

Chất lượng nước - Phát hiện và đếm số bào tử vi khuẩn kị khí khử sunfit (Clostridia)

Phần 1- Phương pháp tăng sinh trong môi trường cấy lỏng

*Water quality - Detection and enumeration of the spores
of sulfite-reducing anaerobes (clostridia)*

Part 1: Method by enrichment in a liquid medium

1 Phạm vi áp dụng

Phần này của tiêu chuẩn qui định phương pháp phát hiện và đếm số lượng bào tử của các vi khuẩn kị khí khử sunfit (Clostridia) bằng cách tăng sinh trong môi trường cấy lỏng.

2 Lĩnh vực áp dụng

Phương pháp này có thể áp dụng đối với mọi loại nước kể cả nước đục.

3 Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 3696 Nước dùng cho phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật.

TCVN 5992 : 1995 (ISO 5667-2) Chất lượng nước. Lấy mẫu. Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu.

TCVN 5993 : 1995 (ISO 5667-3) Chất lượng nước. Lấy mẫu. Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu.

ISO 8199 Chất lượng nước - Hướng dẫn chung cho việc kiểm tra vi sinh vật bằng cách đếm số lượng vi sinh vật trên môi trường nuôi cấy.

4 Định nghĩa

Sử dụng các định nghĩa sau đây cho mục đích của tiêu chuẩn này:

Clostridia: Là các vi sinh vật kỵ khí có khả năng hình thành bào tử, có khả năng khử sunfit thuộc về họ Bacillaceae và giống Clostridium.

5 Nguyên tắc

Việc phát hiện bào tử của các vi khuẩn kỵ khí - khử sunfit (Clostridia) có mặt trong một thể tích qui định của mẫu thử cần theo các bước sau:

5.1 Lựa chọn các bào tử

Lựa chọn các bào tử có trong mẫu bằng cách đun nóng trong một thời gian đủ để diệt các vi khuẩn dinh dưỡng.

5.2 Nuôi cấy tăng sinh

Phát hiện và đếm số bào tử của vi khuẩn kỵ khí khử sunfit bằng cách cấy các thể tích khác nhau của mẫu thử vào môi trường tăng sinh dạng lỏng, tiếp đó nuôi trong điều kiện kỵ khí ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $44 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$.

6 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

6.1 Các nguyên vật liệu chính

Để làm tăng độ tái lập của kết quả, nên sử dụng các thành phần chính khô, hoặc các môi trường khô hoàn chỉnh để chuẩn bị các dịch pha loãng và các môi trường nuôi cấy. Tương tự như vậy, các thuốc thử dưới dạng thương phẩm cũng có thể sử dụng. Cần tuân theo nghiêm ngặt các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Các hoá phẩm sử dụng để pha chế các môi trường nuôi cấy và thuốc thử phải đạt chất lượng phân tích.

Nước sử dụng ở đây phải là nước cất hoặc nước đã khử ion không chứa các chất có thể ức chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật trong các điều kiện thử đã nêu (xem ISO 3696).

Đo pH bằng pH mét, phép đo tương ứng với nhiệt độ ở 25°C .

Nếu như các môi trường nuôi cấy đã pha chế mà không đếm ngay chúng phải được bảo quản ở chỗ tối ở nhiệt độ khoảng 4°C , không quá một tháng, trừ khi có chỉ dẫn nào khác.

6.2 Các môi trường nuôi cấy và dịch pha loãng

6.2.1 Dịch pha loãng: sử dụng một trong các dịch pha loãng đã nêu trong I SO 8199.

6.2.2 Môi trường phân lập Clostridia được tăng cường (DRCM):

6.2.2.1 Môi trường cơ bản nóng độ đơn:

Thành phần:

Pepton từ thịt bò phân giải tryptic	10 g
Cao thịt	10 g
Cao men	1,5 g
Tinh bột	1 g
Natri axetat ngậm nước	5 g
Glucoza	1 g
L-Xystein hydroclorua	0,5 g
Nước	1000 ml

Pha chế

Trộn pepton, cao thịt, natri axetat và cao men với 800 ml nước.

Với 200 ml nước cất còn lại chuẩn bị dung dịch tinh bột như sau: trộn tinh bột với một ít nước lạnh để tạo thành bột nhão. Đun tới sôi phần nước còn lại và thêm từ từ nước nóng này vào khối bột nhão vừa khuấy liên tục.

Sau đó bổ sung dung dịch tinh bột này vào hỗn hợp đầu tiên và đun tới sôi đến khi hoà tan toàn bộ.

Cuối cùng bổ sung glucoza và L-Xystein hydroclorua. Khuấy cho tan.

Chỉnh pH tới 7,1 - 7,2 bằng dung dịch natri hidroxit 1 mol/l

Chuyển vào các lọ có nút xoáy dung tích 25 ml, mỗi lọ 25 ml dịch môi trường. Khử trùng trong nồi hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

6.2.2.2 Môi trường cơ bản nóng độ kép

Pha chế môi trường nóng độ kép như ở 6.2.2.1 nhưng giảm lượng nước xuống một nửa.

TCVN 6191-1: 1996

Chuyển vào các lọ dung tích 25 ml và 100 ml có nút xoáy, mỗi lọ 10 ml và 50 ml dịch môi trường, tương ứng với thể tích các lọ.

6.2.3 Natri sunfit (Na_2SO_3), dung dịch 4 % (m/m)

Hoà tan 4 g natri sunfit khan trong 100 ml nước. Khử trùng qua lọc.

Bảo quản ở khoảng từ 2°C đến 5°C .

Dung dịch chỉ dùng trong 14 ngày.

6.2.4 Sắt (III) xitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$), dung dịch 7 % (m/m)

Hoà tan 7 g sắt (III) xitrat trong 100 ml nước. Khử trùng qua lọc.

Bảo quản ở khoảng từ 2°C đến 5°C .

Dung dịch chỉ dùng trong 14 ngày.

6.2.5 Môi trường hoàn chỉnh

6.2.5.1 Đổ vào ngày phân tích, trộn một lượng bằng nhau của dung dịch natri sunfit (6.2.3) và dung dịch sắt (III) xitrat (6.2.4).

6.2.5.2 Thêm 0.5 ml hỗn hợp (6.2.5.1) vào mỗi lọ môi trường nồng độ đơn (6.2.2.1) vừa mới được đun nóng và để nguội.

6.2.5.3 Thêm 0.4 ml hỗn hợp (6.2.5.1) vào mỗi lọ chứa 10 ml môi trường và 2 ml hỗn hợp trên vào mỗi lọ chứa 50 ml môi trường nồng độ kép (6.2.2.2) đã được xử lý như trên.

7 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh

Các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm vi sinh, và:

7.1 Các lọ có nút hoặc lọ nhỏ có nút xoáy và nút thủy tinh bo silicat dung tích 200 ml, 100 ml và 25 ml.

7.2 Các pipét định mức dung tích 10 ml và 1 ml.

7.3 Nồi cách thủy, có thể điều chỉnh được nhiệt độ.

7.4 Ống nghiệm 150 mm x 13mm.

7.5 Dây thép nhỏ.