

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6189 - 1 : 2009

ISO 7899 - 1 : 1998

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC –
PHÁT HIỆN VÀ ĐẾM KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT –
PHẦN 1 : PHƯƠNG PHÁP THU NHỎ (SỐ CÓ XÁC SUẤT
LỚN NHẤT) ĐỐI VỚI NƯỚC MẶT VÀ NƯỚC THẢI**

*Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci –
Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water*

HÀ NỘI 2009

Lời nói đầu

TCVN 6189 – 1 : 2009 thay thế TCVN 6189 – 1 : 1996.

TCVN 6189 – 1 : 2009 hoàn toàn tương đương với ISO 7899 – 1 : 1998/Cor 1 : 2000.

TCVN 6189 – 1 : 2009 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.

TCVN 6189 (ISO 7899) *Chất lượng nước – Phát hiện và đếm khuẩn đường ruột* gồm hai phần sau đây:

- TCVN 6189 – 1 : 2009 (ISO 7899 – 1 : 1998/Cor 1 : 2000) Phần 1: Phương pháp thu nhỏ (số có xác suất lớn nhất) đối với nước mặt và nước thải;
- TCVN 6189 – 2 : 2009 (ISO 7899 – 1 : 2000) Phần 2: Phương pháp lọc màng.

Lời giới thiệu

Mục đích của tiêu chuẩn này là để đếm số vi khuẩn đường ruột chính *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* và *E. hirae* thường xuất hiện trong phân người và động vật. Một số loài vi khuẩn *Enterococcus* như *E. avium*, *E. columbae* và *E. gallinarum* và đặc biệt chủng *Streptococcus bovis/equinus* có thể xuất hiện nhưng rất ít khi gặp trong mẫu môi trường. Độ phát hiện các vi khuẩn này là thấp. *Enterococcus casseliflavus* và *E. mundtii* là loài không có nguồn gốc từ phân nhưng khi xuất hiện trong mẫu nước (ví dụ do ảnh hưởng của vật liệu và một số loại nước thải công nghiệp) thì được đếm như vi khuẩn đường ruột có nguồn gốc từ phân. Các loài này và số ít các loài khác không có nguồn gốc từ phân có xu hướng sinh ra sắc tố màu vàng trên môi trường nuôi cấy không chọn lọc. Do vậy, phải xét đến cản trở của các loài *Enterococcus* không có nguồn gốc từ phân khi diễn giải kết quả.

Chất lượng nước – Phát hiện và đếm khuẩn đường ruột – Phần 1: Phương pháp thu nhỏ (số có xác suất lớn nhất) đối với nước mặt và nước thải

*Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci –
Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) for surface and waste water*

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp thu nhỏ để phát hiện và đếm khuẩn đường ruột chính trong nước mặt và nước thải bằng cách nuôi cấy trong môi trường lỏng. Phương pháp này có thể áp dụng cho tất cả các loại nước mặt và nước thải, đặc biệt là nước có chứa một lượng lớn các chất lơ lửng.

Phương pháp này không thích hợp cho nước uống và các loại nước có số đếm theo hướng dẫn nhỏ hơn 15 trên 100 ml.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau 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 5992 : 1995 (ISO 5667-2 : 1991¹⁾) Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu.

TCVN 6663-1 : 2002 (ISO 5667-1 : 1980²⁾) Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 1: Hướng dẫn lập chương trình lấy mẫu.

TCVN 6450 : 2007 (ISO/IEC Guide 2 : 2004) Tiêu chuẩn hoá và các hoạt động có liên quan – Thuật ngữ chung và định nghĩa;

TCVN 6663 – 3 : 2008 (ISO 5667-3 : 2003) Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 3: Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu;

¹⁾ ISO 5667-2 : 1991 đã bị hủy và được thay bằng ISO 5667-1 : 2006

²⁾ ISO 5667-1 đã có phiên bản năm 2006

TCVN 6189-1 : 2009

ISO 8199 : 1988³⁾ Water quality – General guide to the enumeration of microorganisms by culture (Chất lượng nước – Hướng dẫn chung để đếm vi sinh vật bằng nuôi cấy).

ISO 3951 : 1989 Sampling procedures and charts for inspection by variables for percent nonconforming (Quy trình lấy mẫu và biểu đồ để thanh tra dùng biến thiên theo phần trăm không phù hợp).

3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này, áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa trong TCVN 6450 (ISO/IEC Hướng dẫn 2) và các thuật ngữ sau:

3.1

Khuẩn đường ruột (Intestinal enterococci)

Vi khuẩn có khả năng phát triển hiếu khí ở 44 °C và thủy phân 4-metylbelferyl-β-D-glucosi (MUD) khi có tali axetat, axit nalidic và 2,3,5-triphenyltetrazolium clorua (TTC) trong môi trường lỏng xác định.

4 Nguyên tắc

Mẫu đã pha loãng được nuôi cấy trong các giếng cấy của đĩa microtit có chứa môi trường cấy đã loại nước.

Phiên giếng cấy được kiểm tra trong tối có ánh sáng cực tím ở 366 nm sau khi ủ trong khoảng thời gian từ 36 h đến 72 h tại 44 °C ± 0,5 °C. Sự có mặt của khuẩn đường ruột được chỉ thị bằng huỳnh quang là kết quả của sự thủy phân MUD. Kết quả được đưa ra là số có xác suất lớn nhất trên 100 ml (MNP).

5 Thiết bị, dụng cụ

Ngoại trừ các dụng cụ, thiết bị vô khuẩn được cấp, tất cả các dụng cụ thủy tinh phải được khử khuẩn theo ISO 8199.

Các thiết bị của phòng thí nghiệm phân tích vi sinh thông thường và cụ thể:

5.1 Thiết bị để khử khuẩn bằng sấy nhiệt (lò) hoặc bằng hơi (nồi hấp).

5.2 Tủ ủ có nhiệt độ ổn định, đạt ở nhiệt độ 44 °C ± 0,5 °C.

5.3 Hầm sấy (Lò sấy kiểu hầm) hoặc phòng sấy bằng luồng khí (nên dùng loại II).

5.4 Buồng quan sát lắp đèn UV (Đèn Wood 366 nm).

CẢNH BÁO - Ánh sáng UV có thể gây kích ứng da và mắt. Sử dụng găng và kính bảo vệ.

³⁾ ISO 8199 đã có phiên bản năm 2005.

- 5.5 Máy đo khúc xạ cầm tay (tùy chọn)
- 5.6 pH mét, với độ chính xác $\pm 0,1$.
- 5.7 Ống nghiệm, 16 mm x 160 mm và 20 mm x 200 mm, hoặc bình có dung tích tương tự.
- 5.8 Pipét nhiều đầu điều chỉnh được hoặc pipét có sẵn 8 đầu điều chỉnh được, hoặc hệ thống phù hợp để đo và phân chia 200 μl trên một giếng cấy.
- 5.9 Ống chóp vô khuẩn lắp vào đầu pipét dùng cho multipipet
- 5.10 Thiết bị lọc màng, phù hợp với ISO 8199, kể cả cái lọc màng có cỡ lỗ danh nghĩa 0,2 μm , để khử khuẩn môi trường lỏng.
- 5.11 Phiến giếng cấy vô khuẩn, 96 giếng cấy, 350 μl , đáy phẳng, không cản ánh sáng huỳnh quang.
- 5.12 Băng dính vô khuẩn để bọc kín đĩa cấy microtit
- 5.13 Đĩa Petri vô khuẩn, đường kính 90 mm.

6 Lấy mẫu

Lấy mẫu và đưa đến phòng thí nghiệm theo TCVN 6663-1 (ISO 5667-1), TCVN 5992 (ISO 5667-2) và TCVN 6663-3 (ISO 5667-3).

7 Môi trường nuôi cấy và dung dịch pha loãng

7.1 Hướng dẫn chung

Để đảm bảo có kết quả, chuẩn bị môi trường nuôi cấy và dung dịch pha loãng, sử dụng các thành phần có chất lượng đồng nhất và hoá chất phân tích hoặc dung dịch pha loãng đã loại nước hoặc môi trường hoàn chỉnh được chuẩn bị theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chuẩn bị các chất này với nước cất hoặc nước đã loại khoáng, không chứa các chất có khả năng gây ức chế hoặc thúc đẩy sự phát triển vi khuẩn trong các điều kiện thử nghiệm. Nếu chưa sử dụng môi trường ngay, có thể lưu giữ môi trường này đến một tháng trong tối ở $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ và trong các điều kiện tránh mọi sự thay đổi thành phần của chúng.

CHÚ THÍCH – Có thể sử dụng các hoá chất có chất lượng khác nếu các hoá chất này có tính năng như nhau trong phép thử.

7.2 Dung dịch pha loãng

7.2.1 Dung dịch pha loãng đặc biệt (SD)

Muối biển tổng hợp ⁴⁾	22,5 g
Dung dịch bromophenol xanh (tuỳ chọn)	10 ml
Nước đã loại khoáng hoặc nước cất (7.2.2)	1000 ml

Tiệt trùng trong nồi hấp (5.1) ở $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min đến 20 min.

Dung dịch bromophenol xanh được chuẩn bị bằng cách thêm 0,04 g vào 100 ml etanol 50 %. Dung dịch này chỉ dùng để tạo màu xanh cho SD và để tránh nhầm lẫn với nước đã loại khoáng hoặc nước cất.

7.2.2 Nước đã loại khoáng hoặc nước cất

Nước được dùng để pha loãng cần được loại khoáng hoặc nước cất không chứa các chất gây ức chế sự phát triển dưới các điều kiện thử nghiệm.

Tiệt trùng trong nồi hấp (5.1) trước khi dùng ở $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 15 min đến 20 min.

7.3 Môi trường nuôi cấy: Môi trường MUD/SF

7.3.1 Thành phần

7.3.1.1 Dung dịch A

Tryptozin	40 g
KH_2PO_4	10 g
D(+)-galactozin	2 g
Polyoxyetylen sorbitan monoleat (Tween® 80 ⁵⁾)	1,5 ml
Nước đã loại khoáng hoặc nước cất (7.2.2)	900 ml

Cho tryptozin, KH_2PO_4 , galactozin và Tween® 80 vào 900 ml nước, trong khi làm nóng nhẹ và khuấy bằng khuấy tử, sau đó đun sôi đến khi tan hoàn toàn. Để nguội.

7.3.1.2 Dung dịch B

NaHCO_3	4 g
Axit nalidixic	250 mg
Nước đã loại khoáng hoặc nước cất (7.2.2)	50 ml

⁴⁾ Phân tích điển hình của sản phẩm có sẵn trên thị trường và muối biển tổng hợp chủ yếu được đưa ra là Phurloc C. Dung dịch NaCl tinh khiết không phù hợp vì chúng có ảnh hưởng ức chế đáng kể.

⁵⁾ Tween 80 là một ví dụ về sản phẩm chủ yếu có sẵn ngoài thị trường. Thông tin này được đưa ra chỉ tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn này mà không phải là xác nhận của ISO về sản phẩm này.

Cho cả hai hoá chất trên vào 50 ml nước trong khi đun nóng nhẹ và khuấy bằng khuấy từ. Để nguội.

7.3.1.3 Dung dịch C

Thalium axetat	2 g
2,3,5-triphenyltetrazolium clorua	0.1 g
Nước đã loại khoáng hoặc nước cất (7.2.2)	50 ml

Cho cả hai hoá chất trên vào 50 ml nước trong khi đun nóng nhẹ và khuấy bằng khuấy từ. Để nguội.

7.3.1.4 Dung dịch D

MUD (4-metylbeliferyl- β -D-glucosi)	150 mg
N,N-dimetylfomamid	2 ml

CẢNH BÁO – Talium axetat và N,N- dimetylfomamid là các chất độc. Sử dụng các hoá chất này trong tủ hút.

7.3.2 Chuẩn bị

Trộn các dung dịch A+B+C+D với nhau.

Điều chỉnh pH đến $7,5 \pm 0,2$.

Tiệt trùng bằng cách lọc qua màng có cỡ lỗ trung bình $0,2 \mu\text{m}$ (5.10).

Phân bố dung dịch vào đĩa microlit 96 giếng cấy (5.11) với thể tích $100 \mu\text{l}$ môi trường cho mỗi giếng cấy (dung tích giếng cấy tối thiểu là $350 \mu\text{l}$) và loại nước ngay trong tủ sấy kiểu hầm hoặc hộp sấy bằng dòng khí (5.3).

Sản xuất môi trường nuôi cấy cần đáp ứng được các tiêu chí về chất lượng đưa ra ở Phụ lục E.

8 Cách tiến hành

8.1 Lựa chọn số lần pha loãng

Số lần pha loãng để cấy thay đổi theo mức nhiễm bẩn dự kiến của nước được thử. Bảng 1 đưa ra một số ví dụ.

Bảng 1

Nguồn gốc mẫu	Số lần pha loãng	Số giếng cấy/lần pha loãng	Giới hạn đo của vi khuẩn/ 100 ml
Nước bề bơi	2	64 giếng pha loãng đến 1/2 32 giếng pha loãng đến 1/20	15 đến $3,5 \times 10^4$
Nước mặt khác	4	24 giếng pha loãng đến 1/2 24 giếng pha loãng đến 1/20 24 giếng pha loãng đến 1/200 24 giếng pha loãng đến 1/2 000	40 đến $3,2 \times 10^6$
Nước thải và nước của trạm xử lý nước thải	6	16 giếng pha loãng đến 1/2 Giếng thứ 17 trở lên pha loãng đến 1/200 000	60 đến $6,7 \times 10^8$

8.2 Chuẩn bị sự pha loãng

CHÚ THÍCH Quy trình này phải được thực hiện trong tủ an toàn sinh học về pha loãng và hút bằng pipet, do sai khi có thể tạo ra.

8.2.1 Nước ngọt và nước lợ (thải) [độ muối < 30 g/kg, đo bằng máy đo khúc xạ (5.5) hoặc phương pháp tương đương].

Chuẩn bị số lượng ống nghiệm vô khuẩn (5.7) tương ứng theo số lần pha loãng đã chọn, đặt trên một cái giá, cho 9 ml dung dịch pha loãng đặc biệt (7.2.1) vào mỗi ống.

Khấy nhẹ mẫu (xem điều 6) để thu được sự phân bố các loài vi sinh vật đồng nhất và sử dụng pipet vô khuẩn, chuyển ngay 9 ml dung dịch mẫu đồng nhất này vào ống thứ nhất có chứa 9 ml dung dịch pha loãng (7.2.1) (Pha loãng 1/2).

Dùng pipet mới, chuyển 1 ml dung dịch này (đã đồng nhất) vào ống thứ hai (pha loãng 1/20).

Từ ống thứ hai (đã được đồng nhất và pha loãng 1/20) nếu cần, pha loãng tiếp 1/10 để đạt độ pha loãng 1/200.

Tiếp tục như trên tới khi tất cả pha loãng đã được chuẩn bị.

8.2.2 Nước biển (độ muối ≥ 30 g/kg)

Chuẩn bị số lượng ống nghiệm vô khuẩn (5.7) đặt lên giá, theo số lần pha loãng đã chọn, cho 9 ml nước đã loại khoáng hoặc nước cất (7.2.2) vào ống đầu tiên và 9 ml dung dịch pha loãng đặc biệt (7.2.1) vào các ống khác.

Khấy nhẹ mẫu (xem điều 6) để thu được sự phân bố các loài vi sinh vật đồng nhất và sử dụng pipet vô trùng, chuyển ngay 9 ml dung dịch mẫu đồng nhất này vào ống thứ nhất có chứa 9 ml nước cất (7.2.2) (Pha loãng 1/2).

Dùng pipet mới, chuyển 1 ml dung dịch này (đã đồng nhất) vào ống thứ hai (Pha loãng 1/20).

Từ ống thứ hai (đã được đồng nhất và pha loãng 1/20) nếu cần, pha loãng tiếp 1/10 để đạt độ pha loãng 1/200.

Tiếp tục như trên tới khi tất cả dung dịch pha loãng đã được chuẩn bị.

8.3 Nuôi cấy và ủ phiến giếng cấy

8.3.1 Nuôi cấy

Chuyển toàn bộ các thành phần trong ống thứ nhất vào đĩa Petri đã khử khuẩn có đường kính tối thiểu 90 mm.

Dùng pipet nhiều đầu hút (5.8) với 8 ống chóp đã khử khuẩn (5.9), phân phối 200 μ l vào mỗi giếng của phiến giếng cấy (5.11) tương ứng với sự pha loãng thứ nhất này.

Các lần pha loãng sau đó (1/20, 1/200, ...) tiến hành như trên nhưng thay đĩa petri và đầu 8 ống chóp pipet giữa mỗi lần pha loãng.

Cách khác, có thể dùng hệ thống phù hợp khác để (5.8) để phân chia 200 μ l của từng dung dịch pha loãng vào giếng cấy theo bảng 1.

CHÚ Ý – Cần chú ý sự nhiễm bẩn do tràn từ giếng cấy này sang giếng cấy khác.

8.3.2 Ủ

Mỗi lần đem phiến giếng cấy để ủ phải bọc lại bằng băng dính vô trùng dùng một lần dùng cho mục đích nuôi cấy.

Ủ phiến giếng cấy (5.2) ở $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ít nhất là 36 h và tối đa là 72 h.

CHÚ THÍCH Phiến giếng cấy cần được giữ cẩn thận để không bị nghiêng.

8.4 Đọc kết quả

Đặt từng phiến giếng cấy, kể cả băng dính, vào buồng quan sát có lắp đèn UV (5.4).

Tất cả các giếng quan sát thấy màu xanh huỳnh quang được coi là dương tính.

CHÚ THÍCH Việc đọc có thể tiến hành bất cứ lúc nào sau 36 h, vì ánh sáng huỳnh quang không làm biến đổi kết quả theo thời gian.

9 Thể hiện kết quả

9.1 Xác định số lượng đặc tính

Đối với mỗi lần pha loãng đã chọn, ghi lại số lượng giếng cấy dương tính (+).

TCVN 6189-1 : 2009

VÍ DỤ 1 Nước bề bơi

1/2 32 + của 64

1/20 5 + của 32

Ghi 32/5 là số lượng đặc tính.

VÍ DỤ 2: Nước mặt khác

1/2 24 + của 24

1/20 18 + của 24

1/200 5+ của 24

1/ 2 000 1 + của 24

Ghi 18/5/1 là số lượng đặc tính

VÍ DỤ 3: Nước thải

1/2 16 + của 16

1/20 16 + của 16

1/200 12 + của 16

1/ 2 000 5 + của 16

1/ 20 000 0 + của 16

1/ 200 000 0 + của 16

Ghi 12/5/0 là số lượng đặc tính

Khi ba hoặc nhiều dung dịch pha loãng đã được cấy, cần phải ghi lại số lượng đặc tính bằng ba chữ số, kết thúc 0 nếu có thể theo ISO 8199.

9.2 Tính toán MPN và khoảng tin cậy của chúng

MPN là ước lượng thống kê của mật độ vi sinh vật, coi là tương ứng với sự phân bố Poisson trong thể tích đã cấy. Khoảng tin cậy được kèm với MPN này.

Phần mềm đưa ra ở Phụ lục A hoặc B có thể tính toán MPN của khuẩn đường ruột trên millilit nước đối với từng cấu hình nuôi cấy và khoảng tin cậy 95 %.

VÍ DỤ 1: Cho rằng CN là số đặc tính, LO giới hạn dưới và UP giới hạn trên:

Nếu CN = 32/5, phần mềm trong Phụ lục A sẽ cho 7,56 khuẩn đường ruột trên millilit.

[LO = 5,42 – UP = 10,54].

nghĩa là 756/100 ml (542 đến 1054)

VÍ DỤ 2:

Nếu CN = 18/5/1, phần mềm trong Phụ lục A sẽ cho 159,08/ml.

[LO = 101,99 – UP = 248,11],

VÍ DỤ 3:

Nếu CN = 12/5/0, phần mềm trong Phụ lục A sẽ cho 1 724,61/ml,

[LO = 1 003,98 – UP = 2962,50]

Nếu không có giếng cấy nào cho kết quả dương tính, thể hiện kết quả như sau:

< $n/100$ ml

Trong đó n là MPN đối với 1 giếng cấy dương tính trong điều kiện pha loãng đã dùng.

10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm cần bao gồm tất cả chi tiết cần thiết để nhận dạng đầy đủ mẫu, viện dẫn đến phương pháp đã dùng và kết quả.

Báo cáo thử nghiệm cũng cần đề cập đến mọi hiện tượng đặc biệt quan sát được trong thử nghiệm và mọi thao tác không qui định hoặc tùy chọn trong phương pháp mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm.

11 Dữ liệu đặc tính của phương pháp

Thông tin liên quan đến độ lặp lại và độ tái lập của qui trình, thu được từ phép thử liên phòng thí nghiệm được đưa ra ở Phụ lục D.

Phụ lục A

(tham khảo)

Ví dụ về phần mềm phân tích thống kê MPN

```

10  REM .....
20  REM GENERAL PURPOSE PROGRAM FOR MPN, ITS S.E., C.I.
30  REM AND HOMOGENEITY TEST STATISTICS
40  REM .....
50  REM
60  DIM A(10,6),X2(3,9)
70  REM SET PROGRAM LIMITS
80  D9=10
90  U9=50
100 L9=0
110 A1=.0005
120 E1=85
130 REM SET CHI-SQUARED SIGNIFICANCE LEVELS
140 GOSUB 1000
150 REM READ IN RESULTS OF A DILUTION SERIES
160 GOSUB 2000
170 REM CALC AND PRINT THE MPN
180 GOSUB 3000
190 REM CALC AND PRINT S.E. OF LOG10(MPN)
200 GOSUB 4000
210 REM CALC AND PRINT 95 PERCENT C.I. FOR MPN
220 GOSUB 5000
230 REM CALC AND PRINT DEVIANCE
240 GOSUB 6000
250 STOP
1000 REM SET CHI-SQUARED SIGNIFICANCE LEVELS
1010 FOR I=1 TO 3
1020 FOR J=1 TO 9
1030 READ X2(I,J)
1040 NEXT J
1050 NEXT I
1060 REM 5 PERCENT LEVELS DF=1...9
1070 DATA 3.84, 5.99, 7.81, 9.49, 11.07
1080 DATA 12.59, 14.07, 15.51, 16.92
1090 REM 1 PERCENT LEVELS
1100 DATA 6.63, 9.21, 11.34, 13.28, 15.09

```

```

1110 DATA 16.81, 18.48, 20.09, 21.67
1120 REM .1 PERCENT LEVELS
1130 DATA 10.83, 13.81, 16.27, 18.47, 20.52
1140 DATA 22.46, 24.32, 26.12, 27.88
1150 RETURN
2000 REM READ IN RESULTS OF A DILUTION SERIES
2010 PRINT "MPN GENERAL PURPOSE PROGRAM"
2020 PRINT "*****"
2030 PRINT " "
2040 PRINT "M.A. HURLEY AND M.E. ROSCOE"
2050 PRINT " "
2060 PRINT "NUMBER OF DILUTION LEVELS.....K=";
2070 INPUT N
2080 IF N<1 THEN GOTO 2060
2090 IF N<=D9 THEN GOTO 2120
2100 PRINT "ERROR *** LEVELS EXCEED MAXIMUM"
2110 STOP
2120 S1=0
2130 FOR I=1 TO N
2140 PRINT " "
2150 PRINT "LEVEL NUMBER .....I=";I
2160 PRINT "DILUTION FACTOR.....D=";
2170 INPUT A(I,2)
2180 PRINT "SUBSAMPLE VOLUME.....V=";
2190 INPUT A(I,1)
2200 PRINT "NUMBER OF SUBSAMPLES.....N=";
2210 INPUT A(I,3)
2220 PRINT "NUMBER OF POSITIVE SUBSAMPLES..P=";
2230 INPUT A(I,4)
2240 PRINT "IS THE DATA CORRECT FOR LEVEL ";I;"(Y OR N) ";
2250 INPUT R$
2260 IF R$="Y" THEN 2280
2270 GOTO 2140
2280 A(I,5)=A(I,1)*A(I,2)
2290 A(I,6)=A(I,5)*A(I,4)
2300 S1=S1+A(I,5)*A(I,3)
2310 NEXT I
2320 RETURN
3000 REM CALCULATES AND PRINTS MPN
3010 S1=0
3020 S3=0

```

TCVN 6189-1 : 2009

```
3030   FOR J=1 TO N
3040   E2=A(J,5)*U9
3050   IF E2<E1 GOTO 3080
3060   E2=0
3070   GOTO 3090
3080   E2=EXP(-E2)
3090   S3=S3+A(J,6)/(1-E2)
3100   NEXT J
3110   IF S3-S1>=0 THEN 3130
3120   GOTO 3200
3130   FOR I=1 TO N
3140   A(I,5)=A(I,5)*2
3150   A(I,6)=A(I,6)*2
3160   NEXT I
3170   S1=S1*2
3180   B1=B1+1
3190   GOTO 3020
3200   X3=L9
3210   X4=U9
3220   X=(X3+X4)/2
3230   S=0
3240   FOR I=1 TO N
3250   E2=A(I,5)*X
3260   IF E2<E1 GOTO 3290
3270   E2=0
3280   GOTO 3300
3290   E2=EXP(-E2)
3300   S=S+A(I,6)/(1-E2)
3310   NEXT I
3320   IF ABS(S-S1)<A1 THEN 3380
3330   IF S-S1>0 THEN 3360
3340   X4=X
3350   GOTO 3220
3360   X3=X
3370   GOTO 3220
3380   X5=X*(2^B1)
3390   PRINT " "
4000   REM CALCS AND PRINTS S.E. OF LOG10 (MPN)
4010   S2=0
4020   FOR I=1 TO N
4030   X3=A(I,5)
```

```

4040 E2=X3*X
4050 IF E2<E1 GOTO 4080
4060 X4=0
4070 GOTO 4090
4080 X4=EXP(-E2)
4090 S3=X3*X3*A(1,3)*X4
4100 S3=S3/(1-X4)
4110 S2=S2+S3
4120 NEXT I
4130 V=1/(X*X*S2)
4140 S1=SQR(V)/LOG(10)
4150 PRINT " "
4160 PRINT "S.E. OF LOG10 (MPN)=";S1
4170 RETURN
5000 REM CALCS 95 PERCENT C.I. FOR MPN
5010 X3=LOG(X)+B1*LOG(2)
5020 S2=SQR(V)
5030 U=EXP(X3+1.96*S2)
5040 L=EXP(X3-1.96*S2)
5050 PRINT " "
5060 PRINT "95 PERCENT C.I. =";L;"TO";U
5070 RETURN
6000 REM CALCS. AND PRINTS DEVIANCE
6010 S3=0
6020 FOR I=1 TO N
6030 S4=0
6040 IF A(I,4)<=0 GOTO 6110
6050 E2=A(I,5)*X
6060 IF E2<E1 GOTO 6090
6070 E2=0
6080 GOTO 6100
6090 E2=EXP(-E2)
6100 S4=A(I,4)*LOG(A(I,4)/(A(I,3)*(1-E2)))
6110 S3=S3+S4
6120 S4=0
6130 IF A(I,4)>=A(I,3) GOTO 6160
6140 S4=A(I,3)-A(I,4)
6150 S4=S4*(LOG(S4/A(I,3))+A(I,5)*X)
6160 S3=S3+S4
6170 NEXT I
6180 D=2*S3

```

TCVN 6189-1 : 2009

```
6190  REM CHI-SQUARED TEST OF DEVIANCE
6200  V=N-1
6210  PRINT ""
6220  PRINT "DEVIANCE =" ; D ; " ON " ; V ; " D.F."
6230  PRINT ""
6240  PRINT "CHI-SQUARED SIGNIFICANCE LEVELS FOR " ; V ; " D.F."
6250  PRINT " 5 PERCENT " ; X2(1,V)
6260  PRINT " 1 PERCENT " ; X2(2,V)
6270  PRINT " .1 PERCENT " ; X2(3,V)
6280  RETURN
7000  END
```

Phụ lục B

(tham khảo)

Ví dụ về phần mềm ước tính MPN

```

10 DIM T (20)
20 DIM M (20)
30 DIM P (20)
40 L = 0
45 CLS : L = L + 1
50 PRINT "CALCULATION OF MPN N ";L
60 PRINT " ....."
70 A = 1
80 PRINT
90 INPUT "NB OF DILUTIONS":DI : PRINT : PRINT
110 PRINT
120 P = 0 : S = : U = 0
130 FOR I = 1 TO DI
140 PRINT "DILUTION" ; I
150 INPUT "NB OF POSITIVE WELLS .." ; P(I)
155 INPUT "NB OF WELLS ....." ; T(I)
160 INPUT "WATER VOLUME/WELL (ML)..." ;M(I) : PRINT
170 P = P(I) + P
180 S = ((T(I) - P(I))*M(I)) + S
190 U = (M(I) * T(I)) + U
200 NEXT I
280 K = 1
290 NP = (P/U) * 2 ^ (K + K / 2 + K / 4 + K / 8 + K / 16 + K / 32 + K / 64 + K / 128 + K / 256 + K / 512)
300 PM = 0
310 FOR I = 1 TO DI
320 PM = PM + ((P(I) * M (I) * EXP (- M(I) * NP)) / (1 - EXP (- M(I) * NP )))
330 NEXT I
340 IF PM < S THEN 370
350 K = K + A
360 GOTO 290
370 DT = S - PM
380 IF ABS (DT) <= .000005 GOTO 702
390 K = K - A
400 A = A / 10
410 GOTO 290
702 FOR I = 1 TO DI:ES = ES + P(I):NEXT I

```

TCVN 6189-1 : 2009

```
710   FOR I = 1 TO DI
720   K (I) = (T(I) * (M(I)^2))
730   NEXT I
740   FOR I = 1 TO DI
745   IF (NP * M(I) > 88 THEN E(I) = 1.65E38:GOTO 760
750   E(I) = (EXP (M(I) * NP) - 1)
760   NEXT I
770   LL = 0
780   FOR I = 1 TO DI
790   LL = LL + (K (I) / E (I))
800   NEXT I
810   CL = (LOG (NP) - (1.96 * (1 / (NP * SQR (LL)))))
817   CU = (LOG (NP) + (1.96 * (1 / (NP * SQR (LL)))))
840   NP = INT (NP * 100 + .5) / 100
850   PRINT : PRINT " NPP = ";NP;" / ML"
860   PRINT : PRINT
870   PRINT "LIMITS INF=";INT ( EXP (CL)* 100 + .5) / 100;" / ML SUP=" ;INT (EXP (CU)*100 + .5) / 100;" /
ML"
880   PRINT : PRINT: INPUT "DO YOUWANT ANOTHER MPN (Y/N)?":RES$
890   IF RES$ = "N" THEN END
900   GOTO 45
```

Lệnh

Sau khi hiển thị số chạy (L. dòng 50)

Nhập số pha loãng (dòng 90)

Đối với mỗi dung dịch pha loãng

- hiển thị số lần pha loãng (dòng 140),
- nhập số giếng hoặc ống phản ứng dương tính (dòng 150),
- nhập số giếng cấy dung dịch pha loãng (dòng 155),
- nhập thể tích nước đã cấy trên một giếng, tính bằng mililit (dòng 160).

Tính toán MPN theo De Man [2] (dòng 280-410).

Tính toán giới hạn dưới và giới hạn trên của khoảng tin cậy theo De Man [2] (dòng 770-817).

Hiển thị

- MPN (trên ml) (dòng 850),
- giới hạn dưới (trên ml) (dòng 870),

- giới hạn (trên mi) (dòng 870),

Câu hỏi: "Có chạy tiếp không?"

Nếu không: END.

Phụ lục C
(tham khảo)
Muối biển tổng hợp

C.1 Thành phần ion chính của muối biển tổng hợp

	Ion chính	% khối lượng tổng	Nồng độ ion ở độ muối 34 g/kg (mg/l)
Clorua	(Cl ⁻)	47,470	18 740
Natri	(Na ⁺)	26,280	10 454
Sunphat	(SO ₄ ⁻²)	6,602	2 631
Magiê	(Mg ⁺)	3,230	1 256
Canxi	(Ca ⁺²)	1,013	400
Kali	(K ⁺)	1,015	401
Bicacbonat	(HCO ³⁻)	0,491	194
Bo	(B)	0,015	6,0
Strontri	(Sr ⁺²)	0,001	7,5
	TỔNG CHẤT RẮN	86,11	34 089,50
Nước	(H ₂ O)	13,88	
	TỔNG SỐ	99,99	

C.2 Ví dụ về chuẩn bị các dung dịch từ các chất đã định

Ba dung dịch cơ bản được làm như sau:

Dung dịch A

CaCl ₂ .2H ₂ O	83,6 g
KCl	43,5 g
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,07 g
Nước cất	đến 1 000 ml

Dung dịch B

NaHCO ₃	15,15 g
Na ₂ B ₄ O ₇	3,0 g
Nước cất	đến 1 000 ml

Dung dịch C

MgSO ₄ .7H ₂ O	190,0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	147,0 g
Nước cất	đến 1 000 ml

Pha loãng dung dịch được pha bằng cách thêm đến 960 ml nước cất, 10 ml dung dịch A, 10 ml dung dịch B, 20 ml dung dịch C và 14,9 g natri clorua, trộn đều đến khi tan hoàn toàn và điều chỉnh pH đến $7,5 \pm 0,2$. Dung dịch pha loãng được chia vào các bình chứa có thể tích yêu cầu và khử khuẩn bằng nồi hấp ở $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ trong 15 min.

Phụ lục D
(tham khảo)

Đặc tính của phương pháp

Độ lặp lại (r) và độ tái lập (R) được tính theo TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) đã nêu dưới đây là phần của phép thử liên phòng thí nghiệm:

Nước bể bơi

(mẫu thêm, 100 phòng thí nghiệm ở Pháp, làm 3 đợt vào năm 1995 và 1996) (một nước biển và hai nước ngọt, không có sự sai khác đáng kể):

i) Tại mức 100 khuẩn đường ruột/100 ml $r \approx 1,5$
 $R \approx 2,7$

ii) Tại mức 400 khuẩn đường ruột/100 ml $r \approx 2,1$
 $R \approx 3,7$

Và thời gian thử nghiệm (trong 1993 và 1994) của chín phòng thí nghiệm và bốn mẫu (nhiễm bẩn tự nhiên):

b) Nước sông có chứa

từ $2,2 \times 10^3$ đến $1,5 \times 10^4$ khuẩn đường ruột/100 ml $r \approx 1,5$
 $R \approx 2,7$

c) Nước cống có chứa

từ $1,9 \times 10^4$ đến $5,1 \times 10^8$ khuẩn đường ruột/100 ml $r \approx 2,6$
 $R \approx 3,9$

Phụ lục E

(tham khảo)

Chuẩn cứ chất lượng để sản xuất môi trường trong phiến giếng cấy

E.1 Khái quát

Đối với mỗi chuẩn cứ sau đây, kiểm soát chất lượng cần phải thực hiện trên từng mẻ phiến giếng cấy được sản xuất. Phiến giếng cấy được thử nghiệm được tiến hành ngẫu nhiên hoặc hệ thống để cấu thành nên mẫu theo ISO 3951, tương ứng với mức kiểm soát chung No. II của kiểm soát thông thường.

Ngưỡng dương tính của phiến giếng cấy được định rõ do bị mức huỳnh quang dẫn đến kết quả đọc dương tính không bị mờ, tối mắt nhìn, dưới ánh sáng Wood (366 nm). Mức này được đo khi áp dụng điều khoản của phụ lục F.

Chuẩn cứ chất lượng chủ ý được đưa ra từ E.2 đến E.5. Mẻ cần được loại bỏ nếu bất cứ chuẩn cứ nào không được đáp ứng.

E.2 Ngưỡng

Không có giếng cấy dương tính trong mỗi phiến giếng cấy mẫu, sau khi cấy dung dịch pha loãng tiết trùng đặc biệt và ủ trong 48 h ở $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Số giếng cấy chứa môi trường nuôi cấy có phản ứng dương tính phải dưới 25 % ngưỡng dương tính đã quy định ở trên và hệ số phương sai phải dưới 10 %.

E.3 Mức huỳnh quang trung bình

Đây là trung bình hình học của dấu hiệu huỳnh quang thu được từ 96 giếng của phiến giếng cấy đã cấy đồng nhất 200 μl cho mỗi giếng huyền phù *E. faecalis* CCM 2541 chứa 500 vi sinh vật trên ml. Dung dịch pha loãng đặc biệt (7.2.1), và ủ ở 48 h tại $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Dấu hiệu trung bình thu được như vậy cần phải ít nhất là hai lần ngưỡng dương tính và hệ số phương sai phải dưới 10 %.

E.4 Độ sinh sản

Độ sinh sản được tính là tỉ số của số lượng các loài quan sát được với mẻ của phiến giếng cấy thử nghiệm với số vi sinh vật dự đoán với vật liệu chuẩn bền vững (giá trị mục tiêu). Mức nồng độ cần phải xung quanh độ chính xác tối đa của phương pháp, nghĩa là khoảng một vi sinh vật trên giếng (500/100 ml). Độ bền và độ đồng nhất (giá trị mục tiêu và khoảng tin cậy) của mẫu chuẩn cần phải được xác định với một (hoặc một vài) mẻ phiến giếng cấy đã chấp nhận. Ngưỡng chấp nhận của phiến giếng cấy được thử ở 0,66 đến 1,5 giá trị quan tâm. Hệ số phương sai cần phải thấp hơn 10 %.

Các chủng được thử nghiệm là:

- *E. faecium* WR63 Có thể lấy từ RIVM, Bilthoven, Hà Lan
- *E. faecalis* CCM 2541 } Có thể lấy từ Bộ sưu tập vi sinh vật của Séc, Brno, Cộng hoà Séc
- *E. hirae* CCM 2423 }

Thời gian ủ là 48 h ở $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

E.5 Cản trở

Khả năng chọn lọc của phiên giếng cấy được thử nghiệm bằng cách cấy vi sinh vật giống với các loài mục tiêu:

- *Aerococcus viridans* CIP 54145T
 - *Lactococcus lactis* CIP 7056T
 - *Staphylococcus epidermidis* CIP 8155T
- } Có thể lấy từ Viện Pasteur, Paris, Pháp

Huyền phù có chứa từ 10^4 đến 10^5 các vi sinh vật này trên 100 ml được cấy vào từng phiên giếng cấy thử nghiệm dựa trên 32 giếng trên một chủng. Sau khi ủ khoảng 48 h tại $(44 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, không giếng nào cho thấy huỳnh quang rõ ràng hơn chuẩn cứ đã quy định về ngưỡng nền (25 % của ngưỡng phản ứng dương tính) hoặc kết tủa formazan.

Phụ lục F

(qui định)

Chuẩn bị phiên giếng cấy hiệu chuẩn**F.1 Vật liệu và thuốc thử**

Thiết bị phòng thí nghiệm hiện có (cân chính xác, pH mét, dụng cụ thủy tinh) và:

F.1.1 4-metylbelferon.

F.1.2 Etanol.

F.1.3 0,8 % dung dịch natri clorua.

F.1.4 Glyxin.

F.1.5 Natri hydroxyt.

F.1.6 Phiên giếng cấy 96 giếng.

F.2 Chuẩn bị dung dịch gốc

Chuẩn bị dung dịch gốc 4-metylbelferon trong etanol bằng cách hỗn hợp như sau:

4-metylbelferon 0,044 g

Etanol 10 ml

F.3 Chuẩn bị dung dịch đệm**F.3.1 Chuẩn bị các dung dịch sau**

Dung dịch glyxin: Hoà tan 7,507 g glyxin và 5,84 g natri clorua trong 1000 ml nước cất.

Dung dịch natri hydroxit: Hoà tan 4 g natri hydroxit trong 1000 ml nước cất.

F.3.2 Cho 56,5 ml dung dịch glyxin [F.e.1 a)] vào 43,5 ml dung dịch natri hydroxit [F.3.1 b)] vào cốc mỏ và máy khuấy. Kiểm tra giá trị pH là 10,3 bằng pH mét.

F.4 Chuẩn bị bản hiệu chuẩn

Tất cả các thao tác sau cần phải tiến hành ở nhiệt độ phòng.

Tất cả các dung dịch pha loãng cần được chuẩn bị sử dụng dung dịch natri clorua 0,8 % (F.1.3).

Chuẩn bị ngay dung dịch 1/100 dung dịch gốc (F.2). Từ dung dịch thu được này, hàng ngày chuẩn bị các dung dịch sau.

ST 1: 100 µl dung dịch vừa chuẩn bị + 0,9 ml dung dịch NaCl 0,8 %.

TCVN 6189-1 : 2009

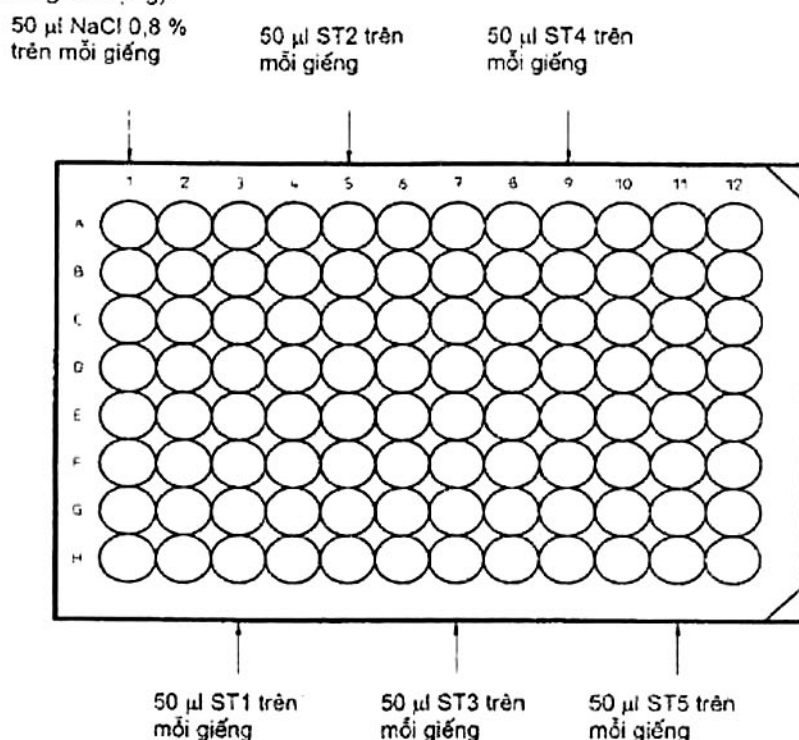
ST 2: 0,5 ml dung dịch ST1 + 0,5 ml dung dịch NaCl 0,8 %.

ST 3: 0,5 ml dung dịch ST2 + 0,5 ml dung dịch NaCl 0,8 %.

ST 4: 0,5 ml dung dịch ST3 + 0,5 ml dung dịch NaCl 0,8 %.

ST 5: 0,5 ml dung dịch ST4 + 0,5 ml dung dịch NaCl 0,8 %.

Hiển thị các dung dịch khác nhau trong các cột lẻ của phiến giếng cấy (F.1.6), như trong Hình F.1 dưới đây (các cột chẵn không sử dụng).



Hình F.1

Cho vào từng giếng 100 µl dung dịch đệm có pH 10,3 (F.3.2). Do vậy thu được trong khoảng từ 0 pg đến 1 500 pg 4-metylbulliferon trên microlit.

CHÚ THÍCH - Thực nghiệm cho thấy ngưỡng có phản ứng dương tính với 4-metylbulliferon SIGMA (mã số M-1381) và phiến giếng cấy trong suốt có đáy bằng NUNC (ref. 1352) là 367 pg/µl nếu phiến giếng cấy được đổ đầy dung dịch ST3 như mô tả trong phụ lục này.

Phụ lục G

(tham khảo)

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6910-1 (ISO 5725-2:1994), Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập lại của phương pháp đo tiêu chuẩn
 - [2] DE MAN J.C. The probability of most probable numbers. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 1, 1975, pp. 67-78.
 - [3] DEVRIESE L.A., COLLINS M.D. and WIRTH R. The Genus *Enterococcus*. In : A. Balows et al. (Ed.) *The Prokaryotes*. 2nd edn., Vol. ii, 1992, pp. 1485-1481, Springer, NY.
 - [4] HURLEY M. A. and ROSCOE M. E. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series.
 - [5] KLEE A.J. A computer program for the determination of most probable numbers and its confidence limits. *Microbiol. Methods*, 18, 1993, pp. 91-98.
-