



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM  
TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

# SẢN PHẨM THỰC PHẨM

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TỔNG SỐ BÀO TỬ,  
NẤM MEN, NẤM MỐC.

TCVN 5166 - 1990

HÀ NỘI

Cơ quan biên soạn : Viện dinh dưỡng - Bộ Y tế  
Cơ quan đề nghị ban hành: Bộ Y tế  
Cơ quan trình duyệt : Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường-  
Chất lượng

Cơ quan xét duyệt và ban hành:

Ủy ban Khoa học Nhà nước

Quyết định ban hành số 735/QĐ ngày 31 tháng 12  
năm 1990

SẢN PHẨM THỰC PHẨM	TCVN 5166-90
Phương pháp xác định tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	
FOODS	Khuyến
Method for enumeration of total yeasts and moulds	khích áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp đếm tổng số bào tử nấm men, nấm mốc trong các loại sản phẩm thực phẩm.

### 1. NGUYÊN TẮC

Sử dụng kỹ thuật đồ đĩa, đếm khóm nấm trên môi trường thạch sau khi ủ hiếu khí ở nhiệt độ  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong thời gian từ 5 đến 7 ngày. Số lượng bào tử nấm men, nấm mốc trong 1 g hoặc 1 ml mẫu sản phẩm thực phẩm kiểm nghiệm được tính từ số khóm nấm đếm được từ các đĩa nuôi cấy theo các đậm độ pha loãng.

### 2. LẤY MẪU VÀ CHUẨN BỊ MẪU

\* Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu theo TCVN 4886-89.

Lượng mẫu cần tối thiểu để pha loãng không ít hơn 1 ml đối với các sản phẩm khác.

### 3. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ

- Đĩa petri thủy tinh đường kính 90-100mm ;
- pipet có chia độ loại 1 , 5 , 10 ml đã tiệt khuẩn ;
- nồi cách thủy điều chỉnh được nhiệt độ  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$  ;
- tủ ẩm điều chỉnh được nhiệt độ  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  ;
- tủ sấy khô ;
- nồi hấp áp lực ;
- bình thủy tinh dung tích 250-500ml ;
- ống nghiệm loại 16-160mm và lớn hơn ;

- pH mét hoặc giấy đo pH .

#### 4. HOA CHẤT, MÔI TRƯỜNG

##### 4.1. Hoá chất

- Thạch dùng cho vi sinh vật ;
- pepton dùng cho vi sinh vật ;
- natri clorua tinh khiết (NaCl) ;
- glucoze tinh khiết ;
- natri hydrophotphat tinh khiết ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ;
- kali dihydrophotphat tinh khiết ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ;
- axit lactic, dung dịch 20% hoặc 30% ;
- axit citric, dung dịch 20% ;
- natri hydroxit tinh khiết (NaOH), dung dịch 0,1N .

##### 4.2. Môi trường

###### a) Nước dệm pepton

Pepton	10g
NaCl	5g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	9g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5g
Nước cất	1000ml

###### b) Nước pepton

- Pepton	1g
NaCl	8,5g
Nước cất	1000ml

###### c) Nước pepton có thạch

Nước dệm pepton (a) hoặc nước pepton (b)	1000ml
Thạch	1g

Pha chế môi trường a , b , c như sau : Đun nhỏ lửa, khuấy đều để hoà tan các chất đến khi sôi. Để nguội đến  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  , điều chỉnh pH môi trường bằng dung dịch NaOH 0,1 N sao cho khi tiệt khuẩn pH =  $7,0 \pm 0,2$  . Rót vào các bình dung tích 250ml mỗi bình 90ml, vào các ống nghiệm mỗi ống 9ml môi trường. Tiệt khuẩn trong nồi hấp ở nhiệt độ  $120^\circ\text{C}$  trong 15 phút.

Các môi trường trên cần được bảo quản ở nơi khô ráo, trong bóng tối với nhiệt độ từ 0 đến 5°C không quá 30 ngày.

c) Môi trường thạch Sabouraud

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

Cách pha chế : Đun nhỏ lửa, khuấy đều để hoà tan các chất đến khi sôi. Rót vào bình dung tích 250ml lượng môi trường 150ml. Tiệt khuẩn trong nồi hấp ở nhiệt độ 110°C trong 30 phút.

Nếu môi trường sử dụng ngay, để nguội đến  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  ở nồi cách thủy, nếu chưa sử dụng ngay thì cần bảo quản ở nơi khô ráo, trong bóng tối với nhiệt độ từ 0 đến 5°C không quá 30 ngày.

## 5. CÁC BƯỚC NUÔI CÂY

### 5.1. Pha loãng mẫu

Pha loãng mẫu theo TCVN 4887-89.

Chọn môi trường pha loãng : Sử dụng nước pepton hoặc nước đậm pepton nếu chỉ cần tính tổng số bào tử nấm men : sử dụng nước thạch hoặc nước pepton có thạch nếu cần tính tổng số cả nấm men và nấm mốc hoặc chỉ có nấm mốc.

Pha loãng mẫu cho đến khi có được đậm độ pha loãng cần thiết đếm được số khóm nấm trên đĩa theo dự tính.

### 5.2. Đĩa đĩa

Đối với một mẫu kiểm nghiệm phải nuôi cấy ít nhất 3 đậm độ, mỗi đậm độ dùng 2 đĩa petri và 1 pipet đã tiệt khuẩn riêng.

Lấy 1ml sản phẩm hoặc dung dịch pha loãng ở những đậm độ khác nhau cho vào giữa từng đĩa petri.

Thạch đã đun nóng chảy, để nguội đến  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , trong điều kiện vô khuẩn điều chỉnh pH môi trường thạch đến 4,5-5,5 bằng dung dịch axit lactic 20%, 40% hoặc dung dịch axit citric 20%.

Rót vào từng đĩa 12 - 15ml môi trường thạch trên, đảo đều dung dịch mẫu với môi trường bằng cách lắc sang phải và sang trái mỗi chiều 3 lần.

Đề các đĩa thạch đông tự nhiên trên mặt phẳng ngang.

Thời gian từ khi bắt đầu pha loãng đến khi rót môi trường vào đĩa không được quá 30 phút .

### 5.3. Ủ ấm

Khi thạch đã đông, đề các đĩa đã nuôi cấy vào tủ ấm ở nhiệt độ  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$  hoặc nhiệt độ phòng thí nghiệm tương ứng trong 5 - 7 ngày. Không lật ngược đĩa .

Sau 3 ngày, đếm kết quả sơ bộ, đếm tổng số các khóm nấm men và nấm mốc mọc trên các đĩa . (Chú ý nhẹ tay, không đi chuyên mạnh hay lật ngược đĩa).

## 6. TÍNH KẾT QUẢ

Chọn tất cả các đĩa có không quá 150 khóm nấm để tính kết quả. Sự phân bố các khóm nấm trên các đĩa phải hợp lý : độ pha loãng càng cao thì số khóm nấm càng ít. Nếu kết quả không hợp lý, phải tiến hành lại các bước nuôi cấy. Tính kết quả như sau :

6.1. Chọn những đĩa có số khóm nấm men từ 15 đến 150 , số, khóm nấm mốc từ 5 đến 50 của 2 đậm độ pha loãng liên tiếp. Nếu chênh lệch các giá trị ở 3 đậm độ nhỏ hơn hoặc bằng 2 lần, tính số (N) bào tử cho 1 g hoặc 1 ml sản phẩm bằng cách tính trung bình cộng của tổng số khóm nấm đếm được trên các đĩa theo công thức sau :

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

C : Số khóm nấm men hoặc nấm mốc đếm được trên các đĩa đã chọn .

$n_1, n_2$  : Số đĩa ở 2 đậm độ liên tiếp đã chọn thứ 1 , thứ 2 .

d : Hệ số pha loãng của đậm độ pha loãng đã chọn thứ 1.

Làm tròn số kết quả có được, chỉ giữ lại 2 số có nghĩa. Biểu thị kết quả dưới dạng thập phân giữa 1,0 và 9,9 nhân với  $10^E$  (n là số mũ thích hợp của 10) .

6.2. Nếu chênh lệch các giá trị ở 2 đậm độ lớn hơn 2 lần, lấy giá trị của đậm độ pha loãng thấp hơn để tính kết quả .

6.3. Nếu 2 đĩa của sản phẩm lỏng nguyên chất hoặc đậm độ pha loãng ban đầu có ít hơn 15 khóm nấm men hoặc ít hơn 5 khóm nấm mốc , tính kết quả theo trung bình cộng của các khóm nấm đã đếm được ở cả 2 đĩa tính ra cho 1 g hoặc 1 ml sản phẩm .

6.4. Nếu tất cả các đĩa không có khóm nấm nào mọc, đánh giá kết quả như sau :

- Ít hơn 1 bào tử nấm men, nấm mốc trong 1 ml sản phẩm.
- Ít hơn 1. <sup>1</sup> bào tử nấm men, nấm mốc trong 1 g sản phẩm .

d : Hệ số pha loãng của đậm độ pha loãng ban đầu ( $10^{-1}$ ).

## 7. BÁO CÁO KẾT QUẢ

Trong báo cáo kết quả kiểm nghiệm phải nêu phương pháp đã dùng và kết quả tính được : số bào tử nấm men, nấm mốc có trong 1 g hoặc 1 ml sản phẩm kiểm tra.

Sai lệch của phương pháp : Trong 95% trường hợp , sai lệch giới hạn của phương pháp từ 12 đến 37% .

---