

# TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 7852:2008**

Xuất bản lần 1

## **THỰC PHẨM – ĐẾM NẤM MEN VÀ NẤM MỐC BẰNG PHƯƠNG PHÁP MÀNG KHÔ CÓ THỂ HOÀN NƯỚC (PHƯƠNG PHÁP PETRIFILM™)**

*Foodstuffs – Enumeration of yeast and mold by dry rehydratable film method  
(Petrifilm™ method)*

HÀ NỘI - 2008

## Lời nói đầu

TCVN 7852:2008 được xây dựng trên cơ sở AOAC 997.02 *Yeast and Mold Counts in Foods. Dry Rehydratable Film Method.*

TCVN 7852:2008 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn 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.

# Thực phẩm – Đếm nấm men và nấm mốc bằng phương pháp màng khô có thể hoàn nước (phương pháp Petrifilm™)

*Foodstuffs – Enumeration of yeast and mold  
by dry rehydratable film method (Petrifilm™ method)*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp đếm nấm men và nấm mốc trong thực phẩm bằng phương pháp sử dụng màng khô có thể hoàn nước.

## 2 Nguyên tắc

Phương pháp này sử dụng các đĩa cấy chứa môi trường khô được bổ sung các kháng sinh, thuốc nhuộm để tăng khả năng quan sát sự phát triển và các chất tạo đông có thể tan trong nước lạnh. Các dung dịch huyền phù chứa pha loãng hoặc đã pha loãng được cho vào các đĩa với lượng 1 ml/đĩa. Dàn đều dung dịch huyền phù trên diện tích khoảng 30 cm<sup>2</sup>. Có thể dùng chất tạo đông để làm đông đặc các đĩa, ủ ấm và đếm nấm men và nấm mốc.

## 3 Thuốc thử

Trong quá trình phân tích, chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có qui định khác.

### 1 Nước pha loãng, dung dịch nước đệm phosphat

Cho 34 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3.2) vào 500 ml nước đựng trong bình định mức 1 lít (4.6). Dùng natri hydroxit (3.3) để chỉnh pH đến 7,2 và pha loãng bằng nước đến vạch. Khử trùng dung dịch 15 min trong nồi hấp áp suất (4.7) ở 121 °C. Bảo quản dung dịch gốc này trong tủ lạnh. Chuẩn bị dung dịch mẫu trắng pha loãng bằng cách dùng pipet (4.3) lấy 1,25 ml dung dịch gốc cho vào bình định mức 1 l (4.6) và pha loãng

## TCVN 7852:2008

bằng nước đến vạch. Phân phối 90 ml ± 1 ml hoặc 99 ml ± 1 ml dung dịch này vào các chai. Khử trùng các chai này 15 min trong nồi hấp áp lực (4.7) ở 121 °C.

**3.2 Kali dihydro phosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).**

**3.3 Natri hydroxit (NaOH), dung dịch 1 M (40 g/L)**

**3.4 Dung dịch clotetraxyclin.**

**3.5 Dung dịch cloramphenicol.**

**3.6 Chất tạo đông có thể tan trong nước lạnh.**

## 4 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và các thiết bị, dụng cụ sau đây:

### 4.1 Đĩa đếm nấm men và nấm mốc

Các đĩa chứa chất dinh dưỡng được bổ sung clotetraxyclin (3.4), cloramphenicol (3.5), chất tạo đông tan trong nước lạnh (3.6) và thuốc nhuộm màu nhạy với phosphatasa (5-brom-4-clo-3-indolyl phosphat) để tăng khả năng quan sát sự phát triển của nấm men và nấm mốc. Khoanh tròn vùng phát triển trên mỗi đĩa có ba mươi ô vuông 1 cm x 1 cm trên nền màng mỏng<sup>1)</sup>.

**4.2 Que dàn mẫu bằng chất dẻo, để dàn đều huyền phù lên khắp vùng phát triển của đĩa.**

**4.3 Pipet, dùng cho huyết thanh học hoặc pipet dạng xyranh có thể phân phối 1,0 ml.**

**4.4 Dụng cụ đếm khuẩn lạc, loại chuẩn hoặc loại có độ khuếch đại tương đương 1,5 lần.**

### 4.5 Bộ trộn

Bộ trộn cơ có tốc độ cao từ 10 000 vòng/min đến 12 000 vòng/min hoặc loại túi nhu động.

**4.6 Bình định mức 1 l.**

**4.7 Nồi hấp áp lực.**

<sup>1)</sup> Có thể sử dụng các đĩa đếm nấm men, nấm mốc 3M™ Petrifilm™ có bán sẵn của Sản phẩm Vi sinh 3M, 3M Center, Bldg. 274-5W05, St. Paul, MN 55144-1000, USA.

## 5 Chuẩn bị

### 5.1 Yêu cầu chung

Bảo quản các túi đĩa đựng đĩa đếm nấm men và nấm mốc chưa mở ở nhiệt độ dưới 8 °C. Sau khi mở, để các đĩa chưa sử dụng vào lại trong túi. Đóng kín túi bằng cách gấp và cuộn đầu mở. Bảo quản túi đựng đã đóng kín lại này ở nhiệt độ dưới 8 °C, nơi khô ráo. Các đĩa sau khi đã mở chỉ được dùng trong một tháng. Để các đĩa đếm nấm men và nấm mốc tiếp xúc với nhiệt độ cao hơn 25 °C và độ ẩm tương đối cao hơn 50 % có thể ảnh hưởng đến tính năng của đĩa.

Sau khi sử dụng, các đĩa vẫn còn chứa khuẩn lạc nấm men và/hoặc nấm mốc mà có thể phát triển được, nên trước khi thải bỏ cần được khử trùng bằng hấp áp lực 15 min ở 121 °C.

### 5.2 Chuẩn bị huyền phù thử nghiệm

Chuẩn bị huyền phù từ sản phẩm thực phẩm trong điều kiện vô trùng với độ pha loãng 1/10 hoặc lớn hơn bằng nước. Trộn bằng bộ trộn (4.5) hoặc túi nhu động trong 2 min và đổ đĩa. Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, nếu cần.

## 6 Cách tiến hành

Đặt đĩa đếm nấm men và nấm mốc lên bề mặt phẳng. Nhấc tấm màng mỏng phía trên ra, giữ pipet vuông góc với đĩa và cấy cẩn thận 1 ml huyền phù thử nghiệm vào chính giữa màng mỏng. Đậy tấm màng mỏng phía trên xuống chặt chẽ.

Dùng tay nhấc que dàn mẫu bằng chất dẻo (4.2). Dóng thẳng tâm que dàn mẫu với tâm đĩa. Dàn đều huyền phù bằng cách ấn nhẹ que dàn mẫu xuống tâm đĩa. Không gạt que dàn mẫu từ bên này sang bên kia màng mỏng. Lấy que dàn mẫu ra và để yên đĩa trong 1 min cho đông đặc lại.

Đặt các đĩa vào tủ ấm theo phương nằm ngang, hướng lên trên, không chồng cao quá 20 đĩa. Ủ các đĩa này nằm ngửa ở nhiệt độ từ 20 °C đến 25 °C.

Đếm các đĩa ngay sau giai đoạn ủ. Các khuẩn lạc nhỏ có màu xanh lục hoặc trắng nhạt là nấm men. Các khuẩn lạc nấm mốc thường có màu xanh nhưng cũng có thể có sắc tố tự nhiên của chúng (ví dụ: màu đen, vàng, xanh lục), chúng có khuynh hướng lớn hơn và khuếch tán nhiều hơn so với các khuẩn lạc nấm men.

Để tính số nấm men và nấm mốc, nhân số lượng tổng số nấm men và nấm mốc/đĩa (hoặc số lượng trung bình các khuẩn lạc/đĩa, nếu đếm các đĩa kép của cùng một độ pha loãng) với hệ số pha loãng

tương ứng. Khi đếm các khuẩn lạc trên các đĩa kép của các độ pha loãng kế tiếp, thì tính số lượng trung bình các khuẩn lạc cho mỗi độ pha loãng trước khi xác định trung bình số đếm của nấm men và nấm mốc.

Các số đếm ước tính có thể được thực hiện trên các đĩa có nhiều hơn 150 khuẩn lạc và phải được ghi là số ước tính. Trong việc đếm như thế, xác định số đếm trung bình/1 cm<sup>2</sup> và nhân với 30 (diện tích phát triển là khoảng 30 cm<sup>2</sup>).

Với số lượng lớn các khuẩn lạc nấm men có thể làm cho toàn bộ diện tích phát triển trở thành màu xanh. Với số lượng lớn các khuẩn lạc nấm mốc có thể làm cho toàn bộ diện tích phát triển trở thành màu xanh, màu đen, màu vàng ... Khi đó, không thể có được số đếm ước tính, nhưng có thể pha loãng tiếp và đổ đĩa huyền phù thử nghiệm để thu được số đếm chính xác hơn.

## 7 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin dưới đây:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết hoàn toàn mẫu thử;
- viện dẫn tiêu chuẩn này hoặc phương pháp đã sử dụng;
- kết quả và đơn vị biểu thị kết quả;
- ngày tháng lấy mẫu và phương thức lấy mẫu (nếu có);
- ngày tháng nhận mẫu phòng thử nghiệm;
- ngày tháng thử nghiệm;
- các điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với các chi tiết của sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.