

Coliforms-*E.coli*

Phương pháp màng lọc USEPA

Phương pháp 8367¹
modified m-TEC

Phạm vi ứng dụng: nước ăn uống, nước không dùng ăn uống, nước giải trí 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 hoặc 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.

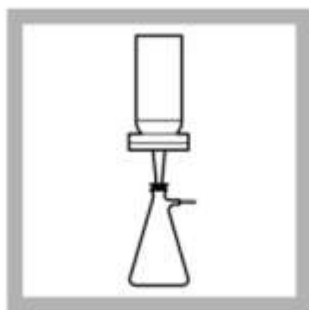
Đĩa agar chuẩn bị sẵn môi trường Modified m-TEC dùng cho xác định *E.coli* trong nước giải trí

Phương pháp một bước cải tiến sử dụng modified m-TEC agar để phát hiện vi khuẩn *E.coli* trong các mẫu nước ngọt dùng cho mục đích giải trí. Modified m-TEC agar chứa chất enzyme để tách sản sinh ra khuẩn lạc. Các khuẩn lạc có màu đỏ hoặc đỏ tươi chỉ thị cho sự hiện diện của *E.coli*. Bước xác nhận không cần thực hiện đối với phương pháp này.



1. Lắp bộ lọc màng. Tham khảo hướng sử dụng trong phần giới thiệu Coliforms. 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

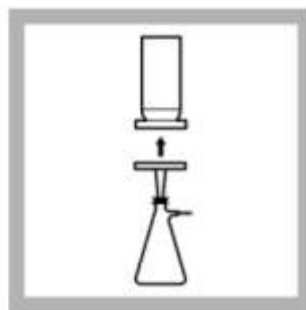


2. Chuẩn bị phần để pha loãng cần thiết để thu được 20-80 khuẩn lạc *E.coli* trên màng.

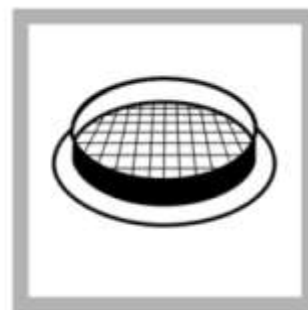
Đảo mẫu trong 30 giây để xáo trộn hoàn toàn.

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 đến ba lần.

Rút ống hút chân không khi màng lọc đã khô để ngăn ngừa làm hỏng màng lọc



3. Tắt bơm hút chân không và nâng đầu phễu lên. Sử dụng kẹp tiệt trùng để chuyển màng lọc đến đĩa petri chứa modified m-TEC agar đã chuẩn bị sẵn.



4. 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 màng lọc hay không và đảm bảo toàn bộ màng lọc chạm vào agar. Thay nắp đầy đĩa petri.



5. 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.



6. Đếm các khuẩn lạc có màu đỏ hoặc đỏ tươi bằng kính hiển vi độ phóng đại 10-15X.



7. Ghi lại kết quả thí nghiệm xác định số khuẩn lạc *E.coli*. 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. Sử dụng thiết bị AQUA QC-STIK™ cho các quy trình kiểm soát chất lượng. Hướng dẫn sử dụng đi kèm với mỗi 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

Môi trường và thuốc thử cần thiết

Description	Unit	Catalog number
m-TEC, modified, prepared agar plates, 47-mm	15/pkg	2811815

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-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 ID	3.7 m (12 ft)	56019

Thuốc thử, môi trường và dụng cụ tùy chọn

Description	Unit	Catalog number
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
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

Thuốc thử, môi trường và dụng cụ tùy chọn (tiếp theo)

Description	Unit	Catalog number
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 Add the contents of one potassium dihydrogen phosphate and one magnesium chloride powder pillow to one liter of distilled water and autoclave (sterilize) to prepare American Public Health Association buffered dilution water.