

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 6831-1:2010
ISO 11348-1:2007**

Xuất bản lần 2

**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
MỚI NUÔI CẤY**

*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 – 2010

Lời nói đầu

TCVN 6831-1:2010 thay thế TCVN 6831-1:2001 (ISO 11348-1:1998).

TCVN 6831-1:2010 hoàn toàn tương đương ISO 11348-1:2007.

TCVN 6831-1:2010 do Ban kỹ thuật Tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 146 *Chất lượng nước* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ tiêu chuẩn TCVN 6831 *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)* gồm các tiêu chuẩn sau:

- TCVN 6831-1:2010 (ISO 11348-1:2007), Phần 1: Phương pháp sử dụng vi khuẩn mới nuôi cấy;
- TCVN 6831-2:2010 (ISO 11348-2:2007), Phần 2: Phương pháp sử dụng vi khuẩn khô lỏng;
- TCVN 6831-3:2010 (ISO 11348-3:2007), Phần 3: Phương pháp sử dụng vi khuẩn đông khô.

Lời giới thiệu

Phép đo qui định trong bộ TCVN 6831 (ISO 11348) có thể tiến hành sử dụng vi khuẩn mới nuôi cấy, cũng như vi khuẩn đông khô hoặc khô lỏng.

Công việc tiêu chuẩn hóa do DIN Normenausschuss Wasserwesen và ISO/TC 147/SC 5/WG 1 tiến hành đã cho thấy, trong trường hợp đặc biệt, các kỹ thuật khác nhau này có thể cho kết quả khác nhau, đặc biệt khi có mặt kim loại nặng.

Độ nhạy thay đổi là do sự khác nhau trong thành phần môi trường sử dụng để chuẩn bị vi khuẩn đông khô hoặc khô lỏng. Các môi trường bảo vệ này ảnh hưởng đến tính có sẵn sinh học của các chất độc và/hoặc sự phát quang của vi khuẩn phát quang. Điều này có nghĩa là nguồn gốc và phương pháp chuẩn bị vi khuẩn cần được xem xét khi biểu thị kết quả. Đôi khi, việc này có thể khó khăn, vì vi khuẩn đông khô và khô lỏng có thể do các nhà cung cấp khác nhau. Do vậy, việc này có nghĩa là thành phần chi tiết không được biết và do vậy người sử dụng không thể diễn giải được.

Vì lý do này, ngoài phép đo độc tính dùng vi khuẩn khô lỏng TCVN 6831-2 (ISO 11348-2) và vi khuẩn đông khô TCVN 6831-3 (ISO 11348-3), qui trình dùng vi khuẩn mới nuôi cấy được mô tả trong tiêu chuẩn này, tính năng thực hiện của qui trình có thể do người sử dụng diễn giải trong từng chi tiết.

Phòng thí nghiệm chịu trách nhiệm về kết quả có cơ hội để lựa chọn kỹ thuật phù hợp nhất dựa trên các lời khuyên của chuyên gia và thông tin về mẫu nước thử nghiệm.

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 mới nuôi cấy

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

CẢNH BÁO – Người sử dụng tiêu chuẩn này cần phải thành thạo với các thực hành trong phòng thí nghiệm thông thường. Tiêu chuẩn này không đề cập tới mọi vấn đề an toàn liên quan đến người sử dụng. Trách nhiệm của người sử dụng là phải xác lập độ an toàn, bảo đảm sức khỏe phù hợp với các quy định của quốc gia.

QUAN TRỌNG – Điều chủ yếu là phép thử theo tiêu chuẩn này cần được tiến hành bởi những nhân viên được đào tạo phù hợp.

1 Phạm vi áp dụng

TCVN 6831:2010 (ISO 11348:2007) qui định ba phương pháp xác định sự ức chế phát quang của vi khuẩn biển *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177). TCVN 6831-1:2010 (ISO 11348-1) qui định phương pháp sử dụng vi khuẩn mới nuôi cấy.

Tiêu chuẩn này áp dụng cho:

- Nước thải;
- Dịch chiết và dịch ngâm chiết bằng nước;
- Nước sạch (nước mặt và nước ngầm);
- Nước mặn và nước lợ;
- Dịch rửa giải của trầm tích (nước ngọt, nước lợ và nước biển);
- Nước giếng khoan;
- Chất ô nhiễm đơn, được pha loãng trong nước.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 7325 (ISO 5814), Chất lượng nước – Xác định oxy hòa tan – Phương pháp đầu đo điện hoá.

TCVN 6184 (ISO 7027), Chất lượng nước – Xác định độ đục.

ISO 5667-16, Water quality – Sampling – Part 16: Guidance on biotesting of samples (*Chất lượng nước – Hướng dẫn thử sinh học các mẫu*).

3 Nguyên tắc

Sự ức chế phát quang do cây 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 đã pha loãng với huyền phù vi khuẩn phát quang đựng trong ống thử.

Chuẩn cứ của phép thử là sự giảm độ phát quang mẫu thử trong suốt thời gian tiếp xúc, cường độ phát quang trong mẫu sẽ được đo sau thời gian phản ứng là 15 min và 30 min hoặc có thể đo thêm sau 5 min, tùy chọn, có tính đến hệ số hiệu chỉnh (f_{kt}). 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 giá trị EC_{50} thông qua các dãy pha loãng (EC là nồng độ ảnh hưởng).

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 mất 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 bằng cách xử lý độ đục của mẫu (7.2) hoặc, ví dụ, bằng cách sử dụng cuvet hiệu chỉnh hấp thụ hai ngăn (xem Phụ lục A).

Vì sự phát quang sinh học^[6] cần đến oxy, nên các mẫu có nhu cầu oxy cao (và/hoặc có nồng độ oxy thấp) có thể sẽ gây ra sự thiếu hụt oxy và mẫu sẽ bị ức chế.

Các chất dinh dưỡng dễ phân hủy sinh học trong mẫu có thể làm giảm sự tự ô nhiễm trong việc phát quang sinh học^[1].

Mẫu có pH nằm ngoài khoảng từ 6,0 đến 8,5 sẽ ảnh hưởng đến sự phát quang của vi khuẩn^{[6],[7]}. Cần phải điều chỉnh pH của mẫu nếu ảnh hưởng độc của pH là không mong muốn.

Vì vi khuẩn thử nghiệm *Vibrio fishcheri* là vi khuẩn biển, nên việc thử nghiệm các mẫu nước mặn theo qui trình chuẩn thường dẫn đến các hiệu ứng kích thích phát quang sinh học mà có thể che hiệu ứng ức chế (xem Phụ lục D).

Nồng độ 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 các hiệu ứng siêu thẩm thấu. Để tránh ảnh hưởng này, nồng độ muối cuối cùng có trong mẫu thử sẽ không được vượt quá độ thẩm thấu của dung dịch NaCl là 35 g/l.

5 Thuốc thử và các vật liệu

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

5.1 Vi khuẩn thử

Sử dụng chủng vi khuẩn phát quang thuộc loại *Vibrio fischeri* NRRL B - 11177. Chủng vi khuẩn có thể được mua ngoài thị trường ở dạng thuốc thử đông-khô hoặc khô-lông hoặc từ bộ chủng nuôi cấy, ví dụ Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 10, D-38124 Braunschweig, Germany, hoặc NRRL, ARS culture collection NCAUR, 1815 N, University Street, Peoria, Illinois 61604, USA. Các huyền phù vi khuẩn dùng để xác định độc tính cần phải mới được nuôi 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, ví dụ $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.

5.4 Axit clohydric, ví dụ $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$.

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 mới nuôi cấy

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

Hoà tan các thành phần trên trong nước, khuấy đều trong 30 min và điều 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 bảo quản từng phần và ở nhiệt độ $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ tới $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.6 Chất chuẩn

Chuẩn bị riêng rẽ các dung dịch chuẩn gốc, pha loãng bằng dung dịch natri clorua (5.2) mà không cần điều chỉnh pH:

TCVN 6831-1:2010

219,8 mg/l	Kẽm sunfat ngậm bảy nước ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)
9 mg/l	3,5-dichlorophenol ($C_6H_4OCl_2$) (Độ tinh khiết $\geq 99\%$)
22,6 mg/l	Kali dicromat ($K_2Cr_2O_7$)

Các nồng độ này xấp xỉ gấp hai lần giá trị các EC_{50} mong đợi đối với các chất chuẩn tương ứng trong tiêu chuẩn này. Thể tích yêu cầu phụ thuộc vào yêu cầu thử nghiệm.

CHÚ THÍCH Có thể sử dụng các dung dịch có sẵn ngoài thị trường có nồng độ $ZnSO_4$ và $K_2Cr_2O_7$ (titrisol) xác định để chuẩn bị dung dịch gốc của các chất chuẩn.

5.7 Dịch lỏng dùng để cấy sơ bộ và cấy chính

30 g	Natri clorua ($NaCl$)
6,10 g	Natri dihydrophosphat ngậm nước ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)
2,75 g	Kali hydrophosphat ngậm ba nước ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)
0,204 g	Magie sunfat ngậm bảy nước ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
0,500 g	Hydrophosphat diammoni [$(NH_4)_2 \cdot HPO_4$]
3 ml	Glyxerol
5,00 g	Caso- pepton
0,50 g	Dịch chiết nấm men

Hòa tan các thành phần trên trong nước và điều 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 bình Erlenmeyer (ví dụ dung tích 250 ml) và khử trùng trong nồi hấp ở nhiệt độ $121^\circ C$ trong 20 min.

Caso-pepton và cao men do nhiều hãng cung cấp nên có thể có chất lượng khác nhau. Trong trường hợp có trở ngại (ví 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 dịch lỏng cấy (5.7) đến pH $7,0 \pm 0,2$.

Thêm và hòa tan 12 g thạch cho mỗi lít bằng cách làm ấm nhẹ; khử trùng và chuyển sang các đĩa Petri vô khuẩn.

5.9 Môi trường bảo vệ

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

Hòa tan hoàn toàn các thành phần trên trong nước ở 37 °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.

Sử dụng môi trường bảo vệ để không gây ảnh hưởng đến các tế bào vi khuẩn trong quá trình làm lạnh. BSA do nhiều hãng cung cấp có thể có chất lượng khác nhau. 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 Hộp kiểm soát nhiệt độ, để duy trì mẫu thử ở nhiệt độ $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Trong mỗi lần thử nghiệm nhiệt độ chỉ được dao động tối đa $\pm 0,3\text{ °C}$.

6.2 Bể điều nhiệt hoặc hộp kiểm soát nhiệt độ, để duy trì dung dịch có thể tích ít nhất 12 ml được chuẩn bị trong 5.5 (ví dụ bình thuốc thử) ở nhiệt độ $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.3 Máy đo độ phát quang, ngấn đo mẫu được duy trì ở nhiệt độ $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, có trang bị các cuvet phù hợp.

6.4 Cuvet thử, làm bằng chất liệu trơ về hoá học, thích hợp để sử dụng với ngấn đo độ phát quang đã chọn và có dung tích tạo thuận lợi để đọc hết bề mặt lớn nhất có thể và phù hợp với hộp kiểm soát nhiệt độ (6.1).

6.5 pH-mét.

6.6 Đồng hồ tính giờ.

6.7 Pipet pittông hoặc bơm tiêm nhựa, 10 μl , 500 μl và 1000 μl .

6.8 Pipet pittông có dung tích có thể thay đổi, từ 10 ml đến 200 ml và 200 μl đến 5000 μl .

6.9 Máy li tâm lạnh.

6.10 Máy khuấy từ và que khuấy từ.

6.11 Tủ ấm lắc rung, để ủ các bình Erlenmeyer.

6.12 Nồi hấp.

6.13 Tủ ủ.

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

6.15 Vòng cấy (hoặc kim cấy).

6.16 Máy đo độ dẫn.

6.17 Tủ lạnh sâu, để bảo quản dung dịch và huyền phù.

6.18 Đầu đo oxy, Theo TCVN 7325 (ISO 5814).

7 Lấy mẫu và xử lý sơ bộ mẫu

7.1 Lấy mẫu

Mẫu phải được đựng trong các vật chứa sạch, trơ về hoá học như qui định tại ISO 5667-16. Nạp đầy mẫu vào vật chứa và gắn kín. Thử nghiệm mẫu càng sớm càng tốt ngay sau khi lấy mẫu. Nếu cần, bảo quản mẫu ở nhiệt độ từ 2 °C đến 5 °C trong vật chứa ở nơi tối không quá 48 h. Nếu phải bảo quản mẫu đến hai tháng thì để mẫu ở nhiệt độ ≤ -18 °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 nồng độ oxy trong tất cả các mẫu. Nồng độ oxy cần phải > 3 mg/l đối với thử nghiệm này. Nếu nồng độ oxy của mẫu chưa pha loãng nhỏ hơn 3 mg/l, thì phải sử dụng phương pháp làm đủ oxy cho mẫu, ví dụ sục khí hoặc khuấy.

Đo pH của tất cả các mẫu. Nếu pH trong khoảng từ 6,0 đến 8,5 thì không cần phải điều chỉnh. Tuy nhiên, việc chỉnh giá trị 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 hai mẫu: mẫu đã điều chỉnh-pH và mẫu chưa điều chỉnh-pH.

Nếu cần, điều chỉnh-pH của mẫu bằng cách thêm axit clohydric (5.4) hoặc dung dịch natri hydroxit (5.3). Tùy thuộc vào mục đích của phép thử có thể điều chỉnh pH đến $7,0 \pm 0,2$ hoặc giới hạn trên ($8,5 \pm 0,2$) và giới hạn dưới ($6,0 \pm 0,2$). Lựa chọn nồng độ của axit clohydric hoặc dung dịch natri hydroxit sao cho thể tích thêm vào không lớn hơn 5 % tổng thể tích.

Cho thêm 20 g natri clorua cho mỗi lít vào mẫu nước hoặc vào mẫu nước đã trung hoà.

Đối với mẫu có nồng độ muối cao thì đo độ muối và nếu cần thêm lượng muối để điều chỉnh độ thẩm thấu tới NaCl 20 g/l.

Nếu mẫu chứa từ 20 g/l đến 50 g/l NaCl tương đương, không cần thêm muối. Nồng độ muối tạo nên trong mẫu thử không được vượt quá độ thẩm thấu 35 g/l dung dịch natri clorua.

Phụ lục D cung cấp thêm các thông tin đối với những mẫu nước mặn.

Các mẫu quá đục cần được để lắng trong 1 h hoặc cho ly tâm, ví dụ trong 10 min ở 5000 g hoặc lọc. Sử dụng chất nổi hoặc cái lọc cho phép thử.

8 Cấy vi khuẩn phát quang

8.1 Cấy vi khuẩn gốc

Chuyển vi khuẩn phát quang chủng *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 (5.1), trong các điều kiện vô khuẩn sang các đĩa Petri chứa môi trường thạch dùng nuôi cấy vi khuẩn gốc (5.8).

Ủ trong tủ ẩm từ 2 ngày đến 3 ngày ở nhiệt độ 20 °C ± 1 °C.

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

Chuyển các khuẩn lạc đã đánh dấu trong điều kiện vô khuẩn sang các đĩa mới sau thời gian bảo quản mỗi tuần và tối đa là hai tuần.

Các lọ vi khuẩn được bảo quản có bán sẵn thường không được phân phối dưới các điều kiện vô khuẩn. Để nuôi cấy vi khuẩn tinh khiết nên dùng một vài chủng khuẩn lạc đơn. Để tránh biến đổi tính di truyền, có thể mở và sử dụng lọ vi khuẩn đã được bảo quản 6 tháng một lần.

CHÚ THÍCH Độ phát quang của các khuẩn lạc phát quang có thể bị giảm trong quá trình bảo quản.

8.2 Chuẩn bị nuôi cấy sơ bộ

Dưới các điều kiện vô trùng, cho 50 ml dịch lỏng nuôi cấy sơ bộ (5.7) vào các bình tam giác (dung tích khoảng 250 ml) đã có một khuẩn lạc đơn lẻ phát quang của chất cấy gốc đã ủ từ 2 ngày đến 3 ngày.

Lắc trong $21 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ ở $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ với ít nhất 180 r.min^{-1} .

Xác định độ đục của dịch pha loãng 1 phần 10 chất cấy trong dung dịch natri clorua (5.2), ví dụ, ở 578 nm, tính bằng đơn vị hấp thụ formazin (FAU), như qui định tại TCVN 6184 (ISO 7027).

8.3 Chuẩn bị nuôi cấy chính

Cho 50 ml dịch lỏng nuôi cấy chính (5.7) với một thể tích thích hợp chất cấy sơ bộ (8.2) vào các bình tam giác 250 ml sao cho có được độ đục ước tính ban đầu là 10 đơn vị FAU.

Lắc trong $20 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ ở $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ với ít nhất là 180 r.min^{-1} .

Xác định độ đục, tính bằng FAU, của dịch pha loãng 1 phần 10 trong dung dịch natri clorua (5.2) bằng đo quang ở 578 nm.

CHÚ THÍCH Khi tuân thủ các điều kiện nêu trên, chất cấy chính không pha loãng thường cho độ đục từ 700 FAU đến 1 800 FAU.

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 đá.

Ly tâm huyền phù vi khuẩn thu được từ dung 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 min đến 20 min ở $6000 \text{ g} \pm 2000 \text{ g}$.

Đối với mỗi 50 ml chất cấy chính, gạt bỏ phần nổi ở trên và hoà phần cặn trong 5 ml đến 10 ml dung dịch natri clorua đã làm lạnh trước (5.2).

Ly tâm lại như điều kiện ở trên.

Đối với 50 ml chất cấy chính, gạt bỏ phần nổi ở trên và hòa phần cặn trong 0,5 ml dung dịch natri clorua đã làm lạnh trước (5.2).

TCVN 6831-1:2010

Chuyển huyền phù vi khuẩn vào cốc thí nghiệm (ví dụ. dung tích 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 phần 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 $2\ 500\ \text{FAU} \pm 500\ \text{FAU}$ hoặc tương đương (xem Chú thích tại 8.1).

Để chuẩn bị huyền phù gốc thích hợp, cứ mỗi mililit huyền phù trong dung dịch natri clorua nên cho thêm ít nhất 10 ml 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 min để thu được hỗn hợp đồng nhất.

Cho hỗn hợp này vào các cuvet thử thích hợp (6.4), mỗi cuvet 100 μl .

Để thuận tiện nên dùng loại cuvet được sử dụng trong quy trình tiếp sau (Điều 9).

Để sử dụng sau này, bảo quản huyền phù gốc trong tủ đá ở $\leq -20\ ^\circ\text{C}$.

CHÚ THÍCH Huyền phù gốc có thể được sử dụng trong vài tháng. Huyền phù có thể được bảo quản lâu hơn ở nhiệt độ $-70\ ^\circ\text{C}$.

Các huyền phù gốc được rã đông chỉ có thể dùng cho các thử nghiệm sơ bộ.

Có thể sử dụng huyền phù gốc vào mục đích thử nghiệm miễn là thoả mãn các chuẩn cứ về tính đúng đắn (xem Điều 12).

9 Cách tiến hành

Chuẩn bị mẫu chuẩn theo 5.6. Thử nghiệm mỗi mẻ vi khuẩn với cả ba mẫu chuẩn. Thử ít nhất một trong ba mẫu chuẩn song song với mỗi cuvet dung dịch huyền phù gốc cho mỗi phép thử.

Chuẩn bị mẫu theo 7.2.

Lấy ống có chứa huyền phù gốc (8.4) ra ngoài tủ lạnh sâu và đặt vào bể điều nhiệt ở $20\ ^\circ\text{C} \pm 2\ ^\circ\text{C}$ để làm tan huyền phù.

Chuẩn bị huyền phù thử theo hai bước:

- Thêm 0,5 ml dung dịch (5.5) cho từng 100 μl huyền phù gốc vào cuvet thử, duy trì ở nhiệt độ $15\ ^\circ\text{C} \pm 1\ ^\circ\text{C}$ và làm đồng nhất bằng cách lắc nhẹ cuvet thử.
- Chờ khoảng 15 min.

Dùng pipet hút dung dịch huyền phù này rồi cho vào bình định mức, ví dụ dung tích 20 ml, và thêm 11,5 ml dung dịch (5.5), duy trì ở nhiệt độ $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, và làm đồng nhất bằng cách lắc nhẹ bình thuốc thử.

Chờ khoảng 15 min.

Chuẩn bị dãy dung dịch pha loãng mẫu, mẫu chuẩn (5.6) và mẫu kiểm soát (5.2) vào một bộ cuvet thử thử nhất (6.4).

Qui trình thông thường để chuẩn bị dãy pha loãng được mô tả trong Phụ lục B. Tùy thuộc vào mục đích của thử nghiệm và các yêu cầu thống kê liên quan đến kết quả phép thử, thì các thiết kế dãy pha loãng có nồng độ dãy hình học hoặc logarit có thể cũng phù hợp. Vì hỗn hợp các thể tích bằng nhau của mẫu/mẫu đã pha loãng và huyền phù thử nghiệm, nên nồng độ mẫu cao nhất trong phép thử chiếm 50% mẫu thử như là một qui luật. Đối với phép thử mẫu nước gần như không pha loãng (80% mẫu), thì cần thêm mẻ kiểm tra (xem B.2 và Bảng 1).

Duy trì các cuvet thử có chứa dung dịch natri clorua (5.2) để kiểm soát, mẫu chuẩn (5.6), mẫu (7.2) và các mẫu của dãy pha loãng (Bảng B.1) ở $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Chọn điều kiện thử nghiệm đảm bảo độ lệch nhiệt độ tối đa trong bể điều nhiệt trong một phép thử là không quá $\pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Đối với các phép thử có thể tích huyền phù cần thử và mẫu thử bằng nhau, dùng pipet hút vào ống đo thử hai, tương ứng với cuvet thử (6.4) 500 μl huyền phù cần thử, duy trì ở nhiệt độ $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong tủ ấm, trong các khoảng thời gian bằng nhau (từ 5 s đến 20 s) như đối với các phép đo cường độ sau này.

Tiến hành phép xác định song song đối với mỗi mức pha loãng ở nhiệt độ thử $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

Xác định và ghi cường độ phát quang, I_0 , của các huyền phù thử bằng máy đo phát quang.

Vì thời gian tiếp xúc đối với tất cả các mẫu phải bằng nhau, nên sử dụng đồng hồ tính giờ (6.6) để đo cường độ phát quang ở các khoảng thời gian đo bằng nhau. Khoảng thời gian đo thích hợp là 5 s đến 20 s.

Đo tất cả các huyền phù thử, bởi vì độ phát quang có thể khác nhau do huyền phù thử không được đồng nhất.

Ngay sau khi đo độ phát quang của huyền phù thử ban đầu, làm đầy huyền phù thử này tới 1 ml bằng mẫu (7.2), mẫu đã pha loãng (Phụ lục B), mẫu chuẩn (5.6) hoặc dung dịch natri clorua (5.2), nếu thích hợp. Việc này được thực hiện bằng cách dùng pipet lấy 500 μl mỗi dung dịch mẫu (7.2), mẫu đã pha loãng (Phụ lục B), mẫu chuẩn (5.6) hoặc dung dịch natri clorua (5.2), đã được chuẩn bị trong dãy cuvet thử thử nhất, cho vào huyền phù thử cần thử trong mỗi cuvet thử của dãy ống đo thử hai tương ứng. Lắc đều bằng tay, bắt đầu bấm giờ và đặt các cuvet thử trở lại bể điều nhiệt tại nhiệt độ $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Lặp lại với tất cả các cuvet thử khác, để cùng khoảng thời gian giữa những lần thêm vào.

TCVN 6831-1:2010

Đo và ghi cường độ phát quang trong tất cả các cuvet, kể cả mẫu kiểm soát, cứ sau 15 min và sau 30 min (I_{15}, I_{30}), có thể đo sau 5 min (I_5), tùy chọn, để khoảng thời gian đo từ 5 s đến 20 s.

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 chuẩn cho việc xác định độ giảm phát quang do nước.

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

Trong đó

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

I_{kt} là cường độ phát quang trong mẫu kiểm tra sau thời gian tiếp xúc 5 min, 15 min hoặc 30 min, 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;

Tính hệ số hiệu chỉnh trung bình \bar{f}_{kt} và độ lệch của các giá trị riêng từ giá trị trung bình tính bằng phần trăm (lấy một chữ số có nghĩa)

$$[(\bar{f}_{kt} \pm f_{kt}) / \bar{f}_{kt}] \times 100 \quad (2)$$

Trong đó :

f_{kt} là giá trị riêng của một trong hai hệ số điều chỉnh và \bar{f}_{kt} là giá trị trung bình.

Dùng công thức (3) để tính I_{ct} :

$$I_{ct} = I_0 \times \bar{f}_{kt} \quad (3)$$

Trong đó:

\bar{f}_{kt} là giá trị trung bình của f_{kt} ;

I_0 là cường độ phát quang của huyền phù mẫu thử, ngay trước khi thêm của mẫu (7.2) hoặc mẫu pha loãng (Phụ lục B), tính bằng đơn vị phát quang tương ứng;

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 (4) để tính ảnh hưởng ức chế của mẫu thử:

$$H_t = [(I_{ct} - I_t) / I_{ct}] \times 100 \quad (4)$$

Trong đó :

H_t là ảnh hưởng ức chế của mẫu thử sau thời gian tiếp xúc 5 min, 15 min hoặc 30 min, tính bằng phần trăm;

I_{ct} xem Công thức (3);

I_t là cường độ phát quang của mẫu thử sau thời gian tiếp xúc 5 min, 15 min hoặc 30 min, 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 chênh lệch số học của phép xác định song song H_u từ trung bình tương ứng \bar{H}_t , tính bằng điểm phần trăm (một chữ số có nghĩa):

$$\bar{H}_t(\%) - H_u(\%)$$

Trong đó

H_u là một trong hai giá trị hiệu ứng ức chế của mẫu thử và \bar{H}_t là giá trị trung bình.

10.2 Xác định các giá trị EC

Tính toán mối tương quan ảnh hưởng của nồng độ đối với từng thời gian tiếp xúc sử dụng tuyến tính chuẩn thích hợp hoặc phân tích hồi qui phi tuyến tính^[6].

Để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ sử dụng kỹ thuật hồi quy tuyến tính, ước lượng giá trị gamma cho từng mức pha loãng (tỷ lệ của độ giảm phát quang với tổng lượng ánh sáng còn lại tại thời điểm t) sử dụng Công thức (5):

$$\Gamma_t = \bar{H}_t / (100 - \bar{H}_t) \quad (5)$$

Trong đó:

Γ_t là giá trị gamma của mẫu thử sau thời gian tiếp xúc 5 min, 15 min hoặc 30 min;

\bar{H}_t là giá trị trung bình của H_t xem Công thức (4).

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 tương quan của nồng độ.

TCVN 6831-1:2010

Mối tương quan về ảnh hưởng nồng độ tại thời điểm tiếp xúc đã cho thường có thể được mô tả bằng phương trình tuyến tính sau:

$$\lg c_t = b \lg \Gamma_t + \lg a \quad (6)$$

Trong đó:

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

Γ_t xem Công thức (5);

b là giá trị của độ dốc của đường tuyến tính;

$\lg a$ là giá trị của phần bị chặn của đường tuyến tính.

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

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

$$c_t = EC_{50,t} \text{ ở } \Gamma_t = 1,00;$$

Đối với phân tích hồi qui phi tuyến tính, các mô hình khác nhau có sẵn trong phần mềm đồ họa chuẩn hoặc phần mềm thống kê. Các phần mềm này được dựa trên hàm phân bố chuẩn (nghĩa là phân tích Probit), phân bố logistic (nghĩa là phân tích Logit), hoặc phân bố Weibull (nghĩa là phân tích Weibull). Ảnh hưởng ức chế đã tính (H_t) có thể được dùng trực tiếp để ước lượng thông số ảnh hưởng nồng độ phi tuyến tính, từ đó, giá trị EC đối với từng mức có thể tính được tiếp sau^[8].

Nếu khoảng của cặp giá trị không khớp với đường cong, thì các giá trị EC có thể được ước lượng theo hình học sử dụng hệ thống tọa độ logarit kép.

11 Biểu thị kết quả

Báo cáo kết quả theo ví dụ trong Bảng 1.

Báo cáo khoảng thời gian thử (5 min, 15 min hoặc 30 min)

Nếu xác định được, báo cáo giá trị LID_{10} (xem Phụ lục B).

Nếu xác định được, báo cáo giá trị EC_{20} và EC_{50} và phương pháp để tính độ lệch của các giá trị này.

Báo cáo cách chuẩn bị vi khuẩn đã sử dụng.

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

Thí nghiệm đối chứng								
Số mẻ kiểm tra	Mức pha loãng D	Giá trị đo được		I_{k30} / I_0	\bar{f}_{k30}	Thử nghiệm tính đúng đắn Độ lệch so với giá trị trung bình \bar{f}_{k30} , tính bằng % ^b		
		I_0	I_{k30}					
1	1 ^a	93	76	0,817 2	0,815 2	± 0,3		
2		91	74	0,813 2				
3	≥ 2 ^a	92	79	0,858 7	0,850 4	± 1,0		
4		95	80	0,842 1				
Thí nghiệm thử								
Số mẻ thử	Mức pha loãng D	Giá trị đo được		I_{c30}	H_{30} %	\bar{H}_{30} %	Thử nghiệm tính đúng đắn Độ lệch so với giá trị trung bình, tính bằng % theo điểm ^c	Γ_{30}
		I_0	I_{30}					
1	1	92	25	75,0	66,7	65,53	± 1,1	1,901
2		93	27	75,8	64,4			
3	2	86	43	73,1	41,2	42,51	± 1,3	0,740
4		90	43	76,5	43,8			
5	3	91	60	77,4	22,5	22,92	± 0,5	0,297
6		89	58	75,7	23,4			
7	4	95	72	80,8	12,4	11,65	± 0,8	0,132
8		94	70	79,9	10,9			
	Chất chuẩn							
9	3,4 mg/l DCP, hoặc 2,2 mg/l Zn, hoặc 18,7 mg/l Cr	91	32	77,4	58,7	57,85	± 0,9	1,372
10		93	34	79,1	57,0			

^a Xem Phụ lục B.

^b Đối với mẻ kiểm tra, độ lệch so với giá trị trung bình \bar{f}_{k30} được tính bằng chênh lệch toán học của các lần xác định song song so với giá trị trung bình của chúng, tính bằng phần trăm [Công thức (2) trong 10.1].

^c Đối với mẻ thử, 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 được tính như chênh lệch toán học của từng giá trị H_{30} (tính bằng phần trăm) so với giá trị trung bình \bar{H}_{30} (tính bằng phần trăm) (được gọi là điểm phần trăm).

Giá trị LID_{10} trong ví dụ này $LID_{10} = 4$.

Giá trị EC_{20} trong ví dụ này = 31,9 %, Giá trị $EC_{50} = 58,8$ % (thông kê bình phương tối thiểu chuẩn).

12 Chuẩn cứ về tính đúng đắn của phép thử

Phép thử được coi là đúng nếu

- Giá trị \bar{f}_{ki} khi ủ trong 15 min hoặc 30 min nằm trong khoảng từ 0,6 đến 1,3;
- Kết quả của các phép xác định song song không chênh lệch so với giá trị trung bình của chúng quá 3% so với các mẫu kiểm tra;
- Đối với các mẫu thử mà xác định giá trị LID_{10} hoặc giá trị EC_{20}/EC_{50} tương ứng, độ lệch so với giá trị trung bình của chúng "điểm phần trăm" không quá 3%.
- Đối với mẻ nuôi cấy huyền phù gốc theo 8.4, cả ba chất chuẩn (5.6) (các dung dịch không được trung hoà, kiểm tra riêng rẽ) gây ức chế từ 20% đến 80% sau thời gian tiếp xúc 30 min ở các nồng độ sau trong huyền phù thử cuối cùng:

4,5 mg/l	3,5-diclorophenol
25 mg/l	Zn(II) (tương đương 109,9 mg/l kẽm sunfat ngậm bảy nước)
4 mg/l	Cr(VI) (tương đương 11,3 mg/l kali dicromat);
- Một trong ba chất chuẩn (5.6) (các dung dịch không được trung hoà), được thử trong phép thử tiến hành song song từng dung dịch huyền phù gốc được rửa đồng cho phép thử thực sự (Điều 9) gây ra ức chế 20% đến 80% sau thời tiếp xúc 30 min.

13 Độ chính xác

Trong chương trình thử nghiệm liên phòng cấp quốc gia có 22 phòng thí nghiệm tham gia, được tiến hành trong suốt mùa thu năm 1991 đã xác định các số liệu về độ chính xác. Các kết quả được tóm tắt trong Phụ lục C.

14 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải viện dẫn tiêu chuẩn này TCVN 6831-1:2010 (ISO 11348-1). Tài liệu cần phải bao gồm các thông tin sau:

- Nhận dạng mẫu nước, kể cả việc lấy mẫu, thời gian lưu giữ và điều kiện bảo quản;
- pH và nồng độ oxy của mẫu nước gốc, tính bằng mg/l hoặc % sự bão hòa;
- Ngày thử nghiệm;
- Phương pháp xử lý sơ bộ mẫu, nếu cần, ví dụ pH sau khi điều chỉnh;
- Nguồn gốc vi khuẩn, số mẻ;
- Ngày chuẩn bị vi khuẩn;
- Nhiệt độ bảo quản vi khuẩn;

- h) Biểu thị kết quả theo Điều 11 và Bảng 1;
- i) Mọi 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 chuẩn đối với mẻ vi khuẩn và thử nghiệm thực tế.

Phụ lục A

(tham khảo)

Phương pháp hiệu 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-hai lớp, lắp vừa với máy 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 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong tủ ủ kiểm soát được nhiệt độ.

Chuẩn bị một dung dịch pha loãng mẫu thử (5.2) có nồng độ gần giá trị $EC_{20,t}$ (C_k). Nếu giá trị $EC_{20,t}$ chênh lệch nhiều thì C_k phải gần với giá trị $EC_{20,t}$ thấp hơn.

CHÚ THÍCH 1 Không cần phải chọn C_k khác nhau cho mỗi khoảng thời gian tiếp xúc (5 min, 15 min, 30 min).

Cho 2,0 ml dung dịch natri clorua 2 % (5.2) vào khoang ngoài của cuvet hiệu chỉnh màu.

Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn đặc biệt.

Đối với vi khuẩn tươi được chuẩn bị theo 8.4, nên sử dụng 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 min, và bật đồng hồ bấm giờ.

Từ thời điểm này trở đi, vị trí của cuvet hiệu chỉnh màu trong khoảng 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 $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Đo mức ánh sáng (I_s) 5 min 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 min sau lần đo đầu.

CHÚ THÍCH 2 Qui trình này có thể đơn giản hoá bằng cách dùng hai cuvet hiệu chỉnh màu giống hệt nhau. Khoảng ngoài của cuvet thứ nhất chứa đầy nước, khoảng ngoài của cuvet thứ hai chứa đầy mẫu đã pha loãng. Sau 15 min, 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 để tính toán ở A.4.

A.4 Tính toán kết quả

Các tính toán 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 (A.1):

$$B_5 = B_0 - \frac{B_0 - B_{10}}{2} \quad (\text{A.1})$$

Tính độ hấp thụ (A_t) của nồng độ $EC_{20,t}$ chưa hiệu chỉnh với thời điểm tiếp xúc (t) theo công thức (A.2):

$$A_t = \frac{EC_{20,t}}{C_k} \times k \times \ln \frac{B_5}{I_5} \quad (\text{A.2})$$

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 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 (A.3):

$$T_t = \frac{1 - e^{-A_t}}{A_t} \quad (\text{A.3})$$

Tính giá trị gamma đã hiệu chỉnh (Γ_c) theo công thức (A.4):

$$c\Gamma_t = (5 T_t) - 4 \quad (\text{A.4})$$

và theo Công thức (A.5):

$$\Gamma_c = c\Gamma_t \times \Gamma_0 \quad (\text{A.5})$$

Trong đó

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

Γ_0 là giá trị gamma gốc.

TCVN 6831-1:2010

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

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 (A.6):

$$\Gamma_c = T_t(1 + \Gamma_0) - 1 \tag{A.6}$$

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 một 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 (A.7) tính hệ số hiệu chỉnh được rút gọn như sau:

$$c\Gamma_t = \frac{\Gamma_c}{\Gamma_0} = \frac{T_t(1 + \Gamma_0) - 1}{\Gamma_0} = \frac{T_t(1 + 0,25) - 1}{0,25} = (5T_t) - 4 \tag{A.7}$$

Trong đó

T_t là giá trị phát quang sinh học đo được ở thời điểm tiếp xúc đã định (t);

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

Γ_0 là giá trị gamma gốc;

Γ_c là giá trị gamma đã được hiệu chỉnh.

A.5 Ví dụ

Bảng A.1 – Ví dụ

Số liệu về hiệu chỉnh màu										
$C_k = 10,0$ % phần thể tích		$B_5 = 81$			$I_0 = 78$			$k = 3,1$		
Tính hiệu chỉnh màu										
C = phần thể tích		5 min			15 min			30 min		
		$c\Gamma_5 = 0,708$			$c\Gamma_{15} = 0,670$			$c\Gamma_{30} = 0,657$		
	I_0	I_5	Γ_0	Γ_c	I_{15}	Γ_0	Γ_c	I_{30}	Γ_0	Γ_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:		$\ln \Gamma = 1,96 \times \ln C - 5,96$			$\ln \Gamma = 1,95 \times \ln C - 6,16$			$\ln \Gamma = 1,90 \times \ln C - 6,12$		
Công thức đã hiệu chỉnh:		$\ln \Gamma = 1,96 \times \ln C - 6,30$			$\ln \Gamma = 1,95 \times \ln C - 6,56$			$\ln \Gamma = 1,90 \times \ln C - 6,53$		
EC _{20,t} gốc		10,3			11,6			12,1		
EC _{20,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

B.1 Nguyên tắc

Khi thử nước thải bằng cách pha loãng dần (D) mẻ 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 mẻ thử [ví 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 theo thông lệ là $D \geq 2$ (nồng độ mẫu cao nhất trong phép thử: 50 % mẫu).

B.2 Chuẩn bị mẫu

Chuẩn bị mẫu theo 7.2.

Mẫu nước thải phải làm đồng nhất bằng cách lắc bằng tay hoặc trộn bằng khuấy từ.

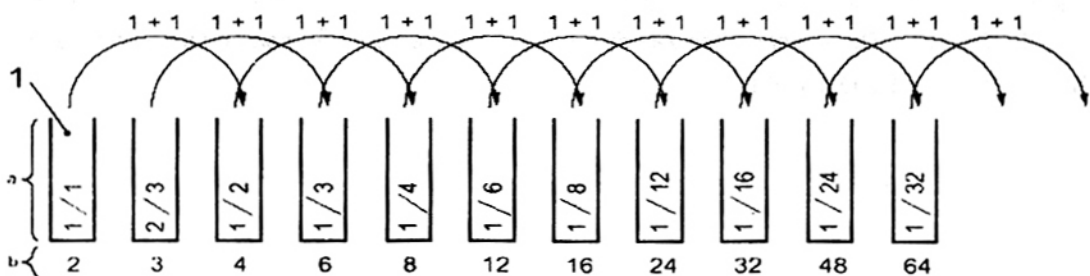
Thêm 20 g dung dịch natri clorua vào mỗi lít mẫu nước hoặc mẫu nước đã điều chỉnh-pH. Đối với mẫu nước có nồng độ muối cao, đo độ muối và tính lượng NaCl (nếu cần) cần để điều chỉnh độ thẩm thấu. Nồng độ muối thu được trong mẫu thử không được vượt quá độ thẩm thấu của dung dịch natri clorua 35 g/l.

Chuẩn bị dãy pha loãng trong dãy cuvet thử thứ nhất. Nên dùng dãy pha loãng theo Bảng B.1. Dãy pha loãng được chuẩn bị bằng cách pha loãng dần và kết hợp hai pha loãng hình học ($D = 2, 4, 8, 16, \dots$ và $D = 3, 6, 12, 24, \dots$). Đối với các phép xác định song song, thể tích mẫu hoặc mẫu đã pha loãng hoặc mẫu kiểm tra bằng 1 500 μl là đủ.

Bảng B.1 – Chuẩn bị dãy pha loãng

	Mức pha loãng D	Thành phần của dãy pha loãng mẫu (Tổng thể tích cho phép xác định song song: 1 500 μ l)	
		Mẫu nước (7.2) μ l	Nước pha loãng (5.2) μ l
	Đối với D = 1		
Mề kiểm tra		0	1 500
Mề thử	1	1 500	0
	Đối với D \geq 2		
Mề kiểm tra		0	1 500
Mề thử	2	1 500	0
	3	1 000	500
	4	750	750
	6	500	1 000
	8	375	1 125
	12	250	1 250
	16	187,5	1 312,5
	24	125	1 375
	32	93,75	1 406,25
Mề chuẩn (Nồng độ xem trong 5.6)		1 500	0

Cách dễ nhất để chuẩn bị dãy pha loãng này là tạo hai dung dịch pha loãng gốc trong các ống nghiệm riêng rẽ (xem Hình B.1)



CHÚ DẪN

- 1 Mẫu
- a Mẫu pha loãng để tạo dãy thử thứ nhất.
- b Mức pha loãng cuối cùng D sau khi thêm huyền phù thử.

Hình B.1 – Sơ đồ pha loãng

Pha loãng 1 trong 1, 3 000 μl mẫu chưa pha loãng (độ pha loãng cuối cùng trong phép thử sau khi trộn với các thể tích bằng nhau huyền phù thử sẽ là 1 trong 2).

Pha loãng 2 trong 3, ví dụ 2 000 μl mẫu + 1 000 μl dung dịch 5.2 (độ pha loãng cuối cùng trong phép thử sau khi trộn với các thể tích huyền phù thử bằng nhau sẽ là 1 trong 3).

Đối với những chuẩn bị pha loãng hơn nữa, chuyển 1 500 μl mẫu /mẫu đã pha loãng vào 1 500 μl dung dịch 5.2 trong các ống thử, trộn đều sau từng lần chuyển.

Trong phép thử vi khuẩn phát quang, thường 500 μl mẫu nước hoặc mẫu đã pha loãng được chuẩn bị trong dãy thử thứ nhất được trộn với 500 μl huyền phù thử (xem Điều 9) được chuẩn bị trong dãy ống thử thứ hai, sau khi đo cường độ ánh sáng ban đầu của huyền phù thử. Do vậy, mức pha loãng thu được D trong mẻ thử đối với phép đo sự ức chế phát quang là gấp đôi độ pha loãng của mẫu hoặc mẫu đã pha loãng.

Nếu cần thử mẫu nước gần như chưa pha loãng, có thể thêm 800 μl mẫu nước chưa pha loãng (7.2) vào 200 μl huyền phù thử. Độ pha loãng của mẫu là 1 trong 1,25 (nồng độ mẫu cuối cùng trong phép thử: 80 % mẫu). Giá trị D tương ứng có thể được coi như $D = 1$. Huyền phù thử đối với $D = 1$ được chuẩn bị bằng cách thêm 4,5 ml dung dịch (5.5) vào vi khuẩn đã được tạo huyền phù lại, thay cho 11,5 ml. Đối với giá trị này, cần có một mẻ kiểm tra thêm để tính toán hệ số hiệu chỉnh phục vụ cho việc hiệu chỉnh giá trị ban đầu. Mẻ kiểm tra được làm bằng cách thêm 800 μl dung dịch natri clorua (5.2) vào 200 μl huyền phù thử.

B.3 Cách tiến hành

Tiến hành phép thử theo Điều 9.

Thực hiện phép xác định kép đối với từng mức pha loãng.

Xác định và ghi lại cường độ phát quang trong tất cả các ống thử, kể cả ống kiểm tra, sau 15 min và 30 min (I_{30}), tùy chọn.

B.4 Đánh giá

Tính giá trị trung bình của ảnh hưởng ức chế \bar{H}_{30} đối với từng mức pha loãng, tính bằng phần trăm (xem 10.1).

Tính độ lệch của phép xác định song song H_{30} so với giá trị trung bình của chúng tương ứng cho phép xác định kép $H_{30}(\%)$ (trung bình) $- H_{30}(\%)$ tính bằng điểm phần trăm, (một chữ số có nghĩa) và theo phần trăm của trung bình cho kiểm tra. (hệ số hiệu chỉnh, xem 10.1).

B.5 Biểu thị kết quả

Thể hiện kết quả theo Điều 11.

TCVN 6831-1:2010

Giá trị D thấp nhất được thử tại mức mà hiệu ứng ức chế trung bình \bar{H}_{30} là < 20 %, được gọi là LID_{10} .

B.6 Báo cáo thử nghiệm

Xem Điều 14.

Ngoài các số liệu được yêu cầu trong tiêu chuẩn này, báo cáo thử nghiệm phải bao gồm thông tin về độ trong của nước thải, điều chỉnh độ muối và phương pháp xử lý sơ bộ (lắng, lọc, ly tâm, sục khí).

Phụ lục C
(tham khảo)

Số liệu độ đúng

Đối với chương trình thử nghiệm liên phòng, dung dịch chưa trung hòa gồm 3,5-diclorophenol, kẽm sunfat ngậm bảy nước, kali dicromat và xetyltrimethylammonium bromua được pha bằng nước cất hoặc nước có độ tinh khiết tương đương. Những giá trị EC được xác định như nêu trong 10.2, và các kết quả được đưa ra trong Bảng C.1.

CHÚ THÍCH Do một số phòng thí nghiệm cho kết quả ức chế lớn hơn 20 % ở nồng độ thử thấp nhất hoặc kết quả ức chế nhỏ hơn 50 % ở nồng độ thử cao nhất nên các giá trị l đôi khi có sự khác nhau đối với EC₂₀ và EC₅₀.

Bảng C.1 — Số liệu độ đúng đối với vi khuẩn tươi được bảo quản trong tủ lạnh sâu

		$l = n$	n_{AP} %	\bar{x} mg/l	s_R mg/l	CV_R %
1	3,5-diclorophenol					
	EC ₂₀	15	0,0	3,31	0,75	22,6
	EC ₅₀	15	0,0	5,80	1,28	22,1
2	Kẽm sunfat heptahydrat ^a					
	EC ₂₀	13	13,3	14,6	2,4	16,6
	EC ₅₀	13	13,3	26,0	3,3	12,8
3	Kali dicromat ^a					
	EC ₂₀	11	15,3	0,717	0,283	39,5
	EC ₅₀	10	28,6	2,726	0,947	34,8
4	Cetyltrimethylammonium bromua					
	EC ₂₀	11	8,3	0,229	0,105	45,6
	EC ₅₀	13	7,1	0,476	0,152	31,8
Giải thích các ký hiệu						
l : Số lượng phòng thí nghiệm tham gia;						
n : Số lượng các bộ dữ liệu;						
n_{AP} : Số lượng ngoại lệ;						
\bar{x} : Giá trị trung bình;						
s_R : Độ lệch chuẩn của độ tái lập;						
CV_R : Hệ số biến thiên của độ tái lập;						
EC ₂₀ : Nồng độ hữu ích gây ra ức chế phát quang 20 %.						
EC ₅₀ : Nồng độ hữu ích gây ra ức chế phát quang 50 %.						
^a Nồng độ của Zn(II) hoặc Cr(VI) tương ứng.						

Phụ lục D
(tham khảo)

Thử mẫu nước mặn với phép thử vi khuẩn phát quang dùng vi khuẩn mới nuôi cấy

D.1 Thông tin chung

Sinh vật thử *Vibrio fischeri* là vi khuẩn biển. Thử mẫu nước mặn bằng quy trình chuẩn thường dẫn tới những ảnh hưởng kích thích mà có thể gây cản trở những hiệu ứng ức chế^[2]. Sự kích thích đó có thể do các ion của kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ^{[2], [3]}. Với những cải tiến này của qui trình thử, sự phát quang sinh học trong kiểm tra được tối ưu hóa bằng cách sử dụng nước biển nhân tạo hoặc nước lợ nhân tạo khi kiểm tra và pha loãng. Do vậy, những hiệu ứng kích thích được giảm bớt và phương pháp này có thể áp dụng cho mẫu nước biển, nước lợ và nước lợ tương ứng.

D.2 Định nghĩa

D.2.1

Độ muối (Salinity)

Độ muối thực tế (practical salinity)

S

Đại lượng không thứ nguyên, dùng để kiểm tra chất lượng nước, được xem như sự ước lượng về nồng độ của muối hòa tan trong nước biển, tính bằng gam trên kilogram; Nó cũng được định nghĩa theo toán học, là tỷ số (K_{15}) giữa độ dẫn điện của mẫu nước, tại 15 °C và 1 atm*, và độ dẫn điện của dung dịch kali clorua xác định (32,4366 g/kg mẫu) ở cùng nhiệt độ và áp suất.

CHÚ THÍCH Chấp nhận từ TCVN 8184-2:2009 (ISO 6107-2:2006), định nghĩa 85.

D.2.2

Mẫu nước mặn (salt water sample)

Mẫu nước mặn hoặc lợ có độ muối trong khoảng từ 5 đến 35.

D.2.3

Nước chiết của trầm tích biển hoặc lợ (Eluates of marine or brackish sediments).

Dịch chiết lỏng của trầm tích biển hoặc nước lợ có nước lợ/biển nhân tạo hoặc tự nhiên như môi trường rửa giải.

D.2.4

Trầm tích nước biển hoặc nước lợ (Pore water of marine or brackish sediment particles)

Nước nằm giữa các hạt trầm tích biển và trầm tích lợ

* Theo qui định hợp pháp, atm được chuyển thành Pa: 1 atm = 101 325 Pa.

D.3 Vật liệu

D.3.1 Chất chuẩn

- 3,5-dichlorophenol;
- Kẽm sunfat ngậm bảy nước ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).

D.3.2 Nước biển nhân tạo (ASW) và nước lợ nhân tạo (ABW)

Sử dụng nước đã loại ion để chuẩn bị nước biển nhân tạo (ASW) và nước lợ nhân tạo (ABW) với các thành phần được nêu trong Bảng D.1. Tất cả thuốc thử phải ở cấp độ tinh khiết.

**Bảng D.1 – Nước biển nhân tạo (ASW) (như qui định trong ISO 10253^[5])
và nước lợ nhân tạo (ABW)**

	Nước biển nhân tạo (ASW)	Nước lợ nhân tạo (ABW)
Độ muối (g/l)		
NaCl	22,0	14,19
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9,7	6,26
Na ₂ SO ₄ (anhydric)	3,7	2,39
CaCl ₂ (anhydric)	1,0	0,65
KCl	0,65	0,42
NaHCO ₃	0,20	0,13
H ₃ BO ₃	0,023	0,015
Độ dẫn điện (μS/cm) (20 °C)	47.000 ± 1.000	31.000 ± 1.000
Độ muối nhân tạo (20 °C)	31 ± 1	20 ± 1
Giá trị pH	7,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2

D.4 Cách tiến hành

D.4.1 Khái quát

Chuẩn bị và làm tan vi khuẩn theo một qui trình tiêu chuẩn. Tùy thuộc vào độ muối của mẫu, sử dụng nước biển nhân tạo (ASW) hoặc nước lợ nhân tạo (ABW) làm mẫu kiểm tra âm, nước pha loãng cho dây pha loãng mẫu và nước pha loãng cho chất chuẩn thay cho dung dịch natri clorua 2 % (S 20) (xem tóm tắt trong Bảng D.2)

Bảng – D.2 So sánh qui trình chuẩn và quy trình cải biến

	Qui trình chuẩn TCVN 6831-1 (ISO 11348-1)	Nước lợ cải biến	Nước mặn cải biến
Độ muối của mẫu (S)	X < 5	5 ≤ x ≤ 20	20 ≤ x ≤ 35
Chất chuẩn hòa tan trong	Dung dịch NaCl (S 20)	ABW (s 20)	ASW (s 20)
Mẫu kiểm tra	Dung dịch NaCl (S 20)	ABW (s 20)	ASW (s 20)
Nước pha loãng	Dung dịch NaCl (S 20)	ABW (s 20)	ASW (s 20)

D.4.2 Mẫu với độ muối $5 \leq x \leq 20$ (Nước lợ cải biến)

Đo và lập tài liệu về độ muối của mẫu. Mẫu có độ muối $S < 20$ thì cần phải tăng độ muối lên $S = 20$ bằng natri clorua. Đo giá trị pH của mẫu. Nếu pH nằm trong khoảng 7,0 đến 8,5, thì sự điều chỉnh là không cần thiết. Nếu cần, điều chỉnh pH của mẫu tới $7,5 \pm 0,2$ bằng cách thêm axit clohydric hoặc dung dịch natri hydroxit; chọn nồng độ của axit clohydric hoặc dung dịch natri hydroxit để hạn chế thể tích thêm vào không quá 5 % tổng thể tích.

Sử dụng nước lợ nhân tạo (ABW) (D.3.2)

- Làm mẫu kiểm tra,
- Dùng cho dây pha loãng của mẫu,
- Dùng cho dung dịch gốc của chất chuẩn cũng và cho dây pha loãng của dung dịch gốc.

D.4.3 Mẫu có độ muối $20 < x \leq 35$ (Nước biển cải biến)

Đo và lập tài liệu về độ muối của mẫu. Đo giá trị pH của mẫu. Nếu pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,5 thì sự điều chỉnh thường là không cần thiết. Nếu cần, điều chỉnh pH của mẫu tới $7,4 \pm 0,2$ bằng cách thêm axit clohydric hoặc dung dịch natri hydroxit; chọn nồng độ của axit clohydric hoặc dung dịch natri hydroxit để hạn chế thể tích thêm vào không quá 5 % tổng thể tích.

Sử dụng nước biển nhân tạo (ASW) (D.3.2)

- Làm mẫu kiểm tra,
- Dùng cho dây pha loãng mẫu,
- Dùng cho dung dịch gốc của chất chuẩn và cho dây pha loãng của dung dịch gốc.

D.5 Số liệu độ đúng

Đối với các chất chuẩn 3,5-dichlorophenol và kẽm sunfat ngậm bảy nước (D.3.1) giá trị EC_{50} được nêu trong Bảng D.3 có thể thu được do một phòng thí nghiệm và chỉ dùng cho mục đích tham khảo.

Bảng D.3 – Số liệu độ đúng đối với vi khuẩn mới nuôi cấy được bảo quản trong tủ lạnh sâu

Chất chuẩn	Phép thử	l	n	\bar{x} mg/l	s mg	CV %
3,5-dichlorophenol	Tiêu chuẩn	1	5	3,87	0,32	8,2
	Nước lợ	1	2	3,46	0,09	2,7
	Nước biển	1	3	3,23	0,19	5,8
Zn(II)	Tiêu chuẩn	1	3	20,70	2,39	11,6
	Nước lợ	1	2	31,43	2,63	8,4
	Nước biển	1	6	36,73	3,66	10,0
Giải thích các ký hiệu:						
l là số lượng phòng thí nghiệm tham gia;						
n là số lượng các bộ số liệu;						
\bar{x} là giá trị trung bình (giá trị EC ₅₀) (một phòng thí nghiệm);						
s là độ lệch chuẩn (một phòng thí nghiệm);						
CV là hệ số biến thiên (một phòng thí nghiệm).						

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 8184-2:2009 (ISO 6107-2:2006), *Chất lượng nước – Thuật ngữ – Phần 2*
- [2] ISO/TS 20281, *Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*
- [3] ISO 10253, *Water quality – Marine algal growth inhibition test with Skeletonema costatum and Phaeodactylum tricornutum (Chất lượng nước – Thử ức chế phát triển của tảo biển bằng Skeletonema costatum và Phaeodactylum tricornutum)*
- [4] GRABERT, E., KOSSLER, F. *About the nutrients on the luminescent bacteria test (Về chất dinh dưỡng trong phép thử vi khuẩn phát quang)*. In: Hastings J.W., Kricka L.J., Stanley P.E., editors. *Bioluminescence and Chemiluminescence, Molecular Reporting with Photons*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1996, pp. 291-294
- [5] KLEIN, B. (1992): Die Rolle des Kaliums bei Toxizitätstests mit Leuchtbakterien (incl. abstract in English: The role of potassium in toxicity tests using luminescent bacteria). *Z.f.Angew.Zool.*, Vol.4, pp. 199-219
- [6] KREBS, F. (1992): Gewässeruntersuchung mit durch Alkali- und Erdalkalitionen-Zugabe optimierten DIN-Leuchtbakterientest, dargestellt am Beispiel der Saar (incl. abstract in English: *River water analysis with luminescent bacteria test according to DIN, optimized by the addition of alkaline and alkaline-earth ions, with the River Saar as an example (Phân tích nước sông bằng phép thử vi khuẩn phát quang theo DIN, bằng cách thêm các ion kiềm và kiềm thổ, lấy ví dụ nước sông Saar)*) In: Steinhäuser, K.G. & Hansen, P. D. (Eds.). *Biologische Testverfahren*. Stuttgart. Germany. Gustav Fischer Verlag. Schr.-Reihe Verein WaBolu. Pp. 657-673
- [7] POSTMA, J.F. et al (2002). Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **53** (2), pp. 226-237
- [8] KREBS, F. (1993). Toxizitätstest mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien. *Gewässerschutz. Water, Abwasser*, **63**, pp. 173-230
-