

4 Định nghĩa

4.1 Liên cấu phân giả định: Là các vi khuẩn cho phản ứng dương tính với môi trường (6.2.1 và 6.2.2) qui định trong phần này của tiêu chuẩn.

4.2 Liên cấu phân: Là các vi khuẩn cho phản ứng dương tính với môi trường (6.2.3) qui định trong phần này của tiêu chuẩn và cho phản ứng âm tính trong phép thử catalaza.

5 Nguyên tắc và phản ứng

5.1 Lọc, nuôi cấy và đếm

Đếm liên cấu phân dựa trên việc lọc một thể tích xác định của mẫu nước qua một màng lọc có kích thước lỗ (0,45 μm) thích hợp để giữ lại các vi khuẩn. Màng lọc được đặt vào môi trường đặc chọn lọc chứa natri nitrua (để ngăn sự sinh trưởng của các vi khuẩn Gram âm) và 2,3,5 – triphenyltetrazoli clorua liên cấu phân sẽ khử thuốc nhuộm không màu thành focmazan màu đỏ.

Sau khi nuôi cấy tất cả các khuẩn lạc đã mọc sẽ cho màu đỏ, màu hạt dẻ hoặc màu hồng, các khuẩn lạc hoặc từ trung tâm, hoặc trong suốt toàn bộ các khuẩn lạc được đếm là liên cấu phân giả định.

5.2 Kháng định

Có thể thử kháng định trên môi trường chọn lọc nữa nếu thấy cần.

Môi trường kháng định, thạch mật asculin-nitrua, được nuôi trong 48 giờ ở nhiệt độ 44°C. Liên cấu phân phát triển trong môi trường này và thủy phân asculin, sản phẩm cuối cùng, 6,7 – dihydroxycoumarin sẽ kết hợp với ion sắt (III) cho hợp chất màu nâu vàng tới đen và khuếch tán vào môi trường.

Ngoài ra, tiến hành một phép thử catalaza đối với các khuẩn lạc nghi ngờ trên môi trường kháng định.

Những khuẩn lạc cho phản ứng asculin dương tính và phép thử catalaza âm tính thì có thể coi là liên cấu phân.

6 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

Cảnh báo: Tất cả các môi trường chọn lọc được trình bày trong tiêu chuẩn này đều chứa natri nitrua (NaN_3). Do chất này rất độc và có tính gây đột biến, vì vậy phải hết sức cẩn thận khi tiếp xúc với nó, đặc biệt tránh hít phải các bụi nhỏ trong khi pha chế các môi trường hoàn chỉnh khô dạng bán sẵn. Các môi trường chứa nitrua không được trộn lẫn với các axit vô cơ mạnh vì có thể tạo thành chất độc hidro nitrua (HN_3). Các dung dịch chứa nitrua cũng có thể tạo thành các hợp chất gây nổ khi tiếp xúc với các ống dẫn bằng kim loại, thí dụ trong các bồn rửa.

Chất lượng nước – Phát hiện và đếm khuẩn liên cầu phân

Phần 2: Phương pháp màng lọc

Water quality – Detection and enumeration of faecal streptococci

Part 2: Method by membrane filtration

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp để phát hiện và đếm liên cầu khuẩn phân trong nước bằng cách lọc qua màng.

2 Lĩnh vực áp dụng

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

3 Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 5667-1 Chất lượng nước – Lấy mẫu. Hướng dẫn xây dựng các phương án lấy mẫu;

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 7704 Chất lượng nước – Đánh giá màng lọc dùng để phân tích vi sinh.

6.1 Các nguyên liệu chính

Để cho kết quả đồng nhất trong khi pha chế các môi trường cần sử dụng các thành phần có chất lượng đồng nhất và các hóa chất thuộc loại phân tích hoặc môi trường hoàn chỉnh khô. Natri nitrua sẽ bị phân hủy theo thời gian vì vậy các môi trường khô chỉ có thời hạn sử dụng nhất định. Chỉ dùng nước cất hoặc nước tinh khiết có chất lượng tương đương.

6.2 Môi trường nuôi cấy

6.2.1 Thạch KF – streptococcus (Kenner)

6.2.1.1 Môi trường cơ bản

Proteose pepton	10,0 g
Cao men	10,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Natri glycerophotphat	10,0 g
Mantoza	20,0 g
Lactoza	1,0 g
Natri nitrua (NaN ₃)	0,4 g
Bromocresol tía [dung dịch cồn etanol (15 g/l)]	1 ml
Thạch	12 - 20 g ¹⁾
Nước	1 000 ml

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách đun sôi trong nồi cách thủy.

Sau khi hòa tan hoàn toàn, đun thêm 5 phút.

Để nguội đến 50°C - 60°C.

6.2.1.2 Dung dịch TTC

2,3,5 - triphenyltetrazolium clorua	1 g
Nước	100 ml

Hòa tan thuốc nhuộm trong nước bằng cách lắc.

¹⁾ Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

TCVN 6189 - 2 : 1996

Khử trùng bằng cách lọc (màng lọc có kích thước lỗ 0,22 μm).

Bảo quản dung dịch khỏi tác động của ánh sáng.

6.2.1.3 Dung dịch hoàn chỉnh

Dung dịch cơ bản (6.2.1.1) 1 000 ml

Dung dịch TTC (6.2.1.2) 10 ml

Thêm dung dịch TTC vào dung dịch cơ bản đã được làm nguội đến $50^{\circ}\text{C} + 60^{\circ}\text{C}$. TTC kém bền vững với nhiệt vì vậy tránh để quá nhiệt độ trên.

Nếu cần, điều chỉnh pH đến 7,2 bằng dung dịch natri cacbonat đã khử trùng (100 g/l).

Rót môi trường vào đĩa petri để có được độ dày môi trường ít nhất 3 mm và để yên trên một mặt phẳng nằm ngang, chỗ mát.

Các đĩa này có thể bảo quản đến 30 ngày trong chỗ tối ở $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

6.2.2 Thạch m-enterococcus (Slanetz và Bartley)

6.2.2.1 Môi trường cơ bản

Tryptoza	20,0 g
Cao men	5,0 g
Glucosa	2,0 g
Dikali hidrophotphat (K_2HPO_4)	4,0 g
Natri nitrua (NaN_3)	0,4 g
Thạch	15,0 g
Nước	1 000 ml

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách đun trong nồi cách thủy.

Sau khi hòa tan hoàn toàn đun thêm 5 phút.

Làm nguội đến $50^{\circ}\text{C} + 60^{\circ}\text{C}$.

6.2.2.2 Dung dịch TTC

Xem 6.2.1.2.

6.2.2.3 Môi trường hoàn chỉnh

Môi trường cơ bản (6.2.2.1) 1 000 ml

TCVN 6189 - 2 : 1996

7.1 Thiết bị màng lọc.

7.2 Màng lọc khử trùng với kích thước lỗ danh định 0,45 μm

Chất lượng màng lọc của các hãng và giữa các lô có thể khác nhau, Do đó, nên kiểm tra chất lượng theo qui định của ISO 7704.

7.3 Tủ ấm, có thể duy trì được nhiệt độ ở $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hoặc $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

7.4 Tủ ấm, có thể duy trì được nhiệt độ ở $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

7.5 Nồi hấp áp lực, có thể duy trì được nhiệt độ $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

8 Lấy mẫu

Xem ISO 5667-1; TCVN 5992 : 1995 (ISO 5667-2) và TCVN 5993 : 1995 (ISO 5667-3).

9 Cách tiến hành

9.1 Xử lý mẫu

Các qui trình chung như việc xử lý mẫu nước và chuẩn bị các dung dịch pha loãng sẽ được xây dựng thành các tiêu chuẩn trong thời gian tới.

9.2 Lọc và nuôi cấy

Các qui định chung của kỹ thuật màng lọc sẽ được xây dựng thành tiêu chuẩn trong thời gian tới.

Lọc một thể tích nước thích hợp.

Đặt màng lọc lên mặt thạch - KF streptococcus (6.2.1) hoặc thạch m-enterococcus (6.2.2).

Nuôi các đĩa ở $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hoặc ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 44 giờ \pm 4 giờ.

9.3 Đếm

Sau khi nuôi, đếm tất cả các khuẩn lạc đã mọc có màu nâu đỏ hoặc màu hồng từ trung tâm hoặc toàn bộ khuẩn lạc. Các khuẩn lạc này được coi là liên cầu phân giả định.

Chú thích – Đôi khi các vi khuẩn khác nhóm liên cầu khuẩn nhóm D có thể sinh ra loại khuẩn lạc này. Việc nâng nhiệt độ ủ đến $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sau khi ủ giai đoạn đầu ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 5 giờ \pm 1 giờ có thể ngăn ngừa sự sinh trưởng của các loại vi sinh vật này.

9.4 Kháng định

Cấy truyền mẫu đại diện của các khuẩn lạc điển hình lên đĩa môi trường thạch-mật asculin nitrua (6.2.3).

Nuôi ở $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ trong 48 giờ.

Xem xét tất cả các đĩa cho thấy các khuẩn lạc có màu từ nâu đến đen và/hoặc môi trường bao quanh có màu nâu hay đen như là loại cho phản ứng dương tính.

9.5 Phép thử catalaza

Nhỏ một giọt dung dịch oxy già (hidro peoxit) (6.3) lên các khuẩn lạc trên môi trường thạch-mật asculin nitrua (6.2.3). Sự xuất hiện các bọt nhỏ của oxy chứng tỏ các sinh vật catalaza dương tính. Chỉ có các khuẩn lạc catalaza âm tính mới được coi là liên cấu phân.

Chú thích – Để loại trừ các sai lầm do phản ứng catalaza âm tính giả có thể xảy ra trên môi trường thạch-mật asculin nitrua, phép thử này có thể lập lại trên một mẫu cấy truyền lên môi trường không chọn lọc khác.

10 Biểu thị kết quả

Qui định chung về biểu thị kết quả và tính số vi khuẩn có trong mẫu sẽ được xây dựng thành tiêu chuẩn trong thời gian tới.

11 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả bao gồm các thông tin sau:

- a) tham khảo tiêu chuẩn này;
- b) mọi chi tiết cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu;
- c) môi trường chọn lọc, nhiệt độ nuôi cấy, và bất kỳ phép thử kháng định nào đã sử dụng;
- d) kết quả như đã nêu ở điều 10 theo số liên cấu phân giả định trên một thể tích mẫu;
- e) số khuẩn lạc đã thử cũng như số liên cấu phân được kháng định.

Dung dịch TTC (6.2.2.2) 10 ml

Thêm dung dịch TTC vào dung dịch cơ bản đã làm nguội đến $50^{\circ}\text{C} + 60^{\circ}\text{C}$.

Nếu cần, điều chỉnh pH đến 7,2 bằng dung dịch natri cacbonat (100 g/l).

Rót 20 ml vào các đĩa Petri đường kính 9 cm (hoặc lượng tương đương vào các đĩa có kích thước khác) và để yên trên một mặt phẳng nằm ngang, chỗ mát.

Các đĩa này có thể bảo quản đến 30 ngày trong chỗ tối ở $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

6.2.3 Thạch – Mật asculin - nitrua

Trypton	17,0 g
Pepton	3,0 g
Cao men	5,0 g
Mật bò khô	10,0 g
Natri clorua	5,0 g
Asculin	1,0 g
Amoni-sắt (III) xitrat	0,5 g
Natri nitrua (NaN_3)	0,15 g
Thạch	12- 20 g ¹⁾
Nước	1 000 ml

Hòa tan các thành phần trong nước bằng cách đun sôi.

Điều chỉnh pH sao cho sau khi khử trùng pH là $7,1 \pm 0,1$ ở 25°C .

Phân phối vào các chai có dung tích 500 ml, có nút xoáy, mỗi chai 250 ml.

Khử trùng 15 phút ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Làm nguội đến $50^{\circ}\text{C} + 60^{\circ}\text{C}$ và rót vào các đĩa Petri sao cho độ dày môi trường ít nhất 3 mm và để yên trên một mặt phẳng nằm ngang, chỗ mát.

6.3 Hidro peroxit, dung dịch 30 g/l.

7 Thiết bị

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

¹⁾ Theo hướng dẫn của nhà sản xuất.