

**TCVN 6831-1 : 2001**

**ISO 11348-1 : 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 1 : PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG VI KHUẨN TƯƠI**

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

*Part 1: Method using freshly prepared bacteria*

**HÀ NỘI - 2001**

## **Lời nói đầu**

TCVN 6831 -1 : 2001 hoàn toàn tương đương với ISO 11348 - 1 : 1998;

TCVN 6831 - 1 : 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 1 : Phương pháp sử dụng vi khuẩn tươi

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

*Part 1 : Method using freshly prepared 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 - 1 : 2001 (ISO 11348-1) qui định phương pháp sử dụng vi khuẩn tươi.

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.

Chuẩn cứ thử là sự giảm độ 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, 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 giàu dinh dưỡng dễ phân huỷ bởi vi sinh vật (thí dụ như: urê, pepton, cao men, thông thường  $\geq 100$  mg/l), có thể làm giảm sự tự ô nhiễm trong việc phát quang sinh học.

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 35 g/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 dùng để xác định độc tính phải là các dung dịch mới được chuẩn bị từ chất cấy.

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

**5.5 Dung dịch dùng cho vi khuẩn tươi**

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) piperazin-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 nhỏ và bảo quản ở nhiệt độ  $- 20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**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 ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )

**5.7 Môi trường nuôi cấy lỏng dùng để cấy sơ bộ và cấy chính**

- Natri clorua (NaCl) 30 g
- Natri dihydrophosphat ngậm nước ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 6,10 g
- Kali hydrophosphat ngậm 3 nước ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) 2,75 g

## TCVN 6831-1 : 2001

- Magie sunfat ngậm 7 nước ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0,204 g
- Hydrophosphat diammoni $[(NH_4)_2 \cdot HPO_4]$	0,500 g
- Glyxerol	3 ml
- Caso- pepton	5,00 g
- Cao men	0,50 g

Hoà tan các thành phần trên trong nước 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. Chuyển mỗi lần 50 ml vào các bình Erlenmeyer (dung tích bình khoảng 250 ml) và khử trùng 20 phút trong nồi hấp áp lực ở nhiệt độ  $121^\circ C$ .

Chú thích – Caso-pepton và cao men do nhiều hãng cung cấp nên có thể cho chất lượng không ổn định. Trong trường hợp có trở ngại (thí dụ : ức chế phát triển), thì cần mua sản phẩm của hãng khác.

### 5.8 Môi trường thạch để cấy vi khuẩn gốc

Điều chỉnh môi trường nuôi cấy (5.7) đến pH  $7,0 \pm 0,2$ .

Thêm 12 g thạch trên lít và hoà tan bằng cách làm ấm nhẹ; khử trùng và chuyển sang các đĩa Petri vô trùng.

### 5.9 Môi trường bảo vệ

- D(+)- Glucoza ngậm nước ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ )	66 g
- Natri clorua (NaCl)	4 g
- L-histidin	2 g
- Albumin huyết thanh bò, BSA	0,5 g

Hoà tan kỹ các thành phần trên trong nước ở  $37^\circ C$ , nếu cần dùng natri hydroxit (5.3) hoặc axit clohydric (5.4) để chỉnh pH đến  $7,0 \pm 0,2$  ở nhiệt độ phòng. Thêm nước đến 100 ml.

Chú thích – Sử dụng môi trường bảo vệ để không gây hại đến các tế bào vi khuẩn trong quá trình làm lạnh. BSA do nhiều hãng cung cấp có thể có chất lượng không ổn định. Trong trường hợp có trở ngại thì cần mua sản phẩm của hãng khác.

Chuẩn bị môi trường bảo vệ ngay trước khi sử dụng.

## 6 Thiết bị, dụng cụ

**6.1 Tủ lạnh**, có thể duy trì huyền phù gốc ở nhiệt độ  $3^\circ C \pm 3^\circ C$ .

**6.2 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  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .

**6.3 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.

**6.4 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.

**6.5 pH mét.**

**6.6 Đồng hồ bấm giờ.**

**6.7 Pipet pitông**, dùng cho các ống hút bằng nhựa, dung tích danh định 10  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$  và 1000  $\mu\text{l}$ .

**6.8 Pipet pitông**, có dung tích thay đổi, từ 10 ml đến 200 ml và 200  $\mu\text{l}$  đến 5000  $\mu\text{l}$ .

**6.9 Máy li tâm lạnh.**

**6.10 Máy khuấy từ và que khuấy từ.**

**6.11 Tủ ẩm lắc rung**, để ủ các bình Erlenmeyer.

**6.12 Nồi hấp áp lực.**

**6.13 Tủ ẩm.**

**6.14 Máy đo phổ hoặc máy đo quang kính lọc và cuvet**, có chiều dài 1 cm.

**6.15 Vòng cây ( hoặc kim cây).**

**6.16 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 hộp chứa và gắn kín. Thử nghiệm mẫu càng sớm càng tốt sau khi lấy mẫu. Nếu cần, bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ  $2^{\circ}\text{C}$  đến  $5^{\circ}\text{C}$  trong bình thủy tinh, nơi tối không quá 48 h. Nếu phải bảo quản mẫu đến 2 tuần thì để mẫu ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$ . Không được sử dụng hoá chất để bảo quản mẫu. Cần chỉnh pH và thêm muối trước khi thử.

### **7.2 Chuẩn bị mẫu**

## TCVN 6831-1 : 2001

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. 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 cho 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 cần) 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 Cấy vi khuẩn phát quang

### 8.1 Cấy vi khuẩn gốc

Chuyển vi khuẩn phát quang của loài *Vibrio fischeri* NRRL B -11177, dưới các điều kiện vô trùng, sang các đĩa Petri chứa thạch dùng cho vi khuẩn gốc (5.8).

Ủ trong tủ ấm từ 2 ngày đến 5 ngày ở nhiệt độ  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Đánh dấu các khuẩn lạc riêng lẻ phát quang, bằng cách quan sát bằng mắt trong bóng tối, và sau đó bảo quản các đĩa trong tủ lạnh.

Chuyển các khuẩn lạc đã đánh dấu trong điều kiện vô trùng, sang các đĩa mới sau thời gian bảo quản tối đa 2 tuần.

Chú thích 1 – Các lọ vi khuẩn đã được bảo quản có bán sẵn không được phân phối dưới các điều kiện vô trùng. Để nuôi cấy vi khuẩn thuần khiết nên dùng một vài chủng khuẩn lạc đơn. Để tránh biến đổi tính di truyền, nên mở lọ vi khuẩn mới được bảo quản 6 tháng một lần.

Chú thích 2 – Độ phát quang của các khuẩn lạc phát quang có thể bị giảm trong quá trình bảo quản.

### 8.2 Chuẩn bị chất cấy sơ bộ

Dưới các điều kiện vô trùng, cho 50 ml môi trường nuôi cấy sơ bộ (5.7) vào các bình Erlenmeyer (dung tích khoảng 250 ml) đã có một khuẩn lạc đơn lẻ phát quang của chất cấy gốc đã ủ từ 2 đến 5 ngày.

Lắc trong  $21\text{ h} \pm 1\text{ h}$  ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  với 180 vòng /phút.

Đo độ đục của dịch pha loãng 1:10 trong dung dịch natri clorua (5.2), thí dụ, ở bước sóng 578 nm, tính bằng đơn vị đo độ đục (FNU), theo TCVN 6184 : 1996 (ISO 7027).



### 8.3 Chuẩn bị chất cấy chính

Bơm 50 ml môi trường nuôi chính (5.7) vào các bình Erlenmeyer 250 ml đã có sẵn một thể tích chất cấy sơ bộ sao cho có được độ đục ước đoán ban đầu là 10 đơn vị FNU.

Lắc trong  $20 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$  ở  $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  với 180 vòng/phút.

Đo độ đục của dịch pha loãng 1:10 trong dung dịch natri clorua (5.2) bằng đo quang ở bước sóng 578 nm, tính bằng FNU.

Chú thích – Khi tuân thủ các điều kiện nêu trên, chất cấy chính không pha loãng thường cho độ đục từ 700 FNU đến 1800 FNU.

### 8.4 Chuẩn bị huyền phù gốc

Làm lạnh sơ bộ dung dịch natri clorua (5.2) và môi trường bảo vệ (5.9) trong nước đá.

Ly tâm huyền phù vi khuẩn thu được từ dịch cấy chính (8.3) ở nhiệt độ  $4 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$  bằng máy ly tâm đã được làm lạnh trước, từ 15 phút đến 20 phút ở  $6000 \text{ g} \pm 2000 \text{ g}$ .

Gạn bỏ phần nổi ở trên và tái tạo các phần bị vón cục lại thành huyền phù trong 5 ml đến 10 ml dung dịch natri clorua lạnh (5.2) (cho từng 50 ml chất cấy chính).

Ly tâm lại trong những điều kiện tương tự.

Gạn bỏ phần nổi ở trên và tái tạo các phần bị vón cục lại thành huyền phù trong 5 ml đến 10 ml dung dịch natri clorua lạnh (5.2) (cho từng 50ml chất cấy chính).

Chuyển huyền phù vi khuẩn vào cốc thí nghiệm (dung tích khoảng 100 ml) đã làm lạnh trước và đặt cốc lên đá lạnh.

Thêm từ từ khoảng 4 ml (cho mỗi 50 ml chất cấy chính) môi trường bảo vệ (5.9) dưới điều kiện làm lạnh liên tục bằng nước đá và khuấy đều.

Tiến hành xác định độ đục của dịch pha loãng 1 : 100 với dung dịch natri clorua (5.2) bằng phương pháp đo quang.

Thêm thật nhanh môi trường bảo vệ đã làm lạnh trước (5.9) cho đến khi đạt độ đục ước tính  $2500 \text{ FNU} \pm 500 \text{ FNU}$  (xem chú thích 2 trong 8.1).

Chú thích – Để chuẩn bị huyền phù gốc thích hợp, cứ mỗi mililit huyền phù trong natri clorua nên cho thêm ít nhất 10ml môi trường bảo vệ. Khi cho thêm môi trường bảo vệ thì độ phát quang sinh học sẽ bị giảm rõ rệt, nhưng nó sẽ xuất hiện lại sau khi thêm dung dịch pha loãng.

Tiếp tục khuấy trong 15 phút để thu được hỗn hợp đồng nhất.

## TCVN 6831-1 : 2001

Cho hỗn hợp này vào các ống nghiệm thích hợp (6.4), mỗi ống 100  $\mu$ l.

Nếu huyền phù cần sử dụng ngay, thì bảo quản tối đa 4 h ở nhiệt độ  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  trước khi cho thêm dung dịch (5.5).

Bảo quản huyền phù gốc trong tủ đá ở  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; nó có thể sử dụng được trong vòng ít nhất 1 tháng. Huyền phù gốc có thể bảo quản được lâu hơn ở  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Các huyền phù gốc được làm tan bằng chỉ có thể dùng cho các thử nghiệm sơ bộ.

Có thể sử dụng huyền phù gốc vào mục đích thử nghiệm nếu thoả mãn các chuẩn cứ của tính đúng đắn (điều 12).

### 9 Cách tiến hành

Chuẩn bị mẫu theo 7.2.

Chuẩn bị các dãy pha loãng cần thiết (xem phụ lục B).

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

Duy trì các ống nghiệm đựng mẫu kiểm tra, các mẫu pha loãng và chất pha loãng (5.2) ở nhiệt độ  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nếu huyền phù gốc (8.4) được bảo quản trong tủ đá, thì làm tan bằng trong nồi cách thuỷ ở nhiệt độ  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

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

Dùng pipet cho vào mỗi ống nghiệm 500  $\mu$ l huyền phù cần thử, duy trì ở nhiệt độ  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong tủ ấm, với các khoảng thời gian bằng nhau (20 giây) như đối với các phép đo cường độ sau này.

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

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

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

Chú thích - Phải đo tất cả các mẫu thử, bởi vì độ 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 cần thử, cần cho thêm mẫu (7.2), mẫu pha loãng (phụ lục B), hoặc dung dịch natri clorua (5.2) để dung dịch này có tổng thể tích 1 ml. Dùng tay trộn, bật đồng hồ bấm giờ và đặt cuvet trở lại vào hộp ổn nhiệt ở  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Lặp lại như vậy với tất cả các cuvet, chú ý để thời gian giữa các lần thử liên tiếp phải bằng nhau.

Đo và ghi 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.

## 10 Đánh giá

### 10.1 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 giá trị ban đầu  $I_0$  của tất cả các mẫu thử trước khi chúng được dùng làm giá trị đối chứng cho việc xác định độ giảm phát quang do nước.

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

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 mẫu thử vào.

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 giá trị trung bình tương ứng của các lần thử kép và theo 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 đánh giá 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 độ 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.

## 10.2 Xác định các giá trị EC

Tính ảnh hưởng của nồng độ đối với từng khoảng thời gian tiếp xúc, sử dụng phép 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 dốc của đường vẽ được ;

lg a là giá trị của phần bị chắn 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.

## 11 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>			
	$I_0$	$I_{k30}$ <sup>2)</sup>						
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 Độ lệch so với giá trị trung bình, tính bằng % <sup>4)</sup>	
		$I_0$	$I_{T30}$					
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			

1) Thể tích của huyền phù thử : tương ứng 0,2 ml và 0,5 ml .

2) Thể tích cuối cùng trong các cuvet: 1 ml.

3) Độ lệch của giá trị  $f_{k30}$ , tính bằng phần trăm của các lần xác định song song so với giá trị trung bình của chúng là số đo độ phân tán của các mẫu kiểm tra.

4) Độ lệch của giá trị  $H_{30}$ , tính bằng phần trăm của các lần xác định song song so với giá trị trung bình của chúng là số đo độ phân tán của các mẫu thử.

Giá trị LID trong thí dụ này = 4.

Giá trị  $EC_{20}$  trong thí dụ này = 31,9 %, Giá trị  $EC_{50}$  = 58,7 %.

## 12 Chuẩn cứ của tính đúng đắn

Phép thử được coi là đúng nếu

- giá trị  $f_{kt}$  khi ủ 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 xác định riêng từng giá trị  $EC_{20}$  /  $EC_{50}$ ;
- 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

## 13 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.

## 14 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) hoặc 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 11 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 quan sát 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, lắp vừa với dụng cụ 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  $15^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$  trong tủ ẩm kiểm soát được nhiệt độ.

Chuẩn bị một dung dịch pha loãng 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.

Chú thích - Đối với vi khuẩn Microtox, nên dùng 1,0 ml nước pha loãng với 50  $\mu$ l huyền phù vi khuẩn gốc. Đối với vi khuẩn Umistox, nên dùng 1,0 ml huyền phù vi khuẩn gốc.

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 bật 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 trước đến  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Đo mức ánh sáng ( $I_5$ ) 5 phút sau lần đo đầu.

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

Đo mức ánh sáng ( $B_{10}$ ) 10 phút sau lần đo đầu.

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, khoang ngoài của cuvet thứ hai chứa đầy mẫu đã pha loãng. Sau 15 phút, có thể đo mức ánh sáng  $B_0$  và  $I_0$ . Những giá trị này khi đó có thể thay cho những giá trị  $B_5$  và  $I_5$  khi tính toán ở A.4.

#### A.4 Tính toán kết quả

Thừa nhận rằng cường độ màu của mẫu 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 ở nồng độ được thử (màu);

$k$  là hằng số hệ thống thu được theo thực nghiệm;

$\ln \frac{B_5}{I_5}$  là độ hấp thụ của 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

## TCVN 6831-1 : 2001

$$\Gamma c = c\Gamma_t \cdot \Gamma_0$$

trong đó

$c\Gamma_t$  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 - Với thời gian tiếp xúc đã định, có thể tính được độ hấp thụ ( $A_t$ ) và độ truyền qua ( $T_t$ ) đối với mỗi nồng độ thử, 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 mỗi 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 xác định 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 về 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 hiệu 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), dãy thử có nồng độ đậm đặc nhất mà ở nồng độ này không có ức chế, hoặc chỉ có ít ảnh hưởng ức chế mà không vượt quá độ biến đổi đặc trưng thử nghiệm, được gọi là “Độ pha loãng không ảnh hưởng thấp nhất” (LID). Độ pha loãng này được biểu thị bằng giá trị nghịch đảo của phần thể tích nước thải trong dãy thử [thí dụ, nếu lượng nước thải là 1 / 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 theo thông lệ là  $D \geq 2$ . 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, có thể cần đến các mẻ kiểm tra ngoại được tiến hành bằng cách trộn 800  $\mu\text{l}$  dung dịch natri clorua với 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 (5.2) $\mu\text{l}$	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 như đã mô tả trong 10.2 , và các kết quả được đưa ra trong các bảng C.1 và C.2.

Các chữ viết tắt trong các bảng C.1 và C.2 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 ích 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 tươi

	L = N	NAP %	$\bar{x}$ mg/l	$s_R$ mg/l	$CV_R$ %
1. 3,5-diclorophenol					
EC <sub>20</sub>	15	0,0	3,78	1,65	43,5
EC <sub>50</sub>	14	6,7	6,06	1,69	27,9
2. Kẽm sulfat heptahydrat					
EC <sub>20</sub>	13	0,0	20,4	7,9	38,9
EC <sub>50</sub>	13	0,0	32,4	10,4	32,3
3. Kali dicromat <sup>1)</sup>					
EC <sub>20</sub>	8	11,1	1,25	1,04	83,1
EC <sub>50</sub>	8	0,0	4,15	3,14	75,5
4. Cetyl-trimethyl-ammonium bromua					
EC <sub>20</sub>	10	9,1	0,171	0,086	50,5
EC <sub>50</sub>	11	8,3	0,393	0,202	51,6
1) Nồng độ Zn <sup>2+</sup> hoặc Cr <sup>6+</sup> tương ứng.					

Bảng C.2 – Số liệu về độ chính xác đối với vi khuẩn tươi bảo quản trong tủ lạnh

	L = N	NAP %	$\bar{x}$ mg/l	$s_R$ mg/l	$CV_R$ %
1. 3,5-diclorophenol					
EC <sub>20</sub>	15	0,0	3,31	0,75	22,6
EC <sub>50</sub>	15	0,0	5,80	1,28	22,1
2. Kẽm sulfat heptahydrat					
EC <sub>20</sub>	13	13,3	14,6	2,4	16,6
EC <sub>50</sub>	13	13,3	26,0	3,3	12,8
3. Kali dicromat <sup>1)</sup>					
EC <sub>20</sub>	11	15,3	0,717	0,283	39,5
EC <sub>50</sub>	10	28,6	2,726	0,947	34,8
4. Cetyl-trimethyl-ammonium bromua					
EC <sub>20</sub>					
EC <sub>50</sub>	11	8,3	0,229	0,105	45,6
	13	7,1	0,476	0,152	31,8
1) Nồng độ Zn <sup>2+</sup> hoặc Cr <sup>6+</sup> tương ứng.					