

Coliforms- Fecal

Phương pháp màng lọc USEPA¹

Phương pháp 8074 m-FC và m-FC/RA

Phạm vi ứng dụng: nước ăn uống, nước không dùng ăn uống, nước giải trí và nước thải

¹ USEPA chứng nhận 9222D

Giới thiệu

Phương pháp màng lọc (MF) là một cách nhanh chóng để ước lượng số vi khuẩn có trong nước. Phương pháp MF đặc biệt hữu ích khi đánh giá thể tích mẫu lớn hoặc phải thực hiện kiểm tra coliform hàng ngày.

Phương pháp

Trong bước đầu tiên, một thể tích mẫu thích hợp được lọc qua màng với kích thước lỗ đủ nhỏ (0,45 micron) để giữ lại các vi khuẩn có mặt. Màng lọc được đặt trên một miếng thấm (trong đĩa petri) bão hòa với một môi trường nuôi cấy chọn lọc để coliform tăng trưởng. Đĩa petri có chứa màng lọc và miếng đệm được ủ, mặt úp xuống, trong 24 giờ ở nhiệt độ thích hợp. Sau khi ủ, các khuẩn lạc đã phát triển được xác định và đếm bằng cách sử dụng một kính hiển vi công suất thấp.

Các ống PourRite™ chứa môi trường chọn lọc được chuẩn bị sẵn. Điều này giúp loại bỏ việc đo lường, pha trộn và hấp khử trùng khi chuẩn bị môi trường nuôi cấy khử nước. Ống được thiết kế có miệng mở lớn, cho phép môi trường nuôi cấy được đổ ra dễ dàng. Mỗi ống chứa môi trường nuôi cấy đủ cho một test.

Chuẩn bị thí nghiệm

Trước khi bắt đầu thí nghiệm

Khi mẫu ít hơn 20mL (đã pha loãng và chưa pha loãng), cho 10mL nước dùng pha loãng đã thanh trùng vào phễu lọc trước khi hút chân không. Cách này giúp phân tán sinh vật đồng đều trên toàn bộ mặt màng lọc.

Phần thể tích mẫu đã được lọc xong sẽ khác nhau tùy thuộc loại mẫu. Chọn thể tích mẫu tối đa để có thể cho kết quả từ 20 đến 200 đơn vị khuẩn lạc (CFU) trên 1 màng lọc. Thể tích mẫu lý tưởng đối với nước không dùng ăn uống hoặc nước thải cho thí nghiệm coliform là 20-80 khuẩn lạc trên một màng lọc. Thông thường, đối với nước đã xử lý, nước ăn uống, thể tích mẫu đem lọc sẽ là 100mL.

Nếu sử dụng các ống PourRite®, để cho môi trường được làm ấm đến nhiệt độ phòng trước khi mở ống.

Tẩy trùng nơi làm việc bằng vải diệt khuẩn, dung dịch tẩy pha loãng, phun diệt khuẩn hoặc dung dịch i-ốt pha loãng. Rửa sạch tay bằng xà phòng và nước.

Quy trình cho nước không uống được

Nước thải, nước sông, tắm rửa, và nước không ăn uống được khác luôn được xét nghiệm về vi khuẩn chỉ thị sự ô nhiễm về phân-fecal coliform. Trong thử nghiệm cho fecal coliform, một môi trường đặc biệt và nhiệt độ ủ cao ức chế sự tăng trưởng của các vi khuẩn không phải fecal coliform. Fecal coliform phát triển trên màng tạo thành một axit phản ứng với thuốc nhuộm anilin có trong môi trường, tạo ra một màu xanh dương.

Sử dụng m-FC broth với axit Rosolic để tăng độ đặc hiệu khi nồng độ cao của các vi khuẩn không phải coliform có thể có trong mẫu, trừ khi tất cả các sinh vật trong mẫu bị căng thẳng hoặc bị thương.

Test xác nhận fecal coliform (m-FC hay m-FC/RA), phương pháp 8074



1. Đặt miếng thấm hút vô trùng vào đĩa petri đã được vô trùng bằng kẹp khử trùng. Thay nắp đĩa Petri.

Không chạm vào miếng đệm thấm hút hay bên trong của đĩa petri

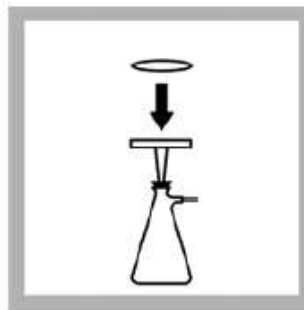
Để khử trùng kẹp, nhúng kẹp vào cồn và hơ qua lửa cồn hay đèn Bunsen. Hãy để kẹp nguội trước khi sử dụng.

Để thực hiện dễ dàng, có thể chọn mua miếng đệm kèm sẵn trong đĩa Petri



2. Đảo đều ống m-FC Broth PourRite 2 đến 3 lần để trộn đều dung dịch bên trong. Sử dụng dụng cụ bẻ ống để mở ống. Cần thận đổ dung dịch lên trên miếng đệm thấm hút. Thay nắp đĩa Petri.

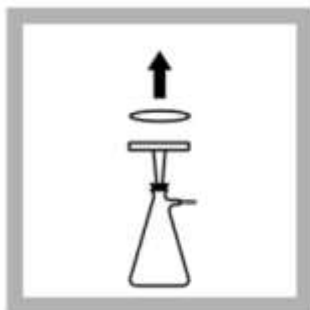
Sử dụng m-FC broth có axit Rosolic để tăng độ nhận diện khi vi khuẩn không phải loại coliform hiện diện ở mức cao, trừ khi chúng bị căng thẳng hoặc bị thương.



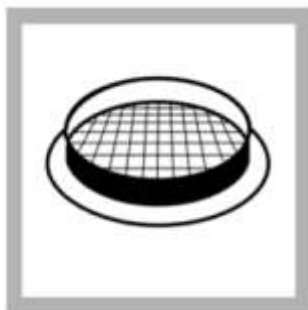
3. Lắp ráp bộ lọc. Sử dụng kẹp khử trùng để đặt màng lọc sao cho phần sọc lưới hướng lên, đặt màng lọc vào bộ lọc.



4. Chuẩn bị phần lọc mẫu nếu cần thiết để thu được kích thước mẫu phù hợp. Đảo mẫu trong 30 giây để xáo trộn đều. Đổ mẫu vào phễu. Để hút chân không và lọc mẫu. Ngưng hút chân không. Rửa sạch thành phễu với 20-30 ml nước vô trùng pha loãng đã được đệm. Để hút chân không. Rửa lại thêm 2 đến 3 lần. Ngưng hút chân không khi màng lọc đã khô để ngăn không làm hỏng màng.



5. Tắt hút chân không và nhấc đầu phễu ra. Dùng kẹp vô trùng để chuyển màng lọc ngay lập tức sang đĩa Petri đã được chuẩn bị.



6. Di chuyển nhẹ quay màng lọc để cho mặt lưới hướng trên miếng đệm thấm hút. Kiểm tra để không có không khí dưới màng lọc và đảm bảo màng lọc hoàn toàn tiếp xúc với miếng đệm thấm hút.

Thay nắp đĩa petri

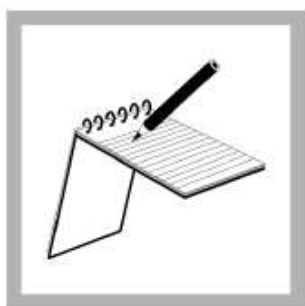


7. Đảo ngược đĩa petri và ủ ở $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ trong 24 ± 2 giờ.

Để loại bỏ môi trường Klebsiella từ nhóm fecal coliform thì nâng cao nhiệt độ ủ đến $45.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Ngoài ra, có thể dùng bể rửa có rãnh để ủ bằng cách đặt đĩa petri vào một túi niêm kín.



8. Sau khi ủ, sử dụng kính hiển vi độ phóng đại 10 đến 15X để đếm những khuẩn lạc màu xanh dương.



9. Ghi lại các kết quả của thí nghiệm. Xem phần **Diễn dịch và báo cáo kết quả**

Để xác nhận lại kết quả, thực hiện theo Phương pháp 8074, xác nhận fecal coliforms.

Xác nhận Coliform tổng (Lauryl Tryptose và Brilliant Green Bile)

Đối với các mẫu nước uống, xác định các khuẩn lạc tiêu biểu để đảm bảo chúng là coliform (xác định các khuẩn lạc sáng màu, tối đa là năm). Cấy song song vào các ống Lauryl Tryptose (LT) single-strength (SS) Broth và Brilliant Green Bile (BGB) Broth bằng cách chuyển sự tăng trưởng từ mỗi cụm khuẩn. Sự tăng trưởng và sản sinh khí trong cả hai ống xác minh rằng các sinh vật nghi ngờ đúng là coliform. Phương pháp xác định xác suất cực đại (MPN) các ống coliform là lý tưởng cho mục đích này.

Dùng kỹ thuật chùi đối với fecal coliforms hoặc *E. coli*:

- Khi chỉ xác định sự hiện diện hay vắng mặt của coliform tổng
- Khi cấy EC hay môi trường nuôi cấy EC/MUG

Cấy theo thứ tự:

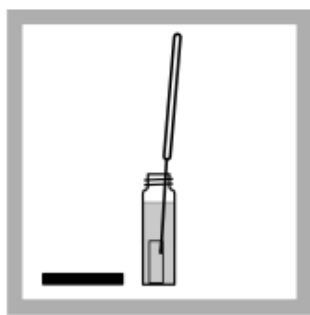
1. EC hoặc EC/MUG
2. LT SS Broth
3. BGB

Xác nhận Coliform tổng (LT và BGB), phương pháp 8074

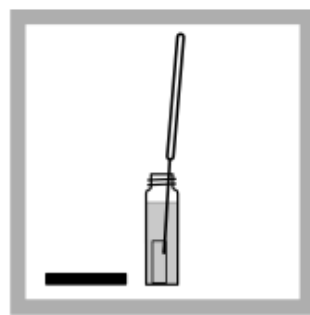


1. Khử trùng kim cấy hay sử dụng kim cấy vô trùng sử dụng một lần.

Để khử trùng kim cấy, đốt kim nóng đỏ trong cồn hay đèn Bunsen. Để kim nguội trước khi sử dụng.



2. Chạm kim cấy vào cum khuẩn coliform (sáng màu) phát triển trên đĩa m-Endo. Chuyển vào ống single-strength Lauryl Tryptose (LT) Broth.

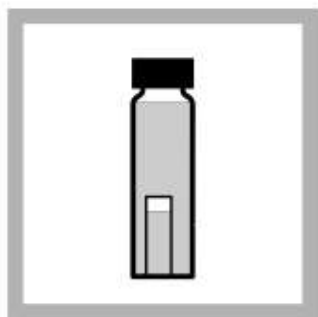


3. Dùng kim chạm vào mẫu cum khuẩn coliform một lần nữa. Chuyển vào ống Brilliant Green Bile (BGB) Broth.



4. Đảo đều cả hai ống để loại bỏ bóng khí kẹt bên trong các lọ.

Ủ ống ở 35 ± 0.5 °C. Sau một giờ, đảo ngược các ống để loại bỏ không khí kẹt bên trong các lọ, sau đó tiếp tục ủ.



5. Sau 24 ± 2 giờ, kiểm tra sự phát triển và các bóng khí bên trong lọ. Tăng trưởng (độ đục) và bóng khí trong cả LT và ống BGB Broth xác minh rằng các cụm khuẩn là coliform. Nếu một hay cả hai ống không xuất hiện các bong bóng khí, tiếp tục ủ cả hai ống thêm 24h

6. Nếu không có khí xuất hiện trong ống LT Broth sau 48 giờ, khuẩn lạc không phải là coliform và không cần thiết thực hiện thêm xét nghiệm.

Ghi lại kết quả của thí nghiệm. Xem phần **Diễn dịch và báo cáo kết quả**.

Xác nhận các kết quả dương tính. Nếu sự phát triển và khí sản sinh trong ống LT Broth nhưng không có trong ống BGB Broth, cấy một ống BGB khác từ ống khí dương tính LT Broth. Ủ ống BGB Broth này, kiểm tra sự phát triển và khí sau 24 giờ và/hay sau 48 giờ. Nếu phát triển và khí được tạo ra trong vòng 48 ± 3 giờ, các cụm khuẩn được xác nhận là coliform.

Xác nhận Fecal Coliform, phương pháp 8074



1. Khử trùng kim cấy hay sử dụng kim cấy vô trùng sử dụng một lần.

Để khử trùng kim cấy, đốt kim nóng đỏ trong cồn hay đèn Bunsen. Để kim nguội trước khi sử dụng.



2. Chạm kim cấy vào cụm khuẩn coliform có màu xanh dương chuyển vào ống Lauryl Tryptose (LT) Broth.

Lặp lại bước 1 và 3 cho từng test cần được xác nhận lại.

Bước 3 và 4 có thể thực hiện đồng thời nếu có sẵn nhiều tủ ủ.



3. Đảo ngược ống để loại bỏ bong bóng khí kẹt bên trong. Ủ ống ở 35 ± 0.5 °C. Sau một giờ, đảo ống để loại bỏ không khí bị kẹt trong các lọ bên trong và tiếp tục ủ.

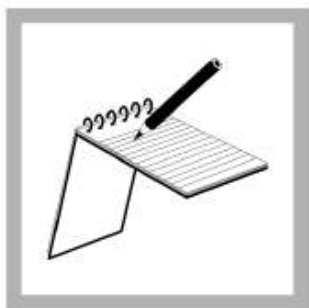
Kiểm tra các ống có sinh khí sau 24 giờ. Nếu không có gì xuất hiện, tiếp tục ủ thêm 24 giờ. Nếu không thấy có sự phát triển và khí sinh



4. Đảo ngược ống để loại bỏ bong bóng khí kẹt bên trong. Ủ ống ở 44.5 ± 0.2 °C trong 24 ± 2 h. Sau một giờ, đảo ống để loại bỏ không khí bị kẹt trong các lọ bên trong.

ra sau 48 ± 3 h, khuẩn
lạc không phải là
coliform.

Nếu thấy có sự phát
triển và khí sinh ra sau
 48 ± 3 h, dùng kim cấy
trùng để cấy vào 1 ống
EC Medium Broth cho
từng ống LT-Broth có
dương tính với khí.



5. Sự phát triển và khí
sinh ở 44.5°C trong
vòng 24 ± 2 h xác nhận
sự hiện diện của fecal
coliforms.

Ghi lại kết quả thử
nghiệm. Xem **Diễn
dịch và báo cáo kết
quả**

Diễn dịch và báo cáo kết quả

Báo cáo mật độ coliform theo số lượng khuẩn lạc có trên 100mL mẫu. Đối với tổng coliform, sử dụng các mẫu cho 20 đến 80 khuẩn lạc coliform và không quá 200 cho tất cả các loại, trên một màng lọc để tính mật độ coliform. Đối với test fecal coliform, các mẫu nên trong khoảng 20 đến 60 khuẩn lạc fecal coliform.

Sử dụng công thức A để tính mật độ coliform. Lưu ý “mL thể tích mẫu” là thể tích của mẫu thực tế không phải thể tích pha loãng.

Công thức A-mật độ coliform trên một màng lọc

Số khuẩn lạc coliform/ 100mL = (số khuẩn lạc coliform đếm được x 100) / mL thể tích mẫu lọc

- Nếu phát triển trên toàn bộ diện tích phần lọc của màng hoặc một phần của màng và các khuẩn lạc không phân tách rõ rệt, báo cáo kết quả là “Phát triển liên tục hoặc không có coliform”
- Nếu tổng số khuẩn lạc (coliform cộng với không phải coliform) vượt quá 200 trên một màng hoặc khuẩn lạc dính chùm không thể đếm chính xác, báo cáo kết quả là “Quá nhiều không thể đếm được-TNTC”

Nếu rơi vào hai trường hợp trên, thực hiện lại test với mẫu mới với mức pha loãng cao hơn sao cho chỉ khoảng 50 khuẩn lạc coliform và không quá 200 khuẩn lạc của tất cả.

Khi kiểm nghiệm nước không dùng ăn uống, nếu không có màng lọc nào đáp ứng số lượng khuẩn lạc tối thiểu mong muốn, tính mật độ trung bình coliform với công thức B

Công thức B- trung bình mật độ coliform cho 1) hai lần test, 2) nhiều lần test hoặc 3) nhiều hơn 1 màng lọc/mẫu

Số khuẩn lạc coliform/ 100mL = (tổng số khuẩn lạc coliform đếm được trong tất cả mẫu x 100) : tổng thể tích của tất cả mẫu lọc (mL)

Kiểm soát:

Kiểm soát dương và âm rất quan trọng. *Pseudomonas aeruginosa* được đề xuất là kiểm soát dương và *Escherichia coli* là kiểm soát âm. Sử dụng thiết bị AQUA QC-STIK™ để dùng cho quy trình kiểm soát chất lượng. Hướng dẫn sử dụng được cấp kèm theo thiết bị AQUA QC-STIK.

Các mẫu nước uống từ các nhà máy xử lý đô thị phải âm đối với tổng coliform và fecal coliform.

Danh mục thay thế và tiêu thụ

Xác nhận fecal coliforms (m-FC hay m-FC/RA)

Môi trường và thuốc thử cần thiết

Description	Unit	Catalog number
m-FC prepared agar plates	15/pkg	2811515
m-FC Broth Ampules, plastic	50/pkg	2373250
m-FC w/Rosolic Acid Broth Ampules, plastic	50/pkg	2428550
m-FC Broth PourRite™ Ampules (for fecal coliform presumptive)	20/pkg	2373220
m-FC with Rosolic Acid Broth PourRite™ Ampules (fecal coliform presumptive)	20/pkg	2428520

Dụng cụ cần thiết

Description	Unit	Catalog number
Ampule Breaker, PourRite™	each	2484600
Counter, hand tally	1	1469600
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)	1	1352900
Filter Funnel Manifold, aluminum, 3-place (use with 13529-00)	1	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	1	54653
Forceps, stainless steel	1	2141100
Incubator, Culture, low profile, 110 VAC, 50/60 Hz	each	2619200
Incubator, Culture, low profile, 220 VAC, 50/60 Hz	each	2619202
Inoculating Needle, disposable	25/pkg	2748925
Loop, inoculating, disposable	25/pkg	2749125
Microscope, compound	each	2942500

Môi trường, thuốc thử và dụng cụ tùy chọn

Description	Unit	Catalog number
Bags, Whirl-Pak®, without dechlorinating agent, 207 mL	100/pkg	2233199
Incubator, Water Bath, 110 VAC, 50/60 Hz	each	2616300
Incubator, Water Bath, 220 VAC, 50/60 Hz	each	2616302

Xác nhận coliform tổng (brilliant green bile broth và lauryl tryptose broth)

Môi trường và thuốc thử cần thiết

Description	Unit	Catalog number
Brilliant Green Bile Broth Tubes (for total coliform confirmation)	15/pkg	32215
Lauryl Tryptose Broth Ampules, sterile (for enrichment technique)	20/pkg	1472520
Lauryl Tryptose Broth Tubes, single-strength (for total coliform confirmation)	15/pkg	2162315

Dụng cụ cần thiết

Description	Unit	Catalog number
Alcohol Burner	1	2087742
Ampule Breaker, PourRite™	each	2484600
Burner, Bunsen	each	2162700
Incubator, Culture, low profile, 110 VAC, 50/60 Hz	each	2619200
Incubator, Culture, low profile, 220 VAC, 50/60 Hz	each	2619202
Isopropyl alcohol	500 mL	1445949
Loop, inoculating, disposable	25/pkg	2749125
Pad, absorbent, with dispenser	1000/pkg	1491800

Môi trường, thuốc thử và dụng cụ tùy chọn

Description	Unit	Catalog number
Adapter for rechargeable battery pack, 230 VAC (for 2580300)	each	2595902
Alcohol Burner	1	2087742
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
Bags, Whirl-Pak®, with dechlorinating agent, 180 mL	100/pkg	2075333
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
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
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 13529-00)	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
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 ID	3.7 m (12 ft)	56019
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	10/pkg	2097810