

Coliforms-*E.coli*

Phương pháp màng lọc USEPA

Phương pháp 8367¹
m-TEC

Phạm vi ứng dụng: nước ăn uống, nước không dùng ăn uống, nước tái tạo và nước thải

¹ Được chấp nhận bởi Cơ quan Môi trường Mỹ-USEPA

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 giấy 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 giấy 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 giấy lọc. Thông thường, đối với nước đã xử lý, nước ăn uống, thể tích mẫu đem lọc sẽ là 100mL.

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.

Phương pháp khẳng định bằng m-TEC Agar cho test tiền định tính *E.coli*

Phương pháp m-TEC phát hiện vi khuẩn *E.coli* trong các mẫu nước ngọt dùng cho mục đích giải trí qua quá trình hai bước. Bước thứ nhất, màng lọc được ủ trên m-TEC agar trong 2 giờ ở 35°C để hồi sinh các sinh vật bị thương. Các sinh vật chịu nhiệt này sau đó được chọn lọc bằng cách lên men lactose ở nhiệt độ cao 44.5°C. Bước thứ hai, sử dụng môi trường có chứa chất ure để phân biệt *E.coli* ure âm từ coliform chịu nhiệt khác thủy phân ure. Các khuẩn lạc có màu vàng hoặc vàng nâu ure âm là dương tính với *E.coli*

Phương pháp 8367, test tiên định tính E.coli (m-TEC agar)



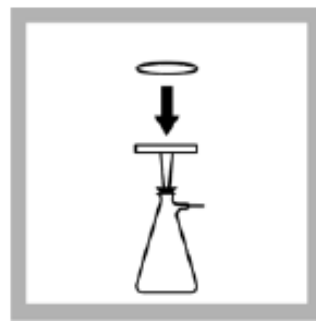
1. Gia nhiệt beaker chứa nước hoặc cốc chứa nước nhưng không để nước bị sôi



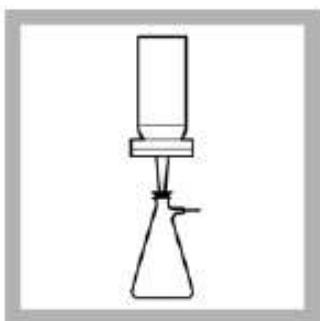
2. Đặt ống m-TEC agar vào trong nước nóng. Khi agar bắt đầu chảy lỏng, lấy ống ra khỏi nước nóng cẩn thận bằng kẹp giữ



3. Sử dụng kĩ thuật vô trùng, đổ một nửa agar trong ống vào đĩa petri 47-mm đã được tiệt trùng. Đậy nắp petri sau đó ngay lập tức và để cho agar đông lại.



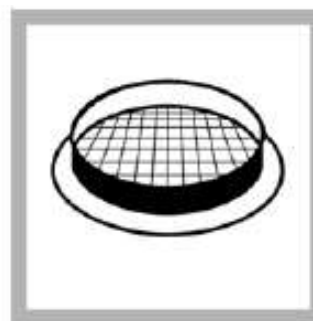
4. Lắp bộ lọc màng. Sử dụng giá kẹp tiệt trùng để đặt giấy lọc lên trên phễu lọc sao cho phần kẻ sọc hướng lên. Để tiệt trùng giá kẹp, nhúng giá đỡ vào trong cồn và đốt trong cồn hoặc dưới đèn đốt Bunsen. Để giá đỡ nguội trước khi sử dụng



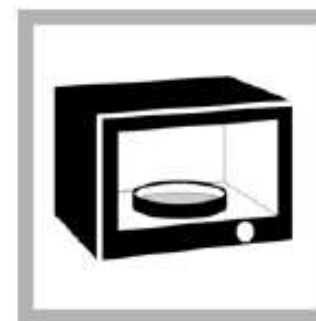
5. Chuẩn bị pha loãng cần thiết để thu được mẫu theo thể tích thích hợp. Đảo mẫu trong 30 giây để xáo trộn hoàn toàn. Đổ mẫu vào trong phễu lọc. Rửa sạch vách phễu với 20-30mL nước pha loãng đã được đệm và tiệt trùng. Hút chân không. Lặp lại bước rửa hai hoặc nhiều hơn.



6. Tắt bơm hút chân không và nâng đầu phễu lên. Sử dụng kẹp tiệt trùng để chuyển màng lọc đến đĩa petri đã chuẩn bị trước đó.



7. Với việc di chuyển lăn tròn nhẹ, đặt giấy lọc với mặt có kẻ sọc hướng lên trên bề mặt agar. Kiểm tra có bọt khí bên dưới giấy lọc hay không và đảm bảo toàn bộ giấy lọc chạm vào agar. Thay nắp đĩa petri.



4. Quay ngược đĩa petri. Để ủ ở 35 ± 0.5 °C trong 2 giờ và sau đó ở 44.5 ± 0.2 °C trong 22 giờ.



9. Để xác nhận, sử dụng kẹp tiết trùng để chuyển giấy lọc đến miếng đệm đã được bão hòa với ít nhất 2mL dung dịch ure.

Chuẩn bị dung dịch ure:

- Hòa tan 2.0g $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ vào 100mL nước khử ion
- Cho 10mg chất chỉ thị natri phenol đỏ vào dung dịch ure
- Dùng 0.02N axit sunfuric để điều chỉnh pH trong khoảng 3-4. Dung dịch sẽ chuyển sang màu vàng.
- Bảo quản dung dịch này ở 2 đến 8°C. Sử dụng trong vòng 1 tuần.



10. Sau 15 phút, đếm các khuẩn lạc có màu vàng hoặc vàng nâu bằng kính hiển vi 10-15X. Sự xuất hiện của các khuẩn lạc màu vàng hoặc vàng nâu cho thấy có sự hiện diện của *E.coli*



11. Ghi lại kết quả thí nghiệm. Xem phần **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 giấy 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 giấy 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.

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

Môi trường và thuốc thử cần thiết

Description	Unit	Catalog number
m-TEC Agar Tubes, 2 tests/tube (for <i>E. coli</i> determination)	6/pkg	2561106
Phenol Red Sodium Salt	5 g	2563922
Sulfuric Acid, 0.02 N	100 mL	20342
Urea Reagent, ACS	100 g	1123726

Dụng cụ cần thiết

Description	Unit	Catalog number
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
Filters, Membrane, 47-mm, 0.45- μ m, gridded, sterile, Gelman	200/pkg	1353001
Filters, Membrane, 47-mm, 0.45- μ m, 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 ID	3.7 m (12 ft)	56019