

TÀI LIỆU KỸ THUẬT

CHROMOGENIC COLIFORM AGAR (CCA)

ĐỊNH LƯỢNG *ESCHERICHIA COLI* AND COLIFORMS

1 MỤC ĐÍCH

Chromogenic Coliform agar (CCA) được sử dụng để phát hiện và đếm *Escherichia coli* và vi khuẩn coliform trong nước với lượng vi khuẩn thấp (tổng số khuẩn lạc dưới 100). Chúng có thể là nước uống, nước bề bơi đã khử trùng, hoặc nước đã qua xử lý.

Thành phần điển hình phù hợp với công thức được mô tả trong tiêu chuẩn ISO 9308-1: 2014.

2 NGUYÊN TẮC

Sự hiện diện đồng thời hai chất nền cho phép phát hiện sự hoạt động của hai enzym: β -galactosidase và β -glucuronidase.

Coliforms được phân biệt bằng việc sản sinh β -galactosidase (β -gal). Enzyme này phản ứng với chất nền chromogenic tạo ra chất kết tủa hồng đỏ.

Tất cả *Escherichia coli* đều có β -galactosidase và 94-97% dương tính với β -glucuronidase (GUD). Sự hiện diện của enzyme được tiết lộ bởi sự hiện diện của một màu xanh lam. Hoạt động đồng thời của hai enzyme này cho khuẩn lạc của *Escherichia coli* có màu tím.

3 THÀNH PHẦN

Có thể được điều chỉnh để có được hiệu suất tối ưu

Trong 1 lit môi trường:

- Enzymatic digest of casein 1,0g
- Yeast extract 2,0g
- Sodium chloride..... 5,0g
- Sodium dihydrogen phosphate x 2H₂O..... 2,2g
- Di-sodium hydrogen phosphate 2,7g
- Sodium pyruvate..... 2,7g
- Sorbitol 1,0g
- Tryptophan..... 1,0g
- Secondary alcohol ethyloxylate surfactant 0,15g
- 6-Chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranoside 0,2g
- 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronic acid..... 0,1g
- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,1g
- Bacteriological agar 16,0g

pH cho môi trường hoàn chỉnh ở 25 °C : 6,8 ± 0,2.

4 CHUẨN BỊ

- Hoà tan 32,5 g môi trường bột khô (BK204) trong 1 lít nước cất hoặc nước đã khử ion.
 - Khuấy từ từ trong nước nóng cho đến khi hoàn toàn tan hết.
 - Không hấp.
 - Làm nguội môi trường đến 44-47 °C.
 - Đổ vào các đĩa Petri vô trùng (độ dày ít nhất 5 mm).
 - Để thạch đông lại trên bề mặt phẳng, lạnh
- Lưu ý: Tránh ánh sáng trực tiếp

5 HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

- Lọc vô trùng qua màng lọc một thể tích nước nhất định để kiểm tra.
- Đặt màng vào bề mặt các đĩa môi trường đã chuẩn bị hoặc môi trường có sẵn (BM182), để cẩn thận cho màng và môi trường tiếp xúc nhau. Các đĩa phải được đưa đến nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.
- Ủ ở (36 ± 2) ° C trong 21 đến 24 giờ

6 KẾT QUẢ

- Định lượng phân biệt *E. coli* và *Coliform* qua bảng sau

VI SINH VẬT	KIỂU HÌNH	MÀU KHUẨN LẠC
<i>Escherichia coli</i>	GUD + / β-gal +	Xanh đen đến tím
Coliform (trừ <i>Escherichia coli</i>)	GUD - / β-gal +	Hồng đến đỏ

- Để tạo thuận lợi cho việc đọc, kết quả có thể được đọc bằng cách đếm trực tiếp qua đáy đĩa

Xem phụ lục 1: PHOTO SUPPORT

Theo tiêu chuẩn ISO 9308-1, Coliforms (trừ *E. coli*) nên được khẳng định với thử nghiệm oxidase cho phản ứng âm tính

7 KIỂM SOÁT CHẤT LƯỢNG

Môi trường bột khô: bột kem, chảy tự do và đồng nhất.

Môi trường chuẩn bị : Thạch màu vàng.

Phản ứng nuôi cấy sau 21 giờ ủ ở 36°C (ISO 9308-1 / A1):

VI SINH VẬT		Phát triển (Productivity Ratio : PR)
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	PR ≥ 70%, khuẩn lạc xanh tím
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	PR ≥ 70%, khuẩn lạc xanh tím
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	PR ≥ 70%, khuẩn lạc hồng

<i>Enterobacter aerogenes</i>	WDCM 00175	$P_R \geq 70\%$, khuẩn lạc hồng
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00024	Ức chế hoặc không có khuẩn lạc đặc trưng
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Ức chế

8 BẢO QUẢN

Môi trường dạng bột: 2-30 °C

Môi trường đổ sẵn: 2-8 °C, tránh ánh sáng.

Ngày hết hạn được ghi trên nhãn.

Môi trường được chuẩn bị sẵn trên đĩa Petri (*): 30 ngày ở 2-8°C, tránh ánh sáng.

(*): Giá trị chuẩn được xác định trong các điều kiện chuẩn bị tiêu chuẩn, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

9 ĐÓNG GÓI

Môi trường dạng bột :

Chai 500 g..... BK150HA

Môi trường đĩa đổ sẵn :

20 đĩa Ø 55 mm BM18208

11 THAM KHẢO

B. Lange, M. Strathmann and R. Oßmer. Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Letters in Applied Microbiology Volume 57, Issue 6, pages 547–553, December 2013.

ISO 9308-1. September 2014. Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: membrane filtration method for waters with low bacterial background flora

ISO 9308-1/A1. December 2016. Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. AMENDMENT 1

12 THÔNG TIN BỔ SUNG

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

Tài liệu mã: CCA_EN_v4

Ngày tạo: 04-2015

Cập nhật: 09-2020

Nguồn gốc của bản sửa đổi: Cập nhật tài liệu tham khảo.

PHỤ LỤC 1: HÌNH ẢNH MINH HỌA

Chromogenic Coliform Agar (CCA) Định lượng *Escherichia coli* và các vi khuẩn coliform khác trong nước.

Kết quả: Sự tăng trưởng thu được sau 21 giờ ủ ở 36°C

Escherichia coli

Các khuẩn lạc đặc trưng: Màu xanh dương đến tím

Coliforms (trừ *E.coli*)

Các khuẩn lạc đặc trưng: Màu hồng đến màu đỏ

