

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC ĐỊNH LƯỢNG ESCHERICHIA COLI VÀ COLIFORMS – PHƯƠNG PHÁP LỌC MÀNG	Mã số: HD.VS.027 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:1/6
---	--	---

ĐỊNH LƯỢNG ESCHERICHIA COLI VÀ COLIFORMS – PHƯƠNG PHÁP LỌC MÀNG

Nhân viên biên soạn	Nhân viên xem xét	Nhân viên phê duyệt
Nguyễn Thị Lệ Huyền	Trần Thái Vũ	Trần Thái Vũ

THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

STT	Vị trí	Nội dung sửa đổi	Ngày sửa đổi
1		Thay đổi Header	01/03/2017

A. GIỚI THIỆU

1. Phạm vi áp dụng

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC ĐỊNH LƯỢNG ESCHERICHIA COLI VÀ COLIFORMS – PHƯƠNG PHÁP LỌC MÀNG	Mã số: HD.VS.027 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:2/6
---	--	---

Phương pháp này được áp dụng để định lượng *Coliforms* tổng và *E.coli* trong nước bằng phương pháp màng lọc.

2. Tài liệu tham khảo

- TCVN 6187-1:2014 (ISO 9308-1:2014 (E))
- TCVN 6404 : 2008
- TCVN 9716:2013 (ISO 8199:2005)

3. Nguyên tắc

Định lượng *Coliforms* và *E.coli* dựa trên nguyên tắc lọc một thể tích mẫu nước xác định qua một màng lọc có kích lỗ lọc thích hợp để giữ lại các vi khuẩn. Màng lọc được đặt vào môi trường Chromogenic Coliform Agar (CCA), ủ ở nhiệt độ xác định. Đếm các khuẩn lạc đặc trưng được hình thành trên màng.

- Vi khuẩn Coliform loại Enterobacterraceac sản xuất -D –Galactosidase cho khuẩn lạc màu hồng tới đỏ.
- Vi khuẩn *E. coli* loại Enterobacterraceac sản xuất -D –Galactosidase và -D-Glucuronidase cho khuẩn lạc màu xanh đen tới tím.

→ Loại trừ dương tính giả bởi vi khuẩn cho Oxydase dương tính. Các vi khuẩn Coliform cho Oxydase âm tính.

Tổng số Coliform tổng khuẩn lạc có oxydase âm tính màu hồng tới đỏ và xanh đen tới tím..

4. Lấy mẫu và bảo quản mẫu

Xét nghiệm mẫu ngay lập tức sau khi nhận mẫu.

Nếu mẫu giữ ở nhiệt độ phòng (trong tối, không quá 25°C) thì xét nghiệm mẫu trong vòng 6 giờ kể từ khi nhận mẫu.

Ngoài ra, mẫu có thể được bảo quản ở nhiệt độ $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ cho tới 24 giờ kể từ khi nhận mẫu.

.

B. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ và HÓA CHẤT

1. Dụng cụ

- Chai Dural 250ml, 500ml

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC ĐỊNH LƯỢNG ESCHERICHIA COLI VÀ COLIFORMS – PHƯƠNG PHÁP LỌC MÀNG	Mã số: HD.VS.027 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:3/6
---	--	---

- Đĩa Petri.
- Màng lọc kích thước lỗ lọc 0,45µm đường kính 47mm hoặc 50mm.
- Ống nghiệm 18ml.
- Pippet 1ml.
- Ống đong 500ml
- Cốc có mỏ 50ml, 250ml, 500ml
- Bình cồn.
- Kẹp inox khử trùng.

2. Thiết bị

- Cân kỹ thuật
- Tủ ấm (36 ± 2)°C.
- Lò hấp ướ (Autoclave)
- Lò vi sóng.
- Tủ cấy vô trùng.
- Tủ sấy
- Thiết bị lọc.
- Máy đo pH với độ chính xác ± 0,1 ở 20 → 25°C.

3. Môi trường, thuốc thử

- Thạch Chromogenic Coliform Agar (CCA).
- Thạch TSA (Tryptic Soy Agar).
- Test thử oxydase.

C. QUI TRÌNH THÍ NGHIỆM

1. Chuẩn bị môi trường, thuốc thử

1.1 *Chromogenic Coliform Agar (CCA)*:

* Thành phần:

- Enzymatic digest of casein 1,0g.
- Yeast extract 2,0g.

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC ĐỊNH LƯỢNG ESCHERICHIA COLI VÀ COLIFORMS – PHƯƠNG PHÁP LỌC MÀNG	Mã số: HD.VS.027 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:4/6
---	--	---

- Nacl	5,0g.
- NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	2,2g.
- NaH ₂ PO ₄	2,7g.
- Sodium pyurate	1,0g.
- sorbifol	1,0g.
- Tryptophane	1,0g.
- Secondarg alcool ethyloxylate Surfactant	0,15g.
- 6 - chloro - 3 - indoxyl – – D - glucuronid acid, cyclohexylammonium saltmonohydrate	0,1g.
- Isopropyl - – D – thiogalactopyranoside	0,1.
- Agar	10g.
- Nước cất	1000ml.

*** Pha chế:** Cân các thành phần trên theo công thức trên. Cho vào 1000ml nước cất đun nóng và khuấy đều cho đến khi tan hoàn toàn. Nếu cần thiết chỉnh pH=6,8±0,2 ở 25°C. Để nguội 45-50°C đổ vào đĩa petri độ dày khoảng 4mm. Nếu không dùng ngay bảo quản ở (5±3)°C trong tối, có thể lưu trữ trong một tháng. Trước khi sử dụng nếu đĩa môi trường có ẩm ướt thì nên làm khô trong thời gian thích hợp.

1.2 Thuốc thử oxydase:

- N,N,N',N' – Tetramethyl – p. phenylenediamine dihydrochlorid	0,1g.
- Nước cất	100ml.

Thuốc thử này không ổn định nên pha một lượng nhỏ cần thiết trong mỗi lần pha và phải bảo quản trong tối.

*** Cảnh báo:** N,N,N',N' – Tetramethyl – p. phenylenediamine dihydrochlorid gây ung thư. Việc pha chế thuốc thử này phải được thực hiện trong điều kiện an toàn, dùng găng bảo vệ và tránh tiếp xúc với da.

Có thể sử dụng các đĩa hoặc que thử có bán sẵn. Trong trường hợp này, cần theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

1.3 Tryptone Soy Agar (TSA)

- Tryptone	15,0g.
------------	--------

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC ĐỊNH LƯỢNG ESCHERICHIA COLI VÀ COLIFORMS – PHƯƠNG PHÁP LỌC MÀNG	Mã số: HD.VS.027 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang: 5/6
---	--	--

- Soy peptone 5,0g.
- Sodium chloride 5,0g.
- Agar 15-25g.
- Nước cất 1000ml.

*** Pha chế:** Cho các thành phần trên vào nước, đun và khuấy cho tan đều. Nếu cần thiết chỉnh pH sau khi hấp $7,2 \pm 0,1$ ở 25°C . Hấp tiệt trùng $121^{\circ}\text{C}/15$ phút. Để nguội khoảng 50°C và rót ra đĩa petri dày ít nhất 4mm. Nếu không dùng ngay có thể lưu trữ $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ trong tối và bảo quản được ít nhất tám tuần.

2 Các bước tiến hành:

Bước 1: Lọc và cấy vào môi trường.

- Lọc 250ml đối với nước khoáng, nước tinh lọc đóng chai (bình), nước đá dùng liền. Lọc 100ml đối với nước ngầm, nước sinh hoạt, nước giếng, nước chế biến.
- Dùng kẹp vô trùng đặt màng lọc lên môi trường thạch CCA, chú ý không để tạo thành bọt khí ở dưới màng.

Bước 2: Ủ màng lọc.

- Ủ màng lọc ở nhiệt độ $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ trong (21 ± 3) giờ.

Bước 3: Kiểm tra màng lọc.

Sau khi ủ.

- Đếm tất cả khuẩn lạc có -D-Galactosidase (hồng tới đỏ) đó là Coliforms không phải E. coli.
- Đếm tất cả khuẩn lạc có -D-Galactosidase và -D-Glucuronidase (xanh đen tới tím) đó là E. coli.

Bước 4: Khẳng định.

- Thực hiện thử nghiệm oxidase trên ít nhất 10 khuẩn lạc từ hồng tới đỏ để khẳng định Coliforms cho thử nghiệm oxidase âm tính (có thể sử dụng oxydase test).
- Nếu có quá nhiều khuẩn lạc (khuẩn lạc mọc dày, không tách rời) thì pha loãng mẫu và tiến hành lọc lại mẫu. Nếu khuẩn lạc quá nhỏ không thực hiện được thử

CÔNG TY TNHH MTV KHOA HỌC CÔNG NGHỆ HOÀN VŨ	HƯỚNG DẪN CÔNG VIỆC ĐỊNH LƯỢNG ESCHERICHIA COLI VÀ COLIFORMS – PHƯƠNG PHÁP LỌC MÀNG	Mã số: HD.VS.027 Lần ban hành: 02 Ngày ban hành: 01/03/2017 Trang:6/6
---	--	---

thử nghiệm oxydase thì cấy chuyển khuẩn lạc trên môi trường TSA rồi ủ (36 ± 2)⁰C trong (21 ± 3) giờ, sau đó tiến hành thử nghiệm oxydase.

Bước 5: Tính kết quả

- Từ số khuẩn lạc đếm được, tính toán ra số E.coli và Coliforms có trong 250ml (hoặc 100ml) theo công thức sau:

$$C \text{ (CFU/V)} = \frac{A \times N}{B}$$

C : Số vi khuẩn được khẳng định, tính trong 250ml (hoặc 100ml).

A : Số khuẩn lạc được khẳng định và cho kết quả dương tính.

B : Số khuẩn lạc thử khẳng định.

N : Số khuẩn lạc đặc trưng đếm được trên màng.

V : Thể tích nước lọc.

- Tổng số Coliform là tổng của tất cả khuẩn lạc có màu hồng tới đỏ và xanh đen tới tím cho kết quả oxydase âm tính.

- E. coli là tất cả các khuẩn lạc có màu xanh đen tới tím.

D. KẾT QUẢ

Kết quả được qui định ghi số CFU/250ml đối với nước khoáng, nước tinh lọc đóng chai (bình), nước đá dùng liền hoặc CFU/100ml đối với nước ngầm, nước sinh hoạt, nước chế biến và được ghi vào **BM.VS.027.01**