

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 6189 – 2 : 2009**

**ISO 7899 – 2 : 2000**

Xuất bản lần 2

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC –  
PHÁT HIỆN VÀ ĐẾM KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT –  
PHẦN 2: PHƯƠNG PHÁP LỌC MÀNG**

*Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci –  
Part 2: Membrane filtration method*

HÀ NỘI - 2009



**Lời nói đầu**

**TCVN 6189 – 2 : 2009** thay thế TCVN 6189 – 2 : 1996.

**TCVN 6189 – 2 : 2009** hoàn toàn tương đương với ISO 7899 – 2 : 2000.

**TCVN 6189 – 2 : 2009** do Ban kỹ thuật Tiêu chuẩn 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) 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

Tiêu chuẩn này mô tả phương pháp phân lập vi khuẩn đường ruột. *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* và *E. hirae* có thể được phát hiện và đếm bằng phương pháp được mô tả trong tiêu chuẩn này. Ngoài ra các chủng *Enterococcus* và một số chủng *Streptococcus* (tên là *S. bovis* và *S. equinus*) đôi khi có thể được phát hiện. Các loài *Streptococcus* không thể sống lâu trong nước và có thể không thể đếm toàn bộ. Đối với mục đích kiểm tra nước, các vi khuẩn đường ruột này có thể coi như chỉ thị của sự ô nhiễm phân. Tuy nhiên, cần phải lưu ý rằng một số nhóm vi khuẩn đường ruột tìm thấy trong nước đôi khi có thể có nguồn gốc từ các môi trường sống khác.



## Chất lượng nước – Phát hiện và đếm khuẩn đường ruột – Phần 2: Phương pháp lọc màng

*Water quality – Detection and enumeration of intestinal enterococci –  
Part 2: Membrane filtration method*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp phát hiện và đếm khuẩn đường ruột trong nước bằng cách lọc qua màng. Tiêu chuẩn này nhằm để kiểm tra nước uống, nước bể bơi và nước đã tẩy trùng, nước sạch. Tuy nhiên phương pháp này có thể áp dụng cho tất cả các loại nước, ngoại trừ nước có một lượng lớn các chất lơ lửng hoặc các loại vi sinh vật gây cản trở. Phương pháp này đặc biệt phù hợp để kiểm tra một thể tích nước lớn mà chỉ chứa một ít khuẩn đường ruột.

### 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 4851 – 1989 (ISO 3696 : 1987) Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

TCVN 5992 : 1995 (ISO 5667-2 : 1991<sup>1)</sup>) Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 2: Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu.

TCVN 6663-1 : 2002 (ISO 5667-1 : 1980<sup>2)</sup>) Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 1: Hướng dẫn lập chương trình lấy mẫu.

<sup>1)</sup> ISO 5667-2 : 1991 đã bị huỷ và được thay bằng ISO 5667-1 : 2006.

<sup>2)</sup> ISO 5667-1 đã có phiên bản năm 2006.

## TCVN 6189-2 : 2009

TCVN 6507-1 : 2005 (ISO 6887-1 : 1999) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân;

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;

ISO 8199 : 1988<sup>3)</sup> 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).

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này, áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa trong TCVN 6450 và các thuật ngữ sau:

#### 3.1

**Khuẩn đường ruột** (Intestinal enterococci)

Vi khuẩn có khả năng khử 2,3,5-triphenyltetrazolium clorua thành formazan và thủy phân aesculin tại 44 °C trong môi trường (6.3.1 và 6.3.2) đã được quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Xem Phụ lục A.

### 4 Nguyên tắc

#### 4.1 Lọc, nuôi cấy và đếm

Đếm khuẩn đường ruột 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 đủ để giữ lại các vi khuẩn. Màng lọc được đặt vào môi trường đặc chọn lọc chứa natri azid (để ngăn sự sinh trưởng của các vi khuẩn Gram âm) và 2,3,5 – triphenyltetrazoli clorua, thuốc nhuộm không màu, khuẩn đường ruột sẽ khử thuốc nhuộm này thành formazan màu đỏ.

Các khuẩn lạc điển hình được mọc lên, có màu đỏ, màu hạt dẻ hoặc màu hồng ở trung tâm của khuẩn lạc, hoặc ở khắp mọi nơi.

<sup>3)</sup> ISO 8199 đã có phiên bản năm 2005.



## 4.2 Kháng định

Nếu quan sát được khuẩn lạc điển hình, bước thử kháng định là cần thiết, bằng cách chuyển toàn bộ khuẩn lạc qua màng rồi chuyển vào thạch mật aesculin-azid, được làm nóng trước ở nhiệt độ 44 °C. Khuẩn đường ruột thuỷ phân aesculin trên môi trường này trong 2 h. Sản phẩm cuối cùng, 6,7-dihydroxycoumarin kết hợp với ion sắt (III) tạo hợp chất màu nâu vàng tới đen, khuếch tán vào môi trường.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

Ngoại trừ dụng cụ thuỷ tinh vô khuẩn dùng một lần, tất cả các dụng cụ thuỷ tinh phải được khử khuẩn theo ISO 8199.

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

5.1 Bộ lọc màng, theo ISO 8199.

5.2 Màng lọc vô khuẩn với kích thước lỗ danh nghĩa 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 thường xuyên, phù hợp với ISO 7704.

5.3 Tủ ấm, có thể duy trì được nhiệt độ ở 36 °C ± 2 °C.

5.4 Tủ ấm, có thể duy trì được nhiệt độ ở 44 °C ± 0,5 °C.

5.5 Nồi hấp áp lực, có thể duy trì được nhiệt độ 121 °C ± 3 °C.

5.6 Kẹp vô khuẩn.

5.7 Bếp điện hoặc bếp cách thuỷ, duy trì được nhiệt độ 100 °C.

## 6 Môi trường nuôi cấy và thuốc thử

### 6.1 Nguyên liệu cơ bản

**CẢNH BÁO** – Tất cả các môi trường chọn lọc được mô tả trong tiêu chuẩn này đều chứa natri azid. 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 chuẩn bị các môi trường hoàn chỉnh khô dạng có bán sẵn. Các môi trường chứa azid không được trộn lẫn với các axit vô cơ mạnh vì có thể tạo thành chất độc hidrod azid (HN<sub>3</sub>). Các dung dịch chứa azid cũng có thể tạo thành các hợp chất gây nổ khi tiếp xúc với các ống dẫn bằng kim loại, ví dụ trong các bồn rửa.

Có thể phân huỷ azid một cách an toàn bằng cách thêm dư dung dịch nitrit bão hoà.

## TCVN 6189–2 : 2009

Để kết quả đồng nhất, trong khi chuẩn bị các môi trường cần sử dụng các thành phần có chất lượng đồng nhất hoặc các hoá chất thuộc loại phân tích hoặc môi trường hoàn chỉnh khô. Natri azid bị phân hủy theo thời gian vì vậy các môi trường khô chỉ có thời hạn sử dụng nhất định.

**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.

**6.2 Nước cất** hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, loại 1 theo TCVN 4851 (ISO 3696).

### 6.3 Môi trường nuôi cấy

#### 6.3.1 Môi trường Slanetz và Bartley

##### 6.3.1.1 Môi trường cơ bản

Trytoza	20,0 g
Chất chiết nấm men	5,0 g
Glucosa	2,0 g
Dikali hidrophotphat ( $K_2HPO_4$ )	4,0 g
Natri azid ( $NaN_3$ )	0,4 g
Thạch	8 g đến 18 g <sup>4)</sup>
Nước	1000 ml

Hòa tan các thành phần trong nước đang sôi.

Sau khi hoà tan hoàn toàn đun thêm 5 min.

Làm nguội ở 50 °C đến 60 °C.

##### 6.3.1.2 Dung dịch TTC

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

Hòa tan chất chỉ thị trong nước bằng cách khuấy.

Khử khuẩn bằng cách lọc (màng lọc có kích thước lỗ 0,2 µm).

Bảo quản dung dịch khỏi tác động của ánh sáng, và loại bỏ dung dịch nếu xuất hiện màu hồng nhạt.

---

<sup>4)</sup> Tuỳ thuộc vào khả năng đông của thạch.

**6.3.1.3 Môi trường hoàn chỉnh**

Môi trường cơ bản (6.3.1.1)	1 000 ml
Dung dịch TTC (6.3.1.2)	10 ml

Thêm dung dịch TTC vào môi trường cơ bản đã làm nguội ở 50 °C đến 60 °C.

Nếu cần, điều chỉnh pH bằng dung dịch natri cacbonat (100 g/l) hoặc dung dịch natri hydroxit (40 g/l) hoặc axit clohydric (36,5 g/l) sao cho sau khi khử trùng pH đạt  $7,2 \pm 0,1$  tại 25 °C.

Rót 20 ml môi trường vào các đĩa Petri đường kính 9 cm (hoặc lượng môi trường tương đương trong 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 hai tuần trong chỗ tối ở  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

**6.3.2 Thạch mật -aesculin - azid**

Trypton	17,0 g
Pepton	3,0 g
Chất chiết nấm men	5,0 g
Mật bò, khô	10,0 g
Natri clorua (NaCl)	5,0 g
Aesculin	1,0 g
Amoni-sắt (III) citrat	0,5 g
Natri azid ( $\text{NaN}_3$ )	0,15 g
Thạch	8 g đến 18 g <sup>1)</sup>
Nước	1000 ml

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

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

Khử trùng trong 15 min tại  $121\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

Làm nguội ở 50 °C đến 60 °C và rót vào các đĩa Petri sao cho độ dày môi trường khoảng 3 mm đến 5 mm và để yên trên một mặt phẳng nằm ngang, chỗ mát.

Các đĩa này có thể bảo quản đến hai tuần ở  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

## 7 Lấy mẫu

Tiến hành lấy mẫu theo TCVN 6663-1 (ISO 5667-1), TCVN 5992 (ISO 5667-2) và TCVN 6663-3 (ISO 5667-3).

## 8 Tiến hành

### 8.1 Chuẩn bị mẫu

Chuẩn bị mẫu, lọc và ủ trên môi trường phân lập theo hướng dẫn được nêu trong ISO 8199 và TCVN 6507-1 (ISO 6887-1). Nên bắt đầu kiểm tra ngay sau khi lấy mẫu. Nếu giữ mẫu ở nhiệt độ môi trường xung quanh, thì việc kiểm tra cần phải tiến hành trong vòng 6 h kể từ khi lấy mẫu. Trong một số trường hợp ngoại lệ, có thể cho phép giữ mẫu tới 24 h trước khi kiểm tra nếu mẫu được bảo quản ở  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Nếu cần phải pha loãng mẫu, thì chuẩn bị các dung dịch pha loãng theo ISO 8199.

### 8.2 Lọc và nuôi cấy

Về các quy định chung của kỹ thuật lọc màng, xem ISO 8199.

Lọc một thể tích nước kiểm tra thích hợp.

Đặt màng lọc lên môi trường Slanetz và Bartley (6.3.1).

Ủ các đĩa ở  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong  $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$ .

### 8.3 Kháng định và đếm

Sau khi ủ, coi tất cả các khuẩn lạc đã mọc có màu nâu đỏ hoặc màu hồng từ trung tâm hoặc toàn bộ khuẩn lạc là điển hình.

Nếu có khuẩn lạc điển hình, dùng kẹp vô khuẩn chuyển màng lọc và khuẩn lạc mà không đảo xuống, lên trên đĩa thạch mật-aesculin-azid đã được làm nóng trước ở  $44^{\circ}\text{C}$ .

Ủ ở  $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  trong 2 h.

Đọc đĩa ngay lập tức.

Coi như tất cả các khuẩn lạc điển hình có màu từ nâu đến đen ở môi trường bao quanh là phản ứng dương tính, và đếm chúng như là khuẩn đường ruột.

**CHÚ THÍCH** Sự phân bố không đều của khuẩn lạc hoặc số đếm quá cao có thể gây nhiễu cho sự phân biệt các khuẩn lạc dương tính, do sự khuếch tán màu đến các khuẩn lạc liền kề.

## 9 Đảm bảo chất lượng

Phòng thí nghiệm cần phải có hệ thống kiểm soát chất lượng để đảm bảo rằng nguyên vật liệu, thuốc thử và kỹ thuật là phù hợp với phép thử.

## 10 Biểu thị kết quả

Tính toán kết quả theo ISO 8199.

## 11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm bao gồm các thông tin sau:

- a) Viện dẫn tiêu chuẩn này;
  - b) Mọi chi tiết cần thiết để nhận dạng đầy đủ mẫu;
  - c) Số khuẩn lạc đã khẳng định như là khuẩn đường ruột;
  - d) Các hiện tượng đặc thù quan sát được trong suốt quá trình phân tích và mọi thao tác không qui định trong phương pháp này, hoặc coi như tùy chọn có thể làm thay đổi kết quả thử nghiệm.
-