

TCVN 7849:2008

ISO 20128:2006

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – ĐỊNH LƯỢNG
LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS GIẢ ĐỊNH
TRÊN MÔI TRƯỜNG CHỌN LỌC –
KỸ THUẬT ĐẾM KHUẨN LẠC Ở 37 °C**

*Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus*
on a selective medium – Colony-count technique at 37 °C*

HÀ NỘI - 2008

Lời giới thiệu

Vì tính đa dạng của sản phẩm sữa lên men và sữa không lên men mà phương pháp này có thể không thích hợp đến từng chi tiết cho các sản phẩm cụ thể.

Việc không thích hợp này có thể là khi số lượng *Lactobacillus acidophilus* thấp hơn rất nhiều so với số lượng các loại vi sinh vật khác như *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* và *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus* và các nấm men.

Sữa và sản phẩm sữa – Định lượng *Lactobacillus acidophilus* giả định trên môi trường chọn lọc – Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37 °C

Milk products – Enumeration of presumptive Lactobacillus acidophilus on a selective medium – Colony-count technique at 37 °C

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng *Lactobacillus acidophilus* giả định trong sản phẩm sữa bằng kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37 °C trên môi trường chọn lọc.

Phương pháp này có thể áp dụng cho sữa lên men, sữa không lên men, bột sữa và thức ăn cho trẻ sơ sinh khi có mặt *L. acidophilus* giả định và khi có mặt cùng với các vi khuẩn sinh axit lactic và bifidobacteria khác.

Phương pháp này không thể áp dụng khi số lượng *L. acidophilus* giả định ít hơn 10⁴ CFU/g và số *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* và *Lactobacillus paracasei* loài phụ *paracasei* lớn hơn 10⁶ CFU/g.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là 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.

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

TCVN 6404 (ISO 7218), Vi sinh vật trong thực phẩm và trong thức ăn gia súc – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật.

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

***Lactobacillus acidophilus* giả định** (presumptive *Lactobacillus acidophilus*)

Vi sinh vật tạo thành các khuẩn lạc dẹt, bện thùng, xù xì, có màu xám đến màu trắng nhạt có các cạnh không đều và có đường kính từ 1 mm đến 3 mm tùy thuộc vào số lượng khuẩn lạc mọc trên môi trường đặc chọn lọc, dưới các điều kiện quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH *L. acidophilus* liên quan mật thiết đến *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri* và *Lactobacillus crispatus*. Phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này không thể phân biệt được giữa bốn loài này, do đó, tiêu chuẩn này chỉ đề cập đến *L. acidophilus* giả định.

4 Nguyên tắc

4.1 Cả hai loại kháng sinh clindamycin và xiprofloxacin đều ức chế phát triển các loại vi sinh vật thường được sử dụng nhiều nhất trong sữa lên men, sữa không lên men và thức ăn dành cho trẻ sơ sinh như: *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* loài phụ *lactis*, *Streptococcus thermophilus* bifidobacteria, lactococci, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* loài phụ *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* và các loài *Leuconostoc*.

4.2 Đồng hóa một lượng đã biết của mẫu thử với dịch pha loãng và các dung dịch pha loãng thập phân đã chuẩn bị.

4.3 Đổ các dung dịch pha loãng thích hợp lên thạch MRS có bổ sung clindamycin và xiprofloxacin.

4.4 Các đĩa thạch này được ủ kỵ khí ở 37 °C trong 72 h ± 3 h.

4.5 Đếm các khuẩn lạc điển hình.

4.6 Tính số lượng vi sinh vật đặc trưng trên gam mẫu từ số khuẩn lạc thu được trên các đĩa đã chọn ở các mức pha loãng phù hợp để thu được kết quả có ý nghĩa.

5 Dịch pha loãng, môi trường cấy và thuốc thử

5.1 Nguyên liệu chính

Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác và chỉ sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương. Xem TCVN 6404 (ISO 7218).

5.2 Dịch pha loãng

Xem TCVN 6263 (ISO 8261).

5.3 Môi trường nuôi cấy

5.3.1 Thạch MRS/clindamycin/xiprofloxacin (thạch MRS/CL/CIP)

Thạch MRS/CL/CIP gồm có thạch MRS (5.3.2) có bổ sung 0,1 mg clindamycin và 10,0 mg xiprofloxacin trên một lít môi trường (xem 5.3.4).

5.3.2 Môi trường cơ bản: Thạch MRS

5.3.2.1 Thành phần

Pepton 1 (dịch thủy phân casein bằng enzym)	10,0 g
Cao thịt	10,0 g
Cao nấm men (khô)	5,0 g
Glucosa	20,0 g
Tween 80 (sorbitan mono-oleat)	1,0 ml
Dikali hydro phosphat (K_2HPO_4)	2,0 g
Natri axetat ngậm ba phân tử nước ($NaCH_3CO_2 \cdot 3H_2O$)	5,0 g
Triamoni xitrat [$(NH_4)_3HC_6H_5O_7$]	2,0 g
Magie sulfat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2 g
Mangan sulfat ngậm bốn phân tử nước ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	0,05 g
Thạch	12 g đến 18 g *
Nước	1 000 ml

* Tùy thuộc vào sức đông của thạch.

5.3.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần trên trong nước. Đun huyền phù đến sôi, thỉnh thoảng khuấy cho đến khi thu được dung dịch hoà tan hoàn toàn. Phân phối môi trường này với các lượng 100 ml $\pm$ 1 ml vào các lọ 150 ml (6.9) hoặc các phần 200 ml $\pm$ 2 ml vào các lọ dung tích 250 ml (6.9).

Nếu cần, chỉnh pH (6.8) để sau khi khử trùng, pH là $6,2 \pm 0,2$. Khử trùng 15 min bằng nổi hấp (6.6) ở 121 °C. Nếu môi trường này không được sử dụng ngay thì làm nguội trên nổi cách thủy (6.7) đến nhiệt độ khoảng từ 44 °C đến 47 °C. Không để môi trường tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời.

TCVN 7849:2008

Môi trường thạch MRS đã chuẩn bị có thể bền đến 6 tháng khi được bảo quản nơi tối ở 1 °C đến 5 °C.

CHÚ THÍCH Thạch MRS hoàn chỉnh có bán sẵn trên thị trường, nhưng các kết quả thu được từ các nhà cung cấp khác nhau có thể khác nhau đáng kể (Xem thêm ISO/TS 11133-1 và ISO/TS 11133-2).

5.3.3 Dung dịch gốc clindamycin

5.3.3.1 Thành phần

Clindamycin hydro clorua	2,0 mg
Nước	10,0 ml

5.3.3.2 Chuẩn bị

Hòa tan clindamycin hydro clorua trong nước. Lọc dung dịch rồi khử trùng qua màng lọc 0,22 µm (6.13) cho vào ống nghiệm vô trùng (6.14).

Nếu dung dịch chưa được sử dụng ngay, thì phân phối thành các lượng nhỏ vào các ống nghiệm lạnh vô trùng (6.17) và giữ các ống này ở nhiệt độ – 20 °C. Dung dịch đông lạnh này có thể bảo quản được đến 6 tuần.

5.3.4 Dung dịch gốc xiprofloxacin

5.3.4.1 Thành phần

Xiprofloxacin hydro clorua	20,0 mg
Nước cất, đến	10,0 ml

5.3.4.2 Chuẩn bị

Hòa tan Xiprofloxacin hydro clorua trong nước và lọc để khử trùng qua màng lọc 0,22 µm (6.13) cho vào ống nghiệm vô trùng (6.14).

Nếu dung dịch chưa được sử dụng ngay, thì giữ ở nhiệt độ – 20 °C. Dung dịch đông lạnh này có thể bảo quản được 8 tuần.

5.3.5 Môi trường hoàn chỉnh: Chuẩn bị đĩa thạch

5.3.5.1 Thành phần

Thạch MRS (5.3.2)	100 ml	hoặc	Thạch MRS (5.3.2)	200 ml
Dung dịch gốc clindamycin (5.3.3)	0,05 ml		Dung dịch gốc clindamycin (5.3.3)	0,1 ml
Dung dịch gốc xiprofloxacin (5.3.4)	0,5 ml		Dung dịch gốc xiprofloxacin (5.3.4)	1,0 ml

5.3.5.2 Chuẩn bị

Ngay trước khi sử dụng, làm tan chảy thạch MRS (5.3.2) trên nồi cách thủy (6.7). Làm nguội trên nồi cách thủy đến nhiệt độ từ 44 °C đến 47 °C.

Cho 0,05 ml dung dịch gốc clindamycin (5.3.3) và 0,5 ml dung dịch gốc xiprofloxacin (5.3.4) vào 100 ml thạch MRS (5.3.2), hoặc cho 0,1 ml dung dịch gốc clindamycin (5.3.3) và 1,0 ml dung dịch gốc xiprofloxacin (5.3.4) vào 200 ml thạch MRS (5.3.2) và trộn thật cẩn thận. Tránh tạo bọt khí.

Rót từ 12 ml đến 15 ml môi trường này vào các đĩa Petri (6.11). Để môi trường nguội và đông đặc lại bằng cách đặt các đĩa Petri này có nắp đậy trên mặt phẳng nằm ngang, mát.

Các đĩa MRS/CL/CIP đã chuẩn bị có thể bảo quản được 10 ngày, nơi tối ở nhiệt độ từ 4 °C đến 7 °C.

Trước khi sử dụng, làm khô các đĩa thạch theo TCVN 6404 (ISO 7218).

6 Thiết bị, dụng cụ thủy tinh

Sử dụng các thiết bị thông thường của phòng thử nghiệm vi sinh, các thiết bị cần thiết để chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng theo quy định của TCVN 6404 (ISO 7218) và cụ thể như sau:

6.1 Dụng cụ thủy tinh

Khử trùng tất cả các dụng cụ tiếp xúc với mẫu thử, dịch pha loãng, các dung dịch pha loãng hoặc môi trường nuôi cấy, theo quy định của TCVN 6404 (ISO 7218). Các dụng cụ thủy tinh phải chịu được việc khử trùng nhiều lần.

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

6.3 Tủ kỵ khí, có thể khống chế được nhiệt độ ở $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, hoặc bình cấy kỵ khí có chứa khoảng từ 9 % đến 13 % cacbon dioxít.

6.4 Bộ trộn, kiểu nhu động (kiểu túi) có các túi vô trùng bằng chất dẻo hoặc bộ trộn quay có thể làm việc với tần số quay tối thiểu 20000 min^{-1} , có hộp đựng bằng kim loại hoặc thủy tinh vô trùng có dung tích thích hợp.

6.5 Thiết bị đếm khuẩn lạc, gồm một bộ phận chiếu sáng có nền đen, được gắn với một kính lúp có độ khuếch đại 1,5 lần và có một dụng cụ đếm cơ hoặc điện tử.

6.6 Nồi hấp áp lực, có khả năng duy trì ở nhiệt độ $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.7 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ từ 44 °C đến 47 °C và nhiệt độ sôi.

6.8 Máy đo pH, có bù nhiệt, chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị pH ở 25 °C.

6.9 Bình cấy hoặc chai, dung tích 150 ml hoặc 250 ml, có nút đậy kín hoặc nắp đậy thích hợp (để giữ môi trường cấy).

6.10 Pipet, vô trùng được hiệu chỉnh để sử dụng cho mục đích vi khuẩn học, có thể phân phối 0,05 ml $\pm$ 0,002 ml, 0,1 ml $\pm$ 0,02 ml, 1,0 ml $\pm$ 0,02 ml và 10 ml $\pm$ 0,2 ml.

6.11 Đĩa Petri, vô trùng, bằng chất dẻo hoặc thủy tinh không màu trong suốt, đường kính 90 mm, chiều sâu tối thiểu là 10 mm. Đáy không có điểm nào không đều mà có thể cản trở việc đếm khuẩn lạc.

6.12 Dao trộn, vô trùng, bằng kim loại hoặc thủy tinh.

6.13 Bộ lọc, vô trùng, có màng xenluloza axetat cỡ lỗ 0,22 μ m.

6.14 Ống nghiệm, vô trùng, dung tích 20 ml, có nắp đậy kín thích hợp.

6.15 Que dàn mẫu, vô trùng, bằng thủy tinh hoặc kim loại.

6.16 Tủ sấy, xem TCVN 6404 (ISO 7218).

6.17 Ống đông lạnh, vô trùng, dung tích 2 ml.

7 Lấy mẫu

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

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

8 Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị mẫu thử và các dung dịch pha loãng thập phân

Chuẩn bị mẫu thử, phần mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo, theo TCVN 6263 (ISO 8261).

Mẫu phải được cấy ra đĩa ít nhất là ba dãy dung dịch pha loãng để kiểm tra sự phát triển của *L. acidophilus* và sự phát triển của các vi khuẩn sinh axit lactic khác.

8.2 Cấy và nuôi cấy

8.2.1 Dùng pipet vô trùng (6.10) chuyển sang bề mặt hai đĩa Petri chứa thạch MRS/CL/CIP (5.3.5), mỗi đĩa 0,1 ml dung dịch pha loãng thích hợp.

8.2.2 Dùng que dàn mẫu (6.15) dàn mẫu đều trên khắp bề mặt môi trường. Sử dụng một que dàn mẫu cho mỗi độ pha loãng.

8.2.3 Để cho môi trường hấp thụ mẫu rồi lật ngược đĩa để vào tủ kỵ khí (6.3) ở 37 °C trong 72 h ± 3 h.

8.2.4 Dùng đĩa Petri chưa cấy môi trường để kiểm chứng độ vô trùng của môi trường.

8.3 Định lượng khuẩn lạc

Sau thời gian ủ quy định (8.2.3), đếm các khuẩn lạc có các đặc điểm của vi sinh vật đặc trưng (xem 3.1) trên đĩa thạch có từ 10 khuẩn lạc đến 300 khuẩn lạc. Có thể sử dụng dụng cụ đếm thích hợp (6.5) để đếm.

9 Tính toán và biểu thị kết quả

9.1 Tính toán

9.1.1 Sử dụng các số đếm từ các đĩa chứa từ 10 khuẩn lạc đến 300 khuẩn lạc thu được trong 8.3.

9.1.2 Tính số lượng *L. acidophilus* giả định, N , có trong mẫu thử trên một gam, theo công thức sau đây:

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

trong đó

$\sum c$ là tổng số khuẩn lạc đặc trưng (3) đếm được trên tất cả các đĩa được giữ lại;

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

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

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất được giữ lại.

9.2 Biểu thị kết quả

9.2.1 Làm tròn kết quả thu được đến hai chữ số có nghĩa. Đối với chữ số thứ ba, thì làm tròn số thứ ba đến chữ số 0 gần nhất. Nếu số thứ ba là 5 thì làm tròn đến số thấp hơn, nếu hai chữ số thứ nhất là số chẵn; làm tròn đến số cao hơn nếu hai chữ số thứ nhất là lẻ.

9.2.2 Nếu chỉ có số đếm nhỏ hơn 10 khuẩn lạc, thì báo cáo kết quả là "ít hơn $10 \times 1/d$ " vi sinh vật trong một gam sản phẩm, trong đó d là giá trị tương ứng với độ pha loãng thấp nhất.

9.2.3 Nếu tất cả các số đếm đều trên 300 khuẩn lạc, thì tính số lượng ước tính từ các đĩa có số khuẩn lạc gần với 300 nhất và nhân số này với số nghịch đảo của độ pha loãng cao nhất. Báo cáo kết quả theo "số lượng ước tính tối thiểu các vi sinh vật trong một gam sản phẩm".

9.2.4 Biểu thị theo số từ 1,0 đến 9,9 nhân với lũy thừa tương ứng của 10.

9.3 Ví dụ

Số đếm khuẩn lạc cho các kết quả như sau (hai đĩa Petri cho mỗi độ pha loãng):

a) ở độ pha loãng thứ nhất (10^{-5}): 280 khuẩn lạc và 299 khuẩn lạc;

b) ở độ pha loãng thứ hai (10^{-6}): 31 khuẩn lạc và 36 khuẩn lạc.

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

$$N = \frac{280 + 299 + 31 + 36}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-5}}$$

$$N = \frac{646}{2,2 \times 10^{-5}} = 294 \times 10^5 \text{ CFU/g}$$

Làm tròn kết quả theo 9.2 thu được 290×10^5 . Do đó, số ước tính là $2,9 \times 10^7$ CFU/g.

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm của phương pháp được nêu trong phụ lục A. Giới hạn lặp lại và tái lập đã được xác định sử dụng sáu loại sản phẩm sữa lên men chứa các mức *L. acidophilus* khác nhau và một mẫu chuẩn.

Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và các chất nền khác với các dải nồng độ và các chất nền đã nêu.

10.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả (*L. acidophilus* giả định trên gam hoặc mililit) thử nghiệm độc lập riêng rẽ (đã chuyển về $\log_{10}$), hoặc tỷ số của hai kết quả thử nghiệm cao hơn và thấp hơn trên cùng kênh thử, thu được, khi sử dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên vật liệu giống hệt nhau, do cùng

một người tiến hành trong cùng một phòng thử nghiệm, sử dụng cùng thiết bị, trong một khoảng thời gian ngắn, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn lặp lại, r .

Về giới hạn lặp lại (r), Bảng 1 cho các giá trị ước tính về độ lặp lại của các sản phẩm khác nhau theo các giá trị độ lệch chuẩn của chúng (s), đối với các sản phẩm sữa lên men.

CHÚ THÍCH Các độ lệch chuẩn lặp lại dao động từ 0,01 đến 0,16 (sản phẩm A). Trong phần lớn các trường hợp, giá trị độ lệch chuẩn lặp lại nhỏ hơn 0,1.

Bảng 1 – Độ lệch chuẩn lặp lại, s ,

Mẫu	Sản phẩm	s ,
A	Sản phẩm thương mại chứa <i>L. acidophilus</i> , <i>L. johnsonii</i> và <i>bifidobacteria</i>	0,16
B	Sản phẩm thương mại chứa <i>L. acidophilus</i>	0,01
C	Sản phẩm nhân tạo chứa mức trung bình của <i>L. gasseri</i> và mức cao của <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. paracasei</i> loài phụ <i>paracasei</i> và vi khuẩn sữa chua	0,13
D	Sản phẩm nhân tạo chứa mức thấp của <i>L. acidophilus</i> và mức cao của <i>bifidobacteria</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. paracasei</i> loài phụ <i>paracasei</i> và vi khuẩn sữa chua	0,05
E	Sản phẩm nhân tạo chứa mức trung bình của <i>L. acidophilus</i> và mức cao của <i>bifidobacteria</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. paracasei</i> loài phụ <i>paracasei</i> và vi khuẩn sữa chua	0,05
F	Sản phẩm thương mại chứa <i>L. acidophilus</i> , vi khuẩn sữa chua, <i>L. rhamnosus</i> và <i>bifidobacteria</i>	0,06
G	Chủng đối chứng: <i>L. acidophilus</i>	0,05

10.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả (*L. acidophilus* giả định trên gam hoặc mililit) (đã chuyển về $\log_{10}$) thử nghiệm riêng rẽ, hoặc tỷ số của hai kết quả thử nghiệm cao hơn và thấp hơn trên cùng kênh thử, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên vật liệu thử giống hệt nhau, do các người khác nhau thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau, không quá 5 % các trường hợp vượt quá giới hạn tái lập, R .

Về giới hạn tái lập (R), Bảng 2 cho thấy các giá trị ước tính về độ tái lập của các sản phẩm khác nhau theo các giá trị độ lệch chuẩn của chúng (s_R) đối với sản phẩm sữa lên men.

CHÚ THÍCH Độ tái lập hơi cao hơn với khoảng 0,15, nhưng đối với các sản phẩm C và D thì giá trị này $> 0,5$ cho thấy rằng phương pháp này không có lợi thế khi hàm lượng vi sinh vật cạnh tranh cao hơn *L. acidophilus* giả định.

Bảng 2 – Độ lệch chuẩn tái lập, s_R

Mẫu	Sản phẩm	s_R
A	Sản phẩm thương mại chứa <i>L. acidophilus</i> , <i>L. johnsonii</i> và bifidobacteria	0,19
B	Sản phẩm thương mại chứa <i>L. acidophilus</i>	0,14
C	Sản phẩm nhân tạo chứa mức trung bình của <i>L. gasseri</i> và mức cao của <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. paracasei</i> loài phụ <i>paracasei</i> và vi khuẩn sữa chua	0,53
D	Sản phẩm nhân tạo chứa mức thấp của <i>L. acidophilus</i> và mức cao của bifidobacteria, <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. paracasei</i> loài phụ <i>paracasei</i> và vi khuẩn sữa chua	1,26
E	Sản phẩm nhân tạo chứa mức trung bình của <i>L. acidophilus</i> và mức cao của bifidobacteria, <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. paracasei</i> loài phụ <i>paracasei</i> và vi khuẩn sữa chua	0,07
F	Sản phẩm thương mại chứa <i>L. acidophilus</i> , vi khuẩn sữa chua, <i>L. rhamnosus</i> và bifidobacteria	0,06
G	Chủng đối chứng: <i>L. acidophilus</i> .	0,17

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- tất cả các chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu độ lặp lại được kiểm tra thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(tham khảo)

Phép thử liên phòng thử nghiệm

Một nghiên cứu cộng tác quốc tế bao gồm tám phòng thử nghiệm của bốn quốc gia, thực hiện trên các sản phẩm sữa lên men thương mại, pha trộn nhân tạo và chất chuẩn, phù hợp với TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Các mẫu đã được thực hiện hai lần và được phân tích trên từng mẫu. Các mẫu pha trộn nhân tạo chứa *L. acidophilus* giả định ở các mức khác nhau lẫn với các vi khuẩn sinh axit lactic khác ở mức cao.

Phép thử này được tổ chức vào tháng chín năm 2004 tại Chr.Hansen A/S, Đan mạch. Phương pháp này đã được gửi đến các thành viên tham gia để nghiên cứu bao gồm việc sử dụng xiprofloxacin. Các kết quả về độ chụm được nêu trong Bảng A.1

Bảng A.1 – Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm

Thông số	Mẫu						
	A	B	C	D	E	F	G
Số lượng phòng thử nghiệm	8	8	8	8	8	8	8
Mẫu	2	2	2	2	2	2	2
Số lượng ngoại lệ	1	1	1	1	1	1	1
Phòng thử nghiệm không có ngoại lệ	7	7	7	7	7	7	7
Phòng thử nghiệm có nhiều hơn ba mẫu có giá trị	6	3	3	5	5	6	5
Mẫu được chấp nhận	12	6	6	10	10	12	10
Giá trị trung bình ($\log_{10}$ CFU/g)	6,6	7,2	6,7	5,6	5,9	6,0	7,8
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r ($\log_{10}$ CFU/g)	0,16	0,01	0,13	0,05	0,05	0,06	0,05
Giới hạn lặp lại, r	0,45	0,03	0,36	0,14	0,14	0,17	0,14
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R ($\log_{10}$ CFU/g)	0,19	0,14	0,53	1,26	0,07	0,06	0,17
Giới hạn tái lập, R	0,53	0,39	1,48	3,53	0,2	0,17	0,48
A	Sản phẩm thương mại chứa <i>L. acidophilus</i> , <i>L. johnsonii</i> và bifidobacteria						
B	Sản phẩm thương mại chứa <i>L. acidophilus</i>						
C	Sản phẩm nhân tạo chứa mức trung bình của <i>L. gasseri</i> và mức cao của <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. paracasei</i> loài phụ <i>paracasei</i> và vi khuẩn sữa chua						
D	Sản phẩm nhân tạo chứa mức thấp của <i>L. acidophilus</i> và mức cao của bifidobacteria, <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. paracasei</i> loài phụ <i>paracasei</i> và vi khuẩn sữa chua						
E	Sản phẩm nhân tạo chứa mức trung bình của <i>L. acidophilus</i> và mức cao của bifidobacteria, <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. paracasei</i> loài phụ <i>paracasei</i> và vi khuẩn sữa chua						
F	Sản phẩm thương mại chứa <i>L. acidophilus</i> , vi khuẩn sữa chua, <i>L. rhamnosus</i> và bifidobacteria						
G	Chủng đối chứng: <i>L. acidophilus</i>						

Thư mục liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.
 - [2] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.
 - [3] TCVN 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo. Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn.
 - [4] ISO/TS 11133-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
 - [5] ISO/TS 11133-2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.
 - [6] DE MAN, J.K., ROGOSA, M. and SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 1960, pp. 130-135.
-