

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 13046:2020**

Xuất bản lần 1

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

*Animal feeding stuffs –*

*Isolation and enumeration of Lactobacillus spp.*

**HÀ NỘI - 2020**

**Lời nói đầu**

TCVN 13046:2020 được xây dựng trên cơ sở tham khảo EN 15787:2009;

TCVN 13046:2020 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 vi khuẩn *Latobacillus probiotic* nhằm kiểm soát việc ghi nhãn đúng cách các sản phẩm thức ăn chăn nuôi <sup>[1]</sup>. Phương pháp được mô tả đã được xác nhận hiệu lực trong một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm <sup>[2]</sup>.

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

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

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định các nguyên tắc chung để định lượng vi khuẩn *Lactobacillus* probiotic trong các mẫu thức ăn chăn nuôi (chất phụ gia, sản phẩm premix và thức ăn chăn nuôi) có chứa *Lactobacillus* ở dạng đơn lẻ hoặc trong 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 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 chứa khoảng  $10^{10}$  đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU)/g;
- b) Các sản phẩm premix chứa khoảng  $10^8$  CFU/g;
- c) Thức ăn chăn nuôi dạng bột hoặc dạng viên, chứa khoảng  $10^6$  CFU/g bao gồm cả các loại thức ăn chăn nuôi hoàn chỉnh và 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 13046:2020

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

***Lactobacillus*** (lactobacilli)

Các vi khuẩn hình thành các khuẩn lạc phù hợp với mô tả về các loài này trên môi trường chọn lọc quy định sau khi ủ từ 48 h đến 72 h ở nhiệt độ 37 °C trong điều kiện yếm khí <sup>[4]</sup>.

Hình thái của khuẩn lạc:

- a) tròn;
- b) đều hoặc không đều (giống hình sao);
- c) lồi hoặc hình nón;
- d) bề mặt mờ đục hoặc láng bóng;
- e) đục, trắng, xanh nhạt, xanh đậm.

Đường kính khuẩn lạc thay đổi từ 0,5 mm đến 3 mm.

Kiểm tra các khuẩn lạc được chọn bằng kính hiển vi cho thấy các tế bào thay đổi từ hình que dài và mảnh, đôi khi cong, đến ngắn, thường là dạng trung gian giữa cầu khuẩn và trực khuẩn, tạo chuỗi là phổ biến.

CHÚ THÍCH: Đối với hình thái cụ thể, xem Tài liệu tham khảo [4].

### 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 48 h đến 72 h, trong điều kiện yếm khí.
- g) Đếm các khuẩn lạc điển hình, có các đặc điểm *Lactobacillus* như đã mô tả ở trên.
- h) Kiểm tra xác nhận hình thể tế bào của các chủng phân lập trong chi *Lactobacillus* 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 chọn lọc và đặc trưng kiểu hình

### 5.1 Dung dịch pha loãng

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

Dung dịch pha loãng này được sử dụng để chuẩn bị dãy dung dịch 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).

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 trên một lít nước cất. Hòa tan các thành phần vào nước. Chính đến pH  $7,0 \pm 0,2$  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 nắp vặn để tránh hao hụt khối lượng trong quá trình hấp áp lực.

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.

## TCVN 13046:2020

### 5.2 Môi trường

#### 5.2.1 Yêu cầu chung

Có bốn môi trường được sử dụng:

- Môi trường MRS (de Man, Rogosa và Sharpe);
- Môi trường MRS có bổ sung triphenyl tetrazolium clorua (TTC);
- Môi trường AMRSA: thạch MRS đã axit hóa;
- Môi trường LAMVAB: Môi trường MRS kỵ khí *Lactobacillus* có chứa kháng sinh vancomycin và xanh bromocresol.

Đối với phương pháp định lượng *Lactobacillus* thông dụng, việc sử dụng thạch MRS sẽ đủ để giả định rằng chủng 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 *Lactobacillus*, *Enterococcus* và *Pediococcus*. Việc chọn có thể được thực hiện bằng cách chỉnh pH, vì *Lactobacillus* chịu được pH thấp hơn *Enterococcus* (pH 5,0 đến pH 6,5), *Pediococcus* phát triển tốt nhất trong dải này. Khi dự kiến *Enterococcus* có mặt ở nồng độ tương tự như *Lactobacillus*, cần sử dụng thạch MRS đã axit hóa (AMRSA). Khi dự kiến *Lactobacillus* kết hợp với *Pediococcus*, thì thạch MRS có bổ sung TTC cho phép phân biệt các khuẩn lạc có màu khác nhau sau khi ủ yếm khí. LAMVAB là môi trường được lựa chọn đối với *Lactobacillus*.

#### 5.2.2 Thành phần

##### 5.2.2.1 Thạch MRS

Thành phần của thạch MRS trên mỗi lít nước cất như sau <sup>[5]</sup>:

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-amoni xitrat, 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 6,2 ± 0,2.

##### 5.2.2.2 Thạch MRS có bổ sung TTC

##### 5.2.2.3 AMRSA

##### 5.2.2.4 LAMVAB

Môi trường gồm có ba thành phần khác nhau:

- Dung dịch A: Canh thang MRS nồng độ 104,4 g/l có chứa xcystein hydrochlorua (0,5 g/l) và xanh bromocresol (0,05 g/l).

b) Dung dịch B: Thạch nồng độ 40 g/l.

c) Dung dịch C: vancomycin hydrochlorua nồng độ 2 mg/ml (khoảng 1 000 µg/mg) trong nước cất.

### 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  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 (xem 5.2.3.1) được ủ ở  $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

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

#### 5.2.3.3 AMRSA

Chỉnh pH của thạch MRS bằng HCl đến pH  $5,4 \pm 0,1$  trước khi hấp áp lực. Khử trùng ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 15 min.

#### 5.2.3.4 LAMVAB

Chỉnh pH của dung dịch A đến pH  $5,0 \pm 0,1$  bằng HCl.

Khử trùng dung dịch A và B ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 15 min. Khử trùng dung dịch C bằng cách lọc qua bộ lọc cỡ lỗ 0,2 µm. Dung dịch C ổn định ít nhất ba tháng trong tủ lạnh.

Chuẩn bị môi trường liên quan đến quá trình khử trùng các thể tích bằng nhau của dung dịch A và B. Làm nguội dung dịch B về  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong tủ ấm hoặc nổi cách thủy. Làm nguội dung dịch A về nhiệt độ phòng. Thêm 10 ml dung dịch C vô trùng vào 500 ml dung dịch A này. Cuối cùng, thêm dung dịch B vào hỗn hợp MRS-vancomycin (A+C). Đổ đĩa ngay sau khi trộn. Quy trình này cho nồng độ vancomycin cuối cùng là 20 mg/l.

### 5.3 Đặc trưng kiểu hình

Nhuộm Gram, quan sát vi khuẩn bằng kính hiển vi và thử phản ứng catalase. Nhờ một giọt hydro peroxit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) lên khuẩn lạc nếu xuất hiện các bọt khí thì phản ứng dương tính. Chỉ xem xét các vi khuẩn dạng đều, hình que Gram dương không bào tử, âm tính với catalase và hiếu khí không bắt buộc.

## 6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

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



## **TCVN 13046:2020**

### **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 sấy**

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

### **6.3 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 được khử trùng ở  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong 1 h trong tủ sấy.

### **6.4 Máy khuấy cơ học**

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

### **6.5 Cân**

Có khả năng cân chính xác đến 0,01 g.

### **6.6 Bình hoặc chai có nắp vận có dung tích thích hợp.**

### **6.7 Ống nghiệm có dung tích thích hợp.**

### **6.8 Pipet và đầu tip vô trùng để phân phối 100 $\mu\text{l}$ 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 Máy đo pH**

### **6.10 Đĩa Petri vô trùng, đường kính trong 90 mm.**

### **6.11 Thiết bị ủ yếm khí**

Bình hoặc buồng yếm khí thích hợp.

### **6.12 Tủ cấy vi sinh**

### **6.13 Nồi cách thủy**

Có khả năng duy trì nhiệt độ từ  $48\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **6.14 Kính hiển vi**

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

### 6.15 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.

## 7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 11923 (ISO/TS 17728) [7].

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 có 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 *Lactobacillus* là thành phần vi khuẩn duy nhất trong thức ăn chăn nuôi thì sử dụng thạch MRS hoặc AMRSA hoặc 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 LAMVAB. Nếu *Lactobacillus* không chiếm ưu thế thì sử dụng LAMVAB.

### 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.

Để chuẩn bị thạch LAMVAB, bổ sung vancomycin từ dung dịch gốc vô trùng vào môi trường ngay trước khi rót.

## TCVN 13046:2020

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.

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.

Các đĩa đã khô nếu được bảo quản đúng cách tránh 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.

Huyền phù ban đầu luôn phải đồng nhất (xem cảnh báo trong 9.3).

### 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 dạng thông thường hoặc  $2\text{ g} \pm 0,01\text{ g}$  chất phụ gia dạng vi hạt (dạng viên nang) và  $50\text{ g} \pm 0,5\text{ g}$  mẫu thức ăn chăn nuôi cho vào bát của bộ trộn vô trùng. Thêm 180 ml hoặc 450 ml dung dịch muối đệm ở nhiệt độ phòng. Tùy thuộc vào cỡ viên nang mà sử dụng một lượng vật liệu mẫu thích hợp trong huyền phù ban đầu.

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

Để phép phân tích lặp lại tốt thì số lượng viên nang phải nhiều hơn 25, để thu được độ lệch chuẩn (SD) nhỏ hơn 20 %.

Trộn các chất phụ gia và sản phẩm premix trong 3 min ở tốc độ cao (xem 6.3) và pha loãng ngay.

Trộn thức ăn chăn nuôi trong 1 min ở tốc độ cao (xem 6.3); bắt đầu trộn ở tốc độ thấp để tránh bị bắn tung tóe, sau đó bật công tắc 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 6.3) và pha loãng ngay bằng 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 hoặc tương đương) 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 sorbitan monooleat hoặc tương đương) với nhiệt độ thích hợp (ví dụ:  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Khối lượng của thể tích pipet đã hút phải được hiệu chuẩn để thu được hệ số hiệu chỉnh dùng cho việc tính số đếm loài *Lactobacillus*.

**CẢNH BÁO** – Huyền phù có chứa vi khuẩn 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 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. 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.

CHÚ THÍCH 3: Cần kiểm tra trước 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 iminodiacetic 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, sử dụng que dàn mẫu vô trùng.

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

Lật ngược các đĩa rồi xếp thành chồng và ủ yếm khí ở  $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  từ 48 h đến 72 h.

#### 9.5 Đếm khuẩn lạc

Sau khi ủ trong các điều kiện quy định ở trên, sử dụng tất cả 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 dương tính với *Lactobacillus* già 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 hình thái khuẩn lạc khác nhau xuất hiện sau khi ủ, mỗi kiểu hình thái chọn ngẫu nhiên từ 2 khuẩn lạc đến 5 khuẩn lạc. Một nửa khuẩn lạc được nhuộm Gram và quan sát bằng kính hiển vi. Nửa còn lại được thử nghiệm về catalase.

Vi khuẩn âm tính với catalase, dạng đều và vi khuẩn Gram dương hình que không bào tử được coi là *Lactobacillus*.

Nếu phát hiện các khuẩn lạc không phù hợp với điều này thì lặp lại phép phân tích với thạch AMRSA và/hoặc thạch LAMVAB. Trong trường hợp có mặt nấm men thì thêm nystatin vào thạch.

## TCVN 13046:2020

### 10 Biểu thị kết quả

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

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

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

$\sum C$  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 các 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 <sup>[1],[2]</sup> 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 *Lactobacillus* 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 vi khuẩn lactobacilli 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.

## Phụ lục A

(Tham khảo)

### Các lưu ý về cách tiến hành

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

Trên thạch MRS đã axit hóa (AMRSA), các vi sinh vật khác *Lactobacillus* được sử dụng làm phụ gia thức ăn chăn nuôi như *Enterococcus* hoặc *Bacillus* không thành thành khuẩn lạc. Chỉ một số loại nấm men, nấm mốc hoặc vi khuẩn *Pediococcus* là có thể hình thành các khuẩn lạc trong các điều kiện quy định. Các khuẩn lạc không phải là *Lactobacillus* có thể dễ phân biệt được do hình thái khuẩn lạc khác nhau hoặc kiểm tra bằng kính hiển vi.

Tất cả các loại vi khuẩn probiotic *Lactobacillus* được cho phép sử dụng trong các sản phẩm thức ăn chăn nuôi đều phát triển trên LAMVAB, đây là môi trường chọn lọc đối với *Lactobacillus*. Tuy nhiên, trong số 88 loài *Lactobacillus*, có một số loài không phát triển tốt hoặc không có trên LAMVAB (ví dụ: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* và một số chủng *Lactobacillus acidophilus*). Trên thạch LAMVAB, hầu hết các vi sinh vật khác được sử dụng làm phụ gia thức ăn không thể hình thành khuẩn lạc và chỉ một số loại nấm men, nấm mốc hoặc vi khuẩn *Pediococcus* có thể phát triển trong các điều kiện quy định. Các khuẩn lạc này có thể dễ phân biệt được bằng cách quan sát bằng kính hiển vi và không được sử dụng để đếm khuẩn lạc.

Chất chống nấm như nystatin (50 U/ml) có thể được thêm vào thạch MRS, AMRSA hoặc LAMVAB để ức chế nấm mốc và nấm men nhưng điều này có thể làm giảm cỡ khuẩn lạc của *Lactobacillus*.

**Phụ lục B**

(Tham khảo)

**Kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm**

Một nghiên cứu liên phòng thử nghiệm gồm có 20 phòng thí nghiệm của 11 nước châu Âu tham gia tiến hành ở hai mức nhiễm khác nhau. Nghiên cứu được tổ chức vào năm 2002 và được phối hợp cùng Phòng thử nghiệm Khoa học Trung tâm <sup>[1],[2]</sup>. Đối với nghiên cứu liên phòng thử nghiệm, các mẫu thử đồng nhất được chuẩn bị bằng cách sử dụng mẫu thức ăn chăn nuôi có chứa vi khuẩn lactobacillus cùng với pediococcus, enterococcus và nấm men khoảng từ  $2 \times 10^7$  CFU/g (mức thấp) đến  $1 \times 10^8$  CFU/g (mức cao) đã được phân tích. Dữ liệu độ chụm thu được từ nghiên cứu được tóm tắt trong Bảng B.1.

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

Thông số	Mẫu			
	MRSA (5.2.2.1)		MRSA + TTC (5.2.2.2)	
	Mức thấp	Mức cao	Mức thấp	Mức cao
Số lượng mẫu thử	2	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	11	11	9	11
Giá trị trung bình, tính bằng $\log_{10}$ CFU/g	7,51	8,00	7,50	7,91
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$ , tính bằng $\log_{10}$ CFU/g	0,24	0,24	0,26	0,12
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $CV_r$ , tính bằng %	3,14	2,96	3,42	1,46
Giới hạn lặp lại, $r$ ( $= 2,8 \times s_r$ )	0,66	0,66	0,72	0,32
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ , tính bằng $\log_{10}$ CFU/g	0,38	0,29	0,39	0,32
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $CV_R$ tính bằng %	5,00	3,63	5,21	4,02
Giới hạn tái lập, $R$ ( $= 2,8 \times s_R$ )	1,05	0,81	1,10	0,89



Bảng B.1 (Kết thúc)

Thông số	Mẫu			
	AMRSA (5.2.2.3)		LAMVAB (5.2.2.4)	
	Mức thấp	Mức cao	Mức thấp	Mức cao
Số lượng mẫu thử	2	2	2	2
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	10	9	7	7
Giá trị trung bình, tính bằng $\log_{10}$ CFU/g	7,40	8,03	7,02	7,68
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$ , tính bằng $\log_{10}$ CFU/g	0,24	0,10	0,24	0,24
Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại, $CV_r$ , tính bằng %	3,21	1,24	3,39	3,13
Giới hạn lặp lại, $r$ ( $= 2,8 \times s_r$ )	0,67	0,28	0,67	0,67
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ , tính bằng $\log_{10}$ CFU/g	0,35	0,18	0,34	0,24
Độ lệch chuẩn tương đối tái lập, $CV_R$ tính bằng %	4,75	2,24	4,82	3,13
Giới hạn tái lập, $R$ ( $= 2,8 \times s_R$ )	0,99	0,50	0,95	0,67

**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, J.-P. Vernoux, M. Gueguen. 2003. A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic lactobacilli in animal feed. Food Microbiol. 80, 131-143
  - [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] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2 (ISBN 0-683-07893-3) by O.Kandler and N.Weiss, chapter "Genus Lactobacilli"
  - [5] Man J.C., de Rogosa, M. and E.M. Sharpe. 1960. Appl. Bact. 23, 130-135
  - [6] TCVN 4325 (ISO 6497), *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu*
  - [7] 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*
-