

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 6187-2 : 1996

ISO 9308-2: 1990 (E)

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC - XÁC ĐỊNH - PHÁT HIỆN VÀ ĐẾM VI KHUẨN
COLIFORM, VI KHUẨN COLIFORM CHỊU NHIỆT VÀ
ESCHERICHIA COLI GIẢ ĐỊNH**

**PHẦN 2. PHƯƠNG PHÁP NHIỀU ỐNG
(SỐ CÓ XÁC SUẤT CAO NHẤT)**

*Water quality - Detection and enumeration of organisms thermotolerant
coliform organisms and presumptive Escherichia coli
Part 2: Multiple tube (most probable number) method*

HÀ NỘI - 1996

TCVN 6187-2:1996

Lời nói đầu

TCVN 6187-2: 1996 hoàn toàn tương đương với ISO 9308-2: 1990 (E)

TCVN 6187-2: 1996 do Tiểu ban kỹ thuật nước tinh lọc TCVN/TC/F9/SC1 thuộc Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F9 Đồ uống biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn- Đo lường - Chất lượng đề nghị. Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

Chất lượng nước - Xác định - Phát hiện và đếm vi khuẩn coliform, vi khuẩn coliform chịu nhiệt và *Escherichia coli* giả định

Phần 2. phương pháp nhiều ống (số có xác suất cao nhất)

Water quality - Detection and enumeration of organisms thermotolerant coliform organisms and presumptive Escherichia coli

Part 2: Multiple tube (most probable number) method

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp để phát hiện và đếm số lượng vi khuẩn coliform, coliform chịu nhiệt và *Escherichia coli* giả định có trong nước bằng cách nuôi cấy trong một môi trường lỏng ở một hệ gồm nhiều ống nghiệm và tính toán "số có xác suất cao nhất" của chúng có trong mẫu thử.

Phương pháp này có thể áp dụng cho mọi loại nước, kể cả các loại nước có chứa một lượng đáng kể vật chất lơ lửng. Việc lựa chọn các phép thử dùng để phát hiện và xác nhận các vi khuẩn nhóm coliform, kể cả *Escherichia coli*, có thể được xem như là bộ phận của một dãy liên tiếp. Quy mô của việc xác nhận với một mẫu thử riêng biệt nào đó, một phần tùy thuộc vào bản chất của mẫu nước và phần khác vào những lý do kiểm tra.

trong thực tế, việc xác định *E. coli* giả định trong nước được nêu ở điều 3.3 của tiêu chuẩn này, thông thường là để cung cấp một chứng cứ của sự ô nhiễm phân.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 3696:1987 Nước dùng cho phòng thí nghiệm phân tích. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

ISO 5667 -1: 1980 Chất lượng nước - Lấy mẫu. Phần 1: Hướng dẫn xây dựng các phương án lấy mẫu.

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

TCVN 6187-2:1996

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

ISO 6887:1983 Vi sinh học - Hướng dẫn chung về chuẩn bị các dịch pha loãng để kiểm tra vi sinh vật.

ISO 8199:1983 Chất lượng nước -Hướng dẫn chung về đếm số lượng vi sinh vật bằng cách nuôi cấy.

3. Định nghĩa

Đối với mục đích của tiêu chuẩn này, áp dụng các định nghĩa sau:

3.1 Vi khuẩn coliform: Là các sinh vật có khả năng sinh trưởng hiếu khí ở nhiệt độ hoặc $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ hoặc $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ trong một môi trường nuôi cấy có lactoza thể lỏng, kèm theo việc tạo thành axit và sinh khí trong vòng 48 h.

3.2 Các vi khuẩn coliform chịu nhiệt: Là các vi khuẩn coliform như đã mô tả ở mục 3.1, có cùng đặc tính lên men trong vòng 24 h, ở nhiệt độ $44^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$ hoặc $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$.

3.3 Escherichia coli giả định: Là các vi khuẩn coliform chịu nhiệt như đã mô tả ở mục 3.2 mà cũng sinh indol từ tryptophan trong vòng 24 h, hoặc $44^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$ hoặc $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$.

4. Nguyên tắc

Cấy các phần mẫu thử, đã được pha loãng hoặc không pha loãng vào một dây ống nghiệm chứa một môi trường nuôi cấy chọn lọc dạng lỏng có lactoza.

Kiểm tra các ống thử sau 24 h và 48 h nuôi ở nhiệt độ hoặc 35°C hoặc 37°C ; cấy chuyển tiếp từ mỗi ống có biểu hiện đục kèm theo sinh khí vào một môi trường khẳng định chọn lọc hơn và khi muốn tìm E.coli giả định cấy vào một môi trường mà qua đó có thể quan sát thấy sự tạo thành indol.

Nuôi các môi trường khẳng định này cho tới 48 h ở nhiệt độ hoặc 35°C hoặc 37°C để phát hiện các vi khuẩn coliform, và ở 44°C trong khoảng 24 h để phát hiện các loại coliform chịu nhiệt và E.coli giả định.

Bằng các bảng thống kê, tính toán số xác xuất cao nhất của các dạng coliform,

coliform chịu nhiệt và E.coli giả định có thể có mặt trong 100 ml mẫu thử, từ số các ống thử kết quả xác nhận dương tính.

5. Dịch pha loãng, môi trường nuôi cấy và thuốc thử

5.1 Các dạng nguyên liệu chính

Hãy sử dụng các thành phần có chất lượng đồng nhất và các hoá chất thuộc loại phân tích để pha chế các môi trường nuôi cấy và thuốc thử và tuân theo các chỉ dẫn đã cho trong phụ lục B. Đối với các thông tin về việc bảo quản, xem trong ISO 8199. Mặt khác, sử dụng các môi trường hoàn chỉnh dạng khô và theo sát các chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Để pha chế các môi trường, sử dụng nước cất bằng dụng cụ thuỷ tinh hoặc nước đã loại ion, không chứa các chất có thể ức chế sinh trưởng của vi khuẩn trong các điều kiện thử và phù hợp với ISO 3696.

5.2 Dịch pha loãng

Để tạo nên các độ pha loãng của mẫu thử, sử dụng một trong các dịch pha loãng được kiến nghị ở phụ lục B. Chuẩn bị dịch pha loãng theo chỉ dẫn đã cho trong phụ lục B.

5.3 Môi trường phân lập

Sử dụng một trong các môi trường nuôi cấy dưới đây, các hướng dẫn về chuẩn bị môi trường đưa ra trong phụ lục A.

5.3.1 Canh thang lactoza

5.3.2 Canh thang macConkey

5.3.3 Môi trường²⁾ glutamat-lactoza-format cải tiến²⁾

5.3.4 Canh thang lauryl- tryptoza (lactoza)

5.4 Môi trường khẳng định

Sử dụng một hoặc một số các môi trường sau:

5.4.1 Các môi trường kiểm tra tính sinh khí;

5.4.1.1 Các thang lục sáng-lactoza (mật)

5.4.1.2 Môi trường EC

5.4.2 môi trường kiểm tra tính sinh indol:

²⁾ Có sẵn ở dạng thương phẩm khô "môi trường glutamat cải tiến có muối kháng". Thông tin này được đưa ra vì tính tiện lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không tạo nên một sự xác nhận của tiêu chuẩn về sản phẩm này.

TCVN 6187-2:1996

Nước trypton.

5.4.3 Môi trường ống đơn, để kiểm tra cả tính sinh khí và sinh indol:

Canh thang tryptoza-mannitol-lauryl có tryptophan.

5.5 Thuốc thử

5.5.1 Thuốc thử kovac để thử indol

5.5.2 Thuốc thử oxidaza để dùng cho phép thử oxidaza.

6. Thiết bị

Các thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm vi sinh gồm có:

6.1 Tủ sấy hơi nóng để khử trùng khô và một nồi hấp áp lực.

Ngoài các thiết bị vô trùng sẵn, thiết bị thủy tinh và các trang bị khác cần được khử trùng theo chỉ dẫn đã nêu trong ISO 8199.

6.2 Tủ ấm hoặc bể điều nhiệt, có thể điều chỉnh được ở nhiệt độ hoặc $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, hoặc $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

6.3 Tủ ấm hoặc bể điều nhiệt, có thể điều chỉnh được ở nhiệt độ hoặc $44^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$, hoặc $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.25^{\circ}\text{C}$.

6.4 pH mét.

7. Lấy mẫu

Lấy mẫu và chuyển về phòng thí nghiệm theo ISO 8199, ISO 5667, TCVN 5992:1995 (ISO 5667-2) và TCVN 5993:1995 (ISO 5667-3).

8. Cách tiến hành

8.1 Chuẩn bị mẫu thử và các môi trường cấy

Để chuẩn bị mẫu thử, tiến hành pha loãng mẫu và cấy vào môi trường phân lập các phần mẫu thử, theo như các chỉ dẫn đã cho ở ISO 8199. Đối với các phần mẫu thử có thể tích lớn hơn 5 ml, sử dụng các ống môi trường phân lập nồng độ kép.

8.2 Nuôi các ống thử

Nuôi các ống môi trường đã cấy mẫu trong 48 h ở nhiệt độ $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, hoặc $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

8.3 Kiểm tra các ống thử

Kiểm tra các ống mẫu lấy sau 18 ÷ 24 h nuôi ấmvà coi là có phản ứng dương tính đối với các ống có biểu hiện đục do vi khuẩn sinh trưởng và sinh khí bên trong các ống lộn ngược (ống Durham), cùng với việc tạo thành axit nếu trong môi trường phân lập có chứa một chỉ thị pH.

Nuôi tiếp trong tủ ống những ống nghiệm chưa có bất kỳ dấu hiệu nào hoặc mọi biến đổi nói trên và kiểm tra lại chúng sau 48 h để tìm phản ứng dương tính.

8.4 Các phép thử khẳng định

Điều quan trọng cần lưu ý là các phản ứng dương tính trong các ống môi trường phân lập thì chỉ là kết quả giả định về coliform. Do đó cần phải tiến hành các phép thử xác nhận, tốt hơn là trên các chủng cấy thuần khiết.

8.4.1 Cấy truyền, nuôi ấmvà kiểm tra

Cấy truyền từ mỗi ống môi trường phân lập có kết quả dương tính vào một hoặc một số ống môi trường khẳng định (5.4) tìm tính sinh khí và sinh indol.

Chú thích: - Nếu môi trường ức chế tối thiểu nhất (canh thang lactoza) được dùng để phân lập, thì nên cấy truyền tiếp vào cả hai trong số các môi trường khẳng định chọn lọc hơn (canh thang lục sáng- lactoza (mật) hoặc canh thang EC) để khẳng định.

8.4.1.1 Vi khuẩn coliform

Để khẳng định sự có mặt của vi khuẩn coliform chịu nhiệt, nuôi một ống môi trường EC khác (5.4.1) ở nhiệt độ 44°C trong 24 h và kiểm tra tính sinh khí.

Để khẳng định sự có mặt của E.coli giả định cấy vào ống trypton (5.4.2) để tạo indol ở 44°C trong vòng 24h. Sau đó thêm 0.2 ml ÷ 0.3 ml thuốc thử kovac (5.5.1) vào ống nước trypton (đã cấy mẫu): Việc xuất hiện một màu đỏ sau khi lắc nhẹ chứng tỏ sự có mặt của indol._

Chú thích

2. Việc sử dụng canh thang lauryl-trypto-mannit có tryptophan cho phép sự hình thành indol và sinh khí do E.coli giả định được thể hiện trong một ống đơn;

TCVN 6187-2:1996

3. Việc phát hiện E.coli giả định được xem như là chứng cứ đảm bảo về sự ô nhiễm phân. tuy nhiên các phép thử sâu hơn để khẳng định E.coli có thể phải được tiến hành nếu xét thấy cần thiết (xem 8.5);

4. Khi cấy truyền từ các khuẩn lạc trên màng lọc vào các ống môi trường khẳng định, tốt hơn cũng nên cấy lên một đĩa môi trường thạch dinh dưỡng để thử oxidaza.

8.5 Phép thử oxidaza

Một vài chủng vi khuẩn tìm thấy trong nước cũng có thể phù hợp với định nghĩa về vi khuẩn coliform ở hầu hết các mặt, nhưng chúng chỉ có khả năng sinh khí từ lactoza, ở nhiệt độ dưới 37°C mà thôi. Do đó chúng cho các kết quả âm tính trong phép thử khẳng định chuẩn đối với vi khuẩn coliform và sự hiện diện của chúng trong nước thì thường thường không được coi là đáng kể. Các chủng aeromonas, xuất hiện một cách tự nhiên trong nước, gây nhiều cho việc xác định chỉ ở nhiệt độ 37°C và thấp hơn, việc khẳng định bằng phép thử oxidaza chỉ cần đến khi xác định coliform.

8.5.1 Tiến hành phép thử oxidaza với các giống cây thuần khiết từ các vi khuẩn lên men lactoza, mọc trên môi trường thạch dinh dưỡng, như sau:

- nhỏ 2 hoặc 3 giọt thuốc thử oxidaza (5.5.2) mới được chuẩn bị lên một miếng giấy lọc trong một đĩa Petri;
- bằng que cấy thuỷ tinh, tăm bông hoặc que cấy có dây bạch kim (không phải loại Ni-crom), dàn mỏng một ít mẫu cấy lên trên giấy lọc được chuẩn bị sẵn (xem chú thích 4).
- quan sát thấy xuất hiện một màu xanh-tím sẫm trong vòng 10 giây là phản ứng dương tính.

Chú thích - Trong mỗi trường hợp sử dụng thuốc thử oxidaza cần thực hiện các phép thử kiểm tra với mẫu cấy một loại vi khuẩn cho phản ứng dương tính và một loại cho phản ứng âm tính (E.coli) đã biết trước.

9. Biểu thị kết quả

Từ số ống môi trường phân lập và các phép thử khẳng định cho các kết quả dương tính, tính toán, bằng cách tham khảo các bảng tra thống kê trong ISO 8199, số xác suất cao nhất của vi khuẩn coliform chịu nhiệt và E.coli giả định có trong 100 ml mẫu thử.

10 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả gồm những thông tin sau:

- a) tham khảo tiêu chuẩn này.
- b) mọi chi tiết cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử.
- c) kỹ thuật và môi trường phân lập đã dùng.
- d) các môi trường và các phép thử khẳng định đã dùng.
- e) thời gian, nhiệt độ và các điều kiện nuôi cấy.
- f) các kết quả trình bày phù hợp với điều 9.
- g) bất kỳ một thông tin nào khác liên quan tới phương pháp.

Phụ lục A

(Tham khảo)

**THÔNG TIN SÂU HƠN VỀ VI SINH HỌC LIÊN QUAN TỚI KIỂM TRA NƯỚC ĐỐI VỚI
NHÓM VI KHUẨN COLIFORM**

Đối với các mục đích kiểm tra nước hàng ngày, nhóm vi khuẩn coliform có thể được mô tả bằng các thuật ngữ vi sinh chung, không mang tính phân loại học, như sau:

Các vi khuẩn coliform là các vi khuẩn hình que (dạng thẳng), gram âm, không có bào tử, oxidaza âm tính; chúng có khả năng sinh trưởng hiếu khí và kỵ khí không bắt buộc trong sự có mặt của muối mật (hoặc các yếu tố tác động bề mặt khác có đặc tính ức chế sinh trưởng tương tự). Chúng cũng có thể lên men lactoza và (mannit) kèm theo tạo thành axit, khí và andehyt trong vòng 48 h, khi nuôi cấy ở nhiệt độ 35°C đến 37°C.

Các vi khuẩn coliform chịu nhiệt là các vi khuẩn coliform cho thấy có cùng khả năng lên men và các đặc tính sinh hoá khi nuôi cấy ở nhiệt độ 44°C đến 44.5°C. E.coli giả định là các vi khuẩn coliform chịu nhiệt, chúng cũng có khả năng sinh indol từ tryptophan.

E.coli có thể được xem là E.coli giả định, chúng cũng có một kết quả dương tính trong phép thử metyl đỏ và có thể loại cacboxyl của axit glutamic, nhưng chúng không có khả năng tạo ra metyl axetyl cacbonol, sử dụng xitrat như nguồn cacbon duy nhất, hoặc sinh trưởng trong canh thang kali xyanua (KCN).

Phụ lục B

(Than khảo)

**CÁC MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY, THUỐC THỬ VÀ NƯỚC PHA LOÃNG MÔI TRƯỜNG
PHÂN LẬP***- Canh thang lactoza*

Môi trường nồng độ kép:

Pepton 10 g
Lactoza 10 g
Cao thịt bò 6 g
Nước cất 1000 ml

Hoà tan các thành phần trên trong nước sôi. Nếu cần, chỉnh pH sao cho khi khử trùng pH = 6.9 ± 0.2.

Pha chế môi trường nồng độ đơn bằng cách pha loãng môi trường nồng độ kép với một thể tích nước cất tương đương.

- Canh thang MacConkey

Môi trường nồng độ kép:

Muối mật 10 g
Pepton 40 g
Lactoza 20 g
Natri clorua 10 g
Bromo cresol (hoặc Cresol)
tía dung dịch 1% (thể tích/ thể tích)
pha loãng trong etanol 2 ml
Nước cất 1000 ml

TCVN 6187-2:1996

Hoà tan pepton, natri clorua và muối mật trong nước bằng cách đun nóng và giữ ở 4°C qua đêm. đem lọc khi dung dịch vẫn còn lạnh, bổ sung lactoza và hoà tan. Chỉnh pH đến 7,4 ± 0.2 và bổ sung bromocresol tía.

Môi trường nồng độ đơn:

Chuẩn bị môi trường nồng độ đơn bằng cách pha loãng môi trường nồng độ kép với một thể tích nước cất tương đương, hoặc có thể làm riêng bằng cách giảm một nửa lượng các chất trong thành phần.

Phân phối môi trường nồng độ đơn thành các lượng 5 ml/một ống và môi trường nồng độ kép thành từng lượng 10 ml và 50 ml. Mỗi ống nghiệm hoặc lọ thuỷ tinh đậy nắp dụng cần có mang một ống lên men lộn ngược (durham). Hấp áp lực ở 150°C trong 10 phút.

- *Môi trường format-lactoza-glutamat cải tiến³⁾*

Môi trường nồng độ kép:

Lactoza 20 g	Canxi clorua(CaCl ₂ .2H ₂ O) 0.02 g
L (+) Muối natri glutamat 12.7 g	Vẩy sắt(III) Xitrat 0.02 g
L (+) Arginin monohidro clorua 0.048 g	Thiamin(aneurin hidroclorua) 0.002 g
L (-) Aspartic axit 0.04 g	Axit nicotic 0.002 g
L (-) Xystin 0.04 g Natri format 0.5 g	Axit Pantotenic 0.002 g
Dikali hidro photphat 1.8 g	Bromocressol tía
Amoni clorua 5 g	{ dung dịch 1%(khối lượng/khối lượng)
Magie sunfat (MgSO ₄ .7H ₂ O) 0.02 g	trong cồn etanol} 2 ml
	Nước cất 1000 ml

Tiện lợi hơn cả, nên chuẩn bị môi trường này với lượng là 10 lit hoặc nhiều hơn. Nếu như không phân phối ngay vào các ống nghiệm, thì để lactoza và thiamin ở ngoài, không pha, và bổ sung chúng ngay trước khi phân phối. Để cho tiện hơn, một vài thành phần được bổ

³⁾ Có bán sẵn ở dạng khô "môi trường glutamat đã điều chỉnh khoáng". Cũng có thể cần điều chỉnh PH

sung vào môi trường ở dạng các dung dịch riêng rẽ và các dung dịch này sẽ được chuẩn bị như sau:

Dung dịch 1:

L (+) Arginin monohidro clorua 0.4 g
L (-) Aspartic axit 0.48 g
Nước cất 50 ml

Đun nóng để hoà tan hoàn toàn.

Dung dịch 2:

L (-) Xystin 0.4 g
Natri hidroxit (5mol/l) 10 g
Nước cất 90 ml

Đun nóng để hoà tan.

3) Có bán sẵn ở dạng khô "môi trường glutamat đã điều chỉnh khoáng". Cũng có thể cần điều chỉnh pH.

Dung dịch 3:

Axit nicotic 0.02 g
Axit Pantotenic 0.02 g
Nước cất 5 ml

Hoà tan mà không đun nóng.

Dung dịch 4:

Vảy sắt(III) Xitrat 0.2 g
Nước cất 10 ml

Đun nóng để hoà tan.

Dung dịch 5:

TCVN 6187-2:1996

Canxi clorua($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2 g

Nước cất 100 ml

Axit clohidric đậm đặc 0.1 ml

Hoà tan không cần đun nóng, và khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Bảo quản để làm dung dịch gốc.

Dung dịch 6: Khử trùng dung dịch thiamin 0.1% trong nước cất.

Tốt nhất, nên pha chế dung dịch này bằng cách: Thêm lượng chứa trong một ống ampul (100 ml), một cách vô trùng, vào 99 ml vào nước cất vô trùng. Bảo quản dung dịch ở 4°C và loại bỏ sau 6 tuần lễ.

Để chuẩn bị 10 lit môi trường nồng độ kép, hoà tan các lượng tương ứng của L (+) muối natri glutamat, natri focmat, dikali hidro photphat, amoni clorua và magie sunphat trong 9 lit nước cất nóng. Sau đó bổ sung toàn bộ các dung dịch 1, 2, 4, và 4 ml của dung dịch 5. Chỉnh pH tới 6.8 hoặc cao hơn nếu thấy cần thiết, sao cho pH cuối cùng, sau khi hoàn chỉnh và khử trùng môi trường, là 6.7. Nếu dùng cùng loại thiết bị và phương pháp khử trùng, thì sẽ có cùng một sự thay đổi về pH luôn xảy ra trong quá trình khử trùng. Có thể cần đến một vài phép thử sơ bộ để tạo được pH chính xác trước khi khử trùng.

Sau khi chỉnh pH, thêm 20 ml dung dịch bromo cresol tía 1% etanol với khoảng 810 ml nước cất, bổ sung cho đến thể tích cuối cùng là 10 lit. Nếu lượng môi trường này không cần sử dụng ngay, cho vào các chai dung tích 500 ml và đem hấp áp lực ở 115°C trong 10 phút. Khi dùng đến, bổ sung lượng cần thiết cho dung dịch lactoza và thiamin (dung dịch 6), để cho tan đều và sau đó phân phối thành từng lượng 10 ml và 50 ml. Mỗi ống nghiệm và lọ được sử dụng cần mang một ống lên men lộn ngược (ống Durham). Điều quan trọng là cần bảo đảm sau khi hấp và trước khi sử dụng, ống Durham này chứa đầy môi trường. Nếu không sẽ tạo nên một kết quả dương tính giả mạo về tính sinh khí. Khử trùng ở nhiệt độ 115°C trong 10 phút hoặc đặt vào một nồi hơi nước ở 100°C trong 3 ngày, mỗi ngày 30 phút.

Môi trường nồng độ đơn:

Chuẩn bị môi trường nồng độ đơn bằng cách pha loãng môi trường nồng độ kép với một thể tích nước cất tương đương và phân phối thành từng lượng 5ml/ống nghiệm có chứa ống lên men lộn ngược (Durham). Khử trùng ở nhiệt độ 115°C trong 10 phút, hoặc trong luồng hơi nước sôi 100°C trong 3 ngày liên tiếp, mỗi ngày 30 phút.

Chú thích 6 - Việc bổ sung 0.1% casein thuỷ phân axit không có vitamin có thể cho các kết quả nhanh hơn.

- Canh thang lauryl tryptoza (lactoza)

Môi trường nồng độ kép:

<p>Tryptoza 40 g</p> <p>Lactoza 10 g</p> <p>Natri clorua 10 g</p> <p>Dikali hidrophotphat 5.5 g</p> <p>Kali dihidrophotphat 5.5 g</p> <p>Natri lauryl sunphat, độ tinh khiết cao 0.2 g</p> <p>Nước cất 1000 ml</p>
--

Cho tryptoza, natri clorua, lactoza và muối photphat vào nước và đun nóng để hoà tan. Bổ sung natri lauryl sunphat và trộn nhẹ

nhàng để tránh sủi bọt. Chính pH đến 6.8 ± 0.2 . Chuẩn bị môi trường nồng độ đơn bằng cách pha loãng môi trường nồng độ kép với một thể tích nước cất tương đương.

Phân phối môi trường nồng độ đơn thành từng lượng 5 ml, và môi trường nồng độ kép thành từng lượng 10 ml và 50 ml. Mỗi ống nghiệm hi-loặc lọ nhỏ được sử dụng cần phải có một ống lên men lộn ngược. Hấp áp lực ở 115°C trong 10 phút.

Các môi trường khẳng định

- Canh thang lactoza - lục sáng (mật)⁴⁾ (để kiểm tra tính sinh khí)

4) Môi trường này không phải luôn luôn cho các kết quả lặp lại được, và nên kiểm tra các đặc tính của nó trước khi dùng.

<p>Pepton 20 g</p> <p>Lactoza 10 g</p>
--

⁴⁾ Môi trường này không phải luôn luôn cho các kết quả lặp lại được và nên kiểm tra các đặc tính ức chế của nó trước khi dùng.

TCVN 6187-2:1996

Mật bò (khô) 20 g
Lục sáng (dung dịch 0.1% khối lượng dung dịch nước) 13 ml
Nước cất 1000 ml

Hoà tan pepton trong 500 ml nước cất. Bổ sung 20 g mật bò khô đã hoà tan trong 200 ml nước cất. Dung dịch này cần có độ pH ở khoảng 7.0 đến 7.5. Dùng nước cất đưa thể tích dung dịch lên 975 ml. Thêm lactoza và chỉnh pH đến 7.4. Thêm dung dịch lục sáng và đưa thể tích chúng lên đến 1000 ml bằng nước cất.

Phân phối vào các ống nghiệm có ống lên men lộn ngược (ống Durham), mỗi ống 5 ml, và hấp ở 115°C trong 10 phút.

- *Môi trường EC* (để kiểm tra tính sinh khí)

Tryptoza hoặc tryticaza 20 g
Lactoza 5 g
Hỗn hợp muối mật số 1.5 g
Dikali hidropho (2HPO_4) 4 g
Kali dihydro photphat (KH_2PO_4) 1.5 g
Natri clorua (NaCl) 5 g
Nước cất 1000 ml

Độ pH phải là 6.9 sau khi khử trùng. Trước khi khử trùng, phân phối vào các ống nghiệm với các lượng đủ để ngập trên ống lên men (Durham) lộn ngược, ít nhất ngập phần nào sau khi đã khử trùng.

- *Nước trypton* (để thử phản ứng indol)

Một vài loại pepton cho các kết quả tốt với các phép thử ở 35°C đến 37°C thì lại không thoả mãn với phép thử indol ở 44°C. Người ta thấy tryptol thoả mãn điều đó và kiến nghị dùng nó.

Trypton 20 g

Natri clorua 5 g

Nước cất 1000 ml

Hoà tan các thành phần trên trong nước và chỉnh pH đến 7.5. Phân phối vào từng lượng 5 ml và hấp ở 115°C trong 10 phút.

Chú thích 7 - Việc bổ sung 0.1% (khối lượng m/m) L hoặc DL tryptophan của thể cải thiện tính năng của môi trường.

- Canh thang *Lauryl -trypto-mannit có tryptophan*

(Môi trường ống đơn để kiểm tra cả hai đặc tính: sinh khí và sinh indol)

Tryptoza 20 g

Natri clorua 5 g

Mannitol 5 g

Dikali hidropho $_2\text{HPO}_4$) 2.75 g

Kali dihydro photphat (KH_2PO_4) 2.75 g

Natri lauryl sunphat 0.1 g

L (-) Tryptophan 0.2 g

Nước cất 1000 ml

Cho tryptoza, natri clorua, mannitol, các muối phot phát và tryptophan vào nước và hâm nóng nhẹ để hoà tan. Bổ sung natri lauryl sunphat và trộn nhẹ nhàng để tránh sủi bọt. Chỉnh pH tới 6.8 ± 0.2 . Phân phối vào các ống nghiệm có chứa ống lên men lộn ngược (Durham) ở trong mỗi ống 5 ml. Hấp ở 115°C trong 10 phút.

Các thuốc thử

Thuốc thử kovac về tính sinh indol:

P- dimethylamino 5 g

Cồn amylic 75 ml

Axit clohidric ($\rho = 1.18 \text{ g/l}$) 25 ml
--

TCVN 6187-2:1996

Hoà tan andehyt nói trên trong cồn amylic. Cần thận bổ sung axit đặc vào. Tránh ánh sáng và bảo quản ở 4°C.

Chú thích 8 - Thuốc thử này cần phải có màu vàng nhạt đến nâu nhạt; một vài mẫu cồn amylic không thoả mãn được và cho màu tối với andehyt.

- Thuốc thử oxidaza

Tetramethyl -p -phenylen diamin hidro clorua 0.1 g
Nước cất 10 ml

Thuốc thử này không giữ được và do đó cần phải được pha chế mới ở lượng nhỏ cho mỗi lần sử dụng nếu cần đến nó.

Dịch pha loãng

- Nước pepton (0.1%)

Pepton 1.0 g
Nước cất 1000 g

Hoà tan pepton trong khoảng 950 ml nước. Chỉnh pH bằng dung dịch NaOH hoặc HCl (1 mol/l), sao cho sau khi khử trùng pH là 7.0 ± 0.1 . Thêm nước cất cho đủ 1000 ml, phân phối thành các lượng phù hợp và khử trùng ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

- Dung dịch pepton muối:

Pepton 1.0 g
Natri clorua (NaCl) 8.5 g
Nước cất 1000 ml

Hoà tan các thành phần trên trong khoảng 950 ml nước bằng nước đun sôi. Chỉnh pH bằng dung dịch NaOH hoặc HCl (1 mol/l), sao cho sau khi khử trùng pH là 7.0 ± 0.1 . Thêm nước cất cho đủ 1000 ml, phân phối thành các lượng phù hợp và hấp ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

- Dung dịch Ringer- nồng độ một phần tư

Natri clorua (NaCl) 2.25 g

Kali clorua (KCl) 0.105 g
Canxi clorua, khan 0.12 g
Natri hidro cacbonat 0.05 g
Nước cất 1000 ml

Hoà tan các thành phần trên và phân phối thành các lượng phù hợp. Khử trùng bằng cách hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút. pH cuối cùng phải là 7.0 ± 0.1 .

- Dung dịch đệm photphat

Kali hidro photphat (KH_2PO_4) 42.5 mg
Magie clorua (MgCl_2) 190 mg
Nước cất 1000 ml

Cách pha chế:

a) dung dịch photphat:

Hoà tan 34 g muối photphat trong 500 ml nước cất. Chỉnh pH tới 7.2 ± 0.5 bằng dung dịch NaOH (1 mol/l) và thêm nước cất đến 1000 ml

b) dung dịch magie clorua:

Hoà tan 38 g magie clorua trong 1000 ml nước cất.

Dung dịch cuối cùng.

để sử dụng, thêm 1.25 ml dung dịch photphat a) và 5.0 ml dung dịch magie clorua b) vào 1000 ml nước cất. Phân phối thành các lượng phù hợp và khử trùng bằng cách hấp áp lực ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút. pH cuối cùng phải là 7.0 ± 0.1 .

Môi trường thạch dinh dưỡng:

Cao thịt 1.0 g
Pepton 1.0 g
Natri clorua 5 g

TCVN 6187-2:1996

Thạch 15 g

Cho các thành phần trên vào nước và đun nóng để hoà tan. Chỉnh pH tới khoảng 8.2 bằng NaOH (1 mol/l), và đun sôi trong 10 phút. Làm trong bằng cách lọc và chỉnh pH tới 7.2 đến 7.4. Phân phối vào các lọ dung tích 100 ml và hấp ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.