

Phạm vi ứng dụng: Nước không uống được và nước thải.

¹ Phương pháp MPN 8368, Môi trường nuôi cấy A-1, được USEPA-chấp thuận sử dụng cho thí nghiệm đối với nước không uống được. Phương pháp 8368 đáp ứng hoặc vượt qua các tiêu chuẩn thông số kỹ thuật được nêu trong Các phương pháp chuẩn xét nghiệm nước và nước thải, xuất bản lần thứ 18, 9221, Quy trình E. Fecal Coliform. Hướng dẫn sử dụng của USEPA đối với Chứng nhận Phân tích nước uống trong phòng thí nghiệm đã nêu ở mục “5.5.3. Môi trường nuôi cấy A-1 có thể được sử dụng thay thế cho Môi trường nuôi cấy EC để kê khai Fecal coliforms có trong nguồn nước, phù hợp với Quy tắc xử lý nước bề mặt. Môi trường nuôi cấy A-1 không được sử dụng cho các mẫu nước uống”

Trước khi bắt đầu thí nghiệm:

Đảm bảo rằng các vật liệu được sử dụng để chứa hoặc chuyển mẫu đều vô trùng .
Bình đựng nước pha loãng có chứa 99 mL nước pha loãng được đệm vô trùng. Khi thêm 11 mL mẫu vào bình nước pha loãng 99-mL, mẫu được pha loãng theo hệ số 10 (pha loãng gấp 10 lần hoặc 10x). Đảm bảo trộn kỹ dung dịch trong chai trước và sau khi cho thêm mẫu.
Tham khảo Pha loãng mẫu trong phần Dẫn nhập vào mục Vi khuẩn để tìm số lần pha loãng cần thực hiện đối với các loại mẫu. Ví dụ nếu bùn Class A, thêm vào dung dịch pha loãng mẫu 100X vào 5 ống, một dung dịch pha loãng mẫu 1000X vào 5 ống và dung dịch pha loãng mẫu 10,000X vào 5 ống. Nếu không biết mật độ coliform, cho 5 dung dịch pha loãng khác nhau vào 5 bộ ống MPN.
Nếu tất cả các ống đều dương tính, pha loãng mẫu thêm nhiều lần và thực hiện lại thí nghiệm. Nếu tất cả các ống đều âm tính, mẫu đã bị pha loãng quá nhiều lần. Lặp lại thí nghiệm với tỉ lệ pha loãng có khoảng cách gần nhau hơn.
Nếu thực hiện nhiều hơn 3 dung dịch pha loãng, sử dụng 3 dung dịch pha loãng liên tiếp chứa cả ống dương tính lẫn âm tính.
Hệ số pha loãng cho một mẫu nguyên chất là 1.
Không cần qua bước xác nhận lại khi sử dụng Môi trường nuôi cấy A-1.
Khử trùng bàn thí nghiệm bằng một miếng vải diệt khuẩn, pha loãng dung dịch chất tẩy rửa, thuốc xịt diệt khuẩn hoặc dung dịch iot pha loãng. Rửa tay kỹ bằng xà phòng và nước.

Thu thập các vật liệu sau:

Mô tả	Số lượng
Môi trường nuôi cấy A-1 trong ống	15
Nước pha loãng, đã được đệm, 99-mL, vô trùng	3 chai
Máy ủ	1
Pipet, serological, 10-11 mL, vô trùng	3
Giấy lọc	1
Khay chứa ống MPN	1

Xem [Các mục thay thế và tiêu hao](#) để biết thêm thông tin.

Fecal Coliforms, Môi trường nuôi cấy A-1, phương pháp 8368



1. Rửa tay sạch bằng nước và xà phòng.

Đào mẫu trong vòng 30 giây, khoảng 25 lần, để đảm bảo rằng mẫu được trộn kỹ.



2. Sử dụng nước pha loãng được đệm vô trùng, chuẩn bị ít nhất 3 dung dịch pha loãng mẫu liên tiếp.

Tham khảo **Pha loãng mẫu** để biết hướng dẫn chi tiết.



3. Gỡ bỏ nắp từ 15 ống đựng Môi trường nuôi cấy A-1. Sử dụng một ống pipet vô trùng để chuyển 10 mL dung dịch pha loãng thứ nhất vào 5 ống. Sử dụng một ống pipet vô trùng để chuyển 10 mL dung dịch pha loãng thứ 2 vào 5 ống. Sử dụng một ống pipet vô trùng để chuyển 10 mL dung dịch pha loãng thứ 3 vào 5 ống.

Không chạm vào phần đuôi ống hoặc bên trong nắp đậy.



4. Thay thế nắp vặn trên mỗi ống ngay sau khi thêm mẫu vào. Đảo và khuấy ống nhiều lần để trộn kỹ mẫu với môi trường nuôi cấy dinh dưỡng. Sau lần đảo cuối cùng, đảm bảo rằng bên trong lọ chứa đầy chất lỏng và không có bọt khí.



5. Đặt các ống vào Máy ủ ở nhiệt độ $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Bất kỳ bọt khí nào hình thành bên trong ống trong quá trình này đều không phải do vi khuẩn. Đảo ống để đảm bảo rằng bọt khí bị loại bỏ khỏi ống. Chắc chắn rằng không còn bọt khí và sau đó đưa các ống trở lại vị trí thẳng đứng. Đưa ống về lại máy ủ.



6. Sau 3 giờ, đảo ống để loại bỏ không khí kẹt bên trong. Nới lỏng nhẹ nắp trước khi đưa trở lại máy ủ. Tăng nhiệt độ lên thành $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ và ủ trong thời gian bổ sung là 21 giờ. Ống phải được giữ thẳng đứng trong thời gian còn lại của thí nghiệm.



7. Sau khoảng 24 ± 2 giờ, gõ nhẹ từng ống và kiểm tra có khí bên trong ống hay không. Nếu bên trong ống chứa bọt khí, thí nghiệm cho kết quả dương tính với vi khuẩn fecal coliform. Đếm số lượng ống có chứa khí. Nếu không có ống nào chứa khí, thí nghiệm cho kết quả âm tính với vi khuẩn fecal coliform



8. Tìm chỉ số MPN trên mỗi 100 mL từ bảng chỉ số MPN.

Nhân chỉ số MPN với hệ số pha loãng trong bộ ống thứ nhất (dung dịch pha loãng thấp nhất được sử dụng trong thí nghiệm).
(Chỉ số MPN x hệ số pha loãng thấp nhất = vi khuẩn fecal coliform trên mỗi 100 mL mẫu)
Xem Ví dụ tính toán.

Pha loãng mẫu

Hoàn tất tiến trình sau để tạo ra các dung dịch pha loãng mẫu liên tiếp. Tham khảo [Hướng dẫn pha loãng tùy theo loại mẫu](#) để tìm số lần mẫu cần phải được pha loãng. Sử dụng 3 dung dịch pha loãng từ [Hướng dẫn pha loãng tùy theo loại mẫu](#) cho thí nghiệm (bước 3 của tiến trình fecal coliform).

Tiến trình

1. Rửa tay.
2. Mở một bình đựng Nước pha loãng được đệm vô trùng.
3. Đảo vật chứa mẫu trong khoảng 30 giây, xấp xỉ 25 lần.
4. Sử dụng một ống pipet vô trùng để nhỏ 11 mL mẫu vào bình đựng nước pha loãng.
5. Đóng nắp bình đựng nước pha loãng và đảo mẫu (trong 30 giây) 25 lần. Đây là dung dịch pha loãng gấp 10 lần hoặc 10x (mẫu được pha loãng theo hệ số 10).
6. Thêm 11 mL dung dịch pha loãng 10x vào một bình đựng dung dịch pha loãng khác và trộn đều (dung dịch pha loãng 100x).
7. Thêm 11 mL dung dịch pha loãng 100x vào một bình đựng dung dịch pha loãng khác và trộn đều (dung dịch pha loãng 1000x).
8. Tiếp tục tạo dung dịch pha loãng cho tới khi có ba bình đựng dung dịch pha loãng được liệt kê trong [Hướng dẫn pha loãng tùy theo loại mẫu](#).

Lưu ý: Lắc mẫu quá mạnh sẽ làm tổn thương hoặc làm căng các vi sinh vật.

Bảng 1 Hướng dẫn pha loãng tùy theo loại mẫu

Dạng mẫu	D.dịch pha loãng 1	D.dịch pha loãng 2	D.dịch pha loãng 3
Nước hồ bơi, khử trùng bằng chlorine	Nguyên chất (1x)	10x	100x
Nước bãi tắm	10x	100x	1000x
Nước hồ	10x	100x	1000x
Nước sông chưa bị ô nhiễm	10x	100x	1000x
Nước thải sau cùng, khử trùng bằng chlorine	100x	1000x	10,000x
Nước sông ô nhiễm	1000x	10,000x	100,000x
Nước mưa	10,000x	100,000x	1,000,000x
Nước thải sau cùng chưa được khử bằng chlorine	10,000x	100,000x	1,000,000x
Nước thải thô	100,000x	1,000,000x	10,000,000x

Ví dụ tính toán

Một mẫu được pha loãng thành 3 chai dung dịch pha loãng được đậm khác nhau. Dung dịch được pha loãng gấp 10 lần (10x), 100-lần (100x) và 1000-lần (1000x). 5 ống MPN được đổ đầy từ mỗi dung dịch pha loãng (tổng cộng 15 ống). Bộ ống đầu tiên (10x) có 4 ống có khí, bộ thứ 2 (100x) có 2 ống có khí và bộ thứ ba (1000x) có 1 ống có khí.

1. Tìm chỉ số MPN cho 3 bộ ống từ [Bảng chỉ số MPN](#).
2. Nhân chỉ số MPN cho hệ số pha loãng thấp nhất.

Chỉ số MPN từ [Bảng chỉ số MPN](#) đối với 4, 2 và 1 ống dương tính là 26. Kết quả coliform đối với mẫu là $26 \times 10 = 260$ coliforms trên mỗi 100 mL mẫu.

Bảng 2 Chỉ số MPN

Số lượng ống dương tính			Chỉ số MPN trên mỗi 100 mL	Số lượng ống dương tính			Chỉ số MPN trên mỗi 100 mL
Bộ dung dịch pha loãng thứ nhất	Bộ dung dịch pha loãng thứ hai	Bộ dung dịch pha loãng thứ ba		Bộ dung dịch pha loãng thứ nhất	Bộ dung dịch pha loãng thứ hai	Bộ dung dịch pha loãng thứ ba	
0	0	0	<2	4	2	1	26
0	0	1	2	4	3	0	27
0	1	0	2	4	3	1	33
0	2	0	4	4	4	0	34
1	0	0	2	5	0	0	23
1	0	1	4	5	0	1	30
1	1	0	4	5	0	2	40
1	1	1	6	5	1	0	30
1	2	0	6	5	1	1	50
2	0	0	4	5	1	2	60
2	0	1	7	5	2	0	50
2	1	0	7	5	2	1	70
2	1	1	9	5	2	2	90
2	2	0	9	5	3	0	80
2	3	0	12	5	3	1	110
3	0	0	8	5	3	2	140
3	0	1	11	5	3	3	170
3	1	0	11	5	4	0	130
3	1	1	14	5	4	1	170
3	2	0	14	5	4	2	220
3	2	1	17	5	4	3	280
4	0	0	13	5	4	4	350
4	0	1	17	5	5	0	240
4	1	0	17	5	5	1	300
4	1	1	21	5	5	2	500
4	1	1	26	5	5	3	900
4	2	0	22	5	5	4	1600
				5	5	5	≥ 1600

Thu thập, bảo quản và lưu trữ mẫu

- Thu thập ít nhất 100 mL mẫu vào trong Túi Whirl-Pak® vô trùng, bình đựng vô trùng dùng một lần hoặc bình nhựa/thủy tinh sử dụng cho nồi hấp.
- Không đổ đầy tràn mẫu vào vật chứa. Bỏ lại ít nhất 2.5 cm (khoảng 1 inch) khoảng không khí đảm bảo đủ không gian phù hợp để trộn đều mẫu trước khi phân tích.
- Đảm bảo lấy được mẫu đại diện của nguồn mẫu. Đổ mẫu vào vật chứa từ một bể chứa hoặc hồ chứa nằm hoàn toàn dưới nước.
- Bắt đầu phân tích càng sớm càng tốt sau khi thu thập. Cho phép không nhiều hơn 6 giờ sau khi thu thập. Nếu không thể bắt đầu thí nghiệm ngay lập tức, làm lạnh mẫu xuống dưới mức 10 °C. Không làm đông lạnh mẫu. Thu thập và vận chuyển mẫu không đúng cách sẽ gây ra kết quả không chính xác.

Kiểm soát

Kiểm soát dương tính và âm tính rất quan trọng. Kiểm soát âm tính nên là *Pseudomonas aeruginosa* và kiểm soát dương tính *Escherichia coli*. Sử dụng thiết bị AQUA QC-STIK™ cho tiến trình quản lý chất lượng. Hướng dẫn sử dụng đi kèm với mỗi thiết bị AQUA QC-STIK. Mẫu nước uống từ các cơ sở xử lý nước đô thị cần âm tính với coliforms tổng hợp và fecal coliforms.

Xử lý vi khuẩn

Để xử lý an toàn Môi trường nuôi cấy vi khuẩn còn lại trong ống nuôi cấy, sử dụng một trong các phương pháp sau:

Sử dụng chất tẩy

Khử trùng vật chứa đã được sử dụng trong thí nghiệm bằng chất tẩy gia dụng. Thêm 1–2 mL chất tẩy vào mỗi vật chứa sử dụng trong thí nghiệm. Để vật chứa tiếp xúc với chất tẩy từ 10 đến 15 phút. Đổ chất lỏng xuống cống thải.

Sử dụng nồi hấp

Cho vật chứa đã được sử dụng trong thí nghiệm vào túi chứa vật liệu nhiễm khuẩn hoặc một túi biohazard để tránh rò rỉ ra nồi hấp. Hấp các vật chứa đã được sử dụng trong thí nghiệm trong túi chưa đóng kín ở 121 °C trong vòng 30 phút ở áp suất 15 pounds. Khi nguội, đóng kín túi, đặt vào túi rác khác và cột chặt.

Tổng kết phương pháp

Phương pháp xác định số xác suất cực đại (MPN) (cũng được gọi là Kỹ thuật lên men nhiều ống) sử dụng ống có nắp vặn có chứa môi trường nuôi cấy vô trùng. Các ống bao gồm 1 lọ được đảo để thu khí (ống Durham). Mẫu được pha loãng, cho vào ống và được ủ. Nếu có coliforms trong dung dịch, khí được sản sinh và bị giữ lại trong ống.

Số lượng các ống hình thành khí được sử dụng để ước tính số lượng sinh vật coliform trong mẫu. Phương pháp MPN cho phép phân tích các mẫu có độ đục cao bằng cách pha loãng trước khi phân tích. Không cần lọc.

Các vật liệu tiêu hao và có thể thay thế

Môi trường nuôi cấy và chất thử cần thiết

Mô tả	Đơn vị	Mã đặt hàng
Môi trường nuôi cấy A-1 Broth Tubes	15/pkg	2560915
Nước pha loãng, được đệm, 99-mL, vô trùng ¹	25/pkg	1430598

1 Nước pha loãng được đệm được chuẩn bị bằng magnesium chloride và potassium dihydrogen phosphate.

Thiết bị cần thiết

Mô tả	Đơn vị	Mã đặt hàng
Túi, Whirl-Pak®, không có tác nhân khử chlorine, 207-mL	100/pkg	2233199
Máy ủ, 12-well Dri-Bath, 120 VAC, 50/60 Hz	cái	2281400
Máy ủ, Môi trường nuôi cấy, 120 VAC, 50/60 Hz	cái	2619200
Pipet, serological, 10-11 mL, vô trùng, dùng một lần	25/pkg	209798
Pipet safety bulb	cái	1465100

Môi trường nuôi cấy và chất thử tùy chọn

Mô tả	Đơn vị	Mã đặt hàng
Gói chất bột sử dụng cho nước pha loãng đã được đệm (25/mỗi gói) ¹	50/pkg	2143166

1 Đổ một gói bột potassium dihydrogen phosphate và một gói magnesium chloride vào 1 lít nước được pha loãng và hấp (khử trùng) để chuẩn bị nước pha loãng được đệm theo Hiệp hội sức khỏe công cộng Hoa Kỳ (American Public Health Association).

Thiết bị tùy chọn

Mô tả	Đơn vị	Mã trong Cat.
Adapter sử dụng cho bộ pin sạc, 230 VAC (cho 2580300)	cái	2595902
Túi sử dụng cho các vật liệu nhiễm khuẩn	200/pkg	2463300
Túi, Whirl-Pak®, có tác nhân khử chlorine, 180-mL	100/pkg	2075333
Túi, Whirl-Pak®, không có tác nhân khử chlorine, 207-mL	500/pkg	2233100
Battery eliminator	cái	2580400
Bộ pin sạc, sử dụng cho máy ủ cầm tay 12 VDC	cái	2580300
Bình, polysulfone, dùng cho nồi hấp (sử dụng cho nước pha loãng đã được đệm)	12/pkg	2245300
Bình đựng mẫu, vô trùng, 100-mL fill-to line, dùng một lần	12/pkg	2495012
Bình đựng mẫu, vô trùng, 100-mL fill-to line, dùng một lần	50/pkg	2495050
Bình đựng mẫu, vô trùng, 100-mL fill-to line, dùng một lần có tác nhân khử	50/pkg	2599150
Dechlorinating Reagent Powder Pillows	100/pkg	1436369
Vải diệt khuẩn	50/pkg	2463200
Máy ủ cầm tay, 12 VDC	cái	2569900
Marker, Laboratory	cái	2092000
Pipet, Serological, 1-mL, vô trùng, dùng một lần, được bọc riêng	50/pkg	2092835
Pipet, Serological, 10-mL, vô trùng, dùng một lần, được bọc riêng	50/pkg	2092628
Pipet, TenSette®, 1.0–10.0 mL	cái	1970010
Pipet tips, vô trùng, được bọc riêng	200/pkg	2558996
Pipet Aid, 110 VAC Recharger, 4 màng lọc thay thế (UL, CSA approved)	cái	2551701
Giá đỡ, Ống Coliform	cái	221500