Chuẩn cứ: tỷ lệ năng suất, $P_R \geq 0,5$

Phản ứng đặc trưng: khuẩn lạc đặc trưng/chòil/mềm theo từng loài

5.2.1.3.3. Tính chọn lọc

Ủ:	5 ngày ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
Chủng:	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 hoặc các chủng tương đương trong các bộ sưu tập vi khuẩn khác
Phương pháp kiểm tra:	định tính
Chuẩn cứ:	ức chế hoàn toàn

6. Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

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

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm vi sinh thông thường [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] và cụ thể như sau:

6.1. Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.2. Pipet xả hết, vô trùng, dung tích danh nghĩa 1 ml, được chia vạch 0,1 ml.

6.3. Nồi cách thủy, hoặc dụng cụ tương tự, có khả năng duy trì nhiệt độ ở 44°C đến 47°C .

6.4. Máy đo pH, có độ chính xác đến 0,1 đơn vị pH ở 25°C .

6.5. Chai, bình và ống nghiệm, để đun sôi và bảo quản môi trường nuôi cấy và pha loãng dung dịch.

6.6. Đĩa Petri, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo vô trùng, đường kính từ 90 mm đến 100 mm.

6.7. Kính hiển vi, để phân biệt nấm men với các tế bào vi khuẩn (có trường sáng, độ khuếch đại từ 250 lần đến 1 000 lần).

6.8. Que dàn mẫu, bằng thủy tinh hoặc chất dẻo (đường kính nhỏ hơn 2 mm và dài 80 mm). Đường kính không được vượt quá 2 mm để giảm thiểu lượng mẫu dính vào que khi kết thúc dàn mẫu.

6.9. Kính khuếch đại hai thị kính, để phân biệt các khuẩn lạc/tế bào nấm men và nấm mốc (khuếch đại từ 6,5 lần đến 50 lần).

7. Lấy mẫu

Điều quan trọng là phòng thử nghiệm phải nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản. Mẫu phòng thử nghiệm không được làm đông lạnh.

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên có liên quan sẽ thỏa thuận về vấn đề này.

8. Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), TCVN 6404 (ISO 7218), TCVN 6263 (ISO 8261) và tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm thì các bên có liên quan sẽ thỏa thuận về vấn đề này.

9. Cách tiến hành

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

Chuẩn bị phần mẫu thử, huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng ban đầu) và các dung dịch pha loãng tiếp theo TCVN 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), TCVN 6404 (ISO 7218), TCVN 6263 (ISO 8261) và tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm.

Khuyến cáo sử dụng 0,1 % canh thang nước pepton (5.1.3) làm dịch pha loãng, trừ việc chuẩn bị mẫu thử cụ thể. Tốt nhất nên dùng bộ trộn kiểu nhu động để trộn mẫu hoặc dùng máy lắc.

Do các bào tử lắng xuống nhanh trong pipet, nên để pipet (6.2) ở tư thế nằm ngang (không để đứng) khi được làm đầy với một thể tích của huyền phù hoặc dung dịch pha loãng thích hợp.

Lắc huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng để tránh các phần tử có chứa vi sinh vật lắng xuống.

9.2. Cấy và ủ

9.2.1. Dùng pipet vô trùng chuyển 0,1 ml mẫu thử dạng lỏng hoặc 0,1 ml huyền phù ban đầu đối với sản phẩm ở dạng khác (Điều 8) cho vào một đĩa thạch DG18 (5.2.1).

Dùng pipet vô trùng chuyển 0,1 ml dung dịch pha loãng thập phân thứ nhất (10^{-1}) (sản phẩm dạng lỏng) hoặc 0,1 ml dung dịch pha loãng thập phân 10^{-2} (sản phẩm ở dạng khác) cho vào một đĩa thạch DG18 (5.2.1) thử hai.

Để thuận tiện cho việc định lượng các lượng nhỏ nấm men và nấm mốc, có thể lấy các lượng đến 0,3 ml dung dịch pha loãng 10^{-1} của mẫu hoặc của mẫu thử dạng lỏng, dàn đều trên ba đĩa.

Lặp lại các thao tác này với các dung dịch pha loãng tiếp theo, sử dụng pipet vô trùng mới cho mỗi dung dịch pha loãng.

Đối với các loại thực phẩm dạng hạt hoặc rắn, ví dụ: quả hạch, hoặc hạt ngũ cốc, thì khuyến cáo đổ đĩa trực tiếp. Các mẫu thuộc các loại sản phẩm này được khử trùng bề mặt trong dung dịch natri hypoclorit 0,35 % (1000 µg/g) với thời gian tiếp xúc 2 min, sau đó được tráng rửa bằng nước cất vô trùng, làm khô trên giấy vô trùng rồi cho lên môi trường đông đặc [1, 2].

9.2.2. Dàn đều dịch lỏng lên khắp bề mặt đĩa thạch bằng que dàn mẫu vô trùng (6.8) cho đến khi dịch lỏng hấp thụ hết vào môi trường.

Có thể sử dụng kỹ thuật cấy bằng phương pháp đổ đĩa nhưng trong trường hợp này sự tương đương của các kết quả phải được đánh giá bằng cách so sánh với kết quả được cấy trên bề mặt đĩa và có thể không phân biệt sự khác nhau của nấm men và nấm mốc. Phương pháp cấy bề mặt đĩa có thể cho kết quả định lượng cao hơn. Kỹ thuật dàn đĩa tạo điều kiện cho các tế bào tiếp xúc tối đa với oxy của không khí và tránh mọi nguy cơ bị bất hoạt do nhiệt của các chồi nấm. Các kết quả có thể phụ thuộc vào từng loại nấm.

9.2.3. Ủ các đĩa đã chuẩn bị (9.2.2) trong môi trường hiếu khí, nắp hướng lên trên, tư thế thẳng đứng trong tủ ấm (6.1) ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 5 ngày đến 7 ngày. Để các đĩa thạch trong ánh sáng khuếch tán từ 1 ngày đến 2 ngày, nếu cần.

Nếu nghi ngờ có mặt *Xeromyces bisporus* thì ủ các đĩa trong 10 ngày.

Khuyến cáo ủ các đĩa trong túi chất dẻo để không làm nhiễm bẩn tủ ấm trong trường hợp nấm mốc lan ra ngoài đĩa.

9.3. Đếm và chọn các khuẩn lạc để khẳng định

Đếm các đĩa sau thời gian ủ quy định, chọn các đĩa (9.2.3) chứa ít hơn 150 khuẩn lạc/chồi/mầm và đếm. Nếu trên các đĩa nấm mốc mọc quá nhanh thì có thể đếm các khuẩn lạc/chồi/mầm sau khi ủ 2 ngày và đếm lại sau khi ủ 5 ngày đến 7 ngày.

CHÚ THÍCH 1 Các phương pháp định lượng nấm men và đặc biệt là nấm mốc là không chính xác, vì chúng là một hỗn hợp của hệ sợi nấm và các bào tử vô tính và hữu tính. Số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc phụ thuộc vào mức độ phân đoạn của sợi nấm và tỷ lệ các bào tử có thể mọc trên môi trường đổ đĩa.

CHÚ THÍCH 2 Thường xuất hiện sự không tuyến tính của các số đếm từ các đĩa dung dịch pha loãng; nghĩa là các dung dịch pha loãng 10 lần của mẫu thường không cho các kết quả nhỏ hơn 10 lần về số đếm khuẩn lạc thu được trên các môi trường đổ đĩa. Điều này là do sự phân đoạn của hệ sợi nấm và việc tách các cụm bào tử trong quá trình pha loãng làm ức chế cạnh tranh khi các lượng lớn khuẩn lạc có mặt trên các đĩa.

CẢNH BÁO Các bào tử nấm mốc phân bố trong không khí rất mạnh, nên cần thao tác với các đĩa Petri cẩn thận để tránh làm phát triển các khuẩn lạc vệ tinh làm cho việc ước tính kết quả quá cao.

Tiến hành kiểm tra bằng kính khuếch đại hai thị kính (6.9) hoặc bằng kính hiển vi (6.7) để phân biệt giữa các tế bào nấm men hoặc nấm mốc và vi khuẩn từ các khuẩn lạc, nếu cần.

Đếm các khuẩn lạc nấm men và các khuẩn lạc/chồi nấm mốc riêng rẽ, nếu cần.

Để nhận biết nấm men và nấm mốc, chọn các vùng phát triển nấm và lấy ra để kiểm tra bằng kính hiển vi hoặc cấy trên môi trường phân lập hoặc nhận dạng thích hợp.

10. Biểu thị kết quả và giới hạn tin cậy

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Ghi lại các khuẩn lạc nấm men và các khuẩn lạc/chồi nấm mốc riêng rẽ, nếu cần.

11. Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ các thông tin dưới đây:

- mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được cho là tùy chọn, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được;

PHỤ LỤC A

(Tham khảo)

CÁC VÍ DỤ VỀ HOẠT ĐỘNG NƯỚC THEO CHẤT NỀN

Bảng A.1 đưa ra các ví dụ về hoạt độ nước theo các sản phẩm cần phân tích.

Bảng A.1 – Hoạt độ nước a_w theo các chất nền

Hoạt độ nước a_w	Các mẫu thực phẩm/chất nền
$\geq 0,95$	Thực phẩm rất dễ bị hỏng (rau, quả, thịt, cá tươi và đông hợp), sữa xúc xích đã nấu, bánh mì, thực phẩm chứa đến 4 % sacaroza hoặc 7 % NaCl (muối)
$\geq 0,91$	Phomat cứng như Cheddar, thịt hun khói, nước quả cô đặc chứa 55 % sacaroza hoặc 12 % NaCl (muối)
$\geq 0,87$	Xúc xích lên men, bánh ngọt xốp, phomat khô, margarin, thực phẩm chứa 65 % sacaroza hoặc 15 % NaCl (muối)
$\geq 0,80$	Nước quả cô đặc, sữa đặc, xirô, bột mì, bánh có hàm lượng đường cao, đậu đỗ có độ ẩm từ 15 % đến 17 %
$\geq 0,75$	Mứt, mứt nhuyễn, quả ngâm đường, bánh hạnh nhân, kẹo dẻo, bánh ngọt
$\geq 0,65$	Bột yến mạch có độ ẩm 10 %, mứt, mật mía, quả hạch
$\geq 0,60$	Quả khô có độ ẩm từ 15 % đến 20 %, caramel, kẹo sữa toffee, mật ong, đậu đỗ ép, thức ăn cho chó, thực phẩm dạng hạt, đậu đỗ và sản phẩm đậu đỗ
$\geq 0,50$	Mì sợi có độ ẩm 12 %, gia vị có độ ẩm 10 %
$\geq 0,40$	Bột trứng nguyên quả có độ ẩm 5 %, kẹo nuga
$\geq 0,30$	Bánh qui, cracker, vỏ bánh mì có độ ẩm từ 3 % đến 5 %, nước chấm dạng khô
$\geq 0,03$	Sữa bột nguyên chất có độ ẩm từ 2 % đến 3 %, bột xúp, cà phê hòa tan.

THƯ MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] ANDREWS, S., PITT, J.I. Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. *App. Environ. Microbiol.* 1986, **51**, pp. 1235-1238
- [2] BELL, C, NEAVES, P., WILLIAMS, A.P. *Food microbiology and laboratory practice*. Blackwell, Oxford, 2005. 324 p.
- [3] BEUCHAT, L.R. Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. In: CORRY, J.E.L., CURTIS, G.D.W., BAIRD, R.M., editors. *Handbook of culture media for food microbiology*, pp. 369-386. Elsevier, Amsterdam, 2003. (*Progress in industrial microbiology*, Vol 37)
- [4] BEUCHAT, LP,., FRANDBERG, E., DEAK, T., ALZAMORA, S.M., CHEN, J., GUERRERO, A.S., LOPEZ-MALO, A., OHLSSON, I., OLSEN, M., PEINADO, J.M., SCHNURER, J., DE SILONIZ, M.I., TORNAL-LEHOCZKI, J. (2001) Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: An interlaboratory study. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, **70**, pp. 89-96
- [5] DEAK, T., CHEN, J., GOLDEN, D.A., TAPIA, M.S., TORNAL-LEHOCZKI, J., VILJOEN, B.C., WYDER, M.T., BEUCHAT, L.R. Comparison of dichloran 18 % glycerol (DG18) agar with general purpose mycological media for enumerating food spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 2001, **67**, pp. 49-53
- [6] HOCKING, A.D., PITT, J.I. Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, **39**, pp. 488-492