

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13516:2022

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI – PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH LƯỢNG
CÁC CHỦNG NẤM MEN PROBIOTIC**

Animal feeding stuffs – Isolation and enumeration of yeast probiotic strains

HÀ NỘI – 2022

Lời nói đầu

TCVN 13516:2022 được xây dựng trên cơ sở tham khảo EN 15789:2009;

TCVN 13516:2022 do Viện Chăn nuôi biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Thức ăn chăn nuôi – Phân lập và định lượng các chủng nấm men probiotic

Animal feeding stuffs – Isolation and enumeration of yeast probiotic strains

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra các nguyên tắc chung để định lượng các chủng nấm men probiotic trong các mẫu thức ăn chăn nuôi (phụ gia, premix và các sản phẩm thức ăn chăn nuôi) có chứa các nấm men như một thành phần vi sinh vật đơn hoặc trong hỗn hợp của các vi sinh vật khác.

Giới hạn phát hiện đối với các loại mẫu thức ăn chăn nuôi như sau:

- a) Các chất phụ gia chứa khoảng 10^9 CFU/g đến 10^{10} CFU/g (đơn vị hình thành khuẩn lạc);
- b) Các premix chứa 10^8 CFU/g;
- c) Các loại thức ăn chăn nuôi, dạng bột hoặc viên chứa 10^6 CFU/g và bao gồm cả thức ăn hoàn chỉnh và các chất thay thế sữa.

Tiêu chuẩn này không áp dụng cho các thức ăn khoáng được dùng làm thức ăn bổ sung và có chứa từ 40 % hàm lượng tro thô trở lên.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên 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, bổ sung (nếu có).

TCVN 6404 (ISO 7218) *Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật*

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – 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 6952 (ISO 6498) *Thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử.*

TCVN 13516:2022

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Nấm men (yeast)

Vi sinh vật hình thành các khuẩn lạc trên thạch chọn lọc dextrose chloramphenicol (oxytetracyclin) chất chiết nấm men chọn lọc theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này.

4 Nguyên tắc

- a) Chuẩn bị các đĩa petri khô vô trùng và thạch vô trùng được làm tan chảy ở $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ để đổ đĩa;
- b) Lấy mẫu đại diện trong các điều kiện vô trùng;
- c) Chuẩn bị huyền phù ban đầu để có được sự phân bố đồng đều các tế bào nấm men trong phần mẫu thử;
- d) Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo của huyền phù ban đầu để giảm số lượng vi sinh vật có trong đơn vị thể tích, để sau khi ủ có thể đếm được các khuẩn lạc;
- e) Cấy lên các đĩa đã chuẩn bị một lượng thích hợp của dung dịch pha loãng thập phân tối ưu, rót thạch đã chuẩn bị vào đĩa hoặc và dùng que dàn mẫu vô trùng để láng đều dịch cấy;
- f) Lật ngược các đĩa thạch đã cấy mẫu nuôi 3 ngày ở nhiệt độ $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ hoặc 2 ngày ở $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ đối với các đĩa rót;
- g) Đếm các khuẩn lạc điển hình, các đặc tính điển hình của nấm men như trong 5.3;
- h) Sử dụng kính hiển vi để kiểm tra hình thái của các nấm men đã phân lập;
- i) Tính đơn vị hình thành khuẩn lạc trên gam hoặc kilogam mẫu thử.

5 Dung dịch pha loãng, môi trường chọn lọc và kit thử đặc trưng kiểu hình

5.1 Dung dịch pha loãng

5.1.1 Dung dịch pha loãng huyền phù ban đầu của các premix, phụ gia và sản phẩm thức ăn chăn nuôi

Dung dịch pha loãng này được dùng để chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân và mẫu pha loãng thập phân ban đầu (10^{-1}). Sử dụng chai hoặc bình thích hợp để đựng dung dịch pha loãng.

Muối đệm phosphat (PBS):

Hòa tan 8 g natri clorua, 0,2 g kali clorua, 1,15 g dinatri hydro phosphat, 0,2 g kali dihydro phosphat trong 1 L nước cất, chỉnh để dung dịch có pH $7,3 \pm 0,2$. Phân phối dung dịch này vào các dụng cụ chứa thích hợp (chai hoặc bình). Đậy nắp chai hoặc bình đựng dung dịch và hấp áp lực 10 min ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nên vặn nắp chai hoặc bình đựng dung dịch để tránh làm thất thoát dung dịch trong quá trình hấp áp lực.

Trước khi sử dụng, đưa nhiệt độ của dung dịch pha loãng về nhiệt độ phòng.

Đo pH của dung dịch pha loãng để đảm bảo khả năng đệm thích hợp.

5.1.2 Dung dịch pha loãng để chuẩn bị dãy dung dịch pha loãng thập phân

Dung dịch pha loãng này được dùng để pha loãng huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng tiếp theo.

Dung dịch muối pepton được chuẩn bị theo TCVN 6507-1 (ISO 6887-1).

Cân 1 g casein là pepton của casein được thủy phân bởi enzym tuyến tụy (hoặc pepton có chất lượng tương đương) và 8,5 g natri clorua vào bình đựng 1 L nước cất. Hòa tan các thành phần trên trong nước. Chỉnh dung dịch đến pH $7,0 \pm 0,2$ ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Đối với các dung dịch pha loãng thập phân, phân phối vào các ống nghiệm mỗi ống $9,0\text{ ml} \pm 0,1\text{ ml}$ dung dịch, đóng nắp các ống nghiệm trước khi hấp khử trùng.

Khử trùng bằng hấp áp lực 15 min ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trước khi sử dụng, cân bằng nhiệt độ của dung dịch pha loãng đến nhiệt độ phòng.

5.2 Môi trường

5.2.1 Thạch dextrose chloramphenicol (oxytetracyclin) chất chiết nấm men (CGYE)

Thành phần, gồm:

Chất chiết nấm men:	5 g
Dextrose:	20 g
Chloramphenicol:	0,1 g
Thạch:	12 g đến 15 g
Thêm nước cất đến	1 000 ml

Có thể mua thành phần cơ bản bán sẵn không chứa kháng sinh và bổ sung chloramphenicol hoặc có thể mua thành phần hoàn chỉnh bán sẵn trên thị trường.

TCVN 13516:2022

CHÚ THÍCH: Chloramphenicol có thể được thay thế bằng oxytetracyclin ($C_{22}H_{24}N_2O_9$) ở nồng độ cuối cùng 100 µg/ml môi trường.

5.2.2 Thạch sinh màu, ví dụ: CHROMagar®Candida

5.3 Đặc trưng kiểu hình và kháng định

Các khuẩn lạc đã chọn được kiểm tra bằng kính hiển vi bằng cách tạo huyền phù trong 1 giọt nước muối vô trùng 0,85 % trên phiến kính được đậy thích hợp để soi kính hiển vi (ví dụ: sử dụng vật kính dầu). Nấm men có các tế bào lớn với hình dạng và kích thước thay đổi, có thể có chồi.

Kiểu hình đặc trưng của khuẩn lạc *Saccharomyces cerevisiae* trên thạch dextrose chloramphenicol (oxytetracyclin) chất chiết nấm men có:

- a) màu kem và mờ đục
- b) hình dạng không đều
- c) kích thước thay đổi (đường kính 1 mm đến 6 mm)

Trên thạch sinh màu:

- d) hình tròn
- e) lồi đến khum
- f) nguyên vẹn (hoàn chỉnh)
- g) tím hoa cà/tía
- h) bề mặt nhẵn hoặc bóng
- i) mờ đục
- j) kích thước thay đổi (đường kính từ 1 mm đến 3 mm).

5.4 Đặc trưng hóa sinh

Các khuẩn lạc nấm men giả định có thể được xác nhận đặc tính hóa sinh bằng các kit thử thương mại (ví dụ: API 20 C AUX hoặc tương đương).

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm vi sinh thông thường và cụ thể như sau.

6.1 Thiết bị khử trùng khô (tủ sấy) và khử trùng ướt (nồi hấp áp lực)

Theo quy định trong TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ và $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ ở $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4 Thiết bị trộn

Sử dụng bộ trộn thích hợp có hai tốc độ (18 000 r/min và 22 000 r/min), kèm theo cốc 1 L được khử trùng 1 h ở $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.5 Bộ khuấy trộn, ví dụ: vortex hoặc loại tương đương.

6.6 Nồi hấp, hoặc dụng cụ tương đương để làm tan chảy thạch mà không hấp áp lực.

Sử dụng nồi cách thủy đun sôi (hoặc nồi hấp) để chuẩn bị các lượng 500 ml thạch, trong khi bộ chuẩn bị môi trường và bộ rót đĩa được sử dụng nhiều hơn 1 000 ml.

6.7 Cân, có thể cân chính xác đến hai chữ số thập phân.

6.8 Chai có nắp vặn, dung tích 25 ml và 1 000 ml.

6.9 Pipet tự động và các đầu tip vô trùng để phân phối các lượng 100 μl và 1 ml, đầu tip rộng.

6.10 Que dàn mẫu vô trùng, hình chữ L bằng thủy tinh hoặc kim loại

6.11 Đĩa Petri vô trùng, đường kính 90 mm.

6.12 Tủ cấy vô trùng.

6.13 Kính hiển vi, có hình ảnh tương phản pha (phóng đại 400 lần) và được sử dụng với nhúng dầu (1 000 lần).

7 Lấy mẫu

Tiêu chuẩn này không quy định việc lấy mẫu. Nên lấy mẫu theo tiêu chuẩn cụ thể liên quan đến sản phẩm, nếu không thì các bên cần thỏa thuận về việc lấy mẫu.

Nên lấy mẫu theo TCVN 11923:2017 (ISO/TS 17728:2015)^[1].

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc biến đổi trong suốt quá trình vận chuyển và bảo quản.

Cần cẩn thận khi lấy mẫu vì nguy cơ nhiễm chéo với nấm men, đặc biệt là sau khi lấy mẫu phụ gia và premix có bổ sung nấm men.

TCVN 13516:2022

8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952 (ISO 6498).

9 Cách tiến hành

9.1 Chuẩn bị đĩa thạch

9.1.1 Chuẩn bị thạch dextrose chloramphenicol (oxytetracyclin) chất chiết nấm men

Đun sôi để hòa tan thạch dextrose chloramphenicol (oxytetracyclin) chất chiết nấm men (CGYE) (5.2.1) trong nước cất. Nếu cần, chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là $6,6 \pm 0,4$. Phân phối môi trường thạch vào các vật chứa thích hợp (chai hoặc bình có nắp vặn bằng kim loại không độc). Khử trùng ở $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ trong 15 min. Sử dụng ngay thì giữ thạch ở nhiệt độ $48^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ để đổ đĩa.

CHÚ THÍCH: Nếu chloramphenicol được thay thế bằng oxytetracyclin thì chuẩn bị môi trường cơ bản theo cách tương tự nhưng không dùng chloramphenicol. Phân phối môi trường cơ bản này với các lượng 100 ml và khử trùng. Chuẩn bị dung dịch oxytetracyclin hydro clorua 1 % khối lượng trong nước và lọc để khử trùng. Ngay trước khi sử dụng, bằng cách vô trùng thêm 1 ml dung dịch này vào 100 ml môi trường cơ bản vừa được làm tan chảy và duy trì ở $48^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (để có được nồng độ cuối cùng 100 µg/ml môi trường),

9.1.2 Chuẩn bị thạch sinh màu

Chuẩn bị môi trường theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi hấp khử trùng môi trường, làm nguội đến $48^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, phân phối môi trường với các lượng từ 20 ml đến 25 ml vào các đĩa Petri (6.11) trong điều kiện vô trùng. Khi môi trường đông đặc, đặt đĩa với nắp hé mở trong tủ cấy vô trùng có lưu thông không khí trong 30 min để làm khô thạch.

CHÚ THÍCH: Để tránh mất nước, các đĩa đã khô có thể để trong tủ lạnh được bày ngay.

Đĩa đã bảo quản lạnh, thì đưa về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng. Kiểm tra nhiễm khuẩn của thạch bằng cách nuôi đĩa kiểm chứng không cấy mẫu.

9.2 Chuẩn bị huyền phù ban đầu và dịch pha loãng thập phân

Cân $20\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ chất phụ gia hoặc premix dạng thông thường, hoặc $2\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$ mẫu phụ gia dạng hạt rất nhỏ (trong viên nang) hoặc $50\text{ g} \pm 0,5\text{ g}$ mẫu thức ăn chăn nuôi. Thêm $180\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ chất pha loãng vào phụ gia hoặc premix, $198\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ vào mẫu phụ gia dạng hạt rất nhỏ hoặc $450\text{ g} \pm 1\text{ g}$ vào mẫu thức ăn chăn nuôi. Đồng hóa hỗn hợp bằng máy đồng hóa hoặc bộ trộn.

CHÚ THÍCH 1: Nên kiểm tra pH của huyền phù ban đầu và hiệu chỉnh đến dải pH từ 7,3 đến 8,1.

Số lượng các viên nang nên nhiều hơn 25 để thu được độ lệch chuẩn nhỏ hơn 20 % để lặp lại tốt phép phân tích.

Trộn mẫu phụ gia và mẫu premix trong 3 min bằng thiết bị trộn ở tốc độ cao (6.4) và pha loãng ngay.

Trộn mẫu thức ăn chăn nuôi trong 1 min bằng thiết bị trộn ở tốc độ cao (6.4), bắt đầu trộn ở tốc độ thấp để tránh bắn mẫu, sau đó chuyển sang tốc độ cao. Để yên mẫu 30 min, để các hạt mẫu thấm nước. Trộn 2 min ở tốc độ cao (6.4) và pha loãng ngay sử dụng pipet miệng rộng.

CHÚ THÍCH 2: Có thể tránh tạo bọt mạnh trong huyền phù ban đầu trong quá trình trộn sử dụng chất chống tạo bọt thích hợp (ví dụ: chất chống tạo bọt silicon hoặc loại tương đương) với lượng phù hợp.

Đối với sản phẩm là viên nang thì sử dụng lượng phụ gia (ví dụ: polyoxyethylensorbitanmonooleat hoặc tương đương) với liều lượng và nhiệt độ phù hợp (ví dụ: 40 °C).

Lượng cân của thể tích lấy bằng pipet phải được hiệu chuẩn để có được hệ số hiệu chỉnh trong phép tính số đếm nấm men probiotic.

CẢNH BÁO – Các huyền phù có chứa các probiotic có xu hướng lắng nhanh sau khi trộn. Cần tránh điều này bằng cách hút nhanh, đúng cách các mẫu đã đồng nhất dùng cho các dịch mẫu pha loãng tiếp theo.

Chuẩn bị một dãy các dung dịch pha loãng (dãy pha loãng) sử dụng pipet vô trùng như bộ phân phối micro đặt tại mức 1 ml. Chuyển 1 ml huyền phù ban đầu vào ống nghiệm có chứa 9 ml muối pepton vô trùng để ở nhiệt độ phòng và lắc để trộn đều. Lặp lại quy trình này sử dụng độ pha loãng 10^{-2} và tất cả các độ pha loãng tiếp theo cho đến khi thu được số ước tính thích hợp của vi khuẩn. Sau quy trình pha loãng mẫu này, chuyển mẫu vào các đĩa nuôi cấy ngay theo 9.3.

CHÚ THÍCH 3: Nên kiểm tra hàm lượng đồng trong huyền phù ban đầu bằng phép thử sơ bộ. Khi hàm lượng đồng vượt quá 200 mg/kg thì cần sử dụng thuốc thử chelat ví dụ: axit iminodioxetic với nồng độ thích hợp liên quan đến giá trị pH.

CHÚ THÍCH 4: Đối với các mẫu có số đếm nấm men cao (phụ gia, premix), có thể thu được độ chụm tốt hơn nếu sử dụng các độ pha loãng 1/100 và/hoặc 1/1 000 thay vì độ pha loãng thập phân. Thay đầu tip pipet giữa các lần pha loãng.

9.3 Nuôi cấy và ủ các đĩa

9.3.1 Yêu cầu chung

Thời gian tính từ khi chuẩn bị xong huyền phù ban đầu cho đến khi rót môi trường ra đĩa không được quá 15 min.

Chuẩn bị các đĩa cấy mẫu và đĩa đối chứng để kiểm tra độ vô trùng.

CẢNH BÁO – Các dung dịch pha loãng được chọn phải đồng nhất trước khi chuyển sang đĩa.

TCVN 13516:2022

9.3.2 Nuôi cấy trên môi trường thạch dextrose chloramphenicol chất chiết nấm men

Lấy hai đĩa Petri vô trùng, dùng pipet vô trùng chuyển sang mỗi đĩa 1 ml dung dịch pha loãng thích hợp của mẫu. Rót khoảng 15 ml thạch dextrose chloramphenicol chất chiết nấm men đã được làm tan chảy trước đó và duy trì ở $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trên nồi cách thủy.

Cẩn thận trộn dịch cấy với môi trường và để cho hỗn hợp đông lại, để đĩa Petri trên mặt phẳng mát nằm ngang.

Lật ngược các đĩa thạch đã đông đặc và đặt vào tủ ẩm ở $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 2 ngày.

9.3.3 Nuôi cấy trên môi trường thạch sinh màu

Từ mỗi độ pha loãng được chọn, dùng pipet tự động chuyển sang hai đĩa mỗi đĩa 100 μl và láng đều bề mặt bằng que dàn mẫu vô trùng.

Khi dịch cấy đã hấp thụ (khoảng 20 min), lật các đĩa và sắp chồng bốn đĩa đưa vào trong tủ ẩm hiếu khí cùng với một cốc nước cất để tăng độ ẩm. Nếu cài đặt ở $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ thì ủ các đĩa thạch đã cấy mẫu trong 5 ngày hoặc cài đặt ở $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ thì ủ trong 2 đến 3 ngày. Tùy thuộc vào nhiệt độ và khả năng phát triển có thể ủ đến 5 ngày.

CHÚ THÍCH: Các đĩa CHROMagar® Candida có thể được ủ ở $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 2 ngày, nhưng các khuẩn lạc nhỏ hơn và màu sắc không hiện hoàn toàn. Do đó, nên ủ 2 đến 3 ngày ở nhiệt độ $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

9.4 Đếm khuẩn lạc

9.4.1 Yêu cầu chung

Tùy thuộc vào môi trường, đếm các khuẩn lạc trên từng đĩa thạch sau khi ủ 2 ngày, 3 ngày và 4 ngày. Trong trường hợp không có đĩa Petri nào có số khuẩn lạc từ 30 đến 350 thì cần lập lại việc phân tích trên các độ pha loãng thích hợp khác.

9.4.2 Thạch dextrose chloramphenicol (oxytetracyclin) chất chiết nấm men

Các đĩa có nhiều hơn 30 khuẩn lạc và ít hơn 300 khuẩn lạc được sử dụng để định lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU). Nấm men thường bám dính vào đáy đĩa làm bằng chất dẻo, đặc biệt là tại điểm nuôi cấy, sinh ra từng đám khuẩn lạc. Cần đếm từng khuẩn lạc này. Nếu có thể, đếm bốn đĩa (mỗi độ pha loãng hai đĩa).

9.4.3 Thạch sinh màu

Sau khi ủ 2 đến 3 ngày trong các điều kiện quy định ở trên, đếm tất cả các đĩa có chứa nhiều hơn 30 và ít hơn 300 khuẩn lạc và sử dụng để định lượng CFU.

Đếm các khuẩn lạc nấm men giả định và tính số lượng CFU trên gam mẫu theo giá trị trung bình phù hợp với TCVN 6404 (ISO 7218). Các khuẩn lạc *Saccharomyces cerevisiae* là các khuẩn lạc có màu tím hoa cà/tím, trong khi các khuẩn lạc nấm men khác có thể phân biệt rõ (ví dụ: *Candida spp.* Có màu trắng đến hồng đậm).

9.5 Đặc trưng kiểu hình và khả năng định

Tùy thuộc vào số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa sau khi ủ, chọn 1 đến 5 khuẩn lạc điển hình để kiểm tra đặc trưng kiểu hình. Điều này xác nhận số đếm khuẩn lạc là chỉ đối với *Saccharomyces cerevisiae*. Việc rửa hai lần tế bào trong dung dịch muối đệm phosphat trước khi tạo huyền phù trong nước muối ở chuẩn McFarlan 2 có thể tạo thuận tiện cho việc phân biệt giữa các chủng *S. cerevisiae*.

Các nấm men sinh các khuẩn lạc điển hình trên môi trường quy định (xem 5.3) và cho thấy các kiểu hình đặc thù được đếm là nấm men probiotic.

Các kết quả này là cơ sở để tính số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên gam mẫu.

10 Biểu thị kết quả

Số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên gam mẫu được tính theo TCVN 6404 (ISO 7218).

Số lượng nấm men, N, trên gam hoặc trên mililit được tính theo Công thức sau:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 \times 0,1n_2) \times d}$$

Trong đó:

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa;

V là thể tích chất cấy được đưa vào mỗi đĩa, tính bằng mililit (ml);

n_1 là số lượng đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất;

n_2 là số lượng đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai;

d là độ pha loãng mà tại đó thu được số đếm.

Làm tròn kết quả thu được đến hai chữ số có nghĩa. Đối với số có ba chữ số, làm tròn chữ số thứ ba đến số gần 0 nhất. Trong trường hợp chữ số thứ ba là 5 thì làm tròn xuống nếu hai chữ số đầu tiên là số chẵn và làm tròn lên nếu hai chữ số đầu tiên là số lẻ.

TCVN 13516:2022

Báo cáo kết quả là số lượng vi sinh vật trên gam sản phẩm, được biểu thị bằng số 1,0 đến 9,9 với số mũ 10.

11 Độ chum

11.1 Yêu cầu chung

Độ chum của phương pháp và các môi trường khác nhau đã được xác định trong nghiên cứu liên phòng thử nghiệm.

11.2 Nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Chi tiết nghiên cứu liên phòng thử nghiệm về độ chum của phương pháp đã được công bố được nêu trong Phụ lục A. Giới hạn lặp lại và giới hạn tái lập đã được xác định sử dụng ba loại mẫu thức ăn chăn nuôi bị nhiễm ở hai mức. Các giá trị thu được từ nghiên cứu liên phòng thử nghiệm này không áp dụng được cho các dải nồng độ và nền mẫu khác với dải nồng độ và nền mẫu đã nêu.

11.3 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ ($\log_{10}$) (số lượng nấm men trên gam hoặc trên mililit) hoặc tỷ số giữa hai kết quả cao với kết quả thấp trên cùng thang đo chuẩn, thu được khi sử dụng cùng phương pháp thực hiện trên các vật liệu thử nghiệm giống hệt nhau, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng một thiết bị, trong khoảng thời gian ngắn không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại r .

11.4 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm đơn lẻ ($\log_{10}$) (số lượng nấm men trên gam hoặc trên mililit) hoặc tỷ số giữa hai kết quả cao với kết quả thấp trên cùng thang đo chuẩn, thu được khi sử dụng cùng phương pháp thực hiện trên các vật liệu thử nghiệm giống hệt nhau, do những người khác nhau thực hiện trong các phòng thí nghiệm khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập R .

12 Báo cáo thử nghiệm

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

- a) tất cả các thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu được sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử nghiệm được sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) nhiệt độ ủ;

- e) mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- f) kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Một nghiên cứu liên phòng quốc tế gồm 20 cộng tác viên ở 12 quốc gia Châu Âu đã được thực hiện trên các mẫu với hai mức nhiễm khác nhau và mẫu trắng. Loại mẫu với mức nhiễm nấm men thấp (2×10^7 CFU/g) có chứa lactobacilli và enterococci ở nồng độ gấp đôi nấm men. Mẫu có hàm lượng nấm men cao (1×10^8 CFU/g) chỉ chứa nấm men. Các mẫu trắng chứa lactobacilli và enterococci và không chứa nấm men.

Dữ liệu về độ chụm được nêu trong Bảng A.1.

Bảng A.1 – Dữ liệu độ chụm thu được trong nghiên cứu liên phòng

	Mẫu (mức nhiễm)			
	CGYE*		Thạch sinh màu	
	Mức thấp	Mức cao	Mức thấp	Mức cao
Số lượng mẫu	3	3	3	3
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	11	15	6	9
Giá trị trung bình ($\log_{10}$ CFU/g)	7,13	7,48	7,04	7,50
Độ lệch chuẩn lặp lại	0,17	0,36	0,14	0,21
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại	2,38	4,86	1,93	2,81
Giới hạn lặp lại, <i>r</i>	0,47	1,02	0,38	0,59
Độ lệch chuẩn tái lập	0,55	0,60	0,14	0,44
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại	7,68	7,98	1,93	5,91
Giới hạn tái lập, <i>R</i>	1,53	1,67	0,38	1,24
*Xem Điều 5 về môi trường nuôi cấy				

Thư mục tài liệu tham khảo

[1] TCVN 11923:2017 (ISO/TS 17728:2015) *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Kỹ thuật lấy mẫu để phân tích vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi.*

[2] EN 15789: 2009 *Animal feeding stuffs – Isolation and enumeration of yeast probiotic strains*
