

Coliform tổng và *E. coli*

DOC316.53.001213

Phương pháp màng lọc USEPA

Phương pháp 10029¹

m-ColiBlue24®

Phạm vi và ứng dụng: đối với nước uống, nước không uống được, nước tái sinh và nước thải.

¹ USEPA chứng nhận.



Chuẩn bị thí nghiệm

Trước khi bắt đầu thí nghiệm:

Khi mẫu thử ít hơn 20mL (pha loãng hoặc không pha loãng) đổ 10mL nước pha loãng vô trùng vào các phễu lọc trước khi hút chân không để lọc mẫu. Điều này hỗ trợ việc phân phối các vi khuẩn đồng đều trên toàn bộ bề mặt giấy lọc.

Thể tích của mẫu được lọc sẽ khác nhau tùy theo mẫu. Chọn kích thước mẫu tối đa để cho 20-200 khuẩn lạc (CFU) trên mỗi giấy lọc. Thể tích mẫu lý tưởng của nước không uống được và nước thải sử dụng cho hiệu quả thí nghiệm coliform sản sinh 20-80 khuẩn lạc trên mỗi giấy lọc. Nói chung đối với nước uống thể tích đem đi lọc sẽ là 100mL

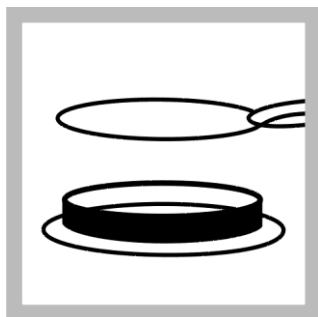
Nếu sử dụng ống ampule PourRite™ thì để cho môi trường nuôi cấy có nhiệt độ bằng với nhiệt độ phòng trước khi mở ống chứa môi trường nuôi cấy.

Khử trùng nơi làm việc với một miếng vải diệt khuẩn, pha loãng dung dịch thuốc tẩy, thuốc xịt diệt khuẩn hoặc dung dịch iốt loãng để khử khuẩn. Rửa tay kỹ bằng xà phòng và nước.

Ống chứa môi trường nuôi cấy- m-ColiBlue24 Broth PourRite Ampules

Broth m-ColiBlue24 có thể được sử dụng để phân tích nước uống, nước đóng chai, đồ uống; nước bề mặt và nước ngầm, nước thải, nước tái sinh và quá trình nước tinh khiết, xử lý hóa chất và các ứng dụng trong dược phẩm.

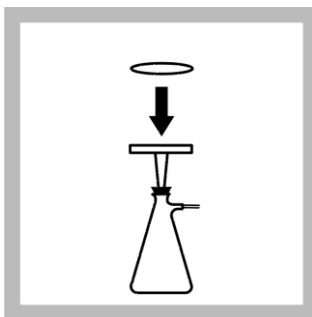
Phát hiện đồng thời Coliform tổng và *E.coli* , Phương pháp 10029



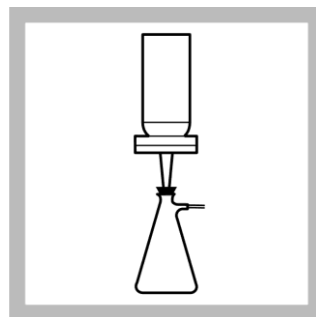
1. Sử dụng kẹp vô trùng để đặt miếng hút thấm vào đĩa Petri vô trùng. Thay thế nắp trên đĩa. Không chạm vào miếng hút thấm hay bên trong đĩa Petri. Để khử trùng kẹp, ngâm chúng trong cồn và cho qua lửa cồn hoặc đèn Bunsen. Hãy để kẹp nguội trước khi sử dụng



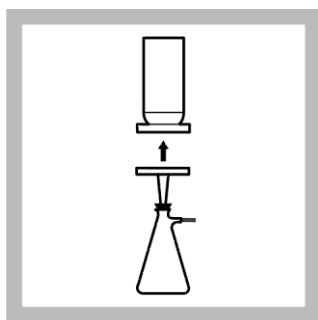
2. Đảo ngược ống chứa môi trường hai hoặc ba lần để hòa trộn. Mở ống **Broth m-ColiBlue24** bằng cách sử dụng dụng cụ bẻ ống ampule, đổ dung dịch đều lên miếng hút thấm. Thay nắp của các đĩa Petri



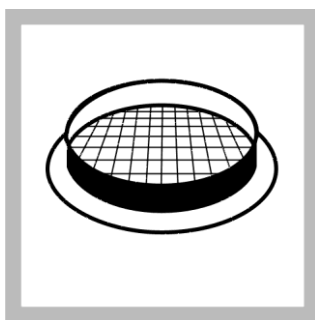
3. Thiết lập dụng cụ lọc. Dùng kẹp vô trùng đặt giấy màng lọc sao cho mặt lưới phía trên. Ngoài ra có thể sử dụng bộ lọc vô trùng sử dụng một lần để lọc mẫu.



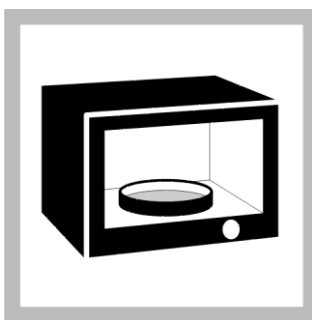
4. Đảo đều mẫu trong 30 giây. Đổ 100mL mẫu hay mẫu đã pha loãng vào phễu. Hút chân không và lọc mẫu. Rửa sạch thành phễu với 20-30 mL nước vô trùng pha loãng. Hút chân không và rửa sạch thêm hai lần nữa. Xả chân không khi bộ lọc khô để ngăn ngừa hư hại cho dụng cụ lọc.

Phát hiện đồng thời Coliform tổng và *E.coli* . Phương pháp 10029 (tiếp tục)

5. Tắt máy hút chân không và nhấc ra khỏi phễu. Dùng kẹp vô trùng để chuyển giấy lọc sang đĩa Petri đã được chuẩn bị trước.



6. Cuộn nhẹ để đặt giấy lọc vào để cho mặt có lưới phía trên. Kiểm tra không khí có bị kẹt dưới giấy lọc và đảm bảo giấy lọc chạm vào miếng hút thấm. Thay nắp đáy đĩa Petri.



7. Đảo ngược đĩa Petri và ủ ở $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ trong 24 giờ



8. Lấy đĩa petri từ tủ ủ, kiểm tra giấy lọc để theo dõi sự tăng trưởng của khuẩn lạc. Các khuẩn lạc thường phân lập để có thể nhìn thấy dễ dàng. Tuy nhiên, một kính hiển vi hay kính lúp 10-15X có thể hữu ích để đếm chính xác. Khuẩn lạc màu đỏ và xanh cho biết Coliform tổng và khuẩn lạc màu xanh cho biết *E.coli*.

Đôi khi khi chỉ có nhân của khuẩn lạc hiển thị màu. Vì thế một khuẩn lạc với số lượng màu đỏ bất kì nên tính là một màu đỏ và một khuẩn lạc với số lượng màu xanh bất kì nên tính là khuẩn lạc xanh. Khuẩn lạc đỏ có thể khác nhau về cường độ màu, khuẩn lạc xanh có thể xuất hiện màu xanh tím. Đếm tất cả các khuẩn lạc có màu đỏ và xanh sẽ là Coliform tổng số. Tính tất cả các khuẩn lạc màu xanh tím là *E.coli*

Tùy chọn kiểm tra khuẩn lạc đỏ

M.ColiBlue24 Broth là công thức được bào chế để các Coliform không phải *E.coli* phát triển thành khuẩn lạc màu đỏ. Tỷ lệ phần trăm của các khuẩn lạc đỏ là dương tính giả (không phải coliform) được so sánh với tỉ lệ phần trăm của khuẩn lạc sáng màu phát triển trên môi trường m-Endo có dương tính giả (không coliform). Do đó, việc xác nhận lại là không cần thiết.

Một vài giống không phải coliform như vi khuẩn *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas* spp có thể phát triển trong M.ColiBlue24 Broth và hình thành khuẩn lạc đỏ. Vi khuẩn này có thể dễ dàng phân biệt với coliforms tổng thông qua các thử nghiệm oxidase. *Pseudomonas*, *Vibrio* và *Aeromonas* spp thì dương tính với oxidase. Coliform tổng và *Escherichia coli* thì âm tính với oxidase. Nếu mẫu thử của bạn chứa hàm lượng cao các vi khuẩn khác, bạn có thể thực hiện một thí nghiệm oxidase để xác định khuẩn lạc đỏ là coliform tổng.

Hai quy trình oxidase được cung cấp. Đếm những khuẩn lạc đỏ và xanh trên các màng lọc m – coliBlue24 Broth trước khi bắt đầu xét nghiệm oxidase

Phương pháp Oxidase 1

Phương pháp này cho phép bạn nhanh chóng đánh giá các test lọc màng có rất nhiều khuẩn lạc. Sử dụng phương pháp này sau 24 giờ ủ với m-ColiBlue24 Broth.

* Nghiên cứu cho thấy rằng các thử nghiệm oxidase không thể được thực hiện trên môi trường nuôi cấy đã được chuẩn bị mà phải trải qua quá trình axit hóa trong sự phát triển của vi khuẩn. M-ColiBlue24 Broth được bào chế để các dụng cụ không trải qua quá trình axit hóa như vậy. Do đó, nhiều khuẩn lạc có thể được thử nghiệm cùng lúc cho phản ứng oxidase của họ bằng cách sử dụng quy trình sau

1. Mở nắp của đĩa petri chứa màng lọc m-ColiBlue24 Broth, lật ngược nắp và đặt trên bề mặt

Kiểm tra: dương tính và âm tính là rất quan trọng. *Pseudomonas aeruginosa* được khuyến cáo cho kiểm soát dương tính và *Escherichia coli* để kiểm soát âm tính. Sử dụng Aqua QC-Sticks™ cho các thủ tục kiểm soát chất lượng.

2. Nhỏ khoảng 0,5 ml thuốc thử oxidase™ Difco SpotTest vào giữa nắp.

3. Sử dụng kẹp vô trùng di chuyển màng lọc khỏi bề mặt và đặt các màng lọc thẳng trên nắp

4. Trong vòng 10-15 giây, oxidase sẽ thấm vào bộ lọc và làm cho các khuẩn lạc oxidase dương tính chuyển sang màu tím. Màu tím có thể nhìn thấy trong khuẩn lạc hay gần kề khuẩn lạc. Khuẩn lạc oxidase âm tính giữ nguyên màu đỏ, chúng đã phát triển khi được ủ trong M-colibblue24 Broth

5. Sau phản ứng 10-15 giây bắt đầu đếm các khuẩn lạc chuyển sang tím
Đếm từng khuẩn lạc riêng biệt bằng các dùng kính hiển vi phóng đại 10-15 lần

Lưu ý: để đơn giản hóa việc đếm khuẩn lạc, đặt nắp phụ lên nắp có chứa thuốc thử oxidase và màng lọc. Sử dụng bút felt-tip để đánh dấu các khuẩn lạc màu tím. Sau 30 giây, bạn có thể đếm các dấu hiệu cho thấy khuẩn lạc tím (oxidase dương tính)

6. Dùng đếm 30 giây sau 10-15 giây sau phản ứng đầu tiên. Bởi vì khuẩn lạc oxidase âm tính sẽ phát triển thành màu tím

Lưu ý: vi khuẩn không chết trong quá trình này, vì thế các khuẩn lạc có thể được chọn để xét nghiệm thêm. Khuẩn lạc hầu như luôn là màu xanh sau 24 giờ ủ trong M-coliBlue24 Broth. *E. coli* không cần xác nhận qua quá trình oxidase.

Phương pháp Oxidase 2

Phương pháp thử nghiệm oxidase chính thức này được mô tả trong phương pháp tiêu chuẩn để kiểm tra nước và nước thải, ấn bản thứ 18 năm 1992.

1. Chọn khuẩn lạc màu đỏ từ màng lọc m-colibblue24 Broth cấy lên tấm Tryptic Soy Agar
2. Giữ ấm các tấm Soy Agar Tryptic ở 35 ° C (95 ° F) cho 18-24 giờ hoặc cho đến khi thu được các khuẩn lạc riêng biệt

* A.H. Havelaar et al. 1980. False-negative oxidase reaction as a result of medium acidification. *Antonie van Leeuwenhoek*. 46, 301-312. L.K. Hunt et al. 1981. Role of pH in oxidase variability of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Clinical Microbiology*. 13: 1054-1059.

Kiểm tra: dương tính và âm tính là rất quan trọng. *Pseudomonas aeruginosa* được khuyến cáo cho kiểm soát dương tính và *Escherichia coli* để kiểm soát âm tính. Sử dụng Aqua QC-Stiks™ cho các thủ tục kiểm soát chất lượng.

3. Bão hòa một mảnh giấy lọc với thuốc thử Difco SpotTest oxidase. (Thuốc thử này có chứa một dung dịch pháp ổn định của N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride). Lưu ý: Ngoài ra oxidase tinh khiết có thể được nhỏ trực tiếp vào khuẩn lạc phát triển trên Tryptic Soy Agar. Khuẩn lạc oxidase dương tính sẽ chuyển từ hồng sang tím.
4. Sử dụng kim nickrome vô trùng chuyển vật chất tế bào từ Tryptic Soy Agar bị cô lập vào giấy lọc
Lưu ý: không sử dụng kim loại hay kim tiêm phòng bởi vì chúng sẽ gây ra kết quả dương tính giả. Các dụng cụ gỗ sẽ tốt hơn.
5. Lạc khuẩn oxidase âm tính sẽ không phản ứng với thuốc thử, nhưng lạc khuẩn oxidase dương tính sẽ làm cho thuốc thử chuyển sang màu tím sậm trong 10 giây
6. Lạc khuẩn oxidase âm tính nên được tính như vi khuẩn coliforms tổng hợp

Giải thích và báo cáo kết quả

Báo cáo mật độ coliform là đếm số lượng các khuẩn lạc trên 100 mL mẫu. Đối với coliform tổng, sử dụng mẫu sinh ra 20-80 khuẩn lạc coliform, không nên quá 200 khuẩn lạc gồm tất cả các loại trên mỗi màng dùng để tính toán mật độ coliform. Để thử nghiệm fecal coliform, mẫu phải sản xuất 20-60 khuẩn lạc fecal coliform.

Sử dụng công thức để tính toán mật độ coliform. Lưu ý "mL mẫu" đề cập đến thể tích mẫu thực tế, không phải là thể tích mẫu đã pha loãng.

Công thức tính mật độ A-Coliform trên một màng lọc

$$\text{Khuẩn lạc coliform trên 100mL} = \frac{\text{Khuẩn lạc coliform đếm}}{\text{mL mẫu lọc}} \times 100$$

- Nếu sự phát triển bao phủ toàn bộ diện tích lọc của lớp màng, hoặc một phần của nó, và khuẩn lạc không tách biệt riêng rẽ, kết quả báo cáo là "tăng trưởng dính chùm, Có hoặc Không có Coliform."
- Nếu tổng số khuẩn lạc (coliform cộng với phi coliform) vượt quá 200 cho mỗi màng hoặc khuẩn lạc không rõ để đếm chính xác, báo cáo kết quả là "Quá Nhiều Để đếm (TNTC).

Trong cả hai trường hợp, thực hiện mẫu mới bằng cách pha loãng, điều đó sẽ cung cấp khoảng 50 coliform khuẩn lạc và không quá 200 coliform gồm tất cả các loại.

Khi thử nghiệm nước không uống được, nếu không có bộ lọc đáp ứng số lượng tối thiểu khuẩn lạc mong muốn, tính toán mật độ coliform trung bình với công thức B

Công thức B- mật độ coliform trung bình 1) gấp đôi, 2) pha loãng nhiều lần hay 3) Nhiều hơn một giấy lọc/ mẫu

$$\text{Khuẩn lạc coliform trên 100mL} = \frac{\text{Tổng khuẩn lạc trong tất cả các mẫu}}{\text{Tổng thể tích (mL) của tất cả các mẫu}} \times 100$$

Kiểm tra dương tính và âm tính là rất quan trọng. *Pseudomonas aeruginosa* được đề nghị như kiểm tra âm tính và *Escherichia coli* là một kiểm tra dương tính. Sử dụng AQUA QC-Stik™ cho các quy trình kiểm soát chất lượng. Hướng dẫn sử dụng đi kèm với mỗi thiết bị QC-Stik AQUA.

Mẫu nước uống từ các nhà máy xử lý nước đô thị phải là âm tính đối với coliform tổng và fecal coliform.

* Aqua QC-Stiks là một thương hiệu của MicroBiologics.

Chất bị tiêu hao và các dụng cụ thay thế

Yêu cầu môi trường nuôi cấy và các thuốc thử đã được chuẩn bị sẵn

Mô tả	Đơn vị	Cat. #
m-ColiBlue24® Broth Ampules, glass	20/pkg	2608420
m-ColiBlue24® Broth Ampules, plastic	50/pkg	2608450
m-ColiBlue24® prepared agar plates	15/pkg	2805215

Dụng cụ yêu cầu

Mô tả	Đơn vị	Cat. #
Ampule Breaker, PourRite™	each	2484600
Bags, Whirl-Pak®, with dechlorinating agent, 180 mL	100/pkg	2075333
Counter, hand tally	each	1469600
Dilution Water, buffered, sterile, 99 mL	25/pkg	1430598
Dish, Petri, with pad, 47-mm, sterile, disposable, Gelman	100/pkg	1471799
Dish, Petri, with pad, 47-mm, sterile, disposable, Millipore	150/pkg	2936300
Filter Holder, magnetic coupling (use with 24861-00)	each	1352900
Filter Funnel Manifold, aluminum, 3-place (use with 13529-00)	each	2486100
Filters, Membrane, 47-mm, 0.45-µm, gridded, sterile, Gelman	200/pkg	1353001
Filters, Membrane, 47-mm, 0.45-µm, gridded, sterile, Millipore	150/pkg	2936100
Filtering Flask, 1000-mL	each	54653
Forceps, stainless steel	each	2141100
Incubator, Culture, 120 VAC, 50/60 Hz	each	2619200
Incubator, Culture, 220 VAC, 50/60 Hz	each	2619202
Microscope, Compound	each	2942500
Pump, vacuum/pressure, portable, 115 VAC, 60 Hz	each	2824800
Pump, vacuum/pressure, portable, 220 VAC, 50 Hz	each	2824802
Stopper, rubber, one hole, No. 8	6/pkg	211908
Tubing, rubber, 0.8 cm (5/16 in.) ID	3.7 m (12 ft)	56019

Tùy chọn môi trường nuôi cấy đã được chuẩn bị, hóa chất và dụng cụ

Mô tả	Đơn vị	Cat. #
Adapter for rechargeable battery pack, 230 VAC (for 2580300)	each	2595902
Alcohol Burner	1	2087742
Aspirator, water	each	213102
Autoclave, 120 VAC, 50/60 Hz	each	2898600
Bag, for contaminated items	200/pkg	2463300
Bags, Whirl-Pak®, without dechlorinating agent, 207 mL	100/pkg	2233199
Bags, Whirl-Pak®, without dechlorinating agent, 720 mL	10/pkg	1437297
Battery eliminator	each	2580400
Battery pack, rechargeable, for portable incubator 12 VDC	each	2580300
Bottle, sample, sterilized, 100-mL, disposable with dechlorinating agent	12/pkg	2599112

Tùy chọn môi trường nuôi cấy đã được chuẩn bị, hóa chất và dụng cụ (tiếp theo)

Mô tả	Đơn vị	Cat. #
Bottle, sample, sterilized, 100-mL, disposable with dechlorinating agent	50/pkg	2599150
Bottle, sample, sterilized, 100-mL, disposable	12/pkg	2495012
Bottle, sample, sterilized, 100-mL, disposable	50/pkg	2495050
Bunsen burner with tubing	each	2162700
Dechlorinating Reagent Powder Pillows	100/pkg	1436369
Dish, Petri, 47-mm, sterile, disposable	100/pkg	1485299
Dish, Petri, 47-mm, sterile, disposable	500/pkg	1485200
Filter Funnel Manifold, aluminum, 3-place (use with 1352900)	each	2486100
Filter Unit, sterile, disposable with gridded membrane (use with 2656700)	12/pkg	2656600
Filtration Support (for field use), stainless steel	each	2586200
Funnels, Push-Fit and membrane filters (use with 2586200)	72/pkg	2586300
Germicidal Cloths	50/pkg	2463200
Incubator, portable, 12 VDC	each	2569900
Incubator, water bath, 120 VAC, 50/60 Hz	each	2616300
Isopropyl alcohol	500 mL	1445949
m-ColiBlue24® Broth, 100 mL glass bottle	1 each	2608442
Pad, absorbent, with dispenser	1000/pkg	1491800
Powder Pillows for buffered dilution water (25 of each) ¹	50/pkg	2143166
Pump, hand vacuum	each	1428300
Sterilization Indicator, Sterikon®	15/pkg	2811115
Sterilization Indicator, Sterikon®	100/pkg	2811199
Syringe, 140-mL, polypropylene (use with 2586200)	each	2586100
Wicks, replacement, for alcohol burner 2087742	—	2097810

1 Cho một gói potassium dihydrogen phosphate và một gói magnesium chloride vào 1 lít nước cất và đem đi hấp (tiệt trùng) để có nước pha loãng theo tiêu chuẩn của Hiệp hội Sức khỏe Cộng đồng Hoa Kỳ.



FOR TECHNICAL ASSISTANCE, PRICE INFORMATION AND ORDERING:
 In the U.S.A. – Call toll-free 800-227-4224
 Outside the U.S.A. – Contact the HACH office or distributor serving you.
 On the Worldwide Web – www.hach.com

HACH COMPANY
 WORLD HEADQUARTERS
 Telephone: (970) 669-3050
 FAX: (970) 669-2932