



TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13876:2023

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT TRONG CHUỖI THỰC PHẨM –
ĐỊNH LƯỢNG NHANH NẤM MEN VÀ NẤM MỐC
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG ĐĨA COMPACT DRY YMR**

*Microbiology of the food chain –
Rapid enumeration of yeasts and moulds by the method using Compact Dry YMR*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13876:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Định lượng nhanh nấm men và nấm mốc bằng phương pháp sử dụng đĩa Compact Dry YMR

*Microbiology of the food chain – Rapid enumeration of yeasts and moulds
by the method using Compact Dry YMR*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp sử dụng đĩa Compact Dry YMR để định lượng nhanh ¹⁾ nấm men và nấm mốc trong thực phẩm.

Phương pháp này thích hợp đối với các sản phẩm có hoạt độ nước lớn hơn 0,95.

Phụ lục A cung cấp thông tin về kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp và kết quả của các phép thử liên phòng thử nghiệm do các tổ chức AOAC ^{[7],[8]} và NMKL - NordVal ^{[9],[10]} thực hiện.

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 6507 (ISO 6887) (tất cả các phần), *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*

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

¹⁾ Phương pháp này cho phép định lượng trong thời gian 3 ngày (72 h) thay vì 5 ngày (120 h) đối với các phương pháp chuẩn nêu trong TCVN 8275-1:2010 (ISO 21527-1:2008)^[4] và TCVN 8275-2:2010 (ISO 21527-2:2008)^[5].

3.1

Nấm men (yeast)

Vi sinh vật hiếu khí ưa ấm, ở nhiệt độ 25 °C khi sử dụng môi trường trong các điều kiện quy định ở tiêu chuẩn này, phát triển thành các khuẩn lạc tròn, bóng hoặc mờ trên bề mặt môi trường, thường có mép viền đều và bề mặt lồi ít hoặc nhiều

CHÚ THÍCH: Nấm men trong môi trường phát triển thành các khuẩn lạc tròn, hình bầu dục.

3.2

Nấm mốc (mould)

Vi sinh vật dạng sợi nhỏ hiếu khí ưa ấm, trong các điều kiện quy định ở tiêu chuẩn này, phát triển thành các mầm/chồi mọc lan như lông tơ hoặc dệt hoặc thành các khuẩn lạc trên bề mặt môi trường, thường có màu xanh lục hoặc có cấu trúc mạng bào tử

3.3

Khuẩn lạc (colony)

Cụm sinh khối vi sinh vật tại một vị trí, có thể nhìn thấy, phát triển trên hoặc trong môi trường dinh dưỡng đặc từ một phần tử sống

4 Nguyên tắc

Sử dụng đĩa môi trường chuẩn bị sẵn bao gồm môi trường nuôi cấy, chất tạo gel hòa tan trong nước lạnh, cơ chất enzym tạo màu và chất kháng sinh chloramphenicol. Cấy 1 mL phần mẫu thử đã pha loãng vào giữa môi trường nuôi cấy và để phần mẫu thử tự khuếch tán. Nấm men và nấm mốc sinh trưởng và phát triển nhờ chất dinh dưỡng; cơ chất enzym tạo màu (X-phos) được dùng để phát hiện và định lượng nấm men và nấm mốc sau khi ủ ở nhiệt độ 25 °C ± 1 °C trong thời gian 3 ngày; chloramphenicol ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Đếm các khuẩn lạc có màu bất kỳ (hầu hết khuẩn lạc có màu xanh lục và xanh lam) và các khuẩn lạc có dạng sợi (dạng bông).

5 Môi trường nuôi cấy và dung dịch pha loãng

Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích, nước sử dụng là nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

5.1 Đĩa Compact Dry YMR

Đĩa Compact Dry YMR gồm chất dinh dưỡng, chloramphenicol, cơ chất enzym tạo màu (X-phos²⁾) và chất tạo gel hòa tan trong nước lạnh.

²⁾ Danh pháp IUPAC là dicyclohexyl[2',4',6'-tris(propan-2-yl)[1,1'-biphenyl]-2-yl]phosphan, mã số hóa chất (CAS) là 564483-18-7.

Kích thước của đĩa là 20 cm², mặt sau của đĩa có lưới ô vuông 1 cm × 1 cm để thuận tiện cho việc đếm khuẩn lạc.

Bảo quản đĩa này ở nhiệt độ từ 1 °C đến 30 °C.

5.2 Dung dịch muối pepton (MRD)

5.2.1 Thành phần

Pepton (sản phẩm thủy phân casein bằng enzym)	1,0 g
Natri clorua (NaCl)	8,5 g
Nước	1 000 mL

5.2.2 Chuẩn bị

Hoà tan các thành phần vào nước đựng trong bình hoặc chai dung tích 1 000 mL bằng cách đun nóng, nếu cần. Khử trùng 15 min bằng nồi hấp áp lực (6.3) ở 121 °C.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH là $7,0 \pm 0,2$ ở nhiệt độ 25 °C, nếu cần.

6 Thiết bị, dụng cụ

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

6.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

6.2 Dụng cụ đo pH, có độ chính xác đến 0,1 đơn vị pH ở nhiệt độ 20 °C đến 25 °C.

6.3 Nồi hấp áp lực, có thể kiểm soát ở nhiệt độ 121 °C.

6.4 Bình định mức, dung tích 1 000 mL.

6.5 Pipet, có thể phân phối thể tích 1 mL.

6.6 Máy trộn Vortex.

6.7 Túi trộn nhu động, có màng lọc, dung tích từ 80 mL đến 400 mL, ví dụ: Stomacher bag.

6.8 Thiết bị đồng hóa mẫu, ví dụ: Stomacher.

6.9 Tủ ẩm, có thể duy trì được nhiệt độ $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.10 Bộ đếm khuẩn lạc.

7 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 11923 (ISO/TS 17728) ^[6]; đối với lấy mẫu bề mặt thân thịt theo TCVN 7925 (ISO 17604) ^[3], lấy mẫu sữa và sản phẩm sữa theo TCVN 6400 (ISO 707) ^[1].

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

8 Chuẩn bị mẫu thử

8.1 Chuẩn bị phần mẫu thử, theo phần tương ứng của TCVN 6507 (ISO 6887).

8.2 Chuẩn bị huyền phù mẫu thử

Cân 10 g phần mẫu thử, chính xác đến 0,1 mg, cho vào túi trộn nhu động (6.7). Thêm 90 mL dung dịch muối pepton (5.2) vào túi trộn, đặt túi trộn trong thiết bị đồng hóa mẫu (6.8) và trộn mạnh trong $1 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$.

Nếu cần chuẩn bị các dãy dung dịch pha loãng liên tiếp 10 lần thì sử dụng dung dịch muối pepton.

CHÚ THÍCH: Sử dụng túi trộn nhu động có màng lọc để tránh để lại các mảnh nhỏ lên bề mặt môi trường nuôi cấy.

9 Cách tiến hành

9.1 Lấy số đĩa Compact Dry YMR (5.1) cần sử dụng. Nếu cần đếm khuẩn lạc ở các độ pha loãng liên tiếp thì sử dụng một bộ bốn đĩa. Ghi nhãn đĩa với thông tin về mẫu thử và độ pha loãng.

9.2 Mở nắp đĩa, dùng pipet (6.5) lấy 1 mL phần mẫu thử đã chuẩn bị (xem Điều 8), cho vào giữa và đậy nắp đĩa. Phần mẫu thử sẽ khuếch tán tự động và đồng đều trên toàn bộ môi trường để chuyển thành dạng gel.

Cần thao tác cẩn thận để tránh ô nhiễm vi sinh vật.

Các mẫu có độ nhớt cao, màu đậm hoặc độ pH quá cao hoặc phản ứng với chất chỉ thị oxy hóa khử có thể ảnh hưởng đến kết quả. Đối với các mẫu như vậy, chỉ phân tích sau khi pha loãng mẫu, điều chỉnh pH của mẫu bằng dung dịch đệm hoặc các biện pháp khác.

9.3 Đậy nắp đĩa và đặt vào tủ ấm (6.9), ủ đĩa ở nhiệt độ $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ trong $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$.

Trong thời gian ủ, cần giữ kín nắp đĩa để tránh thất thoát ẩm.

9.4 Đếm các khuẩn lạc có màu bất kỳ (hầu hết khuẩn lạc có màu xanh lục và xanh lam) và các khuẩn

lạc dạng sợi (dạng bông), sử dụng bộ đếm khuẩn lạc (6.10). Có thể đặt giấy trắng ở phía dưới đĩa để giúp việc đếm khuẩn lạc dễ dàng hơn.

Việc đếm trên đĩa cần được điều chỉnh theo hệ số pha loãng.

Khi khó đếm khuẩn lạc do có số lượng lớn khuẩn lạc mọc trong môi trường, có thể tính tổng số khuẩn lạc bằng 20 lần số khuẩn lạc trung bình từ các ô đại diện $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$, các ô này được đếm ở bốn góc của đĩa.

9.5 Phạm vi đếm khuẩn lạc là từ 1 CFU/đĩa³⁾ đến 150 CFU/đĩa. Nếu đĩa đếm có số khuẩn lạc lớn hơn 150 CFU/đĩa thì pha loãng mẫu thử bằng dung dịch pha loãng thích hợp.

10 Tính và biểu thị kết quả

a) Tính tổng số nấm men, nấm mốc có trong mẫu thử, N , theo trung bình số khuẩn lạc từ hai độ pha loãng liên tiếp, áp dụng Công thức (1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 11 \times d} \quad (1)$$

Trong đó:

$\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đếm được trên hai đĩa với hai độ pha loãng liên tiếp, trong đó có ít nhất một đĩa chứa tối thiểu 10 khuẩn lạc;

V là thể tích dịch cấy được đưa vào mỗi đĩa, tính bằng mililit ($V = 1\text{ mL}$);

d là độ pha loãng tương ứng với dung dịch pha loãng đầu tiên được giữ lại ($d = 1$ khi đĩa đầu tiên được giữ lại là đĩa cấy mẫu thử dạng lỏng không pha loãng).

b) Nếu các đĩa không chứa khuẩn lạc nào thì báo cáo kết quả là:

"Có ít hơn $\frac{1}{V \times d}$ CFU trên gam sản phẩm"

Trong đó:

V là thể tích dịch cấy được đưa vào mỗi đĩa, tính bằng mililit ($V = 1\text{ mL}$);

d là độ pha loãng tương ứng với mỗi đĩa được giữ lại.

c) Nếu số đếm khuẩn lạc trên một đĩa trong khoảng từ 1 CFU/đĩa đến 3 CFU/đĩa thì báo cáo kết quả là:

³⁾ CFU: đơn vị hình thành khuẩn lạc.

“Có mặt nấm men, nấm mốc nhưng ít hơn $\frac{4}{V \times d}$ CFU trên gam sản phẩm”.

d) Nếu số đếm khuẩn lạc trên một đĩa trong khoảng từ 4 CFU/dĩa đến 9 CFU/dĩa thì tính số ước tính N_E nấm men, nấm mốc trên gam sản phẩm theo Công thức (2):

$$N_E = \frac{C}{V \times d} \quad (2)$$

Trong đó:

C là số khuẩn lạc đếm được trên đĩa.

e) Trường hợp chỉ có đĩa chứa dung dịch pha loãng được nuôi cấy cuối cùng có thể đếm và có chứa từ 10 CFU/dĩa đến 150 CFU/dĩa, thì tính số lượng nấm men, nấm mốc có trên gam sản phẩm, N' , áp dụng Công thức (3):

$$N' = \frac{C}{V \times d} \quad (3)$$

f) Nếu số đếm khuẩn lạc trên một trong các đĩa có tất cả các dung dịch pha loãng đã nuôi cấy, cho số lượng nấm men, nấm mốc lớn hơn 150 CFU/dĩa, thì báo cáo kết quả là:

“có nhiều hơn $\frac{150}{V \times d}$ CFU trên gam sản phẩm”.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin dưới đây:

- mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- các điểm đặc biệt quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được cho là tùy chọn, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- kết quả thử nghiệm thu được.

Phụ lục A

(tham khảo)

**Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp
và phép thử liên phòng thử nghiệm**

A.1 Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp do AOAC thực hiện

Các thử nghiệm xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc nêu trong tiêu chuẩn này do AOAC thực hiện năm 2021 ^{[7],[8]}.

A.1.1 Thử nghiệm về độ chọn lọc mục tiêu và độ chọn lọc loại trừ

Kết quả thử nghiệm về độ chọn lọc mục tiêu theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này đối với các loài nấm men, nấm mốc được nêu trong Bảng A.1. Kết quả thử nghiệm về độ chọn lọc loại trừ theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này đối với các loài vi sinh vật không phải nấm men, nấm mốc được nêu trong Bảng A.2.

Bảng A.1 – Kết quả thử nghiệm đối với các loài nấm men, nấm mốc

TT	Tên loài	Phân loại	Mã số ^{a)}	Nguồn gốc	Phát triển sau 72 h ^{b)}	Mô tả khuẩn lạc tại thời điểm 72 h
1.	<i>Alternaria alternata</i>	Nấm mốc	IFO 31188	Lá cỏ ngọt (<i>Stevia rebaudiana</i>) tươi	+	Xanh da trời đến lục sẫm, rìa không rõ
2.	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Nấm mốc	NBRC 9455	Quả việt quất <i>Vaccinium</i> sp.	+	Trắng đến xanh da trời, rìa không rõ, có chấm đen ở tâm
3.	<i>Aspergillus flavus</i>	Nấm mốc	NBRC 6343	Đế giày	+	Xanh da trời nhạt; các chấm đen trên sợi nấm (không điển hình)
4.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Nấm mốc	NBRC 33022	Không xác định	+	Xanh da trời nhạt, khuẩn lạc không rõ
5.	<i>Aspergillus niger</i>	Nấm mốc	NBRC 105649	Da giày	+	Xanh da trời đậm; các chấm đen ở tâm
6.	<i>Aspergillus oryzae</i>	Nấm mốc	NBRC 5375	Không xác định	+	Xanh da trời; tâm nâu nhạt
7.	<i>Aspergillus terreus</i>	Nấm mốc	NBRC 6346	Ba lô	+	Trắng; rìa không rõ
8.	<i>Aspergillus versicolor</i>	Nấm mốc	NBRC 4098	Thuốc lá	+	Xanh da trời nhạt; rìa không rõ
9.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Nấm men	NBRC 6353	Không xác định	+	Xanh lam đến lục đậm
10.	<i>Candida albicans</i>	Nấm men	NBRC 1594	Nấm phế quản	+	Trắng đến lục nhạt

Bảng A.1 (tiếp theo)

TT	Tên loài	Phân loại	Mã số ^{a)}	Nguồn gốc	Phát triển sau 72 h ^{b)}	Mô tả khuẩn lạc tại thời điểm 72 h
11.	<i>Candida apicola</i>	Nấm men	NBRC 10261	Hệ đường ruột của ong	+	Xanh da trời
12.	<i>Candida lactis-condensi</i>	Nấm men	NBRC 1286	Sữa đặc lên men	+	Xanh da trời, kể cả ở rìa
13.	<i>Chaetomium globosum</i>	Nấm mốc	NBRC 6347	Bông	+	Xanh da trời
14.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Nấm mốc	NBRC 6348	Không xác định	+	Xanh da trời nhạt đến xanh da trời; khuẩn lạc không rõ
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	Nấm mốc	NBRC 4460	Không khí	+	Trắng đến xanh da trời nhạt; khuẩn lạc không rõ
16.	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Nấm men	IFO 0026	Xúc xích bò-lợn	+	Trắng
17.	<i>Debaryomyces maramus</i>	Nấm men	NBRC 0668	Không khí	+	Trắng
18.	<i>Fusarium oxysporum</i>	Nấm mốc	NBRC 7155	Không xác định	+	Xanh da trời nhạt; tâm màu xanh da trời đậm
19.	<i>Fusarium solani</i>	Nấm mốc	NBRC 5232	Không xác định	+	Xanh da trời; tâm dạng bông
20.	<i>Geotrichum candidum</i>	Nấm men	NBRC 4598	Không xác định	+	Trắng đến lục nhạt, dạng bông
21.	<i>Hormoconis resinae</i>	Nấm mốc	NBRC 100535	Không xác định	+	Xanh da trời rất nhạt; khuẩn lạc không xác định và không điển hình
22.	<i>Monascus purpureus</i>	Nấm mốc	NBRC 32316	Gạo đỏ	+	Xanh da trời; tâm nâu nhạt
23.	<i>Moniliella acetoabutans</i>	Nấm men	NBRC 9482	Nước trái cây ngọt	+	Xanh da trời
24.	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Nấm mốc	NBRC 6113	Bông đóng kiện bị hỏng	+	Xanh da trời; tâm nâu nhạt
25.	<i>Neosartorya fischeri</i>	Nấm mốc	IFO 8789	Lốp cao su phế liệu	+	Xanh da trời nhạt đến xanh da trời; rìa không xác định
26.	<i>Paecilomyces variotii</i>	Nấm mốc	NBRC 33284	Không xác định	+	Xanh da trời nhạt đến xanh da trời
27.	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Nấm mốc	NBRC 7733	Hạt ngô (<i>Zea mays</i>) bị thối	+	Xanh da trời
28.	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Nấm mốc	NBRC 5727	Đất	+	Xanh da trời; tâm màu trắng đến nâu nhạt
29.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Nấm mốc	IFO 32030	Phomat	+	Xanh da trời; tâm màu trắng dạng bông
30.	<i>Penicillium citrinum</i>	Nấm mốc	NBRC 6352	Không xác định	+	Vàng lục; tâm màu trắng dạng bông
31.	<i>Penicillium funiculosum</i>	Nấm mốc	NBRC 100958	Vải đã xử lý thủy ngân	+	Trắng nhạt; khuẩn lạc không xác định
32.	<i>Penicillium martensii</i>	Nấm mốc	NBRC 8142	Không xác định	+	Xanh lục; rìa không xác định

Bảng A.1 (kết thúc)

TT	Tên loài	Phân loại	Mã số ^{a)}	Nguồn gốc	Phát triển sau 72 h ^{b)}	Mô tả khuẩn lạc tại thời điểm 72 h
33.	<i>Penicillium</i> <i>°Chrochloron</i>	Nấm mốc	NBRC 4612	Không xác định	+	Xanh da trời; rìa không xác định
34.	<i>Penicillium</i> <i>pinophilum</i>	Nấm mốc	NBRC 33285	Không xác định	+	Trắng đến xanh da trời rất nhạt; khuẩn lạc không xác định
35.	<i>Phialophora</i> <i>fastigiata</i>	Nấm mốc	IFO 6850	Không xác định	+	Xanh da trời; rìa không xác định
36.	<i>Phoma herbarum</i>	Nấm mốc	NBRC 107643	Ống hút polyester trên bình uống	+	Trắng đến xanh da trời rất nhạt; rìa không xác định
37.	<i>Pichia anomala</i>	Nấm men	IFO 10213	Không xác định	+	Xanh da trời (gần như lục)
38.	<i>Pseudocochliobolus</i> <i>lunatus</i>	Nấm mốc	NBRC 30883	Lá cây cao lương	+	Xanh da trời nhạt; rìa không xác định
39.	<i>Rhizopus oryzae</i>	Nấm mốc	NBRC 31005	Vỏ radio	+	Nâu vàng nhạt một phần; phát triển không điển hình; có đốm đen trên sợi nấm
40.	<i>Rhodotorula acuta</i>	Nấm men	IFO 1912	Nước ép nho	+	Xanh da trời; rìa xanh da trời nhạt
41.	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Nấm men	NBRC 1125	Không khí	+	Xanh da trời; rìa xanh da trời nhạt
42.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Nấm men	NBRC 0889	Không xác định	+	Xanh da trời nhạt; rìa xanh da trời rất nhạt
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nấm men	NBRC 101557	Rượu sake lên men	+	trắng đến lục nhạt
44.	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Nấm mốc	NBRC 100536	Nhộng tằm	+	Xanh da trời nhạt đến xanh da trời; khuẩn lạc không rõ
45.	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Nấm men	IFO 1180	Nước ép nho	+	Xanh da trời (gần như lục); rìa xanh da trời nhạt
46.	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Nấm mốc	IFO 31137	Đất ở tầng hữu cơ	+	Xanh da trời nhạt; rìa không rõ, tâm màu xanh da trời đậm
47.	<i>Trichoderma viren</i>	Nấm mốc	NBRC 6355	Đất	+	Xanh da trời đến vàng lục; phát triển không điển hình, khuẩn lạc không rõ
48.	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Nấm mốc	IFO6202	Không xác định	+	Xanh da trời nhạt
49.	<i>Trichosporon asahii</i>	Nấm men	NBRC 103889	Vỏ Trichosporia cutis psoriatiformis progressiva	+	Xanh da trời
50.	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Nấm men	NBRC 1098	Không xác định	+	Xanh da trời nhạt đến xanh da trời; rìa xanh da trời rất nhạt
51.	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Nấm men	NBRC 1960	Đường mía	+	Trắng đến xanh da trời nhạt; rìa xanh da trời rất nhạt

^{a)} IFO = Campden Culture Collection (Campden BRI, Chipping Campden, UK); NBRC = National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center (Tokyo, Japan)

^{b)} “+” ký hiệu cho thấy có vi sinh vật sinh trưởng.

Bảng A.2 – Kết quả thử nghiệm đối với các loài vi sinh vật không phải nấm men, nấm mốc

TT	Tên loài	Mã số ^{a)}	Nguồn gốc	Sinh trưởng ^{b)}
1.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	JCM 6841	Nước tiểu	–
2.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	Nước tiểu	–
3.	<i>Alcaligenes faecalis</i>	IFO 13111	Không xác định	–
4.	<i>Bacillus cereus</i>	IFO 13494	Không xác định	–
5.	<i>Bacillus licheniformis</i>	NBRC 12200	Không xác định	–
6.	<i>Bacillus subtilis</i>	NBRC 3134	Không xác định	–
7.	<i>Burkholderia cepacia</i>	NBRC 15124	Dung dịch benzalkonium chloride 10 %	–
8.	<i>Citrobacter freundii</i>	IFO 12681	Không xác định	–
9.	<i>Klebsiella aerogenes</i> (tên cũ <i>Enterobacter aerogenes</i>)	ATCC 13048	Đờm	–
10.	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>Cloacae</i>	NBRC 13535	Dịch tủy sống	–
11.	<i>Enterococcus faecalis</i>	NBRC 12965	Nước cam chanh	–
12.	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434	Không xác định	–
13.	<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3301	Phân người	–
14.	<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3972	Phân	–
15.	<i>Myroides odoratus</i> (tên cũ <i>Flavobacterium odoratum</i>)	ATCC 4651	Không xác định	–
16.	<i>Kocuria rhizophila</i>	ATCC 9341	Đất	–
17.	<i>Lactobacillus casei</i>	NBRC 15883	Phomat	–
18.	<i>Lactococcus lactis</i>	NS 6938	Người	–
19.	<i>Listeria monocytogenes</i>	VTU 206	Không xác định	–
20.	<i>Micrococcus luteus</i>	NBRC 3333	Không xác định	–
21.	<i>Morganella morganii</i>	ATCC 25830	Bệnh nhân bị tiêu chảy mùa hè	–
22.	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	NBRC 15309	Không xác định	–
23.	<i>Proteus mirabilis</i>	IFO 3849	Không xác định	–
24.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NBRC 13275	Nhiễm trùng tai ngoài	–
25.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ATCC 17587	Mật	–
26.	<i>Rhodococcus equi</i>	IFO 14956	Khối áp xe phổi của ngựa con	–
27.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028	Mô động vật, từ tim và gan của gà 4 tuần tuổi	–
28.	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	NBRC 102204	Nước ao	–
29.	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	Không xác định	–
30.	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	NBRC 12732	Không xác định	–
31.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 35984	Vết nhiễm trùng ống thông tiểu	–
32.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	JCM 5674	Ban đỏ	–

^{a)} JCM = Japan Collection of Microorganisms (RIKEN BioResource Center, Ibaraki, Japan); ATCC = American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA); IFO = Campden Culture Collection (Campden BRI, Chipping Campden, UK); NBRC = National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center (Tokyo, Japan); VTU = Visvesvaraya Technological University (Bangalore, India)

^{b)} “–” ký hiệu cho thấy vi sinh vật không sinh trưởng.

A.1.2 Thử nghiệm so sánh kết quả định lượng nấm men và nấm mốc theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này (TCVN 13876:2023) so với các phương pháp chuẩn

Thử nghiệm theo phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này so với phương pháp chuẩn nêu trong TCVN 8275-1:2010 (ISO 21527-1:2008)^[4] được nêu trong Bảng A.3. Thử nghiệm được thực hiện trên 10 nền mẫu bao gồm: tôm nấu chín; củ cải trộn salad; cá ngừ đóng hộp; sữa chua uống hương vị dâu tây chứa probiotic; rau cải bó xôi trộn phomat; bánh trứng; sinh tố rau quả; phomat kem; bánh sandwich kẹp phomat và mì pasta trộn salad kèm thịt gà, thịt lợn. Phần mẫu thử được ủ ở nhiệt độ trong khoảng từ 25 °C ±1 °C trong thời gian 3 ngày.

Bảng A.3 – Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này (TCVN 13876:2023) so với phương pháp chuẩn [TCVN 8275-1:2010 (ISO 21527-1:2008)]

Nền mẫu	Mức bổ sung	n ^{a)}	TCVN 13876:2023			TCVN 8275-1 (ISO 21527-1)			DOM ^{d)}		95 % CI ^{e)}		90 % CI	
			Trung bình Log ₁₀ CFU/g	S _r	RSD _r ^{c)} , %	Trung bình Log ₁₀ CFU/g	S _r	RSD _r , %			LCL ^{f)}	UCL ^{g)}	LCL	UCL
Sữa chua uống lên men	Thấp	5	2,828	0,048	1,70	2,819	0,046	1,63	0,009		-0,076	0,094	0,056	0,074
	Trung bình	5	4,851	0,029	0,60	4,818	0,022	0,46	0,033		-0,007	0,073	0,003	0,064
	Cao	5	5,769	0,078	1,35	5,776	0,095	1,64	-0,008		-0,135	0,120	-0,106	0,090
Phomat cream	Thấp	5	2,767	0,107	3,87	2,629	0,057	2,17	0,139		0,010	0,268	0,040	0,238
	Trung bình	5	4,778	0,058	1,21	4,841	0,064	1,32	-0,064		-0,095	0,032	-0,088	-0,039
	Cao	5	5,660	0,103	1,82	5,716	0,096	1,68	-0,057		-0,131	0,018	-0,114	0,001
Bánh trứng	Thấp	5	2,420	0,049	2,02	2,370	0,157	6,62	0,050		-0,145	0,244	-0,099	0,199
	Trung bình	5	2,963	0,102	3,44	3,247	0,122	3,76	-0,284		-0,310	0,257	-0,304	-0,263
	Cao	5	4,645	0,115	2,48	4,837	0,063	1,30	-0,192		-0,359	0,025	-0,320	-0,063
Rau cải bó xôi trộn phomat	Thấp	5	2,396	0,050	2,09	2,343	0,062	2,65	0,053		-0,060	0,166	-0,034	0,139
	Trung bình	5	2,963	0,102	3,44	3,247	0,122	6,67	-0,284		-0,310	0,257	-0,304	-0,263
	Cao	5	4,510	0,107	2,37	4,668	0,202	4,33	-0,158		-0,353	0,037	-0,308	-0,009
Salad rau	Thấp	5	2,180	0,090	4,13	2,457	0,151	6,15	-0,277		-0,534	0,019	-0,475	-0,079
	Trung bình	5	3,968	0,066	1,66	3,934	0,057	1,45	0,033		-0,050	0,116	-0,030	0,097
	Cao	5	5,976	0,029	0,49	5,922	0,065	1,10	0,053		-0,027	0,133	-0,008	0,115
Sinh tố rau quả	Thấp	5	3,427	0,057	1,66	3,537	0,109	3,08	-0,111		-0,246	0,024	-0,214	-0,007
	Trung bình	5	4,718	0,115	2,44	4,846	0,118	2,43	-0,128		-0,220	0,035	-0,119	-0,057
	Cao	5	5,758	0,106	1,84	5,880	0,131	2,23	-0,122		-0,205	0,039	-0,186	-0,059
Tôm nấu chín	Thấp	5	1,466	0,118	8,05	1,159	0,221	19,1	0,307		-0,013	0,627	0,061	0,553
	Trung bình	5	4,202	0,138	3,28	4,265	0,124	2,91	-0,063		-0,260	0,133	-0,215	0,088
	Cao	5	5,539	0,113	2,04	5,603	0,114	2,03	-0,064		-0,153	0,025	-0,133	0,004
Cá ngừ đóng hộp	Thấp	5	2,454	0,040	1,63	2,275	0,194	8,53	0,179		-0,080	0,438	-0,020	0,378
	Trung bình	5	4,208	0,136	3,23	4,279	0,187	4,37	-0,070		-0,209	0,069	-0,177	0,036
	Cao	5	5,485	0,094	1,71	5,394	0,082	1,52	0,091		-0,081	0,263	-0,041	0,223
Sandwich salad trứng	Thấp	5	2,459	0,161	6,55	2,436	0,134	5,50	0,022		-0,062	0,107	-0,043	0,087
	Trung bình	5	3,930	0,232	5,90	3,933	0,150	3,81	-0,003		-0,199	0,193	-0,153	0,147
	Cao	5	5,322	0,075	1,41	5,383	0,095	1,76	-0,060		-0,255	0,134	-0,210	0,089
Mì pasta trộn salad	Thấp	5	2,991	0,060	2,01	3,120	0,091	2,92	-0,129		-0,304	0,046	-0,263	0,006
	Trung bình	5	3,833	0,065	1,70	3,810	0,121	3,18	0,024		-0,133	0,180	-0,097	0,144
	Cao	5	5,050	0,179	3,54	5,233	0,053	1,01	-0,183		-0,400	0,033	-0,350	-0,017

a) n = số phần mẫu thử lặp lại; b) CFU = đơn vị hình thành khuẩn lạc; c) RDS_r = độ lệch chuẩn tương đối lặp lại; d) DOM = chênh lệch giá trị trung bình; e) CI = khoảng tin cậy của DOM; f) LCL = giới hạn dưới khoảng tin cậy của DOM; g) UCL = giới hạn trên khoảng tin cậy của DOM

A.2 Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp do NMKL - NordVal thực hiện

Thử nghiệm xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này so với phương pháp chuẩn nêu trong TCVN 8275-1:2010 (ISO 21527-1:2008)^[4] do NMKL - NordVal thực hiện năm 2021^[9] và bổ sung năm 2022 ^[10]. Phần mẫu thử được ủ ở nhiệt độ trong khoảng từ 25 °C ±1 °C trong thời gian 3 ngày.

A.2.1 Đánh giá chênh lệch giữa hai phương pháp đối với một số thông số

Kết quả thử nghiệm đánh giá chênh lệch giữa hai phương pháp đối với một số thông số được nêu trong Bảng A.4. Thử nghiệm được thực hiện bằng cả hai phương pháp, trên 85 mẫu thử thuộc 5 nhóm nền mẫu sau đây, thu được 80 kết quả để phân tích thống kê:

- + Bánh, kẹo và sản phẩm trứng: các sản phẩm bánh có nướng, có chứa trứng; các sản phẩm trứng;
- + Sản phẩm sữa: các loại phomat, sữa chua chứa trái cây, sữa uống lên men;
- + Rau quả: salad quả tươi và puree quả, nước quả ướp lạnh, rau lên men (cải muối chua, oliu muối);
- + Thực phẩm nhiều thành phần: thịt chế biến sẵn ăn liền (ví dụ: phile thịt gà, pate), thủy sản tẩm ướp và nấu chín, thịt muối (ví dụ: salami, dăm bông);
- + Thực phẩm ăn liền: thực phẩm phối trộn (ví dụ: sandwich, salad pasta), salad trộn mayonaise, tương ớt.

Tất cả các mẫu đều nhiễm vi sinh vật một cách tự nhiên. Hoạt độ nước của các mẫu đều lớn hơn 0,95.

Bảng A.4 – Chênh lệch giữa hai phương pháp đối với một số thông số

Nhóm thực phẩm	Số lượng mẫu thử, n	Chênh lệch trung bình, D	Độ lệch chuẩn của chênh lệch trung bình, S_D	95 % giới hạn dưới	95 % giới hạn trên
Bánh, kẹo và sản phẩm trứng	15	-0,045	0,278	-1,66	1,57
Sản phẩm sữa	23	-0,037	0,578	-1,62	0,83
Rau quả	14	-0,150	0,457	-1,17	0,87
Thực phẩm nhiều thành phần	13	-0,102	0,777	-1,86	1,66
Thực phẩm ăn liền	15	-0,549	0,780	-2,28	1,18
Tổng các nhóm	80	-0,268	0,676	-1,62	1,07

A.2.2 Đánh giá độ chụm của phương pháp

Thử nghiệm đánh giá độ chụm của phương pháp được thực hiện trên nền mẫu cá hồi đóng hộp với 14 phòng thử nghiệm tham gia. Mẫu thử được cấy hỗn hợp chủng nấm men *S. cerevisiae* CRA 15968 và chủng nấm mốc *P. chrysogenum* DSM 848 với nồng độ tương đương. Mỗi phòng thử nghiệm nhận được 7 nền mẫu, mỗi mẫu 10 g, đựng trong túi đựng mẫu tiệt trùng. Độ pha loãng thích hợp của hỗn hợp nấm men và nấm mốc được sử dụng để cấy vào từng mẫu thử sao cho mức nhiễm thu được là: mức thấp (khoảng 10^2 CFU/mL), mức trung bình (khoảng 10^4 CFU/mL) và mức cao (khoảng 10^6 CFU/mL). Mỗi phòng thử nghiệm nhận được 2 mẫu ở mỗi mức nhiễm và một mẫu kiểm chứng (âm tính).

Kết quả được nêu trong Bảng A.5.

Bảng A.5 – Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp quy định trong tiêu chuẩn này (TCVN 13876:2023) so với phương pháp chuẩn [TCVN 8275-1:2010 (ISO 21527-1:2008)]

Phương pháp	TCVN 13876:2023	TCVN 8275-1 (ISO 21527-1)	TCVN 13876:2023	TCVN 8275-1 (ISO 21527-1)	TCVN 13876:2023	TCVN 8275-1 (ISO 21527-1)
Mức nhiễm	Thấp		Trung bình		Cao	
Số phòng thử nghiệm	14	14	14	14	14	14
Giá trị trung bình, $\log_{10}$ CFU/g	2,56	2,65	3,91	3,96	5,62	5,62
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r	0,13	0,11	0,11	0,13	0,095	0,077
Độ lặp lại giữa các phòng thử nghiệm, s_L	0,13	0,12	0,20	0,14	0,14	0,11
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R	0,18	0,16	0,22	0,19	0,17	0,13
Độ chênh giữa hai phương pháp	-0,09		-0,05		0,00	
Giới hạn dưới của dung sai	-0,34		-0,36		-0,23	
Giới hạn trên của dung sai	0,16		0,25		0,24	
Giới hạn chấp nhận được	$\pm 0,5$		$\pm 0,5$		$\pm 0,5$	

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
 - [2] TCVN 6404:2016 (ISO 7218:2007 with Amendment 1:2013), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Yêu cầu chung và hướng dẫn kiểm tra vi sinh vật*
 - [3] TCVN 7925 (ISO 17604), *Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm – Lấy mẫu thân thịt để phân tích vi sinh vật*
 - [4] TCVN 8275-1:2010 (ISO 21527-1:2008), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 1: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước lớn hơn 0,95*
 - [5] TCVN 8275-2:2010 (ISO 21527-2:2008), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp định lượng nấm men và nấm mốc – Phần 2: Kỹ thuật đếm khuẩn lạc trong các sản phẩm có hoạt độ nước nhỏ hơn hoặc bằng 0,95*
 - [6] 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*
 - [7] Shingo Mizuochi, Gail Betts (2022), “Validation of the CompactDry “Nissui” YMR for Enumeration of Yeasts and Molds in a Variety of Foods: AOAC Performance Tested MethodSM 092002”, *Journal of AOAC International*, Volume 105, Issue 5, Pages 1408–1417
 - [8] AOAC Research Institute (2020), *AOAC 092002 - Compact Dry YMR (Yeast and Mould Rapid)*
 - [9] NMKL - NordVal International (2021), *Compact Dry YM Method for the Enumeration of Yeasts and Moulds in foods*
 - [10] NMKL - NordVal International (2022), *Compact Dry YM RAPID*
 - [11] Microval (2021), *Method Comparison Study Report for the ISO 16140-2:2016 validation of Compact Dry YMR for enumeration of yeasts and moulds in a broad range of foods with an aw >0.95*
-