

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 6507-1: 2005

ISO 6887-1 : 1999

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 PHẦN 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 PHẦN**

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

Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

Lời giới thiệu

Do tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi nên phương pháp này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho từng sản phẩm cụ thể. Trong trường hợp này, có thể sử dụng các phương pháp khác đặc trưng cho từng sản phẩm, nếu hoàn toàn chỉ vì lý do kỹ thuật. Tuy nhiên, cần cố gắng áp dụng phương pháp này khi có thể.

Khi tiêu chuẩn này được soát xét tiếp thì cần phải tính đến mọi thông tin liên quan đến phạm vi mà phương pháp đếm đĩa này phải tuân theo và các nguyên nhân gây sai lệch so với phương pháp trong trường hợp các sản phẩm cụ thể.

Việc hài hoà các phương pháp thử có thể không thực hiện được ngay và đối với một vài nhóm sản phẩm có thể tồn tại các tiêu chuẩn quốc tế và/hoặc tiêu chuẩn quốc gia mà không phù hợp với tiêu chuẩn này. Trong trường hợp có sẵn tiêu chuẩn quốc tế cho sản phẩm cần thử nghiệm thì phải tuân theo tiêu chuẩn đó. Hy vọng rằng khi các tiêu chuẩn như thế được soát xét, thì chúng phải được sửa đổi để phù hợp với tiêu chuẩn này, sao cho cuối cùng chỉ còn các sai lệch với phương pháp đếm đĩa này là các lý do kỹ thuật được thừa nhận.

Tiêu chuẩn này đưa ra các nguyên tắc chung để chuẩn bị các dung dịch huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật. TCVN 6507-2 (ISO 6887-2) đưa ra các nguyên tắc cụ thể để chuẩn bị mẫu thử và huyền phù ban đầu đã tính đến tính đa dạng của thực phẩm và thức ăn chăn nuôi áp dụng tiêu chuẩn này.

Đối với một số các loại sản phẩm, cần phải đặc biệt chú ý khi chuẩn bị huyền phù ban đầu do trạng thái vật lý của sản phẩm (ví dụ như sản phẩm khô, sản phẩm có độ sánh cao) hoặc sự có mặt của các chất ức chế (như các loại gia vị, cá muối), hoặc độ axit v.v...

**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**

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

Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân trong điều kiện hiếu khí để kiểm tra vi sinh vật trong các sản phẩm dùng cho con người hoặc trong thức ăn chăn nuôi.

Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho các trường hợp chung, trừ các sản phẩm đã đề cập trong TCVN 6507-2 (ISO 6887-2).

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 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

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 với một lượng dịch pha loãng lớn, gấp chín lần để cho các hạt to lắng xuống, nếu có.

CHÚ THÍCH: Xem điều 5 và các chú thích 1 và 2 của 9.1.

3.2

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 (3.1) với dịch pha loãng có thể tích 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 cho việc cấy trong môi trường.

3.3

tiêu chuẩn riêng (specific standard)

là tiêu chuẩn hoặc tài liệu hướng dẫn mô tả việc kiểm tra một sản phẩm cụ thể (hoặc một nhóm sản phẩm) để phát hiện hoặc định lượng một loại vi sinh vật cụ thể (hoặc một nhóm vi sinh vật).

4 Nguyên tắc

Chuẩn bị huyền phù ban đầu (3.1) sao cho thu được sự phân bố vi sinh vật trong phần mẫu thử càng đồng đều càng tốt.

Nếu cần, chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân (3.2) 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 ống hoặc lọ) hoặc định lượng được các khuẩn lạc (trên các đĩa thạch), như trong tiêu chuẩn riêng qui định.

CHÚ THÍCH: Để giới hạn phạm vi định lượng đến khoảng đã định, hoặc nếu dự đoán được số vi sinh vật cao, thì có thể cấy chỉ các dung dịch pha loãng thập phân cần thiết (ít nhất hai độ pha loãng liên tiếp) để thu được số đếm theo công thức tính trong TCVN 6404 (ISO 7213).

5 Dịch pha loãng

5.1 Nguyên liệu cơ bản

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

Các hoá chất sử dụng phải đạt chất lượng phân tích và thích hợp để phân tích vi sinh vật.

Nước sử dụng phải là nước cất hoặc có chất lượng tương đương [xem TCVN 6404 (ISO 7218)].

5.2 Dịch pha loãng thường dùng

5.2.1 Dung dịch muối pepton

5.2.1.1 Thành phần

Pepton từ casein	1,0 g
Natri clorua	8,5 g
Nước	1 000 ml

5.2.1.2 Chuẩn bị

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

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

5.2.2 Dung dịch đệm pepton

5.2.2.1 Thành phần

Pepton từ các mô động vật	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
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 (KH_2PO_4)	1,5 g
Nước	1000 ml

5.2.2.2 Chuẩn bị

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

TCVN 6507-1: 2005

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C , nếu cần.

5.3 Dịch pha loãng dùng cho các mục đích đặc biệt

Xem tiêu chuẩn riêng phù hợp với sản phẩm có liên quan.

CHÚ THÍCH: Các nguyên tắc cụ thể, xem TCVN 6507-2 (ISO 6887-2).

5.4 Phân phối và khử trùng dịch pha loãng

Phân phối dịch pha loãng (5.2 hoặc 5.3) với lượng cần thiết để chuẩn bị các huyền phù ban đầu vào các bình (6.4) có dung tích thích hợp.

Phân phối dịch pha loãng (5.2 hoặc 5.3) với lượng cần thiết để chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân vào các ống nghiệm (6.5) hoặc các bình (6.4) sao cho sau khi khử trùng trong mỗi ống nghiệm hoặc bình chứa 9,0 ml. Sai số phép đo của thể tích cuối cùng này sau khi khử trùng không được vượt quá $\pm 2\%$.

CHÚ THÍCH: Nếu cần phải đếm một vài nhóm vi sinh vật sử dụng các môi trường cấy khác nhau, thì cũng có thể cần phải phân phối tất cả các dịch pha loãng (hoặc một số) với các lượng nhiều hơn 9,0 ml, do đó kích thước các ống nghiệm (6.5) và bình (6.4) cũng phải được qui định tương ứng.

Đậy nắp các ống nghiệm hoặc các bình.

Khử trùng 15 phút trong nồi hấp áp lực ở 121°C .

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

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

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

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Thiết bị trộn

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.3 Máy khuấy cơ

Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.4 Bình hoặc lọ có nắp vặn, có dung tích thích hợp.

6.5 Ống nghiệm, có dung tích thích hợp.

6.6 Pipet chia độ xả hết, có dung tích danh định 1 ml và 10 ml, được chia vạch theo 0,1 ml và 0,5 ml tương ứng.

6.7 pH mét, có thể đọc được đến $\pm 0,01$ đơn vị pH ở 25 °C, có thể đo chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH.

6.8 Cân, có thể cân chính xác đến 0,01 g.

7 Lấy mẫu

Tiến hành lấy mẫu theo tiêu chuẩn riêng tương ứng với sản phẩm. Nếu không có tiêu chuẩn riêng, thì các bên có liên quan tự thỏa thuận về vấn đề này.

8 Chuẩn bị mẫu thử

Việc chuẩn bị mẫu thử theo tiêu chuẩn riêng phù hợp với sản phẩm tương ứng. Nếu không có tiêu chuẩn riêng, thì các bên có liên quan tự thỏa thuận về vấn đề này.

9 Cách tiến hành

9.1 Phần mẫu thử và huyền phù ban đầu (dung dịch pha loãng ban đầu)

Cân một lượng m g với sai số cho phép $\pm 5\%$ hoặc đong một thể tích V ml với sai số cho phép $\pm 5\%$ (tối thiểu là 10 g hoặc 10 ml, trừ khi có qui định khác), của phần mẫu thử đại diện (xem điều 8) cho vào một chén đựng vô trùng hoặc túi bằng chất dẻo vô trùng.

Cho một lượng dịch pha loãng $9 \times m$ g hoặc $9 \times V$ ml. Lượng thêm này có thể được cân hoặc đong với sai số cho phép là $\pm 5\%$.

CHÚ THÍCH 1: Trong một số trường hợp cụ thể, đặc biệt là đối các sản phẩm có huyền phù ban đầu 1 + 9 quá sánh hoặc quá đặc thì có thể cần phải tăng thêm dịch pha loãng. Điều này phải được tính đến đối với các thao tác tiếp theo và/hoặc phải được tính đến trong phần tính kết quả.

CHÚ THÍCH 2: Dung dịch pha loãng ban đầu này quyết định một phần giá trị giới hạn dưới của phép định lượng, điều này cũng phụ thuộc vào kỹ thuật sử dụng (ví dụ, kỹ thuật rót đĩa với 1 ml chất cấy của huyền phù 1/10, có giới hạn này là 10 vi sinh vật trong 1 gam). Nếu cần, trong một số sản phẩm cụ thể để số đếm thấp hơn giới hạn này thì có thể sử dụng một lượng dịch pha loãng nhỏ hơn¹⁾. Cần chú ý rằng việc cấy huyền phù ban đầu này có thể gặp khó khăn do không cân bằng về tỷ lệ chất cấy/môi trường cấy (ức chế sự phát triển vi sinh vật do nồng độ hạt thành phần của thực phẩm tăng).

¹⁾ Ví dụ, nếu cần, các mẫu có thể được phân bố lại trong các chai thử nghiệm.

TCVN 6507-1: 2005

Để vi sinh vật không bị tổn thương 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 xấp xỉ bằng nhiệt độ phòng, trừ trường hợp đối với sản phẩm cụ thể (xem tiêu chuẩn riêng).

Đồng hoá hỗn hợp theo các khuyến cáo trong TCVN 6404 (ISO 7218).

Để các hạt to lắng xuống trong 15 phút, nếu cần. Có thể sử dụng các hệ thống lọc để có kết quả tương đương.

Trong trường hợp định lượng các bào tử, việc xử lý nhiệt huyền phù ban đầu, ví dụ 10 phút ở 80 °C cần được thực hiện ngay sau khi chuẩn bị và làm nguội nhanh.

9.2 Các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Dùng pipet vô trùng lấy 1 ml huyền phù ban đầu với sai số đo $\pm 5\%$ cho vào một ống nghiệm chứa 9 ml dịch pha loãng vô trùng ở nhiệt độ thích hợp.

CHÚ THÍCH: Nếu cần một thể tích lớn hơn, thì có thể thêm một thể tích xác định (lớn hơn 1 ml) huyền phù ban đầu với sai số đo $\pm 5\%$, vào ống nghiệm chứa một thể tích dịch pha loãng vô trùng lớn gấp chín lần.

Để có độ chính xác tối ưu, không nhúng pipet vào huyền phù ban đầu sâu hơn 1 cm.

Không để pipet chứa chất cấy tiếp xúc với dịch pha loãng vô trùng.

Trộn kỹ, tốt nhất là dùng máy khuấy cơ (6.3) để trộn trong 5 giây đến 10 giây để thu được dung dịch pha loãng 10^{-2} .

Nếu cần, lặp lại các thao tác này sử dụng dung dịch pha loãng 10^{-2} và các dung dịch pha loãng tiếp theo, thì dùng một pipet vô trùng mới ở mỗi độ pha loãng để thu được các dung dịch pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} v.v... cho đến khi thu được số lượng vi sinh vật thích hợp (xem điều 4).

9.3 Thời gian tiến hành

Thời gian tính từ lúc chuẩn bị xong huyền phù ban đầu cho đến khi chất cấy tiếp xúc với môi trường không được vượt quá 45 phút và thời gian kể từ khi chuẩn bị huyền phù ban đầu (9.1) đến khi bắt đầu chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo không được vượt quá 30 phút, trừ khi có qui định khác trong tiêu chuẩn riêng.

CHÚ THÍCH: Nếu nhiệt độ phòng của phòng thử nghiệm quá cao thì hai khoảng thời gian này phải giảm đi.