

## TÀI LIỆU KỸ THUẬT

# MRS AGAR

## ĐẾM VI KHUẨN LACTIC ACID

### 1 MỤC ĐÍCH

MRS Agar để nuôi cấy và đếm vi khuẩn *Lactobacillus* trong các sản phẩm sữa và thực phẩm khác, trong các sản phẩm dùng làm thức ăn chăn nuôi.

Môi trường có thể được sử dụng để nuôi cấy các *lactobacilli* phát triển chậm như *Lactobacillus brevis* và *Lactobacillus fermentum*. Được axit hóa đến pH thấp, nó có thể được sử dụng để liệt kê *Lactobacillus bulgaricus* trong sữa chua.

Thành phần được mô tả theo tiêu chuẩn ISO 15214.

### 2 LỊCH SỬ

De Man, Rogosa và Sharpe đã phát triển một công thức vào năm 1960 cho một môi trường được thiết kế đặc biệt để nuôi cấy *lactobacilli* trong các sản phẩm từ sữa mà không cần thêm nước ép cà chua.

### 3 NGUYÊN TẮC

Các pepton, glucose, magie và muối mangan khác nhau cung cấp các yếu tố dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của *lactobacilli*.

Tween 80 là nguồn cung cấp các axit béo cần thiết cho sự phát triển của các vi khuẩn này.

Dipotassium phosphate ổn định pH trong quá trình phát triển của vi sinh vật.

Ammonium citrate và sodium acetate ức chế sự phát triển của hầu hết các vi sinh vật ngoại nhiễm, bao gồm cả streptococci và nấm mốc.

### 4 THÀNH PHẦN

Các thành phần có thể được điều chỉnh để đạt hiệu suất tối ưu.

Trong 1 lít môi trường:

- Enzymatic digest of casein.....	10,00 g
- Meat extract .....	10,00 g
- Yeast extract .....	4,00 g
- Glucose .....	20,00 g
- Tween 80 .....	1,08 g
- Dipotassium phosphate.....	2,00 g
- Sodium acetate.....	5,00 g
- Ammonium citrate.....	2,00 g
- Magnesium sulfate.....	0,20 g
- Manganese sulfate .....	0,05 g
- Bacteriological agar .....	16,00 g

pH của môi trường hoàn chỉnh ở 25 °C : 5,7 ± 0,1.

## 5 CHUẨN BỊ

### Chuẩn bị môi trường bột khô :

- Pha 70,3 g môi trường bột khô (BK089) vào 1 lít nước cất vô trùng hoặc nước khử ion.
- Đun nhẹ từ từ cho đến sôi, khuấy nhẹ cho đến khi tan hoàn toàn.
- Chia vào trong các ống nghiệm hoặc trong bình
- Vô trùng bằng autoclave tại 1210C trong 15 phút
- Làm nguội và duy trì môi trường ở 44-47 ° C

✓ **Pha : 70,3 g/L**

✓ **Hấp tiệt trùng : 15 phút trong 121 °C**

### Sử dụng môi trường đã pha sẵn :

- Đun chảy thạch trong khoảng thời gian tối thiểu để thu được dịch lỏng hoàn toàn (BM089). Không lặp lại thao tác này nhiều hơn một lần.
- Làm nguội và duy trì ở trạng thái nóng chảy ở 44-47 ° C

### CHÚ Ý :

Theo quy trình được sử dụng, thạch phải được điều chỉnh đến độ pH khuyến nghị trước chu kỳ khử trùng.

- Đối với sữa chua, nên sử dụng axit axetic để điều chỉnh độ pH cuối cùng là  $5,4 \pm 0,1$ .
- Sử dụng NaOH, điều chỉnh pH đến 6,2 để định lượng *Lactobacillus* và *Pediococcus* trong các sản phẩm dùng làm thức ăn chăn nuôi.
- Sử dụng NaOH, điều chỉnh đến pH  $6,5 \pm 0,2$  để định lượng *Bifidobacterium* trong các sản phẩm làm thức ăn chăn nuôi.

## 6 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

### Vi sinh thực phẩm, đếm vi khuẩn axit lactic ưa nhiệt (NF ISO 15214)

- Chuyển 1 mL sản phẩm cần phân tích và các dung dịch pha loãng nối tiếp vào đĩa Petri vô trùng.
- Đổ 15 mL môi trường vào mỗi đĩa.
- Xoay đều để đồng nhất mẫu và môi trường, để thạch đông lại trên bề mặt phẳng.
- Ủ tại  $30 \pm 1$  °C trong  $72 \pm 3$  h ở điều kiện hiếu khí.

✓ **Cấy (đổ đĩa) : 1 mL vào đĩa**

✓ **Ủ : 72 h tại 30 °C**

### CHÚ Ý :

- Đối với các sản phẩm sữa, ủ trong điều kiện yếm khí ở 37 ° C trong 72 giờ, tham khảo các tiêu chuẩn ISO 27205, ISO 7889, và ISO 20128..
- Khi xử lý thức ăn chăn nuôi, cấy trên bề mặt và ủ trong điều kiện yếm khí ở  $37 \pm 1$  ° C, trong 36 đến 48 giờ để định lượng *Bifidobacterium* và 48 đến 72 giờ đối với *Lactobacillus* (NF EN 15785; NF EN 15786; NF15787).

## 7 KẾT QUẢ

Đếm các khuẩn lạc trong các đĩa có dưới 300 khuẩn lạc. Vì có khả năng các vi khuẩn không phải vi khuẩn lactic có thể phát triển, hãy xác minh dưới kính hiển vi rằng các tế bào đó là trực khuẩn Gram dương, không bào tử.

Xem phụ lục 1 : HÌNH ẢNH HỖ TRỢ.

## 8 QUẢN LÝ CHẤT LƯỢNG

**Môi trường khan:** bột màu be sáng, đồng nhất và chảy tự do.

**Môi trường pha sẵn :** thạch màu hổ

Phản ứng nuôi cấy điển hình sau 72 h tại 30 °C (NF EN ISO 11133)

Vi sinh vật		Phát triển (Hiệu năng : $P_R$ )
<i>Lactobacillus sakei</i>	WDCM 00015	$P_R \geq 70 \%$
<i>Lactococcus lactis</i>	WDCM 00016	$P_R \geq 70 \%$
<i>Bacillus cereus</i>	WDCM 00001	Úc chế, score 0
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Úc chế, score 0

## 9 BẢO QUẢN/ HẠN SỬ DỤNG

**Môi trường khan:** 2-20 °C.

**Môi trường chuẩn bị sẵn :** 2-8 °C.

Hạn sử dụng được ghi trên nhãn.

**Môi trường đã pha trong chai (\*) :** 180 ngày tại 2-8 °C.

(\*) Giá trị chuẩn được xác định trong các điều kiện chuẩn bị tiêu chuẩn, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

## 10 ĐÓNG GÓI

**Môi trường bột khô :**

500 g chai .....BK089HA

**Môi trường pha sẵn (pH 5,7) :**

10 x 200 mL chai..... BM08908

## 11 THAM KHẢO

De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. App. Bacteriol., 23, (1): 130-135.

Journal Officiel du 4 janvier 1978. Méthode officielle d'analyse pour le dénombrement de la flore spécifique du yaourt ou yoghourt. (arrêté du 25 Novembre 1977).

ISO 27205. Février 2010. Produits laitiers. Ferments acidifiants. Norme de composition.

NF ISO 15214. Septembre 1998. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles. Technique par comptage des colonies à 30 °C.

ISO 7889. Février 2003. Yaourt. Dénombrement des micro-organismes caractéristiques. Technique de comptage des colonies à 37 °C.

ISO 20128. Mai 2006. Produits laitiers. Dénombrement de *Lactobacillus acidophilus* présomptifs sur un milieu sélectif. Technique de comptage des colonies à 37 °C.

NF EN 15785. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Bifidobacterium* spp. NF EN

15786. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Pediococcus* spp.

NF EN 15787. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Lactobacillus* spp.

## 12 THÔNG TIN BỔ SUNG

Thông tin trên bao bì có giá trị hơn các công thức, hướng dẫn mô tả trong tài liệu này và có thể sửa đổi bất cứ lúc nào mà không cần thông báo.

Mã tài liệu : MRS AGAR\_ENv11.  
 Ngày tạo : 10-2003  
 Ngày update : 12-2017  
 Lý do sửa đổi : Cập nhật hướng dẫn sử dụng.

## PHỤ LỤC 1 : HÌNH ẢNH HỖ TRỢ

---

### MRS Agar

Phát hiện và đếm *Lactobacillus*.

### Kết quả :

Phát triển sau 72 h tại 30 °C.

#### *Lactobacillus casei* subsp. *raimosus*

Đặc điểm khuẩn lạc :  
Màu trắng, có kích thước  
đồng nhất.

