

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9330-1 : 2012

ISO 14461-1:2005

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – KIỂM SOÁT
CHẤT LƯỢNG TRONG PHÒNG THỬ NGHIỆM VI SINH VẬT
PHẦN 1: ĐÁNH GIÁ NĂNG LỰC THỰC HIỆN
ĐẾM KHUẨN LẠC**

*Milk and milk products -- Quality control in microbiological laboratories –
Part 1: Analyst performance assessment for colony counts*

HÀ NỘI - 2012

Lời nói đầu

TCVN 9330-1:2012 hoàn toàn tương đương với ISO 14461-1:2005;

TCVN 9330-1:2012 do Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 9330:2012 *Sữa và sản phẩm sữa – Kiểm soát chất lượng trong phòng thử nghiệm vi sinh vật* gồm có các phần sau đây:

- TCVN 9330-1:2012 *Sữa và sản phẩm sữa – Kiểm soát chất lượng trong phòng thử nghiệm vi sinh vật – Phần 1: Đánh giá năng lực thực hiện đếm khuẩn lạc*;
- TCVN 9330-1:2012 *Sữa và sản phẩm sữa – Kiểm soát chất lượng trong phòng thử nghiệm vi sinh vật – Phần 2: Xác định độ tin cậy số đếm khuẩn lạc của các đĩa song song và các bước pha loãng liên tiếp*.

Lời giới thiệu

Mỗi phương pháp vi sinh vật bao gồm một số bước kế tiếp theo trình tự cụ thể (lấy mẫu con, pha loãng mẫu, đổ đĩa và đếm khuẩn lạc). Độ không đảm bảo đo của kết quả cuối cùng được xác định bởi tính biến thiên của tất cả các bước liên quan trong quy trình phân tích.

Để thu được các kết quả có độ không đảm bảo đo không quá lớn so với kết quả dự kiến khi thực hiện đúng phương pháp, người phân tích cần tuân thủ các quy định của Thực hành phòng thử nghiệm tốt (GLP).

Có ba yếu tố quan trọng nhất để đạt được số đếm đĩa chính xác là:

- tính đồng nhất của vật liệu mẫu,
- tính chính xác của các bước pha loãng,
- kỹ thuật cấy và/hoặc đếm khuẩn lạc ở các đĩa nuôi cấy.

Có thể đánh giá khả năng thực hiện kỹ thuật đếm khuẩn lạc của phòng thử nghiệm và đưa ra độ biến thiên mong muốn của phương pháp bằng cách đồng hóa kỹ vật liệu mẫu, tạo nhiều dãy dịch pha loãng và cấy một số đĩa từ cùng một dịch pha loãng.

Độ biến thiên quá lớn cho thấy ít nhất một trong các bước khi thực hiện phương pháp nằm ngoài tầm kiểm soát. Xác định các bước này bằng cách so sánh các đĩa nuôi cấy lặp lại, các dịch pha loãng khác nhau và các dãy pha loãng khác nhau. Khi phát hiện các bước của phương pháp phân tích có sự biến thiên quá lớn, phải tiến hành các biện pháp cần thiết để kiểm soát các bước trên.

Sữa và sản phẩm sữa – Kiểm soát chất lượng trong phòng thử nghiệm vi sinh vật – Phần 1: Đánh giá năng lực thực hiện đếm khuẩn lạc

*Milk and milk products – Quality control in microbiological laboratories –
Part 1: Analyst performance assessment for colony counts*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra quy trình kiểm tra năng lực thực hiện đếm khuẩn lạc trong phòng thử nghiệm bằng cách thiết lập độ biến thiên nội bộ phòng thử nghiệm và xác định các bước có liên quan đến độ biến thiên quá mức của các kết quả.

Quy trình này thích hợp để kiểm tra việc tuân thủ chính xác Thực hành phòng thử nghiệm tốt (GLP) và cũng là một điều kiện tiên quyết để tham gia kiểm tra phương pháp đếm khuẩn lạc trong phép thử liên phòng.

VÍ DỤ: Các mẫu kiểm tra thích hợp là sữa tươi nguyên liệu, sữa thanh trùng và sữa bột.

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 6263 (ISO 8261) *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn chung về chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật*

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 7150-4 (ISO 835-4) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ – Phần 4: Pipet kiểu thổi ra*¹⁾

¹⁾ Bộ tiêu chuẩn TCVN 7150:2002 (ISO 835:1981) (gồm 4 phần) đã được hủy bỏ và được thay thế bằng TCVN 7150:2007 (ISO 835:2007) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet chia độ*.

TCVN 9330-1:2012

TCVN 7151:2002 (ISO 648:1977) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet một mức*²⁾

TCVN 8488 (ISO 4788) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Ống đong chia độ*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Kỹ thuật đếm khuẩn lạc (colony-count technique)

Việc đếm số lượng vi sinh vật được xác định bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Số lượng vi sinh vật được biểu thị theo gam hoặc mililit mẫu thử.

4 Nguyên tắc (xem Hình 1)

4.1 Mẫu phân tích được đồng hóa sau đó được pha loãng đến nồng độ làm việc thích hợp (ví dụ: 500 CFU/ml đến 10 000 CFU/ml) để thu được huyền phù.

4.2 Từ dung dịch pha loãng đầu tiên, chuẩn bị 4 dãy pha loãng, mỗi dãy gồm 12 bước pha loãng nhị phân.

CHÚ THÍCH: Sử dụng các bước pha loãng nhị phân (hai lần), không phải các bước pha loãng thập phân (10 lần) như tiến hành thông thường. Với các dung dịch pha loãng nhị phân, có thể đếm khuẩn lạc trên các đĩa với 5 hoặc 6 dung dịch pha loãng, một số lớn khuẩn lạc sẽ cải thiện đáng kể việc kiểm tra các bước pha loãng.

4.3 Mỗi dung dịch pha loãng của mỗi dãy pha loãng được đổ ra 3 đĩa song song.

4.4 Ủ ấm các đĩa.

4.5 Mã hóa các đĩa và đếm số khuẩn lạc trên mỗi đĩa.

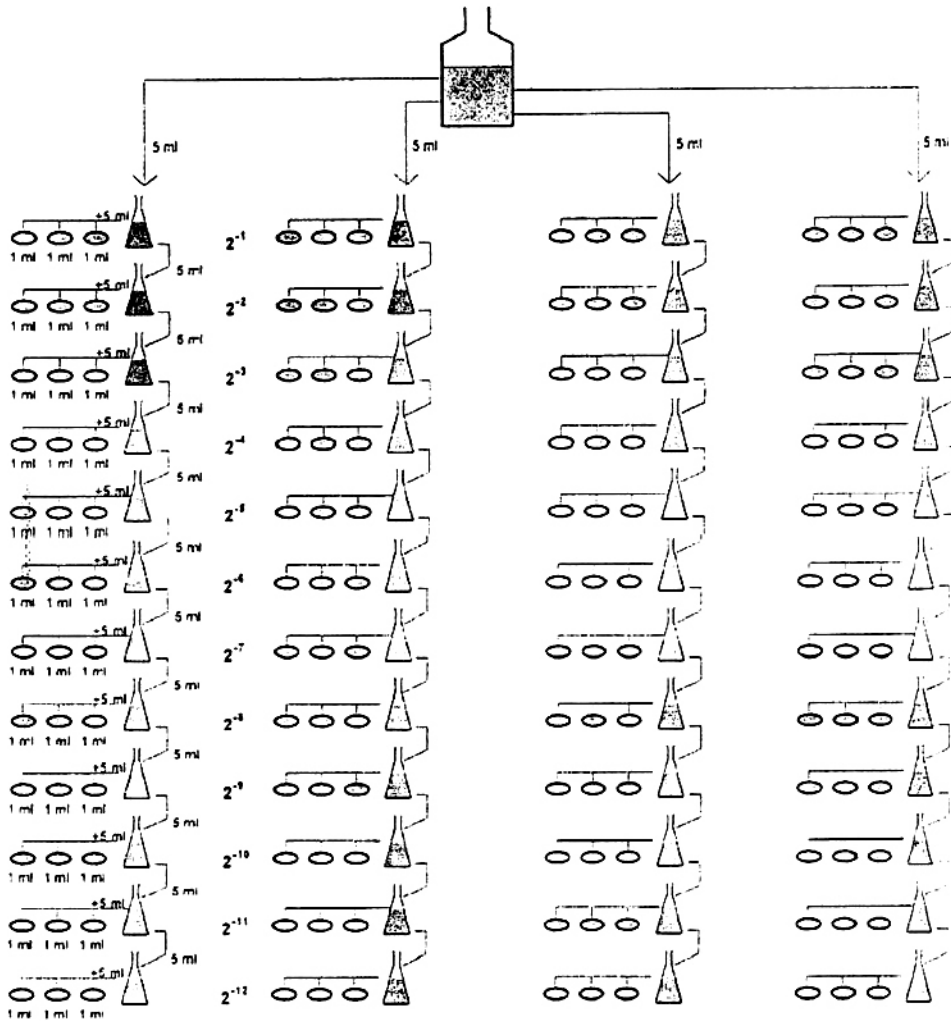
4.6 Lập bảng các số đếm khuẩn lạc và tính toán "tính đồng nhất có ý nghĩa thống kê" theo hai bước.

4.7 Nếu các giá trị thu được là đồng nhất có ý nghĩa thống kê thì chất lượng của việc ứng dụng phương pháp là thỏa mãn và không cần tiến hành các đánh giá tiếp theo.

4.8 Nếu các kết quả không đồng nhất có ý nghĩa thống kê thì tiến hành kỹ thuật phân tích phương sai (ANOVA) để xác định sự biến thiên của kết quả trong điều kiện một hoặc nhiều yếu tố đã bị thay đổi (nghĩa là: dãy pha loãng, mức pha loãng, việc đổ đĩa). Tiến hành các đánh giá tiếp theo và điều chỉnh các yếu tố đã được nhận diện.

CHÚ THÍCH: Người sử dụng phải thiết kế các nguồn phát sinh lỗi chủ yếu trong khi thực hiện phương pháp.

²⁾ TCVN 7151:2002 (ISO 648:1977) đã được hủy bỏ và được thay thế bằng TCVN 7151:2010 (ISO 648:2008) *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Pipet một mức*.



**Hình 1 – Đảm bảo chất lượng phòng thử nghiệm vi sinh vật:
Thiết kế nghiên cứu thăm dò cho phương pháp đếm khuẩn lạc**

5 Dung dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Các thao tác được mô tả trong Điều này và trong Điều 9 phải được tiến hành bởi một nhân viên chuẩn bị môi trường riêng biệt hoặc được chia đều trong nhóm với sự phân công nhiệm vụ rõ ràng cho mỗi thành viên.

Chỉ sử dụng các thuốc thử đạt chất lượng phân tích và nước cất hoặc nước ít nhất có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác. Các thuốc thử và nước phải không chứa các cơ chất có thể tác động ngược đến sự phát triển của vi sinh vật trong các điều kiện phân tích. Môi trường nuôi cấy phải

TCVN 9330-1:2012

được công nhận về chất lượng vi khuẩn học. Môi trường khử nước phải được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

5.1 Dung dịch natri hydroxit hoặc axit clohydric (khoảng 0,1 mol/l), để chỉnh pH của chất pha loãng và môi trường nuôi cấy.

5.2 Môi trường nuôi cấy: thạch trypton-glucoza-chất chiết nấm men, được bổ sung sữa bột gầy.

5.2.1 Thành phần

Chất chiết nấm men	2,5 g
Dịch thủy phân tryptic của casein (trypton)	5,0 g
Glucoza ngậm một phân tử nước ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)	1,0 g
Sữa bột gầy	1,0 g
Thạch	10 g đến 15 g ^a
Nước	1 000 ml
^a Phụ thuộc vào sức đông của thạch	

Trong tất cả các trường hợp, cần phải thêm sữa bột gầy cho dù là môi trường hoàn chỉnh khô thương mại và nhà cung cấp khuyến nghị không cần phải bổ sung.

5.2.2 Chuẩn bị

Cần chuẩn bị 2 lit môi trường của cùng một lô. Nếu sử dụng môi trường hoàn chỉnh khô thương mại thì tuân thủ hướng dẫn của nhà sản xuất nhưng phải bổ sung sữa bột gầy. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng đạt $7,0 \pm 0,2$ ở khoảng $45^\circ C$.

Nếu môi trường được chuẩn bị từ các thành phần cơ bản khô thì hòa tan và phân phối vào nước đã được làm nóng trước theo thứ tự sau: chất chiết nấm men, trypton, glucoza và cuối cùng là sữa bột gầy. Đun nóng để hòa tan và phân phối môi trường. Bổ sung thạch và đun đến sôi, vừa đun vừa khuấy đến khi hòa tan hoàn toàn. Hoặc có thể đun sôi hỗn hợp trong 30 min. Lọc môi trường qua giấy lọc, nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng đạt $7,0 \pm 0,2$ ở khoảng $45^\circ C$.

Phân phối 250 ml môi trường nuôi cấy vào các chai (6.10). Khử trùng các chai cùng lúc trong nồi hấp áp lực (6.1) ở $121^\circ C$ trong 15 min.

Bảo quản môi trường đã chuẩn bị nơi tối ở nhiệt độ từ $0^\circ C$ đến $5^\circ C$ và sử dụng trong vòng 1 tháng.

5.3 Các chất pha loãng: dung dịch muối/pepton hoặc dung dịch Ringer một phần tư cho mỗi lô.

5.3.1 Dung dịch muối/pepton

Chất pha loãng này được dùng cho các mục đích chung.

5.3.1.1 Thành phần

Pepton	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Thêm nước đến	1000 ml

5.3.1.2 Chuẩn bị

Hòa tan các thành phần trong nước, đun nóng nếu cần. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng đạt $7,0 \pm 0,2$ ở 25°C .

5.3.2 Dung dịch Ringer một phần tư

5.3.2.1 Thành phần

Natri clorua (NaCl)	2,25 g
Kali clorua (KCl)	0,105 g
Canxi clorua khan (CaCl_2)	0,06 g
Natri hydrocacbonat (NaHCO_3)	0,05 g
Thêm nước đến	1000 ml

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hòa tan các muối trong nước. Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng đạt $6,9 \pm 0,2$ ở 25°C .

5.3.3 Chuẩn bị chất pha loãng

Khử trùng chất pha loãng bằng cách hấp áp lực với từng lượng không lớn hơn 500 ml. Sau đó dùng ống đong chia độ vô trùng hoặc các dụng cụ phân phối khác (6.11) để phân phối các phần 90 ml chất pha loãng ở nhiệt độ phòng vào các chai pha loãng mẫu (6.8) vô trùng và dùng pipet một vạch dung tích 5 ml hoặc pipet chia độ hoặc các dụng cụ phân phối khác (6.12) để phân phối các phần 5 ml chất

TCVN 9330-1:2012

pha loãng vào các ống nghiệm vô trùng (6.9). Khi sử dụng pipet, chạm đầu pipet vào mặt nghiêng của bình chứa để đảm bảo phân phối chính xác lượng chất pha loãng.

CHÚ THÍCH: Việc phân phối các phần chất pha loãng trước khi khử trùng có thể dẫn đến sự bay hơi không đồng đều, kết quả là các phần chất pha loãng có nồng độ cuối cùng khác nhau.

Làm mát và bảo quản chất pha loãng và các phần chất pha loãng đã phân phối ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C. Sử dụng chất pha loãng và các phần chất pha loãng đã phân phối chậm nhất trong ngày tiếp theo.

6 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Khử trùng các thiết bị có khả năng tiếp xúc với mẫu cần phân tích, chất pha loãng, các nồng độ pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy theo TCVN 6404 (ISO 7218) và TCVN 6263 (ISO 8261).

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

- 6.1 Nồi hấp áp lực, có thể vận hành ở 121 °C ± 3 °C.
- 6.2 Tủ sấy, có thể vận hành ở nhiệt độ lớn hơn 180 °C.
- 6.3 Tủ ấm, có thể vận hành ở 30 °C ± 1 °C và ở tất cả các điểm trong dải nhiệt độ cho phép hoạt động của tủ.
- 6.4 Máy đo pH, hiệu chỉnh theo nhiệt độ, độ chính xác đến ± 0,1 đơn vị pH.
- 6.5 Nồi cách thủy, có thể vận hành ở 20 °C ± 1 °C, 45 °C ± 1 °C và từ 44 °C đến 47 °C.
- 6.6 Kính lúp, loại có độ phóng đại từ 2× đến 4× và loại có độ phóng đại ít nhất 8×.
- 6.7 Bi thủy tinh, có đường kính khoảng 6 mm.
- 6.8 Chai pha loãng, dung tích danh định từ 150 ml đến 250 ml, có nắp đậy kín, chứa từ 5 đến 10 viên bi thủy tinh (6.7). Cho bi thủy tinh vào trước khi khử trùng chai pha loãng.
- 6.9 Ống nghiệm, dài 150 mm, đường kính 15 mm, có nắp đậy.
- 6.10 Chai, dung tích danh định 500 ml, có nắp đậy, để bảo quản các phần 250 ml môi trường nuôi cấy.
- 6.11 Ống đong chia độ, với các độ chia chính, phù hợp với TCVN 8488 (ISO 4788) hoặc các dụng cụ phân phối khác có độ chính xác tương đương.
- 6.12 Pipet một vạch hoặc pipet chia độ, được hiệu chuẩn, có khả năng phân phối 1 ml, 5 ml và 10 ml phù hợp với loại A của TCVN 7151:2002 (ISO 648:1977), hoặc TCVN 7150-4 (ISO 835-4) hoặc các dụng cụ phân phối khác có độ chính xác tương đương.

6.13 Đĩa Petri, làm bằng thủy tinh không màu trong suốt hoặc vật liệu nhựa, đường kính trong của đáy là 90 mm và không gây ảnh hưởng đến kết quả đếm khuẩn lạc.

6.14 Máy khuấy trộn cơ học, có khả năng trộn lượng chứa trong ống nghiệm, làm việc theo nguyên tắc lệch tâm (ví dụ: máy trộn vortex).

6.15 Cân, có phạm vi đo thích hợp, có thể cân chính xác đến 0,05 g.

7 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Sữa

Lắc mạnh mẫu thử bằng cách đảo chiều vật chứa mẫu 25 lần sao cho vi sinh vật được phân tán đồng đều. Tránh tạo bọt hoặc để bọt lan rộng. Khoảng thời gian xen kẽ giữa trộn mẫu và lấy các phần mẫu thử không quá 3 min.

8.2 Sữa bột

Trộn đều lượng chứa trong vật chứa kín bằng cách lắc và đảo nhiều lần. Nếu mẫu thử đựng trong vật chứa kín nguyên vẹn và quá đầy để có thể trộn đều thì chuyển mẫu sang vật chứa lớn hơn sau đó trộn đều.

9 Cách tiến hành

9.1 Yêu cầu chung

Trong phương pháp đếm khuẩn lạc, các đĩa cấy có thể thường xuyên không đếm được hoàn toàn hoặc chỉ đếm được một phần do nhiều nguyên nhân khác nhau (khuẩn lạc mọc lan, nấm mốc phát triển v.v...). Đối với phương pháp hiện hành, chỉ chấp nhận thiếu một số giới hạn kết quả đếm (xem 10.1). Nếu thiếu quá nhiều kết quả thì hoặc là do vật liệu mẫu không thích hợp đối với phép thử hoặc có sai sót kỹ thuật. Trong trường hợp như vậy, lặp lại quy trình với vật liệu mẫu khác thích hợp hơn hoặc tuân thủ nghiêm ngặt quy trình phân tích.

9.2 Số lượng các bước pha loãng thập phân

Xác định số bước pha loãng thập phân dựa trên mật độ vi sinh vật dự kiến có trong mẫu như sau:

TCVN 9330-1:2012

- a) khi số đếm dự kiến nhỏ hơn 100 000 trong 1 ml hoặc trong 1 g mẫu thì chuẩn bị dung dịch pha loãng thập phân đến 0,1 (một bước pha loãng thập phân);
- b) khi số đếm dự kiến từ 100 000 đến 1 000 000 trong 1 ml hoặc trong 1 g mẫu thì chuẩn bị dung dịch pha loãng thập phân đến 10^{-2} (hai bước pha loãng thập phân);
- c) khi số đếm dự kiến lớn hơn 1 000 000 trong 1 ml hoặc trong 1 g mẫu thì chuẩn bị dung dịch pha loãng thập phân đến 10^{-3} (ba bước pha loãng thập phân).

9.3 Chuẩn bị dung dịch pha loãng thập phân đầu tiên

9.3.1 Sữa

Dùng pipet vô trùng (6.12) để lấy 1 ml mẫu thử (8.1) và thêm vào 9 ml chất pha loãng (5.3) (hoặc 10 ml mẫu thử trong 90 ml chất pha loãng hoặc 11 ml mẫu thử trong 99 ml chất pha loãng). Lắc đều dung dịch pha loãng ban đầu [ví dụ: lắc bằng tay 25 lần chuyển động ngang 300 mm trong 7 s hoặc dùng máy khuấy trộn cơ học (6.14) từ 5 s đến 10 s] để đạt được độ pha loãng 10^{-1} .

9.3.2 Sữa bột

9.3.2.1 Mở vật chứa (8.2), dùng dao trộn để lấy lượng phần mẫu thử cần thiết và tiến hành theo 9.3.2.2. Đậy ngay vật chứa.

9.3.2.2 Cân 10 g mẫu thử vào dụng cụ thủy tinh thích hợp (ví dụ: cốc có mỏ) và sau đó cho sữa bột vào chai pha loãng chứa chất pha loãng thích hợp (5.3). Cách khác, cân 10 g mẫu trực tiếp vào chai pha loãng chứa chất pha loãng thích hợp. Để hòa tan mẫu thử, xoay nhẹ nhàng để làm ướt sữa bột sau đó lắc chai (ví dụ: 25 lần với chuyển động ngang 300 mm trong khoảng 7 s). Có thể sử dụng máy trộn kiểu nhu động làm thiết bị lắc. Để yên trong 5 min, thỉnh thoảng lắc.

9.4 Chuẩn bị các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Chuẩn bị dung dịch pha loãng tiếp theo theo TCVN 6263 (ISO 8261).

9.5 Làm tan chảy môi trường

Trước khi bắt đầu các thao tác theo 9.6, làm tan chảy môi trường (5.2) và để nguội trong nồi cách thủy (6.5) đặt ở nhiệt độ từ 44 °C đến 47 °C. Kiểm tra nhiệt độ của môi trường bằng cách đặt nhiệt kế vào 250 ml thạch (ví dụ: thạch nước) của một bình riêng biệt giống với bình đựng môi trường. Rót thạch lỏng trong vòng 2 h sau khi làm tan chảy.

9.6 Chuẩn bị các dung dịch pha loãng nhị phân và cấy môi trường

9.6.1 Dây pha loãng đầu tiên (S_1)

Lấy 12 ống nghiệm pha loãng (6.9) chứa 5 ml dung dịch pha loãng được bảo quản lạnh (5.3.3).

Chuẩn bị các dung dịch pha loãng nhị phân (D_1, D_2, \dots) bằng cách dùng pipet mới dung tích 5 ml để lấy 5 ml huyền phù của dung dịch pha loãng trước đó (9.4) vào ống nghiệm chứa 5 ml chất pha loãng. Trộn huyền phù 5 lần trong 5 s bằng máy khuấy (6.14) trước mỗi lần lấy huyền phù để đưa vào ống nghiệm. Đặt chai pha loãng thập phân cuối cùng (9.4) trở lại tủ lạnh ngay sau khi lấy dịch cấy đầu tiên.

Trước khi bắt đầu tiến hành cấy pha loãng nhị phân tiếp theo, cấy 3 đĩa Petri (P_1, P_2 và P_3) từ mỗi dung dịch pha loãng trong số 12 dung dịch pha loãng, dùng pipet chia độ hoặc pipet một vạch dung tích 1 ml (6.12). Sử dụng pipet vô trùng mới cho mỗi dung dịch pha loãng.

Sau khi cấy tất cả các đĩa của các dãy (S_1), rót từ 12 ml đến 15 ml môi trường nuôi cấy (9.5) được làm nóng chảy và được làm ấm (từ 44 °C đến 47 °C) vào mỗi đĩa Petri theo thứ tự đúng như lúc cấy mẫu. Cần thận trộn môi trường với dịch cấy bằng cách xoay đều các đĩa Petri để các khuẩn lạc phân bố đồng đều sau khi ủ. Để cho hỗn hợp đông lại bằng cách đặt các đĩa Petri trên bề mặt phẳng và nguội.

9.6.2 Các dãy pha loãng tiếp theo (S_2, S_3 và S_4)

Sau khi hoàn thành dãy pha loãng đầu tiên và đổ đĩa, chuẩn bị các dãy pha loãng thứ hai, thứ ba và thứ tư (S_2, S_3 và S_4) tương tự, bắt đầu một dãy pha loãng bằng cách trộn đều lượng chứa trong chai pha loãng thập phân cuối cùng (9.4) được bảo quản trong tủ lạnh trong thời gian chờ đợi trước đó. Dùng 2 phần hoặc 3 phần, mỗi phần gồm 250 ml môi trường đã được làm tan chảy để đổ đĩa cho mỗi dãy pha loãng và loại bỏ phần môi trường còn dư.

9.7 Ủ ấm

Lật úp các đĩa đã chuẩn bị và đặt trong tủ ấm (6.3) ở nhiệt độ 30 °C trong 72 h \pm 2 h. Không chồng cao quá 3 đĩa. Đánh dấu vị trí mỗi đĩa trong chồng (dưới-giữa-trên).

CHÚ THÍCH: Thông tin này có thể có ích nếu xuất hiện biến thiên quá lớn giữa các đĩa cấy và có thể xem xét ảnh hưởng của việc chồng đĩa.

Không để các chồng đĩa sát nhau và sát thành tủ ấm cũng như trần tủ ấm. Không để các khay trong tủ ấm.

9.8 Mã hóa ngẫu nhiên các đĩa và đếm khuẩn lạc

9.8.1 Mã hóa ngẫu nhiên

Không đếm các đĩa theo thứ tự pha loãng hoặc nhóm theo các bước pha loãng vì điều này có thể dẫn đến kết quả ước lượng độ biến thiên thấp do người đếm khuẩn lạc có thể có mong muốn chủ quan tới kết quả. Vì vậy, trước tiên phải kiểm tra và mã hóa các đĩa như mô tả trong điều này bởi một người không tham gia vào quá trình đếm ở 9.8.2.

TCVN 9330-1:2012

Bắt đầu từ dây pha loãng nhất, lựa chọn các dung dịch pha loãng có thể đếm được, nghĩa là các dung dịch pha loãng có số đếm dự kiến trung bình từ 5 đến 300 khuẩn lạc mỗi đĩa.

Mã hóa tất cả các đĩa của dung dịch pha loãng đếm được, sử dụng bảng số ngẫu nhiên để mã hóa ngẫu nhiên các đĩa của tất cả các dây và các dung dịch pha loãng. Xem Bảng 1 về một bảng số ngẫu nhiên như vậy; cũng có thể sử dụng các số ngẫu nhiên từ 1 đến 144. Xóa các dấu hiệu ban đầu trên các đĩa, nên sử dụng các nhãn dán có thể tháo rời. Chỉ rõ các đĩa không đếm được bằng dấu trừ trong quy trình (xem Bảng 2).

9.8.2 Đếm khuẩn lạc

Kiểm tra các đĩa dưới ánh sáng dịu. Để hỗ trợ quá trình đếm, nên dùng kính lúp (6.6) và/hoặc máy đếm thích hợp. Chú ý tránh đếm nhầm các thành phần mẫu không hòa tan hoặc các chất kết tủa trong các đĩa với các khuẩn lạc nhỏ. Kiểm tra các khuẩn lạc nghi ngờ này, sử dụng kính lúp có độ phóng đại cao hơn (6.6) để phân biệt khuẩn lạc với các chất ngoại lai, nếu cần.

Điền các số đếm khuẩn lạc vào Bảng 2.

Độ lệch giữa các số đếm có thể ảnh hưởng đến kết quả đánh giá, như các đĩa bị mọc lan trên toàn bộ hoặc một phần đĩa cần được chỉ rõ trong bảng (Hình 2).

Việc mã hóa và đếm khuẩn lạc phải thực hiện trong ngày kết thúc ủ ấm.

10 Ước lượng thống kê

10.1 Sự phù hợp của bộ dữ liệu

CHÚ THÍCH: Trong các bảng và các công thức, kí hiệu i , j và k tương ứng là chỉ số của dây pha loãng S, các dung dịch pha loãng D và các đĩa P.

Khi không thể đếm được tất cả 3 đĩa song song của bất kỳ một độ pha loãng nào đó thì loại bỏ tất cả các số đếm của dung dịch pha loãng đó ở 3 dây pha loãng khác.

Thực nghiệm có thể ước lượng thống kê khi có ít nhất dữ liệu của 5 mức pha loãng nhị phân. Có thể chấp nhận thiếu 5 % số đếm (nghĩa là: 3 đĩa cấy trong tổng số 60 đĩa (5 mức pha loãng) hoặc 4 đĩa cấy trong tổng số 72 đĩa (6 mức pha loãng)) trừ trường hợp số thiếu nằm trọn trong bộ ba đĩa song song. Trong trường hợp này, phải loại bỏ tất cả các đĩa của dung dịch pha loãng tương ứng.

Thêm vào đó, số đếm trung bình mong muốn của 5 hoặc 6 độ pha loãng chấp nhận được phải nằm trong khoảng 5 đến 300 khuẩn lạc trong mỗi đĩa.

Nếu tất cả các điều kiện trên không được đáp ứng thì bộ dữ liệu coi như không đầy đủ. Lặp lại quy trình, chọn vật liệu mẫu thích hợp hơn (nếu có quá nhiều đĩa không đếm được) hoặc tuân thủ nghiêm ngặt hơn các hướng dẫn sử dụng, hoặc cả hai.

Bảng 1 – Ví dụ mã hóa ngẫu nhiên các đĩa sử dụng trong Bảng 2

Các dãy pha loăng					
Các bước pha loăng	Đĩa	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
2 ⁻¹	1	129	2	82	96
	2	29	21	105	46
	3	143	80	6	35
2 ⁻²	1	140	130	124	122
	2	100	65	135	45
	3	93	88	107	87
2 ⁻³	1	127	117	115	106
	2	108	138	18	20
	3	89	10	63	75
2 ⁻⁴	1	50	123	49	61
	2	17	97	72	99
	3	32	104	26	128
2 ⁻⁵	1	52	13	64	5
	2	22	14	40	34
	3	134	25	37	70
2 ⁻⁶	1	69	113	11	1
	2	136	109	48	78
	3	95	31	19	28
2 ⁻⁷	1	4	74	59	57
	2	79	67	39	71
	3	73	51	141	23
2 ⁻⁸	1	92	12	55	62
	2	30	66	133	81
	3	27	131	91	121
2 ⁻⁹	1	101	144	15	58
	2	36	98	116	24
	3	16	83	56	47
2 ⁻¹⁰	1	68	94	120	142
	2	43	38	119	132
	3	90	41	85	33
2 ⁻¹¹	1	125	139	137	111
	2	114	126	53	8
	3	54	9	76	86
2 ⁻¹²	1	102	42	3	103
	2	77	44	110	7
	3	84	112	118	60

Bảng 2 – Ví dụ về bảng ghi các số đếm khuôn lặc,
sử dụng trong quá trình đếm đĩa đã được mã hóa trong Bảng 1 theo số thứ tự đĩa

Đĩa	Số khuôn lặc	Đĩa	Số khuôn lặc	Đĩa	Số khuôn lặc	Đĩa	Số khuôn lặc
1		37		73		109	
2		38		74		110	
3		39		75		111	
4		40		76		112	
5		41		77		113	
6		42		78		114	
7		43		79		115	
8		44		80		116	
9		45		81		117	
10		46		82		118	
11		47		83		119	
12		48		84		120	
13		49		85		121	
14		50		86		122	
15		51		87		123	
16		52		88		124	
17		53		89		125	
18		54		90		126	
19		55		91		127	
20		56		92		128	
21		57		93		129	
22		58		94		130	
23		59		95		131	
24		60		96		132	
25		61		97		133	
26		62		98		134	
27		63		99		135	
28		64		100		136	
29		65		101		137	
30		66		102		138	
31		67		103		139	
32		68		104		140	
33		69		105		141	
34		70		106		142	
35		71		107		143	
36		72		108		144	

CHÚ THÍCH: Các đĩa không được đếm hoặc không thể đếm được thì ghi "-", các đĩa không có khuôn lặc thì ghi "0".

10.2 Ước lượng bộ dữ liệu đầy đủ (xem Hình 2)

10.2.1 Lập bảng các số đếm

Mỗi số đếm thuộc về một dây pha loăng cụ thể S_i (S_1, S_2, S_3 hoặc S_4), một dung dịch pha loăng cụ thể D_j (D_1, D_2, \dots, D_6 , trong đó D_1 là dung dịch pha loăng ít nhất cho các đĩa có thể đọc kết quả) và một đĩa cụ thể P_k (P_1, P_2 hoặc P_3). Để khái quát hơn về các kết quả, sắp xếp các số đếm ở Bảng 2 theo dây pha loăng S_i , nồng độ pha loăng D_j và các đĩa cây P_k như trong Bảng 3.

Bảng 3 – Lập bảng các số đếm

S_i	D_j	P_k		
		P_1	P_2	P_3
S_1	D_1	C_{111}	C_{112}	C_{113}
	D_2	C_{121}	C_{122}	C_{123}
	D_j	C_{1j1}

S_2	D_1	C_{211}
	D_2
	D_j

S_i	D_j	...	C_{ij2}	...
...

CHÚ THÍCH: C_{123} là số đếm của đĩa thứ ba, dung dịch pha loăng thứ hai của dây pha loăng đầu tiên.

10.2.2 Kiểm tra tính đồng nhất của việc đọc đĩa: phép thử G_p^2

Bước đầu tiên trong ước lượng thống kê các số đếm (xem Hình 2) bao gồm xác định độ lớn của tính đồng nhất có ý nghĩa thống kê của các đĩa cây lặp lại. Phép thử này được tiến hành để phát hiện các kết quả là "quá tốt", nghĩa là: phát hiện các trường hợp trong đó độ biến thiên các số đếm giữa các đĩa song song P_1, P_2 và P_3 nhỏ hơn dự kiến ("phân tán thấp"). Điều này, ví dụ, có thể có nguyên nhân từ việc mã hóa các đĩa không hợp lý trước khi đếm.

Tính đồng nhất có ý nghĩa thống kê là số đạt được như sau (xem Phụ lục A để có thêm thông tin chi tiết về phép thử G_p^2 và ví dụ ở Bảng 6).

- Xác định giá trị trung bình C_{ij} của từng nhóm 3 đĩa song song (ví dụ: $C_{12} = (C_{121} + C_{122} + C_{123})/3$, trung bình các kết quả của mỗi hàng được chỉ ra ở trong bảng).
- Tính toán mỗi đĩa với số đếm C_{ijk} , giá trị $C_{ijk} \cdot \ln(C_{ijk}/C_{ij})$, với C_{ij} là giá trị trung bình các kết quả của bộ đĩa cây song song.

TCVN 9330-1:2012

c) Tính tổng 3 giá trị trong mỗi hàng (các đĩa cây song song) và nhân với 2 để thu được giá trị G^2 riêng biệt cho mỗi bộ đĩa song song. Viết các thông số vào trong bảng. Tính tổng các giá trị của tất cả các độ pha loãng của các dãy pha loãng để thu được giá trị thử:

$$G_p^2 = 2 \left[\sum_i^s \sum_j^d \sum_k^p \left(C_{ijk} \ln \frac{C_{ijk}}{C_{ij}} \right) \right]$$

Trong đó s là số dãy pha loãng, d là số bước pha loãng và p là số đĩa.

CHÚ THÍCH: Công thức thay thế, (A.6) và (A.7), được nêu trong Phụ lục A.

d) So sánh giá trị của G_p^2 với các giá trị χ^2 ("khi" bình phương) trong Bảng 4 với 40 bậc tự do ($df = 40$) trong trường hợp 5 dung dịch pha loãng và 48 bậc tự do ($df = 48$) trong trường hợp 6 dung dịch pha loãng. Nếu một số kết quả bị thiếu (xem 10.1) thì lấy bậc tự do df trừ đi số kết quả bị thiếu trước khi so với các giá trị χ^2 trong Bảng 4.

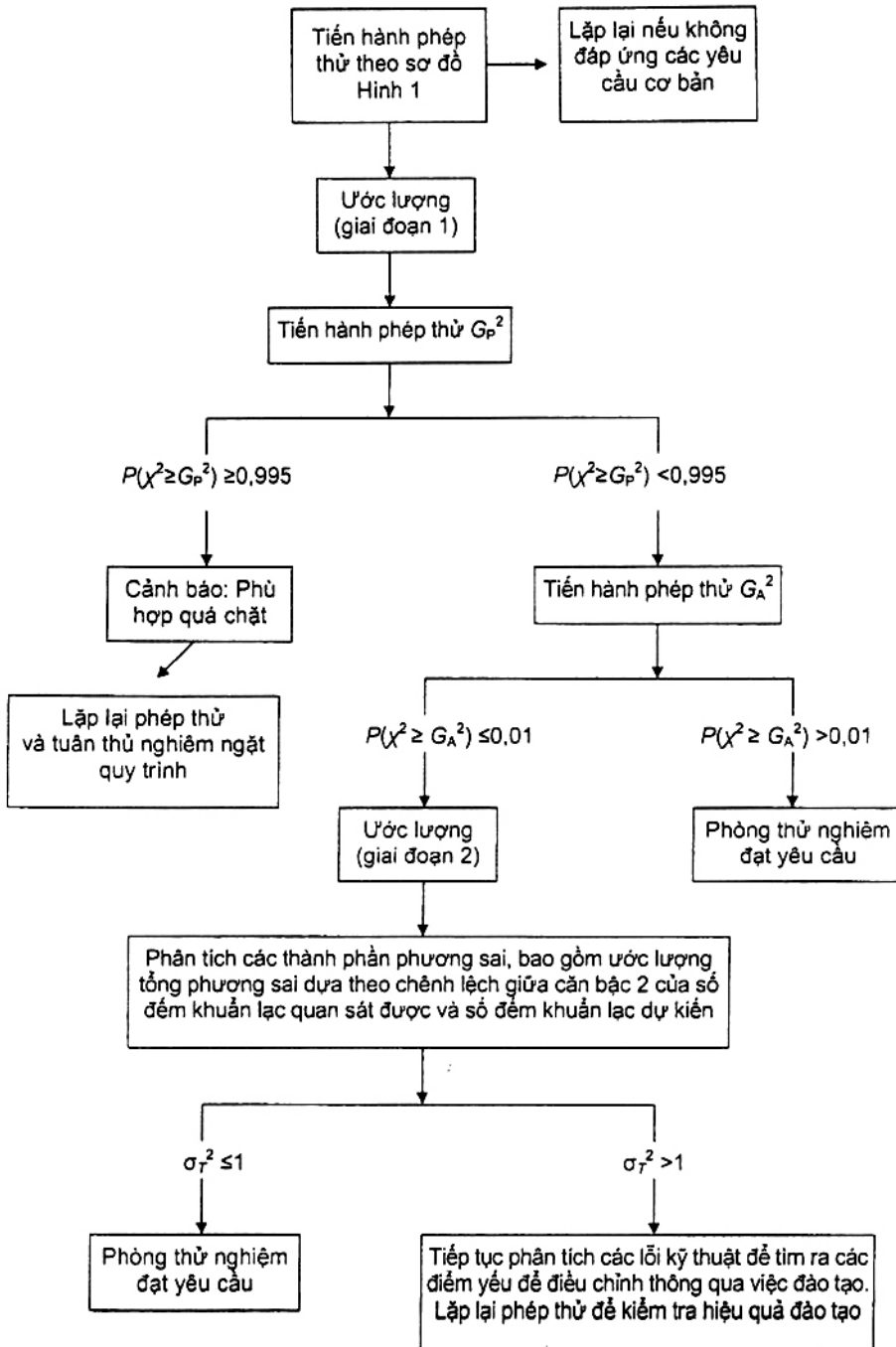
Nếu giá trị G_p^2 thấp hơn giá trị xác suất 0,995 trong bảng thì các số đếm của các đĩa song song có độ biến thiên thấp hơn dự kiến: các giá trị đó rất đồng nhất về mặt thống kê. Người phân tích phải xác nhận điều này bằng cách mã hóa ngẫu nhiên các đĩa một lần nữa và đếm lại từ đầu. Trong trường hợp xác nhận, phải lặp lại việc thực nghiệm và tuân thủ nghiêm ngặt quy trình.

Nếu giá trị G_p^2 lớn hơn giá trị xác suất (P) 0,995 % trong bảng thì độ biến thiên giữa các đĩa song song không quá thấp. Tiếp tục phép thử theo 10.2.3.

Nếu giá trị G_p^2 lớn hơn đáng kể so với giá trị xác suất 0,01 thì các đĩa song song có độ biến thiên lớn hơn dự kiến. Lưu ý đến điều này vì có thể sử dụng để diễn giải về độ biến thiên tổng thể trong các giai đoạn sau này.

Bảng 4 – Các giá trị cho χ^2 ($P = 0,01$ và $P = 0,995$)

df	$\chi^2_{0,01}$	$\chi^2_{0,995}$	df	$\chi^2_{0,01}$	$\chi^2_{0,995}$
37	59,89	18,59	44	68,71	23,58
38	61,16	19,29	45	69,96	24,31
39	62,43	20,00	46	71,20	25,05
40	63,69	20,71	47	72,44	25,78
			48	73,68	26,51



Hình 2 – Lưu đồ phân tích thống kê đối với nghiên cứu thành thạo đếm khuẩn lạc tại phòng thử nghiệm

TCVN 9330-1:2012

10.2.3 Thử nghiệm tính đồng nhất chung của các số đếm

10.2.3.1 Phép thử G_A^2

Bước thứ hai (xem Hình 2) bao gồm xác định độ lớn của tính đồng nhất có ý nghĩa thống kê của toàn bộ dữ liệu. Trong phép thử này, các số đếm được so sánh với các giá trị dự kiến, có tính đến ảnh hưởng của các dung dịch pha loãng.

Tính đồng nhất có ý nghĩa thống kê chung là một số đơn thu được như sau (xem thêm Ví dụ).

a) Xác định tổng các số đếm khuẩn lạc trong bảng (ΣC_{ijk}) và trong tổng thể tích mẫu (ΣV_{ijk}) của các khuẩn lạc đã được đếm.

b) Thể tích mẫu của bước pha loãng cao nhất D_d chứa các khuẩn lạc được đếm (D_s hoặc D_5) được coi là một đơn vị thể tích ($V_d = 1$). Đối với mỗi bước pha loãng thấp hơn D_i , thể tích mẫu tương ứng V_i có thể được xác định như sau:

$$V_i = V_d \cdot 2^a$$

trong đó a là số dung dịch pha loãng nhị phân giữa D_i và dung dịch pha loãng cao nhất D_d .

VÍ DỤ: Giả sử dung dịch pha loãng cao nhất có các số đếm hợp lệ là D_5 , tương ứng với độ pha loãng 2^{-10} , thể tích mẫu của dung dịch pha loãng này được coi là 1 đơn vị thể tích ($V_5 = 1$). Thể tích tương ứng V_3 của dung dịch pha loãng D_3 (2^{-8}), với hai bước pha loãng nhị phân từ D_5 , được tính: $V_3 = V_5 \cdot 2^2 = 4$ đơn vị thể tích V_5 .

1) Tính số khuẩn lạc dự kiến trong một đơn vị thể tích mẫu $e = \Sigma C_{ijk} / \Sigma V_{ijk}$ và từ đó tính số khuẩn lạc dự kiến $E(C_{ijk}) = e \cdot V_{ijk}$ đối với mỗi độ pha loãng.

2) Tính giá trị $C_{ijk} \cdot \ln[C_{ijk}/E(C_{ijk})]$ đối với số đếm C_{ijk} của mỗi đĩa.

3) Nếu $C_{ijk} = 0$ thì giá trị nêu trên cũng tương đương với 0.

4) Tính giá trị $G_{(2)}^2$ đối với mỗi hàng (một bộ các đĩa song song) (nghĩa là: G^2 với 2 bậc tự do nếu không bị thiếu dữ liệu) bằng cách cộng giá trị của bộ ba đĩa và nhân tổng này với 2.

$$G_{(2)}^2 = 2 \left[\sum_k^p \left(C_{ijk} \cdot \ln \frac{C_{ijk}}{E(C_{ijk})} \right) \right]$$

Ghi các giá trị này vào bảng.

5) Tính tổng các giá trị $G_{(2)}^2$ của toàn bộ các dãy pha loãng và dung dịch pha loãng trong bảng. Bằng cách này, giá trị của phép thử thu được như sau:

$$G_A^2 = \sum_i^s \sum_j^d G_{(2)}^2$$

So sánh giá trị G_A^2 với các giá trị χ^2 trong Bảng 5, trong đó df bằng số lượng số đếm sử dụng trong tính toán trừ đi 1. Nếu giá trị G_A^2 thấp hơn giá trị xác suất 0,01 trong bảng thì các số đếm là đồng nhất có ý nghĩa thống kê. Tất cả các bước trong khi tiến hành phương pháp (lấy mẫu con, pha loãng, đổ đĩa, đếm khuẩn lạc) coi như được chấp nhận. Các ước lượng tiếp theo là không cần thiết và có thể kết luận về phép phân tích tại đây.

Bảng 5 – Các giá trị cho χ^2 ($P = 0,01$)

df	$\chi_{0,01}^2$	df	$\chi_{0,01}^2$
56	83,53	67	96,82
57	84,75	68	98,02
58	85,96	69	99,22
59	87,17	70	100,42
		71	101,62

Nếu giá trị G_A^2 lớn hơn giá trị xác suất 0,01 trong bảng thì tiến hành phân tích phương sai (ANOVA) của dữ liệu để xác định và định lượng nguồn các biến thiên quá mức (lấy mẫu con, pha loãng, đổ đĩa, đếm khuẩn lạc).

Có 2 lý do có thể làm tăng giá trị G_A^2 :

a) Khi phần tăng thêm ở mức trung bình thì lý do có thể là có một số bước trong phương pháp có độ biến thiên lớn hơn dự kiến một chút nếu phương pháp được áp dụng đúng. Tuy nhiên, độ biến thiên vượt mức này không quá lớn để không thể sử dụng kết quả trong tính toán. Trong trường hợp này, hàm G_A^2 là dấu hiệu cảnh báo: phương pháp vẫn có thể được áp dụng nhưng cần phải kiểm soát thường xuyên để đảm bảo độ biến thiên không trở nên quá tồi tệ.

b) Khi phần tăng thêm trở nên đáng kể (G_A^2 lớn hơn nhiều so với giá trị $P = 0,01$) thì có một bước hoặc nhiều bước có độ biến thiên cao ở mức không thể chấp nhận được.

Xem xét kỹ lưỡng và hiệu chỉnh các yếu tố có độ biến thiên quá cao.

VÍ DỤ: Bốn dây pha loãng S_1 , S_2 , S_3 và S_4 được chuẩn bị từ một mẫu đồng nhất tốt và được pha loãng thích hợp. Chuẩn bị một dây pha loãng nhị phân từ mỗi mẫu con và cấy 3 đĩa song song P_1 , P_2 và P_3 từ mỗi dung dịch pha loãng D_j . Sáu dung

TCVN 9330-1:2012

dịch pha loãng cho kết quả đếm được. Các số đếm được trình bày trong Bảng 6. Tất cả các giá trị được tính toán bằng máy tính điện tử có đầy đủ các chức năng sau đó kết quả được làm tròn đến 2 hoặc 3 chữ số thập phân.

Bảng 6 – Dữ liệu gốc

S _i	D _j		P _k			C _{ij}	E(C _{ij})	G ²
			P ₁	P ₂	P ₃			
S ₁	D ₁	2 ⁻⁶	84	113	109	102,00	205,80	4,997
	D ₂	2 ⁻⁷	74	82	70	75,33	102,90	0,984
	D ₃	2 ⁻⁸	35	43	33	37,00	51,45	1,483
	D ₄	2 ⁻⁹	10	13	16	13,00	25,72	1,397
	D ₅	2 ⁻¹⁰	7	11	9	9,00	12,86	0,896
	D ₆	2 ⁻¹¹	0	2	3	1,67	6,43	4,256
S ₂	D ₁	2 ⁻⁶	238	236	226	233,33	205,80	0,356
	D ₂	2 ⁻⁷	154	153	153	153,33	102,90	0,004
	D ₃	2 ⁻⁸	154	126	111	130,33	51,45	7,226
	D ₄	2 ⁻⁹	33	34	38	35,00	25,72	0,395
	D ₅	2 ⁻¹⁰	16	15	21	17,33	12,86	1,161
	D ₆	2 ⁻¹¹	4	5	6	5,00	6,43	0,403
S ₃	D ₁	2 ⁻⁶	154	151	136	147,00	205,80	1,280
	D ₂	2 ⁻⁷	84	68	72	74,67	102,90	1,831
	D ₃	2 ⁻⁸	44	65	63	57,33	51,45	4,899
	D ₄	2 ⁻⁹	25	35	25	28,33	25,72	2,275
	D ₅	2 ⁻¹⁰	13	13	13	13,00	12,86	0,000
	D ₆	2 ⁻¹¹	5	0	3	2,67	6,43	6,993
S ₄	D ₁	2 ⁻⁶	238	236	224	232,67	205,80	0,496
	D ₂	2 ⁻⁷	154	156	146	152,00	102,90	0,371
	D ₃	2 ⁻⁸	63	61	56	60,00	51,45	0,437
	D ₄	2 ⁻⁹	17	32	28	25,67	25,72	4,980
	D ₅	2 ⁻¹⁰	11	10	12	11,00	12,86	0,182
	D ₆	2 ⁻¹¹	1	7	4	4,00	6,43	5,082

Tổng = G_p² = 52,364

Các chỉ số: i = 4, j = 6, k = 3.

Trong Bảng 6, cột C_{ij} gồm các giá trị trung bình của 3 đĩa song song, cột $E(C_{ijk})$ gồm các giá trị trung bình dự kiến của các dung dịch pha loãng.

Các giá trị $E(C_{ijk})$ được tính như sau (các bước pha loãng được sử dụng: từ $D_1 = 2^{-6}$ đến $D_6 = 2^{-11}$).

Các thể tích được biểu thị theo đơn vị tương đối (độ pha loãng cao nhất 2^{-11} được coi là đơn vị thể tích):

$$- V_1 (\text{tương ứng với } D_1) = 2^5 V_6 = 32$$

$$- V_2 (\text{tương ứng với } D_2) = 2^4 V_6 = 16$$

$$- V_3 (\text{tương ứng với } D_3) = 2^3 V_6 = 8$$

$$- V_4 (\text{tương ứng với } D_4) = 2^2 V_6 = 4$$

$$- V_5 (\text{tương ứng với } D_5) = 2^1 V_6 = 2$$

$$- V_6 (\text{tương ứng với } D_6) = 1$$

$$- \text{Tổng số khuẩn lạc: } 84 + 113 + 109 + 74 + \dots + 1 + 7 + 4 = 4862$$

$$- \text{Tổng thể tích (theo đơn vị } V_6): (12 \times 32) + (12 \times 16) + (12 \times 8) + (12 \times 4) + (12 \times 2) + (12 \times 1) = 756$$

$$- \text{Số khuẩn lạc dự kiến } E(C_{ijk}) \text{ đối với thể tích } V_6 = 4862/756 = 6,43$$

$$- \text{Số khuẩn lạc dự kiến } E(C_{ijk}) \text{ đối với thể tích } V_5 = 4862/756 \times 2 = 12,86$$

$$- \text{Số khuẩn lạc dự kiến } E(C_{ijk}) \text{ đối với thể tích } V_4 = 4862/756 \times 4 = 25,72$$

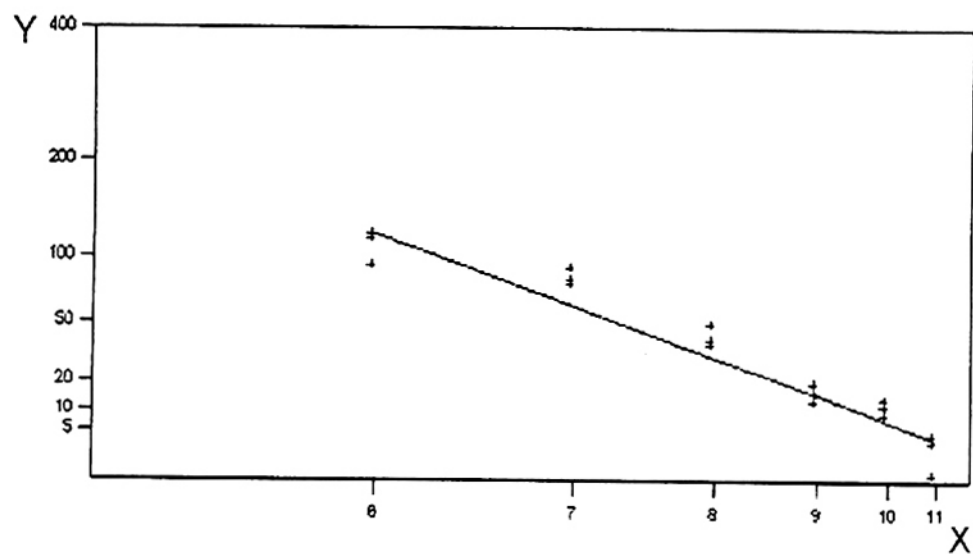
$$- \text{Số khuẩn lạc dự kiến } E(C_{ijk}) \text{ đối với thể tích } V_3 = 4862/756 \times 8 = 51,45$$

$$- \text{Số khuẩn lạc dự kiến } E(C_{ijk}) \text{ đối với thể tích } V_2 = 4862/756 \times 16 = 102,90$$

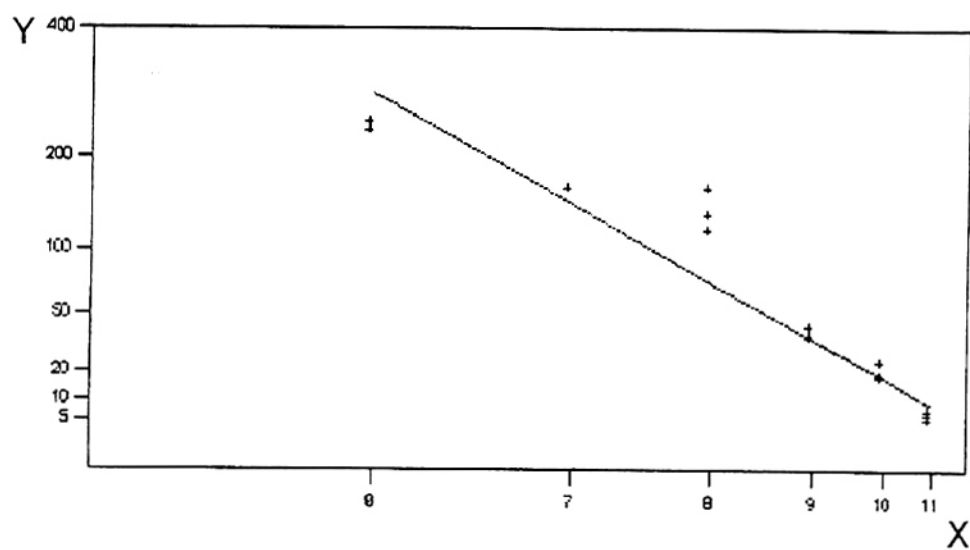
$$- \text{Số khuẩn lạc dự kiến } E(C_{ijk}) \text{ đối với thể tích } V_1 = 4862/756 \times 32 = 205,80$$

Dữ liệu của mỗi dãy pha loãng được nêu trong sơ đồ của Hình 3. Đường thẳng của mỗi biểu đồ trong số bốn biểu đồ nêu lên giá trị dự kiến nếu các dung dịch pha loãng trong dãy pha loãng được tiến hành hoàn hảo. Mỗi giá trị trong một dãy pha loãng được kí hiệu bằng dấu "+".

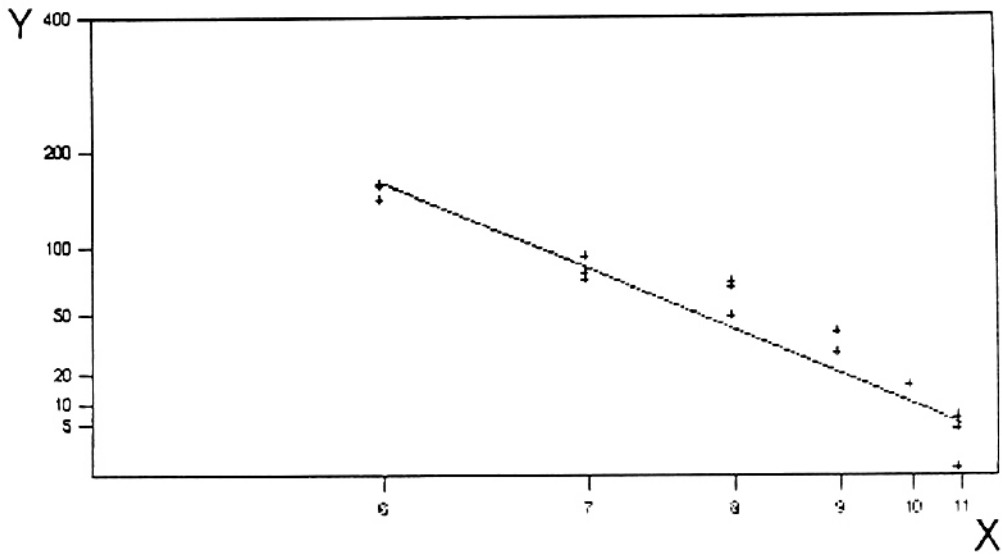
Hình 4 a) biểu diễn bốn đường thẳng trong Hình 3 trong cùng một biểu đồ. Các độ lệch tương hỗ của chúng cho biết chất lượng của việc lấy mẫu con. Hình 4 b) chỉ ra trung bình của các đĩa song song (cột C_{ij} trong Bảng 6) đối với mỗi dãy pha loãng. Trong trường hợp lý tưởng, tất cả các điểm nằm trên cùng một đường.



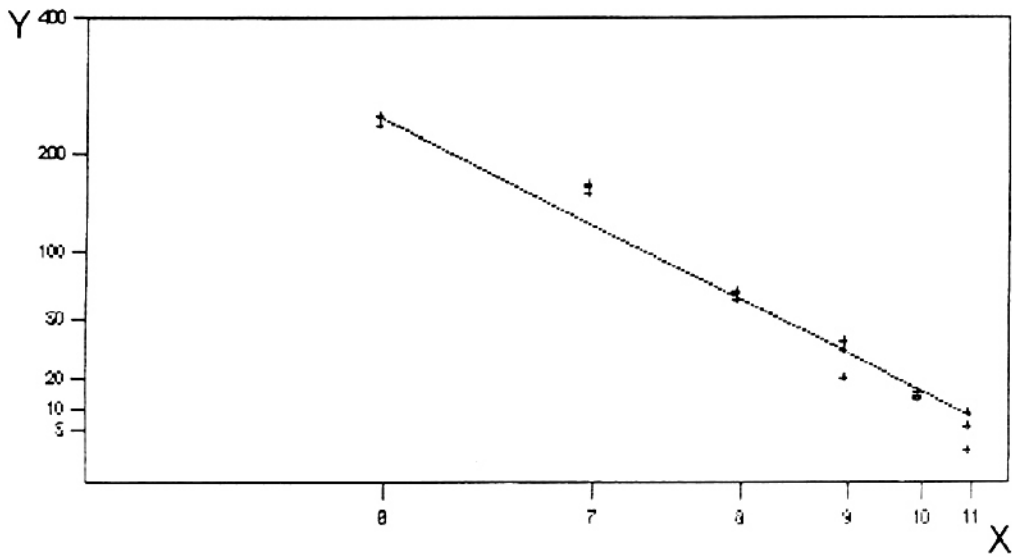
a) Dây pha loãng 1



b) Dây pha loãng 2



c) Dây pha loăng 3



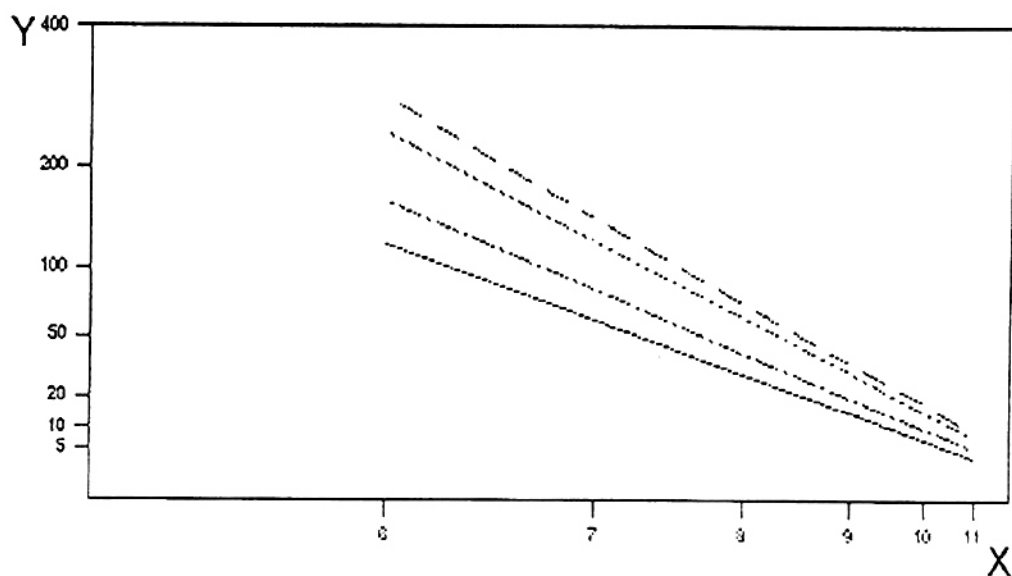
d) Dây pha loăng 4

CHÚ DẪN

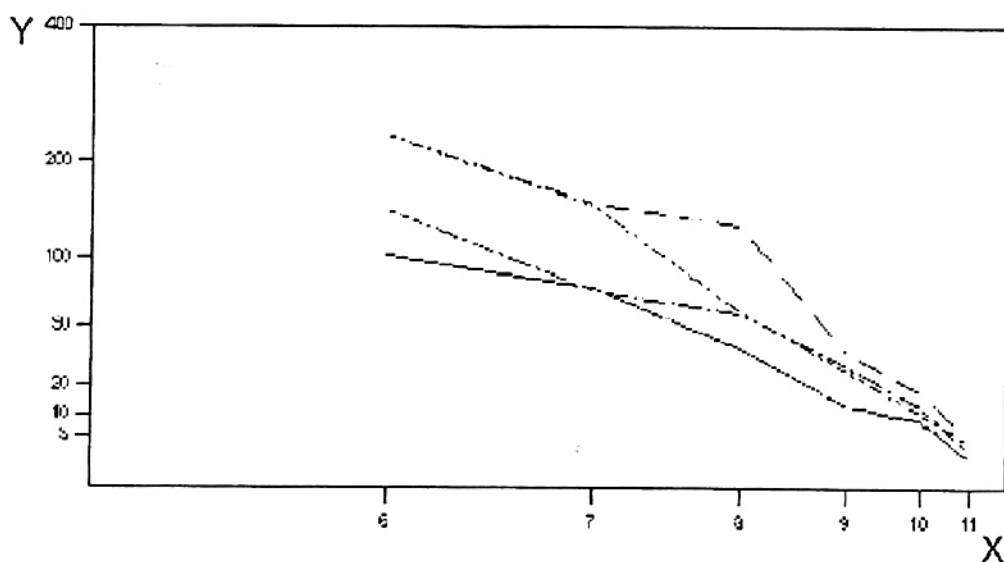
X độ pha loăng 2^{-x} (thang nhị phân)

Y số đếm khuẩn lạc (thang nhị phân)

Hình 3 – Các dãy pha loăng



a) Các trung bình theo khối lượng của mỗi dây pha loãng



b) Các trung bình của các đĩa cấy song song của mỗi dây pha loãng

CHÚ DẪN

X độ pha loãng 2^{-x} (thang nhị phân)

Y số đếm khuẩn lạc (thang nhị phân)

Hình 4 – Các trung bình theo khối lượng và các trung bình của các đĩa cấy song song

10.2.3.2 Tính giá trị của phép thử G_p^2

Đối với phép tính này, sử dụng các giá trị trong cột C_{ij} .

Tính giá trị $G_{(2)}^2$ (cột cuối cùng của Bảng 6) của các đĩa song song trong mỗi hàng.

$$2 [84 \cdot \ln (84/102) + 113 \cdot \ln (113/102) + 109 \cdot \ln (109/102)] = 4,997$$

$$2 [74 \cdot \ln (74/75,33) + 82 \cdot \ln (82/75,33) + 70 \cdot \ln (70/75,33)] = 0,984$$

...

$$2 [1 \cdot \ln (1/4) + 7 \cdot \ln (7/4) + 4 \cdot \ln (4/4)] = 5,062$$

Cộng tất cả các giá trị để thu được giá trị tính đồng nhất chung của việc đổ các đĩa song song:

$$G_p^2 = 4,997 + 0,984 + \dots + 5,062 = 52,364$$

Số bậc tự do của G_p^2 được tính bằng tổng tất cả các bậc tự do của các G^2 . Trong ví dụ nêu trên không thiếu số đếm nào, do đó mỗi hàng có 2 bậc tự do và tổng số bậc tự do $df = 48$

Giá trị G_p^2 (52,364) lớn hơn giá trị 26,51 và nhỏ hơn giá trị 73,68 trong Bảng 4, do đó độ biến thiên giữa các đĩa song song nằm trong giới hạn cho phép.

10.2.3.3 Tính giá trị của phép thử G_A^2

Các giá trị $E(C_{jk})$ trong cột được dùng để tính toán:

$$\begin{aligned} G_A^2 &= 2 [84 \cdot \ln (84/205,80) + 113 \cdot \ln (113/205,80) + \dots + 4 \cdot \ln (4/6,43)] \\ &= 2 (420,35) = 840,70 \end{aligned}$$

Số bậc tự do = $(72 - 1) = 71$

Giá trị G_A^2 (840,70) lớn hơn nhiều so với giá trị 101,62 trong Bảng 5. Do đó độ biến thiên tổng thể đã vượt quá giới hạn; phân tích thống kê nên được tiếp tục để tìm ra nguồn gốc của độ biến thiên lớn này.

10.2.4 Nguồn gốc của các sai số và phân tích phương sai (xem Hình 2)

10.2.4.1 Mỗi yếu tố trong quy trình đều liên quan đến độ biến thiên xác định (thuật ngữ thống kê gọi là phương sai). Trừ các thay đổi lý tưởng giữa các đĩa song song, không thể biết độ lớn của phương sai đối với mỗi yếu tố nếu phương pháp được áp dụng đúng. Tuy nhiên, sự thay đổi lớn hơn nhiều so với giá trị dự kiến chỉ ra các vấn đề trong mỗi bước cụ thể của phương pháp.

TCVN 9330-1:2012

Vì mỗi kết quả liên quan đến một số nguồn biến thiên (lấy mẫu con, pha loãng, đổ đĩa hoặc có thể kết hợp các yếu tố này), cần phải tách các biến thiên liên quan đến mỗi nguồn từ dữ liệu chung. Điều này được thực hiện bằng cách dùng kỹ thuật thống kê gọi là "phân tích phương sai".

CHÚ THÍCH 1: Đối với cơ sở lý thuyết của kỹ thuật nêu trên, xem các sách về thống kê.

CHÚ THÍCH 2: Nếu thiếu dữ liệu (xem 10.1) thì các giá trị tương ứng có thể được ước lượng bằng cách lấy trung bình của các đĩa song song trong cùng đây pha loãng và cùng nồng độ pha loãng. Sai số trong thao tác này nhỏ và có ảnh hưởng không đáng kể đến kết luận.

10.2.4.2 Thực hiện tách các phương sai như sau.

Các số đếm C_{ijk} trong bảng (xem 10.2.2) được chuyển thành các giá trị T_{ijk} theo công thức:

$$T_{ijk} = \sqrt{C_{ijk}} - \sqrt{E(C_{ijk})}$$

Trong đó $E(C_{ijk})$ là giá trị dự kiến của mỗi dung dịch pha loãng (xem 10.2.3).

CHÚ THÍCH: Nếu một hoặc nhiều dữ liệu bị thiếu đã được ước lượng (xem Chú thích 2 trong 10.2.4.1) thì phải tính lại các giá trị dự kiến $E(C_{ijk})$ của bộ dữ liệu tổng thể trước khi thực hiện chuyển đổi.

Các số đếm vi sinh vật tuân theo phân bố thống kê gọi là phân bố Poisson. Tuy nhiên, việc phân tích phương sai lại tuân thủ theo phân bố Gauss (còn gọi là phân bố chuẩn), do đó các dữ liệu thô không được sử dụng trực tiếp trong tính toán. Chuyển dạng khai căn của dữ liệu sẽ cho phương sai của các số đếm hợp lý hơn với giả định lý thuyết của kỹ thuật phân tích phương sai.

10.2.4.3 Từ dữ liệu đã chuyển dạng, T_{ijk} , sẽ tính được giá trị tổng số.

Tổng số tất cả các giá trị đã chuyển dạng:

$$(v) = \sum_i^s \sum_j^d \sum_k^p T_{ijk}$$

Trong đó:

- s là số dãy pha loãng S_i (= 4) ;
- d là số các bước pha loãng D_j (= 5 hoặc 6) ;
- p là số đĩa P_k (= 3).

Tổng bình phương của tất cả các giá trị đã chuyển dạng:

$$(w) = \sum_i^s \sum_j^d \sum_k^p T_{ijk}^2$$

Tổng bình phương của toàn bộ các nhóm đĩa cấy lặp lại, P_k :

$$(x) = \sum_i^s \sum_j^d \left[\sum_k^p T_{ijk} \right]^2$$

Tổng bình phương của toàn bộ các dây pha loăng S_i :

$$(y) = \sum_i^s \left[\sum_j^d \sum_k^p T_{ijk} \right]^2$$

Tổng bình phương của toàn bộ các dung dịch pha loăng D_j :

$$(z) = \sum_j^d \left[\sum_i^s \sum_k^p T_{ijk} \right]^2$$

10.2.4.4 Các tổng này được dùng để tính các tổng bình phương:

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương
Giữa các dây pha loăng S	$(\Sigma 1) = \frac{s \times (y) - (v)^2}{s \times d \times p}$
Các bước pha loăng D trong dây pha loăng S	$(\Sigma 2) = \frac{d \times (x) - (y)}{d \times p}$
Giữa các đĩa song song	$(\Sigma 3) = (w) - \frac{(x)}{p}$
Tổng số	$(\Sigma 4) = (w) - \frac{(v)^2}{s \times d \times p}$

Các tổng bình phương được dùng để tính các bình phương trung bình, các bình phương trung bình này cùng với các bình phương trung bình dự kiến trên lý thuyết được dùng để xác định các phương sai. Các bước này được trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7 – ANOVA: Các bình phương trung bình và các bình phương trung bình dự kiến

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	df	Bình phương trung bình	Bình phương trung bình dự kiến
Giữa các dây pha loăng S	($\Sigma 1$)	$s - 1$	$s_1^2 = \frac{(\Sigma 1)}{s - 1}$	$\sigma_p^2 + p\sigma_d^2 + dp\sigma_s^2$
Giữa các bước pha loăng D trong các dây pha loăng	($\Sigma 2$)	$s(d - 1)$	$s_2^2 = \frac{(\Sigma 2)}{s(d - 1)}$	$\sigma_p^2 + p\sigma_d^2$
Giữa các đĩa song song	($\Sigma 3$)	$s \times d(p - 1)$	$s_3^2 = \frac{(\Sigma 3)}{s \times d(p - 1)}$	σ_p^2
Tổng	($\Sigma 4$)	$s \times d \times p - 1$		

Phương sai giữa các đĩa, σ_p^2 , được ước lượng từ s_3^2 . Phương sai giữa các bước pha loăng trong dây pha loăng, σ_d^2 , được ước lượng từ $(s_2^2 - s_3^2)/p$ và phương sai giữa các dây pha loăng, σ_s^2 , được ước lượng từ $(s_1^2 - s_2^2)/dp$.

Tổng phương sai $\sigma_T^2 = \sigma_p^2 + \sigma_d^2 + \sigma_s^2$.

10.2.5 Ước lượng các phương sai

Giá trị lý tưởng cho σ_p^2 nên là khoảng 0,25; kinh nghiệm cho thấy nếu tổng phương sai σ_T^2 lớn hơn 1 thì có sai lỗi nghiêm trọng.

Nếu tổng phương sai σ_T^2 nhỏ hơn 1 thì phương pháp coi như trong điều kiện kiểm soát thống kê. Nếu tổng phương sai σ_T^2 lớn hơn 1 thì một hoặc nhiều yếu tố mất kiểm soát về mặt thống kê. Trong trường hợp này, phải mở rộng phân tích phương sai để xác định những khuyết điểm khi tiến hành phương pháp.

Việc mở rộng phân tích thống kê bao gồm hai bước. Đầu tiên, phương sai liên quan đến "các bước pha loăng trong dây pha loăng" được phân thành một phương sai liên quan đến các bước pha loăng và một phương sai sinh ra bởi sự tương tác có thể xảy ra giữa các bước pha loăng và các dây pha loăng. Sau đó các phương sai này được kiểm tra về ý nghĩa thống kê để phân loại các yếu tố theo mức quan trọng. Trước hết nên tính các giá trị bổ sung sau đây:

Tổng bình phương của các dung dịch pha loăng D:

$$(\Sigma 5) = \frac{d(z) - (v)^2}{s \times d \times p}$$

Tổng bình phương của sự tương tác giữa các bước pha loăng và các dây pha loăng được tính bằng:

$$(\Sigma 6) = (\Sigma 2) - (\Sigma 5)$$

Các kết quả phân tích phương sai hoàn chỉnh được nêu trong Bảng 8.

Bảng 8 – Các kết quả phân tích phương sai

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	df	Bình phương trung bình	Giá trị F
Giữa các dây pha loăng S	($\Sigma 1$)	$s - 1$	$s_1^2 = \frac{(\Sigma 1)}{s - 1}$	$\frac{s_1^2}{s_6^2}$
Giữa các bước pha loăng D	($\Sigma 5$)	$d - 1$	$s_5^2 = \frac{(\Sigma 5)}{d - 1}$	$\frac{s_5^2}{s_6^2}$
Tương tác	($\Sigma 6$)	$(s - 1)(d - 1)$	$s_6^2 = \frac{(\Sigma 6)}{(s - 1)(d - 1)}$	$\frac{s_6^2}{s_3^2}$
Giữa các đĩa song song	($\Sigma 3$)	$s \times d(p - 1)$	$s_3^2 = \frac{(\Sigma 3)}{s \times d(p - 1)}$	
Tổng	($\Sigma 4$)	$(s \times d \times p) - 1$		

Xác định các giá trị F để kiểm tra ý nghĩa của các phương sai tương ứng. Các giá trị F là các tỷ số giữa hai phương sai trong đó tử số là phương sai tính được liên quan đến yếu tố cần xem xét và mẫu số là phương sai dự kiến nếu yếu tố cần xem xét đó không tạo nên tổng phương sai. Nếu yếu tố cần xem xét không có ảnh hưởng thì hai phương sai độc lập và tỷ số của chúng nằm trong dải xác định trước đó. Tuy nhiên, nếu hệ số đó làm tăng độ biến thiên thì phương sai tử số trở nên quá lớn khiến cho tỉ lệ F nằm ngoài dải xác định trước.

So sánh các giá trị F thu được với $F(f_1, f_2)$ tương ứng trong Bảng 9 ở mức xác suất $P = 0,01$. Các kí hiệu f_1 và f_2 là số bậc tự do (cột df trong Bảng 8) của phương sai tử số và phương sai mẫu số tương ứng.

Bảng 9 – Giá trị F cho các kết hợp lựa chọn của f_1/f_2 ($P = 0,01$)

f_1	f_2	F
3	12	5,95
3	15	5,42
4	12	5,41
5	15	4,56
12	40	2,66
15	48	2,44

TCVN 9330-1:2012

10.2.6 Kết luận và hành động tiếp theo

Cần xem xét kỹ các yếu tố làm cho giá trị F vượt quá giá trị tới hạn trong Bảng 9. Chúng cho thấy các khía cạnh (tính đồng nhất mẫu, thao tác) nên được đưa về điều kiện kiểm soát trước khi sử dụng các số đếm khuẩn lạc. Giải thích về giá trị có nghĩa của các yếu tố khác nhau như sau:

- a) giữa các dây pha loãng S: sai số hệ thống trong việc chuẩn bị các dây pha loãng khác nhau (đồng hóa vật liệu mẫu, phân phối);
- b) giữa các bước pha loãng D: sai số trong cách chuẩn bị các bước pha loãng;
- c) tương tác: sai số chung khi tiến hành công việc;
- d) giữa các đĩa: nếu phương sai giữa các đĩa lớn hơn nhiều so với 0,25 thì phải giải thích rõ: nếu giá trị cao không phải do các bộ đĩa cấy song song thay đổi quá mức (xem các thành phần của giá trị G_p^2 trong Bảng 6) thì xem xét ảnh hưởng của việc chồng đĩa bằng cách tính tổng số đếm khuẩn lạc của toàn bộ dữ liệu theo vị trí của chúng trong chồng đĩa (trên-giữa-dưới);
- e) ước lượng ảnh hưởng của phương sai cao trong phân tích phương sai.

Sau khi xem xét và hiệu chỉnh các bước khiếm khuyết trong áp dụng phương pháp, phải lập lại toàn bộ quy trình để xác nhận rằng các vấn đề đã được hiệu chỉnh.

VÍ DỤ: Dữ liệu trong Bảng 6 được thay thế bởi các giá trị đã chuyển dạng; hai cột bên phải đưa ra tổng của các giá trị của mỗi hàng và tổng các giá trị bình phương của mỗi hàng.

Bảng 10 – Các dữ liệu được chuyển dạng

S _i	D _j		P _k			Tổng	Tổng bình phương
			P ₁	P ₂	P ₃		
S ₁	D ₁	2 ⁻⁶	-5,181	-3,716	-3,905	-12,801	55,895
	D ₂	2 ⁻⁷	-1,542	-1,089	-1,777	-4,408	6,720
	D ₃	2 ⁻⁸	-1,257	-0,615	-1,428	-3,300	3,998
	D ₄	2 ⁻⁹	-1,910	-1,466	-1,072	-4,448	6,946
	D ₅	2 ⁻¹⁰	-0,941	-0,270	-0,586	-1,797	1,302
	D ₆	2 ⁻¹¹	-2,536	-1,122	-0,804	-4,462	8,336
S ₂	D ₁	2 ⁻⁶	1,082	1,017	0,688	2,786	2,676
	D ₂	2 ⁻⁷	2,266	2,225	2,225	6,716	15,038
	D ₃	2 ⁻⁸	5,237	4,052	3,363	12,652	55,153
	D ₄	2 ⁻⁹	0,673	0,759	1,092	2,524	2,222
	D ₅	2 ⁻¹⁰	0,414	0,287	0,996	1,696	1,245
	D ₆	2 ⁻¹¹	-0,536	-0,300	-0,086	-0,922	0,385
S ₃	D ₁	2 ⁻⁶	-1,936	-2,057	-2,684	-6,677	15,184
	D ₂	2 ⁻⁷	-0,979	-1,898	-1,659	-4,535	7,311
	D ₃	2 ⁻⁸	-0,540	0,889	0,764	1,114	1,667
	D ₄	2 ⁻⁹	-0,072	0,844	-0,072	0,700	0,723
	D ₅	2 ⁻¹⁰	0,019	0,019	0,019	0,057	0,001
	D ₆	2 ⁻¹¹	-0,300	-2,536	-0,804	-3,640	7,167
S ₄	D ₁	2 ⁻⁶	1,082	1,017	0,621	2,719	2,589
	D ₂	2 ⁻⁷	2,266	2,346	1,939	6,551	14,398
	D ₃	2 ⁻⁸	0,764	0,637	0,310	1,712	1,087
	D ₄	2 ⁻⁹	-0,949	0,585	0,220	-0,144	1,291
	D ₅	2 ⁻¹⁰	-0,270	-0,424	-0,122	-0,816	0,268
	D ₆	2 ⁻¹¹	-1,536	0,110	-0,536	-1,962	2,659
Tổng của tổng (v)						-10,685	
Tổng của tổng bình phương (w)							214,260

TCVN 9330-1:2012

(x) = tổng của [các bình phương của các tổng đối với mỗi nhóm đĩa cây lặp lại]

= tổng của các bình phương của các giá trị trong cột "tổng" ở Bảng 10

$$= (-12,801)^2 + (-4,408)^2 + \dots + (-1,962)^2$$

$$= 598,070$$

(z) = tổng của [các bình phương của các tổng của các dãy pha loãng]

Các dãy pha loãng	Tổng số	Các bình phương
S ₁	-31,216	974, 445
S ₂	25,452	647,800
S ₃	-12,981	168,494
S ₄	8,059	64,953
Tổng	(v)	1 855,693 (y)

Các tổng (v), (w), (x) và (y) được sử dụng để tính các tổng bình phương:

Nguồn biến thiên**Tổng bình phương**

Giữa các dãy pha loãng S

$$(\Sigma 1) = \frac{4(1855,693) - (-10,685)^2}{4 \times 6 \times 3} = 101,508$$

Các bước pha loãng D trong dãy pha loãng S

$$(\Sigma 2) = \frac{6(598,070) - (1855,693)^2}{6 \times 3} = 96,263$$

Giữa các đĩa cây song song

$$(\Sigma 3) = 214,260 - \frac{598,070}{3} = 14,903$$

Tổng

$$(\Sigma 4) = 214,260 - \frac{(-10,685)^2}{4 \times 6 \times 3} = 212,674$$

Từ các tổng của các bình phương thu được, tính các bình phương trung bình sau đó coi như chúng là các bình phương trung bình dự kiến theo lý thuyết để ước lượng các phương sai.

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	df	Các bình phương trung bình
Giữa các dãy pha loăng S	(Σ1)	3	$s_1^2 = \frac{101,505}{3} = 33,836$
Các bước pha loăng D trong dãy pha loăng	(Σ2)	20	$s_2^2 = \frac{96,263}{20} = 4,813$
Giữa các đĩa song song	(Σ3)	48	$s_3^2 = \frac{14,903}{48} = 0,310$

Ước lượng các thành phần phương sai (xem Bảng 7):

$$\sigma_p^2 \text{ được ước lượng bởi } s_3^2 = 0,310 ;$$

$$\sigma_d^2 \text{ được ước lượng bởi } (s_2^2 - s_3^2)/p = (4,813 - 0,310)/3 = 1,510;$$

$$\sigma_s^2 \text{ được ước lượng bởi } (s_1^2 - s_2^2)/dp = (33,836 - 4,813)/18 = 1,612;$$

$$\sigma_T^2 \text{ được ước lượng bởi } 0,310 + 1,501 + 1,612 = 3,424.$$

Khi giá trị cuối cùng này lớn hơn giá trị cho phép cực đại là 1 thì phải tiến hành xem xét tiếp theo về nguồn gốc của sai số.

Các giá trị sau đây phải được tính toán trước tiên:

(z) = tổng bình phương của các tổng cho mỗi bước pha loăng

Các bước pha loăng	Tổng	Các bình phương
D ₁	-13,974	195,271
D ₂	4,325	18,703
D ₃	12,178	148,299
D ₄	-1,368	1,872
D ₅	-0,859	0,739
D ₆	-10,986	120,695
Tổng	(v)	485,579 (z)

TCVN 9330-1:2012

$$\text{Tổng bình phương đối với các bước pha loãng } (\Sigma 5) = \frac{6(485,579) - (-10,685)^2}{4 \times 6 \times 3} = 38,879$$

$$\text{Tổng bình phương của tương tác } (\Sigma 6) = 96,263 - 38,879 = 57,384$$

Sử dụng các giá trị này để hoàn thành bảng phân tích phương sai (xem Bảng 8):

Bảng 11 – Tính toán

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	df	Bình phương trung bình	Giá trị F
Giữa các dãy pha loãng S	101,508	3	$s_1^2 = 33,836$	8,845 ^a
Giữa các bước pha loãng D	38,879	5	$s_5^2 = 7,776$	2,033 (n.s.) ^b
Tương tác	57,384	15	$s_6^2 = 3,826$	12,321 ^a
Giữa các đĩa song song	14,903	48	$s_3^2 = 0,310$	
Tổng	212,674	71		

^a Có nghĩa ở mức ý nghĩa $P = 0,01$.
^b n.s.: không có ý nghĩa thống kê.

So sánh các giá trị F ở mức xác suất 0,01 (Bảng 9) với các giá trị tính được dưới đây:

- giữa các dãy pha loãng S: $F_{0,01}(3;15) = 5,42 < 8,845$ có ý nghĩa;
- giữa các bước pha loãng D: $F_{0,01}(5;15) = 4,56 > 2,033$ không có ý nghĩa;
- tương tác: $F_{0,01}(15;48) = 2,44 < 12,321$ có ý nghĩa.

Giá trị "giữa các dãy pha loãng S" cao cho thấy sai số hệ thống trong việc chuẩn bị các dãy pha loãng (tính đồng nhất của vật liệu mẫu, phân phối mẫu) hoặc tính không ổn định của quần thể vi sinh vật.

Giá trị "tương tác" cao cho thấy về mặt thống kê, có sự khác nhau về độ tuyến tính (hoặc phi tuyến tính) giữa các số đếm khuẩn lạc của bốn dãy pha loãng (xem Hình 3 và Hình 4). Điều này khẳng định rằng có sai sót trong các thao tác kỹ thuật, nhưng cũng có thể cho thấy các tương tác sinh học hoặc các phát triển bất thường mà người đếm khuẩn lạc có thể nhầm.

Trong trường hợp này, không có thông tin về giá trị có thể chấp nhận "giữa các bước pha loãng D" khi có sự tương tác đáng kể. Kết quả này chỉ cho biết rằng không có sai số hệ thống trong việc chuẩn bị các dung dịch pha loãng.

Phụ lục A
(Tham khảo)

**Kiểm tra trung bình theo khối lượng của mẫu thử và tính đồng nhất
của các số đếm khuẩn lạc**

A.1 Giới thiệu

Khi có sẵn các số đếm khuẩn lạc từ các đĩa cấy song song, từ các thể tích huyền phù khác nhau hoặc từ nhiều hơn một độ pha loãng thì tốt nhất là sử dụng mọi thông tin để ước lượng mật độ tốt nhất. Tính số khuẩn lạc trung bình. Nguyên tắc này được xuất bản lần đầu trong tài liệu về vi sinh vật (xem Tài liệu tham khảo [2]).

Thông thường chỉ những đĩa có số đếm khuẩn lạc từ 30 đến 300 hoặc từ 25 đến 250 là “đáng tin cậy”. Nếu tuân thủ các quy tắc này thì thường chỉ còn lại một dung dịch pha loãng có số khuẩn lạc đếm được và không cần tính số khuẩn lạc trung bình. Tuy nhiên, có thể là lãng phí khi bỏ qua các đĩa ít hơn 25 khuẩn lạc, đặc biệt vì các đĩa có số khuẩn lạc thấp là đáng tin cậy nhất về mặt sinh học. Giới hạn dưới, trung bình khoảng 5 khuẩn lạc trong mỗi đĩa có thể là giới hạn dưới phù hợp về mặt thống kê.

Số khuẩn lạc trung bình lý tưởng bằng tổng số tất cả các số đếm khuẩn lạc quan sát được chia cho tổng các thể tích mẫu liên quan (được biểu thị theo mẫu ban đầu). Cách biểu thị chung nhất của nguyên tắc chung này như sau:

$$M = \frac{\sum C_i}{\sum V_i} = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_n}{V_1 + V_2 + \dots + V_n} \quad (\text{A.1})$$

trong đó:

M là số đếm khuẩn lạc trung bình trên mililit mẫu ban đầu;

C_i là số các khuẩn lạc đếm được trên đĩa thứ i ;

V_i là thể tích được sử dụng để đếm khuẩn lạc trên đĩa thứ i ;

i là số đĩa được sử dụng ($i = 1, 2, \dots, n$);

n là tổng số đĩa được sử dụng.

Để thu thập dữ liệu với độ tin cậy thích hợp, trước hết cần kiểm tra xem các khuẩn lạc đồng nhất hay không (biến thiên ngẫu nhiên). Để làm được điều này, một chỉ số đồng nhất chung là cần thiết để kiểm

TCVN 9330-1:2012

tra các số đếm khuẩn lạc có nguồn gốc từ V_1, V_2, \dots, V_n có phải được lấy từ một huyền phù đồng nhất hay không. Phép thử tốt nhất là G^2 , được mô tả trong A.2.

Nếu phép thử cho thấy dữ liệu không đồng nhất thì không nên sử dụng tất cả các số đếm khuẩn lạc để tính trung bình trên máy tính. Đồng thời, kết quả có thể là dấu hiệu xem xét thêm về lý do của sự không đồng nhất này.

Có hai thành phần chính cấu thành chỉ số đồng nhất G^2 trong việc đếm khuẩn lạc. Nó được sử dụng để xác nhận sự đồng nhất của dữ liệu trước khi tính số khuẩn lạc trung bình và có thể được áp dụng trong phân tích "độ lệch" để tìm ra sự không đồng nhất trong bộ dữ liệu của các số đếm khuẩn lạc. Trong tiêu chuẩn này, chỉ số G^2 được sử dụng để kiểm tra tính đồng nhất chung, ngoài ra còn để kiểm tra tính đồng nhất chung của việc đổ các đĩa song song.

A.2 Phép thử G^2 về tính ngẫu nhiên (tính đồng nhất)

Chỉ số G^2 là chỉ số đồng nhất thích hợp để kiểm tra dữ liệu đếm khuẩn lạc. Chỉ số này được biểu thị ở dạng đơn giản nhất là:

$$G_{n-1}^2 = 2 \left[\sum_{i=1}^n O_i \ln \left(\frac{O_i}{E_i} \right) \right] \quad (\text{A.2})$$

Trong đó:

O_i là số đếm khuẩn lạc quan sát được thứ i ;

E_i là số đếm dự kiến thứ i ;

i là số lần đếm ($i = 1, 2, \dots, n$);

n là tổng số lần đếm.

Trong phép thử "tính đồng nhất nội bộ", giả sử các số đếm khuẩn lạc quan sát được đã tuân thủ các thể tích nghiên cứu. Do đó, các số đếm khuẩn lạc dự kiến E_i thu được bằng cách tính phần của tổng của tất cả các khuẩn lạc quan sát được mà về lý thuyết mỗi thể tích phải chứa:

$$E_i = \frac{V_i}{\sum V_i} \sum C_i \quad (\text{A.3})$$

Trong thực tế, công thức chung (A.2) bao gồm việc tính từng giá trị E_i và không cần dùng cho các mục đích khác (trong trường hợp này, Công thức A.2 được sử dụng bởi vì ANOVA cần các giá trị E_i). Trong trường hợp đó, đưa các số đếm dự kiến trong Công thức (A.3) và cấu trúc lại công thức, thu được dạng thích hợp hơn:

$$G_{n-1}^2 = 2 \left[\sum C_i \cdot \ln \frac{C_i}{V_i} - \left(\sum C_i \right) \cdot \ln \left(\frac{\sum C_i}{\sum V_i} \right) \right] \quad (\text{A.4})$$

Hiển nhiên là trong kiểm tra tính đồng nhất nội bộ, thể tích thực và bất kỳ số đếm tỉ lệ với chúng có thể thay thế V_i . Trong hầu hết các trường hợp, tỉ lệ này có thể được lựa chọn theo cách sao cho các thể tích tương đối R_i là các số nguyên đơn. Sự thay đổi này khiến công thức trở nên khá đơn giản để tính toán bằng máy tính cầm tay.

$$G_{n-1}^2 = \left[\sum C_i \cdot \ln \frac{C_i}{R_i} - \left(\sum C_i \right) \cdot \ln \left(\frac{\sum C_i}{\sum R_i} \right) \right] \quad (\text{A.5})$$

Trong đó:

C_i là số các khuẩn lạc đếm được từ đĩa thứ i ;

V_i là thể tích thực được sử dụng cho đĩa thứ i ;

R_i là thể tích tương đối tương ứng được sử dụng trên đĩa thứ i ;

i là số các đĩa được sử dụng ($i = 1, 2, \dots, n$);

n là tổng số các đĩa được sử dụng.

Các chỉ số có giá trị cao cho thấy sự biến thiên cao hơn mức ngẫu nhiên, gọi là phân tán rộng. Các chỉ số có giá trị rất thấp cho thấy biến thiên thấp bất thường (phân tán hẹp).

Có thể xem xét ý nghĩa thống kê của phân tán rộng hoặc phân tán hẹp bằng cách so sánh các giá trị tính được với phân bố χ^2 lý thuyết ở mức xác suất lựa chọn với $n - 1$ bậc tự do. Các giá trị cần thiết trong các ví dụ được mô phỏng trong Bảng A.1. Các tính toán nêu ở trên sẽ cho chỉ số đồng nhất chung G_A^2 được sử dụng trong nội dung chính.

Chương trình BASIC để tính chỉ số đồng nhất theo Công thức (A.5) được nêu trong Phụ lục B.

Bảng A.1 – Các giá trị tới hạn lựa chọn cho phân bố χ^2

df	Xác suất					
	Phân tán hẹp			Phân tán rộng		
	0,99	0,95	0,10	0,05	0,01	0,001
1	–	0,004	2,71	3,84	6,63	10,38
2	0,020	0,103	4,61	5,99	9,21	13,81
3	0,115	0,352	6,25	7,81	11,34	16,27
4	0,297	0,711	7,78	9,49	13,28	18,47
5	0,554	1,145	9,24	11,07	15,09	20,52

A.3 Sự phù hợp chung của việc đo các đĩa song song

Cách sử dụng thứ hai của phép thử G^2 trong tiêu chuẩn này là kiểm tra tính đồng nhất của việc đo các đĩa song song. Có thể thực hiện điều này bằng cách tính giá trị của chỉ số đồng nhất đối với mỗi bộ đĩa song song. Việc này được đơn giản hóa bởi thực tế là tất cả các thể tích (hoặc thể tích tương đối) trong các bộ đĩa cấy song song là như nhau và có thể được thay thế bởi giá trị 1. Do đó, tổng của các thể tích tương đối bằng với tổng số đĩa song song (n) và Công thức (A.5) có thể được viết lại như sau:

$$G_{n-1}^2 = 2 \left[\sum C_i \cdot \ln C_i - (\sum C_i) \cdot \ln \left(\frac{\sum C_i}{n} \right) \right] \quad (\text{A.6})$$

Trong đó:

C_i là số các khuẩn lạc được đếm trên đĩa thứ i ;

i là số đĩa được sử dụng ($i = 1, 2, \dots, n$);

n là số các đĩa cấy song song.

Giá trị cứng của chỉ số đồng nhất được sử dụng khá hạn chế. Tuy nhiên, nếu có m bộ đĩa cấy với số lượng đĩa song song bằng nhau thì có thể thấy ưu điểm của việc bổ sung G^2 . Cộng các giá trị G^2 và các bậc tự do tương ứng từ tất cả các bộ đĩa cấy để thu được giá trị của tính đồng nhất chung. Trong tiêu chuẩn này, đại lượng nêu trên được gọi là G_p^2 :

$$G_p^2 = G_{m(n-1)}^2 = \sum_{i=1}^m G_{(n-1)}^2 \quad (\text{A.7})$$

Một vài phân tán rộng phải nằm trong khoảng cho phép trong tính toán đối với các phân tích vi sinh, bởi vì các phép đo thể tích vẫn phù hợp với các chuẩn làm việc chấp nhận được và các phép đo này không bao giờ chính xác tuyệt đối. Do đó, dường như là mức xác suất 1 % ($P = 0,01$) thay cho mức 5 % thông thường cần được coi là "giới hạn cảnh báo".

A.4 Các ví dụ

A.4.1.1 Ví dụ 1: Phép thử tính đồng nhất chung

Một bộ các số đếm khuẩn lạc thu được từ hai độ pha loãng thập phân liên tiếp. Chuẩn bị hai dãy đĩa song song từ mỗi độ pha loãng. Các số đếm được nêu trong Bảng 2, với các thể tích tương đối.

Bảng A.2 – Đếm số khuẩn lạc ở hai dãy pha loãng song song và các thể tích tương đối

Độ pha loãng	Các số đếm khuẩn lạc			Tổng	Thể tích tương đối			Tổng
10 ⁻⁴	251	305		556	10	10		20
10 ⁻⁵	31	36		67	1	1		2
Tổng				623				22

Tính ngẫu nhiên của toàn bộ đĩa được tính bằng chỉ số G^2 như sau:

$$G^2 = 2[251 \cdot \ln(251/10) + 305 \cdot \ln(305/10) + 31 \cdot \ln(31/1) + 36 \cdot \ln(36/1) - 623 \cdot \ln(623/22)] = 7,607$$

Khi có bốn số hạng trong tổng, sẽ có $4 - 1 = 3$ bậc tự do. Phải so sánh giá trị tính được với các giá trị trong hàng thứ ba của phân bố χ^2 ở Bảng A.1.

Giá trị 7,607 tính được cho thấy độ biến thiên cao nhưng so với phân bố lý thuyết (giá trị xác suất 1 % = 7,81) thì toàn bộ dữ liệu có thể được xem như là một phân bố ngẫu nhiên từ một huyền phù đồng nhất. Tỷ số của các số đếm giữa các dung dịch pha loãng ($556/67 = 8,3$) khác nhiều so với giá trị lý tưởng 10 : 1, nhưng có thể xuất hiện do tình cờ. Không có lý do thống kê thích hợp để coi bộ dữ liệu là không đồng nhất. Do đó, số khuẩn lạc trung bình có thể được tính theo Công thức (A.1) sử dụng các số đếm khuẩn lạc sẵn có.

A.4.1.2 Ví dụ 2: Phép thử tính đồng nhất chung bằng cách phân tích độ lệch

Với bộ dữ liệu tương tự khác, nhưng có ba đĩa song song, có các giá trị được nêu trong Bảng A.3.

Bảng A.3 – Số đếm khuẩn lạc của ba dãy đĩa cấy song song và các thể tích tương đối

Độ pha loãng	Các số đếm khuẩn lạc			Tổng	Thể tích tương đối			Tổng
10 ⁻⁵	122	74	92	288	10	10	10	30
10 ⁻⁶	12	15	10	37	1	1	1	3
Tổng				325				33

Bộ dữ liệu dường như phân tán khá rộng, như được chỉ ra bởi chỉ số:

$$G^2 = 2[122 \cdot \ln(122/10) + 74 \cdot \ln(74/10) + \dots + 10 \cdot \ln(10/1) - 325 \cdot \ln(325/33)] = 15,077$$

TCVN 9330-1:2012

Giá trị này gần như bằng giá trị xác suất 1 % của 5 bậc tự do. Kết quả này có nghĩa là việc tính số khuẩn lạc trung bình dựa trên dữ liệu toàn bộ là không thận trọng.

Do đó, cần phải kiểm tra trường hợp tiếp theo. Công thức (A.3) có thể được sử dụng lặp lại để nghiên cứu các chi tiết của bộ dữ liệu.

Tổng biến thiên bao gồm ba thành phần: chênh lệch giữa các đĩa song song của độ pha loãng 10^{-5} , chênh lệch giữa các đĩa song song của độ pha loãng 10^{-6} và chênh lệch giữa các mức pha loãng:

$$G_{(2)}^2 = 2[122 \cdot \ln(122/10) + 74 \cdot \ln(74/10) + 92 \cdot \ln(92/10) - 288 \cdot \ln(288/30)] = 12,127$$

$$G_{(2)}^2 = 2[12 \cdot \ln 12 + 15 \cdot \ln 15 + 10 \cdot \ln 10 - 37 \cdot \ln(37/3)] = 1,020$$

$$G_{(1)}^2 = 2[288 \cdot \ln(288/30) + 37 \cdot \ln(37/3) - 325 \cdot \ln(325/33)] = 1,930$$

Các chỉ số dưới của G^2 biểu thị số bậc tự do kèm theo.

Việc chia nhỏ tổng biến thiên dẫn đến phép phân tích độ lệch và có thể được nêu trong Bảng A.4.

Chú ý tổng $12,127 + 1,020 + 1,930 = 15,077$ đúng bằng tổng các chỉ số được tính ở trên.

Bảng A.4 – Tổng biến thiên – Phân tích độ lệch

Nguồn biến thiên	G^2	df	P
Giữa các độ pha loãng	1,930	1	> 0,10
Độ pha loãng song song 10^{-5}	1,020	2	> 0,30
Độ pha loãng song song 10^{-6}	12,127	2	> 0,01
Tổng	15,077	5	< 0,02

Khi so sánh các giá trị tính được với phân bố χ^2 lý thuyết theo số bậc tự do thích hợp, dường như nguyên nhân đáng chú ý của phân tán rộng trong dữ liệu là sự không đồng nhất trong bộ đĩa song song có số khuẩn lạc cao (ít pha loãng hơn). Không nên sử dụng các số đếm này. Điều này có nghĩa là nên tính giá trị trung bình từ duy nhất một bộ số đếm khuẩn lạc thấp (độ pha loãng cao hơn). Do đó, không nên coi bộ dữ liệu này bị thiếu hẳn cho dù dữ liệu ban đầu là không đồng nhất.

A.4.1.3 Ví dụ 3: Tính đồng nhất của các số đếm song song

Cùng một nhân viên thử nghiệm sử dụng 2 đĩa kép để tạo nên 5 bộ số đếm khuẩn lạc. Thực hiện đánh giá thống nhất trên các đĩa song song. Các số đếm ban đầu được sắp xếp theo giá trị số đếm trung

binh tăng dần như trong Bảng A.5. Đối với mỗi cặp số đếm, chỉ số đồng nhất được tính bằng Công thức (A.6).

Bảng A.5 – Cặp số đếm: chỉ số đồng nhất

Số bộ	Các số đếm song song		G^2	df
1	22	18	0,401	1
2	35	41	0,474	1
3	80	99	2,021	1
4	191	164	2,056	1
5	340	297	2,905	1
Tổng			7,857	5

Tổng (7,857) của chỉ số G^2 riêng rẽ là một kiểu thống kê ứng dụng trong nội dung chính để tính sự thống nhất chung của việc đổ các đĩa song song (G_p^2). Theo các giá trị được chỉ ra trong hàng thứ năm của Bảng 5, sự phù hợp chung của các đĩa song song trong ví dụ đường như đã thỏa mãn.

Có thể sử dụng các dữ liệu này hoặc các dữ liệu tương tự theo cách khác. Có thể so sánh mỗi chỉ số riêng rẽ với các giá trị của phân bố χ^2 theo bậc tự do tương ứng. Tuy nhiên, với các trường hợp đã được xác định là kém phù hợp hoặc còn nghi ngờ thì không cần chú ý quá nhiều, bởi vì G^2 thay đổi ngẫu nhiên và hiếm khi có thể sinh ra các giá trị độ lệch một cách tình cờ.

Tuy nhiên, khi hàng chục hay hàng trăm các giá trị chỉ số được dựng trên biểu đồ kiểm soát thì kết quả có thể cho các thông tin hữu ích không chỉ cho người tiến hành phân tích mà còn cho các giới hạn của tiến hành phương pháp.

Khi dữ liệu đạt được trong các khóa đào tạo, có thể dựng các giá trị chỉ số riêng biệt theo đúng thứ tự. Thường có giá trị thông tin nhiều hơn khi vẽ các giá trị so với số đếm khuẩn lạc trung bình.

Thường xuyên có khuynh hướng giá trị chỉ số cao (phù hợp kém, phân tán rộng) do số đếm trung bình tăng lên. Xu hướng này dường như xuất hiện trong ví dụ trên. Cuối cùng, các kết quả phải chỉ ra giới hạn trên (và có thể là giới hạn dưới) của phương pháp khi một người phân tích thực hiện (các giá trị chỉ số luôn được dựng trên một biểu đồ kiểm soát riêng rẽ.)

Phụ lục B
(Tham khảo)

Chương trình BASIC để tính chỉ số G^2

```
10 PRINT "LIKELIHOOD RATIO-INDEX  $G^2$ "
20 INPUT "NUMBER OF TERMS, n-"; N
30 C = 0; R = 0; S = 0; T = 0; D = 0
40 FOR I=1 TO N
50 PRINT "I ="; I
60 INPUT "COLONY COUNT="; C
70 INPUT "RELATIVE VOLUME="; R
80 IF (C = 0) THEN W = 0: GOTO 100
90 W = C*LOG(C/R)
91 REM IN THIS BASIC LOG = NATURAL LOGARITHM
100 S = S + W
110 T = T + R
120 D = D + C
130 NEXT I
140 Y = 2 * (S - D*LOG(D/T))
150 REM IN THIS BASIC LOG = NATURAL LOGARITHM
160 PRINT
170 PRINT "INDEX  $G^2$  ="; Y
180 PRINT
190 PRINT
200 INPUT "ANOTHER SET? (Y/N)"; H$
210 IF H$ = "Y" GOTO 20, ELSE TO 220
220 END
```

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
 - [2] FARMILOE, F.J., CORNFORD, S.J., COPPOCK, J.B.M. and INGRAM, M. The survival of *Bacillus subtilis* spores in the baking of bread. *J. Sci. Food. Agric.*, 5, 1954, pp. 294-404
-