

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 6187 - 1: 2009**

**ISO 9308 - 1 : 2000**

Xuất bản lần 2

**CHẤT LƯỢNG NƯỚC –  
PHÁT HIỆN VÀ ĐẾM ESCHERICHIA COLI VÀ  
VI KHUẨN COLIFORM –  
PHẦN 1 : PHƯƠNG PHÁP LỌC MÀNG**

*Water quality -*

*Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria  
Part 1: Membrane filtration method*

HÀ NỘI - 2009

**Lời nói đầu**

**TCVN 6187 – 1 : 2009** thay thế TCVN 6187 – 1 : 1996.

**TCVN 6187 – 1 : 2009** hoàn toàn tương đương với ISO 9308 – 1 : 2000/Cor 1 : 2007.

**TCVN 6187 – 1 : 2009** do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn Quốc gia TCVN / TC 147 *Chất lượng nước* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

**TCVN 6187 (ISO 9308) *Chất lượng nước – Phát hiện và đếm Escherichia coli và vi khuẩn coliform*** gồm hai phần sau đây:

- TCVN 6187 – 1 : 2009 (ISO 9308 – 1 : 2000/Cor 1: 2007) Phần 1: Phương pháp lọc màng;
- TCVN 6187 – 2: 1996 (ISO 9308 – 2 : 1990) Phần 2: Phương pháp nhiều ống (số có xác suất cao nhất).

## Lời giới thiệu

Đánh giá ô nhiễm do phân là một yếu tố quan trọng trong đánh giá chất lượng một vực nước và đánh giá rủi ro đối với sức khoẻ con người. Kiểm tra mẫu nước về sự tồn tại của *Escherichia coli*, thường sống trong ruột của người và các động vật máu nóng khác sẽ cung cấp những chỉ báo cho sự ô nhiễm đó. Kiểm tra vi khuẩn coliform thường gặp khó khăn vì một số coliform không sống trong ruột mà sống trong đất và nước mặt. Do vậy, sự tồn tại của vi khuẩn coliform dù không có nguồn gốc từ sự nhiễm bẩn do phân, có thể chỉ báo sai cho việc xử lý. Việc nhận dạng các chủng đã được phân lập có thể chỉ ra nguồn gốc của chúng.

## Chất lượng nước – Phát hiện và đếm *Escherichia coli* và vi khuẩn coliform –

### Phần 1: Phương pháp lọc màng

*Water quality – Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria  
Part 1: Membrane filtration method*

#### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả phương pháp làm đối chứng (Phép thử Tiêu chuẩn) để phát hiện và đếm khuẩn *Escherichia coli* và vi khuẩn coliform trong nước dùng cho sinh hoạt. Phép thử Tiêu chuẩn có độ chọn lọc thấp nhưng cho phép phát hiện cả những vi khuẩn có hoạt tính đã bị yếu. Do độ chọn lọc thấp, sự phát triển của nền mẫu có thể ảnh hưởng tới độ tin cậy của việc đếm vi khuẩn coliform và *E. coli* vi dụ trong nước uống, nước giếng nông và nước mặt. Phương pháp này không thích hợp cho những loại nước này. Phép thử Tiêu chuẩn dựa trên sự lọc qua màng rồi cấy trên môi trường thạch khác nhau và tính số lượng các loài sinh vật quan tâm có trong mẫu.

Tiêu chuẩn này đặc biệt thích hợp cho những loại nước có số lượng vi khuẩn thấp. Trường hợp đặc biệt cần thông tin nhanh, phương pháp này (Phép thử Nhanh) phát hiện *E. coli* trong nước dùng cho sinh hoạt chỉ trong 24 h.

Phép thử Nhanh dựa trên sự lọc qua màng, rồi cấy trong điều kiện chọn lọc và tính số *E. coli* trong mẫu.

Phép thử Tiêu chuẩn và Phép thử Nhanh có thể dùng cho các loại nước khác miễn là chất rắn lơ lửng và thực vật trong nước không cản trở việc lọc, nuôi cấy và đếm.

#### 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851-89 (ISO 3696 : 1987) Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử;

## TCVN 6187-1 : 2009

TCVN 5992 : 1995 (ISO 5667-2: 1991<sup>1)</sup>) Chất lượng nước – Lấy mẫu – Hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu;

TCVN 6450 : 2007 (ISO/IEC Guide 2 : 2004) Tiêu chuẩn hoá và các hoạt động có liên quan – Thuật ngữ chung và định nghĩa;

TCVN 6663 – 1: 2002 (ISO 5667-1 : 1980<sup>2)</sup>) Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 1: Hướng dẫn lập chương trình lấy mẫu;

TCVN 6507-1 : 2005 (ISO 6887-1 : 1999) Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Chuẩn bị mẫu thử, huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân để kiểm tra vi sinh vật – Phần 1: Các nguyên tắc chung để chuẩn bị huyền phù ban đầu và các dung dịch pha loãng thập phân;

TCVN 6663 – 3 : 2008 (ISO 5667-3 : 2003) Chất lượng nước – Lấy mẫu – Phần 3: Hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu;

ISO 8199 : 1988<sup>3)</sup> Water quality – General guide to the enumeration of micro-organism by culture (Chất lượng nước – Hướng dẫn chung về đếm vi sinh vật bằng phương pháp nuôi cấy).

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này, áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa của TCVN 6450 (ISO/IEC Guide 2) và các thuật ngữ, định nghĩa sau:

#### 3.1

**Vi khuẩn dương tính với lactoza** (lactose-positive bacteria)

<Phép thử Tiêu chuẩn> vi khuẩn có khả năng tạo thành khuẩn lạc ưa khí ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong vòng  $(21 \pm 3)$  h trên môi trường cấy lactoza chọn lọc khác nhau có sinh ra axit.

#### 3.2

**Vi khuẩn coliform** (coliform bacteria)

<Phép thử Tiêu chuẩn> vi khuẩn dương tính với lactoza như định nghĩa trong 3.1 là âm tính với oxydaza.

#### 3.3

***Escherichia coli***

<Phép thử Tiêu chuẩn> vi khuẩn coliform như định nghĩa trong 3.2 sinh ra indol từ tryptophan ở  $(44.0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  trong  $(21 \pm 3)$  h.

<sup>1)</sup> ISO 5667-2 : 1991 đã bị huỷ và được thay bằng ISO 5667-1 : 2006.

<sup>2)</sup> ISO 5667-1 đã có phiên bản năm 2006.

<sup>3)</sup> ISO 8199 đã có phiên bản năm 2005.

## 3.4

**Escherichia coli**

<Phép thử Nhanh> vi khuẩn kháng mật, sinh ra indol từ tryptophan ở  $(44,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  trong  $(21 \pm 3)$  h.

**4 Nguyên tắc****4.1 Mô tả chung về phương pháp**

Phương pháp này dựa trên sự lọc qua màng và gồm hai phần là Phép thử Tiêu chuẩn làm đối chứng và Phép thử Nhanh tùy chọn có thể tiến hành song song như sau. Phép thử Tiêu chuẩn gồm việc ủ màng trong môi trường chọn lọc sau đó lấy đặc trưng sinh hoá của các khuẩn lạc dương tính lactoza điển hình để phát hiện và đếm vi khuẩn coliform và *E. coli* trong hai ngày đến ba ngày. Phép thử Nhanh gồm hai bước ủ cho phép phát hiện và đếm *E. coli* trong vòng  $(21 \pm 3)$  h. Nếu hai cách thử này được tiến hành song song thì kết quả cuối cùng *E. coli* là cao hơn.

**4.2 Lọc và ủ**

Phần mẫu thử được lọc qua màng để giữ vi khuẩn. Một màng (Phép thử Tiêu chuẩn) được đặt trên môi trường thạch lactoza được ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong  $(21 \pm 3)$  h và một màng (Phép thử Nhanh) đặt trên môi trường thạch chứa casein (tripxin) được ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  từ 4 h đến 5 h, tiếp theo ủ ở  $(44,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  từ 19 h đến 20 h trên môi trường thạch casein (tripxin) và muối mật.

**4.3 Đánh giá và khẳng định, Phép thử Tiêu chuẩn**

Những khuẩn lạc đặc trưng trên màng được đếm là vi khuẩn dương tính với lactoza. Đối với vi khuẩn coliform và *E. coli* việc cấy thử được tiến hành từ những khuẩn lạc đặc trưng đã được chọn ngẫu nhiên để khẳng định: loại sinh ra oxydaza và indol. Đếm số coliform dương tính với lactoza và *E. coli* có trong 100 ml mẫu.

**4.4 Đánh giá và khẳng định, Phép thử Nhanh**

Những khuẩn lạc trên màng có khả năng tạo indol từ tryptophan trong môi trường thạch được đếm là *E. coli*. Đếm số *E. coli* có trong 100 ml mẫu.

**5 Thiết bị và dụng cụ thủy tinh**

Những thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm vi sinh và cụ thể là:

**5.1 Thiết bị tiệt trùng bằng hơi nước (nồi hấp)**

Thiết bị và dụng cụ thủy tinh được tiệt trùng theo hướng dẫn trong ISO 8199.

**5.2 Bếp cách thủy và/hoặc tủ ủ, có điều chỉnh nhiệt độ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ .**

**5.3 Bếp cách thủy và/hoặc tủ ủ, có điều chỉnh nhiệt độ ở  $(44,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .**

CHÚ THÍCH Đối với Phép thử Nhanh, có thể dùng lò ủ đặt chương trình thay cho lò ủ 5.2 và 5.3, và đặt ở  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  và  $(44 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ .

**5.4 Máy đo pH, với độ chính xác  $\pm 0,1$ .**

**5.5 Thiết bị lọc màng, phù hợp với ISO 8199.**

**5.6 Màng lọc, làm bằng este xenlulô, đường kính khoảng 47 mm hoặc 50 mm, có đặc tính lọc tương đương với màng lọc có cỡ lỗ  $0,45 \mu\text{m}$  và có thể có lưới.**

Màng lọc phải không ức chế hoặc kích thích sự phát triển của các khuẩn lạc và mực in lưới trên cái lọc phải không ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn. Nếu màng lọc chưa được tiệt trùng thì cần tiệt trùng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mỗi lò màng lọc cần được thử theo ISO 7704 về tính thích hợp cho sự thử, do việc sử dụng các màng lọc có nhãn hiệu khác nhau có thể dẫn đến sự hiện mẫu khác nhau.

CHÚ THÍCH Màng lọc màu xanh là cây dùng cho Phép thử Nhanh rất tốt cho việc nhận biết sự hiện màu.

**5.7 Kẹp mũi tròn, dùng để kẹp màng lọc**

**5.8 Đèn cực tím, bước sóng 254 nm (đèn thủy ngân áp suất thấp).**

**CẢNH BÁO – Ánh sáng UV gây kích thích mắt và da. Sử dụng găng và kính bảo hộ.**

**5.9 Giá lọc, đường kính ít nhất 47 mm.**

**6 Môi trường cấy và thuốc thử**

Để chuẩn bị môi trường cấy và thuốc thử, cần dùng hợp phần có cùng chất lượng và cấp độ hoá chất phân tích (xem chú thích) theo hướng dẫn trong Phụ lục B. Cũng có thể sử dụng môi trường và thuốc thử mua ngoài thị trường nhưng chúng phải phù hợp với các thành phần nêu trong Phụ lục B và cần phải theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.

CHÚ THÍCH Có thể dùng hoá chất chất lượng khác nếu các hoá chất này có tính năng như nhau trong phép thử.

Để chuẩn bị môi trường cấy, cần dùng nước cất hoặc nước đã loại ion không chứa các chất ức chế sự phát triển của vi khuẩn trong các điều kiện thử và phù hợp với TCVN 4851 (ISO 3696).

Trừ khi có qui định khác, môi trường đã chuẩn bị nên ít nhất một tháng nếu được bảo quản trong tối ở  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  và chống bay hơi.

**7 Lấy mẫu**

Lấy mẫu và đưa đến phòng thí nghiệm theo TCVN 6663-1 (ISO 5667-1), TCVN 5992 (ISO 5667-2) và TCVN 6663-3 (ISO 5667-3).

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Chuẩn bị mẫu

Để chuẩn bị mẫu lọc và chủng cấy trên môi trường biệt lập, theo hướng dẫn trong ISO 8199 và TCVN 6507-1 (ISO 6887-1). Tốt nhất là bắt đầu phép thử ngay sau khi lấy mẫu. Nếu mẫu được giữ ở nhiệt độ môi trường (trong tối và không quá 25 °C) việc kiểm tra nên tiến hành ngay trong vòng 6 h kể từ khi lấy mẫu. Trường hợp đặc biệt mẫu có thể lưu giữ ở  $(5 \pm 3)$  °C đến 24 h trước khi kiểm tra.

### 8.2 Lọc

Lọc 100 ml mẫu (hoặc thể tích lớn hơn, ví dụ 250 ml cho nước đóng chai) bằng màng lọc (5.6). Đặt cái lọc lên trên môi trường thạch tương ứng (8.3 và 8.4), đảm bảo không có không khí ở phía dưới.

### 8.3 Ủ và phân biệt, Phép thử Tiêu chuẩn

Sau khi lọc (8.2) đặt màng trên đĩa aga Lactosa TTC (B.1) và ủ ở  $(36 \pm 2)$  °C trong  $(21 \pm 3)$  h.

CHÚ THÍCH 1 Kéo dài thời gian ủ đến  $(44 \pm 4)$  h có thể cho độ nhạy của phép thử cao hơn và nhất là với những đĩa không hiện rõ các khuẩn lạc điển hình sau  $(21 \pm 3)$  h.

CHÚ THÍCH 2 Dùng thêm một màng lọc để ủ ở 44 °C có thể khắc phục được vấn đề phát triển nền mẫu.

Kiểm tra và đếm tất cả các khuẩn lạc đặc trưng dương tính với lactosa, nhưng không quan tâm đến kích thước, hiện mẫu vàng trong môi trường ở dưới màng lọc. Đối với thử oxydaza và indol cần cấy tiếp tất cả các khuẩn lạc đặc trưng thu được, hoặc một số đại diện (ít nhất 10) trên thạch không chọn lọc (B.3) và trên tryptophan (B.2) tương ứng.

Ủ aga không chọn lọc ở  $(36 \pm 2)$  °C trong  $(21 \pm 2)$  h và tiến hành thử oxydaza như sau:

- Nhỏ hai đến ba giọt thuốc thử oxydaza mới chuẩn bị (B.5.3) lên giấy lọc.
- Dùng que cấy thủy tinh, gỗ, vòng dây plastic hoặc platin (không dùng dây crom-niken) bôi một phần khuẩn lạc vi khuẩn lên giấy lọc đã được chuẩn bị.
- Màu xanh đậm xuất hiện trong 30 s là phản ứng dương tính.

Ủ ống nghiệm chứa L-tryptophan (B.2) ở  $(44,0 \pm 0,5)$  °C trong  $(21 \pm 3)$  h và kiểm tra sự sinh ra indol bằng cách thêm 0,2 ml đến 0,3 ml thuốc thử Kovac (B.5.1). Mẫu đỏ thẫm trên bề mặt môi trường xác định sự sinh ra indol.

Một số chủng *Klebsiella oxytoca* cho phản ứng indol dương tính. Để khắc phục kết quả dương tính này, cần thử thêm  $\beta$ -glucuronidaza (*E. coli* cho phản ứng dương tính còn *K. oxytoca* cho phản ứng âm tính).

Đếm các khuẩn lạc có phản ứng oxydaza âm tính là **vi khuẩn coliform**.

Đếm các khuẩn lạc có phản ứng oxydaza âm tính và phản ứng indol dương tính là **E. coli**.



CHÚ THÍCH 3. Trong những trường hợp đặc biệt, việc nhận biết các vi khuẩn coliform là cần thiết, ví dụ để phân biệt các chủng từ phân hay từ đất/nước.

#### 8.4 Ủ và phân biệt, Phép thử Nhanh

Sau khi lọc (8.2) đặt màng lên trên môi trường TSA (B.3) và ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong 4 h đến 5 h. Sau đó đặt màng lên trên môi trường TBA (B.4) và ủ ở  $(44,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  trong 19 h đến 20 h.

Nếu muốn, có thể kết hợp hai môi trường thạch thành một lớp kép (xem Chú thích B.4). Trong trường hợp đó, đặt màng lọc lên lớp kép mới chuẩn bị gồm TSA (B.3) và TBA (B.4) và ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  trong 4 h đến 5 h và ủ tiếp ở  $(44,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  trong 19 h đến 20 h.

Sau khi ủ, đặt màng lọc lên giá lọc (5.9) bão hoà thuốc thử indol (B.5.2) và chiếu đèn cực tím (5.8) từ 10 min đến 30 min phụ thuộc vào sự hiện màu (xem Chú thích 1). Đếm tất cả những khuẩn lạc có màu đỏ trên màng là *E. coli*.

CHÚ THÍCH 1 Thuốc thử pha trong nước mưa ngoài thị trường có thể cho kết quả rõ ràng hơn và nhanh hơn mà không cần chiếu tia UV.

CHÚ THÍCH 2 Sự phân bố không đều của các khuẩn lạc hoặc số đếm quá cao gây nhiều cho việc phân biệt các khuẩn lạc dương tính với indol do sự khuếch tán màu sang các khuẩn lạc gần kề.

### 9 Thể hiện kết quả

Dựa vào số khuẩn lạc đặc trưng trên màng lọc (8.3) tính số vi khuẩn *E. coli*, coliform và nếu cần cả vi khuẩn dương tính với lactoza trong 100 ml mẫu theo ISO 8199. Khi tiến hành song song hai cách thử (Phép thử Tiêu chuẩn và Phép thử Nhanh) như mô tả cho *E. coli*, kết quả cuối cùng là cao hơn.

### 10 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả cần bao gồm những thông tin sau:

- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết để nhận dạng đầy đủ mẫu;
- kết quả thể hiện theo Điều 9;
- những sự cố đặc biệt quan sát được trong suốt quá trình phân tích và mọi thao tác không quy định trong phương pháp này có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm.

### 11 Đảm bảo chất lượng

Sử dụng phòng thí nghiệm có hệ thống kiểm soát chất lượng để đảm bảo rằng vật liệu, thuốc thử và kỹ thuật là phù hợp với phép thử.

**Phụ lục A**

(tham khảo)

**Thông tin vi sinh về vi khuẩn colifom**

Vi khuẩn colifom thuộc Gram âm, không tạo bào tử, oxydaza âm tính, dang que, hiếu khí và yếm khí khi phát triển trong môi trường muối mật (hoặc các tác nhân hoạt động bề mặt khác có đặc tính ức chế sự phát triển tương tự) và thường có khả năng lên men lactoza tạo ra axit và aldehyt trong 48 h khi ủ ở nhiệt độ  $(36 \pm 2)$  °C. Vi khuẩn này cũng có enzym  $\beta$ -galactosidaza.

*E. coli* là vi khuẩn colifom, nó có khả năng sinh ra indol từ tryptophan trong  $(21 \pm 3)$  h tại  $(44,0 \pm 0,5)$  °C. Vi khuẩn này có enzym  $\beta$ -galactosidaza, cho kết quả dương trong phép thử methyl đỏ và có thể phân huỷ cacboxyl của axit L-glutamic nhưng không sinh ra axetyl methyl cacbinol, dùng citrat làm nguồn cacbon hoặc decarboxyl phát triển trong môi trường KCN.

**Phụ lục B**

(qui định)

**Môi trường nuôi cấy và thuốc thử****B.1 Aga TTC lactose với natri heptadecylsunphat****B.1.1 Môi trường cơ bản**

Lactoza	20 g
Pepton	10 g
Chất chiết nấm men	6 g
Chất chiết thịt	5 g
Bromothymol xanh	0,05 g
Aga (dạng bột hoặc miếng)	15 g đến 25 g <sup>4)</sup>
Nước cất	1000 ml

Hoà tan các chất trong nước bằng đun nóng. Nếu cần, điều chỉnh pH sao cho sau khi tiệt trùng pH đạt  $7,2 \pm 0,1$  ở 25 °C. Cho môi trường vào bình, thể tích tối đa là 250 ml và tiệt trùng trong nồi hấp ở  $(121 \pm 3)$  °C trong 15 min.

**B.1.2 Dung dịch TTC**

2,3,5-Triphenyltetrazolium chlorua (TTC)	0,05 g
Nước cất	100 ml

Hoà tan TTC trong một ít nước và thêm nước đến 100 ml. Tiệt trùng bằng cách lọc qua màng có cỡ lỗ danh định 0,2 µm.

**B.1.3 Dung dịch natri heptadecylsunphat**

Natri heptadecylsunphat (Tergitol <sup>5)</sup> 7)	0,2 g
Nước cất	100 ml

Hoà tan natri heptadecylsunphat trong một ít nước rồi thêm nước đến 100 ml. Tiệt trùng trong nồi hấp ở  $(121 \pm 3)$  °C trong 15 min.

<sup>4)</sup> Phụ thuộc vào khả năng đông của aga.

<sup>5)</sup> Tergitol là một ví dụ sản phẩm phù hợp mua ngoài thị trường. Thông tin này được đưa ra chỉ tạo thuận lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn này mà không phải là xác nhận của ISO về sản phẩm này.

**B.1.4 Môi trường hoàn chỉnh**

Môi trường cơ bản (B.1.1)	100 ml
Dung dịch TTC (B.1.2)	5 ml
Dung dịch natri heptadecylsunphat (B.1.3)	5 ml.

Đun tan chảy môi trường cơ bản rồi để nguội đến  $(50 \pm 5) ^\circ\text{C}$ . Thêm TTC và dung dịch natri heptadecylsunphat vô trùng, trộn cẩn thận để tránh tạo bọt sau mỗi lần thêm. Đổ vào đĩa Petri sao cho độ dày của môi trường ít nhất là 5 mm. Nếu không dùng ngay thì bảo quản ở  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  trong tối cho thời hạn không quá mười ngày.

**B.2 Môi trường Tryptophan**

Casein	10 g
L-tryptophan	1 g
Natri clorua	5 g
Nước cất đến	1000 ml

Hoà tan các chất trong nước bằng đun nóng. Lấy 3 ml vào ống nghiệm để thử. Đậy ống nghiệm bằng nút vải, plastic hoặc nắp kim loại. Để trong nồi hấp trong 15 min ở  $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ . pH của môi trường phải là  $7,5 \pm 0,1$  ở  $25 ^\circ\text{C}$ .

CHÚ THÍCH Nếu đủ lượng tryptophan trong chiết casein đã dùng thì không cần thêm L-tryptophan. Thay cho cách này, thêm 10 g casein.

**B.3 Thạch Trypton đậu nành (TSA)**

Casein	15 g
Pepton đậu nành	5 g
Natri clorua	5 g
Aga (dạng bột hay miếng)	15 g đến 25 g <sup>1)</sup>
Nước cất đến	1000 ml

Hoà tan các chất trong nước bằng đun nóng. Điều chỉnh pH sao cho sau khi tiệt trùng là  $7,2 \pm 0,1$  ở  $25 ^\circ\text{C}$ . Rót vào các bình hoặc ống nghiệm có thể tích tối đa 250 ml và tiệt trùng trong 15 min ở  $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ . Để môi trường nguội đến  $(50 \pm 5) ^\circ\text{C}$  và rót vào đĩa Petri sao cho độ dày môi trường ít nhất là 5 mm.

CHÚ THÍCH Để thử oxydaza có thể dùng một aga không chọn lọc (thay cho TSA) không cản trở phép thử oxydaza (với một lượng ít trong phản ứng tạo men cacbohydrat).

#### B.4 Thạch mật Trypton (TBA)

Trypton	20 g
Muối mật	1,5 g
Aga (dạng bột hoặc miếng)	15 g đến 25 g <sup>1)</sup>
Nước cất đến	1000 ml

Hòa tan các chất trong nước bằng đun sôi. Điều chỉnh pH sao cho sau khi tiệt trùng là  $7,2 \pm 0,1$  ở  $25^\circ\text{C}$ . Rót môi trường vào các bình hoặc ống nghiệm có thể tích tối đa 250 ml và tiệt trùng 15 min ở  $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ . Để môi trường nguội đến  $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$  và rót vào đĩa Petri sao cho độ dày môi trường ít nhất là 5 mm.

Chuẩn bị lớp môi trường kép bằng cách rót khi nóng  $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$  TSA (B.3) lên trên đĩa TBA (B.4) đang ở nhiệt độ phòng.

Lấy một lớp TSA dày khoảng 1 mm (2,5 ml trong đĩa Petri có đường kính 55 mm). Để nguội cho đông rắn và khô nếu cần đảo ngược trong tủ ủ ở  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

Lớp kép cần được chuẩn bị mới cho từng phân tích (từ 30 min đến 60 min trước khi đặt màng lọc lên trên đĩa thạch).

#### B.5 Thuốc thử

##### B.5.1 Thuốc thử Kovac để thử indol, thử tiêu chuẩn

p-Dimetylamin benzadehyt	5 g
Amyl hoặc butyl alcol (không bazơ hữu cơ)	75 ml
Axit clonydic ( $\rho = 1,18 \text{ g/ml}$ )	25 ml

Hòa tan aldehyt trong alcol. Thêm cẩn thận axit clonydic đặc. Bảo quản dung dịch khỏi ánh sáng và ở  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

CHÚ THÍCH Thuốc thử có màu vàng nhạt hoặc nâu nhạt; một vài mẫu amyl alcol cho màu đậm với aldehyt và không dùng được.

**CẢNH BÁO** Tiến hành việc pha chế cẩn làm trong tủ hút. Cẩn dùng gắng và tránh để tiếp xúc da với p-dimetylamin benzadehyt. Alcol amylic có thể gây kích thích niêm mạc và làm hoa mắt, chóng mặt.

##### B.5.2 Thuốc thử indol, thử nhanh

p-Dimetylamin benzadehyt	0,5 g
Axit clohydric c(HCl) = 1 mol/l	100 ml

Hoà tan *p*-Dimetylamin benzadehyt trong axit clohydric (xem cảnh báo trong B.5.1).

Bảo quản thuốc thử trong bình mờ ở  $(5 \pm 3)$  °C. Thuốc thử phải có màu vàng nhạt và không dùng nữa nếu dung dịch chuyển thành màu vàng nâu.

### B.5.3 Thuốc thử oxidaza

Tetrametyl- <i>p</i> -phenylendiamin dihydroclorua	0.1 g
Nước cất	10 ml

Thuốc thử này không bền và cần chuẩn bị trước khi dùng.

**CẢNH BÁO** – Tetrametyl-*p*-phenylendiamin dihydroclorua là chất gây ung thư. Cần làm việc trong tủ hút, sử dụng găng và tránh tiếp xúc với da.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] BARREL, R.A.E. (1992). A Comparison Between Tryptone Bile Agar and Membrane Lauryl Sulphate Broth for the Enumeration of Presumptive *Escherichia coli* in water. *Water Res* 26: 677-681.
  - [2] HAVELAAR, A.H. and DURING, M. (1988) Evaluation of the Anderson Baird-parket Direct Plating Method for Enumerating *Escherichia coli* in Water. *J Appl. Bacteriol.* 64: 89-98.
  - [3] SCHETS, F.M. and HAVELAAR, A.H. (1991). Comparison of Indole Production and  $\beta$ -Glucuronidase Activity for the Detection of *Escherichia coli* in a Membrane Filtration Method. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 272-274
  - [4] SCHETS, F.M., MEDEMA, G.J. and HAVELAAR, A.H. (1983). Comparison of Colilert with Dutch Standard Enumeration for *Escherichia coli* and Total Coliform in Water. *Lett. Appl. Microbiol.* 17: 17-19.
-