

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 10091:2013**

**EN 1104:2005**

Xuất bản lần 1

**GIẤY VÀ CÁC TÔNG TIẾP XÚC VỚI THỰC PHẨM –  
XÁC ĐỊNH SỰ TRUYỀN NHIỄM CÁC CHẤT KHÁNG KHUẨN**

*Paper and board intended to come into contact with foodstuffs –  
Determination of the transfer of antimicrobial constituents*

HÀ NỘI – 2013

**Lời nói đầu**

TCVN 10091:2013 hoàn toàn tương đương với EN 1104:2005.

TCVN 10091:2013 do Ban kỹ thuật Tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC6 *Giấy và sản phẩm giấy* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Giấy và các tông tiếp xúc với thực phẩm – Xác định sự truyền nhiễm các chất kháng khuẩn

*Paper and board intended to come into contact with foodstuffs –*

*Determination of the transfer of antimicrobial constituents*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định sự truyền nhiễm các chất kháng khuẩn từ các vật liệu giấy và các tông và các chi tiết tiếp xúc với thực phẩm.

### 2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 3649 (ISO 186), *Giấy và các tông – Lấy mẫu để xác định chất lượng trung bình.*

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng thuật ngữ và định nghĩa sau

#### 3.1

##### Vùng ức chế (inhibition zone)

Vùng được tạo ra xung quanh mẫu thử, khi mẫu thử được đặt trong môi trường dinh dưỡng đã được cấy sinh vật thử nghiệm chọn lọc trước, mà giải phóng ra các chất kháng khuẩn có khả năng hòa tan trong nước.

### 4 Nguyên tắc

Trộn môi trường dinh dưỡng đã được chuẩn bị với chất cấy thích hợp và đổ vào các đĩa Petri. Mẫu thử được đặt trong môi trường dinh dưỡng bán cứng này và sau đó được ủ. Sau khi quá trình ủ kết thúc, sự xuất hiện vùng ức chế sẽ là dấu hiệu của sự giải phóng các chất kháng khuẩn.

Phép thử được tiến hành với vi khuẩn *Bacillus subtilis* và nấm mốc *Aspergillus niger*.

## **TCVN 10091:2013**

CHÚ THÍCH Kết quả dựa trên quan sát bằng mắt thường.

### **5 Thiết bị, dụng cụ**

#### **5.1 Khuôn rập bằng sắt**

d = 10 mm đến 15 mm có thể tiệt trùng được.

#### **5.2 Dụng cụ ép**

Loại phù hợp để ép mẫu thử được đặt trên đĩa thạch (ví dụ, Drygalski spatula).

#### **5.3 Dụng cụ đo diện tích**

Để xác định đường kính của vùng ức chế.

CHÚ THÍCH Việc đo đường kính của vùng ức chế không phải là bắt buộc.

#### **5.4 Các dụng cụ thí nghiệm vi sinh thông thường.**

### **6 Thuộc thử**

#### **6.1 Nước**

Nước mới cất hoặc nước được tinh lọc bằng phương pháp trao đổi ion và đun sôi (nước khử ion).

#### **6.2 Chất làm ẩm không ion**

Ví dụ như polyoxyethylenesorbitane monooleate.

#### **6.3 Môi trường dinh dưỡng dùng cho *Bacillus subtilis***

Công thức đặc trưng của môi trường dinh dưỡng này là:

– Chất chiết thịt bò:	3,0 g
– Tryptone (peptone của casein):	5,0 g
– Natri clorua, tinh khiết:	5,0 g
– Agar-agar	12,0 g
– Nước	1000,0 ml

CHÚ THÍCH Bổ sung 10 mg/l  $MnSO_4$  vào môi trường dinh dưỡng cho *Bacillus subtilis* (6.7.1) sẽ hỗ trợ sự hình thành các bào tử.

Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng này như sau:

Hòa tan các thành phần nói trên hoặc môi trường dinh dưỡng được chuẩn bị sẵn, có thành phần tương tự vào nước bằng cách đun sôi.

Môi trường dinh dưỡng được chuẩn bị sẵn này có pH ( $7,2 \pm 0,2$ ) ở nhiệt độ 45 °C.

Điều chỉnh pH môi trường dinh dưỡng đến ( $7,2 \pm 0,2$ ) như yêu cầu bằng dung dịch NaOH có nồng độ xấp xỉ 0,01 M hoặc HCl có nồng độ xấp xỉ 0,01 M.

Chia môi trường dinh dưỡng thành hai phần.

Pha chế từng phần 300,0 ml vào trong các bình chứa môi trường dinh dưỡng hoặc các bình dung tích 600,0 ml, ví dụ như bình Roux và đậy các bình bằng nút, ví dụ nút Kapsenberg.

Sử dụng phần còn lại để chuẩn bị các môi trường chủng làm việc vào trong các ống nghiệm.

Pha chế các phần 10,0 ml vào trong 15 đến 20 ống nghiệm và đậy kín lại bằng nút, ví dụ nút bằng xenlulo.

Tiệt trùng các bình và các ống nghiệm trong 15 min ở nhiệt độ ( $121 \pm 1$ ) °C. Sau khi tiệt trùng, ngay lập tức đặt các ống nghiệm ở vị trí sao cho môi trường dinh dưỡng khi đông lại có bề mặt nghiêng.

Bảo quản các bình và ống nghiệm ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C trong thời gian không quá 14 ngày.

Làm nguội các bình chứa môi trường dinh dưỡng đến nhiệt độ xấp xỉ 45 °C để chuẩn bị huyền phù cấy cho vi khuẩn *Bacillus subtilis* (6.7) hoặc để cho đông lại.

Làm nguội các bình đến khi đông lại.

#### 6.4 Môi trường dinh dưỡng nấm mốc Sabouraud cải biến dùng cho *Aspergillus niger*

Công thức đặc trưng của môi trường dinh dưỡng nấm mốc Sabouraud cải biến là :

– tryptone (peptone của casein)	5,0 g
– Peptone (peptone của thịt)	5,0 g
– D (+) glucose $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	10,0 g
– maltose $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	10,0 g
– agar – agar	từ 10,0 g đến 15,0 g
– nước	1000,0 ml

Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng nấm mốc Sabouraud cải biến như sau:

Hòa tan các thành phần nói trên hoặc môi trường dinh dưỡng chuẩn bị sẵn, có thành phần tương tự vào nước bằng cách đun sôi.

Môi trường dinh dưỡng được chuẩn bị sẵn này có pH ( $5,4 \pm 0,1$ ) ở nhiệt độ 45 °C.

## TCVN 10091:2013

Điều chỉnh pH môi trường dinh dưỡng đến  $(5,4 \pm 0,1)$  như yêu cầu bằng dung dịch NaOH có nồng độ xấp xỉ 0,01 M hoặc HCl có nồng độ xấp xỉ 0,01 M.

Tiếp tục tiến hành pha chế môi trường dinh dưỡng vào các bình môi trường dinh dưỡng hoặc các bình như bình Roux và các ống nghiệm, sau đó tiệt trùng và làm nguội như mô tả trong 6.3.

### 6.5 Môi trường dinh dưỡng cho thử nghiệm ức chế với *Bacillus subtilis*

Thành phần của môi trường dinh dưỡng cho thử nghiệm ức chế với *Bacillus subtilis* như sau:

- Tryptone (peptone của casein): 3,45 g;
- Peptone (peptone của thịt): 3,45 g;
- Natri clorua tinh khiết: 5,1 g;
- agar-agar: 13,0 g;
- Nước: 1000,0 ml

Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng này như sau:

Hòa tan các thành phần nói trên hoặc môi trường dinh dưỡng được chuẩn bị sẵn, có thành phần tương tự vào nước bằng cách đun sôi.

Môi trường dinh dưỡng được chuẩn bị sẵn này có pH  $(6,0 \pm 0,1)$  ở nhiệt độ 45 °C. Điều chỉnh pH môi trường dinh dưỡng đến  $(6,0 \pm 0,1)$  như yêu cầu bằng dung dịch NaOH có nồng độ xấp xỉ 0,01 M hoặc HCl có nồng độ xấp xỉ 0,01 M.

Pha chế các phần vào các bình môi trường dinh dưỡng hoặc các ống nghiệm và đậy nút, ví dụ nút Kapsenberg và tiệt trùng trong 15 min ở  $(121 \pm 1)$  °C.

Làm nguội các bình xuống dưới 60 °C để chuẩn bị môi trường cấy (8.2.2) hoặc để cho đông lại.

### 6.6 Dung dịch muối peptone

Thành phần của dung dịch muối peptone như sau:

- Peptone (peptone của thịt) 1,0 g;
- Natri clorua tinh khiết 8,5 g
- Nước 1000,0 ml.

Chuẩn bị dung dịch muối peptone này như sau:

Hòa tan các thành phần nói trên vào nước có pH từ 6 đến 7. Pha chế các thể tích dung dịch bằng nhau vào ba bình, đậy nút, ví dụ nút Kaspensberg và tiệt trùng trong 15 min ở nhiệt độ  $(121 \pm 1)$  °C.

Dung dịch này phải được sử dụng trong vòng 8 ngày nếu được bảo quản tại nhiệt độ phòng và trong vòng 14 ngày nếu được bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

## 6.7 Các vi sinh vật thử nghiệm

### 6.7.1 Quy định chung

Các vi sinh vật sau được sử dụng:

*Bacillus subtilis* DSM 347 (ATCC 6633) và *Aspergillus niger* DSM 1957 (ATCC 6275) và các chủng tương ứng khác.

Vi các chủng khác nhau có thể có độ nhạy khác nhau, nên phải có sự kiểm tra so sánh khi sử dụng các chủng khác với chủng ATCC 6633 và ATCC 6275 nêu trên.

Các chủng làm việc *Bacillus subtilis* thu được bằng cách cấy vào trong các ống nghiệm (6.3) và ủ 7 ngày ở nhiệt độ 30 °C. Sau quá trình ủ các ống nghiệm được bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

Các chủng làm việc *Aspergillus niger* thu được bằng cách cấy vào trong các ống nghiệm (6.4) và ủ 5 ngày ở nhiệt độ 25 °C. Sau quá trình ủ các ống nghiệm được bảo quản ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

### 6.7.2 Chuẩn bị huyền phù bào tử cấy của *Bacillus subtilis*

Cho các phần khoảng 15,0 ml môi trường dinh dưỡng đã hóa lỏng (6.3) và được làm nguội đến nhiệt độ xấp xỉ 45 °C vào 10 đĩa Petri (d = 90 mm) đã tiệt trùng và để cho đông lại.

Môi trường dinh dưỡng trong các bình (6.3) đã sẵn sàng cho quá trình cấy.

Rửa các khuẩn lạc khỏi mười ống nghiệm có chứa chủng làm việc *Bacillus subtilis* (6.7.1) bằng 2,0 ml đến 3,0 ml dung dịch muối peptone đã tiệt trùng (6.6). Ria cấy dịch rửa đều lên bề mặt của mười đĩa petri (mỗi đĩa được cấy từ một ống nghiệm riêng) hoặc toàn bộ dịch rửa trên bề mặt của bình Roux.

Ủ 7 ngày ở nhiệt độ 30 °C. Rửa các khuẩn lạc khỏi các đĩa petri bằng 3,0 ml dung dịch muối peptone (6.6) và khỏi bình bằng 30,0 ml dung dịch muối peptone (6.6). Cho dung dịch huyền phù này vào một bình đã tiệt trùng bằng phễu đã tiệt trùng và đậy bình bằng nắp đã tiệt trùng.

Làm nóng dung dịch, thỉnh thoảng lắc trên bếp cách thủy ở nhiệt độ 85 °C trong 30 min để làm chết các tế bào sinh dưỡng. Sau khi làm nóng, chuyển huyền phù bào tử này vào các bình ly tâm tiệt trùng, dung tích 40,0 ml và ly tâm trong 10 min tại 10000 g. Loại bỏ phần chất lỏng. Rửa phần cặn còn lại bằng 30,0 ml dung dịch muối peptone (6.6) và ly tâm lại. Rửa lại 3 lần. Tạo huyền phù bào tử trong 20,0 ml dung dịch muối peptone (6.6).

Huyền phù bào tử này có thể bảo quản được không quá 4 tuần ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C.

**CHÚ THÍCH** Huyền phù bào tử này cũng có sẵn ở dạng thương phẩm.

### 6.7.3 Chuẩn bị huyền phù bào tử cấy của *Aspergillus niger*

Cho các phần khoảng 15,0 ml môi trường Sabouraud cải biến đã hóa lỏng (6.4) và được làm nguội đến nhiệt độ xấp xỉ 45 °C vào ít nhất 5 đĩa Petri (d= 90 mm), tiệt trùng và để cho đông lại.

Môi trường dinh dưỡng trong bình (6.4) đã sẵn sàng cho quá trình cấy.

## **TCVN 10091:2013**

Cấy chủng *Aspergillus niger* từ chủng làm việc (6.7.1) bằng một vòng cấy vào đĩa Petri. Mỗi đĩa Petri được cấy từ một ống nghiệm riêng. Bình này được cấy ít nhất từ năm ống nghiệm.

Ủ từ 8 đến 10 ngày ở nhiệt độ 25 °C. Chuyển các bào tử bằng một vòng cấy tròn đã được làm ẩm bằng dung dịch muối peptone (6.6) vào một ống nghiệm đã tiệt trùng có chứa 10,0 ml dung dịch muối peptone (6.6) trộn với 0,01 ml chất làm ẩm không ion (6.2) và đậy kín bằng nút đã tiệt trùng.

Lắc kỹ huyền phù trước khi sử dụng. Huyền phù cấy này có thể bảo quản được không quá 4 tuần ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8°C.

### **6.7.4 Mật độ bào tử cho phép thử ức chế**

Pha loãng huyền phù bào tử sao cho mật độ của bào tử trong môi trường agar là:

- *Bacillus subtilis*: 10<sup>4</sup> bào tử trên một mililit agar thử;
- *Aspergillus niger*: 10<sup>5</sup> bào tử trên một mililit agar thử.

Xác định mật độ bào tử của huyền phù cấy cho *Bacillus subtilis* (6.7.2) bằng phương pháp đếm trên đĩa thông thường trên môi trường dinh dưỡng (6.3). Xác định mật độ bào tử của huyền phù cấy cho *Aspergillus niger* (6.7.3) bằng phương pháp đếm trên đĩa thông thường trên môi trường dinh dưỡng (6.4).

## **6.8 Mẫu đối chứng dương**

### **6.8.1 Penicillin, G 0,03 đơn vị**

Có sẵn dạng thương phẩm

### **6.8.2 Dung dịch isothiazolinon**

Hỗn hợp của 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on và 2-methyl-4-isothiazolin-3-on với nồng độ của chất hoạt động là 2,5 % (pha loãng theo tỷ lệ 1:100).

CHÚ THÍCH Dung dịch này đã có sẵn ở dạng thương phẩm.

## **7 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu thử**

Mẫu được lấy theo TCVN 3649 (ISO 186). Chỉ được cầm vào cạnh của mẫu. Mẫu sau khi lấy phải được cho ngay vào bình đựng đã tiệt trùng hoặc bọc mẫu trong màng nhôm.

Lấy ít nhất là mười mẫu cho một đơn vị sản phẩm. Từ mỗi mẫu đập ít nhất 20 mẫu thử hình tròn bằng khuôn dập đã tiệt trùng (5.1) với mỗi loại vi sinh vật thử nghiệm. Chuyển các mẫu thử ngay vào bình đã tiệt trùng. Phải dùng kẹp hoặc cặp đã tiệt trùng để lấy mẫu thử.



## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Tiệt trùng

Tiệt trùng kẹp hoặc cặp, khuôn dập bằng sắt, các bình ly tâm (được gói trong màng nhôm), các bình tam giác, các ống nghiệm cùng nút xenlulo và các bình trong nồi hấp ở nhiệt độ  $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$  trong 15 min. Tiệt trùng các pipet thủy tinh trong các hộp pipet bằng thiết bị tiệt trùng khí nóng trong 2 h ở nhiệt độ  $(180 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

### 8.2 Chuẩn bị các đĩa phẳng

#### 8.2.1 Quy định chung

Chuẩn bị ít nhất ba đĩa Petri cho mỗi phép thử.

#### 8.2.2 *Bacillus subtilis*

Hóa lỏng môi trường agar thử đã tiệt trùng (6.5). Làm nguội đến nhiệt độ thấp hơn  $60^\circ\text{C}$ . Bổ sung một lượng huyền phù bào tử cấy (6.7.2) sao cho đạt được mật độ  $10^4$  bào tử trên một mililit môi trường agar. Phân bố đều huyền phù bằng cách lắc nhẹ nhàng. Cho đều vào mỗi đĩa Petri ( $d = 90$  mm) đã tiệt trùng một lượng chính xác 15,0 ml môi trường. Sử dụng kẹp đã tiệt trùng trải ba mẫu thử lên môi trường dinh dưỡng vẫn còn bán rắn. Ép nhẹ mẫu thử xuống bằng dụng cụ đã tiệt trùng thích hợp (5.2), bảo đảm không tạo thành lớp đệm khí.

Mặt tiếp xúc với thực phẩm phải được đặt quay xuống dưới. Hoặc phải thử cả hai mặt.

Với mỗi phép phân tích, chuẩn bị một đĩa agar môi trường đối chứng âm (mẫu trắng) không có mẫu thử.

Chuẩn bị một mẫu đối chứng dương. Penicilin G 0,03 đơn vị (6.8.1) được thấm vào một mẫu giấy nhỏ (có sẵn ở dạng thương phẩm).

#### 8.2.3 *Aspergillus niger*

Chuẩn bị các đĩa như mô tả trong 8.2.2, nhưng trong trường hợp này là với môi trường dinh dưỡng Sabouraud cải biến (6.4). Huyền phù này được sử dụng là agar thử và huyền phù cấy cho *Aspergillus niger* (6.7.3). Mật độ của bào tử là  $10^5$  cho mỗi mililit agar thử.

Với mỗi phép phân tích, chuẩn bị một đĩa agar môi trường đối chứng âm (mẫu trắng) không có mẫu thử.

Chuẩn bị một mẫu đối chứng dương. Dung dịch isothiazolinon (hỗn hợp của 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on và 2-methyl-4-isothiazolin-3-on) (6.8.2) với nồng độ của chất hoạt động 2,5 %. Dung dịch này được pha loãng với tỷ lệ 1:100. Từ dung dịch pha loãng này dùng pipet lấy 50  $\mu\text{l}$  cho vào miếng giấy lọc nhỏ ( $d = 1,2$  cm), mà sẽ được sử dụng là mẫu đối chứng.

## **TCVN 10091:2013**

### **8.3 Quá trình ủ**

Các đĩa Petri đã được chuẩn bị theo 8.2.2 và 8.2.3 được bảo quản 2 h trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 4 °C đến 8 °C để tạo thuận lợi cho quá trình khuếch tán sơ bộ.

Ủ các đĩa Petri đã được chuẩn bị theo 8.2.2 và 8.2.3 ở nhiệt độ 30 °C và 25 °C tương ứng.

Đặt các đĩa vào trong tủ lạnh hoặc thiết bị ủ sao với nắp đậy các đĩa Petri ở bên dưới để tránh hơi nước ngưng tụ nhỏ giọt lên mẫu thử.

## **9 Đánh giá**

Đánh giá kết quả thử nghiệm với vi sinh vật và nấm sau 3 ngày và 5 ngày ủ tương ứng. Đồng thời cũng đánh giá mẫu đối chứng dương.

**CHÚ THÍCH 1** Đánh giá sơ bộ các đĩa Petri sau 1 ngày và 2 ngày là cần thiết.

Mẫu thử không có dấu hiệu của diện tích vùng ức chế được cho là không chứa các chất kháng khuẩn hòa tan trong nước. Có dấu hiệu của vùng ức chế là khi không thấy sự phát triển của các vi sinh vật hoặc có dấu hiệu giảm phát triển (nhỏ hơn khoảng 20 %) so với các diện tích xung quanh. Mẫu thử có vùng ức chế (đối chứng dương) cũng sẽ được đánh giá. Đường kính của hình tròn mẫu thử phải được đưa ra.

**CHÚ THÍCH 2** Mẫu thử có sự phát triển mạnh của các vi sinh vật được đánh giá là không có vùng ức chế.

**CHÚ THÍCH 3** Trong trường hợp quan tâm, khuyến cáo phải đo vùng ức chế bên ngoài mẫu thử bằng kính lúp và thước đo, kết quả đo là đường kính của mẫu thử.

**CHÚ THÍCH 4** Nếu mẫu đối chứng âm của môi trường dinh dưỡng agar thể hiện không có sự phát triển của vi sinh vật thì lặp lại phép thử với huyền phù cấy mới. Nếu mẫu đối chứng dương cho thấy có sự phát triển của vi sinh vật thì cũng phải lặp lại phép thử.

## **10 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau:

- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) Ngày và địa điểm thử nghiệm;
- c) Nhận dạng về vật liệu thử nghiệm bao gồm cả đường kính của mẫu thử;
- d) Có sự truyền các chất kháng khuẩn hoặc không có sự truyền các chất kháng khuẩn;
- e) Bất kỳ sai khác nào so với tiêu chuẩn này;
- f) Tất cả các sai khác so với quy định của tiêu chuẩn này mà có thể ảnh hưởng đến kết quả.