

## Chất lượng nước – Phát hiện và đếm liên cầu phân –

### Phần 1: Phương pháp tăng sinh trong môi trường cấy lỏng

*Water quality – Detection and enumeration of faecal streptococci –*

*Part 1: Method by enrichment in a liquid medium*

#### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp chuẩn để phát hiện và đếm liên cầu phân trong nước bằng cách tăng sinh trong môi trường cấy lỏng.

#### 2 Lĩnh vực áp dụng

Phương pháp này có thể áp dụng được đối với mọi loại nước, kể cả nước đục.

#### 3 Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 5667 Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 1: Hướng dẫn các phương án lấy mẫu.

TCVN 5992 : 1995 (ISO 5662 – 2) Chất lượng nước – Lấy mẫu – Hướng dẫn các kỹ thuật lấy mẫu.

TCVN 5993 : 1995 (ISO 5662 – 3) Chất lượng nước – Lấy mẫu – Hướng dẫn vận chuyển và xử lý mẫu.

#### 4 Định nghĩa

Liên cầu phân : Là các vi khuẩn cho phản ứng dương tính với các môi trường (6.2.1 và 6.2.2) được qui định trong tiêu chuẩn và cho phản ứng âm tính trong phép thử. catalaza.

## 5 Nguyên tắc và các phản ứng

Việc xác định liên cấu phân trong một thể tích xác định của một mẫu thử cần qua hai bước sau:

### 5.1 Nuôi cấy tăng sinh

Nuôi cấy mẫu thử trong môi trường lỏng chọn lọc canh thang glucoza – nitrua trong  $44 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$  ở  $35^\circ\text{C}$  hoặc  $37^\circ\text{C}$ . Liên cấu phân sinh trưởng trong môi trường này và làm lên men glucoza kèm theo việc hình thành axit là nguyên nhân làm biến đổi màu của chỉ thị pH từ tím sang vàng.

### 5.2 Kháng định

Tất cả các ống tăng sinh cho phản ứng dương tính sau 24 h hoặc 48 h sẽ được nuôi cấy tiếp trên môi trường kháng định để loại trừ các phản ứng dương tính giả như phản ứng của các loại trực khuẩn và cầu khuẩn Gram dương khác. Môi trường kháng định, thạch mật – aesculin – nitrua, sau đó được nuôi cấy ở  $44^\circ\text{C}$  trong 48 h. Liên cấu phân sinh trưởng trong môi trường này và thủy phân aesculin; sản phẩm cuối, 6,7-hydroxycoumarin kết hợp với ion  $\text{Fe(III)}$  để tạo thành một hợp chất màu nâu vàng tới đen khuyếch tán vào môi trường. Ngoài ra, tiến hành phép thử catalaza đối với các khuẩn lạc nghi ngờ trong môi trường kháng định. Các khuẩn lạc cho phản ứng aesculin dương tính và catalaza âm tính có thể được xem là liên cấu phân.

## 6 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Cảnh báo – Tất cả các môi trường chọn lọc được mô tả trong phần này của tiêu chuẩn đều chứa natri nitrua. Vì chất này cực độc và có tính gây đột biến, phải thận trọng để tránh tiếp xúc với nó, đặc biệt tránh hít phải các bụi nhỏ trong khi pha chế các môi trường hoàn chỉnh khô dạng thương phẩm. Các môi trường có chứa nitrua không được trộn lẫn với các axit vô cơ mạnh, vì có thể tạo ra chất độc hydro-nitrua ( $\text{HN}_3$ ). Các dung dịch có chứa nitrua cũng có thể hình thành các chất gây nổ khi tiếp xúc với các ống dẫn bằng kim loại, ví dụ: các ống dẫn bằng kim loại trong các bồn rửa.

### 6.1 Các nguyên vật liệu cơ bản

Để cho các kết quả được đồng nhất, khi pha chế các môi trường cần sử dụng các thành phần cùng mức chất lượng và các hoá chất thuộc loại dùng cho phân tích, hoặc một môi trường hoàn chỉnh khô. Natri nitrua sẽ phân huỷ theo thời gian, vì vậy các môi trường khô chỉ có một thời hạn sử dụng nhất định.

Chỉ sử dụng nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

trong đó

$A$  là độ hấp thụ của mẫu thử;

$A_0$  là độ hấp thụ của mẫu trắng;

$V_m$  là thể tích của phần mẫu thử, mililit (thông thường là 10 ml);

$V_p$  là thể tích của bình định mức (100 ml);

$b$  là độ nghiêng của đường hiệu chuẩn, lít trên miligam.

Nếu cần, tính nồng độ của chất bằng milimol trên lít theo công thức:

$$c_x = \frac{\rho_k}{39,1} \dots (2)$$

Nếu đường cong hiệu chuẩn không tuyến tính thì tiến hành theo mô tả ở 8.1.

### 8.3 Độ chính xác

Kết quả thử nghiệm của một liên phòng thí nghiệm thực hiện vào mùa thu năm 1991 sử dụng phương pháp này đưa ra trong bảng 1.

Bảng 1 – Số liệu về độ chính xác

Mẫu thử <sup>1)</sup>	$l$	$n$	$n_b$ %	$\bar{x}$ mg/l	$\sigma_r$ mg/l	$VC_r$ %	$\sigma_R$ mg/l	$VC_R$ %
A	10	27	10	0,99	0,0581	5,9	0,0411	4,2
B	10	30	0	5,72	0,2279	4,0	0,0961	1,7
C	10	30	0	6,71	0,2397	3,6	0,1387	2,1

$l$  là số lượng các phòng thí nghiệm

$\sigma_r$  là độ lệch chuẩn của độ lặp lại

$n$  là số lượng các giá trị

$VC_r$  là hệ số biến thiên của độ lặp lại

$n_b$  là phần trăm số nằm ngoài

$\sigma_R$  là độ lệch chuẩn của độ tái lập

$x$  là trị số trung bình

$VC_R$  là hệ số biến thiên của độ tái lập

1) A: nước uống

B: nước bề mặt

C: nước thải

## 6.2 Các môi trường nuôi cấy

## 6.2.1 Canh thang glucoza (nồng độ đơn)

cao thịt bò	4,5 g
tripton	15,0 g
glucoza	7,5 g
natri clorua (NaCl)	7,5 g
natri nitrua ( $\text{NaN}_3$ )	0,2 g
bromocresol tía (dung dịch 15 g/l trong cồn etanol)	1 ml
nước vừa đủ	1000 ml

Đun sôi để hoà tan các thành phần trong nước.

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng sẽ là  $7,2 \pm 0,1$  ở  $25^\circ\text{C}$ .

Phân phối vào các ống nghiệm, mỗi ống 10 ml môi trường.

Khử trùng môi trường này trong 15 phút ở  $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

Chú thích – Để kiểm tra các mẫu nước với lượng nhiều hơn 1 ml, cần chuẩn bị môi trường canh thang nồng độ kép có các thể tích bằng thể tích của mẫu thử.

## 6.2.2 Môi trường thạch mật – aesculin – nitrua

tripton	17,0 g
pepton	3,0 g
cao men	5,0 g
mật bò khô	10,0 g
natri clorua (NaCl)	5,0 g
aesculin	1,0 g
amoni sắt (III) xitrat	0,5 g
natri nitrua ( $\text{NaN}_3$ )	0,15 g
thạch	từ 12 g đến 20 g (theo chỉ dẫn của nhà sản xuất)
nước vừa đủ	1000 ml

Hoà tan các thành phần trên trong nước bằng cách đun sôi.

## TCVN 6189-1 : 1996

Chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng, pH sẽ là  $7,2 \pm 0,1$  ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Phân phối vào các bình chứa cho phù hợp.

Khử trùng trong 15 phút ở  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Làm nguội đến  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  tới  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  và rót vào các hộp Petri để có được độ dày môi trường ít nhất là 3mm và để yên trên một mặt phẳng ngang, chỗ mát.

6.3 Dung dịch hydro peroxit (oxi già) 30 g/l.

## 7 Thiết bị

Các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm vi sinh vật, và:

7.1 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  hoặc  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

7.2 Tủ ấm, có thể duy trì nhiệt độ ở  $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

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

## 8 Lấy mẫu

Xem ISO 5667-1, TCVN 5992:1995 (ISO 5662-2) và TCVN 5993:1995 (ISO 5662-3).

## 9 Cách tiến hành

### 9.1 Xử lý mẫu

Các qui trình chung, như xử lý mẫu và chuẩn bị các dung dịch pha loãng sẽ được xây dựng thành tiêu chuẩn trong thời gian tới.

### 9.2 Tăng sinh

Cho 1 ml mẫu (hoặc mẫu pha loãng) vào 10 ml canh thang glucoza – nitrua (6.2.1) và trộn kỹ.

Các lượng mẫu lớn hơn 1 ml cần cho vào canh thang nồng độ kép với cùng thể tích

Nuôi ấm ở  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  hoặc  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong  $22\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

Coi tất cả các ống nghiệm có xuất hiện màu vàng (ở toàn bộ ống hay chỉ ở thành phần dưới ống) là cho phản ứng dương tính, nuôi ấm lại các ống nghiệm âm tính trong một khoảng thời gian  $22\text{ h} \pm 2\text{ h}$  nữa.



Sau giai đoạn nuôi ươm này, thậm chí sự chuyển màu yếu thành màu đỏ nhạt cũng được coi là dấu hiệu của sự tạo thành axit. Để rõ ràng hơn cần so sánh với màu của ống môi trường không cấy mẫu thử.

Để có kết quả định lượng, cần sử dụng phương pháp "số có xác suất cao nhất" (MNP).

### 9.3 Kháng định

Kháng định mỗi ống cấy tăng sinh có biểu hiện sinh axit như sau:

Lấy một vòng que cấy từ ống canh thang tăng sinh nghi ngờ, cấy rĩa lên một đĩa thạch mật – aesculin – nitrua (6.2.2).

Nuôi trong tủ ấm ở  $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong  $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$ .

Tất cả các đĩa cho thấy các khuẩn lạc có màu từ nâu tới đen và /hoặc có màu nâu hay đen ở phần môi trường xung quanh được coi là phản ứng dương tính.

### 9.4 Phép thử catalaza

Nhỏ một giọt dung dịch oxi già (hydro peroxit) (6.3) lên khuẩn lạc trên môi trường thạch mật – aesculin – nitrua.

Việc xuất hiện bọt nhỏ oxi chứng tỏ là các sinh vật cho phản ứng catalaza dương tính. Chỉ có các khuẩn lạc catalaza âm tính mới được coi là liên cầu phân.

Chú thích – Để loại trừ các sai lầm do các phản ứng catalaza âm tính giả có thể xảy ra trên môi trường thạch mật – aesculin – nitrua, phép thử này có thể làm lại trên một mẫu cấy truyền lên một môi trường không chọn lọc khác.

## 10 Biểu thị kết quả

Sự mô tả chung về cách trình bày kết quả và cách tính toán số có xác suất lớn nhất sẽ được xây dựng thành tiêu chuẩn trong thời gian tới.

## 11 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả sẽ bao gồm các thông tin sau:

- tham khảo tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết cần thiết đối với sự nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp kháng định được dùng;
- các kết quả như đã nêu ở mục 10 tính theo số có xác suất lớn nhất của liên cầu phân trong thể tích mẫu thử.