

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN VIỆT NAM**

**TCVN 6507-4 : 2005**

**ISO 6887-4 : 2003**

Xuất bản lần 1

**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**

**PHẦN 4: CÁC NGUYÊN TẮC CỤ THỂ ĐỂ CHUẨN BỊ CÁC  
SẢN PHẨM KHÁC VỚI SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA, THỊT VÀ  
SẢN PHẨM THỊT, THUỶ SẢN VÀ SẢN PHẨM THUỶ SẢN**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples,  
initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

*Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and  
milk products, meat and meat products, and fish and fishery products*

Xuất bản lần 1

**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 –**

**Phần 4: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các sản phẩm khác với sữa  
và sản phẩm sữa, thịt và sản phẩm thịt, thuỷ sản và sản phẩm thuỷ sản**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples,  
initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination –*

*Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and  
milk products, meat and meat products, and fish and fishery products*

**CẢNH BÁO – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các chất liệu, thiết bị và các  
thao tác nguy hiểm. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích  
hợp và xác định khả năng áp dụng các giới hạn qui định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.**

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị các mẫu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật của các sản phẩm thực phẩm ngoài các sản phẩm qui định trong các phần khác của TCVN 6507 (ISO 6887). TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) đưa ra các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo để kiểm tra vi sinh vật.

Tiêu chuẩn này chỉ mô tả các phương pháp chuẩn bị mà có thể áp dụng đồng thời cho một số loại vi sinh vật. Tiêu chuẩn này không bao gồm việc chuẩn bị mẫu chỉ để phát hiện và/hoặc định lượng một vi sinh vật đơn lẻ trong khi phương pháp chuẩn bị này đã được mô tả trong tiêu chuẩn liên quan đến loại vi sinh vật đó.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các sản phẩm sau đây:

- trường hợp chung đối với sản phẩm giàu axit (xem 8.2);
- thực phẩm có hàm lượng chất béo cao, ngoại trừ magarin và bơ phết (xem 8.3);
- bột mì, ngũ cốc nguyên hạt, sản phẩm phụ của ngũ cốc, thức ăn chăn nuôi và thức ăn chăn nuôi dạng bánh (xem 9.1);
- sản phẩm rất rắn, ví dụ: tinh bột sắn (xem 9.2);
- gelatin (xem 9.3);
- magarin và bơ phết (xem 9.4);
- các sản phẩm đã khử nước và các sản phẩm đông lạnh khô (ngoại trừ các sản phẩm sữa và các sản phẩm trứng) (xem 9.5);
- trứng và sản phẩm trứng (xem 9.6);
- sản phẩm đã lên men (sản phẩm chứa các vi sinh vật sống) (xem 9.7);
- bột nhão và bánh (xem 9.8).

CHÚ THÍCH 1: Sữa và sản phẩm sữa, xem TCVN 6263 (ISO 8261).

## 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm ban hành thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

TCVN 6507-1 : 2005 (ISO 6887-1 : 1999), 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 – Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân.

TCVN 6507-2 : 2005 (ISO 6887-2 : 2003), 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 – Phần 2: Các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị thịt và sản phẩm thịt.

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

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

#### 3.1

##### **mẫu phòng thử nghiệm** (laboratory sample)

mẫu đã được chuẩn bị để gửi đến phòng thử nghiệm và được dùng để kiểm tra hoặc thử nghiệm.

[ISO 7002]

#### 3.2

##### **phần mẫu thử** (test portion)

mẫu đại diện đã được định lượng (theo thể tích hoặc khối lượng) lấy từ mẫu phòng thử nghiệm dùng để chuẩn bị huyền phù ban đầu.

#### 3.3

##### **huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng ban đầu)** [initial suspension (primary dilution)]

huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương thu được sau khi cân hoặc đong một lượng sản phẩm cần kiểm tra (hoặc mẫu được lấy từ sản phẩm) đã được trộn, thông thường, với một lượng dịch pha loãng lớn gấp chín lần để cho các hạt to lắng xuống, nếu có.

#### 3.4

##### **dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo** (further decimal dilutions)

các huyền phù hoặc các dung dịch thu được bằng cách trộn một thể tích xác định của huyền phù ban đầu (3.3) với thể tích dịch pha loãng lớn gấp chín lần và bằng cách lặp lại các thao tác này với các độ pha loãng tiếp theo cho đến khi thu được các dãy dung dịch pha loãng thập phân thích hợp để cấy trong môi trường.

### 4 Nguyên tắc

Chuẩn bị huyền phù ban đầu (3.3) sao cho thu được sự phân bố các vi sinh vật trong mẫu thử càng đồng đều càng tốt.

Chuẩn bị huyền phù tăng sinh sơ bộ hoặc huyền phù tăng sinh, theo cách tương tự sử dụng môi trường được khuyến cáo bởi phương pháp phân tích có liên quan, trừ các trường hợp cụ thể liên quan đến tính chất sản phẩm trong tiêu chuẩn này.

Nếu cần, chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân (3.4) sao cho giảm bớt số lượng vi sinh vật có trong một đơn vị thể tích, để sau khi ủ có thể quan sát được có hay không có sự phát triển của chúng (trong trường hợp môi trường lỏng) hoặc các khuẩn lạc (trong trường hợp của đĩa thạch hoặc ống thạch), như qui định trong từng tiêu chuẩn riêng.

Để giới hạn phạm vi định lượng đến khoảng đã định, hoặc nếu dự đoán được số lượng vi sinh vật cao, thì có thể cấy chỉ các dung dịch pha loãng cần thiết (ít nhất hai độ pha loãng liên tiếp) để thu được số đếm theo công thức tính trong TCVN 6404 (ISO 7218).

## 5 Dịch pha loãng

### 5.1 Nguyên liệu cơ bản

Xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

### 5.2 Dịch pha loãng thường dùng

#### 5.2.1 Dung dịch muối pepton

Xem 5.2.1 của TCVN 6507-1 : 2005 (ISO 6887-1 : 1999).

#### 5.2.2 Dung dịch đệm pepton

Xem 5.2.2 của TCVN 6507-1 : 2005 (ISO 6887-1 : 1999).

### 5.3 Dịch pha loãng dùng cho các mục đích đặc biệt

#### 5.3.1 Dung dịch muối pepton với Bromocresol tía

##### 5.3.1.1 Thành phần

Dung dịch muối pepton (xem 5.2.1)	1 000 ml
Bromocresol tía (dung dịch cồn 0,04 %, ví dụ như rượu etanol)	0,1 ml

##### 5.3.1.2 Chuẩn bị

Cho 0,1 ml Bromocresol tía vào 1 000 ml dung dịch muối pepton (5.2.1).

##### 5.3.1.3 Sử dụng

Dung dịch này có thể được dùng trong phân tích một số sản phẩm giàu axit nhất định sao cho việc điều chỉnh pH có thể được thực hiện mà không cần sử dụng que thử pH và lúp (xem 3.2).

Bromocresol tía có màu vàng ở pH axit, chuyển sang màu tía khi pH trên 6,8.

### 5.3.2 Dung dịch đệm phosphat

#### 5.3.2.1 Thành phần

Dinatri hydro phosphat ngậm 12 phân tử nước ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9,0 g
Kali dihydro phosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 g
Nước	1 000 ml

#### 5.3.2.2 Chuẩn bị

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

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

Cho vào mỗi bình 180 ml.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở  $121^\circ\text{C}$ .

#### 5.3.2.3 Sử dụng

Dung dịch đệm phosphat này được dùng làm dịch pha loãng cho gelatin (xem 9.3) và các mẫu khác.

### 5.4 Phân phôi và khử trùng dịch pha loãng

Xem 5.4 của TCVN 6507-1 : 2005 (ISO 6887-1 : 1999).

## 6 Thiết bị và dụng cụ

Sử dụng các thiết bị thí nghiệm vi sinh thông thường [xem TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 6507-1 (ISO 6887-1)] và cụ thể là:

#### 6.1 Bộ đồng hóa

##### 6.1.1 Bộ đồng hóa quay (bộ trộn).

Xem TCVN 6404 (ISO 7218). Nếu sử dụng mẫu thử lớn thì nên dùng cốc vô trùng 1 lít.

##### 6.1.2 Bộ trộn kiểu nhu động

6.2 Máy nghiên loại dụng cụ gia đình, vô trùng.

6.3 Búa

6.4 Nồi cách thuỷ, có thể duy trì được ở nhiệt độ  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , hoặc  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , hoặc từ  $37^{\circ}\text{C}$  đến  $42^{\circ}\text{C}$ .

6.5 Kéo, dao, dao mổ và kẹp vô trùng.

6.6 Dao trộn, thìa hoặc xẻng vô trùng.

6.7 Dụng cụ để lấy lõi (que thăm bằng kim loại) vô trùng, để lấy mẫu sâu bên trong.

6.8 Que khuấy, có thể chuyển động qua lại.

6.9 Bình cầu cổ rộng, vô trùng, dung tích 500 ml.

## 7 Chuẩn bị mẫu

### 7.1 Sản phẩm đông lạnh

Sản phẩm được bảo quản đông lạnh cần đưa về trạng thái phù hợp để lấy mẫu; nghĩa là bảo quản ở  $18^{\circ}\text{C}$  đến  $27^{\circ}\text{C}$  (nhiệt độ phòng thử nghiệm) tối đa là 3 h, hoặc ở  $2^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  tối đa là 24 h. Sau đó các mẫu được thử nghiệm càng sớm càng tốt. Xem 9.3 của TCVN 6507-1 : 2005 (ISO 6887-1 : 1999).

Nếu khi lấy mẫu, sản phẩm vẫn còn đông lạnh thì có thể sử dụng một ít dịch pha loãng ở nhiệt độ phòng thử nghiệm để làm tan băng.

Bột cần được trộn kỹ ngay trong vật chứa trước khi lấy mẫu.

### 7.2 Sản phẩm cứng và sản phẩm khô

Đối với các sản phẩm cứng hoặc sản phẩm khô thì không đồng hoá trong bộ đồng hoá quay (6.1.1) quá 2,5 phút một lần.

Đối với các sản phẩm cứng và khô hoặc không đồng nhất, có thể cần phải xay hoặc nghiên mẫu phòng thử nghiệm. Trong trường hợp này, tránh để nhiệt độ tăng quá, không xay hoặc nghiên quá 1 phút.

### 7.3 Sản phẩm dạng lỏng và sản phẩm không sánh đặc

Trước khi phân tích, mẫu thử cần được lấy sau khi lắc bằng tay [ví dụ, lắc 25 lần theo hình cung 25 cm, chi tiết xem TCVN 6263 (ISO 8261) hoặc bằng dụng cụ cơ học để đảm bảo rằng các vi sinh vật đã phân tán đều].

## **7.4 Sản phẩm không đồng nhất**

Đối với các sản phẩm không đồng nhất (chứa nhiều phần của các thực phẩm khác nhau), thì việc lấy mẫu cần được thực hiện bằng cách lấy các ước số của từng thành phần đại diện cho các phần trong sản phẩm ban đầu.

Cũng có thể đồng hoá toàn bộ mẫu phòng thử nghiệm để lấy được mẫu thử đồng nhất.

Có thể cần phải xay hoặc nghiền mẫu phòng thử nghiệm. Trong trường hợp này, để tránh nhiệt độ tăng quá, không xay hoặc nghiền quá 1 phút.

## **8 Cách tiến hành**

### **8.1 Yêu cầu chung**

Tất cả các việc chuẩn bị và các thao tác bằng tay cần được thực hiện sử dụng kỹ thuật vô trùng tốt và dùng dụng cụ vô trùng để tránh nhiễm bẩn vi sinh vật cho mẫu từ các nguồn bên ngoài. Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Nêu rõ qui trình đã sử dụng để phân tích trong báo cáo thử nghiệm nếu khác với qui trình mô tả trong tiêu chuẩn này.

### **8.2 Trường hợp chung đối với các sản phẩm giàu axit**

Điều quan trọng khi sử dụng huyền phù của các sản phẩm giàu axit là phải đảm bảo pH được đưa về trung tính. Việc sử dụng dịch pha loãng với chất chỉ thị pH bổ sung (5.3.1) có thể tránh được việc sử dụng que thử pH vô trùng: thêm natri hydroxit (NaOH) để trả lại màu của huyền phù cho đến khi chất chỉ thị bắt đầu đổi màu.

Về sử dụng các dịch pha loãng đậm, việc bổ sung NaOH thường cần thiết để tăng khả năng đậm của thành phần kiểm. Nồng độ NaOH được bổ sung phụ thuộc vào độ axit của sản phẩm. Nồng độ thích hợp nhất (ví dụ, 0,1 mol/l hoặc 1 mol/l) là nồng độ gần với tỷ lệ 1 với 9 dịch pha loãng.

### **8.3 Thực phẩm có hàm lượng chất béo cao ngoại trừ magarin và bơ phết (ví dụ tổng khối lượng chất béo trên 20 %)**

Việc sử dụng dịch pha loãng với sorbitan monooleat đã được bổ sung từ 1 g/l đến 10 g/l (Tween 80) ước chừng theo hàm lượng chất béo (ví dụ, ở hàm lượng chất béo 40 % thì bổ sung 4 g/l) có thể làm tăng nhũ hoá trong quá trình huyền phù hoá.

## 9 Cách tiến hành cụ thể

### 9.1 Bột mì, hạt ngũ cốc, sản phẩm phụ từ ngũ cốc, thức ăn chăn nuôi và thức ăn chăn nuôi dạng bánh

#### 9.1.1 Yêu cầu chung

Theo các phương án lấy mẫu dựa vào cỡ của từng mẻ sản phẩm.

#### 9.1.2 Chuẩn bị huyền phù ban đầu

Lắc kỹ bột đựng trong hộp bằng tay trước khi cân mẫu thử.

Cho 1 phần mẫu thử vào 9 phần dung dịch muối pepton (5.2.1) và trộn.

Trước khi đồng hóa, để yên từ 20 phút đến 30 phút ở 18 °C đến 27 °C (nhiệt độ phòng thử nghiệm).

Nếu độ sánh của huyền phù tăng đến mức quá đặc hoặc quá sánh, khó trộn được kỹ hoặc khó lấy được bằng pipet thì thêm tiếp một thể tích dung dịch muối pepton bằng như thế để tạo được huyền phù ban đầu 1 trong 20.

Trộn bằng bộ trộn kiểu nhu động (6.1.2) trong 1 phút hoặc bằng bộ trộn quay (6.1.1) tuỳ vào sản phẩm.

Trong phần tính toán, cần tính đến bất kỳ dung dịch bổ sung nào đã thực hiện:

Nên dùng phần mẫu thử 50 g khi phân tích ngũ cốc và các sản phẩm không đồng nhất khác. Trong trường hợp này, huyền phù ban đầu phải là huyền phù 1 trong 5. Đồng hóa và tạo dung dịch 1 trong 2.

**CHÚ THÍCH** – Các vật liệu cứng (ví dụ: các hạt và bột xương) sẽ đâm thủng túi trong bộ đồng hóa kiểu nhu động; để tránh được điều này nên dùng túi kép.

### 9.2 Sản phẩm rất rắn (ví dụ: tinh bột sắn)

#### 9.2.1 Chuẩn bị mẫu thử

Lấy một lượng mẫu thử lớn hơn so với yêu cầu để phân tích và bằng kỹ thuật vô trùng, dùng máy nghiên (6.2) để nghiên mẫu thành từng miếng nhỏ hoặc dùng búa (6.3) để đập thành những miếng nhỏ, đựng phần mẫu thử trong túi vô trùng bằng chất dẻo.

#### 9.2.2 Chuẩn bị huyền phù ban đầu

Cho 1 phần mẫu thử vào 9 phần dung dịch muối pepton (5.2.1) và trộn.

Trước khi đồng hoá, để yên 20 phút đến 30 phút ở  $18^{\circ}\text{C}$  đến  $27^{\circ}\text{C}$  (nhiệt độ phòng thử nghiệm).

Trộn trong bộ trộn quay (6.1.1).

### **9.3 Gelatin (dạng hạt hoặc dạng lá mỏng)**

#### **9.3.1 Chuẩn bị mẫu thử**

Bằng kỹ thuật vô trùng lấy 20 g mẫu thử.

#### **9.3.2 Chuẩn bị huyền phù ban đầu**

Chuyển mẫu thử sang bình cầu vô trùng dung tích 500 ml (6.9). Thêm 180 ml dịch pha loãng đậm phosphat (5.3.2) và trộn để làm tan các hạt trong chất lỏng.

Để cho gelatin hấp thụ dịch pha loãng trong 60 phút ở nhiệt độ phòng.

Đặt bình cầu vào nồi cách thuỷ (6.4) để ở  $45^{\circ}\text{C}$  tối đa 30 phút và thường xuyên lắc để hòa tan gelatin và có được dung dịch 1 + 9.

### **9.4 Magarin và bơ phết**

#### **9.4.1 Lấy mẫu**

##### **9.4.1.1 Yêu cầu chung**

Mẫu được lấy từ bên trong khối sản phẩm hoặc từ bên trong và/hoặc trên bề mặt của gói nhỏ để bán lẻ.

##### **9.4.1.2 Khối sản phẩm hoặc sản phẩm bao gói sẵn có khối lượng lớn hơn 1 kg**

Bằng kỹ thuật vô trùng, sử dụng dao tròn (6.6) hoặc dao (6.5) để loại bỏ một lớp dày từ 3 mm đến 5 mm và khỏi lớp ngoài.

Đẩy que thăm cấy lõi bằng kim loại vô trùng (6.7) vào sản phẩm theo đường chéo mà không chạm đến cuối. Xoay que thăm hết một vòng rồi lấy ra mẫu thử hình nón.

Chuyển mẫu sang vật chứa hoặc túi bằng chất dẻo vô trùng, dùng dao tròn (6.6) hoặc dao (6.5), tách lấy phần phía trên dày 25 mm để đập lỗ tạo ra bởi que thăm (6.7).

Lấy một hoặc nhiều mẫu lõi để có đủ lượng mẫu để thử nghiệm.

Bất kỳ phương pháp lấy mẫu nào khác (như lấy ra một lượng ít nhất 500 g) đều cho phép miễn là sản phẩm không bị biến chất. Nếu sau đó được gọi vào bác cáo thử nghiệm

#### 9.4.1.3 Sản phẩm magarin bao gói sẵn có khối lượng nhỏ hơn hoặc bằng 1 kg

Mẫu sử dụng trong phòng thử nghiệm được tạo ra từ một hoặc nhiều gói sản phẩm nguyên vẹn.

Lấy mẫu bằng các kỹ thuật vô trùng. Nếu mẫu phòng thử nghiệm là khối sản phẩm có khối lượng lớn hơn 500 g thì mẫu thử phải được lấy sau khi loại bỏ lớp vỏ dày 5 mm.

#### 9.4.1.4 Sản phẩm bao gói sẵn

Mở bao bì của các sản phẩm bao gói sẵn. Dùng dụng cụ vô trùng lấy mẫu, sau khi đã loại bỏ lớp vỏ ngoài. Cũng có thể lấy mẫu bằng que thăm mẫu để lấy một phần hình trụ xuyên suốt mẫu.

Nếu có yêu cầu, mẫu cũng có thể lấy từ bề mặt sản phẩm bằng dụng cụ vô trùng.

### 9.4.2 Chuẩn bị mẫu thử

#### 9.4.2.1 Yêu cầu chung

Từ mẫu phòng thử nghiệm cân 40 g cho vào một bình cầu đã tiệt trùng.

#### 9.4.2.2 Chuẩn bị pha lỏng (dung dịch ban đầu)

Cho vào vật chứa vô trùng một thể tích dịch pha loãng (5.2) tương đương với tỷ lệ chất béo mong đợi của mẫu magarin hoặc bơ phết.

VÍ DỤ – Đối với magarin có hàm lượng chất béo 82 %, thì cứ 40 g mẫu thử thêm  $40 \times 0,82 = 33$  ml dịch pha loãng.

Đặt vật chứa vào nồi cách thuỷ (6.4) để ở 45 °C cho đến khi sản phẩm tan chảy hoàn toàn. Thời gian này không quá 20 phút.

Dùng máy lắc có que khuấy (6.8) để trộn cho đến khi thu được dung dịch nhũ tương đồng nhất. Thời gian trộn có thể từ 2 phút đến 5 phút tùy thuộc vào loại magarin/bơ phết.

Để vật đựng mẫu ở nhiệt độ môi trường sao cho tách rõ lớp chất béo (phía trên) và pha chất lỏng (phía dưới).

Thực hiện các thao tác tiếp theo trên lớp chất lỏng; 1 ml dung dịch này tương đương với 1 g magarin. Đây là mẫu được dùng để chuẩn bị huyền phù ban đầu theo TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

#### 9.4.2.3 Chuẩn bị huyền phù tăng sinh hoặc tăng sinh sơ bộ

Nếu phương pháp yêu cầu phải tăng sinh hoặc làm tăng sinh sơ bộ, thì mẫu có thể là một phần magarin trộn ven.

## 9.5 Sản phẩm khô

### 9.5.1 Yêu cầu chung

Các sản phẩm sau đây được coi là các sản phẩm khô:

- các sản phẩm thịt khô và rau khô; bột xúp khô và hỗn hợp khô chiết từ thịt;
- đồ uống dạng bột: chè, ca cao, sản phẩm sôcôla, cà phê, sản phẩm ép quả khô (dạng bột);
- xenlulô nguyên liệu, xenlulô có thể hòa tan, dextrin, sorbitol, đường, glucoza, glutamat;
- rau thơm, gia vị, hương liệu và phẩm màu;
- chất làm keo hoá polyxaccarit, gôm, v.v...;
- dừa, cao men, bánh kẹo sôcôla (thỏi hoặc kẹo), trứng khô nguyên quả và lòng trắng trứng khô.

Không bao gồm các sản phẩm sau đây:

- các sản phẩm từ sữa;
- các sản phẩm từ trứng;
- các vi sinh vật sống (ví dụ như men để làm bánh).

### 9.5.2 Thiết bị, dụng cụ

Nên dùng các túi đóng hoá nhu động có ống lọc để tạo thuận lợi cho việc dùng pipet hút sản phẩm có chất không hòa tan đáng kể trong dung dịch huyền phù.

### 9.5.3 Chuẩn bị mẫu thử

Sản phẩm dạng bột cần được lắc trộn kỹ trong vật chứa, bằng phương pháp vô trùng cân trực tiếp. Các sản phẩm khác có thể cần phải dùng dụng cụ vô trùng để làm nhỏ hoặc cắt thành miếng nhỏ trước khi sử dụng.

### 9.5.4 Chuẩn bị huyền phù ban đầu

#### 9.5.4.1 Các sản phẩm dạng bột có thể tan hoàn toàn

Lại sản phẩm này có thể tan hoàn toàn nên không phải lúc nào cũng cần phải đóng hoá bằng

#### 9.5.4.2 Các sản phẩm khác (không phải dạng bột)

Chuẩn bị huyền phù sử dụng bộ trộn quay (6.1.1) hoặc bộ trộn kiểu nhu động (6.1.2) như trên.

#### 9.5.4.3 Sản phẩm trương nở trong nước

Đối với tất cả các sản phẩm trương nở trong nước (ví dụ như polysaccrit và chất làm keo hoá gôm, cây mùi tây khô hoặc lá thơm khô), tạo các dung dịch pha loãng tiếp theo bằng dịch pha loãng (1 trong 20, 1 trong 50 hoặc 1 trong 100) để thu được huyền phù thích hợp.

Khi có các dung dịch pha loãng hơn thì phải tăng số lượng đĩa cấy để phân phối 0,1 g mẫu thử khi số đếm được ước đoán thấp.

Độ hoà tan của một số chất có thể được trợ giúp bằng cách thêm một dung dịch enzym cụ thể vào dung dịch đậm pepton (5.2.2) (ví dụ: gamanase được dùng cho sản phẩm từ carob và guar, hoặc xenlulase được dùng cho xenluloza cacboxymetyl).

#### 9.5.4.4 Dung dịch pha loãng bổ sung cho nguyên liệu thực phẩm ức chế

Đối với các loại phụ gia thực phẩm nhất định có chứa các chất ức chế (ví dụ: bột hành, tỏi, oregano, hạt tiêu và một số loại chè nhất định và cà phê), để giảm hoạt tính kháng vi khuẩn:

- sử dụng các dung dịch pha loãng hơn (ví dụ: 1/100 đối với quế và oregano, và 1/1 000 đối với đinh hương) hoặc
- bổ sung  $K_2SO_3$  vào dung dịch đậm pepton (5.2.2) để đạt được nồng độ cuối cùng là 0,5 %.

#### 9.5.4.5 Sôcôla và kẹo sôcôla (thanh hoặc kẹo)

Làm nóng trước dịch pha loãng đến  $40^{\circ}C$ .

Cho mẫu thử đã cân vào dịch pha loãng. Lắc bằng tay để trộn đều.

Đặt hỗn hợp ở nhiệt độ phòng 20 phút đến 30 phút để hoá lỏng. Trộn trong bộ đồng hoá nhu động (6.1.2).

#### 9.5.5 Khôi phục

Nhin chung, để yên mẫu khoảng 30 phút  $\pm$  5 phút ở nhiệt độ phòng thử nghiệm. Không để quá  $25^{\circ}C$  trước khi chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo. Các trường hợp riêng cần được xem xét đặc biệt.

### 9.6 Sản phẩm từ trứng

### **9.6.1.1 Yêu cầu chung**

Trứng được dùng để phân tích vi sinh vật không được có bất kỳ vết nứt nào có thể nhìn thấy được. Các quả trứng có thể được kiểm tra từng quả hoặc theo các mẻ tuỳ theo mục đích phân tích.

Việc kiểm tra có thể được tiến hành khi đã làm sạch/khử trùng hoặc không làm sạch/khử trùng vỏ trứng. Để kiểm tra các hàm lượng bên trong, thì khử trùng bên ngoài quả trứng trước khi bóc vỏ. Để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh cũng có thể không cần phải khử trùng vỏ tuỳ theo thỏa thuận giữa các bên.

### **9.6.1.2 Khử trùng vỏ**

Loại bỏ các thứ bẩn hoặc phân bằng khăn và nước rồi thấm khô.

Mang găng tay vô trùng, dùng vải xô mỏng lau sạch toàn bộ bề mặt vỏ quả sau khi được ngâm trong cồn metylat công nghiệp 70 % hoặc isopropanol.

Cũng có thể dùng dung dịch iốt, nhưng phải chú ý để bảo vệ người thực hiện.

Để khô hoàn toàn, tránh nhiễm bẩn.

## **9.6.2 Phát hiện hoặc đếm hệ vi sinh vật trên vỏ**

### **9.6.2.1 Yêu cầu chung**

Phải luôn sử dụng các kỹ thuật vô trùng để xử lý trứng.

### **9.6.2.2 Phương pháp tráng rửa vỏ**

Dùng các thể tích nhỏ đã biết của dịch pha loãng hoặc môi trường qui định trong phương pháp để tráng rửa quả trứng vài lần, xoay tròn, không làm vỡ trứng.

Dung dịch rửa này cho vào vật chứa được làm huyển phù ban đầu.

Quả trứng nguyên vẹn cũng có thể được đặt vào túi đồng hoá nhu động có chứa một thể tích biết trước của dịch pha loãng hoặc môi trường cấy. Sau đó, tráng rửa trứng trong dịch pha loãng đựng trong túi rồi lấy trứng ra.

### **9.6.2.3 Phương pháp chà xát**

Dùng vải xô mỏng vô trùng hoặc vải/giấy đã ngâm trong dung dịch pha loãng hoặc môi trường cấy, xoa lên khắp quả trứng.

#### 9.6.2.4 Phương pháp ngâm

Đập vỡ quả trứng.

Lấy vỏ và cho vào túi đồng hoá có chứa sẵn một thể tích dịch pha loãng hoặc môi trường cấy.

Bóp nhỏ vỏ trứng đựng trong túi và sử dụng huyền phù thu được.

#### 9.6.3 Phát hiện hoặc đếm hệ vi sinh vật bên trong

Mang găng tay vô trùng mới, đập vỡ quả trứng và lấy lòng trứng một cách vô trùng.

Nếu cần phân tích riêng lòng trắng và lòng đỏ thì tách riêng chúng và cho vào các vật chứa vô trùng khác nhau.

Bổ sung dung dịch muối pepton (5.2.1) để có được dung dịch 1 + 9 đối với lòng đỏ trứng và 1 trong 40 đối với lòng trắng trứng để làm loãng chất gây ức chế lizozim xuất hiện tự nhiên.

Nếu việc phát hiện vi sinh vật được tiến hành trên toàn bộ lòng quả trứng thì cho cả lòng đỏ và lòng trắng trực tiếp vào vật chứa vô trùng có chứa 180 ml dung dịch đệm pepton (5.2.2) hoặc vào môi trường tăng sinh thích hợp.

#### 9.6.4 Toàn bộ lòng quả trứng, lòng trắng trứng và lòng đỏ trứng

Có thể cần hoặc không cần thanh trùng.

Đối với toàn bộ lòng quả trứng, pha loãng 1 + 9 dung dịch đệm pepton (5.2.2).

Đối với lòng trắng trứng, nên dùng huyền phù 1 trong 40 dung dịch đệm pepton (5.2.2) để khắc phục sự ức chế của lizozim xuất hiện tự nhiên.

#### 9.6.5 Lòng trứng khô và lòng trắng trứng khô

Xử lý giống như đối với các sản phẩm khô trong 9.5.

#### 9.6.6 Đếm toàn bộ hệ vi sinh vật (trên vỏ + trong lòng đỏ + trong lòng trắng)

Bằng kỹ thuật vò trùng, đập vỡ quả trứng và cho vỏ với lòng trứng vào vật chứa vô trùng.

Lắc kỹ vật chứa bằng tay để đồng hóa mẫu.

## **9.7 Sản phẩm lên men (các sản phẩm chứa các vi sinh vật sống)**

### **9.7.1 Yêu cầu chung**

Điều này không bao gồm các sản phẩm sinh học.

Mục đích là để kiểm tra các sản phẩm về sự nhiễm bẩn vi sinh vật khác ngoài các vi sinh vật được dùng để lên men.

### **9.7.2 Dịch pha loãng**

Dùng dung dịch muối pepton với Bromocresol tía (5.3.1).

Khi huyền phù cho thấy có sự đổi màu của chất chỉ thị thì thêm 40 g/l natri hydroxit để đưa pH về gần trung tính (ví dụ: pH bằng  $7,0 \pm 0,2$  ở  $25^{\circ}\text{C}$ )

Trong trường hợp đối với nấm men, thì chất kháng nấm phải bổ sung (ví dụ như cycloheximit ở nồng độ 50 mg/kg, hoặc nystatin nồng độ 50 mg/kg, hoặc amphotericin nồng độ 10 mg/kg) vào môi trường đếm.

Đối với các trường hợp khác, nên bổ sung chất kháng sinh để kháng lại hệ vi sinh vật chứa trong sản phẩm cần phân tích. Chất kháng sinh này và nồng độ của nó phải được đề cập đến trong báo cáo kết quả.

## **9.8 Bột nhão và bánh**

### **9.8.1 Yêu cầu chung**

Bột nhão và bánh thường là sản phẩm ngọt và được làm từ bột mì, bơ, trứng và các thành phần khác như các sản phẩm từ sữa hoặc các sản phẩm từ quả.

### **9.8.2 Chuẩn bị mẫu thử**

Đối với các thực phẩm chế biến bao gói sẵn, mở bao bì theo 9.2 của TCVN 6507-2 : 2005 (ISO 6887-2 : 2003).

Lấy các ước số của từng thành phần, có tính đến tỷ lệ của chúng.

Có thể đồng hóa toàn bộ mẫu phòng thử nghiệm để có được mẫu thử đồng nhất.

Nên xử lý bánh qui theo cách tương tự như các sản phẩm khô (9.5).

## **10 Các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo**

### **Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] ISO 7002. Agricultural food products – Layout for a standard method of sampling from a lot
  - [2] TCVN 6263 (ISO 8261) Sữa và các sản phẩm sữa. Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh
-