



Original Article

Research on the Production Procedure of *Escherichia coli* and *Salmonella* Reference Material on Pork Matrix Using for Proficiency Testing

Pham Nhu Trong¹, Nguyen Thi Minh Anh², Nguyen Thi Ha^{2,*}

¹National Institute for Food Control, 65 Pham Than Duat, Phu Dien, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Environmental Sciences, VNU University of Science,
334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

Received 08th August 2025

Revised 15th September 2025; Accepted 30th September 2025

Abstract: This study aims to develop the procedures for the production of *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Salmonella* reference material on pork matrix, using for the proficiency testing in food safety assessment. Microorganisms are managed by freezing, deep freezing, and freeze-drying. The freezing method helps microorganisms survive and stabilize for a long time under normal temperature conditions. Freeze-drying is a complicated technique and requires research on possible substrate components and preservatives to ensure solubility, porosity, and high survival rate of the final product as microbiological reference material. Two considered important characteristics of the reference material are homogeneity and stability. The compositions of the input material were identified to create a stable state and a good recovery rate by evaluating the homogeneity and continued stability monitoring. The procedure includes: i) Preparation of microorganisms and material creation; ii) Assessment of physical properties of the material: porosity, uniformity rate, dissolubility; iii) Quantitative testing the homogeneity and the stability of the freeze-drying bacterial reference material; and iv) Application of the produced freeze-drying of *E. coli* and *Salmonella* reference material used in the proficiency testing program. The results show that the standard sample achieves a good physical state and meets the requirements for homogeneity and stability according to ISO 13528:2022.

Keywords: *Escherichia coli*, *Salmonella*, pork, microbiological reference material, freeze- drying, food safety testing, proficiency testing.

* Corresponding author.

E-mail address: nguyenthiha@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuees.5413>

Nghiên cứu quy trình sản xuất mẫu chuẩn *Escherichia coli* và *Salmonella* trên nền thịt lợn sử dụng trong thử nghiệm thành thạo

Phạm Như Trọng¹, Nguyễn Thị Minh Anh², Nguyễn Thị Hà^{2,*}

¹*Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia,
65 Phạm Thận Duật, Phú Diễn, Hà Nội, Việt Nam*

²*Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 08 tháng 8 năm 2025

Chỉnh sửa ngày 15 tháng 9 năm 2025; Chấp nhận đăng ngày 30 tháng 9 năm 2025

Tóm tắt: Nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình sản xuất mẫu chuẩn vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) và *Salmonella* trên nền thịt lợn, phục vụ cho thử nghiệm thành thạo trong đánh giá an toàn thực phẩm. Vi sinh vật được bảo quản bằng lạnh âm, âm sâu và đông khô. Trong đó phương pháp đông khô giúp vi sinh vật tồn tại và ổn định lâu dài ở điều kiện nhiệt độ thường. Tuy nhiên, đông khô là kỹ thuật phức tạp và cần nghiên cứu thành phần giá thể cũng như các chất bảo quản để mẫu đạt độ tan, độ xốp và tỷ lệ sống sót cao theo yêu cầu để tạo mẫu chuẩn vi sinh. Hai đặc tính quan trọng của mẫu chuẩn là độ đồng nhất và độ ổn định. Trong nghiên cứu này đã xác định thành phần để tạo trạng thái vật lý ổn định và tan tốt khi hoàn nguyên, bước đầu đánh giá tính đồng nhất và theo dõi độ ổn định của mẫu theo thời gian. Xây dựng được quy trình sản xuất mẫu chuẩn vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* trên nền thịt lợn với các bước: i) Chuẩn bị chủng và tạo mẫu; ii) Đánh giá tính chất vật lý của mẫu: độ xốp, độ đồng đều, độ tan; và iii) Kiểm tra tính đồng nhất và tính ổn định mẫu chuẩn đông khô vi khuẩn bằng định lượng. Và ứng dụng thành phẩm mẫu chuẩn đông khô vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* sử dụng trong chương trình thử nghiệm thành thạo. Các kết quả cho thấy mẫu chuẩn đạt trạng thái vật lý tốt, và đạt yêu cầu về độ đồng nhất, ổn định theo ISO 13528:2022.

Từ khóa: *Escherichia coli*, *Salmonella*, thịt lợn, mẫu chuẩn vi sinh, đông khô, kiểm nghiệm an toàn thực phẩm thử nghiệm thành thạo.

1. Mở đầu

Trong kiểm nghiệm vi sinh thực phẩm, việc đảm bảo độ chính xác và tin cậy của kết quả phân tích đóng vai trò then chốt. Một trong những yếu tố cốt lõi để đạt được điều này là các phòng thí nghiệm cần thực hiện đầy đủ nội kiểm và ngoại kiểm, trong đó việc sử dụng mẫu kiểm tra chất lượng từ các chủng vi khuẩn chuẩn là rất cần thiết.

Hiện nay, hầu hết các phòng thí nghiệm tại Việt Nam vẫn phải phụ thuộc vào các chủng vi khuẩn chuẩn nhập khẩu với chi phí cao, quy trình lưu trữ phức tạp, và hạn chế về tính ổn định trong thời gian dài. Mặc dù các chủng vi khuẩn như *Escherichia coli* (*E. coli*) và *Salmonella* từ Bộ sưu tập chủng giống chuẩn Hoa Kỳ (ATCC - American Type Culture Collection) vẫn cần được nhập khẩu, việc nghiên cứu và sản xuất mẫu

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: nguyenthaha@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuees.5413>

chuẩn dạng đông khô từ các chủng này trong nước là hướng đi khả thi nhằm tăng tính chủ động, giảm chi phí dài hạn và phù hợp hơn với điều kiện sử dụng thực tế của hệ thống phòng thí nghiệm trong nước.

E. coli và *Salmonella* là hai vi khuẩn tiêu biểu thường được sử dụng trong đánh giá an toàn thực phẩm, đặc biệt trong kiểm soát chất lượng thịt lợn – loại thực phẩm có nguy cơ cao nhiễm vi khuẩn do điều kiện giết mổ, bảo quản và phân phối. Đây là những tác nhân chính gây ra nhiều vụ ngộ độc thực phẩm, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe cộng đồng và uy tín của cơ sở sản xuất [1]. Việc xây dựng mẫu chuẩn từ hai chủng vi khuẩn chuẩn quốc tế, kết hợp với nền mẫu thịt lợn mô phỏng điều kiện thực tế, sẽ giúp đánh giá hiệu quả hơn tính ứng dụng và độ nhạy của các phương pháp phân tích, từ đó phục vụ tốt cho hoạt động thử nghiệm thành thạo và đánh giá liên phòng.

Trong các phương pháp bảo quản vi khuẩn, đông khô được xem là kỹ thuật hiệu quả, cho phép bảo quản chủng trong thời gian dài mà không cần điều kiện lưu trữ phức tạp, đồng thời duy trì tính ổn định và khả năng phục hồi cao [2]. Kỹ thuật này đã được áp dụng rộng rãi bởi các tổ chức lớn như ATCC (Hoa Kỳ) hay NCTC (Anh) [3]. Do đó, nghiên cứu quy trình sản xuất mẫu chuẩn vi sinh dạng đông khô của *E. coli* và *Salmonella* tại Việt Nam, sử dụng nền mẫu phù hợp và quy trình đóng gói hiệu quả, sẽ giúp các phòng thí nghiệm trong nước có thể tiếp cận nguồn mẫu tin cậy với chi phí hợp lý, đồng thời tăng cường năng lực kiểm nghiệm vi sinh thực phẩm nội địa.

Công nghệ đông khô được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực sinh học, giúp bảo quản mẫu ở nhiệt độ thấp mà vẫn đảm bảo tính ổn định, không bị phân hủy và hoạt tính sinh học. Phương pháp này đặc biệt quan trọng trong việc bảo quản vi sinh vật, giúp duy trì cấu trúc tế bào và hạn chế sự biến đổi về đặc tính di truyền. Các phòng thí nghiệm, viện nghiên cứu đều sử dụng công nghệ đông khô để bảo tồn vi sinh vật, đảm bảo chất lượng mẫu trong thời gian dài mà không cần điều kiện bảo quản phức tạp [4, 5].

Thử nghiệm thành thạo là một trong các phương thức nhằm đảm bảo chất lượng kết quả

thử nghiệm. Tham gia thử nghiệm thành thạo sẽ đánh giá và giám sát việc thực hiện phép thử hoặc phép đo cụ thể của các phòng thí nghiệm khi so sánh kết quả thực hiện các phép phân tích trên cùng một mẫu thử hoặc trên các mẫu thử tương tự nhau trong những điều kiện đã xác định. Hiện nay, yêu cầu về việc tham gia thử nghiệm thành thạo được các cơ quan công nhận ISO/IEC 17025:2017 và các cơ quan chỉ định (cơ quan thẩm quyền tại Việt Nam) đặc biệt chú trọng. Nhiều tổ chức công nhận và tất cả các cơ quan chỉ định yêu cầu phòng thử nghiệm phải tham gia thử nghiệm thành thạo và có kết quả đạt trước khi đăng ký xin công nhận [6].

Trong nghiên cứu này đã tiến hành xây dựng quy trình sản xuất mẫu chuẩn *E. coli* và *Salmonella* trên nền mẫu thịt lợn sử dụng trong thử nghiệm thành thạo với việc lựa chọn chủng chuẩn *E. coli* và *Salmonella* được cung cấp từ bộ sưu tập chủng vi sinh vật quốc tế (ATCC) trước khi tiến hành quá trình đông khô để thử nghiệm và lựa chọn các công thức phù hợp cho nền mẫu thịt lợn. Chất lượng mẫu chuẩn sau đông khô được đánh giá trên cơ sở đặc điểm vật lý, khả năng hoàn nguyên và khả năng sống sót của vi khuẩn, tính đồng nhất và ổn định.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Escherichia coli ATCC 25922: là chủng chuẩn quốc tế, đại diện cho nhóm vi khuẩn Gram âm, thường dùng trong kiểm nghiệm vi sinh thực phẩm và đánh giá phương pháp phát hiện.

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis ATCC 13076: là chủng vi khuẩn gây bệnh đường tiêu hóa phổ biến, thường liên quan đến ngộ độc thực phẩm từ nguồn gốc động vật. Hai chủng được lưu giữ trong điều kiện đông khô hoặc ở -80°C trong môi trường bảo quản chuyên dụng tại Phòng Thí nghiệm Khoa Vi sinh và Biến đổi gen, Viện Kiểm nghiệm An toàn Vệ sinh Thực phẩm Quốc gia.

Nền mẫu thịt lợn tươi: thịt lợn nạc được lấy từ phần thịt vai hoặc mông của con lợn (tỉ lệ mỡ <10%) được sử dụng để mô phỏng nền thực

phẩm thực tế có nguy cơ nhiễm vi sinh vật. Tỷ lệ này đảm bảo sự ổn định của mẫu khi trộn với phụ gia và trong quá trình đông khô.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Dụng cụ, hóa chất

Hóa chất: nước pepton, BHI broth, TBX (Merck, Đức), XLD (Merck, Đức), Myo-inositol, Glucose, Lactose, sữa Meiji cho trẻ 1–3 tuổi (bột). Dung dịch ổn định: Myo-Inositol (2 g), Glucose (2 g), Lactose (5 g) và nước (100 ml)

Môi trường TBX: Casein thủy phân bằng enzym (20 g), muối mật số 3 (1,5 g), BCIG (144 μ mol), DMSO (3 ml, để pha dung dịch gốc BCIG, thao tác trong tủ an toàn), thạch (9-18 g tùy thuộc độ cứng), nước cất (1000 ml) và có thể thêm muối xyclohexylamoni (0,075 g).

Môi trường XLD: Chất chiết nấm men (3 g), NaCl (5 g), xylose (3,75 g), lactose (7,5 g), sucrose (7,5 g), L-lyzin HCl (5 g), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (6,8 g), sắt (III) amoni xitrat (0,8 g), phenol đỏ (0,08 g), natri deoxycholat (1 g), thạch (9-18 g), nước cất (1000 ml).

Dụng cụ: Nồi hấp (Hymaraya, Nhật), tủ sấy (Sanyo, Nhật), tủ âm (Memert, Đức), tủ an toàn sinh học cấp 2 (Bio II, Anh), máy đồng nhất mẫu, máy đông khô (ModulyoD 5L - Thermo Fisher Scientific, Mỹ), tủ đông nhiệt độ thấp (MDFU700VX-PB), lọ thủy tinh 10 ml có nắp cao su và nắp nhôm và các dụng cụ cơ bản khác trong phòng thí nghiệm.

2.2.2. Xử lý nền mẫu thịt lợn

Rửa thịt 3 lần bằng nước sạch, chỉ giữ lại phần thịt nạc (tỉ lệ mỡ <10%). Cắt thịt thành miếng, kích thước khoảng 1×1 cm, cho thịt vào nồi hấp khử trùng (autoclave), để nguội thịt về nhiệt độ phòng (25°C). Xay nhuyễn bằng máy xay thực phẩm trong 2 phút ở tốc độ cao, đảm bảo hỗn hợp mịn đồng nhất. Phân chia thịt đã xay vào túi nylon vô trùng (khối lượng 200 g/túi). Đóng kín, bảo quản ngay ở -20°C đến khi sử dụng; thời gian bảo quản tối đa trong 3 tháng.

Kiểm tra mẫu thịt lợn sau khi xử lý: mẫu thịt được mang đi định lượng *E. coli* trên môi trường thạch TBX phương pháp đồ đĩa và *Salmonella* trên môi trường thạch XLD phương pháp trải đĩa

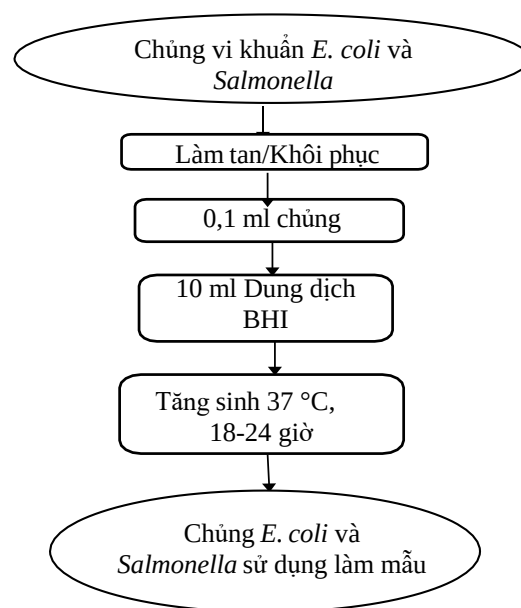
để thử độ nhiễm khuẩn của mẫu thịt lợn, kiểm tra mẫu thịt lợn sau xử lý có đạt yêu cầu. Công thức thử nghiệm nền mẫu thịt lợn được chỉ ra ở Bảng 1. Sau khi chuẩn bị, thực hiện quy trình đông khô và đánh giá độ xốp, mịn, tốc độ hoàn nguyên và ổn định trong quá trình đông khô để lựa chọn công thức nền mẫu tối ưu.

Bảng 1. Công thức thử nghiệm nền mẫu thịt lợn

Mẫu thịt lợn nền	Gelatin 10% (g)	Thịt lợn đã xử lý (g)	Sữa Meiji bột (g)	Dung dịch ổn định (ml)
M1	25	20	5	50
M2	20	10	5	50
M3	10	20	5	50
M4	10	5	5	50
M5	5	5	5	50

2.2.3. Chuẩn bị chủng vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella*

Sơ đồ chuẩn bị chủng vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* được chỉ ra ở Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ các bước chuẩn bị chủng vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella*.

Chủng vi khuẩn chứa trong các ống eppendorf, bảo quản ở -20°C sau đó được làm tan ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Hút 0,1 ml dịch

mỗi chủng *E. coli* vào nuôi cấy riêng trong 10 ml môi trường BHI. Tiếp theo ủ ở 37°C trong 18-24 giờ và thu được chủng có nồng độ tương đương $1-1,5 \times 10^8$ vi khuẩn/ml.

2.2.4. Tạo mẫu chuẩn vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* trên nền mẫu thịt lợn

Quy trình tạo mẫu chuẩn vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* trên nền mẫu thịt lợn được tiến hành theo nghiên cứu [7, 8] như sau: hút 2 ml chủng vi khuẩn *E. coli* và 2 ml chủng vi khuẩn *Salmonella* đã được nuôi cấy vào 100 ml dung dịch ổn định, dung dịch ổn định chứa vi khuẩn (dung dịch A), lắc đều. Lấy 150 μ l dung dịch nền mẫu thịt lợn đã pha vào khuôn (hình trụ và hình bán cầu), thêm 50 μ l dung dịch A vào các ô trong khuôn chứa mẫu. Để các khuôn silicon vào khuôn inox để lạnh âm sâu ở tủ lạnh -80°C trong 24 giờ, sau đó đông khô ở -45°C trong 24 giờ. Sau khi đông khô lấy mẫu từ khuôn cho vào trong lọ thủy tinh đáy hờ nắp cao su tiếp tục đông khô thứ cấp trong 2 giờ. Các lọ mẫu được đem hút chân không, đóng nắp và gắn chặt vòng nắp và bảo quản ở tủ mát 3-5°C. Kiểm tra nồng độ vi sinh đích sau đông khô bằng cách tiến hành phân tích 3 lọ mẫu ngẫu nhiên.

2.2.5. Đánh giá chất lượng mẫu chuẩn

Đánh giá chất lượng mẫu sau đông khô: quan sát tính chất vật lý: độ xốp viên, thời gian hoàn nguyên, màu sắc, độ mịn. Phương pháp thử nghiệm được sử dụng bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc: Phương pháp định lượng *E. coli* bằng phương pháp đổ đĩa (TCVN 7924- 2:2008) [9]. Phương pháp phát hiện, định lượng *Salmonella* bằng phương pháp trải đĩa (TCVN 10780-1:2017) [10]. Tính kết quả theo TCVN 6404:2016 [11].

Kiểm tra độ thuần vi sinh bằng phương pháp nhuộm Gram và quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi.

Đánh giá tính đồng nhất: ngay sau khi đóng lọ, các mẫu sẽ được sắp xếp định vị theo thứ tự tăng dần từ 1 đến 10 lọ được lựa chọn ngẫu nhiên để phân tích lặp cho đánh giá tính đồng nhất và

xử lý theo tiêu chuẩn ISO/IEC 17034 và ISO Guide 35:2017 [12].

Sử dụng phân tích phương sai một chiều để kiểm tra sự khác biệt đáng kể giữa các đơn vị, sử dụng Excel để đánh giá tính đồng nhất. Sự khác biệt giữa các đơn vị không có ý nghĩa thống kê ở mức tin cậy 95%, sử dụng phép kiểm F.

Khi số vi sinh vật nhiều hơn 35-40 CFU trên đĩa trong mỗi phần mẫu thử. Độ đồng nhất được đánh giá như sau: 10 mẫu thử được phân tích lặp và biểu diễn kết quả với đơn vị log, mẫu thử nghiệm thành thạo được coi là đồng nhất nếu sự khác biệt giữa các mẫu không có ý nghĩa thống kê.

Đánh giá độ ổn định với mẫu định tính: đối với các chương trình liên quan đến việc xác định sự có hay không có của một tính chất trong mẫu (vi sinh vật trong mẫu hoặc hóa chất trong mẫu). Nếu một vi sinh vật hoặc hóa chất được cho là có mặt trong một mẫu, mẫu sẽ được xem là ổn định nếu vi sinh vật hoặc hóa chất đó được phát hiện trong tất cả mẫu đem thử kiểm tra độ ổn định. Tương tự, nếu một vi sinh vật hoặc hóa chất được cho là không có mặt, mẫu sẽ được xem là ổn định nếu vi sinh vật hoặc hóa chất đó không phát hiện được trong tất cả các mẫu được thử kiểm tra độ ổn định.

Đánh giá độ ổn định và mẫu định lượng: mẫu được đánh giá bằng kiểm định t (t-test) với mức tin cậy 95%. Nếu kết quả p-value > 0,05. Như vậy sự khác nhau của các kết quả không có ý nghĩa thống kê, kết luận mẫu đạt độ ổn định. Trong trường hợp kết quả p-value < 0,05. Như vậy sự khác nhau của các kết quả có ý nghĩa thống kê. Mẫu không đạt độ ổn định theo phương pháp thống kê thì được sử dụng.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả chuẩn bị nền mẫu thịt lợn

Kết quả đánh giá tính chất vật lý, khả năng đồng nhất, quá trình đông khô và hình thái sản phẩm sau đông khô của 5 nền mẫu cho thấy chỉ có công thức M4 đáp ứng tốt các yêu cầu về hình thái và độ ổn định của mẫu (Bảng 2).

Bảng 2. Đặc điểm vật lý, khả năng đông nhất của các nền mẫu đông khô và hình thái sản phẩm sau đông khô

Mẫu	Đặc tính mẫu	Hiện tượng khi đông khô, hình thái sản phẩm sau đông khô
M1 (Gelatin 25 g, Thịt 20 g, Sữa 5 g)	Mẫu khó hoàn nguyên, sau khi pha chế có hiện tượng đặc quánh, không đồng nhất.	Mẫu xuất hiện bọt khí, bề mặt sản phẩm sù và bám dính lên thành khuôn, gây khó khăn trong thao tác sau đó. Màu sắc sẫm, không đồng đều, tạo cảm quan không đạt. Sản phẩm sau đông khô không bền, dễ vỡ vụn khi thao tác.
M2 (Gelatin 20 g, Thịt 10 g, Sữa 5 g)	Đông quá cứng, đặc biệt là ở đáy khuôn. Khi cắt hoặc thao tác dễ làm gãy vỡ sản phẩm.	Có hiện tượng tách lớp nhẹ, lớp trên bị bọt khí nhiều, lớp dưới dính. Khả năng hoàn nguyên kém, không trở về trạng thái ban đầu khi pha loãng với dung môi.
M3 (Gelatin 10 g, Thịt 25 g, Sữa 5 g)	Tạo được nền đặc, kết cấu đặc vừa phải nhưng hơi khô, khó đông nhất. Hỗn hợp có màu sắc đậm hơn so với các mẫu khác.	Bề mặt sản phẩm xuất hiện một số bọt khí nhỏ, độ mịn kém hơn mẫu M4. Sản phẩm sau đông khô tương đối chắc, khó tách khuôn hơn do hàm lượng protein cao. Khả năng hoàn nguyên ở mức trung bình, cấu trúc sau hoàn nguyên không thật sự đồng nhất, có dấu hiệu tách lớp và độ kết dính kém.
M4 (Gelatin 10 g, Thịt 5 g, Sữa 5 g)	Mẫu đồng nhất, màu sắc nhẹ, ổn định trong quá trình trộn và pha. Khi tiến hành đông khô, sản phẩm có bề mặt mịn, không bọt, không bám khuôn.	Mẫu đông khô tốt, dễ tách ra khỏi khuôn, không bị nứt vỡ hay co rút. Đặc biệt, khả năng hoàn nguyên cao, sản phẩm có thể tái tạo về trạng thái ban đầu khi thêm dung môi ổn định.
M5 (Gelatin 5 g, Thịt 5 g, Sữa 5 g)	Lỏng hơn các công thức khác, thao tác dễ dàng.	Xuất hiện hiện tượng co rút mạnh, cấu trúc sản phẩm kém định hình, bề mặt dễ nứt, dễ rụng vụn khi thao tác. Sau hoàn nguyên, mẫu trở về dạng lỏng nhưng khó kiểm soát nồng độ vi sinh nếu áp dụng.

Từ các quan sát trên, có thể kết luận rằng hàm lượng gelatin và thịt ảnh hưởng trực tiếp đến tính chất vật lý và khả năng đông khô của nền mẫu. Tỷ lệ gelatin cao dẫn đến độ nhớt lớn, dễ tạo bọt và làm sản phẩm không ổn định. Trong khi đó, công thức số 4, với tỷ lệ gelatin và thịt thấp, lại cho kết quả tốt nhất, cả về hình thái, độ ổn định và khả năng hoàn nguyên - là điều kiện lý tưởng cho các bước nghiên cứu vi sinh vật tiếp theo.

3.2. Kết quả pha nền mẫu

Tiến hành pha chế theo công thức M4 đã chọn. Dung dịch nền mẫu có màu đục đồng nhất: Sau khi lắc đều mẫu tạo thành một hỗn dịch lỏng, không có vón cục hay lớp phân tách rõ rệt. Điều này cho thấy việc pha mẫu được thực hiện đúng kỹ thuật, đảm bảo phân bố đồng đều vi sinh vật trong dung dịch. Lớp lắng nhẹ dưới đáy bình:

Sau thời gian ngắn để yên, có sự lắng nhẹ của một phần cặn thịt ở đáy. Đây là hiện tượng bình thường do mô cơ có trọng lượng lớn hơn dung dịch đệm. Tuy nhiên, điều này không ảnh hưởng đến kết quả nếu trước khi lấy mẫu để phân tích, hỗn dịch được lắc lại kỹ.

Bọt khí hay vẩn mờ: Hỗn dịch không xuất hiện bọt khí lớn hoặc lớp vẩn mờ trên bề mặt, cho thấy thao tác lắc nhẹ nhàng, đúng chuẩn, không phá vỡ cấu trúc tế bào hoặc giải phóng lipid gây ảnh hưởng đến môi trường nuôi cấy sau này.

Duy trì điều kiện bảo quản phù hợp: Mẫu sau khi pha được giữ lạnh ở 2-8°C nếu chưa sử dụng ngay, nhằm ổn định vi sinh vật, tránh sự phát triển quá mức hoặc suy giảm số lượng - đặc biệt với các mẫu chứa vi sinh vật hiếu khí tùy tiện.

Theo TCVN 4833-1:2005 và các tài liệu hướng dẫn kỹ thuật phân tích vi sinh vật trong thực phẩm [13-15], việc sơ chế và pha nền mẫu

thịt cần đảm bảo: Mẫu được đồng nhất và giữ nguyên tính đại diện. Mẫu cần được xử lý trong thời gian ngắn, nếu không phải bảo quản lạnh và các thao tác được tiến hành cẩn thận, chính xác. Do vậy, kết quả thử nghiệm khuôn dùng đông khô mẫu chuẩn *E. coli* và *Salmonella* trên nền mẫu thịt lợn đưa ra ở bảng 3 và hoàn toàn phù hợp với tiêu chuẩn trên.

Bảng 3. Kết quả đánh giá khuôn dùng đông khô mẫu chuẩn vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* trên nền mẫu thịt lợn

Loại khuôn	Ưu điểm	Nhược điểm
Nhựa cứng (ống)	Dễ chuẩn bị, giá thành thấp, có nắp đậy	Dễ bám dính thành, khó lấy sản phẩm ra sau đông khô
Silicon	Dễ thao tác, không bám khuôn, dễ lấy mẫu	Mẫu dễ bị biến dạng nhẹ, nếu không định hình tốt từ đầu

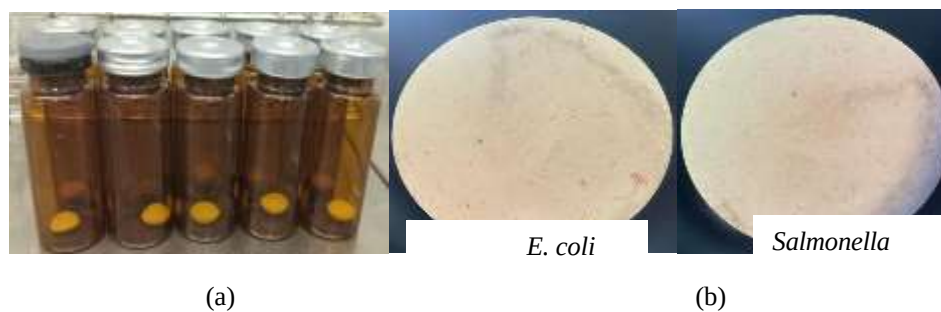
Lựa chọn khuôn silicon để đựng nền mẫu cho quá trình đông khô vì có ưu điểm nổi bật:

Không bám dính, sản phẩm sau đông khô dễ dàng được lấy ra nguyên vẹn; có độ đàn hồi, tái sử dụng nhiều lần mà vẫn đảm bảo vệ sinh; mẫu sau đông khô có hình trụ đồng đều, thẩm mỹ và dễ thao tác hoàn nguyên. Tuy nhiên, cần lưu ý cẩn thận trong bước pha trộn mẫu để tránh tạo bọt và nên để khuôn nằm cố định trên khay phẳng nhằm đảm bảo mẫu không nghiêng hoặc biến dạng khi đông lạnh.

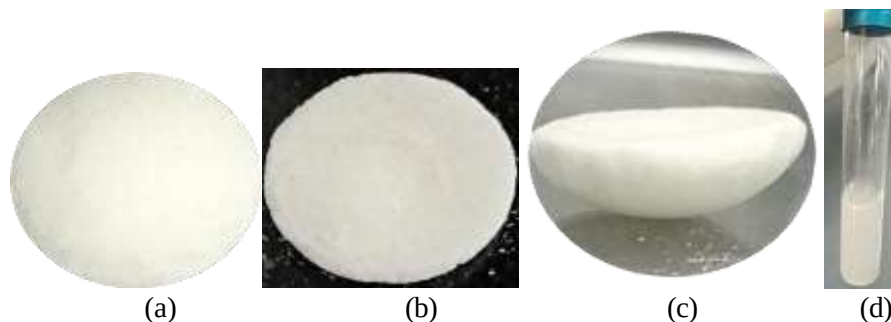
3.3. Kết quả đánh giá chất lượng mẫu sau đông khô

3.3.1. Tính chất vật lý mẫu chuẩn vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella*

Tất cả các mẫu sản phẩm thu được đều đảm bảo yêu cầu về tính chất vật lý: mẫu đóng bánh đều, màu sắc đồng nhất không bị teo, vỡ hay sủi bọt bám lên thành ống, sản phẩm xốp mịn, không vón cục, không bị teo vỡ, tan nhanh khi hoàn nguyên (Hình 2).



Hình 2. Các mẫu chuẩn *E. coli* và *Salmonella* sau khi đông khô (a) và hình thái khuẩn lạc quan sát qua kính hiển vi quang học; (b) với độ phóng đại 4 lần.



Hình 3. Bề mặt viên đông khô và dung dịch hoàn nguyên: bề mặt viên đông khô thành phẩm (a-c) và dung dịch sau khi hoàn nguyên viên đông khô vào dung dịch nước muối (d).

Kết quả nhuộm gram và quan sát hình thái vi khuẩn để kiểm tra độ thuần cho thấy chỉ xuất hiện một loại khuẩn lạc đồng nhất với một loại giống với tính chất đặc trưng của chủng gốc ban đầu, không quan sát thấy tạp nhiễm vi khuẩn khác. Độ thuần nhất của sản phẩm đông khô đạt 100% (Hình 3). Kết quả này cũng phù hợp với mô tả của Bergey's Manual (2015) [16].

3.3.2. Kết quả kiểm tra vi sinh sau đông khô

Sau khi kết thúc quá trình đông khô để kiểm tra khả năng sống sót của vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella*. Lựa chọn ngẫu nhiên 3 lọ kiểm tra nồng độ.

Mẫu được tiến hành kiểm tra bằng phương pháp đồ đĩa thạch TBX, sau 24 giờ, ủ ở 44°C (*E. coli*) và trải trên đĩa XLD, sau 24 giờ, ủ ở 37°C (*Salmonella*). Kết quả định lượng *E. coli* cho

thấy hình dạng khuẩn lạc: tròn, lồi, rìa của khuẩn lạc mịn, liên tục, không có khía hoặc tua, có màu xanh lam - xanh lục. Bề mặt khuẩn lạc: nhẵn, bóng. Đối với *Salmonella*, hình dạng khuẩn lạc: khuẩn lạc tròn, lồi, rìa của khuẩn lạc mịn, liên tục, không có khía hoặc tua, màu đỏ với trung tâm đen, xung quanh xuất hiện quầng hồng do phản ứng sinh hóa; bề mặt khuẩn lạc: nhẵn, bóng. Cả *E. coli* và *Salmonella* đều mọc khuẩn lạc đều, tỉ lệ sống sót sau đông khô là ổn định.

3.3.3. Đánh giá tính đồng nhất mẫu chuẩn *E. coli* và *Salmonella* trên nền mẫu thịt lợn

Kết quả đánh giá 10 lọ mẫu ngẫu nhiên trong lô 80 mẫu tạo lập, 2 lần lặp cho thấy với *E. Coli* (Bảng 4) và *Salmonella* (Bảng 6).

Bảng 4. Đánh giá độ đồng nhất mẫu vi khuẩn *E. coli*

Số TT mẫu (mã mẫu)	Kết quả (CFU/ml)		Kết quả Log		Log10 (Trung bình)
	Lần 1	Lần 2	Log (Lần 1)	Log (Lần 2)	
11	180	200	2,255	2,301	2,279
22	200	160	2,301	2,204	2,255
19	170	200	2,230	2,301	2,267
76	200	170	2,301	2,230	2,267
61	170	210	2,230	2,322	2,279
70	210	190	2,322	2,279	2,301
6	220	180	2,342	2,255	2,301
50	210	220	2,322	2,342	2,332
45	190	190	2,279	2,279	2,279
60	180	180	2,255	2,255	2,255

Bảng 5. Đánh giá độ đồng nhất mẫu vi khuẩn *Salmonella*

Số TT mẫu (mã mẫu)	Kết quả (CFU/ml)		Kết quả Log		Log10 (Trung bình)
	Lần 1	Lần 2	Log (Lần 1)	Log (Lần 2)	
58	2300	2300	3,362	3,369	3,365
16	2400	2500	3,380	3,398	3,389
29	2600	2500	3,415	3,398	3,407
65	2700	2400	3,431	3,373	3,403
25	2500	2400	3,400	3,380	3,390
64	2500	2400	3,398	3,380	3,389
40	2400	2300	3,382	3,362	3,372
45	2300	2300	3,362	3,369	3,365
21	2400	2500	3,380	3,398	3,389
3	2300	2500	3,362	3,398	3,380

Từ kết quả bảng 4, 5, sử dụng phần mềm Excel để phân tích ANOVA một chiều xác định được giá trị P-value 0,77808 và 0,20336 tương

ứng cho *E. coli* và *Salmonella*, các giá trị đều > 0,05 do vậy sự khác biệt là không đáng kể ở độ tin cậy 95% (Bảng 6).

Bảng 6. Kết quả phân tích phương sai đánh giá độ đồng nhất của vi khuẩn *E. Coli* và *Salmonella*

Nguồn biến	Vi khuẩn	SS	df	MS	F	p-value	F crit
Giữa các nhóm	<i>E. coli</i>	0,0106	9	0,001177633	0,592324822	0,778081	3,02038
	<i>Salmonella</i>	113820	9	0,000502335	1,727153072	0,20336	3,02038
Trong nhóm	<i>E. coli</i>	0,0199	10	0,001988154			
	<i>Salmonella</i>	111500	10	0,000290845			
Tổng	<i>E. coli</i>	0,0305	19				
	<i>Salmonella</i>	225320	19				

Các kết quả đưa ra ở bảng 4-6 cho thấy các mẫu của cả 2 chủng đều đạt yêu cầu về độ đồng nhất.

3.3.4. Đánh giá độ ổn định mẫu chuẩn *E. coli* và *Salmonella* trên nền mẫu thịt lợn

Kiểm tra độ ổn định bằng cách lựa chọn 05 mẫu ngẫu nhiên cho mỗi chủng, tiến hành phân tích

bằng cách sử dụng hàm sample(mau.con.lai,5) trong phần mềm R. Kết quả thu được ở bảng 7 cho thấy độ ổn định của các mẫu đạt rất cao, xấp xỉ 100% phù hợp với tiêu chuẩn về độ ổn định theo ISO 13528:2022. Kết quả thu được là tương đồng với các nghiên cứu trước đây về sản xuất một số chủng vi khuẩn dạng đông khô trong kiểm tra chất lượng xét nghiệm vi sinh [17-19].

Bảng 7. Đánh giá độ ổn định mẫu *E. coli* và *Salmonella*

Chủng vi khuẩn	Mã số mẫu	Kết quả CFU/ml		Kết quả Log		Log10 (Trung bình)	X-Y	0,3σ _{pt}
		Lần 1	Lần 2	Log (Lần 1)	Log (Lần 2)			
<i>E. coli</i>	66	170	200	2,230	2,301	2,230	0,004	0,075
	36	200	170	2,301	2,230	2,301		
	78	170	210	2,230	2,322	2,230		
	17	210	190	2,322	2,279	2,322		
	34	220	180	2,342	2,255	2,342		
	Trung bình			2,285	2,278	2,285		
	ustab = δstab =			0,0027				
<i>Salmonella</i>	68	2700	2400	3,431	3,373	3,403	0,001	0,075
	18	2500	2400	3,400	3,380	3,390		
	34	2500	2400	3,398	3,380	3,389		
	75	2400	2300	3,382	3,362	3,372		
	30	2300	2300	3,362	3,369	3,365		
	Trung bình			3,395	3,373	3,384		
	ustab = δstab =			0,0008				

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình tạo mẫu chuẩn *E. coli* và *Salmonella* trên nền mẫu thịt lợn với công thức: 10 g Gelatin, 5 g Thịt lợn, 5 g Sữa bột, 50 ml dung dịch ổn định. Dung dịch chủng gồm 100 ml dung dịch ổn định và 2 ml chủng *E. coli* hoặc 2 ml chủng

Salmonella. Nồng độ vi khuẩn mẫu sau đông khô từ $10^2 - 10^3$ CFU/lọ. Kết quả đánh giá về mẫu đông khô trong nghiên cứu cho thấy 100% sản phẩm đóng bánh đều, đẹp, trắng ngà, không bị teo vữa hay sủi bọt bám lên thành ống, sản phẩm xốp mịn, không vón cục và hòa tan trong 5 phút sau khi hoàn nguyên. Kết quả thu được hoàn toàn phù hợp với tiêu chuẩn quốc gia TCVN

9298:2014. Độ đồng nhất cao cho thấy quy trình sản xuất ổn định, chất lượng giữa các mẫu là tương đương. Đặc biệt đánh giá độ đồng nhất đối với mẫu ngoại kiểm theo yêu cầu bắt buộc được quy định trong ISO 13528:2022 với 10 lọ cho mỗi chủng cho thấy độ đồng nhất của sản phẩm là đạt yêu cầu. Kết quả kiểm tra độ đồng nhất các chủng vi khuẩn sau đông khô trong nghiên cứu hoàn toàn giống với kết quả kiểm tra đặc tính chủng trước đông khô phù hợp với tiêu chuẩn trong ISO 13528:2022. Thực hiện kiểm tra độ ổn định cho mẫu vi khuẩn *E. coli* và *Salmonella* sau đông khô cũng cho thấy 100% mẫu kiểm tra phù hợp với tiêu chuẩn về độ ổn định theo ISO 13528:2022.

Tài liệu tham khảo

- [1] L. M. Duc, H. T. Dung, P. H. S. Hung, N. T. Thuy, P. T. Hang, L. T. Hoan, N. V. Chao, Assessment of the Microbial Contamination Level in Pork Sold at Several Markets in Hue City, Journal of Science and Agricultural Technology - Hue University of Agriculture and Forestry, Vol. 7, 2023, pp. 3814-3821, <https://doi.org/10.46826/huaf-jasat.v7n3y2023.1070>.
- [2] T. T. Hang, N. N. Khoa, D. T. Ha, D. H. Duc, N. T. M. Diep, T. T. Hang, N. N. Khoa, D. T. Ha, D. H. Duc, N. T. M. Diep. Assessment of the Contamination Status of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in Pork Sold at Major Markets in Quy Nhon City, Binh Dinh Province, DTU Journal of Science and Technology, Vol. 5, No. 42, 2020, pp. 94-98.
- [3] W. M. T. N. Senaratne, J. A. A. S. Jayaweera. Comparison of Microbial Preservation Methods: A Narrative Review, Germs, Vol. 14, No. 4, 2024, pp. 375-386, <https://doi.org/10.18683/germs.2024.1447>.
- [4] C. A. Morgan, N. Herman, P. A. White, G. Vesey, Preservation of Micro-Organisms By Drying; A Review, Journal of Microbiological Methods, ISSN 0167-7012, Vol. 66, No. 2, 2006, pp. 183-193, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>.
- [5] S. Bellali, J. B. Khalil, A. Fontanini, D. Raoult, J. C. Lagier, A New Protectant Medium Preserving Bacterial Viability after Freeze Drying, Microbiol 2020, pp. 236-126454, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126454>.
- [6] International Organization for Standardization, ISO Guide 30:2015 Reference Materials - Selected Terms and Definitions, 2015.
- [7] International Organization for Standardization. GUIDE 80 Guidance for the in-house Preparation of Quality Control Materials (QCMs), 2014.
- [8] International Organization for Standardization, GUIDE 35 Reference Materials - Guidance for Characterization and Assessment of Homogeneity and Stability, 2017.
- [9] TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001) Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for the Enumeration of B-Glucuronidase-Positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count Technique at 44°C Using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide.
- [10] TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017) Microbiology of the Food Chain - Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella spp.*
- [11] TCVN 6404:2016 (ISO 7218:2007 with Amendment 1:2013) Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – General Requirements and Guidance For Microbiological Examinations.
- [12] TCVN ISO 17034:2017 (ISO 17034:2016) General Requirements for the Competence of Reference Material Producers.
- [13] TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013) Microbiology of the Food Chain - Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms - Part 1: Colony Count at 30 Degrees C by the Pour Plate Technique.
- [14] International Organization for Standardization. ISO/IEC 17025 Testing and Calibration Laboratories, 2017.
- [15] International Organization for Standardization. ISO 6579-1:2017 - Microbiology of the Food Chain - Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella spp.* Retrieved from <https://www.iso.org/standard/56712.html>, 2017 (accessed on: July 25th, 2025).
- [16] B. Manual Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2015.
- [17] J. B. C. Sara Bellalia. A New Protectant Medium Preserving Bacterial Viability After Freeze Drying, Microbiological Research. 2019.
- [18] P. V. Hieu, V. T. B. Hong, D. T. N. Dung, D. M. Phuong, N. X. Dat. Study on the Production of Several Lyophilized Bacterial Strains for Quality Control in Microbiological Testing, Journal of Medical Research, Vol. 140, No. 4, 2021.
- [19] L. T. P. Thao, D. T. Oanh, D. H. Cuong, N. T. Hang, N. T. M. Hoa, T. T. Son, V. T. H. Ha, L. T. H. Hao. Production of Certified Reference Material *Escherichia Coli* in Milk- Based Product, Vietnam Journal of Food Control, Vol. 5, No. 4, 2022.