

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 8880:2011
ISO 19458:2006**

Xuất bản lần 1

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC –
LẤY MẪU ĐỂ PHÂN TÍCH VI SINH VẬT**

Water quality – Sampling for microbiological analysis

HÀ NỘI – 2011

Lời nói đầu

TCVN 8880:2011 hoàn toàn tương đương với ISO 19458 :2006

TCVN 8880:2011 do Ban kỹ thuật Tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC 147 *Chất lượng nước* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Việc lấy mẫu phù hợp là yếu tố cần để cung cấp mẫu đại diện cho phòng thí nghiệm có chức năng thử nghiệm. Điểm đặc trưng của lấy mẫu phụ thuộc vào mục đích lấy mẫu, và bản chất/đặc tính của mẫu. Các loài vi sinh vật là những loài sinh vật sống. Ngoài ra, nếu chúng được đưa vào nước, chúng không tạo thành một dung dịch hoàn chỉnh, nhưng tạo thành huyền phù có tính chất không ổn định.

Mục đích lấy mẫu có thể phục vụ cho các mục đích khác nhau, được mô tả trong bộ TCVN 6663 (ISO 5667), TCVN 6663-1 (ISO 5667-1), TCVN 6663-2 (ISO 5667-2) và TCVN 6663-3 (ISO 5667-3);

- a) Xác định tính phù hợp của nước với các quy định kỹ thuật về chất lượng;
- b) Đặc tính của sự nhiễm bẩn, mức nhiễm bẩn (trung bình) và sự biến động của chúng;
 - 1) Cái gì biến đổi ngẫu nhiên?
 - 2) Có xu hướng không?
 - 3) Có chu kỳ không?
- c) Nhận dạng của nguồn ô nhiễm.

Số lượng hoặc tần suất của mẫu, chúng sẽ thay đổi theo mục đích của lấy mẫu.

Số lượng mẫu tối thiểu sẽ ít hơn nếu nồng độ trung bình khác nhiều so với quy định (quá thấp hoặc quá cao), và số lượng mẫu tối thiểu sẽ nhiều hơn nếu nồng độ trung bình và quy định kỹ thuật là tương tự nhau. Tương tự, trong trường hợp b), nếu xu hướng càng không rõ ràng, tần suất lấy mẫu sẽ nhiều hơn (xem Phụ lục A)

Chất lượng nước – Lấy mẫu để phân tích vi sinh vật

Water quality – Sampling for microbiological analysis

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 đối với người sử dụng tiêu chuẩn, nếu có. Người sử dụng có trách nhiệm xây dựng biện pháp bảo đảm an toàn và sức khỏe phù hợp với các qui định của quốc gia.

QUAN TRỌNG – Chỉ những nhân viên đã được đào tạo phù hợp mới được tiến hành phép thử theo tiêu chuẩn này.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này cung cấp hướng dẫn về lập kế hoạch lấy mẫu nước, quy trình lấy mẫu để phân tích vi sinh vật và yêu cầu vận chuyển, xử lý và bảo quản mẫu cho đến khi bắt đầu phân tích. Tiêu chuẩn này tập trung vào lấy mẫu để điều tra vi sinh vật.

Thông tin chung về lấy mẫu từ các vực nước riêng được nêu trong các phần tương ứng của bộ TCVN 6663 (ISO 5667).

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 6663-1 (ISO 5667-1), *Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 1: Hướng dẫn lập chương trình lấy mẫu và kỹ thuật lấy mẫu.*

TCVN 6663-3 (ISO 5667-3), *Chất lượng nước – Lấy mẫu – Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu.*

3 Điểm lấy mẫu

Vị trí lấy mẫu phải có tính đại diện và phải tính được sự biến động về chiều rộng, chiều thẳng đứng và thời gian và phải được phân định theo các khuyến nghị chung của TCVN 6663-1 (ISO 5667 -1), có tính đến các khía cạnh bổ sung đặc trưng cho vi sinh vật.

TCVN 8880:2011

Cần tránh các điểm lấy mẫu có điều kiện không phù hợp, và tính không đồng nhất của hệ thống thủy địa cần phải được xem xét. Trong nghiên cứu về hiệu quả của sự khử khuẩn, điểm lấy mẫu phải được chọn để đảm bảo phản ứng là hoàn tất.

Ví dụ: về tính không đồng nhất của hệ thống có thể ảnh hưởng như thế nào đến kết quả được nêu dưới đây.

- Không tương đương để lấy mẫu bề mặt hoặc mẫu dưới bề mặt, hoặc mẫu dưới bề mặt “bị nhiễm bẩn” trong quá trình thu hồi qua lớp váng bề mặt. Trong một số trường hợp (ví dụ hồ, bể bơi), sự nhiễm bẩn trong lớp váng bề mặt có thể cao gấp 1000 lần so với dưới bề mặt.
- Tất cả các điểm trong mạng cấp nước là không tương đương nhau, vì có thể là điểm cuối và các phần có dòng chảy bị giảm, đặc biệt nếu mạng cấp nước được lấy từ hai nguồn.
- Chất lượng tại lối ra của bể được trộn đều nói chung cũng giống như trong khối nước, nhưng có thể là hoàn toàn khác với lối vào.

4 Kỹ thuật lấy mẫu

4.1 Nhân viên

Những người lấy mẫu phải được đào tạo chính thức, và phải được xác nhận về năng lực và những thông tin này phải được viết thành văn bản.

4.2 Bình chứa mẫu

4.2.1 Khái quát

Đối với lấy mẫu thường nhật (ví dụ lấy mẫu tại vòi, nước cho các hoạt động giải trí, nước bể bơi), sử dụng chai sạch, đã khử khuẩn. Dung tích của chai phải đủ để có thể phân tích tất cả các thông số yêu cầu.

Đối với lấy mẫu bằng cách nhúng chai xuống nước sạch, sử dụng chai đã được khử khuẩn cả mặt trong và ngoài và được bảo vệ, ví dụ bằng giấy kraft (để giữ khô sau khi khử khuẩn trong nồi hấp), giấy tráng nhôm hoặc bằng túi nhựa.

Nếu không khử khuẩn bằng nồi hấp, khử khuẩn bằng tia gamma hoặc bằng oxit etylen. Túi có thể mở chỉ trước khi lấy mẫu và cũng có thể dùng làm găng để giữ chai được vô khuẩn tối đa trước khi được đặt lên thiết bị lấy mẫu vô khuẩn khác.

Cách khác, mặt ngoài của chai chứa mẫu có thể được khử khuẩn ngay trước khi nhúng bằng chất khử khuẩn phù hợp như izopropanol (4.3.1.1) và để khô trước khi dùng. Cách làm này không phù hợp cho phân tích vi khuẩn tạo bào tử.

Trong phần lớn trường hợp, vì xác định ít hơn 5 loại vi sinh vật nên dung tích chai bằng 500 ml là đủ, vì mỗi loài chỉ yêu cầu nuôi cấy tối đa là 100 ml.

Trong một số trường hợp, thể tích đủ lớn là cần thiết, ví dụ:

- Đối với phân tích nước đóng chai (250 ml cho từng thông số);
- Đối với *Legionella* spp. hoặc *Salmonella* spp. (đến một lít).
- Đối với virus, kén *Giardia*, nang trứng *Cryptosporidium*, Amip trong nước sạch, kiểm tra từ 10 đến vài trăm lít hoặc nhiều hơn nữa. Thông thường, bước làm giàu được tiến hành tại chỗ bằng cách sử dụng cái lọc và sau đó được chuyển đến phòng thí nghiệm.

Chai có thể làm bằng thủy tinh hoặc nhựa khác nhau (polypropylen, polystyren, polyetylen, polycarbonat). Chai thủy tinh thường được ưu tiên dùng nhiều hơn để sử dụng lại, và polyetylen được dùng như làm chai dùng một lần.

Váng bề mặt có thể làm thấp ngưỡng phát hiện vi sinh vật, và sức căng bề mặt tiếp xúc tới hạn phải được xem xét nếu sử dụng vật liệu không tiêu chuẩn [13].

Nút chai có thể là thủy tinh nhám hoặc nút nhựa cho chai thủy tinh, nắp nhựa ấn cho chai nhựa, hoặc nắp nhựa hoặc nắp kim loại cho cả chai nhựa và chai thủy tinh. Chai đã mở nút nhựa hoặc nút thủy tinh phải được bảo vệ để khỏi bị nhiễm bẩn ví dụ bằng giấy nhôm.

Khi cần thể tích lớn để thử ví dụ virus, *Samonella* spp., amip, nang trứng *Cryptosporidium*, kén *Giardia*, đôi khi cần phải phân tích vài chục hoặc vài trăm lít. Để tránh khó khăn về xử lý, làm lạnh và khuấy nhưng thể tích lớn như vậy, bước làm giàu tại chỗ (bằng cách tạo bông, ly tâm hoặc lọc) được khuyến nghị. Bơm tĩnh có thể dùng với hệ thống ống vô khuẩn.

CHÚ THÍCH 1: Nắp kim loại, đặc biệt là nhôm có thể tạo chất độc khi khử khuẩn bằng nồi hấp. Có thể khắc phục hiện tượng này bằng cách kết hợp một lớp lót chống rò rỉ chịu nhiệt.

CHÚ THÍCH 2: Một số kim loại có thể cho sản phẩm độc khi khử khuẩn bằng nhiệt, thậm chí trong lò sấy, hoặc làm giảm pH.

CHÚ THÍCH 3: Một số chủng loại bông được dùng làm nút cho các bình thủy tinh có thể trở thành chất độc nếu chúng được làm nóng trong thời gian quá dài và nhiệt độ quá cao.

CHÚ THÍCH 4: Nắp nhựa ấn kèm với chai có một vài ưu điểm là chúng chống rò rỉ như nút vặn, và các nút có thể giữ được ở vị trí mở, tạo thuận lợi khi nạp và lắp ống. Khi mở, nút vẫn còn nối với chai, do vậy chai và nút được giữ cùng nhau, và nút cũng được bảo vệ tránh nhiễm bẩn.

4.2.2 Khử khuẩn chai

Nếu dùng lại, làm sạch chai thủy tinh và các nút của chúng bằng chất tẩy rửa không độc, không có phospho, sau đó tráng kỹ bằng nước cất hoặc nước đã loại ion.

Khử khuẩn chai trong nồi hấp tại $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ trong ít nhất 15 min. Giữ nút của chai lỏng không vặn chặt, để hơi thể chỗ tất cả không khí khi nhiệt độ tăng, và để tránh hiện tượng chai nhựa bị đổ khi làm mát. Vặn chặt nút sau khi khử khuẩn. Khử khuẩn bằng nồi hấp. Nút thủy tinh riêng rẽ với chai, hoặc dùng giấy hoặc giấy nhôm để ngăn ngừa các nút bị kẹt chặt khi làm nguội.

TCVN 8880:2011

Nếu cần, khử khuẩn chai trong lò sấy ít nhất 1 h tại (170 ± 10) °C. Tách riêng nút thủy tinh nhám với cổ chai bằng dải giấy hoặc mảnh giấy để tránh dính chặt khi làm mát. Chai phải truy tìm được ngày khử khuẩn.

Kiểm soát hiệu quả của quá trình khử khuẩn bằng chỉ thị hóa học hoặc sinh học.

Nếu không thể thực hiện khử khuẩn bằng bất kỳ phương pháp nào khác, khử khuẩn bằng cách nhúng chai mở trong nước sôi ít nhất 30 min. Ngay sau khi nhúng nước sôi, đổ hết nước trong chai và đậy nắp bằng nút đã nhúng vào nước sôi và bọc bằng giấy sạch.

CHÚ THÍCH 1: Chai polyetylen có thể được khử khuẩn bằng cách tiếp xúc với khí oxit etylen. Nhưng do tính độc của oxit etylen nên quy trình này được tiến hành trong thiết bị chuyên dụng và với thời gian đủ để giải hấp oxit etylen. Do vậy, không sử dụng làm quy trình thường nhật phòng thí nghiệm.

CHÚ THÍCH 2: Phơi xạ với tia gamma được tạo ra do nguồn ^{60}Co hoặc ^{137}Cs hoặc electron hoạt hóa năng lượng đủ (1×10^4 Gy đến 2×10^4 Gy) là kỹ thuật khử khuẩn rất hiệu quả, có sẵn trong thiết bị chuyên dụng. Không có hoạt độ chống vi khuẩn còn dư nhưng một số vật liệu có thể thay thế bằng cách polyme hóa sau khi chiếu xạ lại.

4.2.3 Khử hoạt tính của chất khử khuẩn

Để đánh giá chất lượng vi sinh vật của nước đã khử khuẩn bằng chất oxy hóa (ví dụ clo, cloramin, bromin hoặc ozon), dừng hoạt động của chất oxy hóa ngay khi lấy mẫu. Thêm tác nhân khử như natri thiosunphat vào chai mẫu.

Khối lượng natri thiosunphat (ngậm năm phân tử nước) theo lý thuyết cần để khử hoạt tính 1 mg clo là 7,1 mg. Do vậy, cứ 100 ml dung tích chai, cho thêm 0,1 ml dung dịch natri thiosunphat ngậm 5 phân tử nước (4.3.1.2). Cách này sẽ khử hoạt tính ít nhất 2 mg/l và đến 5 mg/l clo tự do còn dư cách này đủ khử cho phần lớn các mẫu nước, tùy thuộc vào động lực khử hoạt tính.

Trong một số trường hợp, như nước rửa chân trước khi vào bể bơi, biện pháp khử khuẩn (ví dụ diệt tận gốc *Legionella* trong hệ thống phân phối nước uống), có thể có nồng độ clo cao hơn và sẽ cần liều natri thiosunphat tương ứng cao hơn.

Natri thiosunphat không bị phá hủy trong nồi hấp hoặc sấy khô. Đảm bảo rằng pH của dung dịch natri thiosunphat là trung tính (pH thấp có thể gây phân hủy).

Natri thiosunphat không có ảnh hưởng lên mẫu và cũng có thể được dùng cho nước không được clo hóa.

CHÚ THÍCH: *Legionella* miễn cảm với natri và kali thiosunphat thường được dùng, nhưng phát hiện thấy những ảnh hưởng bất lợi của natri tại nồng độ được dùng để khử hoạt tính nồng độ clo thông thường.

Đối với một số chất khử khuẩn khác, cần tiến hành các biện pháp khử hoạt tính tương ứng. Nếu khử hoạt tính không thể thực hiện hoặc không khả thi, cần phải báo cáo.

Chất tạo chelat được khuyến nghị để bảo vệ vi khuẩn khỏi tính độc của kim loại nặng như đồng hoặc kẽm. Axit etylen dinitrilotetraaxetic (EDTA) hoặc natri nitrilotriaxetat (NTA) ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_6$) có thể được dùng làm dung dịch khử khuẩn-lọc tại nồng độ cuối cùng khoảng 50 mg trên lít nhưng chỉ dùng khi cần

(ví dụ nước đã xử lý bạc hoặc đồng). Bạc cũng có thể khử hoạt tính bằng natri sunfua. Thêm 1 ml dung dịch natri sunfua (4.3.1.3) vào một lít mẫu.

4.2.4 Kiểm soát chất lượng chai chứa mẫu

4.2.4.1 Thử khử khuẩn

Phòng thí nghiệm phải đảm bảo tính vô khuẩn của chai chứa mẫu, được tự chuẩn bị hoặc là sản phẩm thương mại, được làm bằng thủy tinh hoặc nhựa. Chai là sản phẩm thương mại cần phải có chứng nhận về sự khử khuẩn giống như một điều kiện có thể chấp nhận, và phép thử về tính vô khuẩn cũng được tiến hành trên các lô khi sử dụng. Điều này liên quan đến lô chai sau khi dán nhãn, bổ sung các chất khử hoạt tính khi phù hợp, và bảo quản.

Tính vô khuẩn của chai có thể thường xuyên được đảm bảo bằng kiểm soát quá trình khử khuẩn. Nếu không, tính vô khuẩn của các chai chứa mẫu phải được thử.

VÍ DỤ: Các ví dụ về quy trình thử sau đây (thường tiến hành với tỉ lệ một trên 100 chai):

a) Phương pháp lăn chai

Phương pháp này gồm cho 20 ml hoặc 50 ml thạch dinh dưỡng nóng chảy vào chai thử và láng thành chai với thạch bằng cách lăn chai trong khi làm mát (dưới điều kiện dòng nước nhỏ chảy qua nếu cần). Ủ tại $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ trong 5 ngày không thấy sự phát triển của khuẩn lạc.

b) Phương pháp môi trường nuôi cấy lỏng

Phương pháp này gồm lấy 20 ml đến 50 ml thioglycollat hoặc chất dinh dưỡng nuôi cấy khác vào trong chai, lăn chai để ướt hết thành chai và ủ ở $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ trong năm ngày. Không thấy đục nếu quá trình khử khuẩn là hoàn tất.

4.2.4.2 Thử các chất khử hoạt tính

Sự có mặt thiosunphat có thể được kiểm tra bằng phương pháp chuẩn độ iod:



Thêm 10 ml nước cất vào chai và chuẩn độ bằng dung dịch iod (4.3.1.4), sử dụng hồ tinh bột hoặc thiophen làm chất chuẩn độ điểm cuối.

4.2.4.3 Kiểm tra các độc tố còn dư trong chai mẫu

Độc tố còn dư trong chai chứa mẫu có thể là do quy trình rửa, do các thành phần tạo ra hoặc thêm vào chai nhựa và cũng do quá trình khử khuẩn. Sử dụng chai thủy tinh hoặc polyetylen hàng ngày không đòi hỏi kiểm tra thường xuyên đối với chất độc, nhưng nếu có bất kỳ sự nghi ngờ nào thì kiểm tra theo Geldreich, 1975 [8] (ví dụ).

4.3 Thuốc thử, thiết bị và vật liệu

4.3.1 Thuốc thử

4.3.1.1 Etanol, phần thể tích (C_2H_5OH) = 70 %, isopropanol, phần thể tích $[(CH_3)_2CHOH]$ = 70 %, hoặc dung dịch hypoclorit, $\rho(ClO^-) \approx 1$ g/l.

4.3.1.2 Dung dịch natri thiosunphat ngậm 5 phân tử nước, $\rho(Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O) = 18$ mg/ml.

4.3.1.3 Dung dịch natri sunfua, $\rho(Na_2S) = 0,1$ mg/ml.

4.3.1.4 Dung dịch iod $c(I_2) = 0,05$ mol/l.

4.3.2 Thiết bị và vật liệu

Ngoài các bình chứa mẫu, các thiết bị và vật liệu sau có thể cần thiết

4.3.2.1 Xà phòng và khăn

4.3.2.2 Đèn thổi khí và bình tái nạp

4.3.2.3 Bình hoặc cốc, khăn vô trùng

4.3.2.4 Bật lửa, diêm

4.3.2.5 Bút đánh dấu, bút chì, nhãn

4.3.2.6 Dao, kim, cờ lê, tuốcnovit

4.3.2.7 Hộp đựng đá và đá hoặc tấm đá, hộp lạnh xách tay hoặc khoang tủ lạnh trong xe.

4.3.2.8 Nhiệt kế hoặc thiết bị ghi nhiệt độ

4.3.2.9 Khung đựng chai hoặc dụng cụ tương đương, có dây hoặc khâu chuỗi (tốt hơn nên bằng thép không gỉ, ít nhất là ở phần đáy).

4.3.2.10 Sào hoặc kẹp dài hoặc dụng cụ lấy mẫu phù hợp với độ sâu khác nhau.

4.3.2.11 Bàn đồ, danh sách điểm lấy mẫu, phiếu lấy mẫu

4.3.2.12 Xe và giấy tờ, thẻ cho phép

4.3.2.13 Ủng chịu nước (an toàn)

4.3.2.14 Thiết bị đo pH, clo, oxy hòa tan, độ dẫn điện

4.3.2.15 Găng tay vô khuẩn.

4.4 Quy trình nạp mẫu

4.4.1 Nước có thể uống từ vòi

4.4.1.1 Khái quát

Lấy mẫu tại vòi có thể có các mục đích khác nhau:

- Để xác định chất lượng nước trong hệ thống phân phối chính (hệ thống chịu trách nhiệm của nhà phân phối);
- Để biết chất lượng nước khi nước chảy trực tiếp từ vòi được tiêu thụ – lấy từ vòi nước – (có thể thay đổi do mạng cấp nước trong tòa nhà);
- Để biết chất lượng nước khi được tiêu thụ, nghĩa là lúc nước chảy khỏi vòi (có thể bị nhiễm bẩn).

Mẫu để đánh giá chất lượng trong hệ thống [trường hợp a)] lấy tốt nhất tại vòi đặc biệt (cũng trong hệ thống phân phối) gần với ống phân phối chính, sạch, không có phụ kiện và có thể khử khuẩn bằng ngọn lửa hoặc các thiết bị phù hợp.

Vòi thông thường có thể được dùng để đánh giá chất lượng nước trong hệ thống [vẫn trường hợp a)], nếu chúng được khử khuẩn bằng ngọn lửa nhưng trong trường hợp kết quả không rõ ràng, xem xét mạng cung cấp nước như là một nguồn nhiễm bẩn tiềm ẩn.

Trường hợp mô tả ở b) là phương pháp chọn để đánh giá chất lượng nước uống kể cả ảnh hưởng của mạng cung cấp nước bên trong tòa nhà. Trong trường hợp này, khử khuẩn vòi bằng ngọn lửa là không có giá trị và phương pháp khử khuẩn khác [áp dụng dung dịch hypoclorit, etanol hoặc izopropanol (4.3.1.1)] cần được cân nhắc.

Tình huống được mô tả trong trường hợp c) là phương pháp để đánh giá chất lượng nước uống trong tình huống đặc biệt, ví dụ bị vỡ ống.

Tùy thuộc vào mục đích, cần hoặc không đúng để

- Thay thế thiết bị kèm theo;
- Khử khuẩn vòi;
- Xả nước (xem Bảng 1).

Bảng 1 – Lấy mẫu tại vòi cho các mục đích khác nhau

Mục đích (xem ở trên)	Loại nước	Loại bỏ thiết bị phụ trợ	Khử khuẩn	Xả nước
a)	Trong hệ thống phân phối chính	Có	Có	Có
b)	Khi được phân phối đến vòi	Có	Có	Không ^a (tối thiểu)
c)	Khi được tiêu thụ	không	không	Không

^a Xả nước chỉ khắc phục ảnh hưởng của khử khuẩn vòi.

TCVN 8880:2011

Lấy mẫu từ các bể chứa nước uống thường được lấy từ vòi ở lối ra. Mẫu dưới bề mặt đôi khi được lấy từ bể của nó, trong trường hợp này yêu cầu chai được khử khuẩn cả thành trong và thành ngoài của chai (xem 4.2.1).

Đảm bảo mẫu được lấy một cách vô khuẩn với tay sạch hoặc găng vô khuẩn để bảo vệ mẫu khỏi bị bọt khí và bắn tóe.

Trong quá trình nạp, bên trong chai không bị tiếp xúc với bất cứ vật gì (ngón tay, túi, răng, nền).

Đề lại một ít khoảng không trong chai đủ để có thể lắc chai trước khi phân tích.

Đậy nắp chai ngay lập tức. Không sử dụng mẫu nước này để đo nhiệt độ hoặc bất kỳ một thông số thử khác ngay tại chỗ.

Chi tiết, xem TCVN 6663-5 (ISO 5667-5).

4.4.1.2 Nước trong trạm xử lý và bể chứa

Trong trạm xử lý nước hoặc bể chứa, vòi dùng để lấy mẫu phải được cung cấp cho từng lối ra chính và các điểm lấy mẫu khác. Các vòi này phải có khả năng được khử khuẩn bằng ngọn lửa, duy trì trong tình trạng sạch, dán nhãn sạch và được dành riêng để lấy mẫu, xem TCVN 6663-5 (ISO 5667-5) và TCVN 6663 -13 (ISO 5667-13).

Đốt vòi kim loại bằng đèn xì hàn đảm bảo sự khử khuẩn miệng vòi nếu nhiệt độ đạt tới 80 °C hoặc cao hơn. Phương pháp này không dùng được trong trường hợp nếu nước vẫn còn trong phần được làm nóng.

CHÚ THÍCH: Bật lửa chỉ khử khuẩn được ở bên ngoài (không đủ).

4.4.1.3 Nước trong đường phân phối chính

Để xác định chất lượng trong đường phân phối chính, lấy mẫu trong đường phân phối chính hoặc gần với nó (thường chỉ sau đồng hồ nước). Đảm bảo không bị nhiễm bẩn từ mặt ngoài của vòi chạm tới mẫu. Không lấy mẫu vòi rò rỉ và tránh vòi trộn, nếu có thể. Tháo bất kỳ miệng của vòi hoặc các thiết bị kèm theo hoặc vật chèn (cờ lê và kim phải có sẵn). Khử khuẩn bằng ngọn lửa là tốt nhất (sau khi đốt và mở vòi, có thể có tiếng xèo xèo). Tiếp theo, mở vòi đến nửa vòi và xả đến khi đạt được nhiệt độ nước không đổi (để không còn nước cũ trong hệ thống ống của tòa nhà). Sau đó đặt chai mở dưới dòng nước và nạp đầy trong điều kiện vô khuẩn.

Nếu không thể dùng ngọn lửa, khử khuẩn vòi bằng phương pháp phù hợp khác. Để khử khuẩn miệng của vòi nhựa, sau khi làm sạch kỹ, ngâm chúng từ 2 min đến 3 min trong cốc dung dịch hypoclorit, etanol hoặc izopropanol (4.3.1.1). Cách khác, dùng gạc hoặc dụng cụ tương tự để khử khuẩn mặt ngoài và mặt trong nếu có thể.

Sau đó, để nước chảy đủ thời gian cần thiết để giảm ảnh hưởng của mạng lưới bên trong tòa nhà. Cần phải biết chi tiết của tòa nhà (thể tích bể hoặc thiết bị làm mềm nước cứng và thời gian lưu) để xác định thời gian xả trước khi lấy mẫu. Dùng sự ổn định của nhiệt độ để đạt hiệu ứng cho cùng mục đích.

Nhiều loài vi sinh vật thủy sinh có trong nước là do phá vỡ màng sinh học và sự lơ lửng trở lại của các cặn lắng từ khớp nối hoặc khuỷu ống trong trường hợp dòng cực đại và rung chuyển áp suất. Để giảm thiểu các hiệu ứng này, mở vòi với dòng tối đa từ 5 s đến 10 s, sau đó giảm xuống một nửa trong thời gian yêu cầu, và đặt chai dưới vòi đang chảy và không đóng và mở lại vòi.

4.4.1.4 Nước được phân phối đến vòi tiêu thụ

Để xác định chất lượng nước được phân phối đến vòi tiêu thụ, đảm bảo rằng mẫu không bị nhiễm bẩn từ bề mặt phía ngoài của vòi chạm vào mẫu. Cạo hết mọi cặn bẩn (lớp gỉ, chất nhờn, dầu hoặc các chất khác) có thể làm rơi ra trước khi nạp đầy chai. Không lấy mẫu vòi có rò rỉ. Thay thế vòi mũi hoặc các thiết bị kèm theo hoặc (cờ lê và sợi phải có sẵn). Khử khuẩn vòi tốt nhất bằng ngọn lửa hoặc, nếu không thể, bằng các phương pháp phù hợp khác (xem ở trên). Cuối cùng, để nước chảy trong thời gian đủ để đảm bảo rằng mẫu không có ảnh hưởng do nhiệt còn dư hoặc ảnh hưởng khử khuẩn. Đặt chai dưới vòi không đóng và mở lại vòi.

4.4.1.5 Nước khi được tiêu thụ

Để xác định chất lượng nước khi nước được tiêu thụ (ví dụ trong các tình huống vỡ ống), cần phải xem xét đến sự nhiễm bẩn do vi khuẩn từ phía ngoài của vòi và từ bất kỳ thiết bị phụ trợ gắn kèm. Do vậy, thiết bị gắn kèm phải được giữ đúng vị trí và vòi không cần phải khử khuẩn trước khi lấy mẫu.

4.4.2 Nước phun từ giếng và nước

Phân tích nước giếng có thể có những mục đích khác nhau:

- 1) Để biết chất lượng nước ngầm;
- 2) Để biết chất lượng nước giếng;
- 3) Để biết chất lượng nước nếu được dùng.

Tùy thuộc vào mục đích, cần phải chọn các kiểu lấy mẫu khác nhau, nếu có sự khác nhau giữa giếng khoan hoặc giếng đào mà bơm được lắp đặt cố định và giếng khoan hoặc giếng đào không lắp đặt bơm cố định. Bảng 2 và Bảng 3 đưa ra khái quát về kiểu phương pháp lấy mẫu được chọn tùy thuộc vào mục đích của giếng có hoặc không lắp đặt bơm cố định.

Bảng 2 – Lấy mẫu nước giếng cho các mục đích khác nhau trong các giếng có thiết bị bơm được lắp đặt vĩnh viễn và vòi hoặc đầu ra kim loại

Mục đích	Loại nước	Bơm	Khử khuẩn vòi
1	Nước ngầm	Có (mở rộng)	Có
2	Nước giếng	Không (tối thiểu)	Có
3	Nước khi được tiêu thụ	Không	Không

Bảng 3 – Lấy mẫu nước giếng cho các mục đích khác nhau trong các giếng mà không có thiết bị bơm lắp đặt cố định

Mục đích	Loại nước	Bơm nhúng (làm sạch)	Có khử khuẩn bên trong và bên ngoài chai	Từ thùng, xô
1	Nước ngầm	+ ^a	-	-
2	Nước giếng	+ ^a	+	-
3	Nước tiêu thụ	-	-	+

^a Sau khi bơm tăng cường
^b Chỉ bơm tối thiểu

Giếng khoan hoặc giếng đào có lắp đặt bơm cố định, thường có vòi kim loại. Tùy thuộc vào mục đích lấy mẫu, bơm tăng cường có thể cần hoặc không, và khử khuẩn vòi bằng ngọn lửa, cần hoặc không, xem Bảng 2.

Bơm tăng cường cho mục đích 1 nghĩa là bơm phải đến khi nhiệt độ nước và đạt được độ dẫn điện không đổi hoặc ít nhất ba lần nước được nạp mới trở lại. Đối với mục đích 2 (để biết chất lượng của nước giếng) chỉ cần thay đổi nước ít, để khắc phục ảnh hưởng của sự khử khuẩn vòi. Đối với mục đích 3, không cần bơm hoặc khử khuẩn vòi.

Giếng khoan hoặc giếng đào không lắp đặt bơm cố định (Bảng 3) được lấy mẫu với bơm chìm dưới nước cho mục đích 1. Bơm này chỉ được dùng cho nước sạch và bơm tăng cường lần nữa (xem ở trên) cần phải được đảm bảo. Đối với mục đích 2, nên dùng thiết bị lấy mẫu vô trùng kể cả vật dẫn. Cách khác, bơm chìm cũng có thể dùng chỉ sau khi bơm tối thiểu trước. Đối với mục đích 3, khi người tiêu thụ sử dụng nước từ giếng khoan hoặc giếng đào không có thiết bị bơm, trong một số trường hợp, ví dụ như bằng xô thùng, v.v... nạp nước từ thùng/xô vào chai lấy mẫu vô trùng.

4.4.3 Nước bề bơi

Để lấy mẫu ("sau") lọc hoặc lấy trên đường ống cung cấp nước bề bơi, phải có sẵn vòi lấy mẫu dành riêng, sát ống để tránh lấy phải nước ứ đọng. Nạp vào chai theo đúng cách như đối với lấy mẫu vô trùng trong đường ống phân phối chính (4.4.1.3).

Đối với lấy mẫu dòng nước chảy vào bể bơi (sau khi lọc, xử lý và bỏ sung clo) lấy mẫu tại khoảng cách từ điểm bơm, khi lượng chất khử khuẩn còn dư vẫn ổn định.

Khảo sát thông thường nước bề bơi liên quan đến lấy mẫu dưới bề mặt (-10 cm đến -30 cm), sử dụng sào lấy mẫu, đối diện với lối vào. Sử dụng chai sạch, vô khuẩn. Nếu không có dòng nước chảy thẳng, chú ý để chọn các điểm lấy mẫu phù hợp hơn và điểm lấy mẫu đại diện. Chai được đưa vào theo chiều ngang để tránh mất thiosunphat, sau đó để thẳng cho đến khi đủ lượng nước lấy.

CHÚ THÍCH: Trên bề mặt nước bề bơi, trong điều kiện tĩnh, hình thành nên lớp vi sinh có sự tích tụ của các loài vi sinh vật như *staphylococci* lớp vảy/da nổi. Trong một số bể bơi, nhiễm bẩn nước trên bề mặt cũng có thể được đánh giá bằng lấy mẫu nước trào ở rãnh thoát nước bên ngoài phạm vi bể.

4.4.4 Nước mặt

4.4.4.1 Nước

Nước (hồ, sông, ven biển) thường được phân loại sau một loạt đo, qua một mùa. Điểm lấy mẫu phải được xác định chặt chẽ.

Điểm lấy mẫu phải đại diện cho chất lượng nước tại địa điểm được dùng cho mục đích chủ yếu là tắm, hoặc nơi ô nhiễm được dự kiến, tùy thuộc vào mục đích lấy mẫu.

Lấy mẫu dưới lớp mặt (-20 cm đến -30 cm) trong cột nước sâu 1 m đến 1,5 m. Đưa chai úp xuống vào nước tới độ sâu lấy mẫu. Tiếp sau, nẹp chai bằng cách quay về một phía và hướng lên để tránh nhiễm bẩn. Nếu có dòng chảy, giữ chai ngược dòng.

Tại một số bãi tắm, cột nước 1 m không đạt được và mẫu cần được lấy tại độ sâu nông hơn. Cần hết sức chú ý đến hiệu ứng tạo huyền phù lại.

CHÚ THÍCH: Một trong những nguồn chính thay đổi chất lượng nước bãi biển là tạo huyền phù lại của vi khuẩn hấp phụ trên đất sét hoặc bùn hữu cơ. Cát bờ biển có trong vùng thủy động không hấp phụ nhiều chất nhiễm bẩn. nguyên nhân tạo huyền phù do tự nhiên và con người có thể làm tăng rủi ro vệ sinh và cần phải xem xét, ví dụ, thủy triều, bão, bơi thuyền. Nhưng lấy mẫu hồng có thể có các tác động giống nhau (ví dụ lấy mẫu quá gần đáy, khuấy trầm tích đáy, di chuyển thuyền).

4.4.4.2 Biển, hồ, sông: từ thuyền

Biến động theo mùa và sự phân tầng theo chiều thẳng đứng của hồ và nước biển và pha trộn nước sông cần phải xem xét khi lựa chọn địa điểm lấy mẫu chính xác.

Có nhiều thiết bị để lấy dưới bề mặt hoặc mẫu sâu ngoài khơi, nhưng chai dùng để nghiên cứu hóa học hĩa dương học được dùng cho hóa chất (Chai Go-Flow, Nansen hoặc Van Doorn[12]) không khử khuẩn và không phù hợp.

Hệ thống J-Z [12] gồm chai thủy tinh vô khuẩn, trong điều kiện chân không. Nó lắp vừa với nút cao su và ống thủy tinh, gắn kín và uốn cong sao cho gần với dây xích. Khi chai ở tại độ sâu mong muốn, thông tin được gửi đến dây xích/dây chèo, làm vỡ ống và chai được nẹp mẫu. Cũng có thể đặt trên chai Nansen.

Hệ thống xy lanh và các kỹ thuật khác cũng được sử dụng, phần lớn các kỹ thuật phức tạp nhất duy trì mẫu nước tại áp suất tại chỗ, để nghiên cứu vi khuẩn ưa áp suất.

Khi sử dụng những thiết bị như vậy, hoặc một pole trong vùng nước nông, giữ không làm xáo trộn trầm tích do vận hành, thả neo,... tới mức tối thiểu.

TCVN 8880:2011

Lấy mẫu từ thuyền, lấy mẫu từ phía mạn khuất gió của tàu, không lấy mẫu phía có gió thổi. Lấy mẫu từ thuyền thả neo hoặc từ thuyền có tàu dẫn, lấy từ đầu mũi của thuyền.

Phải giảm thiểu mọi khả năng nhiễm bẩn do dây xích nối dụng cụ vô khuẩn, ví dụ sử dụng dây hoặc mắt xích tại cuối chuỗi làm bằng thép không gỉ.

4.4.5 Nước thải

Sử dụng găng dùng một lần hoặc kẹp vô khuẩn để lấy mẫu dưới bề mặt, để giảm thiểu rủi ro nhiễm khuẩn cho nhân viên lấy mẫu. Loại bỏ bụi bẩn khỏi bề mặt đầu ra của chai và hoặc đặt chúng trong túi sạch và vận chuyển riêng chúng với mẫu nước uống. Quy trình (thiết bị lấy mẫu) nêu trong 4.4.4.2 (biển, hồ, sông) có thể áp dụng.

4.4.6 Lấy mẫu loài vi sinh vật mặt

Lấy mẫu màng sinh học bằng nạo/vét bề mặt dùng xẻng/bay vô khuẩn, dao hay miếng gạt. Cho mẫu màng sinh học vào trong bình chứa mẫu vô khuẩn và phân tích sau khi đã đồng nhất.

CHÚ THÍCH: Sắp xếp theo không gian của loài vi sinh vật sẽ bị phá hủy bằng quy trình lấy mẫu định tính này.

Vi khuẩn gây ăn mòn được tìm trong trầm tích lấy được từ mẫu lỏng qua lọc, gạn hoặc ly tâm. Hạt kim loại bị ăn mòn có thể thu được bằng cạo hoặc tạo ra “búa nước” (thay đổi đột ngột áp suất của đường ống nước).

Vi khuẩn khử sunphat đôi khi có thể tìm thấy trong nước, nhưng vai trò của chúng trong sự ăn mòn kim loại đã được chứng minh rất rõ bằng cách đặt miếng bông gạt bên trong đường ống còn ẩm, hơn là chỉ lấy mẫu nước.

4.5 Phiếu lấy mẫu

Nhận dạng đầy đủ và dán nhãn cho chai, và điền chúng vào phiếu lấy mẫu (nhật ký lấy mẫu) trước, hoặc ngay sau khi lấy mẫu.

Phiếu lấy mẫu ít nhất phải có tên và địa chỉ của khách hàng, bản danh sách các thông số phân tích, ngày, thời gian và địa điểm lấy mẫu cũng như tên của người lấy mẫu. Nguồn gốc của mẫu và mục đích của phân tích cũng là cần thiết vì chúng giúp cho việc lựa chọn phương pháp. Chi tiết khác có thể cần cho việc diễn giải đúng kết quả (ví dụ nhiệt độ, bioxit, điểm lấy mẫu thêm và quan sát hoặc hiện tượng có thể ảnh hưởng đến chất lượng vi sinh vật của mẫu nước).

5 Vận chuyển và bảo quản

5.1 Vận chuyển

Thời gian từ khi lấy mẫu đến khi phân tích phòng thí nghiệm càng ngắn càng tốt. Đối với nước uống, phân tích tốt nhất là bắt đầu trong cùng ngày làm việc.

Làm mát mẫu – tốt nhất (5 ± 3) °C trong quá trình vận chuyển (ví dụ dùng hộp đá hoặc đá chày) nếu không có những quy định khác trong tiêu chuẩn cụ thể. Chú ý không làm đóng băng mẫu (ngoại trừ mẫu kiểm tra virus). Bảo vệ mẫu khỏi ánh nắng chiếu vào.

Đối với những mẫu có thời gian vận chuyển trên 8 h, cần phải theo dõi và ghi lại nhiệt độ.

Điều kiện vận chuyển phải được ghi lại.

Tuy nhiên cần chú ý:

- Không đặt hộp đá tiếp xúc trực tiếp với mẫu, vì chúng gây ra hiện tượng đóng băng mẫu [10].
- Điều chỉnh số lượng, thể tích và vị trí của hộp chứa đá theo số lượng, khối lượng và nhiệt độ ban đầu của mẫu [9].

Ghi chép đầy đủ quy trình yêu cầu đối với thời gian vận chuyển dài hơn (> 8 h).

Mẫu lạnh và ấm phải được vận chuyển riêng biệt.

Hướng dẫn về vận chuyển và bảo quản mẫu nước để phân tích hóa-lý, phóng xạ và sinh học, xem TCVN 6663 -3 (ISO 5667-3).

Trong khoảng từ 0 °C đến 45 °C, phản ứng của vi khuẩn phụ thuộc vào nhiệt độ. Nếu hệ vi sinh vật nhân bản thì nhiệt độ càng cao nhân càng nhanh. Mặt khác, nếu chúng đang chết, phản ứng cũng được đẩy nhanh bằng cách làm nóng. Trong vi khuẩn học, Q_{10} thường được coi như bằng 2. Có nghĩa là nhiệt độ tăng 10 °C sẽ làm tăng tốc độ phân chia lên hệ số 2, cả quá trình nhân đôi và chết. Do vậy, điều quan trọng là làm mát mẫu trong quá trình vận chuyển, nhưng không làm đóng băng chúng, vì tạo thành đá có thể làm chết phần lớn tế bào (> 99 %). Mẫu chỉ dùng để phân tích virus, giữ mẫu ở - 70 °C nếu các chất làm lạnh phù hợp được bổ sung vào mẫu.

CHÚ THÍCH 1: Trong điều kiện tối ưu, một quá trình phân chia tế bào E.coli cần 20 min và kết quả là 1×10^9 tế bào sau đó. Tuy nhiên, nước chứa loài vi sinh vật khác và chất dinh dưỡng không đủ, nên sự nhân lên không xảy ra. Mặt khác, hệ vi thực vật có thể giảm nửa với thời gian ít hơn 20 min, hoạt động khử khuẩn của clo không có chất khử hoạt tính là vấn đề thứ hai.

CHÚ THÍCH 2: Phần lớn thí nghiệm được thực hiện về mẫu nước bảo quản để xét nghiệm vi khuẩn học cho thấy hiệu ứng có tốt khi giữ trong tủ lạnh dưới 10 °C. Khoảng nhiệt độ lý tưởng (5 ± 3) °C, có thể đạt được bằng cách đặt mẫu trong hộp đá (tốt nhất là đá nhân tạo). Nhưng, nhiệt độ hoàn toàn của mẫu nước không đạt (5 ± 3) °C ngay khi chai mẫu được đặt vào trong hộp đá. Khoảng thời gian cân bằng nhiệt độ trong hộp sẽ thay đổi do:

- Hộp đá (thể tích, đặc tính cách nhiệt);
- Nhiệt độ ngoài vỏ;
- Lượng mẫu nước và nhiệt độ ban đầu của chúng;
- Lượng đá.

TCVN 8880:2011

CHÚ THÍCH 3: Túi “đá nhân tạo” có thêm tác nhân làm mát hơn đá thường và sẽ không làm tan chảy, do vậy hạn chế được ảnh hưởng đến nhân dân, mực đánh dấu trở nên bị nhòe hoặc nhiễm bẩn mẫu. Do vậy chúng được ưa dùng hơn đá thật.

5.2 Thời gian trì hoãn

Thời gian trì hoãn từ khi lấy mẫu đến khi phân tích kể cả vận chuyển, đăng ký và quá trình trong phòng thí nghiệm.

Thời gian trì hoãn từ khi lấy mẫu đến khi phân tích có thể giảm độ tin cậy của kết quả. Sau đó, người lấy mẫu và người phân tích nên làm việc cùng nhau để giảm tối đa lượng mẫu phải phân tích trong ngày sau khi lấy mẫu. Thời gian trì hoãn phải càng ngắn càng tốt và phải được ghi lại trong báo cáo thử.

CHÚ THÍCH 1: Theo Tài liệu tham khảo [4], thời gian trì hoãn thường được nhắc đến là 8 h lấy tiêu biểu cho thời gian trì hoãn của một vòng hành trình giữa Phòng thí nghiệm sức khỏe cộng đồng Hoàng Gia Luân Đôn và các điểm xa nhất trong sông Thames, bằng xe ngựa trong thế kỷ trước. Mặc dù có những hiện đại hóa trong hệ thống vận chuyển, xu hướng hiện tại thường cho phép thời gian trì hoãn dài hơn. Trên thực tế, những quan sát thực nghiệm trái ngược nhau vẫn tồn tại trong các tài liệu.

CHÚ THÍCH 2: Trong nước đã khử khuẩn cũng như nước biển hoặc nước sông, tế bào vi khuẩn chỉ thị faecal đường như trong quá trình chết, tình trạng sinh lý yếu. Trong Tài liệu tham khảo [8], tác giả khuyến nghị thời gian trì hoãn tối đa là 8 h, theo nghiên cứu sớm nhất về các loại nước này.

CHÚ THÍCH 3: Đối với nước uống chưa xử lý hoặc nước phú dưỡng khác, thời gian trì hoãn dài hơn được đề xuất bởi một số tác giả. Tuy nhiên, tất cả những nhà vi sinh vật học và các sách chuyên ngành khuyến nghị phân tích mẫu càng sớm càng tốt, vì các nghiên cứu chính cho thấy những sự thay đổi đáng kể thậm chí trong cả tủ lạnh [5], [6], [7].

Bảng B.1 tóm tắt về những khuyến nghị cho thời gian trì hoãn tối đa được trích từ các tài liệu. Thời gian đã được đề cập là để thăm dò: chúng phụ thuộc vào loại nước, tình trạng sinh lý của loài vi sinh vật (ví dụ khử khuẩn hoặc không), và thậm chí cả phương pháp phân tích. Tuy nhiên, giá trị cho thời gian bảo quản mẫu tối đa kể cả thời gian vận chuyển và nhiệt độ trong các tiêu chuẩn cụ thể phải được tuân thủ.

Kết quả thu được vượt ngoài thời gian bảo quản được khuyến nghị cần phải có ghi chú nêu rõ kết quả thu được sau n giờ.

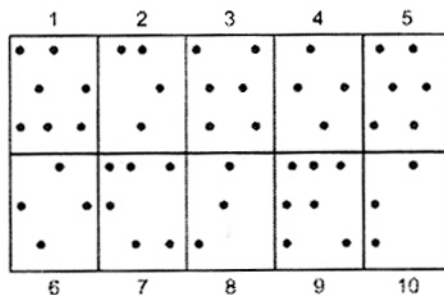
Phụ lục A

(tham khảo)

Xác định số lượng mẫu ưu tiên để xác định mật độ trung bình của vi khuẩn trong nước với mức tin cậy đã cho, cho xác định định lượng thu được bằng nuôi cấy vi sinh vật

A.1 Khái quát

Không có phần nào trong 10 phần mẫu thử 100 ml chứa mật độ trung bình theo lý thuyết là 5 vi sinh vật trên 100 ml.



Hình A.1 – Ví dụ về phân bố 50 vi sinh vật trong thể tích 1 l nước được trộn đều

Có thể chứng tỏ rằng dưới điều kiện lý tưởng về tính đồng nhất, sự phân phối của số lượng vi khuẩn xấp xỉ theo luật Poisson.

Đặc trưng bởi phương sai bằng với giá trị trung bình, định luật phân bố này thực sự được quan sát cho mật độ thấp (<12 khuẩn lạc trên thể tích phân tích), ví dụ Sallmonella hoặc E. coli trong nước uống.

Đối với nồng độ cao hơn (≥ 12 khuẩn lạc trên thể tích phân tích), phương sai s^2 thường lớn hơn giá trị dự kiến:

$$s^2 = K.m, \text{ trong đó } K > 1.$$

Sự phân bố thường quá phân tán hoặc dễ lan truyền; K được gọi là hệ số quá phân tán, m là trung bình số học.

A.2 Tính

Để tính số lượng mẫu phân tích, quy trình như sau:

- Chọn dung sai D trên kết quả: ví dụ $\pm 20\%$, $\pm 50\%$, thể hiện giá trị phần trăm theo thập phân (ví dụ $20\% = 0,02$);
- Nếu có thể, mức nồng độ của nước được phân tích, ước lượng trung bình dự kiến m trên phần mẫu thử;
- Nếu có thể, có giá trị lý thuyết của hệ số phân tán K sử dụng Bảng A.1;

TCVN 8880:2011

d) Xác định số lượng mẫu N từ Công thức sau:

$$N = \frac{K \cdot \chi_1^2}{m \cdot D^2}$$

Trong đó

N là số lượng mẫu;

χ^2 là giá trị phân bố Khi bình phương với một độ tự do (giá trị ý nghĩa ở mức 95 % là 3,84);

K là tỉ số giữa phương sai và giá trị trung bình, hệ số phân tán [14];

D là dung sai, biểu thị theo số thập phân của giá trị trung bình;

m là trung bình số học.

Bảng A.1 – Ước lượng hệ số phân tán K từ các loại nước và số lượng vi sinh vật dự đoán

Độ đục của nước	Nồng độ của vi sinh vật m (hạt tạo khuẩn lạc trên thể tích phân tích)			
	< 12	12 đến 30	30 đến 50	> 50
Nước sạch	$K = 1$	$K = 1,5$	$K = 3$	$K = 8$
Đục	$K = 1$	$K = 2$	$K = 4$	$K = 12$
Rất đục	$K = 1$	$K = 2$	$K = 5$	$K = 16$

A.3 Ví dụ

A.3.1 Ví dụ A.3.1

Ví dụ, nếu mục tiêu độ đúng là khoảng 20 % trung bình ước lượng là 5 khuẩn lạc trên thể tích mẫu phân tích, hệ số phân tán là $K=1$ (Bảng A.1), sau đó số mẫu N yêu cầu với mức tin cậy 95 % là:

$$N = \frac{3,84}{(0,2)^2 \times 5} = 19,2$$

Do vậy, số lượng mẫu $N = 19$ cần để xác định nồng độ vi sinh vật của mẫu nước chứa 5 khuẩn lạc trên thể tích phân tích, với dung sai ± 20 %.

Nếu chỉ lấy 5 mẫu, độ đúng tương đối sẽ không lớn hơn 40 %.

Nếu chỉ lấy 1 mẫu, rủi ro âm tính giả là 70 %.

A.3.2 Ví dụ A.3.2

Đối với nồng độ 30 khuẩn lạc trên thể tích phân tích, Bảng A.1 sẽ cho hệ số phân tán $K = 4$ (phương sai gấp bốn lần giá trị trung bình) đối với nước đục.

Tại mức tin cậy 95 % và dung sai 20 %, tính số lượng mẫu phân tích là:

$$N = \frac{4 \cdot 3,84}{(0,2)^2 \cdot 30} = 12,8$$

Do vậy, 13 mẫu sẽ phải phân tích để ước lượng nồng độ vi sinh vật, với 20 % dung sai và mức tin cậy 95 %, trong nước đục chứa 30 khuẩn lạc trên thể tích mẫu phân tích.

A.3.3 Ví dụ A.3.3

Nước mặt đục với nồng độ vi sinh vật dự kiến 15 khuẩn lạc trên thể tích phân tích K = 2 (Bảng A.1).

Đối với dung sai ± 20 %, số lượng mẫu phân tích là:

$$N = \frac{2 \cdot 3,84}{(0,2)^2 \cdot 15} = 13$$

Đối với dung sai ± 50 %, số lượng mẫu phân tích là:

$$N = \frac{2 \cdot 3,84}{(0,5)^2 \cdot 15} = 2$$

A.3.4 Ví dụ A.3.4

Dung sai phù hợp: ± 20 %

Độ đục của nước phân tích: nước sạch

Nồng độ vi sinh vật dự kiến: 20 khuẩn lạc trên thể tích phân tích;

K = 1,5 (từ Bảng A.1)

Số lượng mẫu phân tích là:

$$N = \frac{1,5 \cdot 3,84}{(0,2)^2 \cdot 20} = 7$$

Bảy mẫu được lấy để phân tích

Kết quả là : 13, 15, 7, 8, 19, 8, 13.

Sau đó

$$m = \frac{13 + 15 + 7 + 8 + 19 + 8 + 13}{7} = 11,9$$

(thấp hơn đáng kể so với dự kiến)

Và

$$s^2 = \frac{(13-11,9)^2 + (15-11,9)^2 + (7-11,9)^2 + (8-11,9)^2 + (19-11,9)^2 + (8-11,9)^2 + (13-11,9)^2}{7-1} = 19,5$$

$$K = \frac{19,5}{11,9} = 1,6$$

Số lượng mẫu phù hợp và có thể sử dụng cho nghiên cứu thêm.

Phụ lục B

(tham khảo)

Giá trị khuyến nghị (R) và giá trị chấp nhận được (A) đối với thời gian bảo quản mẫu tối đa kể cả thời gian vận chuyển và nhiệt độ ngoại trừ có các quy định khác trong các tiêu chuẩn cụ thể

Bảng B.1

	Thời gian bảo quản mẫu tối đa (h) bao gồm cả vận chuyển		Nhiệt độ bảo quản nước °C		Quan sát ^a
	R	A	R	A	
Khái quát Vi sinh vật nuôi cấy (22 °, 30 °C hoặc 36 °C)	8	12	5 ± 3		
Chỉ thị Faecal, vi khuẩn sinh dưỡng <i>E. coli</i> (và vi khuẩn coliform) Enterococci <i>Clostridium perfringens</i> (tế bào sinh dưỡng)	12 12 12	18 18 18	5 ± 3 5 ± 3 5 ± 3		
Bào tử Bào tử của vi khuẩn khử sulphit (<i>Clostridium</i> spp.)	24	72	5 ± 3		quan sát thấy chết trong nước thô sau 24 h
Virus Thể thực khuẩn	48	72	5 ± 3		
Mầm bệnh Faecal <i>Salmonella</i> spp. và loài khác Enterobacteriaceae Enterovirus Nang trứng <i>Cryptosporidium</i> <i>Giardia</i> cysts	12 48 1 tháng 24 24	18 72 96 96	5 ± 3 5 ± 3 -70 5 ± 3 5 ± 3	-20 Nhiệt độ xung quanh	
Các vi sinh vật khác Amoebae <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Legionella</i> spp. Cyanobacteria <i>Campylobacter</i> (<i>thermophilic</i> spp.) Tổng vi khuẩn cho chất phát huỳnh quang Trứng giun sán	24 8 24 48 24 48 1 năm	96 12 48 72 48 72 72 1 tuần	5 ± 3 Nhiệt độ xung quanh 5 ± 3 5 ± 3 5 ± 3 3 ± 2 Nhiệt độ xung quanh 5 ± 3 5 ± 3	5 ± 3 Nhiệt độ xung quanh	Xuất hiện giảm dần đôi khi trong vài giờ Nhạy với oxy Mẫu được ổn định trong lọ không có bụi + Formaldehyt (3 % nồng độ cuối cùng) trong tối Mẫu bền ở pH = 2

^a Xem Tài liệu tham khảo [1], [2], [4], [5], [6], [7], [8], [9], [11], và [15] trong Thư mục tài liệu tham khảo.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] LIGHTFOOT, N.F. and MAIER, E.A. Eds. *Microbiological analysis of food and water — Guidelines for quality assurance*. Elsevier, 1998
- [2] DELATTRE, J.M. and OGER, C. *Le prélèvement d'eau pour analyse microbiologique*. Monography, Institut Pasteur Lille (F), 1985
- [3] GARRETT, W.D. Collection of slick-forming materials from the sea surface. *Limnol. Oceanogr.*, **10**, 1965, pp. 602-605
- [4] STANDRIDGE, J.H. and LESAR, D.J. Comparison of four hour and twenty four hour refrigerated storage of non potable water for faecal coliform analysis. *Appl. and Env. Microbiol.*, **34** (4), 1977, pp. 398-402
- [5] MCDANIELS, A.E. and BORDNER, R.H. Effects of holding time and temperature on coliform numbers in drinking water. *JAWWA*, **75** (9), 1983, pp. 458-463
- [6] NASH, H.D. and GELDREICH, E.E. *Sample preservation: a progress report*. EPA/600/D-84-041, 1984
- [7] MCDANIELS, A.E. et al. Holding effects on coliform enumeration in drinking water samples. *Appl. and Env. Microbiol.*, **50** (4), 1985, pp. 755-762
- [8] GELDREICH, E.E. *Handbook for evaluating water bacteriological laboratories*. EPA 670/9-75/006, 1975
- [9] GOUDAERT, F. *Temperature of water samples in ice-boxes*. Institut Pasteur de Lille (F), 2000
- [10] ELLIOT, J.M. *Some methods for the statistical analysis of samples of benthic invertebrates*. Freshwater Biological Association Scientific Publication No. 25, Second Edition, Fourth Impression, 1993
- [11] Unpublished data from A.G.L.A.E. (French interlaboratory proficiency testing scheme), 2001
- [12] MC NEIL, SIEBURTH, J. *Sea microbes. Part II, Methodology*, Chapter 4, Sampling, 1979, pp. 71-97
- [13] DEXTER, S.C., SULLIVAN, J.D. Jr, WILLIAMS, J. and WATSON, S.W. Influence of substrate wettability on the attachment of marine bacteria to various surfaces. *Appl. Microbiol.*, **30**, 1975, pp. 298-308
- [14] MCCULLAGH, P. and NELDER, J.A. *Generalized Linear Models*. London, Chapman and Hall, 1983, (second edition), 1989
- [15] AFNOR T90D N427/AFNOR T90E N08. Travaux AFNOR Legionella, 2002
- [16] TCVN 5994 (ISO 5667-4), *Chất lượng nước — Lấy mẫu — Phần 4: Hướng dẫn lấy mẫu ở hồ ao tự nhiên và nhân tạo*

TCVN 8880:2011

- [17] TCVN 6663-5 (ISO 5667-5), *Chất lượng nước — Lấy mẫu — Phần 5: Hướng dẫn lấy mẫu nước uống từ các trạm xử lý và hệ thống phân phối bằng đường ống*
 - [18] TCVN 6663-6 (ISO 5667-6), *Chất lượng nước — Lấy mẫu — Phần 6: Hướng dẫn lấy mẫu ở sông và suối*
 - [19] TCVN 6663-7 (ISO 5667-7), *Chất lượng nước — Lấy mẫu — Phần 7: Hướng dẫn lấy mẫu nước và hơi nước tại xường nổi hơi*
 - [20] TCVN 5999 (ISO 5667-10), *Chất lượng nước — Lấy mẫu — Phần 10: Hướng dẫn lấy mẫu nước thải*
 - [21] TCVN 6000 (ISO 5667-11), *Chất lượng nước — Lấy mẫu — Phần 11: Hướng dẫn lấy mẫu nước ngầm*
 - [22] ISO 5667-12, *Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments*
 - [23] TCVN 5667-13 (ISO 5667-13), *Chất lượng nước — Lấy mẫu — Phần 13: Hướng dẫn lấy mẫu bùn nước, bùn nước thải và bùn liên quan*
 - [24] TCVN 6663-15 (ISO 5667-15), *Chất lượng nước — Lấy mẫu — Phần 15: Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu bùn và trầm tích*
-