

Chất lượng nước – Phát hiện và đếm số bào tử vi khuẩn kỵ khí khử sunphit (clostridia)

Phần 2 : Phương pháp màng lọc

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

Part 2: Method by membrane filtration

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp phát hiện và đếm các bào tử của các vi khuẩn kỵ khí khử sunphit (clostridia) bằng phương pháp màng lọc.

2 Lĩnh vực áp dụng

Phương pháp này có thể áp dụng cho tất cả các loại nước, trừ khi có một lượng lớn các chất bị giữ lại trên màng lọc.

3 Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 3696 – Nước dùng cho phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật;

TCVN 5992 : 1995 (ISO 5667) 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 7704 Chất lượng nước - Đánh giá màng lọc dùng cho phân tích vi sinh;

ISO 8199 Chất lượng nước - Hướng dẫn chung về kiểm nghiệm vi sinh bằng cách đếm các vi sinh vật trên môi trường nuôi cấy.

4 Định nghĩa

Với mục đích của tiêu chuẩn này sử dụng các định nghĩa sau đây:

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

5 Nguyên tắc

Phát hiện các bào tử của các vi khuẩn kỵ khí khử sunphit (clostridia) trong một thể tích mẫu nước xác định theo các bước sau đây:

5.1 Lựa chọn các bào tử

Chọn lọc các bào tử có trong mẫu bằng cách đun nóng trong một khoảng thời gian đủ để tiêu diệt các vi khuẩn dinh dưỡng.

5.2 Lọc qua màng và nuôi cấy

Lọc mẫu nước qua màng lọc có kích thước lỗ sao cho các bào tử vi khuẩn ($0,2 \mu\text{m}$) được giữ lại trên màng lọc.

Đặt màng lọc vào môi trường nuôi cấy chọn lọc xác định (thạch sắt sunphit), tiếp theo ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $20 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ và $44 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ và đếm các khuẩn lạc có màu đen.

6 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

6.1 Các nguyên liệu chính

Để làm tăng độ tái lập của kết quả nên sử dụng các thành phần chính khô, hoặc môi trường hoàn chỉnh khô để pha chế các dịch pha loãng và các môi trường nuôi cấy. Tương tự các thuốc thử có bán sẵn cũng có thể sử dụng. Cần tuân thủ nghiêm ngặt chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Các thuốc thử và hoá chất dùng để pha chế môi trường nuôi cấy phải là loại phân tích.

Phải dùng nước cất hoặc nước đã khử ion, không chứa các chất có thể ức chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật trong điều kiện thử đã nêu (xem ISO 3696).

Dùng pH met để đo độ pH, phép đo thích hợp ở nhiệt độ 25°C .

Nếu các môi trường nuôi cấy đã pha chế mà không dùng ngay thì phải bảo quản ở chỗ tối khoảng 4°C không quá 1 tháng, trừ khi có chỉ dẫn nào khác.

6.2 Thạch - Sắt - Sunphit

6.2.1 Môi trường chính (thạch dinh dưỡng)

Thành phần

Cao thịt	3 g
Pepton	10 g
Natri clorua	5 g
Thạch	15 g
Nước	1000 ml

Chuẩn bị

Hấp bằng hơi để hoà tan, thêm nước đến 1 lít, và điều chỉnh pH đến $7,6 \pm 0,1$ bằng dung dịch natri hydroxit 1 mol/l.

Khử trùng ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong nồi hấp áp lực trong 20 phút.

Bảo quản trong tủ lạnh sau khi đông đặc.

6.2.2 Dung dịch natri sunphit (Na_2SO_3)

Hoà tan 10 g natri sunphit trong 100 ml nước.

Cứ sau 2 tuần nên chuẩn bị dung dịch mới.

6.2.3 Dung dịch sắt (III) sunfat (FeSO_4)

Hoà tan 8 g sắt (III) sunfat tinh thể trong 100 ml nước.

6.2.4 Môi trường hoàn chỉnh

Ngay trước khi sử dụng, đun chảy môi trường chính (6.2.1) và cứ 18 ml dung dịch này thêm vào đó 1 ml dung dịch natri sunphit (6.2.2) và 5 giọt dung dịch sắt (III) (6.2.3).

Thêm 1 ml dung dịch natri sunphit và 5 giọt dung dịch sắt (III) (6.2.3) sunfat vào ống thạch ngay trước khi bắt đầu trình tự tiến hành (xem 9.3)

6.3 Thạch - Sunphit - Tryptoza

Thành phần:

Tryptoza	15 g
Soyton	5 g
Caomen	5 g
Natri metabisunphit	1 g
Amoni sắt (III) xitrat	1 g
Nước	1000 ml

Chuẩn bị:

Hấp bằng hơi để hoà tan và điều chỉnh pH đến $7,6 \pm 0,1$ ở 25°C .

Phân chia vào các ống thử mỗi ống 18 ml. Khử trùng môi trường ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

Bảo quản trong tủ lạnh ở 4°C đến 5°C . Không sử dụng môi trường đã pha chế sau 2 tuần.

7 Thiết bị và dụng cụ thuỷ tinh

Thiết bị và dụng cụ bình thuỷ tinh của phòng thí nghiệm vi sinh thông thường, và

7.1 Bình thuỷ tinh (Erlenmeyer Flask, bình đáy tròn hoặc bình nón) có dung tích 2 lít.

7.2 Ống thử 160 mm x 16 mm.

7.3 Pipet chia độ, có dung tích 10 ml có vạch chia 0,1 ml.

7.4 Pipet có dung tích 10 ml.

7.5 Bình dung tích 1 lít.

7.6 Bình hơi.

7.7 Nối cách thuỷ.

7.8 Thiết bị lọc màng.

7.9 Màng lọc vô trùng có kích thước lỗ danh định $0,2 \mu\text{m}$.

Chú thích – Chất lượng của màng lọc có thể khác nhau theo từng nhãn hiệu thậm chí theo từng lô sản xuất, do đó nên kiểm tra chất lượng trên cơ sở qui định của ISO 7704.

7.10 Tủ ấm, có thể duy trì được nhiệt độ ở $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

7.11 Đĩa petri.

8 Lấy mẫu

Theo TCVN 5992 – 1995 (ISO 5667/2) Chất lượng nước – Lấy mẫu và ISO 8199 về kỹ thuật lấy mẫu.

9 Cách tiến hành

9.1 Xử lý mẫu

Theo TCVN 5993 – 1995 (ISO 5667/3). Chất lượng nước – Lấy mẫu – Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu và ISO 8199.

9.2 Chọn lọc các bào tử (kỹ thuật)

Trước khi thử, mẫu nước cần đun nóng trong nồi cách thủy ở $75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút kể từ lúc đạt được nhiệt độ trên. Cần định kỳ sử dụng một chai chứa cùng một thể tích như mẫu thử để kiểm tra đối chứng nhằm kiểm tra thời gian đun nóng cần thiết. Nhiệt độ của nước trong chai đối chứng có thể được ghi lại bằng nhiệt kế.

9.3 Cấy mẫu và nuôi ấ

Tham khảo ISO 7704 về mô tả chung của kỹ thuật màng lọc.

Theo hướng dẫn của tài liệu trên, lọc một thể tích nước thích hợp. Đối với nước uống, nước suối, và nước giếng, nước khoáng, nước biển và nước bề mặt, ít nhiễm bẩn bởi clostridia thì lọc 100 ml; đối với nước bị ô nhiễm nặng hoặc nước thải thì dùng một thể tích nhỏ hơn. Thể tích nước ít hơn 10 ml thì nên trộn với 10 đến 100 ml nước hoặc dịch pha loãng đã khử trùng.

Điều chỉnh các dịch pha loãng sao cho các quả khuẩn lạc đen tách biệt ra và dễ dàng đếm được.

Sau khi lọc, tháo màng bằng kẹp đã khử trùng và đặt úp lên đáy của đĩa petri, đảm bảo sao cho không có bọt khí được tạo thành dưới màng lọc. Sau đó cẩn thận rót 18 ml môi trường nuôi cấy đã hoàn toàn hoá lỏng trước đó đã được làm nguội đến khoảng 50°C qua màng lọc trong khi vẫn giữ kẹp thanh trùng. Sau khi đã tạo được lớp môi trường, ủ kỵ khí hoặc dưới điều kiện khác mà đảm bảo kỵ khí ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong $20\text{ h} \pm 4\text{ h}$ và $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$. Nếu dùng tủ ấ hoặc bình kỵ khí thì màng lọc có thể đặt lên bề mặt của thạch với mặt đếm để hướng lên trên.

9.4 Biểu thị kết quả

Đếm tất cả các khuẩn lạc đen sau khi ủ $20\text{ h} \pm 4\text{ h}$ và $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$.

TCVN 6191-2 : 1996

10 Tính toán kết quả

Tính toán kết quả theo ISO 8199.

11 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả cần nói rõ phương pháp đã sử dụng, kết quả biểu thị bằng số vi khuẩn kỵ khí khử sunphit (clostridia) trong một đơn vị thể tích mẫu. Thông thường việc đếm được tiến hành ở $44^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$. Nếu điều đó không thể thực hiện được thì đếm ở $20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ và kết quả chỉ được coi là kết quả xấp xỉ.

Báo cáo kết quả phải nêu bất kỳ chi tiết thao tác nào mà không qui định trong tiêu chuẩn này hoặc những chi tiết bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Báo cáo kết quả cần phải bao gồm các thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu.