

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6263:2007

ISO 8261:2001

Xuất bản lần 2

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – HƯỚNG DẪN CHUNG VỀ
CHUẨN BỊ MẪU THỬ, HUYỀN PHÙ BAN ĐẦU VÀ DUNG
DỊCH PHA LOÃNG THẬP PHẦN ĐỂ KIỂM TRA VI SINH VẬT**

Milk and milk products – General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination

HÀ NỘI – 2007

Lời nói đầu

TCVN 6263:2007 thay thế TCVN 6263:1997;

TCVN 6263:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 8261:2001/IDF 122:2001;

TCVN 6263:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Tiêu chuẩn này phần lớn dựa theo TCVN 6507-1:2005 (ISO 6887-1:1999). Những điều chỉnh cần thiết đối với thực hành phòng thử nghiệm vi sinh trong ngành công nghiệp sữa và các hướng dẫn cụ thể cho các sản phẩm sữa, đặc biệt liên quan đến việc chuẩn bị mẫu đều đã được đề cập đến.

Đối với dung dịch pha loãng hoặc các dung dịch pha loãng cần xác định đôi khi cũng là chủ đề cần thảo luận. Trong tiêu chuẩn này, dung dịch muối/pepton cũng như nước đệm pepton được qui định giống như đã được qui định trong TCVN 6507-1:2005 (ISO 6887-1:1999). Ngoài ra, đối với các phòng thử nghiệm vi sinh của ngành sữa có sáu dung dịch pha loãng được qui định cho các mục đích đặc biệt.

Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật

Milk and milk products – General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các hướng dẫn chung về việc chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật của sữa và sản phẩm sữa, kể cả các loại thực phẩm từ sữa dành cho trẻ sơ sinh.

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 (ISO 6887-1), Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, dung dịch 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 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 Định nghĩa

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

3.1

huyền phù ban đầu (initial suspension)

dung dịch pha loãng ban đầu (primary dilution)

huyền phù, dung dịch hoặc nhũ tương thu được sau khi cân hoặc đong một lượng sản phẩm cần kiểm tra (hoặc của mẫu được lấy từ sản phẩm) được trộn với một lượng chất lỏng (dịch pha loãng) lớn gấp chín lần, nếu cần thì dùng máy trộn và phải tuân thủ các qui định thích hợp, nếu có các hạt to thì để chúng lắng xuống.

CHÚ THÍCH 1 Trong một số trường hợp, đặc biệt đối với các sản phẩm cho huyền phù ban đầu 1+9 rất quánh hoặc quá đặc, phải bổ sung thêm dịch pha loãng. Trong một số trường hợp khác, đối với các kết quả thử liên quan đến các chuẩn mực yêu cầu, có thể cần dung dịch pha loãng ban đầu 1 + 9 đậm đặc hơn. Các yếu tố này cần phải được tính đến trong những thao tác tiếp theo và/hoặc trong biểu thị kết quả.

CHÚ THÍCH 2 Tốt nhất là sử dụng dung dịch pha loãng thứ nhất cho trường hợp ít hơn 10 vi sinh vật trong một gam. Đối với một số phép định lượng cho một số sản phẩm mà thấp hơn ngưỡng này thì nên sử dụng độ pha loãng nhỏ hơn cho huyền phù. Tuy nhiên, việc nuôi cấy huyền phù này có thể dẫn đến tỷ lệ không cân bằng giữa dịch cấy và môi trường.

CHÚ THÍCH 3 Đối với các phòng ngừa thích hợp, xem 8.1.

CHÚ THÍCH 4 Đối với các chi tiết của dịch pha loãng, xem điều 5.

3.2

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

huyền phù, dung dịch hoặc các thể nhũ tương thu được bằng cách trộn một thể tích chính xác của dung dịch pha loãng ban đầu (3.1), với 9 lần thể tích dịch pha loãng và bằng cách lặp lại các thao tác này với mỗi lần pha loãng như vậy cho đến khi thu được các dãy dung dịch pha loãng thập phân thích hợp cho việc cấy trong môi trường nuôi cấy.

CHÚ THÍCH Xem 8.1.

4 Nguyên tắc

Chuẩn bị huyền phù ban đầu (3.1) và chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo (3.2) để giảm bớt số lượng vi sinh vật có trong một đơn vị thể tích để thuận tiện cho việc kiểm tra vi sinh, nếu cần.

5 Dịch pha loãng

5.1 Nguyên liệu chính

Để tăng độ chụm của kết quả, nên sử dụng các thành phần chính khô, hoặc các môi trường hoàn chỉnh khô để chuẩn bị các dịch pha loãng. Cần tuân thủ nghiêm ngặt các hướng dẫn của nhà sản xuất.

Chỉ sử dụng các loại thuốc thử đạt chất lượng phân tích, trừ khi có qui định khác, và nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

Sử dụng các dung dịch natri hydroxit (NaOH) và axit clohydric (HCl) có nồng độ phân tử gam thích hợp để điều chỉnh pH của môi trường để giảm thiểu sự thay đổi thể tích môi trường và thành phần, nghĩa là thể tích môi trường càng thấp thì nồng độ phân tử gam càng cao.

5.2 Dịch pha loãng dùng cho mục đích chung

5.2.1 Dung dịch pepton-muối

5.2.1.1 Thành phần

Pepton từ thủy phân casein	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước	1 000 ml

5.2.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước, bằng cách đun nóng nhẹ trên bếp điện (6.13), nếu cần. Chỉnh pH bằng dung dịch thích hợp (5.1) sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C

5.2.2 Dung dịch Ringer nồng độ một phần tư

5.2.2.1 Thành phần

Natri clorua (NaCl)	2,25 g
Kali clorua (KCl)	0,105 g
Canxi clorua, dạng khan (CaCl_2)	0,06 g
Natri hydrocacbonat (NaHCO_3)	0,05 g
Nước	1 000 ml

5.2.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các muối trong nước. Chỉnh pH bằng dung dịch thích hợp (5.1) sao cho sau khi khử trùng, pH là $6,9 \pm 0,2$ ở 25°C .

5.2.3 Dung dịch pepton

5.2.3.1 Thành phần

Pepton	1,0 g
Nước	1 000 ml

5.2.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan pepton trong nước. Chính pH bằng dung dịch thích hợp (5.1) sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C

5.2.4 Dung dịch đệm phosphat

5.2.4.1 Thành phần

Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	42,5 g
Nước	1 000 ml

5.2.4.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối trong 500 ml nước. Chính pH bằng dung dịch thích hợp (5.1) sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,2 \pm 0,2$ ở 25°C . Pha loãng bằng nước tới 1 000 ml. Bảo quản dung dịch gốc này trong điều kiện lạnh.

Cho 1 ml dung dịch gốc này (ở 20°C) vào 1 000 ml nước để dùng làm dung dịch pha loãng.

5.3 Dịch pha loãng dùng cho mục đích đặc biệt

Các dịch pha loãng này chỉ được sử dụng để chuẩn bị các huyền phù ban đầu.

5.3.1 Môi trường tiên tăng sinh: Nước đệm pepton

5.3.1.1 Thành phần

Pepton từ thủy phân mô động vật	10,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Dinatri hydrophosphat ngậm 12 phân tử nước ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0 g
Kali dihydro phosphat (KH_2PO_4)	1,5 g
Nước	1 000 ml

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trong nước, bằng cách đun nóng nhẹ trên bếp điện (6.13), nếu cần. Chính pH bằng dung dịch thích hợp (5.1) sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C

Dịch pha loãng này được khuyến cáo dùng cho các phép thử để phát hiện *Salmonella* hoặc *Listeria monocytogenes* (xem ISO 5679).

5.3.2 Dung dịch natri xitrat [dùng cho phomat và sữa bột (sấy màng)]

5.3.2.1 Thành phần

Trinatri xitrat ngậm 2 phân tử nước ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	20,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước, bằng cách đun nóng trên bếp điện (6.13) ở khoảng từ 45 °C đến 50 °C. Chỉnh pH bằng dung dịch thích hợp (5.1) sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,5 \pm 0,2$ ở 25 °C.

5.3.3 Dung dịch dikali hydro phosphat (dùng cho phomat, sữa bột (sấy màng), sữa chua, caseinat, whey bột axit và cream lên men).

5.3.3.1 Thành phần

Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	20,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.3.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước, bằng cách đun nóng trên bếp điện (6.13) ở khoảng từ 45 °C đến 50 °C. Đối với whey bột axit, chỉnh pH bằng dung dịch thích hợp (5.1) sao cho sau khi khử trùng pH của dung dịch pha loãng ban đầu là $8,4 \pm 0,2$ ở 25 °C. Còn đối với phomat, sữa bột (sấy màng), sữa chua, caseinat và cream lên men, chỉnh pH bằng dung dịch thích hợp (5.1) sao cho sau khi khử trùng là $7,5 \pm 0,2$ ở 25 °C.

5.3.4 Dung dịch dikali hydro phosphat với chất chống tạo bọt (dùng cho casein axit, casein lactic và casein rennet)

5.3.4.1 Thành phần

Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	20,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.4.2 Thành phần của dung dịch gốc chống tạo bọt

Polyetylen glycol 2000 (BDH)	1 g
Nước	1 000 ml

5.3.4.3 Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước, bằng cách đun nóng ở nhiệt độ từ 45 °C đến 50 °C. Thêm 1 ml dung dịch gốc chống tạo bọt vào 1 lít dung dịch K_2HPO_4 . Chỉnh pH bằng dung dịch thích hợp (5.1) sao cho pH của dung dịch pha loãng ban đầu của casein axit và casein lactic sau khi khử trùng là $8,4 \pm 0,2$ ở 25 °C, còn đối với casein rennet là $7,5 \pm 0,2$ ở 25 °C.

5.3.5 Dung dịch tripolyphosphat (dung dịch thay thế cho casein rennet khi gặp vấn đề về việc hoà tan)**5.3.5.1 Thành phần**

Natri tripolyphosphat ($\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{P}_3$)	20,0 g
Nước	1 000 ml

5.3.5.2 Chuẩn bị

Hoà tan muối trong nước, đun nóng trên bếp điện (6.13), nếu cần. Phân phối dung dịch tripolyphosphat vào các chai với các lượng 90 ml và khử trùng bằng nồi hấp áp lực (6.1) để ở 121 °C trong 20 phút. Môi trường này có thể bảo quản được đến tối đa là 1 tháng ở nhiệt độ từ 0 °C đến + 5 °C.

5.3.6 Dịch pha loãng dùng cho mục đích chung với dung dịch α -amylaza (đối với thực phẩm dành cho trẻ sơ sinh chứa hàm lượng tinh bột cao)

Cho 12,5 mg α -amylaza (EC 3.2.1.1)¹⁾ với hoạt tính riêng khoảng 400 đơn vị²⁾/miligam vào 225 ml dịch pha loãng dùng cho mục đích chung (xem 5.2). Dịch pha loãng này được dùng cho 25 g mẫu thử. Sử dụng các lượng thuốc thử tương tự để chuẩn bị các lượng mẫu thử khác (ví dụ, đối với 10 g mẫu, thì cho 5 mg α -amylaza vào 90 ml dịch pha loãng dùng cho mục đích chung).

5.4 Phân phối, khử trùng và bảo quản dung dịch pha loãng

Phân phối dịch pha loãng (5.2 hoặc 5.3), đã được làm ấm trước đến 45 °C, nếu cần, dùng cho dung dịch pha loãng ban đầu vào các bình hoặc lọ (6.4). Phân phối dịch pha loãng dùng để pha loãng thập phân (5.2) này vào các ống nghiệm (6.5) hoặc các lọ (6.4).

Phân phối sao cho sau khi khử trùng, trong mỗi bình hoặc lọ có chứa 90 ml dịch pha loãng hoặc một lượng yêu cầu khác và mỗi ống nghiệm hoặc lọ phải chứa 9,0 ml dịch pha loãng hoặc lượng yêu cầu khác. Đậy nắp ống nghiệm, bình hoặc lọ. Sai số của phép đo thể tích không được vượt quá $\pm 2\%$.

Khử trùng 15 phút bằng hấp áp lực (6.1) ở 121 °C (đối với các thể tích lớn hơn có thể phải hấp áp lực lâu hơn). Nếu dịch pha loãng không sử dụng ngay, bảo quản ở chỗ tối từ 0 °C đến 5 °C, nhưng không quá 1 tháng dưới các điều kiện không làm thay đổi thể tích hoặc thành phần của chúng.

Nếu cần thiết phải đếm một vài nhóm vi sinh vật, sử dụng các môi trường nuôi cấy khác nhau, cũng có thể cần thiết phải phân phối tất cả các dịch pha loãng (hoặc một số) với các lượng nhiều hơn 9,0ml. Cỡ của các ống nghiệm, bình và lọ (6.4 và 6.5) cũng phải qui định tương ứng.

¹⁾ Số hiệu EC liên quan đến số phân loại enzym do Nomenclature Committee của Hội đồng Sinh hoá Quốc tế về Khuyến cáo Thuật ngữ của Enzym (1978), Academic Press, New York, 1979.

²⁾ Đơn vị này (thường được gọi là đơn vị quốc tế hay còn gọi là đơn vị tiêu chuẩn) được xác định là lượng enzym gây xúc tác để chuyển hoá 1 μmol cơ chất trên phút trong các điều kiện chuẩn.

6 Thiết bị, dụng cụ

CHÚ THÍCH Có thể dùng các dụng cụ sử dụng một lần để thay thế cho các dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần, nếu phù hợp với các yêu cầu qui định. Dụng cụ thủy tinh sử dụng nhiều lần phải có độ bền tốt khi khử trùng lặp lại và phải trơ về mặt hoá học.

Sử dụng các thiết bị của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường [Xem TCVN 6404 (ISO 7218)] và các dụng cụ sau đây:

6.1 Thiết bị để khử trùng khô (tủ sấy) hoặc thiết bị để khử trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

CHÚ THÍCH Nồi hấp có thể dùng riêng rẽ hoặc dùng như một phần của thiết bị cho việc chuẩn bị và phân phối môi trường.

Không khử trùng pipet bằng nồi hấp áp lực vì hơi nước sẽ đọng lại phía trong khi nguội sẽ ảnh hưởng đến độ chính xác của việc phân phối môi trường.

6.2 Thiết bị trộn

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

Cốc hoặc túi bằng chất dẻo phải có đủ dung tích để trộn mẫu với lượng dịch pha loãng thích hợp. Nói chung, thể tích của vật chứa phải gấp đôi thể tích của mẫu thử cộng với dịch pha loãng.

Có thể sử dụng túi bằng chất dẻo có bộ lọc hợp nhất để giữ lại các hạt lớn.

6.3 Máy khuấy trộn cơ học, có khả năng trộn 1 ml hoặc 2 ml mẫu thử trong trường hợp mẫu dạng lỏng, hoặc các dung dịch pha loãng thập phân, với 9 ml hoặc 18 ml dịch pha loãng trong ống nghiệm có kích thước thích hợp, để thu được chất huyền phù đồng nhất và máy hoạt động theo nguyên lý quay lệch tâm chất chứa trong ống nghiệm (Máy trộn Vortex) [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

6.4 Bình hoặc lọ, có đủ dung tích để chứa 90 ml dịch pha loãng dùng để tạo huyền phù ban đầu, hoặc bội số của 90 ml và còn có khoảng trống để trộn.

6.5 Ống nghiệm (bình hoặc lọ nhỏ), có đủ dung tích để chứa 10 ml mẫu thử (hoặc bội số của 10 ml) (với mẫu thử dạng lỏng) hoặc dung dịch pha loãng ban đầu (trong các trường hợp khác) hoặc các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo và còn có khoảng trống phía trên để trộn.

6.6 Pipet, được nhét nút bông ở đầu hoặc được trang bị dụng cụ hút pipet bằng cơ học, dung tích danh định là 1 ml và có lỗ thoát có đường kính từ 1,75 mm đến 3 mm. Chỉ sử dụng các pipet có đầu còn nguyên vẹn, nên dùng loại có vạch chia rõ để phân biệt dung tích.

6.7 Pipet chia độ, được nhét nút bông ở đầu, được trang bị dụng cụ hút pipet bằng cơ học, có dung tích tương đối lớn, ví dụ: 10 ml hoặc 20 ml. Chỉ sử dụng các pipet có typ nguyên vẹn, nên dùng loại có vạch chia rõ để phân biệt dung tích.

6.8 Hạt thủy tinh, có đường kính khoảng 6 mm.

6.9 pH mét, có độ chính xác tới $\pm 0,2$ đơn vị [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

6.10 Cân phân tích, có khoảng cân phù hợp và có độ chính xác nằm trong giới hạn 1 % khối lượng được cân.

6.11 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ và ở $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.12 Dao trộn hoặc đũa thủy tinh.

6.13 Bếp điện, hoặc thiết bị gia nhiệt thích hợp để làm nóng nhẹ (không dùng đầu đốt bằng khí) và có thể thao tác ở nhiệt độ qui định.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình bảo quản và vận chuyển.

Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể nào liên quan đến sản phẩm cần phân tích, thì các bên tự thỏa thuận về vấn đề này.

8 Cách tiến hành

8.1 Khái quát

Trong suốt quá trình thử nghiệm, nhiệt độ của phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân không được vượt quá $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, trừ khi có qui định khác.

Đối với một số nghiên cứu cứu cụ thể (ví dụ, *Salmonella*), thì cần đến các kỹ thuật và phòng ngừa đặc biệt. Trong trường hợp đó, các kỹ thuật đặc biệt là vấn đề được đề cập trong tiêu chuẩn

Các thao tác trong 8.2 và 8.3 không được thực hiện dưới ánh nắng mặt trời.

Luôn phải chú ý để đảm bảo vô trùng.

8.2 Chuẩn bị mẫu thử và huyền phù ban đầu

8.2.1 Khái quát

Một số sản phẩm cần phải xử lý nhiệt hoặc axit hoá. Để thu hồi tối ưu các vi sinh vật bị ức chế trên môi trường chọn lọc, nên sử dụng việc tái hoạt hoá dung dịch pha loãng ban đầu để khôi phục hoàn toàn các vi sinh vật này. Việc tái hoạt hoá này là để dung dịch pha loãng ban đầu ở nhiệt độ môi trường từ 20 °C đến 25 °C trong khoảng 45 phút trước khi pha loãng hoặc cấy tiếp theo.

Để tránh gây hại đến các vi sinh vật do thay đổi nhiệt độ đột ngột, thì nhiệt độ của dịch pha loãng trong suốt quá trình thao tác mô tả dưới đây luôn phải giữ bằng nhiệt độ của mẫu thử, trừ khi có qui định khác.

8.2.2 Sữa và các sản phẩm sữa dạng lỏng

Trộn mẫu thử thật kỹ sao cho các vi sinh vật phân bố càng đều càng tốt bằng cách đảo chiều lọ chứa liên tục 25 lần. Tránh tạo bọt hoặc để bọt tan hết. Khoảng thời gian từ khi trộn đến khi lấy phần mẫu để thử không được quá 3 phút.

Dùng pipet vô trùng (6.6) lấy 1 ml mẫu thử cho vào 9 ml dịch pha loãng (5.2) (hoặc 10 ml mẫu thử cho vào 90 ml dịch pha loãng, hoặc 11 ml mẫu thử cho vào 99 ml dịch pha loãng). Lắc đều dung dịch pha loãng ban đầu này [ví dụ, lắc bằng tay 25 lần với khoảng di động là 300 mm, trong 7 giây hoặc sử dụng máy lắc bằng cơ (6.3) lắc từ 5 giây đến 10 giây] để thu được dung dịch pha loãng 10^{-1} .

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.3.

8.2.3 Sữa bột, whey bột, whey bột axit, buttermilk bột và lactoza

Trộn kỹ lượng chứa trong lọ kín bằng cách lắc và đảo chiều liên tục.

Nếu mẫu thử đựng trong lọ kín còn nguyên, quá đầy, khó lắc trộn thì nên chuyển sang lọ chứa lớn hơn rồi trộn đều. Mở nắp, dùng dao tròn lấy phần mẫu thử yêu cầu và tiến hành theo chỉ dẫn dưới đây. Đậy ngay nắp lọ.

Hâm nóng lọ chứa 90 ml dịch pha loãng trên nồi cách thuỷ (6.11) để ở 45 °C.

Cân 10 g mẫu thử cho vào bình thủy tinh thích hợp (ví dụ như cốc có mỏ) và đổ bột vào lọ có chứa dịch pha loãng thích hợp (5.2). Đối với whey bột axit, sử dụng dịch pha loãng đặc biệt (5.3.3) ở pH $8,4 \pm 0,2$ hoặc đối với sữa bột sấy màng thì sử dụng dịch pha loãng (5.3.2 hoặc 5.3.3) ở pH $7,5 \pm 0,2$, nếu cần.

Cách khác, cân 10 g mẫu thử cho trực tiếp vào lọ chứa dịch pha loãng.

CHÚ THÍCH Để hoà tan tốt hơn, đặc biệt đối với sữa sấy màng nên sử dụng các hạt thủy tinh (6.8). Nếu sử dụng thì phải cho vào lọ trước khi khử trùng.

Để hoà tan mẫu thử, xoay từ từ lọ để làm ướt bột và sau đó lắc lọ 25 lần, với khoảng di động là 300 mm trong khoảng 7 giây. Có thể dùng máy trộn kiểu nhu động (6.2) để thay cho việc lắc.

Đặt lọ mẫu vào nổi cách thủy (6.11) trong 5 phút, thỉnh thoảng lắc.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.3.

8.2.4 Phomat và phomat chế biến

Cân 10 g mẫu thử trong đĩa và chuyển vào cốc đựng của máy trộn quay, hoặc túi đựng của máy trộn kiểu nhu động, hoặc cân trực tiếp 10 g mẫu thử vào vật chứa.

Khi dùng máy trộn quay, hoặc máy trộn kiểu nhu động, cho thêm 90 ml dịch pha loãng (5.3.2 hoặc 5.3.3, pH $7,5 \pm 0,1$) đã được làm ấm trước đến $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Trộn cho đến khi phomat tan đều (từ 1 phút đến 3 phút). Trong trường hợp dùng máy trộn quay, vận hành máy trong một thời gian đủ để tạo được 15 000 đến 20 000 vòng quay. Với máy trộn quay chậm nhất thì thời gian trộn cũng không được vượt quá 2,5 phút.

Tốt nhất là phải đảm bảo nhiệt độ của quá trình trộn không vượt quá $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ và trong mọi trường hợp không để nhiệt độ vượt quá $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Để cho bột tan hết.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.3.

8.2.5 Casein axit, casein lactic, casein rennet và caseinat

8.2.5.1 Trộn kỹ lượng chứa bên trong vật chứa kín bằng cách lắc và đảo chiều vật chứa.

Cân 10 g mẫu thử cho vào túi bằng chất dẻo vô trùng (xem 6.2). Thêm 90 ml dịch pha loãng thích hợp ở nhiệt độ phòng như sau:

- đối với casein axit và casein lactic, thì sử dụng dikali hydro phosphat có chất chống tạo bọt (5.3.4) ở pH $8,4 \pm 0,2$.

- đối với trường hợp caseinat, thì sử dụng dikali hydro phosphat (5.3.3) ở pH $7,5 \pm 0,2$, và
- đối với casein rennet, thì sử dụng dikali hydro phosphat có chất chống tạo bọt (5.3.4) ở pH $7,5 \pm 0,2$.

8.2.5.2 Việc sử dụng dung dịch dikali hydro phosphat làm dịch pha loãng (5.3.4) đối với casein rennet có thể gặp phải một số vấn đề với các hạt casein. Các "hạt" này cản trở việc định lượng PCA+L. Do đó, nên sử dụng qui trình sau đây.

Trộn kỹ và để yên 15 phút ở nhiệt độ phòng. Trộn 2 phút trong bộ trộn kiểu nhu động (6.2) sử dụng hai túi vô trùng đối với các sản phẩm kết hạt, nếu cần. Để yên 5 phút.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, theo 8.3.

8.2.5.3 Cách khác, đối với casein rennet khi gặp phải các vấn đề về các hạt thì sử dụng qui trình sau đây:

Nghiền nhỏ các hạt trước khi lấy phần mẫu thử, nếu cần. Cho khoảng 20 g mẫu thử vào vật chứa thích hợp. Nghiền bằng cách sử dụng thiết bị trộn có gắn các lưỡi dao, có thể xoay được 20 000 vòng/phút, được lắp với thiết bị tránh làm tăng nhiệt trong quá trình nghiền trộn (ví dụ, dụng cụ Virtis).

Cân 5 g mẫu thử đã chuẩn bị như trên cho vào chai vô trùng 250 ml. Cho thêm các hạt thủy tinh để trộn và 95 ml dung dịch kali tripolyphosphat (5.3.5) đã được làm ấm trước đến $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Để chai này lên máy trộn và trộn trong 15 phút. Sau đó để chai này lên nổi cách thủy 15 phút ở nhiệt độ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong khi vẫn trộn.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, theo 8.3.

8.2.6 Bơ

Cân 10 g mẫu thử cho vào bình chứa. Đặt bình chứa lên nổi cách thủy (6.11) ở $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Giữ trong nổi cách thủy cho đến khi tất cả mẫu thử vừa tan chảy hết. Thêm 90 ml dịch pha loãng (5.2) đã được làm ấm đến $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ và trộn. Thao tác này rất dễ dàng khi thực hiện bằng máy trộn kiểu nhu động (6.2).

Cách khác, chỉ sử dụng pha lỏng để pha loãng như sau:

Lấy 50 g mẫu thử [có chứa khoảng 16 % phần thể tích/khối lượng nước (= 8 ml)] và thêm một lượng dịch pha loãng (5.2.4) (50 – 50x % nước trong bơ) (= 42 ml) đã được hâm nóng đến $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ trên nổi cách thủy (6.11). Đặt vật chứa này trên nổi cách thủy (6.11) ở $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ cho đến khi bơ tan hết. Lắc kỹ và để cho tách pha không quá 15 phút. Nếu cần, dùng dao trộn hoặc đũa thủy tinh (6.12) để loại bỏ pha béo.

Để tách pha, chuyển phần đã tan chảy sang ống ly tâm vô trùng (hoặc làm tan trực tiếp phần mẫu thử trong ống này) và li tâm với tần số quay từ 1 000 đến 2 000 vòng trên phút, nếu cần. Loại bỏ pha béo (phía trên) bằng ống nghiệm vô trùng, được nối với một bơm chân không. Dùng pipet hút từ lớp dưới đáy.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.3.

8.2.7 Sản phẩm sữa đông lạnh (bao gồm cả kem, lạnh thực phẩm)

Cân 10 g mẫu thử cho vào bình chứa. Đặt bình chứa lên nồi cách thuỷ (6.11) ở 30 °C. Giữ trong nồi cách thuỷ cho đến khi tất cả mẫu thử vừa tan chảy hết.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.3.

8.2.8 Custard, món tráng miệng và cream

Cân 10 g mẫu thử cho vào một bình (6.4) có chứa hạt thuỷ tinh (6.8). Thêm 90 ml dịch pha loãng (5.2) ở nhiệt độ phòng và lắc cho tan đều.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.3.

8.2.9 Sữa lên men và cream lên men

Cân 10 g mẫu thử cho vào một bình (6.4) có chứa hạt thuỷ tinh (6.8). Thêm 90 ml dịch pha loãng (5.3.3) ở nhiệt độ phòng với pH $7,5 \pm 0,2$ và lắc cho tan đều. Cách khác, có thể sử dụng máy trộn kiểu nhu động (6.2) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Trong trường hợp này không cần phải cho thêm các hạt thuỷ tinh.

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.3.

8.2.10 Sữa bột dành cho trẻ sơ sinh

Trộn kỹ lượng chứa trong lọ kín bằng cách lắc và đảo chiều liên tục. Nếu mẫu thử đựng trong lọ kín còn nguyên, quá đầy khó lắc trộn thì nên chuyển sang lọ chứa lớn hơn rồi trộn đều. Mở nắp, dụng dao trộn (6.12) lấy phần mẫu thử yêu cầu và tiến hành theo chỉ dẫn dưới đây. Đóng ngay nắp lọ.

Hâm nóng lọ chứa 90 ml dịch pha loãng thích hợp trên nồi cách thuỷ (6.11) để ở 45 °C. Cân 10 g mẫu thử cho vào bình thuỷ tinh thích hợp (ví dụ như cốc có mỏ) và rót dần bột vào lọ có chứa dịch pha loãng thích hợp (5.2 hoặc 5.3.5).

Cách khác, cân 10 g mẫu thử cho trực tiếp vào lọ đựng dịch pha loãng được làm ấm trước đến 45 °C.

CHÚ THÍCH Để hoà tan tốt hơn, nên sử dụng các hạt thuỷ tinh (6.8). Nếu sử dụng thì phải cho vào lọ trước khi khử trùng.

Để hoà tan mẫu thử, xoay từ từ lọ để làm ướt bột và sau đó lắc lọ 25 lần, với khoảng di động là 300 mm trong khoảng 7 giây. Có thể dùng máy trộn kiểu nhu động (6.2) để thay cho việc lắc. Cách khác, có thể

sử dụng bộ trộn kiểu nhu động (6.2). Đặt lọ mẫu vào nổi cách thủy (6.11) trong 5 phút, thỉnh thoảng lắc. Chuẩn bị các dung dịch pha loãng tiếp theo, theo 8.3.

Các mẫu có chứa hàm lượng tinh bột cao có thể gặp khó khăn vì có độ sánh của dung dịch pha loãng ban đầu cao.

Sử dụng dịch pha loãng dùng cho mục đích chung với α -amylaza (5.3.6) để giảm bớt độ sánh của dung dịch pha loãng ban đầu hoặc dùng lượng dịch pha loãng lớn gấp đôi. Lấy dung dịch pha loãng tiếp theo này cho các lần kiểm tra tiếp.

8.3 Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Đối với các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

Khi thử kiểm tra sự có mặt hay không có mặt vi sinh vật trong 0,1 ml hoặc 0,1 g mẫu thử, thì không cần thiết phải chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo.

Nếu cần các thể tích lớn hơn, thì dùng pipet vô trùng (6.7) lấy 10 ml huyền phù ban đầu cho vào một lọ chứa 90 ml dịch pha loãng vô trùng (5.2), hoặc lấy 11 ml dung dịch pha loãng ban đầu cho vào 99 ml dịch pha loãng vô trùng (5.2). Trong qui trình thông thường, nếu cần đến dung dịch pha loãng 10^{-3} thì chuyển 1 ml dung dịch pha loãng ban đầu vào 99 ml dịch pha loãng vô trùng.

Khi chuyển dung dịch pha loãng ban đầu sánh như casein axit hoặc casein rennet (8.2.5) thì tráng pipet vài lần bằng dịch pha loãng, sử dụng dịch pha loãng trong ống nghiệm đã dùng cho dung dịch pha loãng thập phân.

CẢNH BÁO – Cần phải thực hiện bước này vì dung dịch pha loãng ban đầu sánh nên có thể không chuyển được lượng chính xác của dung dịch pha loãng ban đầu.

Khi lấy tỷ lệ 10 ml cộng 90 ml, 11 ml cộng 99 ml thì lắc bằng tay theo quy định trong 8.2.2.

8.4 Thời gian tiến hành

Thời gian thực hiện qui trình, xem TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707) Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
 - [2] TCVN 4829 (ISO 6579), Vi sinh vật học. Hướng dẫn chung các phương pháp phát hiện *Salmonella*.
-