

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 13043:2020**

Xuất bản lần 1

**THỨC ĂN CHĂN NUÔI –  
PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH LƯỢNG *BACILLUS* SPP. GIẢ ĐỊNH**

*Animal feeding stuffs –  
Isolation and enumeration of presumptive Bacillus spp.*

**HÀ NỘI – 2020**

**Lời nói đầu**

TCVN 13043:2020 được xây dựng trên cơ sở tham khảo EN 15784:2009;

TCVN 13043:2020 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F17  
*Thức ăn chăn nuôi* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng  
thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Lời giới thiệu

Phương pháp này được xây dựng để định lượng và phân biệt các bào tử có khả năng nảy mầm của vi khuẩn *Bacillus* probiotic, nhằm kiểm soát việc ghi nhãn đúng cách các sản phẩm thức ăn chăn nuôi <sup>[1]</sup>. Các tế bào sinh dưỡng không được tính đến trong phương pháp này, vì tất cả các sản phẩm của các loài *Bacillus* được chấp nhận hiện nay đều ở dạng bào tử.

Bào tử của các loài *Bacillus* tồn tại sau quá trình xử lý nhiệt ở 80 °C trong 10 min và hình thái khuẩn lạc đặc trưng của các loài *Bacillus* của các chủng được sử dụng riêng lẻ được kiểm tra bằng phương pháp nêu trong Tài liệu tham khảo [2].

Phương pháp này không chọn lọc vi khuẩn *Bacillus* probiotic nhưng có thể được áp dụng để định lượng chúng trong các chất phụ gia, sản phẩm premix và thức ăn chăn nuôi có số lượng các *Bacillus* probiotic cao hơn nhiều so với các vi khuẩn *Bacillus* khác.

Nếu thức ăn chăn nuôi bị nhiễm các loài không phải *Bacillus* probiotic ở mức cao thì cần sử dụng quy trình bổ sung kháng sinh để đếm chọn lọc cụ thể hơn, có tính đến sự kháng kháng sinh của các chủng *Bacillus* khác nhau.

## Thức ăn chăn nuôi – Phân lập và định lượng *Bacillus* spp. giả định

*Animal feeding stuffs – Isolation and enumeration of presumptive Bacillus spp.*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các nguyên tắc chung để định lượng vi khuẩn *Bacillus* probiotic trong thức ăn chăn nuôi có chứa các loài *Bacillus* ở dạng đơn lẻ hoặc hỗn hợp với các vi sinh vật khác. Phương pháp này không áp dụng cho thức ăn chăn nuôi có chứa chất khoáng được xác định là thức ăn chăn nuôi bổ sung có thành phần chủ yếu là chất khoáng và chứa ít nhất 40 % tro thô [3].

Có nhiều loại mẫu thức ăn chăn nuôi khác nhau:

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

Giới hạn phát hiện là 500 ( $5 \times 10^2$ ) đơn vị hình thành khuẩn lạc trên gam (CFU/g). Giới hạn định lượng là  $2 \times 10^4$  CFU/g.

### 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 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 thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật*

## TCVN 13043:2020

TCVN 6507-1 (ISO 6887-1), *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 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 – Hướng dẫn chuẩn bị mẫu thử*

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 3.1

##### ***Bacillus*** (bacilli)

Các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* hình thành khuẩn lạc phù hợp với mô tả về các loài này, trên bề mặt thạch trypton đậu tương (TSA) sau khi xử lý nhiệt và ủ ở 37 °C từ 16 h đến 24 h trong điều kiện hiếu khí.

Hình thái các khuẩn lạc của bốn loài *Bacillus* trên TSA như sau:

- a) *Bacillus subtilis*: đường kính từ 3 mm đến 8 mm, tròn, bề mặt mờ, đục, nhẵn, màu kem hoặc màu nâu;
- b) *Bacillus cereus* và *Bacillus coagulans*: đường kính từ 3 mm đến 8 mm, bề mặt mờ hoặc kính mờ và có viền gợn sóng;
- c) *Bacillus licheniformis*: đường kính từ 4 mm đến 8 mm, lồi, đục mờ, dạng sụn đến rất nhầy, phân thùy, có nhiều khuẩn lạc nhỏ bao quanh. Phần nhầy trung tâm của khuẩn lạc có thể khô và bị phẳng, trắng và đục nhưng xung quanh vẫn có các khuẩn lạc nhỏ, nhầy. Một số phần của khuẩn lạc sẽ bám dính vào cơ chất chắc hơn các phần khác.

#### 3.2

**Số đếm khuẩn lạc của các loài *Bacillus* probiotic giả định** (colony count of presumptive probiotic *Bacillus* species)

Số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) được đếm và tính theo quy trình nêu trong tiêu chuẩn này.

### 4 Nguyên tắc

Chuẩn bị huyền phù ban đầu của mẫu thử trong dung dịch pha loãng, sử dụng máy đồng hóa thích hợp. Từ huyền phù ban đầu này chuẩn bị dịch mẫu pha loãng mới và xử lý nhiệt ở 80 °C trong 10 min. Chuẩn bị dãy dịch mẫu pha loãng thập phân từ mẫu đã xử lý nhiệt rồi cấy trải trên thạch TSA và ủ ở 37 °C từ 16 h đến 24 h trong điều kiện hiếu khí. Đếm các khuẩn lạc của các loài *Bacillus* và tính số đơn vị hình thành khuẩn lạc trên gam hoặc kilogam.

## 5 Dung dịch pha loãng và môi trường chọn lọc

### 5.1 Dung dịch pha loãng

#### 5.1.1 Dung dịch pha loãng dùng cho huyền phù ban đầu

Dung dịch pha loãng này được sử dụng để chuẩn bị dãy pha loãng thập phân từ huyền phù mẫu thử ban đầu  $10^{-1}$  trong các vật chứa thích hợp (ví dụ: hộp, chai hoặc bình).

##### 5.1.1.1 Dung dịch pha loãng ban đầu dùng cho các chất phụ gia

Dung dịch 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, pH  $7,3 \pm 0,2$  trong 1 L nước cất. Phân phối dung dịch muối này vào các vật chứa thích hợp (ví dụ: hộp, chai hoặc bình). Hấp áp lực tất cả các vật chứa đã đậy kín nắp có chứa dung dịch pha loãng ban đầu ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 10 min. Để tránh hao hụt trong quá trình hấp, cần sử dụng chai có nắp vặn.

Để dung dịch pha loãng nguội đến nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

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

##### 5.1.1.2 Dung dịch pha loãng ban đầu dùng cho thức ăn chăn nuôi và sản phẩm premix

Dung dịch natri hydroxit 0,2 %: Hòa tan 2 g natri hydroxit trong một lít nước cất. Phân phối dung dịch này với các lượng nhỏ vào dịch mẫu pha loãng ban đầu của các viên thức ăn đựng trong các bình có nắp đậy kín. Hấp áp lực tất cả các bình đã đậy kín nắp có chứa dung dịch pha loãng ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 15 min.

Để dung dịch pha loãng nguội đến nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

### 5.1.2 Dung dịch muối pepton polysorbat dùng cho pha loãng thập phân

Dung dịch pha loãng này được sử dụng để pha loãng thập phân huyền phù mẫu thử ban đầu và các dịch mẫu pha loãng tiếp theo.

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

Chuẩn bị dung dịch 1 g casein thủy phân bằng enzym, ví dụ: pepton casein thủy phân enzym tuyến tụy (hoặc pepton có cùng chất lượng) và 8,5 g natri clorua trong một lít nước cất. Hòa tan các thành phần vào nước. Chính pH đến  $7,0 \pm 0,2$  ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Để pha loãng thập phân, cho vào các ống nghiệm vô trùng có chứa 9,0 ml  $\pm$  0,1 ml dung dịch hoặc sử dụng chai có nắp vặn để tránh hao hụt khối lượng trong quá trình hấp áp lực.

## **TCVN 13043:2020**

Hấp khử trùng ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 15 min. Để dung dịch pha loãng nguội đến nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

### **5.2 Môi trường**

Sử dụng thạch trypton đậu tương<sup>1)</sup> làm môi trường nuôi cấy.

Thành phần tính bằng g/l:

a) Trypton	15,0 g
b) Natri clorua	5,0 g
c) Pepton đậu tương	5,0 g
d) Thạch	15,0 g
e) Nước	1 000 ml

pH cuối cùng  $7,3 \pm 0,2$ .

## **6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh**

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

### **6.1 Thiết bị hấp áp lực**

Theo TCVN 6404 (ISO 7218).

### **6.2 Tủ ấm**

Tủ ấm có khả năng duy trì nhiệt độ ở  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **6.3 Nồi cách thủy**

Nồi cách thủy có khả năng giữ nhiệt độ ở  $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  và  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **6.4 Thiết bị trộn**

Bộ trộn hai tốc độ hoặc có thể điều chỉnh được ( $18\ 000\text{ r/min}$  và  $22\ 000\text{ r/min}$ ), có bát trộn một lít đã được khử trùng trong tủ sấy ở  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 1 h.

### **6.5 Máy khuấy cơ học**

Máy khuấy cơ học, ví dụ: máy trộn Vortex [xem TCVN 6404 (ISO 7218)] hoặc tương đương.

---

<sup>1)</sup> Môi trường thương mại có sẵn từ các nhà cung cấp khác nhau.

## 6.6 Cân

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

## 6.7 Chai có nắp vặn

## 6.8 Pipet và đầu tip

Pipet chia vạch xả hết hoặc pipet tự động và đầu tip vô trùng để phân phối 100 µl và 1 ml. Các đầu tip có lỗ rộng gắn vào pipet để hút và pha loãng mẫu thức ăn chăn nuôi đã đồng nhất.

## 6.9 Que dàn mẫu

Que dàn mẫu hình chữ L hoặc hình tam giác vô trùng, bằng thủy tinh hoặc kim loại hoặc que dàn mẫu vô trùng dùng một lần bằng chất dẻo.

## 6.10 Đĩa Petri vô trùng, có ba vách thoát khí, đường kính trong 90 mm.

## 6.11 Tủ cấy vi sinh

## 6.12 Kính hiển vi, có vật kính dầu độ phóng đại 100x.

## 6.13 Máy đo pH.

## 7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 11923 (ISO/TS 17728) [5].

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.

**CẢNH BÁO** – Thực hiện các biện pháp phòng ngừa để tránh khả năng nhiễm chéo mẫu với các vi khuẩn *Bacillus*. Đặc biệt sau khi lấy mẫu các chất phụ gia và sản phẩm premix có bổ sung *Bacillus*. Nếu cần, làm sạch và khử trùng thiết bị giữa mỗi lần lấy mẫu, đặc biệt là sau khi lấy mẫu các chất phụ gia và sản phẩm premix có chứa *Bacillus*. Cho mẫu vào vật chứa vô trùng.

## 8 Chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo TCVN 6952 (ISO 6498) và tiêu chuẩn sản phẩm thích hợp. Nếu không có tiêu chuẩn cụ thể như vậy thì các bên liên quan tự thỏa thuận về vấn đề này. TCVN 6952 (ISO 6498) đưa ra các hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử.



## TCVN 13043:2020

### 9 Cách tiến hành

#### 9.1 Chuẩn bị đĩa thạch

Chuẩn bị môi trường theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hấp áp lực môi trường ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 15 min, sau đó làm nguội trong nồi cách thủy đến nhiệt độ  $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , rồi rót lần lượt các phần từ 12 ml đến 15 ml vào từng đĩa Petri (6.10) trong điều kiện vô trùng và dàn đều để tạo thành một lớp đồng nhất.

Khi môi trường đã đông đặc, lật ngược các đĩa rồi xếp thành chồng, mỗi chồng bốn đĩa và để khô ở nhiệt độ phòng hoặc trong tủ ấm ở  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  khoảng 12 h hoặc để qua đêm. Hoặc để các đĩa mở hé nắp một phần trong tủ cấy vi sinh khoảng 30 min để làm khô bề mặt thạch.

Kiểm tra độ vô trùng của các đĩa đã khô.

**CẢNH BÁO** – Nếu bề mặt của đĩa thạch không khô hoặc lượng môi trường trong mỗi đĩa Petri nhiều hơn 15 ml thì khuẩn lạc của các loài *Bacillus* sẽ lan trên toàn bộ đĩa, do vậy không đếm được tế bào.

Các đĩa đã khô, nếu được bảo quản đúng cách, tránh mất nước có thể giữ được hai tuần trong tủ lạnh. Trong trường hợp này, để các đĩa đến nhiệt độ phòng khoảng 30 min trước khi sử dụng.

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

##### 9.2.1 Chất phụ gia

Cân  $20\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$  chất phụ gia loại thông thường. Cho  $180\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$  dung dịch muối đệm phosphat (5.1) vào chất phụ gia. Đồng hóa hỗn hợp bằng bộ trộn thích hợp (6.4). Bắt đầu trộn ở tốc độ thấp để tránh hỗn hợp bị bắn tung tóe và chuyển sang trộn ở tốc độ cao trong 2 min rồi pha loãng ngay.

**CHÚ THÍCH:** Có thể tránh tạo bọt mạnh trong huyền phù ban đầu khi trộn bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt phù hợp (ví dụ: chất chống tạo bọt silicon) ở nồng độ thích hợp.

**CẢNH BÁO** – Các probiotic có xu hướng lắng nhanh cùng với các hạt mẫu, do đó khi vừa trộn xong phải lấy ngay huyền phù đồng nhất.

Chuyển 1,0 ml huyền phù ban đầu vào ống nghiệm chứa 9,0 ml dung dịch muối pepton polysorbat 80 loãng vô trùng ( $10^{-2}$ ) (5.1.2). Trộn các lượng trong ống bằng máy trộn Vortex, trộn ở tốc độ tối đa 3 lần mỗi lần 1 s. Gia nhiệt ống trong nồi cách thủy ở  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 10 min. Làm nguội các ống trong nước lạnh (khoảng  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) và pha loãng khi các ống đạt đến nhiệt độ phòng.

Khối lượng của thể tích pipet đã hút phải được hiệu chuẩn để thu được hệ số hiệu chỉnh đối với việc tính số đếm các loài *Bacillus*.

### 9.2.2 Thức ăn chăn nuôi và sản phẩm premix

Cân 50 g  $\pm$  0,5 g mẫu thử. Thêm 450 g  $\pm$  1 g dung dịch natri hydroxit 0,2 % (5.2) vào thức ăn chăn nuôi hoặc sản phẩm premix. Đồng hóa hỗn hợp bằng bộ trộn thích hợp (6.4). Bắt đầu trộn ở tốc độ thấp để tránh hỗn hợp bị bắn tung tóe và sau đó chuyển sang trộn ở tốc độ cao (xem 6.4). Trộn thức ăn chăn nuôi và sản phẩm premix ở tốc độ cao trong 1 min.

CHÚ THÍCH: Có thể tránh tạo bọt mạnh trong huyền phù ban đầu khi trộn bằng cách sử dụng chất chống tạo bọt phù hợp (ví dụ: chất chống tạo bọt silicon) ở nồng độ thích hợp.

Đặt mẫu ở nơi mát khoảng + 5 °C trong 30 min. Trộn lại mẫu ở tốc độ cao trong 1 min. Pha loãng ngay bằng cách sử dụng các đầu tip pipet có lỗ rộng.

**CẢNH BÁO – Probiotic có xu hướng lắng nhanh với các hạt mẫu, do đó khi vừa trộn xong phải lấy ngay huyền phù đồng nhất.**

Dùng các đầu tip pipet có lỗ rộng chuyển 1,0 ml huyền phù ban đầu vào ống nghiệm chứa 9,0 ml dung dịch muối pepton polysorbat 80 loãng vô trùng ( $10^{-2}$ ) (5.1.2). Trộn dung dịch bằng cách sử dụng máy trộn Vortex, trộn ở tốc độ tối đa 3 lần mỗi lần 1 s. Gia nhiệt ống nghiệm trong nồi cách thủy ở 80 °C  $\pm$  1 °C trong 10 min. Làm nguội các ống trong nước lạnh (khoảng 10 °C) và pha loãng khi các ống đạt đến nhiệt độ phòng.

Chuẩn bị (từ dung dịch pha loãng  $10^{-2}$  đã xử lý nhiệt) dãy dịch mẫu pha loãng thập phân bằng cách dùng pipet lấy 1 ml hỗn hợp dung dịch pha loãng  $10^{-2}$  đã xử lý nhiệt cho vào 9 ml dung dịch muối pepton polysorbat 80 loãng vô trùng (5.1.2) và trộn bằng máy trộn Vortex (6.5). Lặp lại quy trình này sử dụng dịch mẫu pha loãng  $10^{-3}$  và chuẩn bị các dãy pha loãng thập phân tiếp theo cho đến khi thích hợp để tính số đếm tế bào. Sau quy trình pha loãng này, cấy ngay các đĩa như mô tả trong 9.3.

Thời gian tính từ khi kết thúc quá trình chuẩn bị huyền phù ban đầu cho đến khi cấy môi trường không lớn hơn 30 min. Chuẩn bị một đĩa cấy tương tự nhưng không có mẫu để kiểm tra độ vô trùng.

Khối lượng của thể tích pipet đã hút phải được hiệu chuẩn để thu được hệ số hiệu chỉnh đối với việc tính số đếm các loài *Bacillus*.

### 9.3 Cấy và ủ ấm

Mỗi dịch mẫu pha loãng đã chọn, cấy hai đĩa thạch riêng rẽ, mỗi đĩa 0,1 ml dung dịch. Dàn nhanh dung dịch trên bề mặt môi trường bằng que dàn mẫu vô trùng.

**CẢNH BÁO – Các dịch mẫu pha loãng thích hợp đã chọn phải đồng nhất trước khi cấy mẫu lên các đĩa.**

Lật ngược các đĩa rồi xếp thành chồng, mỗi chồng bốn đĩa và ủ ở 37 °C  $\pm$  1 °C từ 16 h đến 24 h trong điều kiện hiếu khí.

## TCVN 13043:2020

### 9.4 Đếm khuẩn lạc

Sau khi ủ trong các điều kiện quy định nêu trên, chọn các đĩa chứa hơn 30 khuẩn lạc và không quá 300 khuẩn lạc *Bacillus* giả định để định lượng số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU). Nếu có thể, đếm 4 đĩa (hai độ pha loãng liên tiếp). Nếu số khuẩn lạc trung bình mọc trên các đĩa dịch mẫu pha loãng cụ thể nhỏ hơn 20 thì cần lặp lại phép thử. Nếu kết quả của phép thử lặp lại thu được có ít hơn 20 khuẩn lạc thì cần đưa các số đếm vào công thức tính giá trị trung bình. Trong báo cáo thử nghiệm (Điều 12) kết quả này cần được giải thích như sau: Kết quả này nhỏ hơn giới hạn phát hiện.

Vi khuẩn hình thành khuẩn lạc điển hình trên các môi trường xác định có hình thái như mô tả trong 3.1, được phát hiện và đếm là các loài *Bacillus*. Số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mỗi gam thức ăn chăn nuôi được tính theo Công thức (1) trong Điều 10.

## 10 Biểu thị kết quả

Số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mỗi gam thức ăn chăn nuôi được tính theo TCVN 6404 (ISO 7218).

Số lượng *Bacillus* trên mỗi gam hoặc mililit,  $N$ , được tính bằng Công thức (1):

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

Trong đó:

$\sum C$  là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa ở một hoặc hai độ pha loãng liên tiếp, có ít nhất một đĩa chứa 15 khuẩn lạc;

$V$  là thể tích dịch cấy dùng cho mỗi đĩa, tính bằng mililit (ml) (thường là 0,1 ml);

$n_1$  là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất có thể đếm được;

$n_2$  là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai có thể đếm được;

$d$  là hệ số pha loãng của độ pha loãng thứ nhất.

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.

Kết quả là số vi sinh vật trên mỗi gam sản phẩm, được biểu thị bằng một số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10.

## 11 Độ chụm

### 11.1 Yêu cầu chung

Độ chụm của phương pháp sử dụng các môi trường khác nhau về độ lặp lại và độ tái lập được xác định trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm <sup>[2]</sup>.

### 11.2 Nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Chi tiết nghiên cứu liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được công bố (xem Tài liệu tham khảo [1]) và được tóm tắt trong Phụ lục B. Giới hạn lặp lại và giới hạn tái lập 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 có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và nền mẫu khác với các dải nồng độ và nền mẫu đã nêu.

### 11.3 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm (số vi khuẩn *Bacillus* trên gam hoặc mililit) đơn lẻ, độc lập (đã chuyển về  $\log_{10}$ ) hoặc tỷ số của hai kết quả thử nghiệm cao hơn đến thấp hơn trên thang chuẩn, thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do cùng một người thực hiện, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn lặp lại  $r$ .

### 11.4 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử nghiệm (số vi khuẩn *Bacillus* trên gam hoặc mililit) đơn lẻ (đã chuyển về  $\log_{10}$ ) hoặc tỷ số của hai kết quả thử nghiệm cao hơn đến thấp hơn trên thang chuẩn, thu được trên vật liệu thử giống hệt nhau, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn giới hạn tái lập  $R$ .

## 12 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã dùng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã dùng, viện dẫn đến tiêu chuẩn này;
- d) nhiệt độ ủ;
- e) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi
- f) mọi chi tiết về các tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- g) các kết quả thử nghiệm thu được, hoặc, nếu kiểm tra độ lặp lại, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

**Phụ lục A**

(Tham khảo)

**Các lưu ý về cách tiến hành**

Phần lớn các tế bào sinh dưỡng của vi sinh vật sẽ bị bất hoạt bởi quá trình xử lý nhiệt được sử dụng trong phương pháp này.

Trong trường hợp thức ăn chăn nuôi “bị nhiễm” các loài không phải *Bacillus* probiotic ở mức cao thì có thể cần bổ sung các kháng sinh thích hợp vào môi trường thạch có khả năng ức chế hệ sinh vật nền.

## Phụ lục B

(Tham khảo)

## Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm gồm có 17 phòng thử nghiệm của 12 nước châu Âu tham gia tiến hành trên ba loại mẫu khác nhau trong đó vi khuẩn *Bacillus* bị nhiễm ở hai mức và mẫu thứ ba là mẫu trắng đại diện. Mẫu nhiễm ở mức thấp đại diện cho mẫu thức ăn chăn nuôi và chỉ chứa *Bacillus*. Mẫu cô đặc cao hơn đại diện cho sản phẩm premix có chứa *Bacillus* và làm nền mẫu để bổ sung hệ vi sinh vật *Pediococcus* và nấm men. Các mẫu trắng có chứa các vi khuẩn *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* và nấm men tuy nhiên không có bào tử *Bacillus*. Kết quả đánh giá mẫu trắng không được nêu trong Bảng B.1 và có thể xem trong các tài liệu được trích dẫn.

Phép thử được tổ chức vào năm 2002 và được phối hợp bởi Phòng thí nghiệm Khoa học Trung tâm (Anh) <sup>[1],[2]</sup>.

Bảng B.1 – Dữ liệu độ chụm thu được từ nghiên cứu cộng tác <sup>[2]</sup>

Thông số	Mẫu (mức nhiễm)	
	Mức thấp $10^5$ CFU/g	Mức cao $10^9$ CFU/g
Số lượng mẫu	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	11	11
Giá trị trung bình, tính bằng $\log_{10}$ CFU/g	5,95	9,53
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$ , tính bằng $\log_{10}$ CFU/g	0,07	0,09
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $CV_r$ , tính bằng %	1,13	0,99
Giới hạn lặp lại, $r$ ( $= 2,8 \times s_r$ )	0,19	0,26
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ , tính bằng $\log_{10}$ CFU/g	0,35	0,32
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $CV_R$ , tính bằng %	5,80	3,40
Giới hạn tái lập $R$ ( $= 2,8 \times s_R$ )	0,97	0,91

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] European Community Project SMT4-CT98-2235. "Methods for the official control of probiotics used as feed additives (vol. 1-3). 2002. Report EUR 20873/1-3. Office for Official Publications of the European Communities. ISBN 92-894-6249-3 (set)"
  - [2] Leuschner R.G.K., J. Bew, A. Cruc. 2003. Enumeration of probiotic bacilli spores in animal feed: A collaborative study. J. AOAC 86, 568-575
  - [3] Council Directive (79/373/EEC) of 2 April 1979 on the marketing of compound feeding stuffs (OJ No L 86, 6.4.1979, p.30)
  - [4] TCVN 4325 (ISO 6497), *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu*
  - [5] TCVN 11923 (ISO/TS 17728) , *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*
-