

Phương pháp định lượng



GV: NGUYỄN VĂN HẠNH

Phương pháp định lượng là gì ?



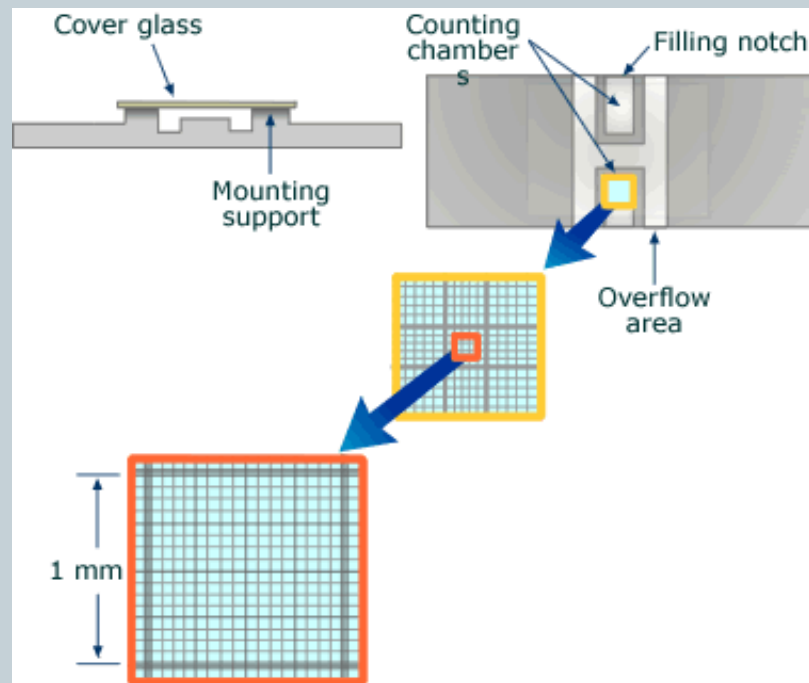
- Là các phương pháp để xác định số lượng vsv trong mẫu.
- Trả lời cho câu hỏi: “*Hàm lượng vi sinh vật trong mẫu là bao nhiêu ?*”
- Các phương pháp định lượng
 1. Phương pháp đếm trực tiếp
 2. Phương pháp đếm khuẩn lạc
 3. Phương pháp đếm khuẩn lạc trên màng lọc
 4. Phương pháp đo độ đục
 5. Phương pháp MPN (most probable number)
- Đơn vị tính:

tế bào/ml	tế bào/g
CFU/ml	CFU/g
MPN/ml	MPN/g

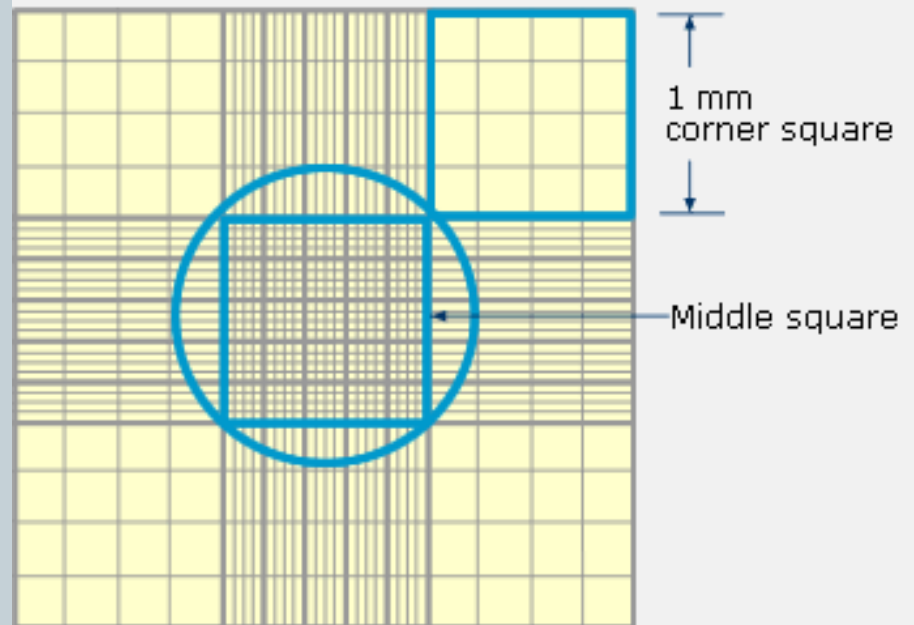
Phương pháp đếm trực tiếp



- Mật độ vsv đơn bào có kích thước lớn như nấm men, men, tảo ... có thể được xác định trực tiếp bằng buồng đếm trên kính hiển vi.

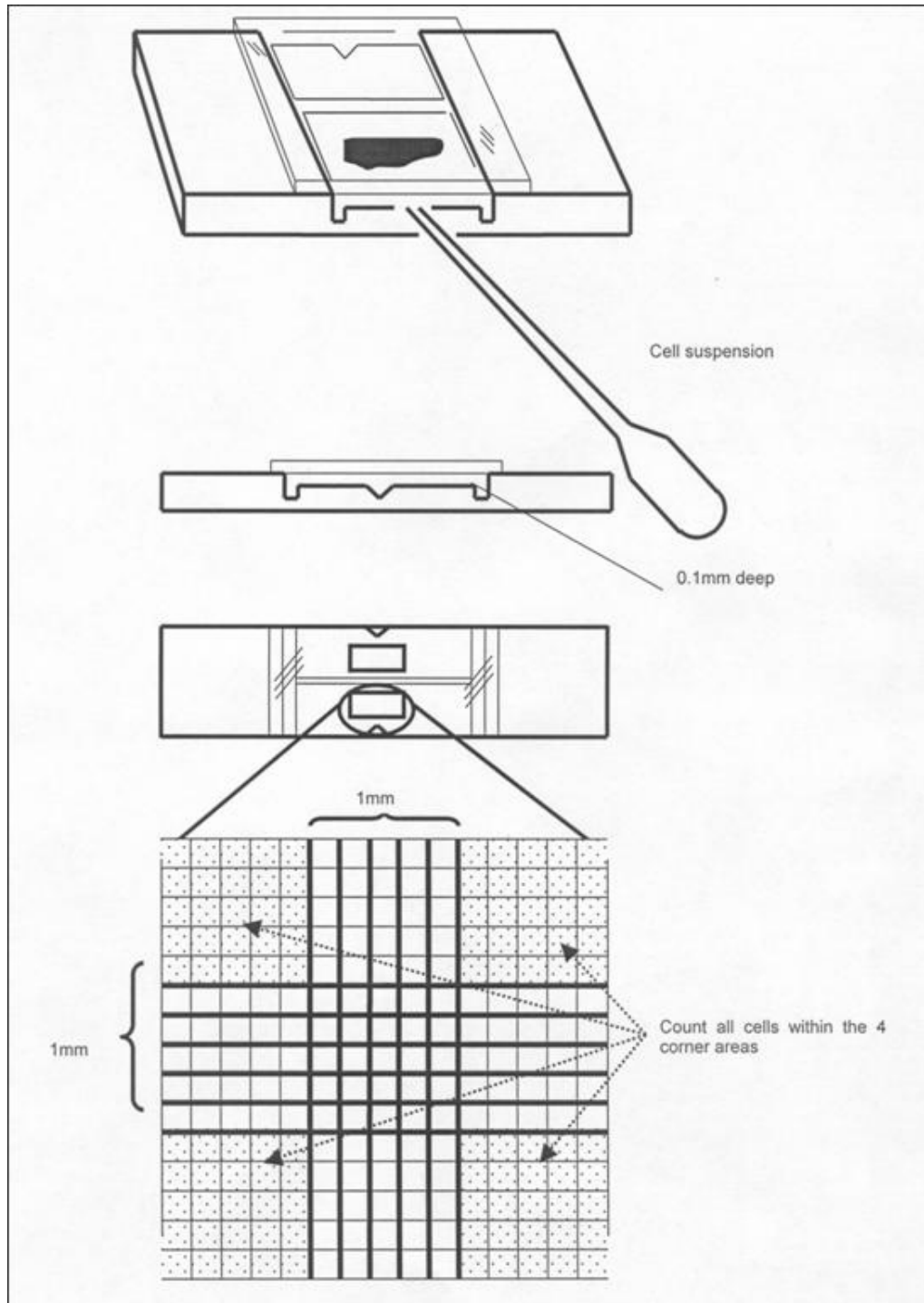


Standard Haemocytometer Chamber

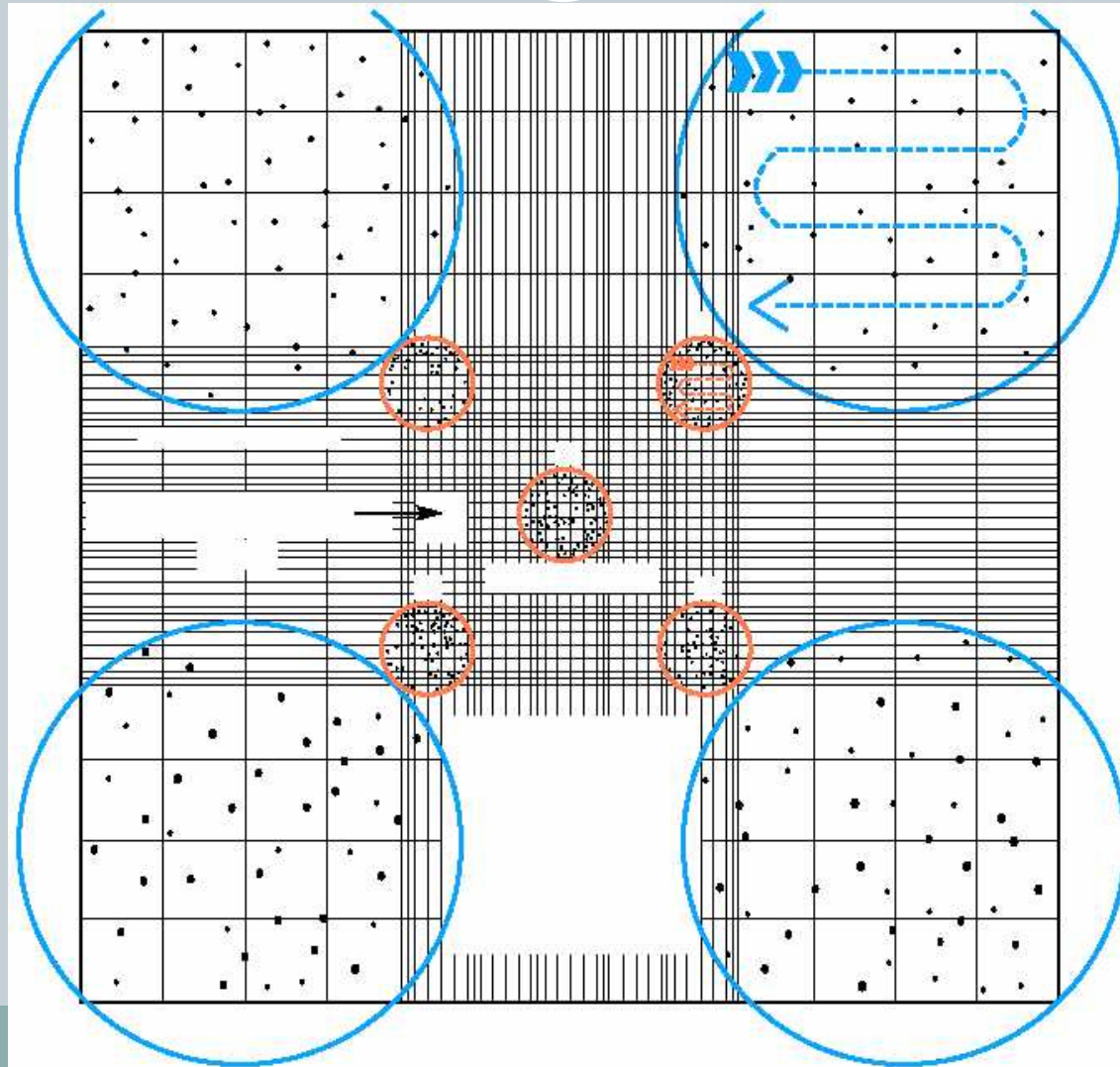


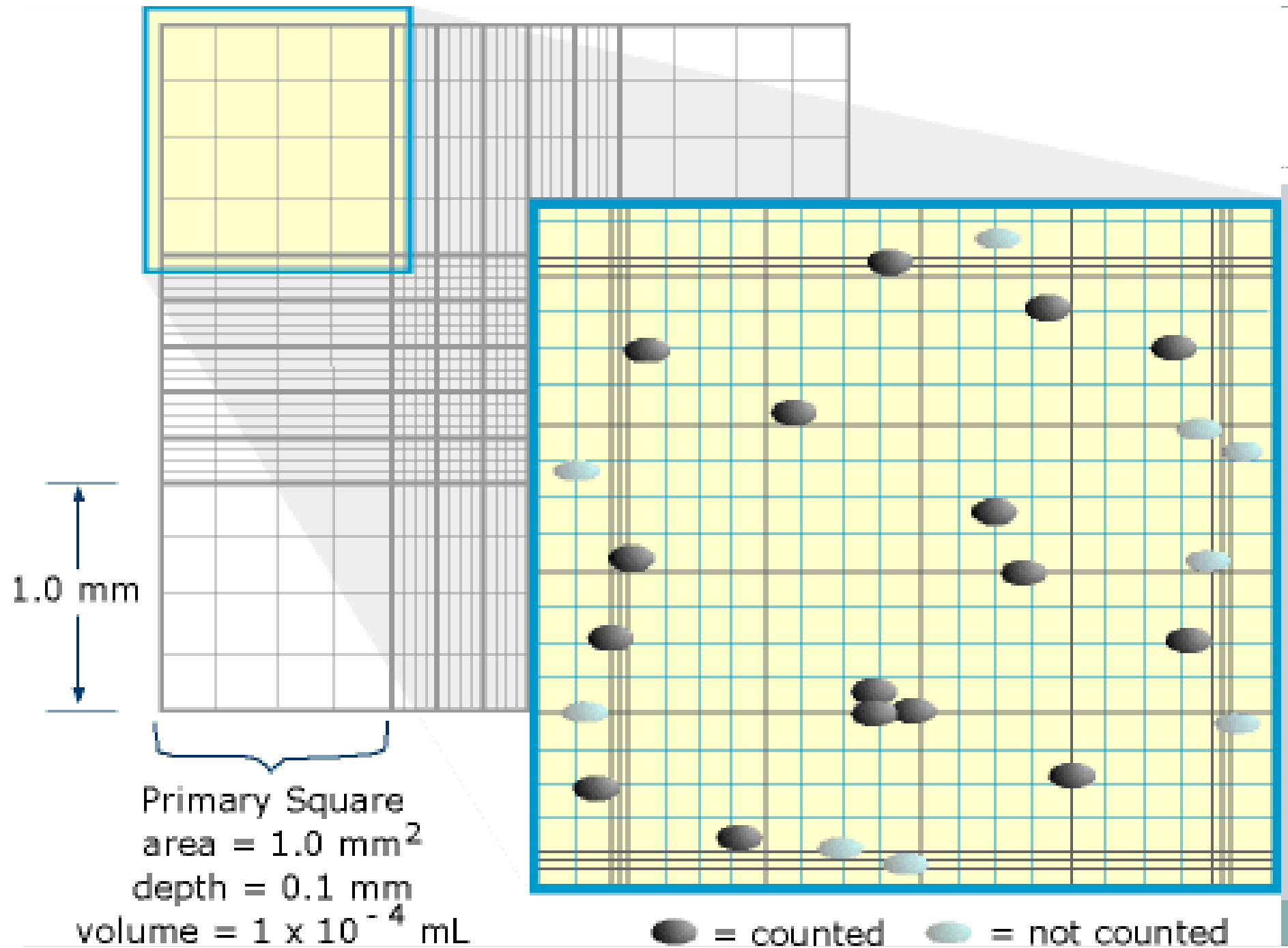
Đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu

Pha loãng mẫu cần
đếm sao cho trong mỗi ô
nhỏ của buồng đếm có
khoảng 5 - 10 tế bào



Cách đếm tế bào trong buồng đếm





Ưu điểm và nhược điểm



Ưu điểm: cho biết được số lượng VSV

Nhược điểm: dễ nhầm lẫn, độ chính xác không cao, không thích hợp cho huyền phù vsv có mật độ thấp



Khắc phục nhược điểm của pp đếm trực tiếp ????

Đếm trực tiếp bằng kính hiển vi huỳnh quang



Các chất nhuộm phát huỳnh quang

- Acridin cam (AODC)
- 4',6-dianidino-2-phenyl-indol (DAPI)
- Fluorescein isothiocyanate (FITC)

Ưu điểm:

- Loại bỏ sai số do các chất vẩn
- Kết quả phản ánh đúng với sinh khối

Phương pháp đếm khuẩn lạc



Ưu điểm:

Cho phép xác định số tế bào sống

Định lượng chọn lọc vsv

Phương pháp:

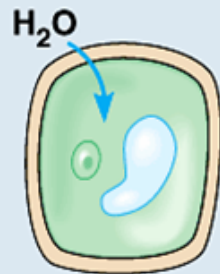
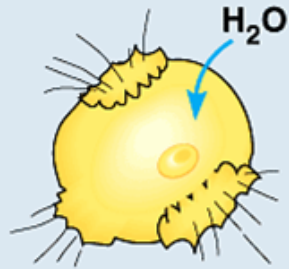
- Chuẩn bị dịch pha loãng mẫu
- Chuẩn bị các chuỗi pha loãng mẫu
- Cấy mẫu vào môi trường, ủ mẫu
- Đếm số khuẩn lạc hình thành



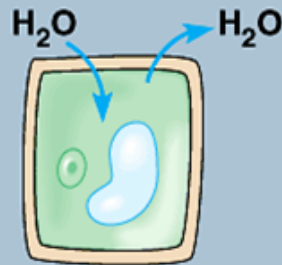
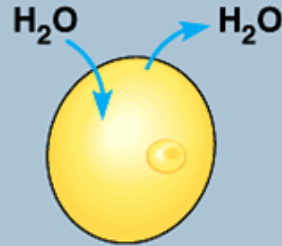
Chuẩn bị dịch pha loãng mẫu



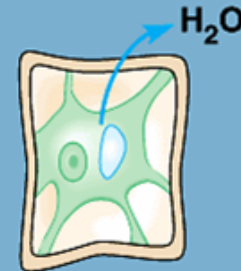
Nhuộc trương



Đẳng trương



Ưu trương



**Tế bào
động vật**

**Tế bào
thực vật**

**Không sử dụng nước cất và nước muối sinh lý để
pha loãng mẫu thực phẩm**

Các dung dịch pha loãng mẫu



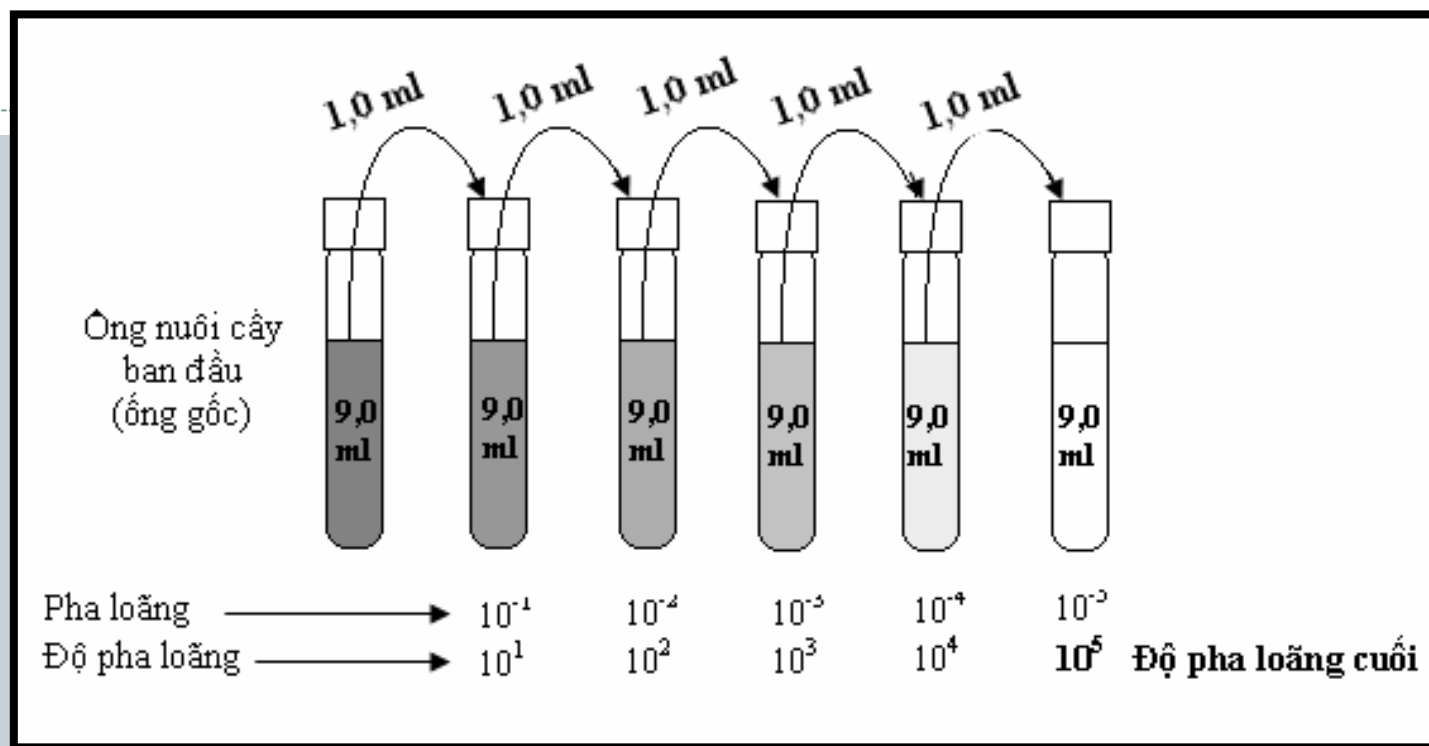
- Saline peptone water (SPW)

NaCl	1g
Peptone	8,5g
Nước cất vừa đủ	1 lít

- Buffered peptone water (BPW)

NaCl	5g
Peptone	10g
Nước cất vừa đủ	1 lít

Chuẩn bị các chuỗi pha loãng mẫu



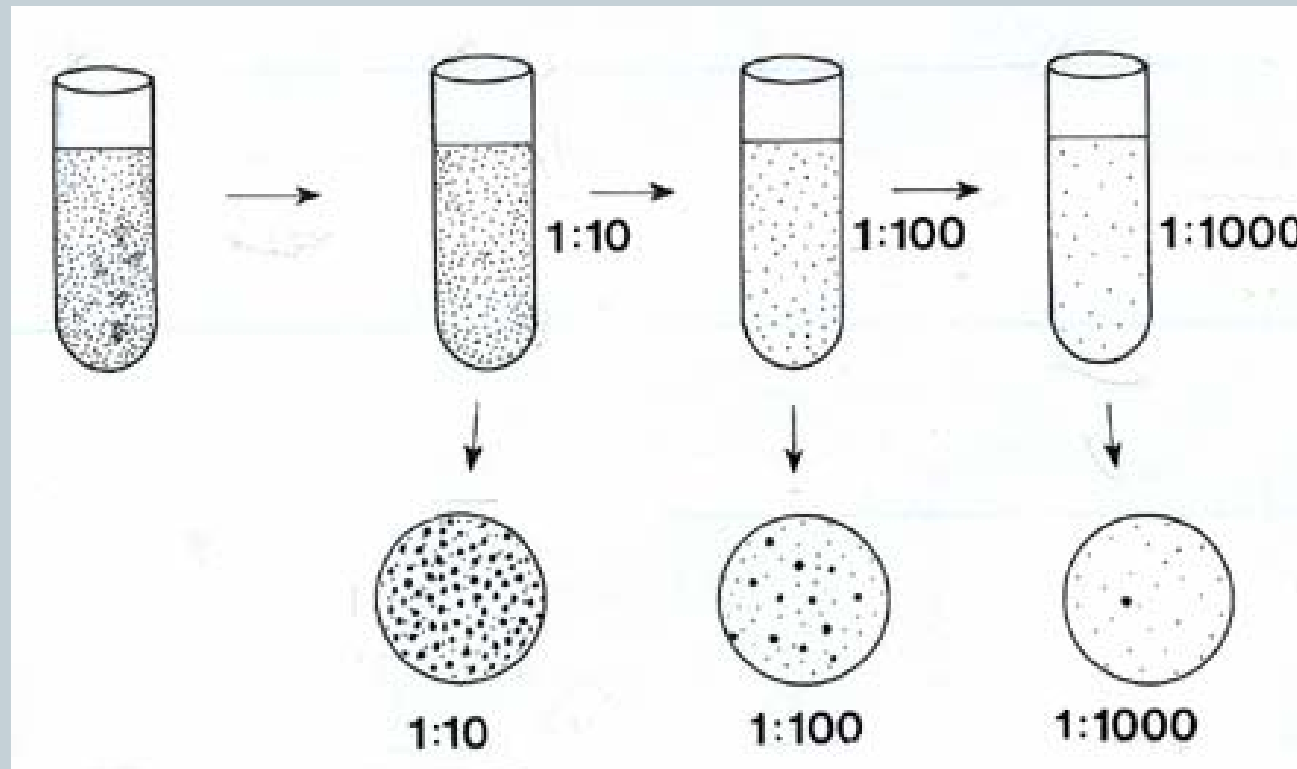
pha loãng mẫu lỏng theo dãy thập phân

Đối với các mẫu rắn hay bán lỏng:

10g mẫu + 90ml dung dịch pha loãng $\Rightarrow$ độ pha loãng 10^1

Các bước tiếp theo tương tự như pha loãng mẫu lỏng

Cấy mẫu vào môi trường



- Phương pháp cấy bề mặt
- Phương pháp đổ đĩa

Phương pháp đổ đĩa



- Chuẩn bị đĩa petri vô trùng
- Môi trường được chuẩn bị - hấp khử trùng và được bảo quản mát ở 45°C trong bể điều nhiệt
- Hút 1ml mẫu vào đĩa trống (chọn nồng độ thích hợp)
- Đổ vào đĩa đã cấy 10 – 15ml môi trường, lắc đều
- Để nguội môi trường
- Đem ủ

Phương pháp đổ đĩa



Ưu điểm

Cấy được thể tích mẫu lớn (1ml)

Xác định được các VSV cần dinh dưỡng tiếp xúc từ nhiều phía

Cho phép đếm được mật độ VSV cao, khoảng 150-300 khuẩn lạc

Nhược điểm

Không định lượng được những VSV quá nhạy nhiệt

Không xác định được hình dạng khuẩn lạc nhất định

Khó làm thuần một dòng VSV

Phương pháp cấy bề mặt



- Môi trường phải được chuẩn bị trên đĩa trước 1-2 ngày để khô mặt
- Phương pháp
 - Cấy 0.1 – 0,3ml vào đĩa môi trường
 - Trải đều trên mặt bằng que trang tam giác
 - Để ở nhiệt độ phòng 15-20 phút cho khô mặt



Phương pháp cây bề mặt



Ưu điểm

- Định lượng được các VSV nhạy nhiệt
- Có thể nhận dạng được dạng khuẩn lạc đặc trưng
- Dễ dàng làm thuần chủng VSV mục tiêu

Nhược điểm

- Chỉ cây được thể tích mẫu nhỏ
- Chỉ cho phép đếm được số lượng khuẩn lạc thấp

Các thiết bị hỗ trợ đếm khuẩn lạc



Máy đếm khuẩn
lạc



Máy đếm khuẩn
lạc
tự động

Đếm khuẩn lạc



- Đếm tất cả khuẩn lạc đơn lẻ mọc trên môi trường
- Thường chọn những đĩa có số khuẩn lạc khoảng 30 – 300
- Dùng bút để đếm các khuẩn lạc đã đếm
- Tính toán kết quả

(dựa trên số khuẩn lạc đếm được và độ pha loãng để tính ra số khuẩn lạc vsv trong dung dịch ban đầu)

Phương pháp màng lọc



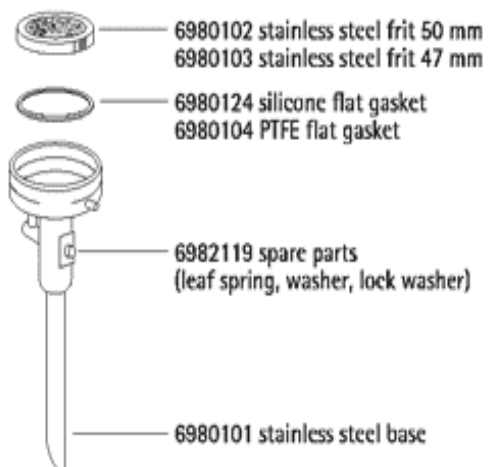
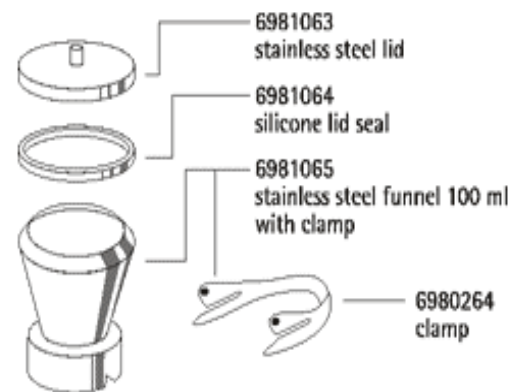
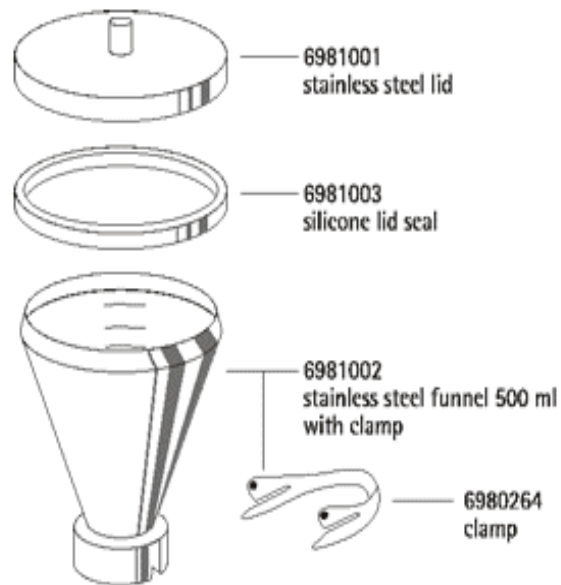
- Kích thước lỗ lọc $0,47\mu\text{m}$ hay $0,22\mu\text{m}$
- Đường kính và hình dạng màng lọc phụ thuộc vào đường kính phễu lọc
- Đường kính màng thường là 45mm



Thiết bị lọc nhiều pha



Các bộ phận của thiết bị lọc VSV



Phương pháp lọc VSV



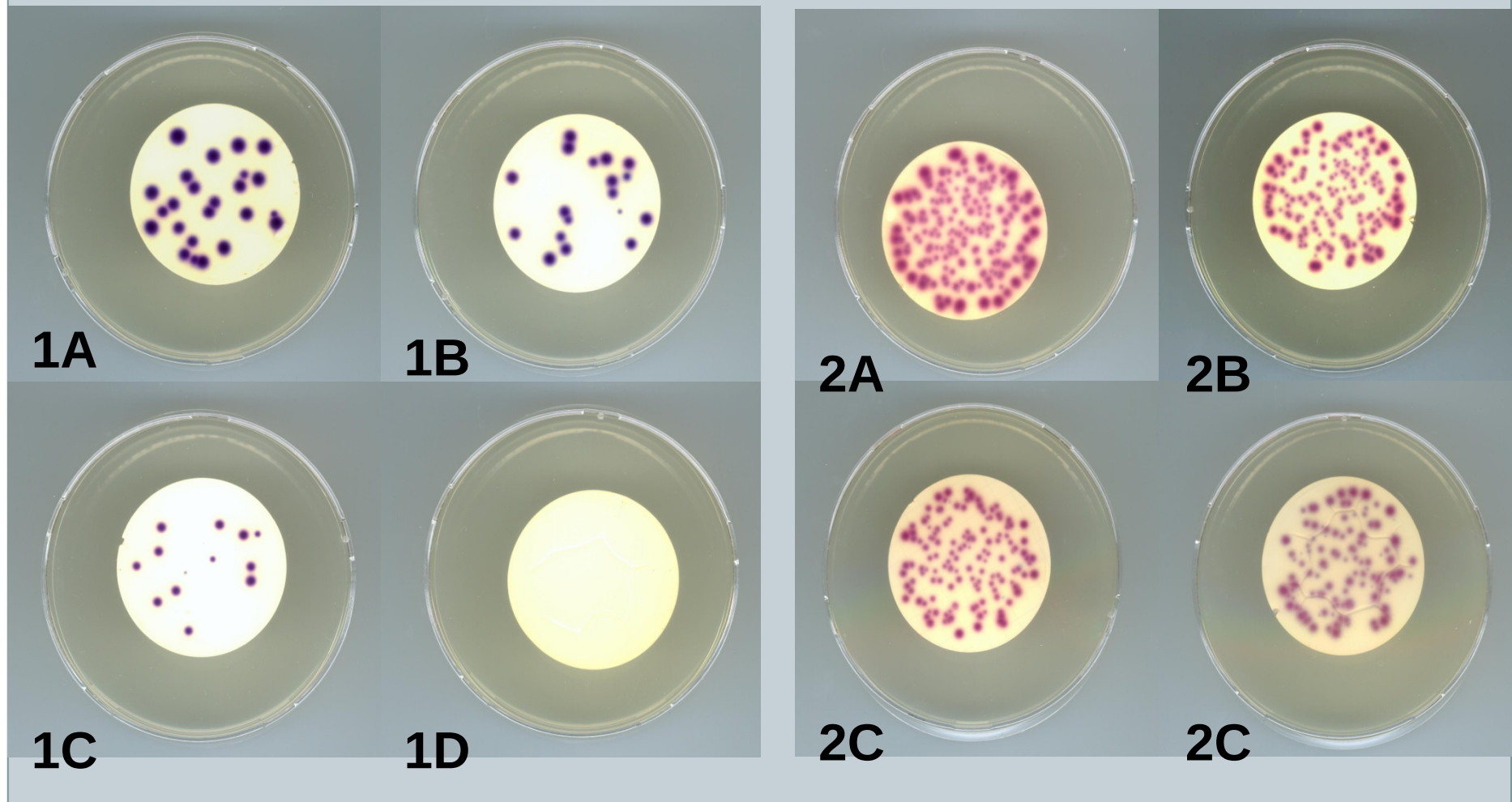
- Phễu lọc, giá đỡ màng lọc phải được vô trùng sau mỗi lần lọc
- Mật độ VSV trong dịch lọc thích hợp:
<150 khuẩn lạc/màng
- Thể tích dịch lọc trong 1 lần: 50 -100ml
- Nếu thể tích dịch lọc nhỏ hơn thì phải pha loãng bằng dd pha loãng hay nước cất vô trùng

Phương pháp màng lọc



- Ưu điểm
 - Xác định được mật độ VSV cụ thể trong một thể tích mẫu lớn: 10ml, 100ml ...
- Nhược điểm
 - Không thích hợp cho việc phân tích các mẫu thực phẩm rắn

Khuẩn lạc vsv mọc trên màng



E. coli trên môi trường ID Coli agar

Coliforms trên môi trường ID Coli agar

ĐỊNH LƯỢNG VSV BẰNG PP MPN (Most Probable Number)



- ✓ Phương pháp MPN dựa trên nguyên tắc xác suất thống kê sự phân bố VSV trong các độ pha loãng khác nhau của mẫu.
- ✓ Mỗi độ pha loãng được nuôi cấy lặp lại nhiều lần (3 – 10 lần)
- ✓ Các độ pha loãng được chọn lựa sao cho trong các lần lặp lại có một số lần dương tính và có một số lần âm tính.
- ✓ Số lần dương tính được ghi nhận và so sánh với bảng thống kê $\Rightarrow$ giá trị ước đoán số lượng VSV trong mẫu.

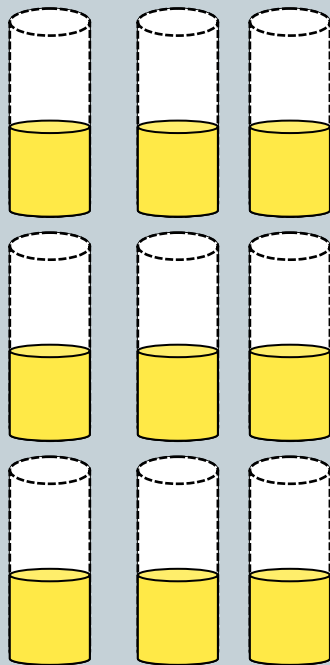
ĐỊNH LƯỢNG VSV BẰNG PP MPN



- Hai hệ thống MPN
 - Hệ thống 9 ống
 - Hệ thống 15 ống
- Đặc điểm
 - Vi sinh vật mục tiêu phải có những biểu hiện đặc trưng trên môi trường nuôi cấy như
 - Sự tạo hơi: Coliforms ...
 - Sự đổi màu: *S. aureus*
 - Cho phép định lượng được mật độ VSV thấp trong thể tích mẫu lớn

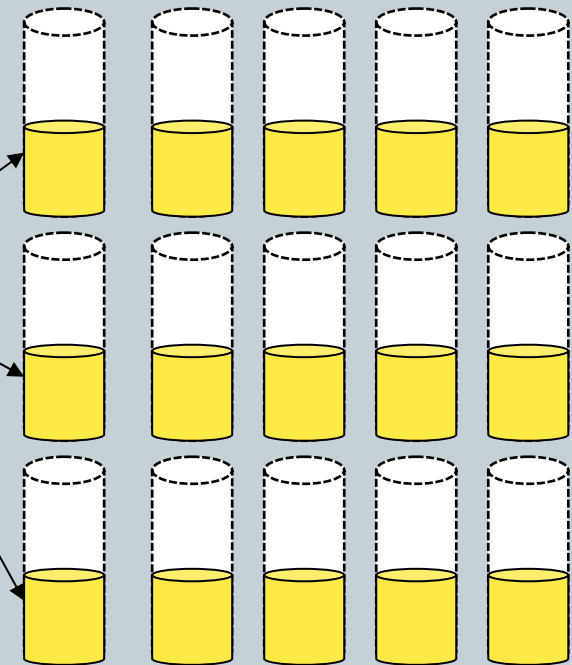
Hệ thống MPN/g(ml)

Hệ thống 9 ống

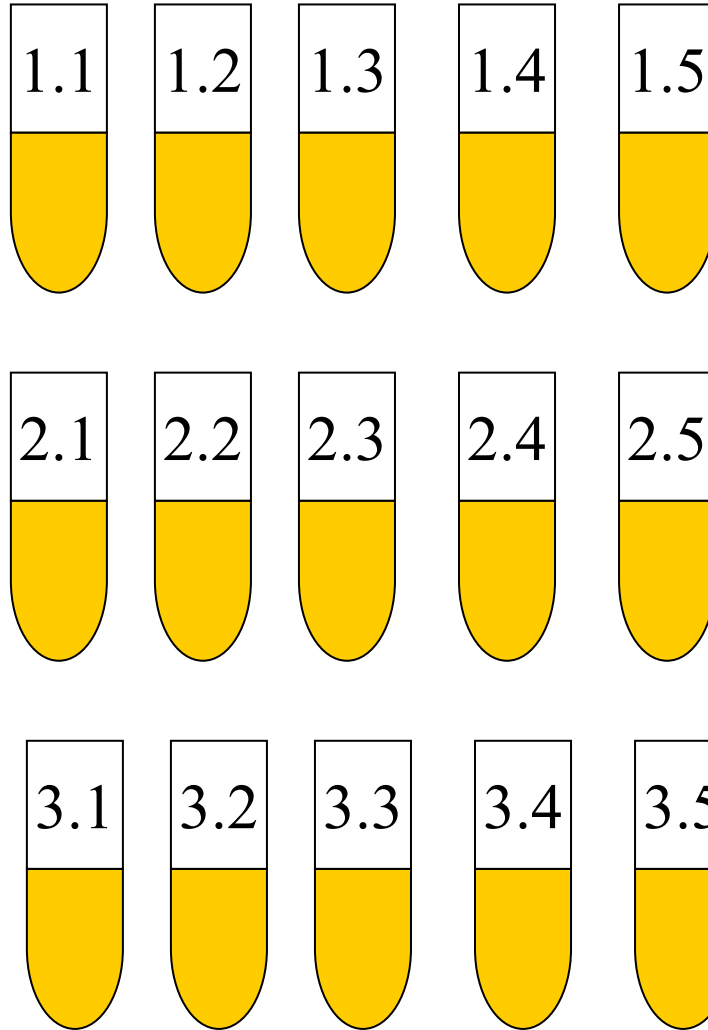


10ml mỗi trường

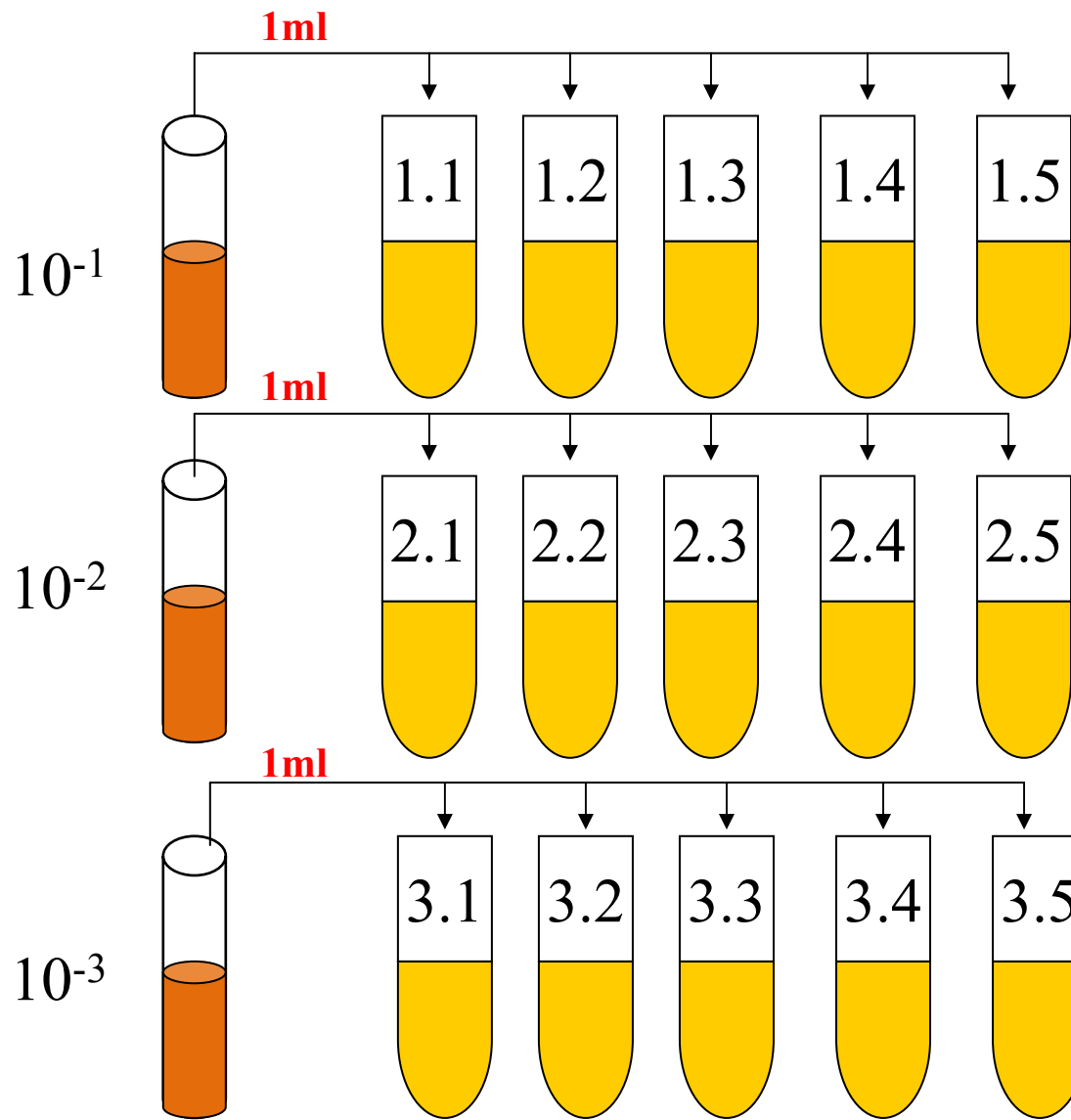
Hệ thống 15 ống



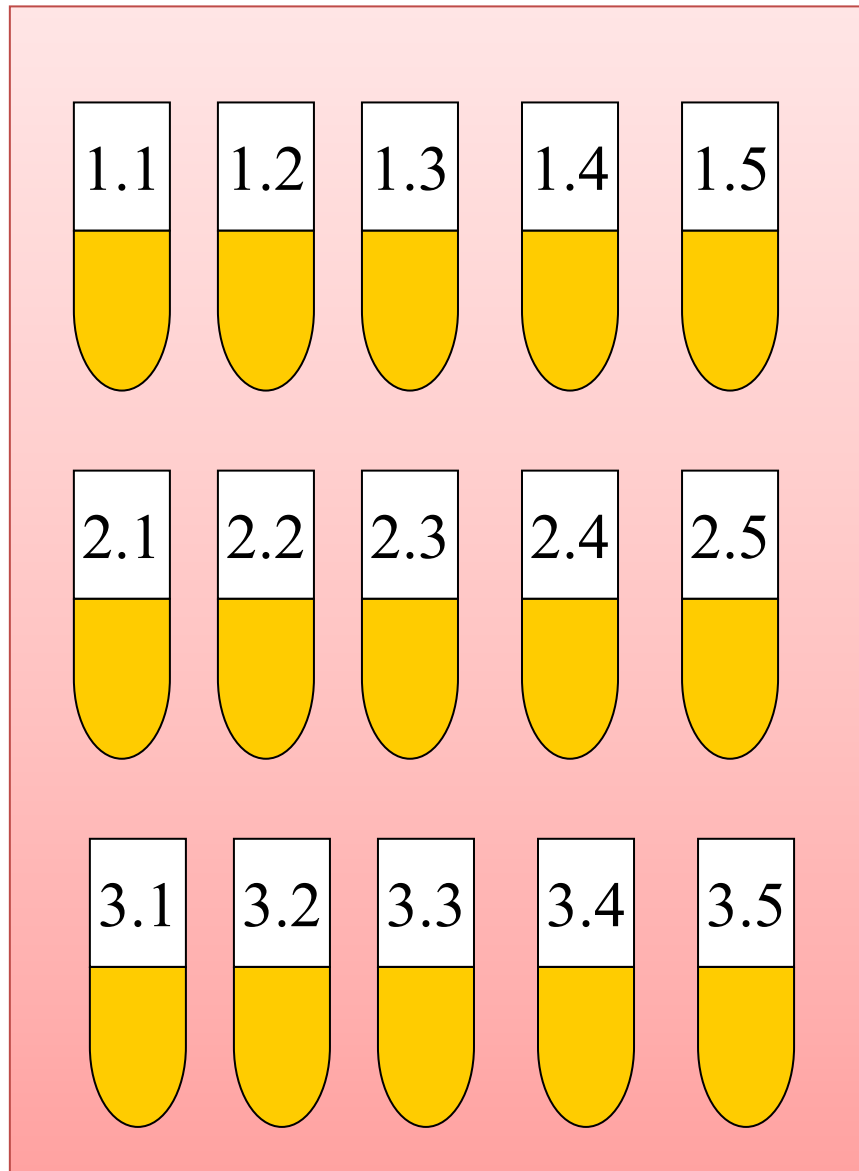
ĐỊNH LƯỢNG VSV BẰNG PP MPN



1 - Chuẩn bị các ống nghiệm có chứa môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng của đối tượng VSV cần định lượng

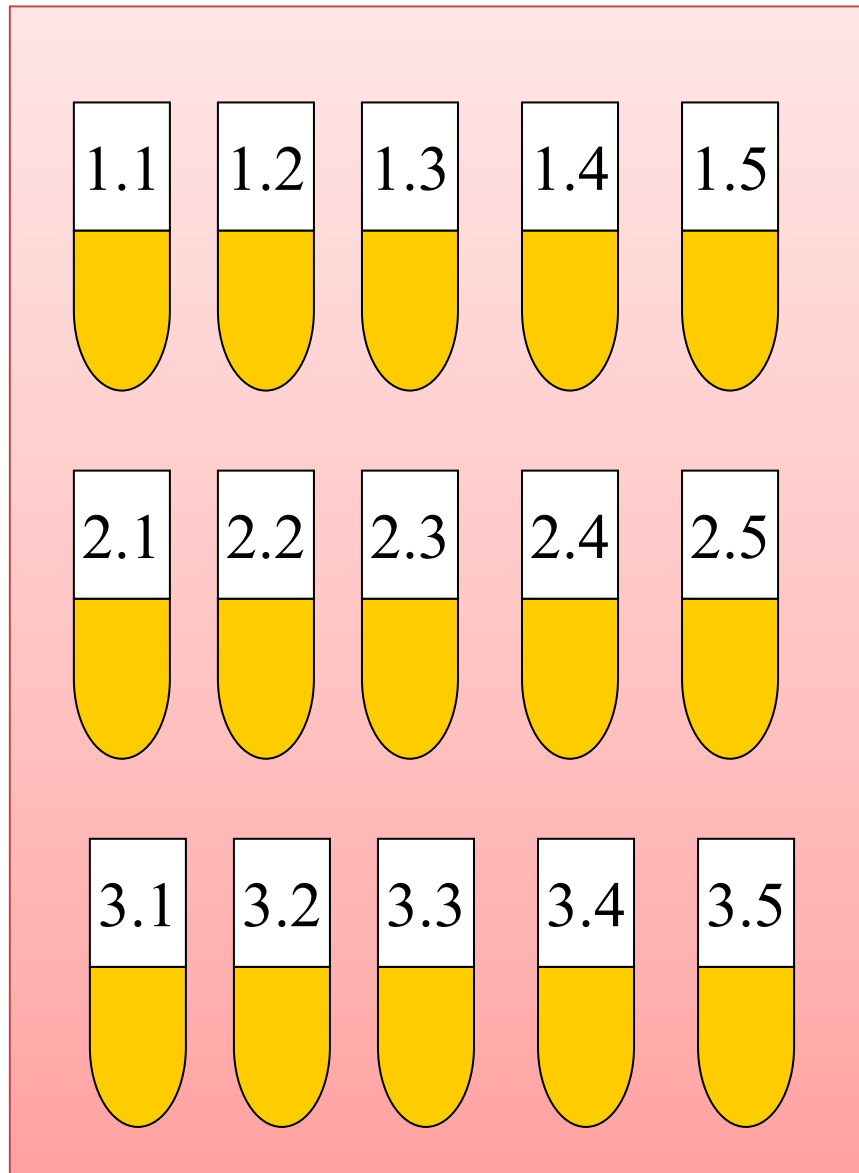


2 - Cây một thể
tích chính xác
dung dịch mẫu
ở 3 nồng độ
pha loãng bậc
10 liên tiếp

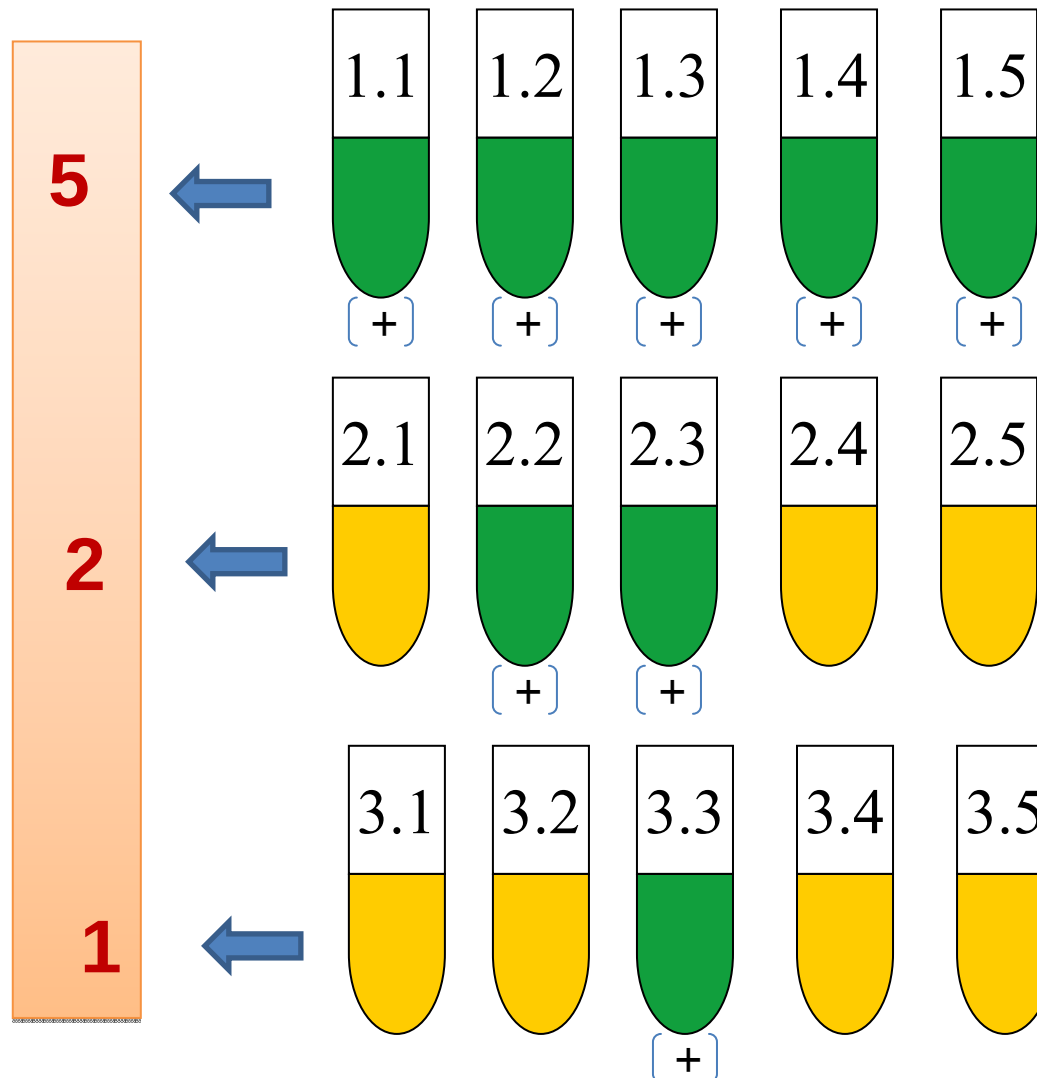


3 – Đem ống
nghiệm ủ ở điều
kiện thích hợp

Sự
đổi
màu
của
môi
trường



4 – Quan sát các
biểu hiện chứng
minh sự phát triển
của vsv cần kiểm
định



5 – Ghi nhận số lượng các ống nghiệm dương tính ở từng độ pha loãng

5
2
1



ĐỊNH LƯỢNG VSV BẰNG PP MPN

