

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13044:2020

Xuất bản lần 1

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

*Animal feeding stuffs –
Isolation and enumeration of Bifidobacterium spp.*

HÀ NỘI – 2020

Lời nói đầu

TCVN 13044:2020 được xây dựng trên cơ sở tham khảo EN 15785:2009;

TCVN 13044:2020 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 vi khuẩn *Bifidobacterium* probiotic, nhằm kiểm soát việc ghi nhãn đúng cách các sản phẩm thức ăn chăn nuôi ^[1]. Phương pháp định lượng được đưa ra đối với các loài *Bifidobacterium* đã được xác nhận hiệu lực trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm ^[2].

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

Thức ăn chăn nuôi – Phân lập và định lượng *Bifidobacterium* spp.

Animal feeding stuffs – Isolation and enumeration of Bifidobacterium spp.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các nguyên tắc chung để định lượng vi khuẩn *Bifidobacterium* probiotic trong các mẫu thức ăn chăn nuôi (chất phụ gia, sản phẩm premix và thức ăn chăn nuôi) có chứa *Bifidobacterium* ở dạng đơn lẻ hoặc hỗn hợp với các vi sinh vật khác. Tiêu chuẩn 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:

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

Giới hạn phát hiện được xác định trong TCVN 6404 (ISO 7218).

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 13044:2020

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 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 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

Bifidobacterium (bifidobacteria)

Các vi khuẩn hình thành khuẩn lạc phù hợp với mô tả về các loài này, khi ủ trên môi trường quy định ở 37 °C từ 36 h đến 48 h; trong điều kiện yếm khí.

Hình thái các khuẩn lạc:

- a) tròn;
- b) lồi;
- c) viền đều;
- d) màu kem;
- e) bề mặt láng bóng;
- f) mùi đục.

Đường kính khuẩn lạc thay đổi từ 0,5 mm đến 1 mm.

Kiểm tra các khuẩn lạc được chọn bằng kính hiển vi cho thấy các tế bào có dạng hình que khác nhau.

4 Nguyên tắc

- a) Chuẩn bị các đĩa thạch vô trùng đã làm khô.
- b) Lấy một phần mẫu thử đại diện trong điều kiện vô trùng.
- c) Chuẩn bị huyền phù ban đầu từ phần mẫu thử đồng nhất để thu được các tế bào vi khuẩn phân bố đồng đều.
- d) Chuẩn bị các dịch mẫu pha loãng thập phân tiếp theo từ huyền phù ban đầu để giảm số lượng vi sinh vật trên một đơn vị thể tích và cho phép đếm các khuẩn lạc sau khi ủ.

- e) Cấy các đĩa đã chuẩn bị một lượng các dịch mẫu pha loãng tối ưu và sử dụng que dàn mẫu vô trùng để phân tán dịch cấy.
- f) Lật ngược các đĩa và ủ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, từ 36 h đến 48 h, trong điều kiện yếm khí.
- g) Đếm các khuẩn lạc điển hình, có các đặc điểm của *Bifidobacterium* như đã mô tả ở trên.
- h) Kiểm tra xác nhận hình thể tế bào của các chủng phân lập trong chi *Bifidobacterium* bằng kính hiển vi.
- i) Tính số khuẩn lạc trên gam hoặc kilogam mẫu thức ăn chăn nuôi.

5 Dung dịch pha loãng, môi trường và các đặc trưng kiểu hình

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 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.

5.1.2 Dung dịch pha loãng 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. Chỉnh 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

TCVN 13044:2020

trùng có chứa 9,0 ml ± 0,1 ml dung dịch hoặc sử dụng chai có nắp vặn để tránh hao hụt khối lượng trong quá trình hấp áp lực.

Hấp khử trùng ở 121 °C ± 1 °C trong 15 min. Để dung dịch pha loãng nguội đến nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

5.2 Môi trường

5.2.1 Yêu cầu chung

Có bốn môi trường được sử dụng:

- a) Thạch MRS (de Man, Rogosa và Sharpe);
- b) Thạch MRS có bổ sung triphenyl tetrazolium clorua (TTC);
- c) AMRSA: môi trường thạch MRS đã axit hóa;
- d) Môi trường chọn lọc: Môi trường MRS bổ sung cystein hydroclorua và mupirocin.

Đối với phương pháp định lượng *Bifidobacterium* thông dụng, việc sử dụng thạch MRS là đủ để giả định rằng chủng vi khuẩn probiotic có mặt với số lượng lớn hơn nhiều so với các loại vi sinh vật khác. Đây là môi trường thích hợp cho sự phát triển của các vi khuẩn lactic như *Pediococcus*, *Enterococcus* và *Lactobacillus*. Có thể chọn lọc vi khuẩn bằng cách chỉnh pH, vì *Pediococcus*, *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* chịu được pH thấp hơn *Enterococcus* (pH 5,0 đến pH 6,5) và phát triển được trên môi trường thạch MRS đã axit hóa. Khi dự kiến *Pediococcus* và *Lactobacillus* có mặt, môi trường thạch MRS có bổ sung TTC cho phép phân biệt các khuẩn lạc của *Bifidobacterium* có màu nâu đỏ khác nhau sau khi ủ yếm khí. Môi trường MRS bổ sung mupirocin được chọn dùng cho *Bifidobacterium* và được sử dụng khi các vi khuẩn lactic probiotic khác có mặt với số lượng lớn hơn so với *Bifidobacterium*.

5.2.2 Thành phần

5.2.2.1 Thạch MRS

Thành phần của thạch MRS trên mỗi lít nước cất như sau:

20,0 g dextrose, 10,0 g polypepton, 10,0 g chất chiết thịt, 5,0 g chất chiết nấm men, 5,0 g natri axetat ngậm ba phân tử nước, 2,0 g natri phosphat, 2,0 g tri-amonitrat, 1,0 g Tween 80, 0,2 g magie sulfat ngậm bảy phân tử nước, 0,05 g mangan sulfat ngậm bốn phân tử nước, 15,0 g thạch, pH 6,5 ± 0,2.

CHÚ THÍCH: Có thể sử dụng môi trường thạch MRS Bacto™ *Lactobacillus* của Phòng thử nghiệm Difco hoặc của các nhà cung cấp sản xuất môi trường có thành phần tương tự khác.

5.2.2.2 Thạch MRS có bổ sung TTC**5.2.2.3 AMRSA****5.2.2.4 Môi trường chọn lọc**

Bổ sung dung dịch cystein hydrochlorua 0,05 % (ví dụ: Sigma C-1276 hoặc tương đương) vào thạch MRS (5.2.2.1) để có nồng độ cuối cùng là 50 µg mupirocin trên mililit (ví dụ: Oxoid CT0523B hoặc tương đương).

5.2.3 Chuẩn bị**5.2.3.1 Thạch MRS**

Hòa tất cả các thành phần trong nước cất và khử trùng bằng hấp áp lực ở 121 °C ± 1 °C trong 15 min.

5.2.3.2 Thạch MRS có bổ sung TTC

Hòa 1 g triphenyl tetrazolium clorua (TTC) trong 100 ml nước và lọc vô trùng. Sau khi hấp áp lực, thêm 1 ml dung dịch đã chuẩn bị vào 100 ml môi trường thạch MRS (5.2.3.1) được ủ ở 48 °C ± 1 °C.

CHÚ THÍCH: TTC bị phân hủy do hấp áp lực.

5.2.3.3 AMRSA

Chỉnh pH của thạch MRS đến 5,4 ± 0,1 bằng HCl trước khi hấp áp lực. Khử trùng ở 121 °C ± 1 °C trong 15 min.

5.2.3.4 Môi trường chọn lọc

Bổ sung dung dịch cystein hydrochlorua 0,05 % ((khối lượng/thể tích) (ví dụ: Sigma C-1276 hoặc tương đương) vào môi trường chọn lọc (5.2.2.4)

Để chuẩn bị dung dịch mupirocin, cho vào 50 đĩa (ví dụ: Oxoid CT0523B hoặc tương đương với 200 µg mỗi đĩa), mỗi đĩa 10 ml nước cất ở 37 °C, vô trùng và lắc trong 30 min. Gạn dung dịch ra khỏi các đĩa và thêm vào mỗi đĩa 190 ml môi trường tan chảy được giữ ở nhiệt độ khoảng 48 °C trước khi rót và để khô. Nồng độ mupirocin cuối cùng là 50 µg/ml.

5.3 Đặc trưng kiểu hình

Đặc trưng kiểu hình của *Bifidobacterium* dưới kính hiển vi là các tế bào hình que. Hình thể tế bào có thể được sử dụng để phân biệt *Bifidobacterium* với *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* và *Bacillus*.

TCVN 13044:2020

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Chỉ sử dụng thiết bị, dụng cụ 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 TCVN 6404 (ISO 7218).

6.2 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

Có khả năng duy trì nhiệt độ ở $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4 Thiết bị trộn

Bộ trộn hai tốc độ hoặc có thể điều chỉnh được (18 000 r/min và 22 000 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.

6.6 Cân

Có thể cân chính xác đến 0,01 g.

6.7 Kính hiển vi

Có thể sử dụng kính hiển vi phân pha ở độ phóng đại từ 600x đến 1 000x.

6.8 Bình hoặc chai có nắp vặn có dung tích thích hợp.

6.9 Ống nghiệm có dung tích thích hợp.

6.10 Pipet 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.

6.11 Máy đo pH.

6.12 Đĩa Petri vô trùng, đường kính trong 90 mm.

6.13 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.

6.14 Thiết bị ủ yếm khí

Bình hoặc buồng yếm khí thích hợp.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này.

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 vi sinh vật. Đặc biệt sau khi lấy mẫu các chất phụ gia và sản phẩm premix bổ sung vi sinh vật. 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 vi sinh vật. 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 thì các bên liên quan tự thỏa thuận vấn đề này. TCVN 6952 (ISO 6498) đưa ra các hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử.

9 Cách tiến hành

9.1 Thức ăn chăn nuôi có hệ vi sinh vật probiotic đơn hoặc đa thành phần

Nếu *Bifidobacterium* là thành phần vi khuẩn duy nhất trong thức ăn chăn nuôi thì sử dụng thạch MRS. Nếu chúng chiếm ưu thế hơn so với hệ vi sinh vật bổ sung thì có thể tiến hành trên AMRSA hoặc MRS + TTC hoặc môi trường kháng sinh chọn lọc. Nếu *Bifidobacterium* không chiếm ưu thế thì sử dụng môi trường kháng sinh chọn lọc.

9.2 Chuẩn bị đĩa thạch

Chuẩn bị thạch MRS theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tiến hành axit hóa thạch MRS để chuẩn bị thạch AMRS trước khi hấp áp lực.

Đối với thạch MRS + TTC, hấp áp lực thạch MRS ở $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min, khi môi trường trong nồi cách thủy đã nguội đến nhiệt độ $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, bổ sung TTC đã lọc vô trùng.

TCVN 13044:2020

Làm tan chảy môi trường cơ bản thạch MRS có bổ sung cystein-hydrochlorua vào trước ngày sử dụng và giữ ở $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cho mupirocin (xem 5.2.2.4) vào môi trường ngay trước khi rót.

Rót vào mỗi đĩa Petri (6.12) khoảng 15 ml môi trường trong điều kiện vô trùng và dàn đều để tạo thành một lớp đồng nhất.

Kiểm tra độ vô trùng của các đĩa đã khô.

CẢNH BÁO – Các probiotic có xu hướng lắng nhanh sau khi trộn. Cần tránh điều này bằng cách xử lý các mẫu đồng nhất đúng cách.

Các đĩa đã khô nếu được bảo quản đúng cách tránh bị mất nước, có thể giữ được 2 tuần trong tủ lạnh. Trong trường hợp này, để các đĩa đến nhiệt độ phòng khoảng 30 min trước khi sử dụng.

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

Cân $20\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ chất phụ gia hoặc sản phẩm premix và $50\text{ g} \pm 0,5\text{ g}$ mẫu thức ăn chăn nuôi cho vào bát trộn vô trùng. Thêm vào 180 ml hoặc 450 ml dung dịch muối đệm ở nhiệt độ phòng.

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

Trộn các chất phụ gia và sản phẩm premix trong 3 min ở tốc độ cao (xem 6.4) và pha loãng ngay.

CẢNH BÁO – Các probiotic có xu hướng lắng nhanh sau khi trộn. Cần tránh điều này bằng cách xử lý các mẫu đồng nhất đúng cách.

Trộn thức ăn chăn nuôi trong 1 min ở tốc độ cao (xem 6.4); bắt đầu trộn ở tốc độ thấp để tránh bị bắn tung tóe, sau đó bật công tắc chuyển sang tốc độ cao. Để yên mẫu trong 30 min. Điều quan trọng là thức ăn được viên lại để hấp thụ chất lỏng. Trộn trong 2 min ở tốc độ cao (xem 6.4) và pha loãng ngay, sử dụng pipet có đầu hút lỗ rộng.

CHÚ THÍCH 2: 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.

Trong trường hợp các sản phẩm dạng viên nang, phải sử dụng các chất phụ gia phù hợp (ví dụ: polyoxyetylen-sorbitanmonooleat; hoặc tương đương) ở nhiệt độ thích hợp (ví dụ: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$).

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

Chuẩn bị một dãy các dịch mẫu pha loãng thích hợp (dãy dịch mẫu pha loãng) sử dụng pipet vô trùng, ví dụ bộ phân phối dung môi micro cài đặt ở mức 1 ml. Chuyển 1 ml huyền phù ban đầu vào ống

nghiệm chứa 9 ml dung dịch muối pepton vô trùng đã để đến nhiệt độ phòng và trộn bằng máy trộn Vortex trong 5 s. Lặp lại quy trình này sử dụng dịch mẫu pha loãng 10^{-2} và chuẩn bị các dịch mẫu pha loãng 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 9.4.

Kiểm tra trước để xác định hàm lượng đồng trong huyền phù ban đầu. Hàm lượng đồng vượt quá 200 mg/kg thì cần sử dụng các thuốc thử tạo phức, ví dụ: axit iminodioxetic ở nồng độ thích hợp liên quan đến giá trị pH.

9.4 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 đều nhanh dung dịch trên bề mặt môi trường bằng que dàn mẫu vô trùng.

Lật ngược các đĩa rồi xếp thành chồng và ủ yếm khí ở 37 °C từ 36 h đến 48 h.

CẢNH BÁO – Dịch mẫu pha loãng thích hợp đã chọn phải đồng nhất trước khi cấy mẫu vào các đĩa

9.5 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 để định lượng số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU).

Đếm các khuẩn lạc *Bifidobacterium* giả định trên các đĩa và lấy giá trị trung bình để tính số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mỗi gam thức ăn chăn nuôi theo TCVN 6404 (ISO 7218).

9.6 Hình thể tế bào – khẳng định

Tùy thuộc vào số lượng các khuẩn lạc có hình thái khác nhau xuất hiện sau khi ủ, mỗi kiểu hình thái chọn ngẫu nhiên từ 2 khuẩn lạc đến 5 khuẩn lạc.

Lấy một khuẩn lạc, hòa các tế bào vào 20 µl PBS trên một lam kính, đẩy lam lên và quan sát bằng vật kính dầu của kính hiển vi ở độ phóng đại từ 600x đến 1 000x. Nếu các tế bào hình que có nhiều dạng khác nhau: ngắn, đều, mỏng có các đầu nhọn, tròn đều, dài có uốn cong hoặc nhô ra hoặc có nhiều nhánh lớn; nhọn, dạng thùy hơi phân nhánh hoặc các đầu hình thìa; đơn lẻ hoặc trong các chuỗi nhiều hình dạng; trong các tập hợp hình sao hoặc các cụm tế bào được xếp theo hình chữ V hoặc hình que xếp song song, thì các tế bào này được coi là *Bifidobacterium*.

Nếu phát hiện các khuẩn lạc có đặc điểm khác trong quá trình khẳng định thì cần lặp lại phép phân tích với môi trường chọn lọc hơn (môi trường MRS + TTC, môi trường AMRSA, môi trường kháng sinh chọn lọc).

TCVN 13044:2020

10 Biểu thị kết quả

Trung bình số đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) trên mỗi gam thức ăn chăn nuôi đối với vi khuẩn hình thành các khuẩn lạc điển hình trên môi trường quy định và biểu hiện hình thái điển hình, được tính theo TCVN 6404 (ISO 7218).

Số lượng *Bifidobacterium*. spp trên mỗi gam hoặc mỗi mililit, N , được tính bằng Công thức (1):

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

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

V là thể tích dịch cấy được sử dụng cho mỗi đĩa, tính bằng mililit (ml);

n_1 là số đĩa đếm được ở độ pha loãng thứ nhất;

n_2 là số đĩa đếm được ở độ pha loãng thứ hai;

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.

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], [2]) 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 lượng *Bifidobacterium* 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 lượng *Bifidobacterium* 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
- 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.
- h) môi trường (xem 5.2.1).

Phụ lục A
(Tham khảo)

Lưu ý về cách tiến hành

Môi trường thạch MRS cho phép tất cả các vi khuẩn lactic và cả các loài vi sinh vật khác phát triển. Việc bổ sung TTC vào thạch MRS là cách tốt nhất để phân biệt, ví dụ: *Bifidobacterium* có màu đỏ khác nhau sau khi ủ yếm khí.

Trên môi trường thạch MRS đã axit hóa (AMRSA) các vi sinh vật khác ngoài *Bifidobacterium* được sử dụng làm phụ gia thức ăn chăn nuôi như vi khuẩn *Enterococcus* hoặc *Bacillus* không hình thành khuẩn lạc. Chỉ một số loại nấm men, nấm mốc hoặc vi khuẩn *Lactobacillus* và *Pediococcus* là có thể hình thành các khuẩn lạc trong các điều kiện quy định.

Cần sử dụng môi trường MRS chọn lọc bổ sung mupirocin nếu *Bifidobacterium* có nồng độ thấp hơn các vi sinh vật probiotic khác.

Chất chống nấm như nystatin (50 U/ml) có thể được thêm vào thạch MRS, AMRSA hoặc MRS + TTC để ức chế nấm mốc và nấm men.

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 11 nước châu Âu tham gia tiến hành ở hai mức nhiễm khác nhau (thấp và cao). Phép thử được tổ chức vào năm 2002 và được phối hợp cùng Phòng thử nghiệm Khoa học Trung tâm ^[1]. Đối với nghiên cứu liên phòng thử nghiệm, các mẫu thử đồng nhất được chuẩn bị bằng cách sử dụng thức ăn chăn nuôi có chứa *Bifidobacterium* là thành phần duy nhất trong các mẫu bị nhiễm ở mức cao (tùy thuộc vào môi trường được sử dụng đối với MRS là $6,6 \times 10^6$ và môi trường *Bifidobacterium* chọn lọc là $9,5 \times 10^7$) và kết hợp với vi khuẩn *Pediococcus* trong mẫu thử cô đặc thấp hơn (tùy thuộc vào môi trường được sử dụng, đối với MRS là $1,3 \times 10^5$ và môi trường *Bifidobacterium* chọn lọc là $1,9 \times 10^6$). Dữ liệu độ chụm thu được từ phép thử được tóm tắt trong Bảng B.1.

Bảng B.1 – Dữ liệu độ chụm thu được từ nghiên cứu cộng tác ^{[1],[2]}

Thông số	Mẫu							
	MRSA (5.2.2.1)		MRSA + TTC (5.2.2.2)		AMRSA (5.2.2.3)		BSM (5.2.2.4)	
	Mức thấp	Mức cao	Mức thấp	Mức cao	Mức thấp	Mức cao	Mức thấp	Mức cao
Số lượng mẫu	2	2	2	2	2	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	5	5	7	9	6	9	8	10
Giá trị trung bình, tính bằng \log_{10} CFU/g	5,30	7,69	5,22	7,49	5,08	7,53	5,27	7,81
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , tính bằng \log_{10} CFU/g	0,15	0,13	0,27	0,18	0,31	0,12	0,33	0,09
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, CV_r , tính bằng %	2,90	1,74	5,26	2,42	6,11	1,60	6,30	1,19
Giới hạn lặp lại, r	0,43	0,38	0,77	0,51	0,87	0,34	0,93	0,26
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , tính bằng \log_{10} CFU/g	0,24	0,25	0,29	0,39	0,44	0,26	0,35	0,21
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, CV_R , tính bằng %	4,52	3,30	5,51	5,21	8,74	3,50	6,55	2,62
Giới hạn tái lập, R	0,67	0,71	0,81	1,09	1,24	0,74	0,97	0,57

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, V. Coeuret, P. Simpson, R.P. Ross, C. Stanton. 2003. A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic bifidobacteria in animal feed. Int. J. Food Microbiol. 83, 161-170
 - [3] Council Directive (79/373/EEC) of 2 April 1979 on the marketing of compound feeding stuffs (OJ No L)
 - [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*
-