

DỮ LIỆU KỸ THUẬT

MICROPLATE MUD/SF

PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG ENTEROCOCCI TRONG NƯỚC

1 MỤC ĐÍCH SỬ DỤNG

Microplate MUD/SF cho phép xác định và đếm thực tế enterococci đường ruột trong nước, theo NF EN ISO 7899-1.

Việc sử dụng các tấm microtiter, với các giếng chứa môi trường được phát triển đặc biệt, được hình thành để sử dụng trong phân tích một số loại nước, đáng chú ý là nước bơi và nước bãi biển trong nước mặn và nước ngọt, nước bề mặt (tĩnh) và nước sau xử lý. Phương pháp này có thể áp dụng cho tất cả các mẫu nước, kể cả những mẫu giàu chất lơ lửng. Đối với việc định lượng enterococci, kỹ thuật microtiter với MUD đã được công nhận là phương pháp cụ thể, chính xác và nhanh chóng nhất trong tất cả các phương pháp được sử dụng trước đây. Kỹ thuật này đại diện cho một sự phát triển quan trọng liên quan đến các công nghệ hiện có đối với enterococci, trong số các vi sinh vật chỉ thị ô nhiễm phân, thể hiện sự quan tâm đặc biệt đến việc kiểm soát chất lượng nước.

2 LỊCH SỬ

Trong số rất nhiều phương pháp được sử dụng để phân lập và định lượng liên cầu nhóm D, môi trường GTC, được phát triển lần đầu bởi Donnelly & Hartman vào năm 1978, rất chọn lọc, nhưng không cho phép tách liên cầu trong phân ra khỏi liên cầu không có trong phân.

Việc sử dụng chất nền fluorogen đã thu hút nhiều nghiên cứu để xác định vi sinh vật thông qua các quy trình đơn giản và nhanh chóng. Năm 1982, Littel & Hartman đã chọn trong số rất nhiều chất nền fluorogen, chất cho phép mô tả đặc điểm và phân biệt liên cầu trong phân với các liên cầu khác. Họ đã chứng minh rằng 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUD) đã bị thủy phân bởi gần như tất cả các liên cầu trong phân ngoại trừ *Streptococcus mitis*. Kỹ thuật microtiter, cũng như phương pháp thống kê diễn giải kết quả, đã được Hernandez sử dụng và xác nhận vào năm 1988, với sự hỗ trợ của 5 phòng thí nghiệm đối tác để nghiên cứu so sánh giữa các phương pháp hiện đang được sử dụng và phương pháp fluorogen thu nhỏ mới, trên nước biển ngoài khơi bờ biển Pháp. Mức độ thu hồi được cho là bằng hoặc vượt trội so với các phương pháp khác trong ống hoặc bằng màng lọc. Đặc biệt, phương pháp thu nhỏ thể hiện tính đặc hiệu cao hơn phương pháp lọc màng. Do đó, phương pháp này có thể được coi là một phương tiện đáng tin cậy để phát hiện enterococci trong nước.

3 PRINCIPLES

Mỗi tấm microtiter chứa 96 giếng (12 hàng 8 giếng).

Cơ chất thể hiện hoạt tính enzym của vi khuẩn được đề cập là MUD (4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside). Thành phần này được kết hợp trong môi trường nuôi cấy được thiết kế đặc biệt để phát hiện enterococci. Môi trường nuôi cấy được khử nước và cố định vào đáy giếng microtiter. Quá trình bù nước thực sự của môi trường đạt được khi mẫu nước được đưa vào giếng. Enterococci cuối cùng có mặt trong mẫu cấy, thủy phân MUD

thành 4-methylumbelliferone và glucose. Việc sản xuất 4-methylumbelliferone, được biểu thị bằng huỳnh quang màu xanh lam, có thể được quan sát với sự trợ giúp của đèn UV ở bước sóng 366 nm. Khi việc đọc các giếng đã được thực hiện, số lượng giếng phát huỳnh quang được đếm cho mỗi độ pha loãng. Từ một số đặc trưng thu được, một phân tích thống kê, dựa trên định luật Poisson cho phép tính toán enterococci trong mẫu được phân tích.

Thành phần môi trường, với hàm lượng peptone và galactose cao, cho phép phục hồi tuyệt vời.

Polysorbate, monopotassium phosphate và sodium hydrogenocarbonate làm tăng hiệu suất môi trường.

Nalidixic acid ngăn chặn sự sao chép DNA đối với vi khuẩn nhạy cảm với nó và thallium acetate ức chế gần như tất cả các hệ sinh vật gây ô nhiễm khác.

Việc ủ ở 44°C đã được nghiên cứu để ức chế sự phát triển của phần lớn các vi sinh vật gây ô nhiễm.

4 THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG

Mỗi giếng của tấm microtiter được đổ đầy 100 µL môi trường, trong đó công thức có thể được điều chỉnh để đạt được hiệu suất tối ưu.

Cho 1L môi trường hoàn chỉnh:

- Tryptose.....	40,0 g
- Galactose	2,0 g
- Polysorbate (Tween 80).....	1,5 mL
- Monopotassium phosphate	10,0 g
- Sodium hydrogenocarbonate.....	4,0 g
- Nalidixic acid	0,25 g
- Thallium acetate	2,0 g
- 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC).....	0,1 g
- MUD.....	0,15 g

pH của môi trường hoàn chỉnh ở 25 °C: 7,5 ± 0,2.

5 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

Để tiến hành phân tích các mẫu từ nước clo hóa, brom hóa hoặc ozon hóa, bằng phương pháp vô trùng, cần thêm sodium thiosulfate dư vào bình chứa để trung hòa chất oxy hóa. Bằng cách này, có thể thu hồi toàn bộ vi sinh vật được phát hiện.

Chuẩn bị và pha loãng

- Trộn đều mẫu để thu được sự phân bố đồng nhất của vi sinh vật.
- Đối với nước ngọt, nước tắm và các loại nước bề mặt khác (độ mặn dưới 30 g/Kg), sử dụng các ống chứa 18 mL chất pha loãng microplate đặc biệt (Muối biển tổng hợp - BR003 hoặc BM088) có hoặc không có bromocresol blue và tạo độ pha loãng 1:10.
- Đối với nước biển có độ mặn lớn hơn 30g/Kg (đo bằng khúc xạ kế), sử dụng nước cất vô trùng (BM115) để pha loãng.
- Thực hiện pha loãng lần lượt với muối biển tổng hợp. Tỷ lệ pha loãng để cấy là hàm số thể hiện bản chất và mức độ ô nhiễm của nước
- Các độ pha loãng và phạm vi phát hiện cho số lượng vi sinh vật có trong mỗi loại mẫu được liệt kê trong bảng sau:

Loại mẫu	Tỷ lệ pha loãng	Số lượng giếng/ tỷ lệ pha loãng	Phạm vi đo (số vi sinh vật / 100 mL)
Nước nhà tắm/ hồ bơi	2	64 giếng ở 1:2 32 giếng ở 1:20	$1,5 \times 10^1$ đến $3,5 \times 10^4$

Nước bề mặt khác	4	24 giếng ở 1:2 24 giếng ở 1:20 24 giếng ở 1:200 24 giếng ở 1:2000	$4,0 \times 10^1$ đến $3,2 \times 10^6$
Nước thải và nước sau xử lý	6	16 giếng ở 1:2 cho đến 16 giếng ở 1:200 000	$6,0 \times 10^1$ đến $6,7 \times 10^8$

Cấy mẫu

- Chuyển dung dịch pha loãng ban đầu vào vật chứa vô trùng thích hợp.
- Sử dụng pipet đa kênh (8 đầu vô trùng), cấy 200 μ L vào từng giếng microtiter
- Theo cách tương tự, cấy các độ pha loãng tiếp theo (1:20, 1:200, 1:2000, v.v.) bằng cách sử dụng ống nhận mới và đầu tip pipet vô trùng mới.
- Việc cấy phải được thực hiện cẩn thận để tránh lây nhiễm chéo.
- Đậy mỗi tấm microtiter bằng một miếng dính vô trùng được cung cấp trong bộ dụng cụ. Biện pháp này hạn chế sự mất nước của môi trường trong các giếng và bảo vệ đĩa khỏi bị nhiễm bẩn bên ngoài trong thời gian ủ.

□ **Thể tích cấy:**
200 μ L mỗi giếng

□ **Ủ:**
36 đến 72 h ở 44 °C

Ủ:

Ủ các đĩa microtiter ở $44,0 \pm 1,0$ °C trong 36 giờ, tối đa không quá 72 giờ..

6 KẾT QUẢ

Các giếng hiển thị huỳnh quang màu xanh lam dưới ánh sáng tia cực tím 366nm được coi là dương tính.. Việc đọc có thể được thực hiện sau thời gian ủ tối thiểu vì huỳnh quang không giảm dần theo thời gian. Các tấm microtiter mờ đục (BT003) được phát triển để đọc trực quan và đếm thủ công.

Xem PHỤ LỤC 1: HỖ TRỢ ẢNH

Xác định số đặc trưng từ số giếng dương tính cho mỗi độ pha loãng đã chọn. Trong trường hợp cấy nhiều hơn 3 độ pha loãng, nên giữ lại một số đặc trưng bao gồm 3 số (nếu có thể, kết thúc bằng 0)

Tham khảo phụ lục của tiêu chuẩn NF EN ISO 7899-

LƯU Ý:

Một tệp Excel có thể được cung cấp theo yêu cầu để xác định MPN và mức độ tin cậy.

7 KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

Huỳnh quang sau khi ủ trong 48h ở 44 °C:

Phân tích	Kết quả / Tăng trưởng
Bối cảnh: phân phối DSM vô trùng	Không có giếng dương, nền trung bình <25 % ngưỡng dương
Mức huỳnh quang trung bình của <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00176	Huỳnh quang lớn hơn gấp đôi ngưỡng dương (biến thiên <10 %)

Khả năng tăng trưởng, vi sinh vật	Tăng trưởng / Mức độ hồi phục
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00176 <i>Enterococcus faecium</i> WDCM 00178 <i>Enterococcus hirae</i> WDCM 00089	66 đến 150 % mức mục tiêu 66 đến 150 % mức mục tiêu 66 đến 150 % mức mục tiêu
<i>Aerococcus viridans</i> WDCM 00061 <i>Lactococcus lactis</i> WDCM 00016 <i>Staphylococcus epidermidis</i> WDCM 00132	Huỳnh quang < 25 % ngưỡng dương Huỳnh quang < 25 % ngưỡng dương Huỳnh quang < 25 % ngưỡng dương

8 BẢO QUẢN/ HẠN SỬ DỤNG

Microplates: 2-8 °C.

Hạn sử dụng được ghi trên nhãn dán.

9 ĐÓNG GÓI

Microplates màu trắng, mờ đục:

25 microplates + 25 miếng dán đĩa vô trùng, trong suốt.....BT00308

10 TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Buehler, H.J., Katzman, P.A., and Doisey, E.A.. 1949. Bacterial glucuronidase. Federation Proceedings, **8** : 189.
- Cochran, W.G.. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". Biometrics, **6** : 105- 116.
- de Man, J.C.. 1975. The probability of most probable numbers. European Journal of Applied Microbiology, **1** : 76-78.
- Kilian, M., and Bülow, P.. 1976. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B, **84** : 245-251.
- Feng, P.C.S., and Hartman, P.A.. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Applied Environmental Microbiology, **43** :1320-1329.
- Hurley, M.A., and Roscoe, M.E.. 1983. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. Journal of Applied Bacteriology, **55** : 159-164.
- Trepeta, R.W., and Edberg, S.C.. 1984. Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, **19** : 172-174.
- Hernandez, J.F., Guilbert, J.M., Delattre, J.M., Oger, C., Charrière, C., Hugues, B., Serceau, R., and Sinegre, F.. 1991. Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of *E.coli* and enterococci in marine water. Water Science and Technology, **24** : 137-141.
- NF EN ISO 7899-1. Mars 1999. Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduaires. Partie 1 : Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) par ensemencement en milieu liquide.

11 THÔNG TIN THÊM

Thông tin được cung cấp trên nhãn được ưu tiên hơn các công thức hoặc hướng dẫn được mô tả trong tài liệu này và có thể sửa đổi bất cứ lúc nào mà không cần cảnh báo.

Mã tài liệu : MICROPLATES MUD SF_Env8.
Ngày tạo : 02-2005
Cập nhật : 09-2019
Nguồn gốc sửa đổi : Chính sửa tài liệu tham khảo tiêu chuẩn

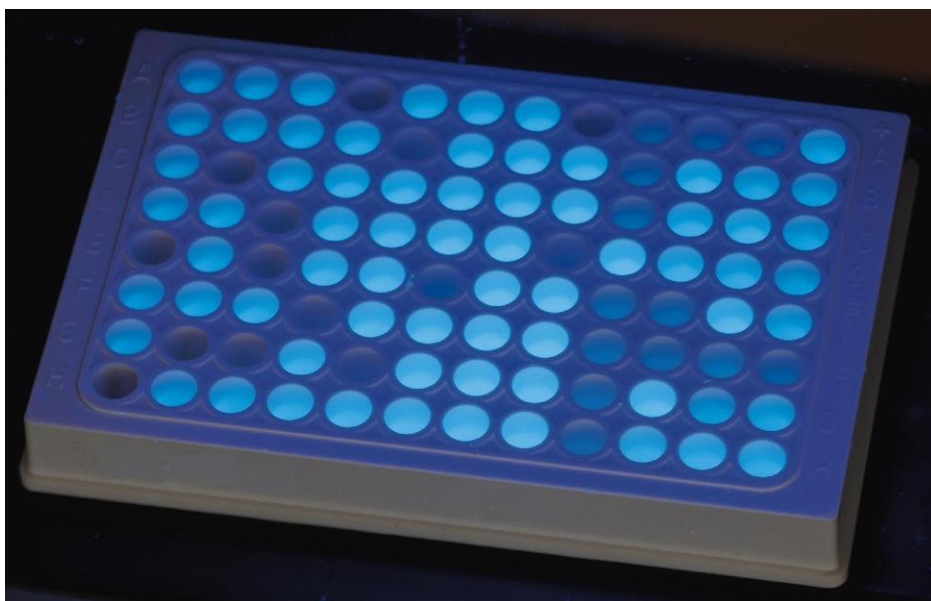
PHỤ LỤC 1: HÌNH ẢNH HỖ TRỢ

Microplate MUD/SF

Phát hiện và định lượng enterococci trong nước, theo phương pháp NF EN ISO 7899-1..

Kết quả:

Sinh trưởng thu được sau 36 giờ ủ ở 44°C



Đặc điểm: Các giếng thể hiện huỳnh quang xanh lam dưới ánh sáng UV ở bước sóng 366 nm được coi là dương tính.