

**TCVN 6831-2 : 2001**

**ISO 11348-2 : 1998**

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC – XÁC ĐỊNH ẢNH HƯỞNG  
ỨC CHẾ CỦA MẪU NƯỚC ĐẾN SỰ PHÁT  
QUANG CỦA VI KHUẨN *VIBRIO FISCHERI*  
(PHÉP THỬ VI KHUẨN PHÁT QUANG) –  
PHẦN 2 : PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG  
VI KHUẨN KHÔ-LỎNG**

*Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples  
on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)*

*Part 2 : Method using liquid-dried bacteria*

## **Lời nói đầu**

TCVN 6831 - 2 : 2001 hoàn toàn tương đương với ISO 11348 - 2 : 1998;

TCVN 6831 - 2 : 2001 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F13 Các phương pháp phân tích và lấy mẫu biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

# Chất lượng nước – Xác định ảnh hưởng ức chế của mẫu nước đến sự phát quang của vi khuẩn *Vibrio fischeri* (Phép thử vi khuẩn phát quang )

## Phần 2: Phương pháp sử dụng vi khuẩn khô - lỏng

*Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test)*  
*Part 2 : Method using liquid-dried bacteria*

### 1 Phạm vi áp dụng

TCVN 6831 : 2001 (ISO 11348) qui định ba phương pháp xác định sự ức chế phát quang của vi khuẩn biển *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177). TCVN 6831-2 : 2001 (ISO 11348-2) qui định phương pháp sử dụng vi khuẩn khô - lỏng.

Tiêu chuẩn này áp dụng cho :

- nước thải;
- dịch chiết và dịch ngâm chiết bằng nước;
- nước ngọt (nước mặt và nước ngầm) hoặc nước mặn và nước lợ, đặc biệt dùng để kiểm soát sự thay đổi ức chế đối với vi khuẩn;
- nước giếng khoan.

### 2 Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 5667-16 : 1998 Chất lượng nước – Hướng dẫn thử sinh học các mẫu.

TCVN 6184 : 1996 (ISO 7027: 1990) Chất lượng nước – Xác định độ đục.

### 3 Nguyên tắc

Sự ức chế phát quang do cấy vi khuẩn *Vibrio fischeri* được xác định bằng cách thử nghiệm theo từng mẻ. Điều đó được thực hiện bằng việc kết hợp các thể tích qui định của mẫu thử hoặc mẫu thử đã pha loãng với huyền phù chứa vi khuẩn phát quang đựng trong cuvet.

## TCVN 6831-2 : 2001

Chuẩn cứ thử là sự giảm phát quang đo được sau khi mẫu và vi khuẩn tiếp xúc 15 phút và 30 phút hoặc 5 phút, tùy chọn, có tính đến hệ số hiệu chỉnh ( $f_{kt}$ ), đó là phép đo sự thay đổi cường độ của các mẫu kiểm tra trong suốt thời gian tiếp xúc. Ảnh hưởng ức chế của mẫu nước có thể được xác định bằng LID (xem phụ lục B) hoặc là các giá trị  $EC_{20}$  và / hoặc  $EC_{50}$  thông qua các dãy pha loãng.

Xác định mức pha loãng gây ra ức chế phát quang < 20%. Với các mức gây ức chế cao hơn, thì ảnh hưởng của nồng độ có thể xác định bằng biểu đồ hoặc bằng phép phân tích thống kê. Sự ức chế do mẫu được biểu thị theo các độ pha loãng gây giảm phát quang 20% và 50% so với các giá trị của mẫu thử trắng ( $EC_{20}$  và  $EC_{50}$ ). Những giá trị này được nội suy trong các dãy pha loãng.

## 4 Các chất gây nhiễu

Các chất không tan, ít tan hoặc dễ bay hơi hoặc các chất có phản ứng với nước pha loãng hoặc với huyền phù thử nghiệm, hoặc làm thay đổi trạng thái của chúng trong quá trình thử, có thể ảnh hưởng đến kết quả hoặc làm giảm độ tái lập của kết quả thử.

Trong trường hợp nước quá đục hoặc đậm màu, có thể xảy ra sự dập tắt phát quang do việc hấp thụ ánh sáng hoặc tán xạ ánh sáng gây ra. Sự gây nhiễu này đôi khi có thể khắc phục được, thí dụ : bằng cách sử dụng cuvet hiệu chỉnh hấp thụ hai ngăn (xem phụ lục A).

Vì sự phát quang sinh học cần đến lượng oxy > 0,5 mg/l, nên các mẫu có nhu cầu oxy cao (và / hoặc có hàm lượng oxy thấp) có thể sẽ gây sự thiếu hụt oxy và mẫu sẽ bị ức chế.

Mẫu bị nhiễm bản chất hữu cơ do các chất dinh dưỡng dễ phân huỷ sinh học (thí dụ như: urê, pepton, cao men, thông thường  $\geq 100$  mg/l) có thể làm giảm phát quang sinh học không lệ thuộc vào tác nhân ô nhiễm.

Hàm lượng muối trong mẫu ban đầu vượt quá 30 g/l NaCl, hoặc hàm lượng các thành phần khác có độ thẩm thấu tương đương, cùng với lượng muối cần phải thêm vào khi thử có thể gây ra ảnh hưởng siêu thẩm thấu. Nếu mẫu chứa tương đương từ 20 g/l đến 50 g/l NaCl thì sẽ không phải cho thêm muối. Hàm lượng muối cuối cùng có trong mẫu thử sẽ không được vượt quá độ thẩm thấu của dung dịch NaCl 35g/l.

## 5 Thuốc thử và các vật liệu

Chỉ sử dụng các hoá chất đạt chất lượng phân tích. Dùng nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.

### 5.1 Vi khuẩn thử

Loài vi khuẩn phát quang thuộc chủng *Vibrio fischeri* NRRL - 11177. Các huyền phù vi khuẩn được dùng để xác định độc tính phải là các dung dịch được chuẩn bị từ các thuốc thử khô - lỏng có bán sẵn được bảo quản trong tủ đá ở nhiệt độ -18°C đến -20°C. Vi khuẩn phát triển ngay sau khi khôi phục và được dùng cho thử nghiệm.

**5.2 Dung dịch natri clorua, làm chất pha loãng**

Hoà tan 20 g natri clorua (NaCl) trong nước và thêm nước đến 1 lít.

**5.3 Dung dịch natri hydroxit,  $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$** **5.4 Axit clohydric,  $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$** 

**Chú thích** – Để điều chỉnh pH có thể cần sử dụng các axit hoặc các bazơ nồng độ thấp hơn hoặc cao hơn.

**5.5 Dung dịch dùng cho vi khuẩn khô - lỏng.**

D(+)- Glucoza ngậm nước ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	8,0 g
Natri clorua (NaCl)	20,0 g
Magie clorua ngậm 6 nước ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	2,035 g
Kali clorua (KCl)	0,30 g
N- (2- Hydroxyetyl) piperazine-N- (2- axit ethanesunfonic) (HEPES)	11,9 g

Hoà tan các thành phần trên trong nước, khuấy đều trong 30 phút và chỉnh pH đến  $7,0 \pm 0,2$  bằng dung dịch natri hydroxit (5.3) hoặc bằng axit clohydric (5.4). Thêm nước đến 1 lít.

Dung dịch này có thể chia thành các phần và bảo quản ở nhiệt độ  $-20^\circ\text{C}$ .

**5.6 Chất đối chứng**

- Kẽm sunfat ngậm 7 nước ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- 3,5-dichlorophenol ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$ )
- Kali dicromat ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )

**6 Thiết bị, dụng cụ**

**6.1 Tủ đá,** để lưu giữ các vi khuẩn cần bảo quản.

**6.2 Tủ lạnh,** để duy trì huyền phù gốc ở nhiệt độ  $3^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ .

**6.3 Hộp ổn nhiệt,** để duy trì mẫu thử ở nhiệt độ  $15^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Trong mỗi lần thử nghiệm nhiệt độ chỉ được dao động tối đa  $\pm 0,2^\circ\text{C}$ .

**6.4 Máy đo độ phát quang,** tế bào đo được duy trì ở nhiệt độ  $15^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , có trang bị các cuvet phù hợp.

**6.5 Ống nghiệm (lọ),** làm bằng chất liệu trơ về hoá học, thích hợp để sử dụng với máy đo độ phát quang đã chọn và có dung tích đủ lớn để đọc hết bề mặt lớn nhất có thể.

## **TCVN 6831-2 : 2001**

**6.6 pH mét.**

**6.7 Đồng hồ bấm giờ.**

**6.8 Pipet pitông với ống hút nhựa, dung tích danh định 10 µl, 500 µl và 1000 µl.**

**6.9 Pipet pitông dung tích thay đổi, từ 10 ml đến 200 ml và 200 µl đến 5000 µl.**

**6.10 Máy li tâm lạnh.**

**6.11 Nồi cách thủy có thể duy trì nhiệt độ ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .**

**6.12 Máy đo độ dẫn.**

## **7 Lấy mẫu và xử lý mẫu sơ bộ**

### **7.1 Lấy mẫu**

Mẫu phải được đựng trong các bình sạch, trơ về hoá học phù hợp với ISO 5667-16. Cho mẫu vào đầy các bình và gắn kín. Thử nghiệm mẫu càng sớm càng tốt sau khi lấy mẫu. Nếu cần, bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong bình thủy tinh, nơi tối không quá 48 h. Nếu phải bảo quản mẫu đến 2 tuần thì để mẫu ở nhiệt độ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Không được sử dụng hoá chất để bảo quản mẫu. Cần chỉnh pH và thêm muối trước khi thử.

### **7.2 Chuẩn bị mẫu**

Đo pH của tất cả các mẫu. Nếu pH nằm trong khoảng 6 - 8,5 thì không cần phải chỉnh. Tuy nhiên, việc chỉnh pH có thể làm biến đổi bản chất của mẫu. Mặt khác, pH của mẫu và pH của mẻ thử có thể khác nhau do khả năng đệm của môi trường thử khác nhau. Có thể cần phải thực hiện thử nghiệm trên cả 2 mẫu: mẫu đã chỉnh pH và mẫu không chỉnh pH.

Nếu cần, chỉnh pH của mẫu đến  $7,0 \pm 0,2$  bằng cách thêm axit clohydric (5.4) hoặc natri hydroxit (5.3); chọn nồng độ của axit clohydric hoặc natri hydroxyt sao cho thể tích thêm vào không lớn hơn 5% tổng thể tích.

Cho thêm 20 g natri clorua trên lít vào mẫu nước hoặc vào mẫu nước đã trung hoà. Đối với nước lợ và nước mặn, cần đo độ mặn và tính lượng NaCl (nếu có) cần thiết để điều chỉnh độ thẩm thấu (xem điều 4).

Các mẫu quá đục cần được để lắng trong 1 h hoặc cho ly tâm, thí dụ trong 10 phút ở 5000 g hoặc lọc.

## **8 Cách tiến hành**

Chuẩn bị mẫu theo 7.2.

Chuẩn bị các dây pha loăng cần thiết (xem phụ lục B).

Đối với các mẫu kiểm tra, duy trì dung dịch NaCl (5.2) ở nhiệt độ  $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Bảo quản vi khuẩn khô - lỏng ở  $-20^{\circ}\text{C}$  (5.1).

Làm tan băng vi khuẩn khô - lỏng trong nồi cách thủy ở nhiệt độ  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Các huyền phù gốc đã làm lạnh có thể chỉ sử dụng cho thử nghiệm ban đầu.

Thêm 0,5 ml dung dịch (5.5) (cho từng 100  $\mu\text{l}$  huyền phù gốc), giữ ở nhiệt độ  $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  và làm đồng nhất bằng cách lắc nhẹ lọ. Chờ khoảng 15 phút.

Dùng pipet cho vào mỗi ống nghiệm 500  $\mu\text{l}$  huyền phù cần thử, duy trì ở nhiệt độ  $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  trong hộp ổn nhiệt ở các khoảng thời gian giống nhau như đối với các phép đo cường độ sau này.

Nếu có thể, thực hiện phép đo kép cho mỗi mức pha loăng ở nhiệt độ thử  $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Sau thời gian ổn định ít nhất 15 phút, dùng máy đo độ phát quang để xác định và ghi lại cường độ phát quang  $I_0$  của các huyền phù thử.

Điều chỉnh dụng cụ của máy đo huỳnh quang sao cho gần với mức cực đại.

Chú thích – Nên đo tất cả các mẫu thử, bởi vì sự phát quang có thể khác nhau do huyền phù thử không được đồng nhất.

Vì thời gian tiếp xúc đối với tất cả các mẫu phải bằng nhau, nên sử dụng đồng hồ bấm giờ để cố định thời gian đo cường độ phát quang ở các khoảng thời gian đo. Khoảng thời gian đo thích hợp là 20 giây.

Ngay sau khi đo độ phát quang của huyền phù thử, cần cho thêm mẫu (7.2), mẫu pha loăng (phụ lục B), hoặc dung dịch natri clorua (5.2) để dung dịch này có đủ 1 ml. Dùng tay trộn đều, bật đồng hồ bấm giờ và đặt cuvet trở lại hộp ổn nhiệt ở  $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Lặp lại như vậy với tất cả các cuvet khác, chú ý để khoảng thời gian giữa các lần cho thêm liên tiếp là như nhau.

Đo và ghi lại cường độ phát quang trong tất cả các cuvet, kể cả mẫu kiểm tra, cứ sau 15 phút và sau 30 phút ( $I_{15}$ ,  $I_{30}$ ), có thể đo sau 5 phút ( $I_5$ ), tùy chọn.

Ghi lại sự điều chỉnh dụng cụ.

## 9 Đánh giá

### 9.1 Ảnh hưởng ức chế lên vi khuẩn phát quang

Sử dụng công thức (1) để tính hệ số hiệu chỉnh (giá trị  $f_{kt}$ ) từ cường độ phát quang đo được. Hệ số này dùng để hiệu chỉnh các giá trị ban đầu  $I_0$  của tất cả các mẫu thử trước khi chúng được dùng làm giá trị đối chứng để xác định độ giảm phát quang do nước.

$$f_{kt} = I_{kt} / I_0 \quad (t = 5 \text{ phút, } 15 \text{ phút, } 30 \text{ phút}) \quad \dots (1)$$

## TCVN 6831-2 : 2001

trong đó

$f_{kt}$  là hệ số hiệu chỉnh đối với thời gian tiếp xúc 5 phút, 15 phút, 30 phút;

$I_{kt}$  là cường độ phát quang trong mẫu kiểm tra sau thời gian tiếp xúc 15 phút hoặc 30 phút, tính bằng đơn vị phát quang tương ứng;

$I_0$  là cường độ phát quang của huyền phù thử kiểm tra, ngay trước khi cho thêm chất pha loãng (5.2), tính bằng đơn vị phát quang tương ứng;

Lấy giá trị  $f_{kt}$  trung bình của các mẫu kiểm tra.

Dùng công thức (2) để tính  $I_{ct}$ :

$$I_{ct} = I_0 \cdot \overline{f_{kt}} \quad \dots (2)$$

trong đó

$\overline{f_{kt}}$  là giá trị trung bình của  $f_{kt}$ ;

$I_0$  [xem ở công thức (1)];

$I_{ct}$  là giá trị đã hiệu chỉnh của  $I_0$  đối với các cuvet đựng mẫu thử ngay trước khi cho thêm mẫu thử.

Dùng công thức (3) để tính ảnh hưởng ức chế của mẫu thử:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_{Tt}}{I_{ct}} \times 100 \quad \dots (3)$$

trong đó

$H_t$  là ảnh hưởng ức chế của mẫu thử sau thời gian tiếp xúc 15 phút hoặc 30 phút, tính bằng phần trăm;

$I_{ct}$  [xem công thức (2)];

$I_{Tt}$  là cường độ phát quang của mẫu thử sau thời gian tiếp xúc 15 phút hoặc 30 phút, tính bằng đơn vị phát quang tương ứng;

Tính giá trị trung bình của ảnh hưởng ức chế  $H_t$  cho mỗi mức pha loãng, tính bằng phần trăm;

Tính độ lệch của phép xác định song song của  $H_t$  từ trung bình tương ứng của các lần thử kép và là phần trăm giá trị trung bình đối với các mẫu kiểm tra.

Để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ, dùng công thức (4) để tính giá trị gamma cho từng mức pha loãng:

$$\Gamma_t = \frac{\overline{H_t}}{100 - \overline{H_t}} \quad \dots (4)$$



trong đó

$\Gamma_t$  là giá trị gamma của mẫu thử sau thời gian tiếp xúc 15 phút hoặc 30 phút;

$\overline{H}_t$  là giá trị trung bình của  $H_t$  [xem công thức (3)].

Chú thích – Khi một nồng độ thử nhất định cho ức chế phát quang sinh học 0 % hoặc 100 % , thì không thể tính được giá trị gamma. Do đó, chỉ có những giá trị  $H_t$  nằm trong khoảng 10% và 90% được dùng để tính ảnh hưởng của nồng độ.

## 9.2 Xác định các giá trị EC

Tính ảnh hưởng của nồng độ đối với từng khoảng thời gian tiếp xúc, sử dụng phép phân tích hồi qui tuyến tính chuẩn. Ảnh hưởng của nồng độ ở một khoảng thời gian tiếp xúc cụ thể thường được biểu thị bằng công thức tuyến tính (5):

$$\lg c_t = b \lg \Gamma_t + \lg a \quad \dots (5)$$

trong đó

$c_t$  là phần mẫu nước có trong mẫu thử, tính bằng phần trăm;

$\Gamma_t$  [xem công thức (4)];

$b$  là giá trị của độ nghiêng của đường vẽ được ;

$\lg a$  là giá trị của phần bị cắt của đường vẽ được.

Bằng các phương pháp thống kê bình phương tối thiểu, tính các giá trị  $EC_{20}$  và  $EC_{50}$  với các giới hạn tin cậy tương ứng, trong đó :

$$c_t = EC_{20,t} \text{ ở } \Gamma_t = 0,25;$$

$$c_t = E_{50,t} \text{ ở } \Gamma_t = 1,00.$$

Nếu phạm vi các cặp giá trị không thể khớp với đường cong, thì các giá trị EC có thể được ước tính bằng đồ thị, sử dụng hệ tọa độ logarit kép.

## 10 Biểu thị kết quả

Báo cáo kết quả theo mẫu trong bảng 1.

Nếu xác định được, báo cáo giá trị LID (xem phụ lục B).

Nếu xác định được, báo cáo giá trị  $EC_{20}$  và  $E_{50}$ .

Báo cáo cách chuẩn bị vi khuẩn đã sử dụng.

Bảng 1 – Thí dụ về đánh giá thử nghiệm – Mẫu : nước thải sau xử lý của trạm xử lý nước thải

Thí nghiệm kiểm tra								
Thử nghiệm	Giá trị đo được		$I_{k30} / I_0$	$\overline{fk_{30}}$	Thử nghiệm tính đúng đắn Độ lệch so với giá trị trung bình $\overline{fk_{30}}$ , tính bằng % <sup>3)</sup>			
	$I_0$	$I_{k30}^{2)}$						
80% <sup>1)</sup>	297	242	0,8148	0,8115	± 0,4			
	292	236	0,8082					
50% <sup>1)</sup>	295	253	0,8576	0,8501	± 0,9			
	305	257	0,8426					
Thí nghiệm thử								
Thử	Mức pha loãng D	Giá trị đo được		$I_{c30}$	$H_{30}$	$\overline{H_{30}}$	Thử nghiệm tính đúng đắn	$\Gamma_{30}$
		$I_0$	$I_{T30}^{2)}$		%	%	Độ lệch so với giá trị trung bình, tính bằng % <sup>4)</sup>	
80% <sup>1)</sup>								
1	1	300	81	243,5	66,7	65,7	± 1,0	1,919
2		297	85	241,0	64,7			
50% <sup>1)</sup>								
3	2	280	141	238,0	40,8	42,2	± 1,4	0,731
4		292	140	248,2	43,6			
5	3	292	193	248,2	22,3	22,95	± 0,65	0,298
6		285	185	242,3	23,6			
7	4	303	229	257,6	11,1	11,75	± 0,65	0,113
8		302	225	256,7	12,4			
<p>1) Thể tích của huyền phù thử : tương ứng 0,2 ml và 0,5 ml .</p> <p>2) Thể tích cuối cùng trong cuvet: 1 ml.</p> <p>3) Độ lệch của giá trị <math>f_{k30}</math>, tính bằng phần trăm của các lần xác định song song so với giá trị trung bình của chúng là số đo sự phân tán của các mẫu kiểm tra.</p> <p>4) Độ lệch của giá trị <math>H_{30}</math>, tính bằng phần trăm của các lần xác định song song so với giá trị trung bình của chúng là số đo sự phân tán của các mẫu thử.</p> <p>Giá trị LID trong thí dụ này = 4.</p> <p>Giá trị <math>EC_{20}</math> trong thí dụ này = 31,9 %, Giá trị <math>EC_{50}</math> = 58,7 %.</p>								

## 11 Chuẩn cứ của tính đúng đắn

Phép thử được coi là đúng nếu :

- giá trị  $f_{kt}$  khi ủ trong 30 phút nằm trong phạm vi từ 0,6 đến 1,8;
- kết quả xác định song song không chênh lệch quá 3% so với trung bình của chúng. Điều này đúng cho mẫu kiểm tra, cũng như mẫu thử khi xác định giá trị LID hoặc các giá trị  $EC_{20}$  và  $EC_{50}$  tương ứng;
- Cả ba chất đối chứng (5.6) gây ức chế từ 20% đến 80% sau thời gian tiếp xúc 30 phút ở các nồng độ sau (các dung dịch không được trung hoà, kiểm tra riêng rẽ):

3,5-diclorophenol	6 mg/l
Zn <sup>2+</sup> (là kẽm sunfat ngậm 7 nước)	25 mg/l
Cr <sup>6+</sup> (là kali dicromat)	4 mg/l

## 12 Độ chính xác

Trong một thử nghiệm liên phòng thí nghiệm quốc gia được tiến hành trong suốt mùa hè năm 1991 do 22 phòng thí nghiệm tham gia đã xác định các số liệu về độ chính xác. Các kết quả được nêu trong phụ lục C.

## 13 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải nêu trích dẫn của tiêu chuẩn và phần đã sử dụng [TCVN 6831-1 : 2001 (ISO 11348-1); TCVN 6831-2 : 2001 (ISO 11348-2) hay TCVN 6831-3 : 2001 (ISO 11348-3)] và gồm các thông tin sau:

- a) nhận biết mẫu nước, kể cả việc lấy mẫu, thời gian và điều kiện bảo quản;
- b) pH của mẫu nước gốc;
- c) ngày thử nghiệm;
- d) xử lý sơ bộ mẫu, nếu có;
- e) nguồn gốc vi khuẩn, số mẻ;
- f) ngày chuẩn bị vi khuẩn;
- g) nhiệt độ bảo quản vi khuẩn, nếu bảo quản đông lạnh;
- h) biểu thị kết quả theo điều 10 và bảng 1;
- i) những sai lệch so với phương pháp này và thông tin về các tình huống có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- j) kết quả thử với các chất đối chứng.

## Phụ lục A

(tham khảo)

### Phương pháp chỉnh màu

#### A.1 Phạm vi áp dụng

Việc giảm độ phát quang do hấp thụ ánh sáng có thể xảy ra khi mẫu trong các dãy pha loãng thấy rõ màu, đặc biệt những màu từ đỏ đến nâu. Nếu quan sát thấy màu ở nồng độ  $EC_{20}$ , thì nên thực hiện qui trình sau đây để kiểm tra nếu thấy cần thiết phải hiệu chỉnh màu. Trong mọi trường hợp, khi nồng độ của mẫu thử gần với giá trị  $EC_{50}$  thì nên hiệu chỉnh màu.

#### A.2 Dụng cụ bổ sung

A.2.1 Cuvet hiệu chỉnh màu: cuvet có hai lớp, có gắn bộ phận đo độ phát quang.

A.2.2 Pipet Pasteur.

#### A.3 Cách tiến hành

Thực hiện toàn bộ qui trình hiệu chỉnh màu ở nhiệt độ  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong tủ ấm kiểm soát được nhiệt độ.

Chuẩn bị một dung dịch mẫu thử có nồng độ gần giá trị  $EC_{20,t}$  ( $C_k$ ). Khi các giá trị  $EC_{20,t}$  chênh lệch lớn thì  $C_k$  phải gần với giá trị  $EC_{20,t}$  thấp nhất.

Chú thích – Không cần phải chọn  $C_k$  khác nhau cho mỗi khoảng thời gian tiếp xúc (5 phút, 15 phút, 30 phút).

Cho 2,0 ml dung dịch natri clorua 2% vào khoang ngoài của cuvet hiệu chỉnh màu.

Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn đặc biệt.

Trộn kỹ huyền phù trước khi dùng pipet Paster để chuyển vào khoang trong của cuvet hiệu chỉnh màu. Thêm huyền phù cho bằng với mức dung dịch có trong khoang ngoài của cuvet hiệu chỉnh màu. Đo mức ánh sáng ( $B_0$ ) sau ít nhất 15 phút, và khởi động đồng hồ bấm giờ.

Từ thời điểm này trở đi, vị trí của cuvet hiệu chỉnh màu trong khoang đo phải được giữ nguyên cho tất cả các số đọc.

Dùng pipet lấy hết dung dịch natri clorua từ khoang ngoài và thay vào đó bằng 2,0 ml mẫu thử đã pha loãng (phụ lục B) và làm lạnh sơ bộ đến  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Sau lần đo đầu 5 phút, đo mức ánh sáng ( $I_5$ ).

Dùng pipet lấy hết mẫu thử đã pha loãng từ khoang ngoài và thay vào đó bằng 2,0 ml dung dịch natri clorua.

Sau lần đo đầu 10 phút, đo mức ánh sáng ( $B_{10}$ ).

Chú thích – Qui trình này có thể đơn giản hoá bằng cách dùng 2 cuvet hiệu chỉnh màu giống hệt nhau. Khoang ngoài của cuvet thứ nhất chứa đầy nước pha loãng, khoang ngoài của cuvet thứ hai chứa đầy mẫu thử đã pha loãng. Sau 15 phút, có thể đo mức ánh sáng  $B_0$  và  $I_0$ . Những giá trị này có thể thay cho các giá trị  $B_5$  và  $I_5$  khi tính toán trong A.4.

#### A.4 Tính toán kết quả

Việc tính này thừa nhận rằng mẫu màu phù hợp với định luật Beer-Lambert, đó là trường hợp thông thường.

Tính  $B_5$  theo công thức:

$$B_5 = B_0 = \frac{B_0 - B_{10}}{2}$$

Tính độ hấp thụ ( $A_t$ ) của nồng độ  $EC_{20,t}$  chưa hiệu chỉnh với thời gian tiếp xúc ( $t$ ) theo công thức:

$$A_t = \frac{EC_{20,t}}{C_k} \cdot k \cdot \ln \frac{B_5}{I_5}$$

trong đó

$C_k$  là nồng độ của mẫu hoặc của hoá chất có trong nồng độ thử (màu);

$k$  là hằng số hệ thống thực nghiệm;

$\ln \frac{B_5}{I_5}$  là độ hấp thụ của dung dịch pha loãng cần thử trong cuvet hiệu chỉnh màu.

Tính độ truyền qua tương ứng ( $T_t$ ) theo công thức:

$$T_t = \frac{1 - e^{-A_t}}{A_t}$$

Tính những giá trị gamma đã hiệu chỉnh ( $\Gamma_c$ ) theo công thức:

$$c\Gamma_t = (5T_t) - 4$$

và

$$\Gamma_c = c\Gamma_t \cdot \Gamma_0$$

trong đó

## TCVN 6831-2 : 2001

$c\Gamma_t$  là hệ số hiệu chỉnh cho giá trị gamma ở thời gian tiếp xúc đã định (t);

$\Gamma_0$  là giá trị gamma gốc.

Tiến hành tính lại kết quả thử với giá trị gamma đã được hiệu chỉnh.

Chú thích – Ở thời gian tiếp xúc đã định, độ hấp thụ ( $A_t$ ) và độ truyền qua ( $T_t$ ) đối với mỗi nồng độ thử đều có thể tính được, và từ đó tính được giá trị gamma chưa hiệu chỉnh theo công thức:

$$\Gamma_c = T_t(1 + \Gamma_0) - 1$$

Hệ số hiệu chỉnh là giống nhau đối với từng giá trị gamma, khi thừa nhận độ dốc của đồ thị gốc là đúng. Do đó, điều này đủ để tính hệ số hiệu chỉnh chỉ đối với 1 giá trị gamma. Trong phép tính này, áp dụng giá trị gamma tương ứng với nồng độ  $EC_{20,t}$  chưa hiệu chỉnh ( $\Gamma = 0,25$ ). Công thức tính hệ số hiệu chỉnh được rút gọn như sau:

$$c\Gamma_t = \frac{\Gamma_c}{\Gamma_0} = \frac{T_t(1 + \Gamma_0) - 1}{\Gamma_0} = \frac{T_t(1 + 0,25) - 1}{0,25} = (5T_t) - 4$$

trong đó

C là nồng độ của mẫu;

$I_t$  là giá trị phát quang sinh học đo được ở thời gian tiếp xúc đã định (t);

$c\Gamma_t$  là hệ số hiệu chỉnh cho các giá trị gamma ở thời gian tiếp xúc đã định (t);

$\Gamma_0$  là giá trị gamma gốc;

$\Gamma_c$  là giá trị gamma đã được hiệu chỉnh.

## A.5 Thí dụ

Số liệu chỉnh màu										
$C_k = 10,0\%$ phần thể tích	$B_5 = 81$			$l_5 = 78$			$k = 3,1$			
Tính toán hiệu chỉnh màu										
$C_k = \%$ phần thể tích	5 phút			15 phút			30 phút			
$c\Gamma_5 = 0,708$			$c\Gamma_{15} = 0,670$			$c\Gamma_{30} = 0,657$				
	$l_0$	$l_5$	$\Gamma_0$	$\Gamma_c$	$l_{15}$	$\Gamma_0$	$\Gamma_c$	$l_{30}$	$\Gamma_0$	$\Gamma_c$
mẫu trắng	100	90			80			70		
5,625	98	82	0,076	0,054	74	0,059	0,040	65	0,055	0,036
11,250	94	63	0,343	0,243	60	0,253	0,170	53	0,242	0,159
22,500	96	45	0,920	0,651	42	0,829	0,556	38	0,768	0,505
45,000	97	15	4,820	3,412	17	3,565	2,389	17	2,994	1,967
Công thức gốc	$\ln\Gamma = 1,96 \times \ln C - 5,96$			$\ln\Gamma = 1,95 \times \ln C - 6,16$			$n\Gamma = 1,90 \times \ln C - 6,12$			
Công thức đã chỉnh	$\ln\Gamma = 1,96 \times \ln C - 6,30$			$\ln\Gamma = 1,95 \times \ln C - 6,56$			$n\Gamma = 1,90 \times \ln C - 6,53$			
$EC_{30,t}$ gốc	10,3			11,6			12,1			
$EC_{30,t}$ đã hiệu chỉnh	12,3			14,3			15,1			

**Phụ lục B**

(tham khảo)

**Mức pha loãng D - Chuẩn bị các dãy pha loãng**

Khi thử nước thải bằng cách pha loãng dần (D) mẻ thử có nồng độ đậm đặc nhất mà ở nồng độ này không gây ức chế, hoặc chỉ có ảnh hưởng nhỏ ức chế mà không vượt quá khả năng biến đổi đặc trưng thử nghiệm, được gọi là “Độ pha loãng thấp nhất không ảnh hưởng” (LID). Độ pha loãng này được biểu thị bằng giá trị nghịch đảo của phần thể tích nước thải trong mẻ thử [thí dụ, nếu hàm lượng nước thải là 1 trong 4 (25% phần thể tích) thì mức pha loãng là  $D = 4$ ].

Trong phép thử vi khuẩn phát quang, thường trộn các thể tích huyền phù thử đúng bằng với thể tích của mẫu nước hoặc thể tích của mẫu đã pha loãng. Do đó, các mức pha loãng trong các dãy pha loãng thường  $D \geq 2$ . Nếu cần thử mẫu nước gần như không pha loãng, thì có thể thêm 800  $\mu\text{l}$  mẫu nước vào 200  $\mu\text{l}$  huyền phù thử. Độ pha loãng khi đó là 1:1,25. Giá trị D tương ứng có thể được coi là  $D = 1$ . Đối với giá trị D này, cần có thêm một mẻ kiểm tra được tiến hành bằng cách thêm 800  $\mu\text{l}$  dung dịch natri clorua vào 200  $\mu\text{l}$  huyền phù thử.

Để chuẩn bị các dãy pha loãng nên tiến hành theo bảng B.1.

**Bảng B.1 – Chuẩn bị dãy pha loãng – Thành phần của mẻ thử và mẻ kiểm tra**

Pha loãng	Mức pha loãng D	Mẫu nước $\mu\text{l}$	Nước pha loãng $\mu\text{l}$ (5.2)	Huyền phù gốc $\mu\text{l}$ (8.4)
1 trong 1,25	1	800	-	200
1 trong 2	2	500	-	500
1 trong 3	3	333,3	166,7	500
1 trong 4	4	250	250	500
1 trong 6	6	166,7	333,3	500
1 trong 8	8	125	375	500
1 trong 12	12	83,3	416,7	500
1 trong 16	16	62,5	437,5	500
1 trong 24	24	41,7	458,3	500
1 trong 32	32	31,3	468,7	500
Mẻ kiểm tra với $D = 1$		-	800	200
với $D \geq 2$		-	500	500

Giá trị D thấp nhất mà khi đó ảnh hưởng ức chế  $H_1 < 20\%$  được gọi là LID.



**Phụ lục C**

(tham khảo)

**Số liệu về độ chính xác**

Các dung dịch 3,5-diclorophenol, kẽm sunfat ngậm 7 nước, kali dicromat và xetyl-trimethyl-ammonium bromua chưa trung hoà, được chuẩn bị bằng nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương được dùng cho thử nghiệm liên phòng thí nghiệm. Những giá trị EC được xác định theo mô tả trong 9.2.

Các chữ viết tắt trong các bảng C.1 biểu thị:

L: Số lượng phòng thí nghiệm tham gia

N: Số lượng các bộ dữ liệu

NAP: Số lượng ngoại lệ, tính bằng phần trăm

$s_R$ : Độ lệch chuẩn của độ tái lập

$\bar{x}$ : Giá trị trung bình

$CV_R$ : Hệ số biến thiên của độ tái lập, tính bằng phần trăm

$EC_{20}$ ,  $EC_{50}$ : Nồng độ hữu hiệu gây ra ức chế phát quang 20% hoặc 50 % tương ứng.

Chú thích – Do một số phòng thí nghiệm cho kết quả ức chế lớn hơn 20% đối với nồng độ thử thấp nhất hoặc kết quả ức chế nhỏ hơn 50 % đối với nồng độ thử cao nhất nên các giá trị L đôi khi có sự khác nhau đối với  $EC_{20}$  và  $EC_{50}$ .

Bảng C.1 – Số liệu về độ chính xác đối với vi khuẩn khô - lỏng

	L = N	NAP %	$\bar{x}$ mg/l	$s_R$ mg/l	$CV_R$ %
1. 3,5-diclorophenol					
EC <sub>20</sub>	20	4,8	4,69	1,03	22,0
EC <sub>50</sub>	20	4,8	7,61	1,31	17,2
2. Kẽm sunfat ngậm 7 nước					
EC <sub>20</sub>	19	5,0	15,0	3,6	23,8
EC <sub>50</sub>	20	0,0	26,3	6,1	23,2
3. Kali dicromat <sup>1)</sup>					
EC <sub>20</sub>	18	0,0	1,22	0,5	46,2
EC <sub>50</sub>	19	0,5	3,50	1,15	32,8
4. xetyl-trimetyl-ammoni bromua					
EC <sub>20</sub>	14	0,0	0,745	0,416	55,9
EC <sub>50</sub>	16	5,9	1,199	0,346	28,9
1) Nồng độ Zn <sup>2+</sup> hoặc Cr <sup>6+</sup> tương ứng.					