

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Bài giảng
THỰC HÀNH
SINH HỌC VI SINH

Lưu hành nội bộ

Bài 1 CÁC QUY TẮC AN TOÀN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH

I. NHỮNG QUY ĐỊNH CHUNG

Thao tác an toàn là yêu cầu cực kỳ quan trọng đối với thí nghiệm vi sinh vật. Vi sinh vật có kích thước nhỏ bé mà mắt thường không nhìn thấy được. Trong quá trình làm thí nghiệm, chúng ta thường thao tác với số lượng rất lớn và đậm đặc tế bào vi sinh vật. Bên cạnh những giống, loài vi sinh vật có ích là những giống, loài có khả năng gây bệnh và có hại đối với sức khỏe con người. Mặt khác, trong quá trình thí nghiệm chúng ta cũng phải sử dụng nhiều loại hóa chất, trong đó có những hóa chất có độc tính, chính vì thế, người làm thí nghiệm trong phòng thí nghiệm vi sinh vật cần tuân thủ các qui tắc cơ bản sau đây:

- Những người không có nhiệm vụ không được vào phòng thí nghiệm.
- Khi vào phòng thí nghiệm phải mặc áo Blouse (cài khuy kín), cột tóc gọn gàng.
- Không nói chuyện ồn ào, giữ gìn trật tự.
- Không ăn uống, hút thuốc trong phòng thí nghiệm.
- Mang khẩu trang, găng tay khi thao tác với vi sinh vật và hóa chất.
- Trên bàn thí nghiệm chỉ để vật dụng thí nghiệm, sổ ghi chép, giấy ghi chép. Tất cả các vật dụng cá nhân, áo khoác, túi xách, sách vở,... phải để đúng nơi qui định.
- Trước và sau khi kết thúc thí nghiệm, phải sát trùng mặt bàn bằng các hóa chất sát trùng đã chuẩn bị sẵn và lau khô.
- Cần ghi chú tên chủng, ngày tháng thí nghiệm, người làm thí nghiệm lên tất cả các đĩa petri, ống nghiệm,...
- Tuyệt đối không để môi trường hay vật phẩm có vi sinh vật dấy lên quần áo, sách vở và dụng cụ cá nhân. Đồng thời cũng phải chú ý bảo vệ da và quần áo khỏi bị dính hóa chất và thuốc nhuộm.
- Cẩn thận khi thao tác với đèn cồn hoặc đèn Bunsen. Tắt ngọn lửa khi chưa có nhu cầu sử dụng hoặc ngay sau khi thực hiện xong mỗi thao tác. Tuyệt đối không dùng đèn cồn để sưởi ấm lửa đèn cồn.
- Sử dụng quả bóp cao su khi thao tác ống hút định lượng (pipette). Tuyệt đối không hút hóa chất, môi trường bằng miệng.
- Không tự ý sử dụng trang thiết bị, dụng cụ trong phòng thí nghiệm khi chưa được hướng dẫn cụ thể. Sử dụng theo hướng dẫn, hết sức thận trọng, tránh làm đổ vỡ và hư hỏng.
- Tất cả các vật liệu bị nhiễm bẩn cần phải được khử trùng trước khi vứt bỏ hoặc sử dụng lại.
- Kết thúc thí nghiệm phải vệ sinh các thiết bị, dụng cụ đã sử dụng theo đúng quy trình và sắp xếp vào đúng nơi qui định.
- Rửa tay sạch sẽ trước khi rời phòng thí nghiệm.
- Tất cả các trường hợp tai nạn phải báo cáo cho cán bộ hướng dẫn thí nghiệm để kịp thời và xử lý.

II. MỘT SỐ LƯU Ý VỚI SINH VIÊN

Trước khi thực hành:

- Cần đọc bài trước nội dung toàn bài để hình dung được khối lượng công việc sẽ làm.
- Hiểu rõ nguyên tắc, mục đích của các thí nghiệm.
- Đọc cẩn thận cách tiến hành thí nghiệm.

Trong giờ thực hành:

- Ghi chú cẩn thận những căn dặn của giảng viên về các thao tác và qui trình thực hành.
- Thực hiện thí nghiệm theo đúng hướng dẫn của giảng viên.
- Trong quá trình thí nghiệm có những thao tác, công đoạn không rõ cần hỏi lại giảng viên hướng dẫn.
- Ghi chép cẩn thận các chú ý quan trọng của thí nghiệm và kết quả của mỗi thí nghiệm.

Kết thúc thực hành:

- Làm báo cáo thực hành theo yêu cầu của giảng viên.

Bài 2 THIẾT BỊ - DỤNG CỤ PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH

I. TRANG THIẾT BỊ

1. **Tủ sấy (vacuum oven):** nhiệt độ từ 60°C – 200°C , dùng để sấy khô, khử trùng các loại dụng cụ chịu được sức nóng khô, chủ yếu là dụng cụ thủy tinh, kim loại.



Hình 2.1 Tủ sấy

2. **Tủ ấm (incubator or etuve):** nhiệt độ từ 20°C – 60°C , có chế độ ổn định nhiệt độ, được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật tại nhiệt độ thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng.

3. **Tủ lạnh hay tủ mát (freezer):** dùng bảo quản môi trường đã pha chế, giống vi khuẩn, các chế phẩm sinh học (vaccin, huyết thanh, đĩa giấy kháng sinh,...), hóa chất, thuốc thử dễ phân hủy ở nhiệt độ thường.

4. **Nồi hấp ướt (Autoclave):** thiết bị này cấp nhiệt bằng hơi nước ở áp suất cao (hơi nước bão hòa ở áp suất cao), được sử dụng để hấp khử trùng môi trường, một số nguyên liệu và dụng cụ thí nghiệm.



A Hình 2.2 Nồi hấp áp lực hơi nước B
(A) Autoclave, (B) Nồi hấp bán tự động

5. **Cân phân tích điện tử (analytical balance):** trọng lượng từ $100\mu\text{g}$ – 200g . Độ chính xác 10^{-4} g. Cân kỹ thuật (technical balance): độ chính xác 10^{-2} g. Dùng cân hóa chất, môi trường.



A

B

Hình 2.3 A- cân phân tích, B- cân kỹ thuật

6. Tủ cấy vô trùng có đèn cực tím (UV) (flux laminar): tạo không gian vô trùng được sử dụng để thao tác với vi sinh vật nhờ hệ thống đèn tử ngoại và bộ phận thổi khí vô trùng.



Hình 2.4 Tủ cấy

7. Máy ly tâm (centrifuge): Dùng tách các chất ở các pha rắn - lỏng ra khỏi nhau như tách sinh khối tế bào ra khỏi môi trường nuôi cấy, tách hồng cầu, enzyme,...



Hình 2.5 Máy ly tâm

8. Máy lắc (shaker): Thiết bị dùng để nuôi cấy, nhân giống vi sinh vật bằng cách lắc các bình nuôi cấy theo các chiều khác nhau (lắc vòng và lắc ngang) một cách đều đặn để tăng lượng oxy hòa tan trong môi trường.



Hình 2.6 Máy lắc

9. Kính hiển vi (microscope): có vai trò rất quan trọng nghiên cứu vi sinh vật. Dùng nghiên cứu, quan sát tế bào vi sinh vật về đặc điểm hình thái, sinh lý nhờ vào khả năng phóng đại của kính (sẽ giới thiệu chi tiết ở mục III).

10. Máy đo pH (pH meter): đo pH dung dịch, môi trường nuôi cấy,...



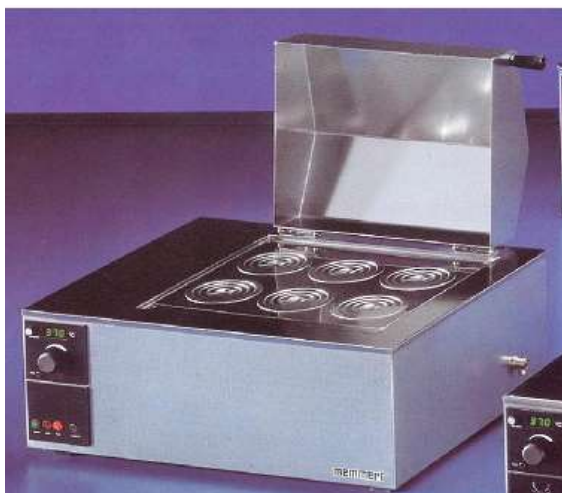
Hình 2.7 A- máy đo pH để bàn, B- máy đo pH cầm tay

11. Máy cất nước (single/ double water stills): dùng để cất nước.



Hình 2.8 Máy cất nước 1 lần

12. Bể ổn nhiệt (water bath): chứa nước và được cài đặt ở nhiệt độ nhất định để ổn định nhiệt độ cho những thí nghiệm cần sự ổn định về nhiệt độ.



Hình 2.9 Bể ổn nhiệt

13. Nồi lên men (fermenter): thiết bị lên men nuôi cấy vi sinh vật



Hình 2.10 Nồi lên men

14. Các thiết bị khác như: máy đếm vi sinh vật, máy quang phổ, sấy đông khô,...

II. DỤNG CỤ

1. Dụng cụ thủy tinh: có nhiều loại với nhiều kích cỡ khác nhau như bình tam giác, ống nghiệm, đĩa petri, lam kính, đĩa thủy tinh, que trang, ống đong, cốc đong, bình định mức,... yêu cầu phải sạch, trong, trung tính. Trước khi dùng để đựng môi trường, dụng cụ thủy tinh phải được sấy khô, làm nút bông và khử trùng bằng nồi hấp hoặc trong tủ sấy khô.

- Đối với dụng cụ mới: cần ngâm nước hoặc dung dịch H_2SO_4 loãng trong 24 giờ. Sau đó mới rửa lại bằng nước hoặc xà phòng nhiều lần cho đến khi pH trung tính.

- Đối với dụng cụ đã qua sử dụng còn chứa môi trường và vi sinh vật, cần khử trùng rồi mới rửa sạch bằng xà phòng, phơi và sấy khô.

- Đối với dụng cụ bị bám bẩn, cần ngâm thêm với dung dịch sulfocromic vài giờ, sau đó rửa lại bằng nước sạch.

Dụng cụ sạch khi đưa lên ánh sáng không có vết mờ và vết bọt.

2. Các dụng cụ khác: như đèn cồn, giá ống nghiệm, que cấy, kẹp, kéo, bơm tiêm nhựa, đầu tít, bếp điện,...

III. GIỚI THIỆU CÁC LOẠI KÍNH HIỂN VI

1. Kính hiển vi nền đen

* Nguyên tắc: ánh sáng thường chiếu từ dưới lên, qua rìa của tụ quang nền đen, chiếu hắt vào xung quanh tiêu bản, những tia sáng này bị tiêu bản làm khúc xạ rồi đưa vào vật kính. Tiêu bản được soi sáng rực trên nền đen, giống như trong phòng tối có một tia sáng mạnh chiếu vào, giúp thấy rõ từng hạt bụi trong không khí bị tia sáng chiếu vào.

* Chức năng: quan sát hình thái và đặc tính của một số vi khuẩn mà kính hiển vi thường khó quan sát.

2. Kính hiển vi đối pha

* Nguyên tắc: ánh sáng thường bị đối pha và biên độ dao động bởi cấu trúc đặc biệt của tụ quang kính, vật kính và thị kính.

* Chức năng: dùng quan sát rõ nét các cấu trúc nhỏ như tiên mao, các lớp màng.

3. Kính hiển vi huỳnh quang

* Nguyên tắc: chùm tia tử ngoại chiếu vào tiêu bản đã nhuộm màu bằng các chất huỳnh quang. Trong tế bào, các cấu trúc khác nhau sẽ phát quang với màu sắc khác nhau.

* Chức năng: quan sát và phân biệt được các cấu trúc khác nhau trong tế bào vi sinh vật.

4. Kính hiển vi điện tử

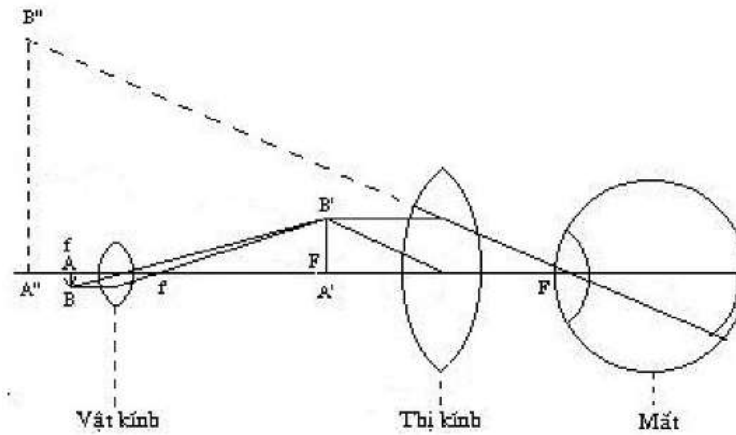
* Nguyên tắc: chùm tia điện tử bước sóng rất ngắn, năng suất phân li rất lớn nên độ phân giải cao, giúp phân biệt 2 điểm rất gần nhau.

* Chức năng: dùng quan sát virus, cấu trúc phân tử của tế bào.

5. Kính hiển vi quang học

* Nguyên tắc: dùng ánh sáng có bước sóng từ 500 nm – 560 nm trong chùm ánh sáng thường để tạo năng suất phân ly lớn giúp phân biệt 2 điểm cách nhau khoảng 0,2 μm trở lên.

Hệ thống phóng to của kính hiển vi quang học gồm hai bộ phận: vật kính (quay về phía vật quan sát) và thị kính (quay về phía mắt nhìn). Mỗi bộ phận này là một hệ thống thấu kính hội tụ phức tạp, mẫu vật cần quan sát AB được đặt trước vật kính một khoảng cách lớn hơn tiêu cự của vật kính một chút. Ảnh thật đảo ngược A'B' của vật sẽ thu được ở bên kia vật kính, nằm trong khoảng tiêu cự của thị kính. Thị kính hoạt động như một kính lúp. Qua thị kính, người ta sẽ thấy ảnh ảo A''B'' được phóng to lên của ảnh thật A'B'



Hình Nguyên tắc quang học của kính hiển vi.

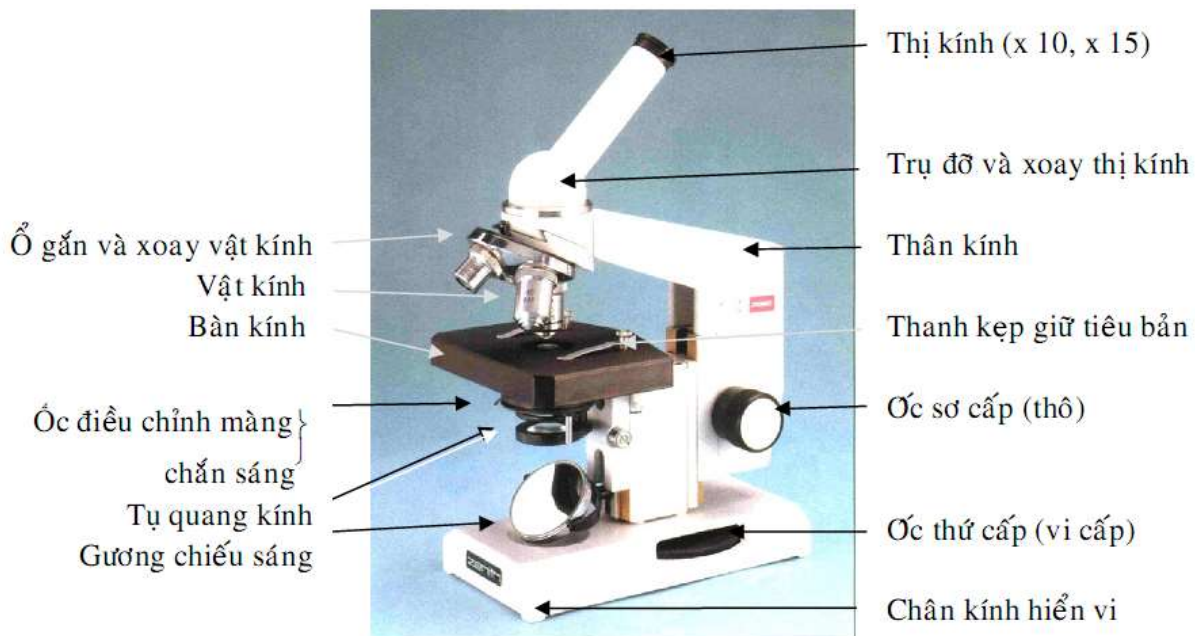
* Chức năng: quan sát tế bào vi sinh vật, ký sinh trùng, tế bào động vật, thực vật.

* Cấu tạo: gồm 2 phần

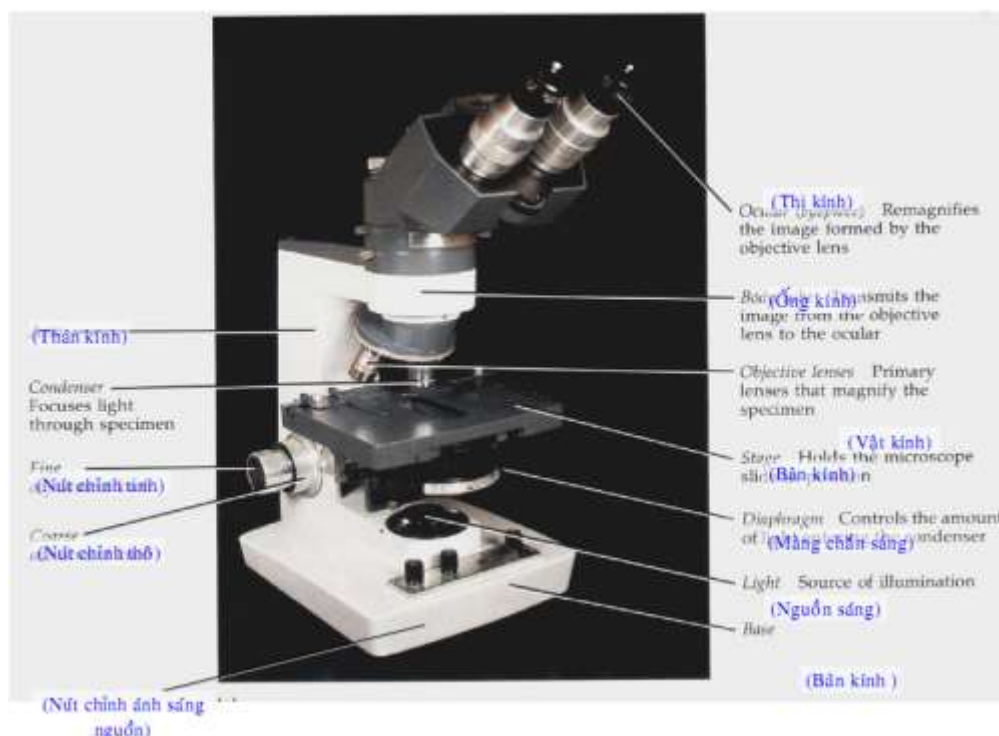
- Hệ thống cơ học: giá kính gồm chân kính, thân kính, trụ đỡ và xoay thị kính, ổ gắn và xoay vật kính, bàn kính, thanh trượt di chuyển tiêu bản, ốc di chuyển thanh trượt, kẹp giữ tiêu bản, ốc di chuyển tụ quang kính, ốc điều chỉnh sơ thô cấp, ốc điều chỉnh thứ cấp (vi cấp).

- Hệ thống quang học gồm: thị kính, vật kính, tụ quang kính, màn chắn sáng, nguồn chiếu sáng (đèn điện chiếu sáng và/ hoặc kính chiếu sáng).

Ngoài ra, ở kính dùng nguồn chiếu sáng là đèn điện thì có thêm bộ phận cung cấp điện như phích cắm, dây điện, cầu chì, mạch điện (trong chân kính) và nút điều chỉnh cường độ chiếu sáng.



Hình Các bộ phận KHV quang học – dùng gương.



Hình Các bộ phận KHV quang học – dùng đèn.

* Nguyên tắc hoạt động: vật kính là hệ thống quang học phức tạp gồm một số thấu kính trực tiếp phóng đại mẫu vật. Các thấu kính sắp xếp theo thứ tự, thấu kính nhỏ ngoài cùng hướng vào tiêu bản có độ phóng đại lớn nhất. Độ phóng đại của kính phụ thuộc tiêu cự, tức bán kính cong của thấu kính. Thấu kính càng cong, tiêu cự càng ngắn thì khả năng phóng đại càng lớn.

Có 2 loại vật kính:

- Vật kính khô độ phóng đại nhỏ như x8, x10, x15, x40, x45.
- Vật kính dầu có độ phóng đại lớn như x90, x100.

Thị kính cũng có cấu tạo phức tạp, gồm 2 thấu kính, một hướng về mắt người xem, một hướng về vật kính. Thị kính phóng đại một lần nữa ảnh do vật kính thu vào, làm ảnh to lên, xem rõ hơn.

Độ phóng đại của kính = độ phóng đại của vật kính x độ phóng đại của thị kính.

Ví dụ: Độ phóng đại của vật kính: x100

Độ phóng đại của thị kính: x10

Độ phóng đại của kính: $100 \times 10 = 1.000$ lần.

Năng suất phân ly (độ phân giải) của kính hiển vi là đại lượng cho biết khả năng phân biệt hai điểm của vật quan sát nằm sát nhau. Năng suất phân ly của kính quan trọng hơn độ phóng đại, và là tiêu chuẩn chính để chọn kính hiển vi. Nếu khoảng cách giữa 2 điểm nằm càng sát nhau mà vẫn có thể phân biệt được thì năng suất phân ly của kính càng cao.

Khoảng cách này phụ thuộc chiều dài sóng ánh sáng sử dụng và số lượng tia sáng đi vào vật kính, được biểu hiện bằng công thức:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Trong đó: λ : Độ dài bước sóng phát ra từ mẫu vật
 n : Chỉ số chiết quang của môi trường giữa mẫu vật và vật kính
 α : Nửa góc mở của vật kính
 $2n \sin \alpha$: Trị số mở của vật kính

Như vậy, muốn có độ phân ly cao phải dùng ánh sáng có bước sóng thật ngắn, hoặc dùng vật kính có trị số mở lớn. Nếu dùng vật kính có trị số mở 0,65 và soi với ánh sáng trắng (có bước sóng trung bình $\lambda = 0,55 \text{ mm}$) thì khoảng cách nhỏ nhất có thể nhìn thấy rõ được là:

$$d = \frac{0,55}{0,65} = 0,85 \text{ } \mu\text{m}$$

Với những chi tiết có khoảng cách nhau dưới 0,85 mm thì người ta không phân biệt được. Trong khi đó nếu dùng thị kính có độ phóng đại lớn hơn cũng không ích gì mà phải thay vật kính khác có trị số mở lớn hơn.

Nếu thay vật kính chìm (vật kính dầu x100) thì khoảng cách nhỏ nhất giữa các chi tiết của vật soi có thể thấy được là:

$$d = \frac{0,55}{1,25} = 0,44 \text{ } \mu\text{m}$$

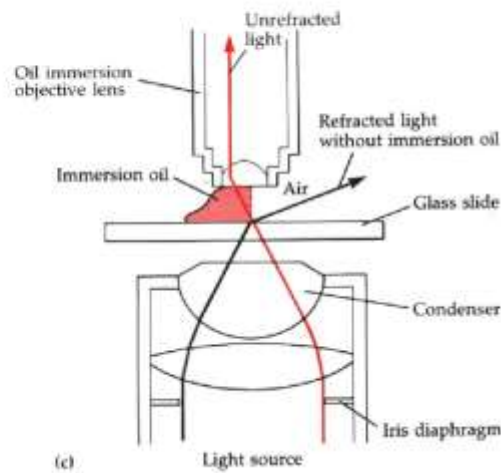
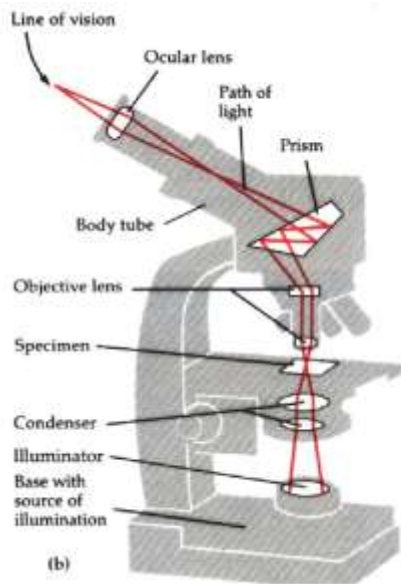
Vì λ đã xác định bởi nguồn ánh sáng thấy, muốn giảm d để tăng khả năng phân tích của kính thì chỉ có cách là tăng $n \sin \alpha$. Trong số này góc α bị giới hạn bởi nhiều sai lệch khó điều chỉnh, còn lại là chỉ số chiết quang n . Nhưng n không được cao hơn chỉ số chiết quang của các thấu kính trong vật kính, nên người ta chỉ nâng n giữa vật kính và mẫu vật bằng một chất dầu gọi là dầu bách hương (dầu cede) để đạt chỉ số chiết quang tối đa mong muốn bằng chỉ số chiết quang của thấu kính.

n không khí = 1,000

n thủy tinh = 1,515

n dầu soi = 1,520

Chiết suất ánh sáng của không khí nhỏ hơn thủy tinh, nên tia sáng khi đi qua tiêu bản thủy tinh sẽ bị khúc xạ một phần. Phần phía ngoài của tia sáng do bị khúc xạ nên không đi vào được vật kính. Vật kính có độ phóng đại lớn thì đường kính của thấu kính càng nhỏ, lượng tia sáng đi vào được vật kính rất ít, nên không thấy rõ ảnh. Để hạn chế nhược điểm này ta dùng dầu soi có chiết suất ánh sáng gần bằng thủy tinh, thủy tinh và dầu soi được xem như một môi trường đồng nhất. Ánh sáng đi qua không bị khúc xạ, nên tập trung đầy đủ vào vật kính, giúp xem rõ ảnh. Năng suất phân ly của kính càng cao thì góc nghiêng càng lớn và bước sóng càng nhỏ. Tăng góc nghiêng bằng cách chế tạo vật kính sao cho vật quan sát (tiêu bản) được đặt gần vật kính.



Hình Đường đi của tia sáng

Hình Nguyên lý hoạt động của vật kính dầu

Kính tụ quang là hệ thống thấu kính dùng tập trung ánh sáng vào tiêu bản, tăng cường độ chiếu sáng, rất quan trọng khi dùng vật kính dầu.

Với vật kính khô ta dùng tụ quang có độ mở (A): 0,20 – 0,65.

Với vật kính dầu thường dùng tụ quang có độ mở từ: 1,20 – 1,30.

Trong tụ quang có màng chắn sáng, khi tia sáng càng mạnh thì màu của vật quan sát càng mờ nhạt, nên khép bớt màn chắn sáng lại. Ngược lại, cần mở hết chắn sáng ra, khi dùng vật kính dầu.

Điều chỉnh tụ quang cần lưu ý:

- Khi nguồn sáng ở xa thì dùng gương phẳng, vì tụ quang chỉ tập trung được các tia sáng song song.
- Điểm giữa của tụ quang phải trùng với trục quang học của kính.
- Độ mở của tụ quang phải tương ứng hơn độ mở của vật kính.

Vậy ta dùng màng chắn sáng điều chỉnh cho độ mở của tụ quang nhỏ đi, loại bớt ánh sáng khuếch tán làm ảnh rõ hơn (mối tương quan giữa vật kính và lá chắn điều chỉnh ánh sáng)

- Nguồn sáng quyết định hình ảnh của tiêu bản, độ phóng đại càng cao thì nguồn sáng phải càng mạnh. Để điều khiển cường độ chiếu sáng có thể dùng đèn chiếu sáng rời hoặc lắp vào để kính kết hợp với màng chắn sáng.

* Cách sử dụng: trước khi sử dụng phải kiểm tra tất cả các bộ phận của kính, dùng khăn mềm để lau các bộ phận của kính (Chú ý: chỉ lau bên ngoài, không tháo rời các bộ phận của kính), để kính ngay ngắn vừa với tầm ngồi, sau đó tiến hành tuần tự các bước tiếp theo để soi tiêu bản.

+ Bước 1: Lấy ánh sáng

Đối với kính hiển vi phải dùng gương để lấy ánh sáng từ bên ngoài thì làm như sau: Chọn phía sáng nhất để làm nguồn sáng, quay gương về phía nguồn sáng đã chọn (nếu ánh sáng mạnh thì dùng mặt phẳng, nếu ánh sáng yếu thì dùng mặt lõm của gương), mở que chắn

sáng nếu hệ thống chắn sáng bị đóng. Mắt nhìn qua lỗ trên mâm kính, tay điều khiển gương sao cho thấy mặt trên hộp tụ quang có 1 chùm sáng mạnh là đạt yêu cầu. Xoay vật kính nhỏ nhất (vật kính 10) về trục kính (khi nghe tiếng cạch nhẹ là đã đúng vị trí).

Mắt nhìn vào thị kính, thấy vi trường sáng tròn đều là được. Nếu vi trường chưa sáng tròn đều thì mắt nhìn vào thị kính, tay điều khiển gương cho đến khi được vi trường sáng tròn đều.

Đối với kính hiển vi dùng ánh sáng đèn thì cắm dây đèn vào ổ cắm, bật công tắc, điều khiển núm chỉnh ánh sáng ở đế kính để có được ánh sáng thích hợp. Xoay vật kính nhỏ nhất (vật kính x10) về trục kính như trên.

+ Bước 2: Đặt tiêu bản vào mâm kính

Trước khi đặt tiêu bản vào mâm kính, phải chọn mặt phải, mặt trái của tiêu bản. Mặt phải của tiêu bản thường có dán lamên, dán nhãn (nếu có lamên và nhãn) hoặc làm giảm bớt độ lóa của gương khi để nghiêng soi ra ánh sáng (nếu không có lamên, không có nhãn).

Để mặt phải của tiêu bản lên trên, tay phải mở kẹp tiêu bản, tay trái cầm phía đầu nhãn tiêu bản, đặt tiêu bản vào mâm kính và tay phải thả kẹp giữ tiêu bản ra. Tiêu bản được giữ chặt vào xe đẩy, trên mâm kính.

Dùng ốc xe đẩy để điều chỉnh sao cho mẫu vật nằm đúng vào trục kính (giữa lỗ mâm kính).

Chú ý: Có thể dùng điểm sáng của hộp tụ quang để làm điểm chuẩn khi điều chỉnh mẫu vật về điểm trục kính, nếu mẫu vật nhỏ quá.

+ Bước 3: Quan sát

Nguyên tắc bắt buộc khi quan sát là phải quan sát được ở vật kính có độ phóng đại nhỏ, rồi mới chuyển sang quan sát ở vật kính có độ phóng đại lớn hơn kề nó.

Xem tiêu bản ở vật kính x10:

- Hạ tụ quang kính xuống dưới (tức tăng khoảng cách tụ quang với tiêu bản, thị trường mờ đi).
- Xoay vật kính x10 vào khớp của ổ đỡ vật kính (hướng vật kính vào tụ quang).
- Mắt nhìn vào bàn đặt tiêu bản (không nhìn vào thị kính), hai tay xoay ốc điều chỉnh sơ cấp đưa dần vật kính hướng đến tiêu bản (không được chạm vào tiêu bản).
- Đặt mắt hướng vào thị kính, hai tay xoay chậm ốc điều chỉnh sơ cấp hướng ra xa tiêu bản đến khi mắt thấy rõ dần tiêu bản mẫu vật thì dừng lại.
- Hai tay nắm ốc vi cấp điều chỉnh cho ảnh rõ nhất.
- Mắt vẫn hướng vào thị kính, điều chỉnh một lần nữa khoảng cách của tụ quang kính với tiêu bản và màng chắn sáng sao cho ảnh rõ nhất.

Xem tiêu bản ở vật kính x40:

- Nâng tụ quang kính lên vừa phải (thị trường sáng hơn).
- Xoay vật kính x40 vào khớp của ổ đỡ vật kính (hướng vật kính vào tụ quang).
- Đặt mắt hướng vào thị kính, có thể nhìn thấy ngay hình thái của mẫu vật (đôi khi không rõ lắm). Hai tay nắm ốc vi cấp điều chỉnh cho ảnh rõ nhất.
- Mắt vẫn hướng vào thị kính, điều chỉnh một lần nữa khoảng cách của tụ quang kính với tiêu bản và màng chắn sáng sao cho ảnh rõ nhất.

Xem tiêu bản ở vật kính x90, x100:

- Nâng tụ quang kính lên sát tiêu bản, mở cường độ sáng tối đa (thị trường sáng nhất).
- Xoay vật kính x100 vào khớp của trụ đỡ vật kính (hướng vật kính vào tụ quang).
- Nhỏ một giọt dầu soi vào giữa tiêu bản.
- Mắt nhìn vào bàn đặt tiêu bản (không nhìn vào thị kính), hai tay xoay ốc điều chỉnh sơ cấp đưa dần vật kính hướng đến tiêu bản vừa chạm vào tiêu bản thì dừng lại.
- Đặt mắt hướng vào thị kính, hai tay xoay chậm ốc điều chỉnh sơ cấp hướng ra xa tiêu bản đến khi mắt thấy rõ dần tiêu bản mẫu vật thì dừng lại.

Lưu ý: Khi di chuyển vật kính quá xa, đầu vật kính không còn nhúng vào giọt dầu soi thì thị trường tối hẳn đi.

- Hai tay nắm ốc vi cấp điều chỉnh cho ảnh rõ nhất.
- Mắt vẫn hướng vào thị kính, điều chỉnh một lần nữa khoảng cách của tụ quang kính với tiêu bản và chỉnh màng chắn sáng sao cho ảnh rõ nhất.

** Bảo quản*

- Sau khi sử dụng xong, xoay tất cả các vật kính ra trước, mở kẹp tiêu bản, lấy tiêu bản ra trả về chỗ cũ, hạ mâm kính, hạ hộp tụ quang. Dùng hai tay bê kính cất vào tủ chống ẩm (tủ bảo quản KHV).
- Phải giữ gìn kính luôn luôn sạch sẽ, không để bụi bẩn và hóa chất dính vào. Luôn luôn giữ kính ở nơi khô ráo, mát mẻ để các bộ phận quang học không bị mốc.
- Khi lau kính, khi sử dụng kính, không được tháo rời các bộ phận của kính. Không được dùng tay xoa trên mặt các thấu kính, mà nên dùng một bút lông nhỏ sạch để chải bụi ở các mặt kính hoặc dùng bông mềm, sạch để lau.
- Nếu sử dụng vật kính x100 thì phải dùng dung dịch phù hợp thấm vào giấy chuyên dụng để lau sạch dầu cede đầu vật kính x100.
- Tránh mọi sự va chạm mạnh vào kính, không đánh đổ, đánh rơi kính. Nếu di chuyển kính ra khỏi phòng thí nghiệm, nhất thiết phải đưa kính vào hộp của nó có chèn lót cẩn thận.
- Nếu phát hiện có 1 hư hỏng nào đó, nhất thiết không được tự ý tháo ra sửa chữa mà phải báo với cán bộ hướng dẫn biết để xử lý.

Bài 3 PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG

I. GIỚI THIỆU

Sau khi khử trùng cần đảm bảo sự vô trùng tuyệt đối cho dụng cụ, môi trường và vật phẩm, không làm thay đổi chất lượng mẫu vật và bảo đảm an toàn tuyệt đối cho người sử dụng. Các phương pháp khử trùng hoạt động chủ yếu dựa vào các tác nhân lý hóa (nhiệt độ, bức xạ, lọc và hóa chất) để diệt vi sinh vật. Có thể khử trùng bằng phương pháp nhiệt khô hoặc nhiệt ẩm. Với tác nhân khử trùng bức xạ, năng lượng chiếu xạ ở bước sóng ngắn (tia X, tia gamma) có khả năng ion hóa phân tử nước tạo ra các gốc tự do tác dụng phá hủy DNA, màng lipid và protein trong tế bào. Các dịch lỏng có thể được khử trùng bằng cách lọc qua màng với kích thước lỗ 0,2 mm, cho phép dịch lỏng đi qua và giữ lại tất cả vi khuẩn và các vi sinh vật có kích thước lớn hơn. Ethylen oxid, Triethyl glycol, chất diệt khuẩn, kháng sinh....được sử dụng để khử trùng, ức chế sự sống và tăng trưởng của vi sinh vật. Tác nhân khử trùng được chọn tùy mục đích và vật liệu cần khử trùng.

1. Khử trùng bằng nhiệt

a. Nhiệt khô (lò Pasteur hay tủ sấy): dùng để khử trùng các dụng cụ bằng kim loại hay thủy tinh. Quá trình này được thực hiện trong tủ sấy (là một lò sấy kín bằng kim loại, được đốt nóng bằng điện trở hay chất khí). Nhiệt độ trong tủ sấy có thể lên đến 180°C và khí nóng tỏa đều trong tủ. Dụng cụ được sấy ở **180°C/30 phút** hay **160°C/2 giờ**. Tắt tủ sấy khi sử dụng xong, chờ nhiệt độ giảm **dưới 80°C** mới được mở cửa tủ.

b. Nhiệt ẩm: phương pháp này làm nóng nhanh, hơi nóng nhiều và thấm sâu vào phẩm vật. Vi sinh vật chết vì protein bị đông kết lại.

Bảng 3.1 Nhiệt độ và thời gian khử trùng bằng nhiệt ẩm

Vi sinh vật	Nhiệt độ khử trùng			
	Tế bào dinh dưỡng		Bào tử	
	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)
Nấm men	50 – 70	5 - 10	70 – 80	5 – 10
Nấm mốc	60	5 – 10	70	5 – 10
Vi khuẩn không bào tử	60 – 70	5 – 10		
Vi khuẩn có bào tử	60 – 70	5 – 10	120	12
Siêu vi trùng	60 – 70	5 – 10		

c. Hơ trực tiếp trên lửa: que cấy, kéo, kẹp...có thể được khử trùng theo cách này hay là nhúng vào cồn rồi hơ.

d. Phương pháp hấp Pasteur (hấp cách thủy): sữa, kem, thức uống lên men phải qua một lần khử trùng bằng nhiệt. Quá trình này không diệt hoàn toàn vi sinh vật mà chỉ diệt vi khuẩn dị dưỡng gây bệnh, không diệt được các vi khuẩn hoại sinh có bào tử. Khi sử dụng phương pháp này, phải chọn nhiệt độ và thời gian cần thiết để diệt một loại vi khuẩn đối

kháng mạnh nhất mà ta cần diệt. Ưu điểm của phương pháp này là giữ được hương vị và phẩm chất của chất cần được khử trùng.

e. Đun sôi: thường thêm vào 1% bicarbonat natri để tăng nhiệt độ sôi. Phương pháp này chỉ diệt tế bào dinh dưỡng, bào tử và nấm vẫn còn. Thường dùng cho kim và ống chích.

f. Chưng cách thủy nhiều lần: với môi trường chứa huyết thanh hay những chất dễ hư ở nhiệt độ cao phải áp dụng phương pháp này ở nhiệt độ 70 – 80°C, mỗi ngày đun 1 giờ và thực hiện liên tục trong 3 ngày liên.

g. Hơi nước lưu thông: dùng để khử trùng môi trường và dung dịch hóa học không chịu nhiệt độ trên 100°C. Có thể dùng autoclave nhưng luôn mở van thoát hơi (để nhiệt độ không lên quá 100°C. Hấp từ 30 phút đến 1 giờ.

Cũng như phương pháp chưng cách thủy nhiều lần, những phẩm vật khử trùng theo phương pháp này phải được kiểm soát sự vô trùng bằng cách để ở 37°C trong 24 giờ.

h. Hơi nước bão hòa ở áp suất cao (Autoclave): phương pháp này dựa trên nguyên tắc làm gia tăng nhiệt vật khử trùng bằng hơi nước bão hòa dưới áp suất lớn hơn áp suất khí quyển. Khi áp suất hơi nước tăng thì nhiệt độ cũng tăng. Phương pháp này có thể tiêu diệt cả tế bào dinh dưỡng lẫn bào tử vi sinh vật.

Bảng 2.2 Nhiệt độ hơi nước bão hòa ở các áp suất khác nhau

<i>Áp suất (atm)</i>	<i>Nhiệt độ (°C)</i>
0	100
0,5	112
1,0	121
1,5	128
2,0	135

Chú ý: thường hấp khử trùng ở **nhiệt độ 121°C** và áp suất **1,2 atm**. Thời gian hấp tùy thuộc thể tích vật cần khử trùng và dụng cụ để chứa vật đó.

Bảng 2.3 Thời gian khử trùng ở 121°C cho các loại dụng cụ

Dụng cụ	Thể tích	Thời gian khử trùng ở 121°C
Ống nghiệm	10 ml	15'
Bình tam giác	50 – 200 ml	15'
Bình tam giác	500 ml	17' – 20'
Bình tam giác	1000 ml	25'
Bình tam giác	2000 ml	35'

2. Khử trùng bằng hóa chất

Sự phân loại và sử dụng các chất hóa học căn cứ vào các điểm sau:

- Tính chất của vật cần sát trùng (ví dụ: thuốc sát trùng dụng cụ không thể được dùng cho da)

- Loại vi sinh vật cần khử. Một chất diệt khuẩn mạnh có thể diệt nấm yếu nhưng một chất diệt virus có thể không tác dụng với vi nấm.
- Cần ấn định rõ các điều kiện tổng quát như nhiệt độ, pH, thời gian, nồng độ.

Chất khử trùng	Hình thức sử dụng	Tác dụng
Phenol	Dung dịch 2-5%	<ul style="list-style-type: none"> - Tẩy uế, sát trùng dụng cụ thí nghiệm - Tẩy trùng phòng - Không được thoa lên da - Tính sát trùng giảm khi nhiệt độ giảm. - Thường dùng các chất chuyển hóa của phenol như crésol, hexachlorophene
Rượu (etyllic)	Nồng độ 70%	<ul style="list-style-type: none"> - Dùng sát trùng ngoài da. - Còn làm đông kết protein vi khuẩn.
Iode		<ul style="list-style-type: none"> - Tác dụng lên hầu hết các loại vi sinh vật kể cả virus. - Thường dùng để sát trùng ngoài da, tẩy uế nước
Kim loại nặng	HgO Metaphène AgNO ₃ 1% CuSO ₄	<ul style="list-style-type: none"> -Dùng làm thuốc mỡ -Dùng sát trùng ngoài da và các màng nhày -Dung dịch tác dụng lên hầu hết vi sinh vật -Tác dụng chủ yếu lên nấm mốc.
Thuốc tẩy		Tạo nhũ tương với chất béo trên da trong đó có vi khuẩn, chỉ làm giảm đi số vi khuẩn mà không sát khuẩn thực sự.

3. Khử trùng bằng màng lọc

Phương pháp này dùng để khử trùng các chất lỏng dễ bị hư hỏng ở nhiệt độ cao trên 60°C như huyết thanh. Nguyên tắc của phương pháp này là cho dung dịch lọc qua màng lọc với những lỗ có đường kính nhỏ hơn đường kính của vi sinh vật nhỏ nhất. Vi sinh vật sẽ bị giữ lại trên màng lọc, còn dung dịch sẽ đi qua và được vô trùng. Màng lọc có thể bằng sứ, amiante, cellulose, hỗn hợp cellulose và ester của cellulose. Mỗi loại có một áp suất tương ứng thường được kiểm soát bằng thể tích qua màng lọc trong thời gian nhất định. Nếu áp suất quá cao vi sinh vật sẽ lọt qua lỗ lọc. Tùy theo cấu tạo của màng lọc, ta có nhiều loại lọc:

- Lọc Chamberland: lọc là một trụ bằng bột sứ
- Lọc Seitz: màng lọc bằng giấy lọc đặc biệt
- Lọc Pyrex: màng lọc bằng sợi thủy tinh

4. Khử trùng bằng bức xạ

- Tia tử ngoại (UV – Ultra violet) là bức xạ thường dùng nhất. Dùng tia UV diệt trùng không khí phòng bệnh viện, phòng thanh trùng. Tia UV chỉ khử trùng bề mặt.
- Tia âm cực: diệt trùng các dụng cụ giải phẫu, thuốc nhuộm, thực phẩm. Tia âm cực có thể khử trùng các vật đã cho vào bao gói kín.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

Sinh viên thực tập làm nút bông, gói đĩa petri và hấp khử trùng.

1. Vật liệu

- Bình tam giác, ống nghiệm, hộp petri, ống hút
- Bông không thấm, giấy gói
- Nồi hấp áp lực

2. Thực hành

- Làm nút bông ống nghiệm, bình tam giác.
- Gói đĩa petri.
- Hấp khử trùng.

Bài 4 MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

I. GIỚI THIỆU

1. Khái niệm môi trường dinh dưỡng

- Các chất dinh dưỡng là những hợp chất tham gia vào quá trình trao đổi chất nội bào.
- Môi trường dinh dưỡng là hỗn hợp các chất dinh dưỡng và các chất này có nhiệm vụ duy trì thế oxy hóa khử, áp suất thẩm thấu của tế bào và sự ổn định của pH trong môi trường.

2. Yêu cầu của môi trường dinh dưỡng

Môi trường dinh dưỡng của vi sinh vật phải đạt các yêu cầu cơ bản như sau:

- Chứa đủ các chất dinh dưỡng cần thiết đối với hoạt động sống của vi sinh vật cụ thể.
- Đảm bảo đủ các điều kiện hóa, lý thích hợp cho sự trao đổi chất của VSV với môi trường.
- Môi trường chứa đầy đủ các nguyên tố hữu cơ và vô cơ cần thiết ở dạng có thể hấp thụ được, có pH thích hợp, không chứa các yếu tố độc hại và phải hoàn toàn vô trùng.

3. Phân loại môi trường

❖ Theo thành phần

- Môi trường tự nhiên: có thành phần là các sản phẩm tự nhiên như: trứng, sữa, khoai tây, dịch chiết nấm men, đường, cám. Thành phần hóa học của loại môi trường không được xác định chính xác do sự không ổn định của sản phẩm tự nhiên.
- Môi trường tổng hợp: chứa các chất hóa học mà thành phần của chúng được xác định và định lượng một cách cụ thể và chính xác.
- Môi trường bán tổng hợp: chứa cả các chất hóa học lẫn các sản phẩm tự nhiên.

❖ Theo tính chất lý học

- Môi trường lỏng: thành phần môi trường này không chứa agar và thường được sử dụng để nghiên cứu quá trình tổng hợp của vi sinh vật.
- Môi trường đặc: môi trường này chứa 1,5 – 2% agar hoặc 10 – 20% gelatin. Môi trường này được sử dụng để nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh lý của vi sinh vật.
- Môi trường bán lỏng: chỉ chứa 0,3 – 0,7% agar.

❖ Theo công dụng

- Môi trường cơ bản: thích hợp cho nhiều loại vi sinh vật khác nhau.
- Môi trường chọn lọc: là môi trường đảm bảo cho sự phát triển ưu thế của một loài hay một nhóm loài vi sinh vật xác định nào đó.
- Môi trường kiểm định: là môi trường cho phép phân biệt được một số đặc điểm của một số loài vi khuẩn xác định. Thông thường, người ta cho vào môi trường chất chỉ thị màu để tạo ra những màu đặc trưng.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

Sinh viên chuẩn bị một số môi trường để nuôi cấy vi sinh vật.

1. Vật liệu

- Bình tam giác 100 ml, ống nghiệm, phễu thủy tinh, ống hút 5 ml, 10 ml, ống đong 100 ml.
- Cân, lò viba, nồi hấp áp suất.
- Agar và các hóa chất cần thiết.

2. Thực hành

❖ Các bước pha môi trường dinh dưỡng

- Cân, đo, đong thật chính xác các thành phần môi trường.
- Hòa tan vào nước cất.
- Cân agar rồi cho vào dung dịch trên (nếu là môi trường đặc)
- Làm trong môi trường (có thể bỏ qua bước này): lọc qua giấy lọc, vải thưa...
- Điều chỉnh pH của môi trường: dùng HCl 10% hoặc NaOH 10% để điều chỉnh pH.
- Đun tan agar (đối với môi trường đặc)
- Phân phối vào dụng cụ: môi trường thường được phân phối vào đĩa petri, ống nghiệm, bình tam giác.
- Đậy nút bông lại.
- Khử trùng môi trường.

Chú ý:

- Đối với ống nghiệm: nếu môi trường làm thạch nghiêng thì lượng môi trường cần được phân phối chiếm 1/4 thể tích ống nghiệm. Nếu làm thạch đứng thì lượng môi trường được phân phối chiếm 1/2 - 1/3 thể tích ống nghiệm.
- Đối với bình cầu hay bình tam giác: lượng môi trường được phân phối chiếm 1/2 - 2/3 thể tích bình.
- Các thao tác phân phối phải nhanh gọn, không để môi trường dính vào miệng dụng cụ, nút bông và việc phân phối cần được thực hiện xong trước khi môi trường bị đông đặc.

❖ Làm thạch nghiêng, thạch đứng và đổ thạch vào đĩa petri

- Thạch nghiêng: tiến hành ngay sau khi khử trùng và môi trường chưa đông đặc.
 - + Đặt ống nghiệm có môi trường lên giá đặt nghiêng và không được để môi trường chạm vào nút bông.
 - + Để yên cho đến khi môi trường đông đặc.
- Thạch đứng: đặt các ống nghiệm có môi trường vào giá, để yên cho môi trường đông đặc
- Đổ môi trường vào đĩa petri:
 - + Mở bao giấy gói các đĩa petri
 - + Một tay cầm dụng cụ chứa môi trường,
 - + Tay còn lại mở nút bông và hơi miệng bình trên ngọn lửa đèn cồn.
 - + Mở hé nắp đĩa petri, rót môi trường vào đĩa petri (khoảng 15 – 20 ml).
 - + Đậy nắp đĩa lại, xoay tròn đĩa để môi trường được phân phối đều bên trong đĩa.
 - + Để yên cho môi trường đông đặc.
 - + Lật ngược đĩa lại và bảo quản.

3. Thành phần và cách pha một số môi trường thường dùng

a. Môi trường Hansen (nuôi cấy nấm men)

Glucose	50 g	MgSO ₄	3 g
Pepton	10 g	Agar	20 g
KH ₂ PO ₄	3 g	Nước cất đủ	1000 ml

b. Môi trường cao thịt – pepton (nuôi cấy vi khuẩn)

Cao thịt	3 g	Pepton	10 g
NaCl	5 g	Agar	15 g
Nước cất đủ	1000 ml		

c. Môi trường nước pepton (nuôi cấy vi khuẩn)

Pepton	10 g
Nước mắm	20 ml
Nước cất đủ	1000 ml

d. Môi trường Crapek – dox (nuôi cấy nấm mốc)

NaNO ₃	3,5 g	FeSO ₄	0,1 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g	Đường kính	30 g
MgSO ₄	0,5 g	Agar	20 g
KCl	0,5 g	Nước cất đủ	1000 ml

e. Môi trường Gausse (nuôi cấy xạ khuẩn)

Tinh bột tan	20 g	FeSO ₄	0,01 g
K ₂ HPO ₄	3 g	NaCl	0,5 g
MgSO ₄	3 g	Agar	20 g
KNO ₃	1 g	Nước cất đủ	1000 ml

Cách pha

- Cân, đo đúng chính xác lượng cần thiết các thành phần môi trường.
- Bổ sung lượng nước cho đủ theo công thức.
- Cho agar vào, đun sôi và khuấy đều cho đến khi agar vừa tan (nếu môi trường lỏng thì bỏ qua bước này).
- Phân phối vào dụng cụ chứa, đầy bằng nút bông.
- Khử trùng ở 1,2 atm / 30 phút.

f. Môi trường PGA (potato glucose agar) (nuôi cấy nấm mốc)

Khoai tây	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Nước cất đủ	1000ml

Cách pha

- Khoai tây được gọt vỏ, rửa sạch, cân đủ 200 g, cắt lát, nấu sôi để lấy nước chiết.
- Cho glucose vào và hòa tan hoàn toàn.
- Bổ sung lượng nước cho đủ theo công thức.
- Cho agar vào, đun sôi và khuấy đều cho đến khi agar vừa tan.
- Phân phối vào dụng cụ chứa, đầy bằng nút bông.
- Khử trùng ở 1,2 atm / 30 phút.

4. Các phương pháp khử trùng môi trường dinh dưỡng

a. Nguyên tắc: tiêu diệt toàn bộ vi sinh vật ngoại lai hiện diện trong môi trường, tạo

điều kiện vô trùng cho môi trường để kết quả phân lập, nuôi cấy chính xác. Do đó, khi khử trùng môi trường phải đảm bảo một số điều kiện như sau:

- Không làm biến tính môi trường, không làm biến tính một số chất trong môi trường
- Sau khi khử trùng, trong môi trường không sản sinh ra các chất độc gây chết vi sinh vật nuôi cấy.
- Phải đảm bảo điều kiện vô trùng tuyệt đối sau khi khử trùng
- Bảo đảm an toàn đối với người sử dụng

b. Một số phương pháp khử trùng môi trường dinh dưỡng

Phương pháp khử trùng được sử dụng chủ yếu để khử trùng môi trường là autoclave. Tuy nhiên, tùy từng loại môi trường khác nhau sẽ có những điều kiện khử trùng khác nhau:

- ❖ Đối với môi trường chứa các chất dễ biến tính (sữa, các loại đường)
 - Đối với môi trường chứa sữa: không được khử trùng trên 100°C vì ở nhiệt độ cao sữa dễ bị biến tính. Do đó, đối với loại môi trường này, ta tách ra làm 2 phần: sữa tiến hành thanh trùng Pasteur, còn các thành phần khác được khử trùng trong autoclave. Sau đó, hòa trộn 2 thành phần đó với nhau.
 - Đối với một số môi trường chứa một số chất dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao như urea thì nếu chúng ta tự pha chế thì chia ra 2 phần để khử trùng còn nếu môi trường tổng hợp thì ta khử trùng bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ nhỏ (0,45 μm) để lọc khử trùng.
- ❖ Môi trường thông thường: tiến hành khử trùng bình thường với các điều kiện thời gian và nhiệt độ được khuyến cáo cho từng loại môi trường.

Bài 5 CÁC PHƯƠNG PHÁP CẤY VI SINH VẬT

I. GIỚI THIỆU

- Vi sinh vật cần được nuôi cấy để định danh, khảo sát đặc tính tăng trưởng và biến dưỡng của chúng. Các chủng vi sinh vật được cấy vào môi trường đặc trưng khác nhau. Thao tác cấy cần được thực hiện sao cho không đưa vi sinh vật khác hay vi sinh vật tạp nhiễm vào môi trường. Kỹ thuật thao tác vô trùng được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh để loại trừ các vi sinh vật gây nhiễm. Môi trường, dụng cụ chứa môi trường, dụng cụ nuôi cấy hoặc các dụng cụ cần thiết khác cần được khử trùng và được giữ ở trạng thái vô trùng trước khi sử dụng.

- Các thao tác vô trùng được thực hiện trong một không gian vô trùng xung quanh ngọn lửa (đèn cồn hoặc đèn bunsen). Ngoài ra ngọn lửa được dùng để đốt khử trùng que cấy, miệng chai lọ, ống nghiệm khi mở nắp hay nút bông.

- Để đảm bảo tính vô trùng cao, thao tác cấy thường được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Không khí trong tủ cấy vô trùng sẽ được khử trùng bằng tia tử ngoại (đèn UV) và màng lọc. Trước khi sử dụng tủ, cần bật đèn UV trước 30 – 60 phút và bật quạt thông gió khi tiến hành thao tác.

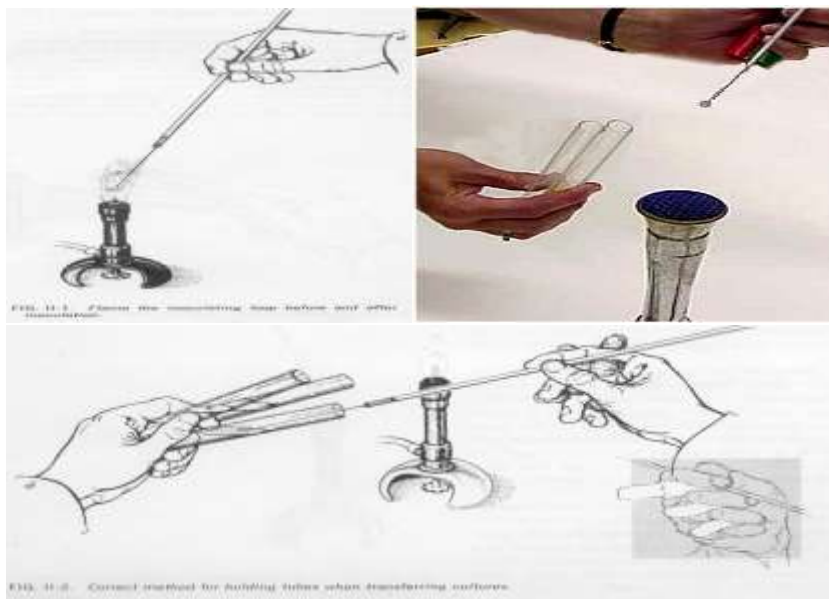
- Để tránh việc gây nhiễm thông qua tiếp xúc, người thao tác cần mang găng tay hoặc sát trùng tay trước khi bắt đầu thao tác. Cần sát trùng mặt bên trong tủ cấy và bề mặt tủ bằng cách lau với cồn 70° hoặc các dung dịch diệt khuẩn khác trước khi thao tác.

- Các dụng cụ thường dùng để cấy vi sinh:

- Kim cấy: que cấy kim loại có đầu nhọn, thường dùng để cấy chủng ở dạng khuẩn lạc từ môi trường rắn lên môi trường rắn hoặc lỏng.
- Que cấy móc: que cấy có đầu vuông góc, thường dùng để cấy vi sinh vật có tạo hệ khuẩn ty.
- Que cấy vòng: que cấy kim loại đầu có vòng tròn, thường dùng để cấy chủng từ môi trường rắn hoặc lỏng lên môi trường rắn, lỏng.
- Ống hút thủy tinh: dùng để chuyển một dung tích nhất định giống lên bề mặt môi trường rắn hoặc vào môi trường lỏng. Hiện nay, pipetman với đầu tip vô trùng được sử dụng thay thế cho ống hút.
- Cũng có thể dùng đầu tăm bông vô trùng cấy giống từ môi trường lỏng lên bề mặt môi trường rắn.

- Vi sinh vật sẵn sàng cho nuôi cấy thường ở một trong các dạng sau:

- Dịch nuôi cấy hoặc canh trường lỏng (broth culture) có chứa một số lượng lớn chủng vi sinh vật quan tâm.
- Dạng trên bề mặt môi trường rắn chứa agar (1,5 – 2%) trong ống thạch nghiêng (agar slant) hay trong đĩa petri.
- Dạng nằm sâu trong môi trường rắn trong ống thạch sâu (deep agar) chứa agar mềm (0,5 – 0,7%).



Hình 5.1 Một số thao tác cơ bản khi sử dụng que cấy

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

Sinh viên thực hiện các bước chuẩn bị trước khi thao tác vô trùng và thực hành kỹ thật vô trùng để cấy vi sinh vật.

1. Vật liệu

- Que cấy vòng, que cấy móc, kim cấy
- Pipetman và đầu tip 0,2 ml, 1 ml vô trùng
- Đèn cồn
- Ống môi trường, ống giống

2. Thực hành

Trước khi cấy cần ghi chú cẩn thận lên thành dụng cụ sẽ chứa vi sinh (ống nghiệm, đĩa petri, bình nuôi cấy) tên giống vi sinh vật và ngày cấy.

a. Khử trùng que cấy

- Đốt nóng đầu que cấy trong ngọn lửa và đốt nhẹ phần cán sẽ đưa vào bên trong dụng cụ chứa vi sinh vật.
- Cầm thẳng đứng que cấy cho nóng đều.
- Mở nút bông đưa ngay que cấy đã khử trùng vào dụng cụ chứa giống.
- Làm nguội que cấy bằng cách áp đầu que vào thành ống nghiệm (hoặc bình chứa thủy tinh) hoặc đặt nhẹ lên phần môi trường không chứa vi sinh vật. Sau đó thu lấy một lượng nhỏ sinh khối vi sinh vật.

b. Cấy giống từ môi trường lỏng sang ống nghiệm chứa môi trường lỏng

* Dùng que cấy

- Ống nghiệm vi sinh vật được cầm ở tay trái, tay phải cầm que cấy. Ngón út của tay phải dùng để mở nút bông. Sau khi khử trùng que, mở nút bông, hơi nóng miệng ống nghiệm.
- Đưa ngay que cấy đã khử trùng vào trong và làm nguội que cấy.

- Thu sinh khối bằng cách nhúng que cấy vào môi trường lỏng, rút thẳng que cấy ra không để dính vào thành miệng ống nghiệm.
- Hơ miệng ống nghiệm, đẩy nút bông lại.
- Đặt ống nghiệm vào giá.
- Đầu que cấy chứa vi sinh vật được giữ gần ngọn đèn
- Dùng tay trái lấy ống môi trường mới, mở nút bông, khử trùng miệng ống nghiệm.
- Đưa que cấy chứa vi sinh vật vào ống môi trường, khuấy mạnh để sinh khối tách khỏi đầu que cấy.
- Hơ miệng ống nghiệm, đẩy nút bông lại.
- Khử trùng que cấy ngay sau khi sử dụng xong và để lại chỗ cũ.

** Dùng pipetman*

- Tay trái cầm ống giống vi sinh vật, tay phải cầm pipetman với đầu tip vô trùng đã chỉnh trước thể tích cần hút, ngón út tay phải mở nút bông, hút sinh khối rồi chuyển qua ống môi trường.
- Đầu tip được bỏ vào túi đựng rác (được hấp trước khi thải bỏ).

Lưu ý khi sử dụng pipetman

- Không đưa pipetman và đầu tip vào ngọn lửa.
- Không dùng với dung tích ngoài khoảng giới hạn dung tích cho phép (được ghi rõ trên pipetman)
- Thao tác từ tốn, nhẹ nhàng khi điều chỉnh dung tích.
- Khi hút dịch lỏng, cần thả đầu ngón tay cái từ từ để dịch lỏng không văng lên gây hư hỏng pipetman hoặc gây nhiễm.

c. Cấy giống từ ống thạch nghiêng (môi trường rắn) sang môi trường lỏng

Tiến hành tương tự như trường hợp b với một số khác biệt sau:

- Thu sinh khối từ ống giống: chấm nhẹ đầu que cấy lên khuẩn lạc trên bề mặt môi trường.
- Chuyển giống vào môi trường lỏng: khuấy mạnh đầu que cấy trong môi trường lỏng để tách sinh khối ra khỏi đầu que cấy.

d. Cấy giống từ môi trường lỏng lên bề mặt ống thạch nghiêng

- Thu sinh khối như trường hợp b
- Cấy giống lên bề mặt ống thạch nghiêng bằng cách đặt nhẹ đầu que cấy lên bề mặt môi trường ở đáy ống, dàn đều sinh khối. Tiếp theo cấy theo hình sin từ đáy ống nghiệm lên đến đầu trên của mặt thạch nghiêng.

Bài 6 KỸ THUẬT TẠO KHUẨN LẠC ĐƠN

I. GIỚI THIỆU

- Vi sinh vật trong tự nhiên ở dạng quần xã gồm nhiều quần thể. Việc nghiên cứu một quần thể vi sinh vật nhất định phụ thuộc nhiều vào khả năng phân lập, làm thuần quần thể, khả năng giữ giống dùng cho các thí nghiệm tiếp theo. Đa số các nghiên cứu về vi sinh vật đều được thực hiện trên chủng thuần. Hầu hết các phương pháp tạo chủng thuần đều dựa trên kỹ thuật pha loãng kết hợp với điều kiện nuôi cấy chọn lọc tạo ưu thế tăng trưởng cho chủng quan tâm. Một số phương pháp tạo khuẩn lạc đơn như sau:

- Phương pháp cấy rìa (streak plate): đây là phương pháp hữu hiệu và dễ thực hiện. Hỗn hợp vi sinh vật được trải và rìa trên môi trường sao cho các tế bào riêng lẻ tách nhau ra. Sau thời gian ủ, mỗi tế bào sẽ tăng trưởng thành khuẩn lạc đơn riêng biệt. Khuẩn lạc đơn này chính là chủng thuần do có nguồn gốc từ một tế bào ban đầu.

- Phương pháp hộp trải (spread plate) hoặc hộp đổ (pour plate): là phương pháp pha loãng liên tiếp bậc 10 dịch chứa vi sinh vật thành các mức pha loãng khác nhau. Chuyển 0,1 ml dịch được pha loãng ở các mức lên môi trường rắn chuẩn bị sẵn (hộp trải) hoặc 1 ml dịch tương ứng vào môi trường rắn đun chảy (hộp đổ). Mỗi tế bào riêng biệt sẽ tăng trưởng thành khuẩn lạc đơn.

- Mức độ thuần khiết của chủng có thể được kiểm tra như sau:

- Mỗi khuẩn lạc của chủng thuần chỉ tạo ra một loại khuẩn lạc duy nhất trên bề mặt môi trường có hình thái giống với khuẩn lạc của chủng ban đầu.
- Mỗi khuẩn lạc đơn chỉ chứa một loại tế bào có hình thái hiển vi giống nhau.

- **Lưu ý:** Hạn chế thấp nhất nguy cơ bị nhiễm bằng cách thực hiện nghiêm túc các yêu cầu của thao tác vô trùng.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

Sinh viên thực hành tạo khuẩn lạc đơn bằng hộp rìa (kỹ thuật rìa chữ T và rìa bốn góc) và hộp trải.

1. Vật liệu

- Que cấy vòng, thanh gạt thủy tinh, đĩa petri môi trường thạch nước pepton.
- Đèn cồn, cốc thủy tinh chứa cồn
- Pipetman và đầu tip 0,2 ml vô trùng
- Ống giống *E. coli*
- Các ống nghiệm chứa chính xác 9ml nước muối sinh lý.
- Petri, ống nghiệm, bình tam giác 250ml, ống đông, đèn cồn, que cấy tam giác.
- Pipetman và đầu tip 1ml vô trùng.
- Môi trường: PCA (Pepton plate count agar).
- Dung dịch pha loãng (8,5g NaCl + 1g pepton + đủ 1000ml)

2. Thực hành

2.1. Kỹ thuật cấy ria

- Dùng que cấy vòng thao tác vô trùng thu giống (xem bài 5)
- Ria các đường trên hộp petri như hình vẽ (ria chữ T và ria bốn góc). Sau mỗi đường ria, đốt khử trùng đầu que cấy và làm nguội trước khi thực hiện đường ria tiếp theo.
- Gói đĩa petri, ủ ở 37°C trong tủ ẩm 2 ngày.

2.2. Kỹ thuật cấy trải

- Dùng pipetman và đầu tip vô trùng, thao tác vô trùng (xem bài 5) chuyển 0,1 ml dịch chứa hỗn hợp vi sinh lên bề mặt môi trường trong đĩa petri.
- Dùng thanh gạt thủy tinh, thao tác vô trùng, trải đều vi sinh vật lên bề mặt môi trường.
- Gói hộp petri, ủ ở 37°C trong tủ ẩm 2 ngày.

2.3. Kỹ thuật pha loãng

a. Thu mẫu

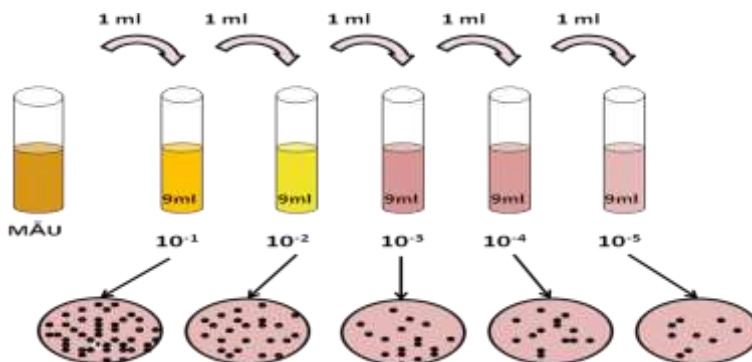
Khi tiến hành thu mẫu, cần lưu ý bảo đảm các yêu cầu sau:

- Lấy mẫu có tính chất đại diện.
- Mẫu phân tích vi sinh phải được lấy trước khi mẫu phân tích các chỉ tiêu hóa lý.
- Dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu phải vô trùng.
- Mẫu lấy xong phải phân tích ngay, không để quá 24 giờ.
- Mỗi mẫu phải được ghi nhãn ký hiệu và ghi rõ đặc điểm của mẫu và nơi thu mẫu.

b. Pha loãng mẫu

- Nếu mẫu nghiên cứu là chất lỏng: pha 1ml mẫu với 9 ml dung dịch pha loãng để được nồng độ 10^{-1} . Tiếp tục pha 1 ml dung dịch nồng độ 10^{-1} vừa thu được với 9 ml dung dịch pha loãng sẽ được nồng độ 10^{-2} . Tiếp tục tiến hành như vậy để được các nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} ... như mong muốn.

- Nếu mẫu nghiên cứu là chất đặc (như đất, lương thực, thực phẩm): chuẩn bị 2 bình nón dung tích 250 ml. Bình 1 chứa 99 ml dung dịch pha loãng. Bình 2 cũng vô trùng nhưng không chứa gì. Cân 1 g mẫu cho vào cối sứ vô trùng (khử trùng bằng cách đốt một ít cồn, để nguội), thêm một ít nước lấy ở bình 1, nghiền mẫu cho nát. Sau đó dùng nước ở bình 1 để chuyển toàn bộ mẫu đã nghiền nát sang bình 2, lắc đều 5 phút, để lắng 30 giây rồi tiếp tục pha loãng như trên.



Hình 8.1 Pha loãng mẫu

c. Cây mẫu

❖ Phương pháp cấy trải

- Dùng pipette hút 0,1 ml dịch pha loãng ở 3 nồng độ liên tiếp tùy chọn cho vào 3 đĩa môi trường PCA đã chuẩn bị sẵn.
- Khử trùng que gạt thủy tinh trên ngọn lửa đèn cồn, để nguội.
- Trải đều dịch mẫu trên môi trường thạch bằng que gạt thủy tinh.
- Lật ngược đĩa, ủ ở 37°C trong 24 – 48 giờ.
- Ghi nhận sự hiện diện của vi sinh vật và đếm số khuẩn lạc hình thành.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Hình 8.2 Phương pháp cấy trải

❖ Phương pháp đổ đĩa

- Môi trường PCA được giữ ở 45±1°C
- Cấy 1 ml dịch pha loãng ở 3 nồng độ liên tiếp vào 3 đĩa petri trông vô trùng.
- Đổ 15 ml môi trường PCA vào đĩa. Xoay ngược và xuôi chiều kim đồng hồ 5 lần.
- Đặt đĩa ở mặt phẳng ngang để môi trường đông đặc.
- Lật ngược đĩa, ủ ở nhiệt độ 37°C trong 48h.
- Ghi nhận sự hiện diện của vi sinh vật và đếm số khuẩn lạc hình thành.



Hình 8.3 Phương pháp đổ

3. Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả phân lập khuẩn lạc đơn theo các kỹ thuật khác nhau.

III. CÂU HỎI

1. So sánh sự phân bố của vi sinh vật ở 2 phương pháp cấy trang và đổ đĩa.
2. Ưu và khuyết điểm của hai phương pháp đổ đĩa và cấy trải.
3. Tại sao dùng dd có chứa NaCl để pha loãng mẫu? Có dùng nước cất pha loãng mẫu được không?
4. Thiết kế dãy pha loãng mẫu để đạt 3 độ pha loãng 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}

Bài 7 PHƯƠNG PHÁP QUAN SÁT VI SINH VẬT

I. GIỚI THIỆU

1. Quan sát

- Tùy theo kích thước, vi sinh vật có thể được quan sát bằng mắt thường hoặc phải cần đến những thiết bị đặc biệt như kính lúp, kính hiển vi...

- Kính hiển vi là công cụ quan trọng trong nghiên cứu hình thái và nhận diện vi sinh vật. Kính hiển vi được thiết kế để có tính năng khác nhau nhằm đáp ứng yêu cầu cho phép phóng đại và quan sát rõ, chân thật các đối tượng vi sinh vật, nội bào quan khác nhau. Một số kính hiển vi thường gặp là:

- Kính hiển vi soi nổi
- Kính hiển vi quang học
- Kính hiển vi đối pha
- Kính hiển vi huỳnh quang

2. Các phương pháp nhuộm

Khi quan sát mẫu vật qua kính hiển vi quang học, phần lớn cơ cấu bên trong của vi sinh vật có chiết suất gần bằng nhau cho nên rất khó phân biệt được, vì vậy cần phải làm tiêu bản và nhuộm màu. Nhuộm màu vi sinh vật nhằm:

- + Để nghiên cứu hình thái, cấu tạo đặc biệt của vi sinh vật như giáp mô, nha bào.
 - + Để phân loại vi sinh vật căn cứ vào tính chất bắt màu Gram.
 - + Để dễ phân biệt và quan sát được các vi cấu tạo trong tế bào vi sinh vật.
 - + Để bảo tồn tiêu bản trong một thời gian dài, để chụp ảnh.
- Các kỹ thuật nhuộm đơn giản bao gồm:
- + Nhuộm đơn (Simple stain): là phương pháp nhuộm màu chỉ sử dụng một loại thuốc nhuộm, các loại thuốc nhuộm thường dùng là methylene blue, crystal violet, fuchsin, với nấm thường dùng dung dịch Lactophenol cotton blue (nấm bắt màu xanh). Bao gồm các loại sau: nhuộm base (Basic dyes), nhuộm acid (Acidic dyes), nhuộm trung tính (indifferent dyes)
 - + Nhuộm phân biệt: nhuộm Gram, nhuộm acid-fast
 - + Nhuộm cấu trúc: nhuộm Feulgen, nhuộm bào tử, nhuộm vách tế bào, nhuộm Capsule, nhuộm Flagella
- Trong đó, Nhuộm Gram là một trong những phương pháp nhuộm quan trọng nhất để phân loại vi khuẩn. Nó cho phép ta phân biệt hai nhóm vi khuẩn tùy theo phản ứng với thuốc nhuộm.

Khi nhuộm vi khuẩn với thuốc nhuộm tím crystal violet và một chất gắn màu iodine (dung dịch lugol), sau khi tẩy màu (decolorization) bằng cồn 95%, có hai trường hợp xảy ra:

- + Nếu vi khuẩn giữ chặt màu tím, đó là các vi khuẩn G^+ .
- + Nếu vi khuẩn bị mất màu sau khi tẩy cồn, khi nhuộm bổ sung với dung dịch safranin, vi khuẩn sẽ có màu hồng, đó là vi khuẩn G^- .

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

Sinh viên thực hành phương pháp sử dụng kính hiển vi để quan sát: vi khuẩn, nấm men, nấm mốc ở trạng thái sống và trạng thái nhuộm màu.

1. Vật liệu

- Phẩm nhuộm xanh methylen hay fuchsin (1%o)
- Dầu soi kính (cèdre), dung dịch lau kính xylol, còng, phiến kính (lame), lá kính (lamelle), gòn thấm, que cấy, đèn cồn, nước cất vô trùng.
- Hóa chất nhuộm Gram: Dung dịch Tím kết tinh (Crystal violet), dung dịch Iod (lugol), dung dịch tẩy màu (Etanol 95%), dung dịch nhuộm bổ sung Safranin.
- Kính hiển vi quang học
- Giống vi sinh vật: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus* sp., *Aspergillus*, *Penicillium*, ...

2. Thực hành

2.1. Quan sát nấm, vi khuẩn ở trạng thái sống

a. Quan sát khuẩn ty và cuống sinh bào tử của nấm mốc

- Cho 1 giọt nước lên giữa phiến kính sạch (lau bằng vải mềm và hơ qua ngọn lửa đèn cồn trước khi dùng).
- Dùng que cấy mốc lấy một mẫu nấm điển hình để vào trong dịch thấm ướt.
- Dùng kim dìm nấm vào trong giọt nước.
- Khi nấm bị thấm ướt hoàn toàn ta đẩy lá kính lên trên (tránh tạo bọt khí vì nếu không sẽ rất khó quan sát). Phương pháp này dễ làm gãy các cuống sinh bào tử (khuẩn ty sinh dục) của nấm
- Thực hành: Quan sát khuẩn ty và cuống sinh bào tử của *Aspergillus* ở vật kính X10 và vật kính X 40

b. Quan sát nấm men và vi khuẩn bằng phương pháp làm giọt ép

- Dùng que cấy vòng lấy 1 giọt dịch vi khuẩn hoặc nấm men cho vào giữa phiến kính.
- Đẩy lá kính lên trên, tránh tạo bọt khí.
- Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính X10 và X40.
- Thực hành: quan sát vi khuẩn *E. coli* và nấm men *Sacharomyces cerevisiae*

2.2. Quan sát vi khuẩn ở trạng thái nhuộm

a. Phương pháp làm vết bôi (cố định tiêu bản)

- Đặt một giọt nước vô trùng lên phiến kính. Dùng que cấy lấy một ít vi khuẩn từ khuẩn lạc trên môi trường hòa đều vào giọt nước và trải mỏng trên mặt lam, để khô (không dùng giọt nước nếu lấy mẫu từ canh khuẩn).
- Cố định mẫu: Hơ nhẹ phía dưới phiến kính qua ngọn lửa đèn cồn 3 đến 4 lần hoặc nhỏ giọt cồn ngay vết trải và đốt. Mục đích là giết chết tế bào sống và gắn chặt tế bào vào phiến kính khi rửa không bị trôi và giúp tế bào dễ bắt màu hơn.

b. Phương pháp nhuộm đơn

- Chuẩn bị vết bôi

- Nhuộm màu: Nhỏ vài giọt thuốc nhuộm đơn (xanh metilen 0,1% hay Fuchsin Ziehl). Rửa nước và làm khô trong không khí, sau đó quan sát ở vật kính X100 với giọt dầu soi kính.
- Thực hành: nhận dạng hình thái của các vi khuẩn thường gặp: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *E. coli*,

c. Phương pháp nhuộm Gram (phương pháp Hucker cải tiến)

- Chuẩn bị vết bôi
- Nhuộm bằng dung dịch Tím kết tinh trong 1 phút, rửa nước, thấm khô.
- Nhuộm lại bằng dung dịch Iod trong 1 phút, rửa nước, thấm khô.
- Tẩy còn khoảng 30 giây (cho đến khi vừa thấy mất màu), rửa nước, thấm khô.
- Nhuộm bổ sung bằng dung dịch Safranin 2-3 phút, rửa nước, để khô trong không khí.
- Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính dầu 100X.

Kết quả: Vi khuẩn Gram (+) bắt màu tím dung dịch tím kết tinh: *Staphylococcus aureus*
Vi khuẩn Gram (-) bắt màu đỏ của Safranin: *E. coli*

Lưu ý:

- Giai đoạn tẩy màu rất quan trọng. Tẩy màu đúng, các loại tế bào kể cả nhân giữ màu đỏ safranin.
- Gram (+) có thể thành Gram (-):
 - + Do sự tự hủy, tăng tính acid của môi trường, nhiệt độ cấy không thích hợp, sự hiện diện của một số độc chất. Do đó muốn được chính xác phải nhuộm Gram với lứa cấy từ 18 – 24 giờ.
 - + Khi dung dịch Iodine đã hỏng. Vì vậy phải giữ dung dịch Iodine trong chai nâu, tránh ánh sáng và loại bỏ khi dung dịch từ màu nâu sậm chuyển sang vàng nhạt hay không màu.
 - + Tẩy màu quá lâu.
- Gram (-) có thể thành Gram (+):
 - + Nếu vết bôi được cố định khi chưa khô.
 - + Vết bôi quá dày, vi khuẩn phân tán không đều, tập trung quá nhiều ở một chỗ và có thể giữ màu tím khi tẩy.
 - + Thời gian tẩy màu quá ít.

III. CÂU HỎI

1. Tại sao phải cố định tiêu bản?
2. Giải thích cơ chế nhuộm Gram
3. Tại sao phải dùng giọt dầu khi quan sát ở vật kính X100?

Bài 8 PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG VI SINH VẬT

I. GIỚI THIỆU

Sự hiện diện của vi sinh vật có thể định lượng bằng nhiều phương pháp khác nhau như: đếm số lượng tế bào trực tiếp trên kính hiển vi, định lượng gián tiếp thông qua mức độ cản ánh sáng (độ đục), đếm số khuẩn lạc mọc trên một môi trường xác định, định lượng một cách thống kê bằng phương pháp pha loãng tới hạn (phương pháp MPN, most probable number), định lượng dựa trên sinh khối tích lũy,...

Phương pháp đếm trực tiếp: các sinh vật đơn bào kích thước tương đối lớn như nấm men, tảo, nguyên sinh động vật, có thể dùng phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu để định lượng vi sinh vật. Trường hợp vi sinh vật có kích thước nhỏ như vi khuẩn, khó quan sát và đếm bằng kính hiển vi thì các phương pháp như đếm khuẩn lạc hoặc nuôi cấy trong môi trường lỏng bằng phương pháp MPN được sử dụng. Tuy nhiên các phương pháp đếm khuẩn lạc, phương pháp MPN cũng thích hợp cho các vi sinh vật có kích thước lớn.

Phương pháp đếm khuẩn lạc: phương pháp này cho phép định lượng các tế bào vi sinh vật sống hiện diện trong mẫu. Phương pháp này có đặc điểm là cho phép định lượng chọn lọc vi sinh vật tùy môi trường và điều kiện nuôi cấy.

Phương pháp đo độ đục: khi một pha lỏng có chứa nhiều phần tử không tan (không phải là phân tử tan), thì sẽ tạo thành một hệ huyền phù (suspension: rắn – lỏng, không phải là dung dịch: chất tan – lỏng) và có độ đục bởi các phần tử hiện diện trong môi trường lỏng cản ánh sáng, làm phân tán chùm ánh sáng tới. Tế bào vi sinh vật là một thực thể nên khi hiện diện trong môi trường cũng làm môi trường trở nên đục. Độ đục của huyền phù tỷ lệ với một độ tế bào. Trong một giới hạn nhất định của độ đục và mật độ tế bào, có thể xác lập được quan hệ tỷ lệ tuyến tính giữa mật độ tế bào và độ đục. Do vậy có thể định lượng mật độ tế bào một cách gián tiếp thông qua đo độ đục bằng máy so màu ở bước sóng từ 550 – 610 nm. Trong trường hợp này, trước tiên cần phải thiết lập đường quan hệ tuyến tính giữa độ đục và mật độ bằng cách sử dụng một số huyền phù tế bào có độ đục xác định và mật độ tế bào của mỗi huyền phù được xác định bằng một phương pháp trực tiếp khác, ví dụ như phương pháp đếm khuẩn lạc, phương pháp buồng đếm, ...

Phương pháp pha loãng tới hạn (MPN): còn được gọi là phương pháp pha loãng tới hạn hay phương pháp chuẩn độ. Đây là phương pháp dùng để đánh giá số lượng vi sinh vật theo xác suất lớn nhất có thể có trong một đơn vị thể tích mẫu với độ chính xác tương đối cao. Phương pháp MPN thường được thực hiện trên mẫu ở vài nồng độ pha loãng khác nhau, trong đó phương pháp 3 nồng độ thường được dùng phổ biến nhất.

Phương pháp xác định sinh khối vi sinh vật: mức độ hiện diện của vi sinh vật có thể được định lượng bằng sinh khối tích lũy của vi sinh vật. Phương pháp này mang tính ước lượng, có độ chính xác không cao.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

Sinh viên thực hành định lượng vi khuẩn bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa và đếm số lượng nấm men bằng buồng đếm hồng cầu.

1. Vật liệu

- Buồng đếm hồng cầu, lamel.
- Sinh khối nấm men 24 giờ sau nuôi cấy.
- Các ống nghiệm chứa chính xác 9 ml nước muối sinh lý.
- Pipette

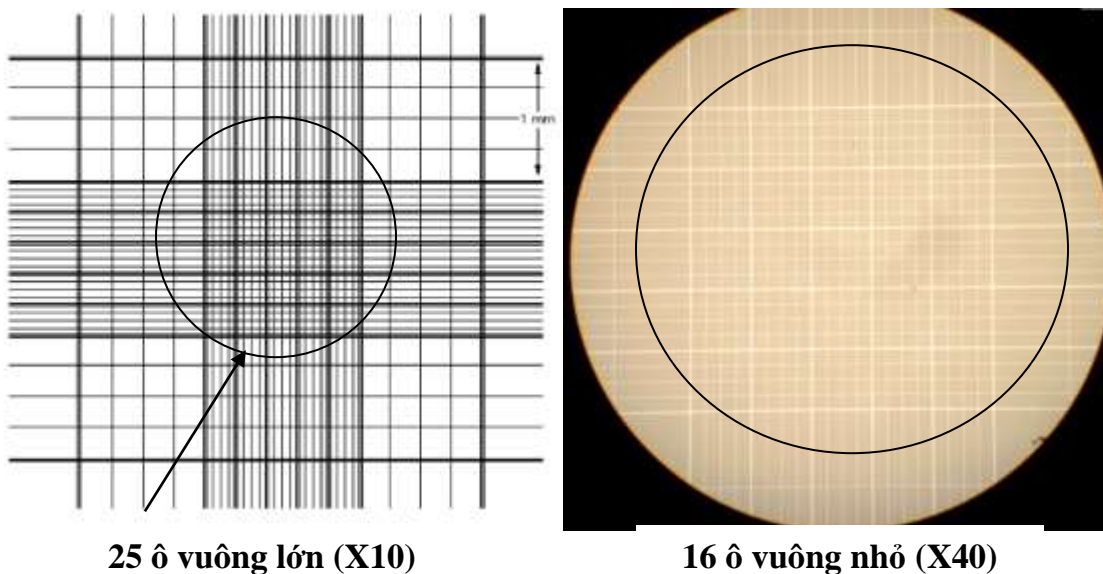
2. Thực hành

- Phương pháp đếm số lượng vi sinh vật nhằm đánh giá số lượng vi sinh vật trong một thể tích hay một trọng lượng mẫu xác định.

- Hiện nay, có 3 phương pháp đếm số lượng vi sinh vật thường được sử dụng:
 - + Đếm trực tiếp bằng phòng đếm hồng cầu (dùng để đếm tế bào nấm men).
 - + Đếm gián tiếp số lượng vi sinh vật bằng cách đếm số khuẩn lạc mọc trên môi trường đặc.
 - + Phương pháp pha loãng tới hạn (với chỉ số MPN).
- Cả 3 phương pháp trên đều trải qua 2 bước cơ bản sau:
 - + Thu mẫu
 - + Pha loãng mẫu: Mẫu sau khi lấy về cần được pha loãng đến mức độ có thể tiến hành đếm được. Tùy theo số lượng vi sinh vật trong mẫu (ước đoán) mà pha loãng nhiều hay ít. Phương pháp pha loãng đã được trình bày trong bài trước.

2.1. Đếm trực tiếp bằng phòng đếm hồng cầu

Phòng đếm hồng cầu ngoài việc dùng để đếm các tế bào máu, còn dùng để đếm tế bào vi sinh vật có kích thước lớn (nấm men, bào tử nấm mốc).



Hình 8.4 Buồng đếm hồng cầu quan sát dưới kính hiển vi.

Người ta thường dùng 2 loại phòng đếm hồng cầu: phòng đếm Thomas và phòng đếm Goriep. Nguyên tắc cấu tạo của 2 loại phòng đếm này đều giống nhau. Đó là một phiến kính dày hình chữ nhật, chia thành 3 khoảng ngang. Khoảng giữa chia thành 2 khoảng nhỏ. Trên mỗi khoảng nhỏ này có kẻ 1 lưới đếm, gồm rất nhiều ô vuông. Mỗi ô lớn lại được chia thành các ô vuông nhỏ thường là 16 ô (có loại kính có 20 ô con) và chiều cao là 1/10 mm. Như vậy thể tích một ô nhỏ là $1/4000 \text{ mm}^3$ (hay $1/5000 \text{ mm}^3$). Phòng đếm có lá kính dày để đáy.

❖ Các bước thực hiện

- Lắc đều ống nghiệm chứa mẫu đã được pha loãng mẫu.
- Đậy lá kính lên lưới đếm.
- Dùng ống hút vô trùng lấy mẫu, cho 1 giọt vào mép lá kính, do sức mao dẫn dịch tự tràn vào mặt trên lưới đếm. Chú ý: không để thành bọt khí trong lưới đếm hoặc tràn dịch mẫu xuống rãnh quá nhiều.
- Đặt phòng đếm lên bàn kính hiển vi và để yên trong 3-5 phút, sau đó tiến hành đếm tế bào trong 5 ô lớn chéo nhau. Trong mỗi ô lớn, đếm lần lượt từ ô con thứ nhất đến ô con thứ 16. Chỉ **đếm các tế bào nằm bên trong ô con** và **những tế bào nằm trên 2 cạnh liên tiếp cùng chiều**. Ghi số lượng tế bào đếm được trong 5 ô lớn (80 ô con).
- Dùng xong, phòng đếm và lá kính phải rửa ngay và lau khô.
- Số lượng tế bào trong 1 ml mẫu nghiên cứu được tính bằng công thức:

$$\text{Số tế bào/ml} = a * 4.000 * 10^{(3)} * 10^{(-n)} / b$$

Trong đó:

a: Số tế bào trong 5 ô lớn (80 ô con)

$10^{(3)}$: Số chuyển mm^3 thành ml

b: Số ô con trong 5 ô lớn ($16 \text{ ô} \times 5 = 80 \text{ ô con}$)

$10^{(-n)}$: Độ pha loãng mẫu

Lưu ý: số tế bào đếm được trong 5 ô lớn phải trên 200 mới bảo đảm được mức độ chính xác của phương pháp.

2.2. Phương pháp gián tiếp đếm số khuẩn lạc trên môi trường đặc

Nguyên tắc của phương pháp này là cấy 1 thể tích xác định huyền phù cần nghiên cứu lên môi trường đặc trong đĩa petri và sau đó đếm số khuẩn lạc mọc lên sau khi ủ. Khi đó ta coi mỗi khuẩn lạc là kết quả của sự phát triển từ 1 tế bào.

❖ Các bước thực hiện

- Pha loãng mẫu đến độ pha loãng thích hợp.
- Cấy bằng phương pháp cấy trải hoặc đổ đĩa.
- Ủ ở điều kiện thích hợp trong thời gian xác định.
- Sau khi hình thành khuẩn lạc, tiến hành đếm. Lấy bút viết kính kẻ hai đường kính giao nhau ở đáy đĩa petri. Đếm số khuẩn lạc trong từng vùng và nhớ chấm mực đánh dấu các khuẩn lạc đã đếm. Việc pha loãng được coi là tốt nhất khi từ dịch pha loãng này cấy vào môi trường đặc làm mọc lên 25 – 250 khuẩn lạc.
- Số lượng vi sinh vật trong 1g hoặc 1ml dịch mẫu được tính bằng công thức:

$$\text{Số tế bào / g} = M * a * 10^{(-n)}$$

Trong đó: M : Số khuẩn lạc trung bình trong 1 petri

A : Thể tích mẫu được cấy vào hộp petri

$10^{(-n)}$: Độ pha loãng

- Khi số lượng khuẩn lạc lớn, người ta có thể dùng máy đếm khuẩn lạc bán tự động. Người ta đặt đĩa thạch sập đáy trên bàn của máy đếm có chiếu sáng từ dưới lên. Đếm các khuẩn lạc bằng 1 chiếc bút đặc biệt có thiết bị lò xo. Ấn đầu nhọn của ngòi bút lên chỗ tương ứng với từng khuẩn lạc, kết quả trên mặt đĩa petri sẽ có một dấu vết, đồng thời mạch điện được đóng lại và chỉ số của máy đếm tăng thêm 1 đơn vị. Sau đó đầu nhọn của mặt bút được nâng lên khỏi đĩa, lò xo kéo nó lại vị trí xuất phát và mạch điện bị ngắt.

2.3. Phương pháp pha loãng tới hạn (với chỉ số MPN)

- Nguyên tắc của phương pháp là pha loãng thật nhiều lần dịch có chứa vi sinh vật. Sau đó kiểm tra xem tới độ pha loãng nào còn phát hiện thấy sự có mặt của vi sinh vật cần kiểm tra. Dùng phương pháp thống kê toán học để tính ra số lượng gần đúng của từng nhóm vi sinh vật nhất định trong mẫu nghiên cứu. Phương pháp này được dùng để kiểm tra độ nhiễm bẩn của nước, thực phẩm,...

- Số lượng gần đúng của vi sinh vật là chỉ số MPN (Most probable number) được tra trong bảng Mac Crady (bảng do Mac Crady xây dựng trên cơ sở xử lý xác suất thống kê một khối lượng lớn các kết quả thử nghiệm).

Các bước thực hiện

- Pha loãng mẫu: tùy tình trạng của mẫu mà ta sử dụng các độ pha loãng khác nhau, từ nồng độ nguyên chất, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} hay từ nồng độ 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Phải chọn giới hạn thể nào để nồng độ thấp nhất luôn luôn có mặt vi sinh vật, còn nồng độ cao nhất thì hoàn toàn không phát hiện thấy vi sinh vật. Cách pha loãng từ dịch huyền phù ban đầu được chuẩn bị giống hệt như đối với phương pháp thạch đĩa

- Cấy vào môi trường lỏng: từ mỗi độ pha loãng, có thể cấy vào từ 2, 3, 4 hay 5 ống nghiệm chứa môi trường dinh dưỡng thích hợp cho vi sinh vật cần kiểm tra phát triển (ví dụ cần kiểm tra vi khuẩn *E. coli* trong nước thì dùng môi trường có dùng lactose và chỉ thị màu, ống Durham để dễ phát hiện thấy vi sinh vật phát triển, thường dùng môi trường BGBL 2%). Ủ ở nhiệt độ thích hợp.

- Sau thời gian ủ, ở mỗi độ pha loãng ghi số ống nghiệm (+) (nghĩa là có vi khuẩn mọc bằng cách theo dõi sự chuyển màu của môi trường và có bọt khí trong ống Durham). Ghi nhận nồng độ pha loãng cao nhất không thấy vi khuẩn mọc.

- Tìm chỉ số ống nghiệm có phản ứng (+). Chỉ số này gồm 3 chữ số:

+ Chữ số cuối cùng (hàng đơn vị): ghi số lượng ống nghiệm có phản ứng dương tính ở độ pha loãng cao nhất, mà ở nồng độ pha loãng cao hơn kế tiếp sẽ không có ống nghiệm nào dương tính cả (không có vi khuẩn mọc được).

+ Hai chữ số tiếp theo: ghi số ống (+) ở 2 nồng độ pha loãng thấp kế tiếp.

- Từ chỉ số trên, tính được số lượng tế bào vi sinh vật có xác suất lớn nhất trong mỗi đơn vị thể tích của dịch huyền phù theo bảng Mac Crady.

- Số lượng vi sinh vật trong 1g hay 1ml mẫu được tính bằng cách lấy tích của chỉ số MPN (số lượng gần đúng) với độ pha loãng đã được dùng để nhận được con số đầu tiên trong chỉ số ống dương tính (con số hàng trăm)

Ví dụ: cấy mẫu thực phẩm từ nồng độ nguyên chất, $10^{-1}, \dots, 10^{-4}$ vào 5 dãy ống nghiệm ứng với 5 loại nồng độ. Mỗi nồng độ được cấy vào 3 ống môi trường BGBL 2% có ống Durham. Ủ nhiệt độ thích hợp. Kết quả được ghi nhận như sau:

- | | | | | | |
|--|------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| ▪ Độ pha loãng | 1 | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} |
| ▪ Số ống nghiệm được cấy | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| ▪ Số ống nghiệm có vi sinh vật (+) | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 |
| ▪ Chỉ số ống (+): | 321 | | | | |
| ▪ Chỉ số gần đúng của vi sinh vật (chỉ số MPN – tra bảng Mac Crady): | 15,0 | | | | |
| ▪ Số lượng vi sinh vật có khả năng xuất hiện trong 1 g (1ml) | | | | | |

$$N \text{ tế bào/ml} = 15 \times 10 = 150 \text{ tế bào/ml}$$

III. CÂU HỎI

Tại sao chỉ đếm số khuẩn lạc nằm trong khoảng 25 - 250 khuẩn lạc

Phụ lục

BẢNG CHỈ SỐ MAC CRADY

Trường hợp cấy 2 ống nghiệm cho mỗi nồng độ

Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN
000	0.0	100	0.6	121	3.0	212	20.0
001	0.5	101	1.2	200	2.5	220	25.0
010	0.5	110	1.3	201	5.0	221	70.0
011	0.9	111	2.0	210	6.0	222	110.0
020	0.9	120	2.0	211	13.0		

Trường hợp cấy 3 ống nghiệm cho mỗi nồng độ pha loãng

Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN
000	0.0	121	1.5	223	4.0	320	9.5
001	0.3	130	1.6	230	3.0	321	15.0
010	0.3	200	0.9	231	3.5	322	20.0
011	0.6	201	1.4	232	4.0	323	30.0
020	0.6	202	2.0	300	2.5	330	25.0
100	0.4	210	1.5	301	4.0	331	45.0
101	1.7	211	2.0	302	6.5	332	110.0
102	1.1	212	3.0	310	4.5	333	140.0
110	0.7	220	2.0	311	7.5		
111	1.1	221	3.0	312	11.5		
120	1.1	222	3.5	313	16.0		

Trường hợp cây 4 ống nghiệm cho mỗi nồng độ pha loãng

Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN	Chỉ số ống (+)	Chỉ số MPN
000	0.0	113	1.3	231	2.0	402	5.0
001	0.2	120	0.8	240	2.0	403	7.0
002	0.5	121	1.1	241	3.0	410	3.5
003	0.7	122	1.3	300	1.1	411	5.5
010	0.2	123	1.6	301	1.6	412	8.0
011	0.5	130	1.1	302	2.0	413	11.0
012	0.7	131	1.4	303	2.5	414	14.0
013	0.9	132	1.6	310	1.6	420	6.0
020	0.5	140	1.4	311	2.0	421	9.5
021	0.7	141	1.7	312	3.0	422	13.0
022	0.9	200	0.6	313	3.5	423	17.0
030	0.7	201	0.9	320	2.0	424	20.0
031	0.9	202	1.2	321	3.0	430	11.0
040	0.9	203	1.6	322	3.5	431	16.5
041	1.2	210	0.9	330	3.0	432	20.0
100	0.3	211	1.3	331	3.5	433	30.0
101	0.5	212	1.6	332	4.0	434	35.0
102	0.8	213	2.0	333	5.0	440	25.0
103	.0	220	1.3	340	3.5	441	40.0
110	0.5	221	1.6	341	4.5	442	70.0
111	0.8	222	2.0	400	2.5	443	140.0
112	1.1	230	1.7	401	3.5	444	160.0

Bài 9 KỸ THUẬT ĐĨA KHÁNG SINH

I. GIỚI THIỆU

- Nhiều vi sinh vật có tính miễn cảm đối với kháng sinh, có thể được kiểm soát bằng kháng sinh. Kháng sinh là nhóm các sản phẩm chuyển hóa được tạo bởi vi sinh vật có tác dụng ức chế sự tăng trưởng hoặc tiêu diệt vi sinh vật khác. Kháng sinh tác động đặc hiệu có nghĩa là một loại kháng sinh chỉ tác động lên một hay một số nhóm vi khuẩn nhất định. Ngày nay, nhiều kháng sinh và dẫn suất kháng sinh tự nhiên được tổng hợp hóa học.

- Các chủng vi khuẩn khác nhau có độ nhạy cảm với các loại kháng sinh ở mức độ khác nhau, tính miễn cảm của một vi sinh vật đối với kháng sinh có thể được quan sát bằng thực nghiệm dựa trên kỹ thuật đĩa kháng sinh và vòng vô khuẩn. Kỹ thuật đĩa kháng sinh sử dụng một đĩa giấy vô trùng được tẩm kháng sinh ở một liều lượng nhất định đặt lên một hộp petri môi trường rắn chứa vi sinh vật mục tiêu. Kháng sinh sẽ khuếch tán vào môi trường, nếu nồng độ kháng sinh đủ để ức chế sự tăng trưởng của vi sinh vật, xung quanh đĩa sẽ hình thành một vòng vô khuẩn. Đường kính vùng bị chặn diễn đạt tính cảm ứng của vi khuẩn đối với thuốc kháng sinh, trường hợp không có vùng bị chặn, vi khuẩn kháng lại thuốc kháng sinh. Tìm hiểu tính kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh giúp cho việc chọn lựa phương hướng điều trị đúng với những kháng sinh đặc hiệu. Kỹ thuật này cũng được dùng để sàng lọc, xác định hoạt tính kháng khuẩn của các kháng sinh hoặc hợp chất kháng khuẩn.

- Những điều cơ bản về kỹ thuật đĩa kháng sinh

Môi trường nuôi cấy: môi trường được chuẩn hóa cao để giúp cho hầu hết các vi khuẩn gây bệnh thông thường mọc tốt (ví dụ môi trường Mueller-Hinton). Đổ vào đĩa petri (đường kính 9cm) 25 ml môi trường, tương ứng độ dày $4\text{ mm} \pm 0,5$. Các đĩa thạch phải được đặt trên một mặt phẳng ngang bằng để đảm bảo cho độ sâu của thạch ở tất cả các vị trí trong đĩa bằng nhau, cho thạch nguội tới nhiệt độ phòng

Môi trường bổ phụ: Các vi khuẩn khó mọc sẽ được cung cấp thêm các chất bổ phụ vào môi trường cơ bản như máu hoặc các sản phẩm của máu, các vitamin hoặc các yếu tố phát triển khác.

Đĩa giấy kháng sinh: là các khoanh giấy có tẩm kháng sinh được bảo quản trong hộp riêng, dự trữ ở -20°C . Các khoanh giấy làm hàng ngày được giữ ở $2 - 8^{\circ}\text{C}$ tùy theo sự chỉ dẫn của hãng sản xuất và phải được để thăng bằng 30 phút ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Độ đục chuẩn: Độ đục chuẩn Mc Farland 0,5 được làm bằng cách lấy 0,5 ml BaCl_2 nồng độ 0,048 M (1,175% $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ W/V) trộn với 99,5ml H_2SO_4 nồng độ 0,18 M (1% v/v) và phân chia vào các ống giống nhau và cùng loại với những ống để sử dụng cho việc chuẩn bị các hỗn dịch vi khuẩn. Các ống này phải được hàn kín và giữ tối trong nhiệt độ phòng và có thể sử dụng được trong vòng 6 tháng.

Cách tiến hành: cấy dịch khuẩn lên đĩa môi trường bằng cách cấy trải, hoặc láng bằng tăm bông (nếu ở những nơi có độ ẩm không khí cao), hút bỏ dịch khuẩn còn thừa. Để

cho khô mặt thạch bằng cách đặt chúng vào tủ ẩm 15 phút. Thông thường, 5 đĩa giấy sẽ được đặt ở xung quanh đĩa và cách nhau khoảng 20 mm từ cạnh của đĩa giấy này tới cạnh của đĩa giấy khác và một đĩa đặt ở trung tâm. Sử dụng kẹp đầu nhọn vô trùng để đặt khoanh giấy nhẹ nhàng, rồi ấn khế khoanh giấy xuống bảo đảm tiếp xúc hoàn toàn với mặt thạch. Không dịch chuyển khoanh giấy nếu như nó đã tiếp xúc với mặt thạch. Các đĩa được để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút (không quá 60 phút) để đảm bảo cho kháng sinh từ các khoanh giấy khuếch tán ra một cách đồng đều ở thạch. Ủ ngược các đĩa ở 37°C trong vòng 18-20 giờ. Đo đường kính vòng ức chế (được tính bằng mm) từ phía sau mặt đĩa. Nếu cạnh của vòng ức chế không rõ nét, người ta phải đọc khu vực ức chế xấp xỉ 80% sự ức chế.

II. NỘI DUNG THỰC HÀNH

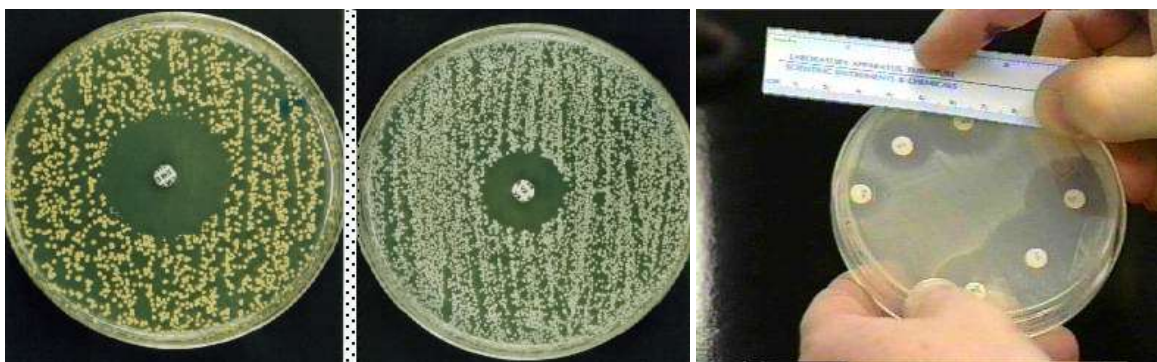
Sinh viên thực hành phương pháp đục lỗ trên đĩa thạch để quan sát tác dụng ức chế tăng trưởng vi sinh vật của kháng sinh.

1. Vật liệu

- Dung dịch chuẩn độ đục: huyền dịch BaSO₄ tương đương với độ đục chuẩn 0.5 McFarland. Huyền dịch như vậy có chứa khoảng 1×10^8 cfu/ml.
- Vi khuẩn thử nghiệm: đĩa khuẩn lạc *E.coli*, *Streptococcus aureus* < 24h
- Thước kẻ li, que cấy tam giác, pipetman và đầu tip 100ul, 1000 ul vô trùng
- Đĩa petri môi trường cao thịt pepton, ống nghiệm chứa 5ml dung dịch pha loãng.
- Các dung dịch kháng sinh riêng lẻ ampicilin, streptomycin (2 mg/ml), kanamycin, tetracylin (96 mg/ml), penicilin (2.000 đơn vị /ml).

2. Thực hành

- Lấy khoảng 10 khuẩn lạc bằng que cấy vòng hòa tan trong 1ml nước muối sinh lý. Chuẩn độ dịch khuẩn *E.coli*, *Staphylococcus aureus* tương đương với độ đục chuẩn 0.5 McFarland.
- Trong điều kiện vô trùng, cấy trải 100 µl dịch khuẩn *E. coli*, *Staphylococcus aureus* lên 2 đĩa thạch chứa môi trường pepton (mỗi chủng cấy 1 đĩa). Hút bỏ dịch thừa nếu có.
- Để khô bề mặt trong 15 phút. Dùng bút đánh dấu chia hộp petri thành 5 phần bằng nhau.
- Dùng dụng cụ vô trùng, đục 5 lỗ có đường kính bằng nhau (6 mm) trên mỗi phần của hộp petri.
- Dùng pipetman và đầu tip 100 µl vô trùng chuyển 50 µl dung dịch kháng sinh vào lỗ thạch. Mỗi lỗ được bổ sung một trong số các kháng sinh sau: ampicilin, kanamycin, penicillin, streptomycin, tetracylin.
- Ủ ở 37°C trong 24 giờ.
- Quan sát và đo đường kính vòng vô khuẩn.



Hình 8.4 Vòng kháng khuẩn của kháng sinh trên đĩa thạch.

Bài 10 KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH SINH HÓA CỦA VI SINH VẬT

Phân loại và định danh vi khuẩn là một vấn đề quan trọng trong chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh (trên người, động vật và các thủy sản) cũng như trong xét nghiệm vi sinh thực phẩm. Muốn định danh phân loại vi sinh vật, ngoài việc khảo sát hình thái, kích thước tế bào và khuẩn lạc, tính chất bắt màu Gram, cần phải khảo sát các tính chất sinh lý của vi khuẩn thể hiện qua các phản ứng sinh hóa xảy ra trong những môi trường nuôi cấy đặc biệt.

I. Các đặc tính phân giải glucid của vi sinh vật

1. Phản ứng lên men hydratcarbon

* *Nguyên tắc*: nhằm xác định khả năng lên men một loại hydratcarbon đặc hiệu có trong môi trường cơ bản của vi sinh vật. Khi lên men hydratcarbon, vi sinh vật sẽ tạo trong môi trường những acid hữu cơ, có sinh hơi hay không sinh hơi. Việc sinh acid sẽ làm giảm pH thể hiện qua sự đổi màu chất chỉ thị pH có trong môi trường nuôi cấy.

* *Môi trường*: - Phenio Red Broth Base pH 7,4, có bổ sung 1% loại đường cần khảo sát.

- Chỉ thị: phenol red, màu vàng ở pH acid, màu đỏ ở pH kiềm

- Hydratcarbon (1%) thường sử dụng nhất là: glucose, lactose, galactose, raffinose, rhamnose, sucrose, inositol, xylose, fructose, mannitol, sorbitol, trehalose, cellobiose, arabinose,...

Có thể pha dung dịch mẹ (stock) đường 5% hoặc 10% trong nước cất trước khi thêm vào môi trường cơ bản để đạt được nồng độ cần thiết. Môi trường được phân vào các ống nghiệm, sau đó cho các ống Durham vào (để theo dõi sự sinh hơi của vi khuẩn). Khử trùng môi trường ở 116 – 118°C trong 15 phút.

* *Phương pháp cấy*: dùng khuẩn lạc của các dòng thuần 18 – 24 giờ trên môi trường thích hợp. Có thể dùng que cấy vòng hoặc que cấy thẳng để cấy vi khuẩn vào ống nghiệm chứa môi trường cần thử

* *Đọc kết quả*: - Phản ứng (+): môi trường chuyển màu vàng

- Phản ứng (-): môi trường vẫn màu đỏ.

- Có sinh hơi: có khí trong ống Durham

- Ở những vi sinh vật lên men chậm, môi trường có màu cam. Nếu nghi ngờ cần so sánh với ống không cấy, ủ lại và đọc kết quả như trên

* *Ứng dụng*: khả năng lên men đường hoặc rượu thường được dùng để định danh các vi sinh vật đường ruột hoặc để phân tích một số giống hay loài bằng vài loại đường đặc hiệu dựa trên tính chất chuyên biệt của chúng. Ví dụ: mọi thành viên của họ Enterobacteriaceae đều lên men glucose, *E. coli*, *Klebsiella* và nhóm *Enterobacter* lên men glucose và lactose. Thử nghiệm trên có thể giúp phân biệt 2 giống *Listeria monocytogenes* (salicin +) với *Corynebacterium* (salicin -), giúp phân biệt *Staphylococcus aureus* (mannitol +) với *S. epidermidis* (mannitol -)...

2. Phản ứng Methyl Red (MR)

* *Nguyên tắc*: phản ứng này dùng để phân biệt 2 loại vi khuẩn về hình thức biến dưỡng glucose:

- Loại 1: lên men thật mạnh đường glucose tạo các chất acid cuối cùng rất bền và cho phản ứng MR (+).

- Loại 2: lên men glucose thành các chất trung gian không bền. Các chất này biến thành các chất trung tính cuối cùng (chất acetoin) và cho phản ứng MR (-).

Yêu cầu là phải thực hiện với canh trùng già ít nhất là 48 giờ.

* *Môi trường và thuốc thử*:

- Môi trường MR-VP (môi trường Clark-Lubs, dạng môi trường đông khô).

- Thuốc thử methyl red:

+ Methyl red	0,02 g
+ Ethanol 95%	50 ml
+ Nước cất	50 ml

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn vào ống nghiệm có chứa 5 ml môi trường MR-VP, ủ trong 24 – 28 giờ ở 37°C, thêm 5 giọt thuốc thử methyl red và lắc đều.

* *Đọc kết quả*:

- Phản ứng (+): môi trường có màu đỏ
- Phản ứng (-): môi trường có màu vàng

* *Ứng dụng*: phản ứng MR giúp phân biệt các giống: *E. coli* (+) với *Enterobacter aerogenes* (-), *Yersinia* (+) với các trực khuẩn Gram âm không thuộc họ đường ruột khác (-), xác định loài *Listeria monocytogenes* (+).

3. Phản ứng Voges Proskauer (VP)

* *Nguyên tắc*: có loại vi khuẩn biến dưỡng đường glucose thành một chất trung tính là acetyl-methyl-carbinol hay acetoin, chất này bị oxyt hóa trong môi trường kiềm và kết hợp với α -naphthol để cho phức chất có màu hồng đỏ.

* *Môi trường và thuốc thử*:

- Môi trường MR-VP (môi trường Clark-Lubs)

- Thuốc thử: dung dịch α -naphthol 5% trong ethanol

- Dung dịch KOH 40% trong nước.

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn vào ống nghiệm có chứa 3 ml môi trường MR-VP ủ 37°C trong 24 – 48 giờ. Sau thời gian ủ thêm vào 1,8 ml α -naphthol 5% (hay 15 giọt trong 1 ml môi trường) và 0,6 ml KOH 40% trong nước (hay 10 giọt trong 1 ml môi trường) lắc đều và để yên 5 – 10 phút.

* *Đọc kết quả*: phản ứng (+) khi có màu hồng đỏ xuất hiện. Vài loại vi khuẩn cho phản ứng (+) chậm và yếu nên cần phải hơi nhẹ vừa nóng (để ống nghiệm hơi nghiêng) mới xuất hiện màu.

* *Ứng dụng*: phản ứng MR-VP giúp phân biệt *E. coli* (thường -) với *Klebsiella*, *Enterobacter* (thường +), *Staphylococcus* (thường +) với *Micrococcus* (thường -).

4. Phản ứng Simmons citrate

* *Nguyên tắc*: một số vi khuẩn có khả năng sử dụng citrate như nguồn carbon duy nhất trong môi trường tổng hợp vô cơ. Khi citrate biến dưỡng đến giai đoạn cuối cùng là CO₂, có một

sự mất cân bằng về ion (có sự phóng thích NH_3) và do đó môi trường bị kiềm hóa chuyển từ màu xanh lá cây sang màu xanh dương đậm.

* *Môi trường*: môi trường thạch Simmons citrate (dạng đông khô) được đều chế theo thể thạch nghiêng, thành phần môi trường có chứa chỉ thị màu xanh bromothymol.

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn trên thạch nghiêng, chú ý cấy từ khuẩn lạc của vi khuẩn trên môi trường đặc, không nên cấy từ canh trùng (môi trường lỏng) vì sẽ cho phản ứng (+) giả. Ủ các ống môi trường ở 37°C trong 18 – 24 giờ.

* *Đọc kết quả*:

- Phản ứng (+): vi khuẩn mọc trên mặt thạch nghiêng với sự đổi màu sang màu xanh dương hoàn toàn, chút ít hay không.

- Phản ứng (-): vi khuẩn không mọc trên mặt thạch và không đổi màu môi trường.

* *Ứng dụng*: phản ứng giúp phân biệt *Edwardsiella* (-) với *Salmonella* (thường +), *Klebsiella*, *Enterobacter* (thường +) với *E. coli* (-), *Aeromonas hydrophilia* (thường +) với *A. salmonicida* (-).

5. Phản ứng Malonat

* *Nguyên tắc*: phản ứng dùng để khảo sát khả năng sử dụng Sodium malonat làm nguồn carbon. Khi vi khuẩn sử dụng malonat sẽ sinh ra phản ứng kiềm, biến đổi môi trường từ màu xanh lá cây sang màu xanh dương.

* *Môi trường*: Malonat broth (lỏng) với chỉ thị là màu là xanh bromothymol (màu xanh lá cây).

* *Phương pháp cấy*: dùng que cấy lấy 1 ít vi khuẩn thuần khiết (hay khuẩn lạc trên môi trường thạch) cấy vào môi trường malonat lỏng, ủ 37°C trong 18 – 24 giờ.

* *Đọc kết quả*:

- Phản ứng (+): môi trường chuyển sang màu xanh dương.

- Phản ứng (-): môi trường vẫn màu xanh lá cây

* *Ứng dụng*: phản ứng giúp phân biệt các giống *Alcaligenes faecalis* (+) với *Acinobacter* (-), *Klebsiella*, *Enterobacter* (+) với *E. coli* (-), *Arizona* (+) với *Salmonella* (-).

6. Phản ứng trên môi trường KIA (Kligler Iron Agar) hay TSI (Triple Sugar Iron agar)

* *Nguyên tắc*: phản ứng này dùng để phân biệt các loại vi trùng thuộc họ Enterobacteriaceae. Môi trường KIA (có thể dùng môi trường TSI) thường dùng để khảo sát sự lên men đường glucose, lactose và khả năng sinh khí H_2S , khí H_2 và CO_2 của vi khuẩn. Trong môi trường có chỉ thị màu phenol red dùng để phát hiện khả năng lên men đường của vi khuẩn. Đây là môi trường đặc, được chuẩn bị trong ống nghiệm ở thể nghiêng sâu.

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn bằng cách cấy đâm sâu vào phần môi trường sâu và cấy trên bề mặt thạch nghiêng. Ủ ở nhiệt độ thích hợp một thời gian.

* *Đọc kết quả*: có các trường hợp xảy ra:

- Phần sâu và phần nghiêng vẫn giữ màu đỏ: vi khuẩn không lên men ở cả 2 loại đường, có nghĩa vi khuẩn là gốc lactose âm, glucose âm, (kí hiệu K/K).

- Phần sâu bị acid hóa đổi màu vàng, phần nghiêng vẫn giữ màu đỏ: nguyên nhân là do khởi đầu vi khuẩn lên men glucose, acid hóa 2 phần nghiêng và sâu. Sau đó vì trên phần nghiêng vi khuẩn mọc nhanh nên đã kiềm hóa trở lại do sự biến dưỡng peptone có trong môi trường và thải ra $\text{NH}_3 \rightarrow$ vi khuẩn gốc lactose âm, glucose dương (K/A).

- Phần nghiêng và phần sâu đổi màu vàng do vi khuẩn lên men cả 2 loại đường, môi trường trở nên rất acid, các chất chuyển hóa kiềm được phóng thích từ sự biến dưỡng peptone ở phần nghiêng không đủ sức để trung hòa cùng một lúc các chất chuyển hóa acid của 2 loại đường glucose và lactose, nên phần nghiêng không bị kiềm hóa như trường hợp trên \rightarrow vi khuẩn thuộc gốc lactose dương, glucose dương (A/A).

- Có hiện tượng sinh khí: sinh các bong bóng khí ở phần sâu do vi khuẩn lên men đường sinh khí CO_2 và $\text{H}_2 \rightarrow$ vi khuẩn là gốc có khả năng sinh hơi.

- Khi có màu đen xuất hiện ở vùng nổi 2 phần nghiêng và sâu là do vi khuẩn có khả năng khử sulfate có trong môi trường, tạo thành khí H_2S . Chất này phản ứng với Fe (ferrous sulfate) có trong môi trường để tạo kết tủa sulfur sắt màu đen.

Chú ý: môi trường TSI chỉ khác với KIA ở chỗ có thêm đường sucrose (saccharose). Sucrose có nồng độ giống lactose, sự sử dụng sucrose cũng giống lactose, được ghi nhận bởi sự acid hóa ở phần thạch đứng và nghiêng. Môi trường này giúp tìm ra những vi khuẩn lên men lactose chậm (nhiều ngày) vì đa số vi khuẩn đường ruột lên men lactose chậm, đều lên men sucrose sau một ngày. Cách thực hiện phản ứng cũng tương tự như môi trường KIA, cho kết quả về lên men đường glucose, lactose, sucrose, sinh H_2S và sinh hơi.

7. Phản ứng thủy phân tinh bột

* *Nguyên tắc:* một số vi sinh vật sinh amylase thực hiện việc thủy phân tinh bột và sử dụng các sản phẩm thủy phân để làm nguồn carbon và năng lượng. Để phát hiện khả năng này, căn cứ vào sự chuyển màu của môi trường tinh bột khi gặp iod.

* *Môi trường và thuốc thử:*

- Môi trường tinh bột (%):

Peptone	1,0
KH_2PO_4	0,5
Tinh bột tan	0,2
Agar	1,5
pH	6,8 – 7,0

Chuẩn bị môi trường trong bình tam giác, khử trùng 1 atm và sau đó rót vào đĩa petri vô trùng.

- Dung dịch Lugol

* *Phương pháp cấy:* sau khi môi trường đông, cấy vi sinh vật cần nghiên cứu thành một vết cấy dọc theo đường kính của đĩa petri hay cấy chấm ở giữa đĩa thạch (đối với nấm mốc). Nuôi cấy 7 – 10 ngày đêm. Khi vi sinh vật phát triển, nhỏ dung dịch Lugol phủ kín bề mặt môi trường.

* *Đọc kết quả:* quan sát vùng môi trường quanh vết cấy:

- Nếu có sự thủy phân tinh bột bởi vi sinh vật thì vùng quanh vết cấy sẽ không màu hay màu đỏ nâu (do tinh bột bị thủy phân).

- Nếu vùng quanh vết cấy có màu tím, chứng tỏ vi sinh vật không có khả năng thủy phân tinh bột do không có enzyme amylase.

* *Ứng dụng*: khảo sát đặc tính sinh enzyme amylase của nấm mốc và vi khuẩn, phân biệt *Corynebacterium diptheriae type gravis* (+) với *Corynebacterium* spp. (-), *Streptococcus bovis* nhóm D (+) với *Streptococcus* spp. khác (-).

II. Các đặc tính phân giải hợp chất nitơ của vi sinh vật

1. Phản ứng hóa lỏng gelatin (phân giải protein)

* *Nguyên tắc*: một số vi sinh vật có khả năng dịch hóa (làm lỏng) gelatin nhờ chúng tiết vào môi trường các enzyme thủy phân protein (collagenase). Để phát hiện khả năng này, người ta cấy các vi sinh vật cần nghiên cứu lên môi trường gelatin – nước thịt – peptone.

* *Môi trường*: môi trường gelatin 12% (nutrient broth + 12% gelatin): thêm 12% gelatin vào môi trường canh thịt – peptone, để yên 20 – 30 phút cho gelatin trương lên, sau đó nung trong nồi cách thủy cho đến khi gelatin tan hết. Rót hỗn hợp trên vào các ống nghiệm, mỗi ống 8 – 10 ml. Khử trùng ở 0,5 atm trong 15 phút.

* *Phương pháp cấy*: cấy bằng que cấy đầu nhọn theo lối cấy đâm sâu, ủ ở 30°C trong 24 – 48 giờ.

* *Đọc kết quả*: nếu vi khuẩn được ủ ở nhiệt độ 30°C, để quan sát hiện tượng hóa lỏng gelatin phải đưa ống nghiệm nuôi cấy vi khuẩn vào tủ lạnh trong vòng 10 phút, sau đó lấy ra quan sát:

- Phản ứng (+): môi trường gelatin ở trạng thái lỏng

- Phản ứng (-): môi trường gelatin ở trạng thái đông đặc.

2. Phản ứng Indol

* *Nguyên tắc*: một số vi khuẩn có khả năng phân giải tryptophan trong môi trường thành indol. Nhân pyrol của indol sẽ kết hợp với p-dimethylamino benzaldehyde trong thuốc thử Kovacs tạo thành một phức chất dạng quinon màu đỏ tía trên mặt thoáng của môi trường.

* *Môi trường và thuốc thử*:

- Môi trường: Tryptone water gồm 15 g tryptone trong 1 lít nước cất, pH 7,3, phân phối vào ống nghiệm, hấp khử trùng 121°C trong 15 phút.

- Môi trường kết hợp: MIU (Motility-Indol-Urea); SIM (Sulfide-Indol-Motility).

- Thuốc thử Kovacs:

- p-dimethylamino benzaldehyde	10 g
- Amyl hoặc butanol	150 ml
- HCl đậm đặc	50 ml

Thuốc thử đựng trong chai nâu và luôn đầy kín, khi thuốc thử đổi màu nâu sẫm thì đổ bỏ.

* *Phương pháp cấy*:

- Đối với môi trường nước peptone: dùng que cấy lấy vi khuẩn cần kiểm tra cho vào ống nghiệm chứa môi trường nước peptone.

- Nếu dùng môi trường MIU hay SIM: dùng que cấy đã lấy vi khuẩn đâm thẳng vào giữa mặt thạch một đường dài bằng $\frac{3}{4}$ chiều sâu của thạch. Ủ 37°C trong 18 – 24 giờ. Sau thời gian ủ, nhỏ 3 – 5 giọt thuốc thử Kovacs vào canh trùng.

* *Đọc kết quả:*

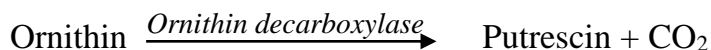
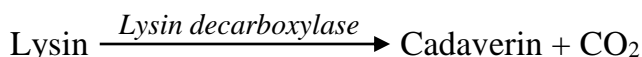
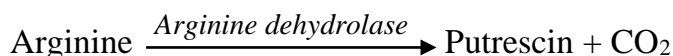
- Phản ứng (+): một vòng màu đỏ sẫm xuất hiện trên bề mặt môi trường.

- Phản ứng (-): bề mặt môi trường giữ nguyên màu vàng của thuốc thử

* *Ứng dụng:* phản ứng indol dùng để phân biệt các vi khuẩn trong nhóm Coliforms. Ví dụ: *E. coli* (thường +) với *Klebsiella* và *Enterobacter* (thường -).

3. Phản ứng ADH (Arginine dehydrolase), LDC (Lysin decarboxylase), ODC (Ornithine decarboxylase)

* *Nguyên tắc:* phản ứng này dùng để xác định vi sinh vật có khả năng phân giải acid amin bằng cách khử nhóm carboxyl (-COOH) thành amin hoặc diamin và CO₂ nhờ có enzyme decarboxylase. Các sản phẩm của sự tách carboxyl làm tăng pH môi trường, làm chuyển màu chất chỉ thị. Sự phân giải acid amin xảy ra trong điều kiện kỵ khí.



* *Môi trường và thuốc thử:*

- Môi trường Moller Decarboxylase Base (dạng đông khô), thêm vào acid amin: lysin, arginin, ornithin nồng độ 1%, pH 6,0, phân phối vào ống nghiệm, khử trùng 121°C trong 20 phút.

- Chỉ thị màu bromocresol purple, chuyển màu từ vàng sang tím ở pH 6,8.

Ống B (Base – đối chứng): ống kiểm chứng chỉ chứa glucose, không chứa acid amine.

Ống L (Lysin): chứa glucose và lysin

Ống A (Arginin): chứa glucose và arginin

Ống O (Ornithin): chứa glucose và ornithin

- Dầu parafin

* *Phương pháp cấy:* cấy vi khuẩn vào 4 ống B, L, A, O, phủ dầu parafin trên bề mặt môi trường dày khoảng 5 mm. Ủ 37°C trong 18 – 24 giờ.

* *Đọc kết quả:*

- Đọc ống B trước: ống này phải có màu vàng

- Đọc các ống L, A, O: phản ứng (+) có màu tím, phản ứng (-) có màu vàng.

* *Ứng dụng:* dùng để phân loại và định danh các loài thuộc họ Enterobacteriaceae.

4. Phản ứng Urease

* *Nguyên tắc:* một số vi khuẩn sản xuất ra enzyme urease thủy phân ure trong môi trường thành CO₂ và NH₃. Môi trường bị kiềm hóa làm chất chỉ thị màu phenol red đổi sang màu đỏ.

* *Môi trường:*

- Môi trường ure đặc (Christensen Ure agar): rất nhạy
- Môi trường ure lỏng với chất chỉ thị màu phenol red.

* *Phương pháp cấy:* cấy vào môi trường gốc vi khuẩn thuần khiết từ một khuẩn lạc. Ủ 37°C trong 18 – 24 giờ.

* *Đọc kết quả:*

- Phản ứng (+): môi trường chuyển sang màu đỏ
- Phản ứng (-): môi trường không đổi màu

* *Ứng dụng:* *Klebsiella* cho phản ứng (+) sau 18 – 24 giờ, *Citrobacter* cho phản ứng (+) sau 24 – 48 giờ, *Proteus* cho phản ứng (+) sau 18 – 24 giờ, đối với các vi khuẩn khác loại môi trường lỏng ít nhạy nên khó tìm thấy phản ứng (+).

5. Phản ứng sinh H₂S

* *Nguyên tắc:* xác định khả năng vi sinh vật sinh H₂S từ các acid amin chứa lưu huỳnh (methionine, cysteine và cystine) tạo chất kết tủa màu đen. Việc tạo thành H₂S còn đặc trưng cho cả nhóm vi sinh vật khử sulfate thành H₂S trong hô hấp kỵ khí.

* *Môi trường:* canh thịt-peptone được phân phối vào ống nghiệm và hấp khử trùng. Có thể dùng môi trường KIA hay SIM (bán lỏng) để thử khả năng sinh H₂S.

* *Phương pháp cấy:* với canh thịt, cấy vi khuẩn cần kiểm tra vào ống môi trường. Sau khi cấy, gắn vào nút bông một miếng giấy lọc có tẩm acetate chì. Bên ngoài nút bông bọc thêm một lớp nylon để ngăn khí H₂S bay ra khỏi ống nghiệm. Ủ ở 37°C trong 7 – 10 ngày. Đối với môi trường KIA hay SIM, cấy theo lối cấy đâm với que cấy thẳng.

* *Đọc kết quả:*

- Đối với môi trường canh thịt có gắn giấy lọc tẩm acetate chì, nếu thấy giấy lọc chuyển sang màu đen là phản ứng (+), nếu không có màu đen là phản ứng (-).
- Đối với môi trường KIA hay SIM, quan sát thấy các vết màu đen trong môi trường là phản ứng (+), nếu không thấy xuất hiện các vết đen trong thạch là phản ứng (-).

* *Ứng dụng:* phân biệt *Pseudomonas putrefaciens* (+) với *Pseudomonas* spp. khác (-), *Salmonella* (thường +) với *Shigella* (-).

6. Phản ứng khử nitrate (nitrate reductase)

* *Nguyên tắc:* việc khử nitrate thành nitrite (đôi khi thành N₂) xảy ra ở các vi sinh vật có enzyme nitratoreductase, chúng có khả năng sử dụng nitrate làm nguồn thức ăn nitơ. Ngoài ra có một số vi sinh vật có khả năng sử dụng nitrate làm chất nhận e⁻ hay H⁺ trong hô hấp kỵ khí để oxy hóa hợp chất hữu cơ: $\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$.

* *Môi trường và thuốc thử:* môi trường nitrate: canh thịt peptone có chứa 0,2% KNO₃ và thuốc thử Griess gồm 2 loại có thành phần sau:

- Acid sulfanilic: hòa tan 0,5 g acid sulfanilic vào 30 ml acid acetic (glacial) bổ sung thêm 100 ml nước cất, đem lọc. Dung dịch được bảo quản trong 1 tháng.
- α -naphthylamin: hòa tan 0,1 g α -naphthylamin trong 100 ml nước cất đun sôi. Để nguội rồi bổ sung thêm 30 ml acid acetic (glacial), đem lọc, bảo quản trong 1 tháng.

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn vào môi trường nitrate, ủ trong 1 – 5 ngày. Thêm 1 ml dung dịch acid sulfanilic, tiếp theo thêm 1 ml dung dịch α -naphtylamin.

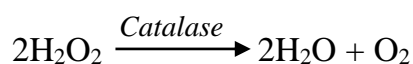
* *Đọc kết quả*: nếu có sự hình thành một hợp chất màu đỏ hồng chứng tỏ có hiện diện của NO_2 (do nitrate bị khử thành nitrite) kết luận phản ứng (+). Nếu không có sự hình thành hợp chất màu đỏ hồng phải tiếp tục thêm 2 – 3 mg bột kẽm (Zn) vào ống nghiệm. Nếu sau 5 phút vẫn không có màu đỏ là phản ứng (+), nếu có màu đỏ xuất hiện là phản ứng (-) do còn hiện diện NO_3 khi gặp Zn sẽ bị khử thành NO_2 .

* *Ứng dụng*: xác định các vi khuẩn trong họ Enterobacteriaceae thường có phản ứng (+).

III. Các phản ứng liên quan đến enzyme hô hấp của vi sinh vật

1. Phản ứng catalase

* *Nguyên tắc*: nhằm xác định sự có mặt của enzyme catalase của một số vi sinh vật hô hấp kỵ khí tùy ý. Catalase giúp vi sinh vật kỵ khí không bị ngộ độc khi môi trường có oxy không khí bởi sự hình thành chất H_2O_2 . Catalase xúc tác phản ứng sau:



* *Thuốc thử*:

- Hydrogen peroxide 30% (superoxal) giữ lạnh trong chai sẫm màu, tránh sáng.
- Dung dịch đệm phosphate (M/15), pH 7,0

* *Phương pháp thử*:

- Thử trên lame: dùng kim cây lấy tâm của khuẩn lạc thuần khiết (18 - 20 giờ ủ trên môi trường thích hợp) đặt lên lame kính sạch, rồi nhỏ một giọt H_2O_2 30% lên trên. Việc dùng kim hoặc khuyên cấy trộn lẫn H_2O_2 vào vi sinh vật là không cần thiết.
- Thử trong ống nghiệm: nhỏ trực tiếp 1 ml H_2O_2 30% lên dòng thuần vi sinh vật cấy dày trên mặt thạch nghiêng (không dùng môi trường thạch máu). Quan sát các bóng khí xuất hiện tức thì và ghi nhận kết quả.
- Phương pháp lamelle: dùng kim cây lấy tâm khuẩn lạc đặt lên lam kính, nhỏ một giọt H_2O_2 0,5% lên và đập lại bằng lamelle. Theo dõi bóng khí bị giữ lại dưới lamelle.

* *Đọc kết quả*:

- Catalase (+): tạo O_2 , các bóng khí xuất hiện tức thì (hoặc trong vòng 10 giây)
- Catalase (-): không tạo O_2 , không có bóng khí.

* *Ứng dụng*: phản ứng thường được dùng để phân biệt vi sinh vật hiếu khí với vi sinh vật kỵ khí: *Bacillus* (+) với *Clostridium* (-), *Streptococcus* (-) với *Micrococcus* hay *Staphylococcus* (+), *Listeria monocytogenes* (+) với *Erysipelothrix* (-)

2. Phản ứng Oxydase

* *Nguyên tắc*: nhằm xác định sự có mặt của enzyme cytochrom oxydase của vi khuẩn. Đây là nhóm enzyme cuối cùng vận chuyển e^- đến oxy phân tử để tạo thành nước trong chuỗi hô hấp.

* *Giống vi khuẩn và thuốc thử*:

- Vi khuẩn kiểm tra được nuôi trên môi trường thạch đến khi phát triển thành khuẩn lạc.
- Thuốc thử: Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1% (dung dịch không màu)

* *Đọc kết quả*: để xác định hoạt tính oxydase có 2 cách:

- Cách 1: người ta nhỏ vài giọt dung dịch Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1% (trong nước) lên trên các khuẩn lạc mọc trong các đĩa thạch. Khuẩn lạc của các vi sinh vật có hoạt tính oxydase sẽ bị nhuộm đỏ và sau 10 - 30 phút chuyển thành đen.
- Cách 2: nhỏ vài giọt thuốc thử trên lên giấy lọc. Dùng que cấy lấy một ít vi khuẩn cần kiểm tra bôi lên giấy lọc có tẩm dung dịch thuốc thử phản ứng oxydase. Phản ứng (+) sẽ tạo màu đỏ tím trong vòng 10 - 30 phút.

* *Ứng dụng*: giúp xác định *Aeromonas* (+), *Pseudomonas* (thường +), Enterobacteriaceae (-).

Phân biệt: vi khuẩn họ Pseudomonadaceae (oxydase +) với họ Enterobacteriaceae (-)

3. Phản ứng O/F (Oxidation-fermentation test)

* *Nguyên tắc*: xác định vi khuẩn chuyển hóa carbohydrate (glucose) bằng cách lên men (Fermentation) hay bằng cách oxyd hóa hiếu khí (Oxydation).

* *Môi trường*:

- Môi trường: O-F Basal Medium, khử trùng ở 121°C/15 phút.

- Dung dịch glucose 10%, khử trùng bằng cách lọc với màng lọc có kích thước 0,2 µm.

Bổ sung một cách vô trùng 10 ml dung dịch đường glucose 10% với 90 ml môi trường O/F basal để có môi trường O/F có chứa 1% đường. Phân phối môi trường vào ống nghiệm trong điều kiện vô trùng: 5 ml mỗi ống.

* *Phương pháp cấy*: cấy vi khuẩn kiểm tra vào 2 ống môi trường:

- Ống 1: ủ trong điều kiện kỵ khí (cho thêm một lớp parafin vô trùng)
- Ống 2: ủ trong điều kiện hiếu khí.

* *Đọc kết quả*:

- Vi khuẩn oxyd hóa (O): ống kỵ khí có màu xanh (green), ống hiếu khí có màu vàng.
- Vi khuẩn lên men (F): cả hai ống môi trường đều có màu vàng.
- Không phản ứng: cả 2 ống có màu xanh.

* *Ứng dụng*: phản ứng dùng để phân biệt các vi khuẩn G- không thuộc họ đường ruột với các vi khuẩn G- thuộc họ Enterobacteriaceae. Ví dụ: Vi khuẩn họ Enterobacteriaceae có phản ứng lên men glucose (F). Hầu hết các vi khuẩn *Pseudomonas* spp. có phản ứng oxyd hóa glucose (O).

IV. Khảo sát tính chất liên quan đến tính gây bệnh ở vi sinh vật

1. Phản ứng đông huyết tương (coagulase test)

* *Nguyên tắc*: kiểm tra khả năng làm đông huyết tương của vi sinh vật do tác dụng của men coagulase. Coagulase là một chất giống prothombin có khả năng tác động lên những yếu tố bình thường của huyết tương để sinh ra chất giống thrombin, có tác dụng biến fibrinogen thành fibrin (kết quả tạo khối đông dạng sợi).

* *Hóa chất – thuốc thử*:

- Hóa chất thử: huyết tương hoặc fibrinogen.

- Huyết tương: nên dùng huyết tương người hoặc thỏ vô trùng, tươi hoặc đông khô (dạng thương mại). Huyết tương tươi thu được bằng cách quay ly tâm máu tươi có chứa chất chống đông. Huyết tương đông khô đã pha nên dùng ngay trong ngày.

* *Phương pháp thử và đọc kết quả:*

- Phương pháp thử trên lame: nhỏ một giọt nước cất hay nước muối sinh lý lên lame kính sạch, dùng que cấy lấy một lượng lớn tế bào từ khuẩn lạc cần kiểm tra, hòa nhẹ vào giọt nước, tạo huyền phù nồng độ cao. Thêm vào một khuyên cấy chứa huyết tương, trộn đều và đọc kết quả:

+ Phản ứng (+): có ngưng kết rõ rệt sau 5 – 20 giây hoặc từ 20 giây đến 2 phút. Nếu ngưng kết xảy ra sau một phút, lặp lại phép thử trên lame. Nếu kết quả vẫn như cũ chuyển sang thử trong ống nghiệm.

+ Phản ứng (-): không có ngưng kết, hỗn dịch vẫn đồng nhất. Khẳng định bằng cách thử trong ống nghiệm.

- Phương pháp thử trong ống nghiệm: cho vào ống nghiệm 0,5 ml huyết tương thỏ. Thêm 0,5 ml dịch nuôi cấy đồng thuận hoặc một khuyên cấy khuẩn lạc từ môi trường thạch. Xoay nhẹ (không lắc) để trộn đều vi khuẩn. Ủ 37°C. Quan sát 30 phút liên tục 4 giờ (khi xem chỉ nghiêng nhẹ ống nghiệm). Đọc kết quả:

+ Phản ứng (+): xuất hiện những khối đông hoặc những sợi rõ rệt. Mọi mức độ đông kết đều được coi là dương tính.

+ Phản ứng (-): không có khối đông, hỗn dịch vẫn đồng nhất như ống không cấy.

* *Ứng dụng:* phản ứng đông huyết tương là test đặc hiệu để phân biệt các loài trong giống *Staphylococcus*: *S. aureus* (+) với *S. epidermidis* (-) và *S. saprophyticus* (-). Kết quả: Phản ứng dương tính (+) thường được coi là tiêu chuẩn chẩn đoán cuối cùng để định danh *Staphylococcus aureus* và chỉ thị về tính gây bệnh.

V. CÁC PHẢN ỨNG SINH HÓA ĐẶC BIỆT KHÁC

1. Phản ứng ONPG

* *Nguyên tắc:* xác định sự có mặt hay không có mặt enzyme β -galactosidase nhờ vào sử dụng một chất hữu cơ có tên gọi: O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (gọi tắt ONPG) hoặc chất hữu cơ p-Nitrophenyl- β -D-galactoside (PNPG) được xem như là cơ chất đối với enzyme. Khi vi khuẩn có enzyme β -galactosidase thì chúng sẽ phân cắt cơ chất O-Nitrophenyl- β -D-galactoside để giải phóng nitrophenyl làm môi trường xuất hiện màu vàng.

* *Mục đích:* phân biệt các vi khuẩn có khả năng sử dụng đường lactose và vi khuẩn không sử dụng được lactose (không có β -galactosidase): *Citrobacter* và *Arizona* (+) với *Salmonella* (-), *Escherichia coli anaerogeneic* (+) với *Shigella sonnei* (-).

* *Cách thử:* dùng que cấy lấy 1 khuẩn lạc của vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa 0,25 ml dung dịch NaCl 0,85% và 1 giọt toluen, lắc để phân tán đều, ủ ở 37°C trong 5 – 10 phút. Thêm 0,25 ml dung dịch ONPG, ủ ở 37°C trong 20 phút đến 24 giờ.

Có thể dùng đĩa ONPG (đĩa giấy lọc có tấm ONPG) cho vào ống nghiệm chứa huyền dịch vi trùng trên.

* **Độc kết quả:** sau 20 phút thấy có sự đổi màu sang màu vàng là phản ứng (+), nếu không đổi màu thì tiếp tục ủ thêm, thời gian tối đa là 24 giờ, nếu không đổi màu là phản ứng (-).

2. Phản ứng KCN

* **Nguyên tắc:** dùng để phân biệt các vi khuẩn có khả năng sống và phát triển được trong môi trường dinh dưỡng có chứa chất potassium cyanic (KCN) – một chất độc đối với đa số vi khuẩn.

* **Môi trường:** cứ 100 ml môi trường KCN broth base (sau khi khử trùng xong) được bổ sung 1,5 ml dung dịch KCN nồng độ 0,5%.

* **Cách thử:** Cấy vi khuẩn vào môi trường dinh dưỡng có KCN, ủ ở 35°C trong 48 giờ.

* **Độc kết quả:**

- Phản ứng (+): vi trùng mọc được làm đục môi trường

- Phản ứng (-): vi trùng không mọc được và vi trùng vẫn trong

* **Ứng dụng:** dùng để phân biệt vi khuẩn: *Citrobacter freundii* (+) với nhóm *Salmonella* (-), *Pseudomonas aeruginosa* (+) với *Alcaligenes faecalis* (-).

3. Thủy phân Esculine

* **Nguyên tắc:** nhằm xác định khả năng thủy phân glycoside escilin thành glucose và esculetin của một số vi khuẩn trong điều kiện có sự hiện diện của 40% mật.

* **Môi trường:** môi trường Bile Esculin Medium (môi trường chứa 40% mật) được phân phối vào các ống nghiệm, khử trùng 121°C, làm thạch nghiêng.

* **Cách thử:** cấy vi khuẩn thuần khiết cần kiểm tra ở 24 giờ tuổi, ủ 35°C trong 24 giờ (hoặc 48 giờ đối với *Streptococcus*).

* **Độc kết quả:**

- Phản ứng (+): tạo màu đen trên môi trường quanh khuẩn lạc vi khuẩn.

- Phản ứng (-) (chỉ được kết luận sau 72 giờ ủ): không tạo màu đen trên môi trường.

* **Ứng dụng:** dùng để phân biệt *Streptococcus* nhóm D (+) với các *Streptococcus* không thuộc nhóm D, *E. coli* (-) với *Klebsiella serratia* (+).

VI. THÀNH PHẦN VÀ CÁCH PHA MỘT SỐ LOẠI MÔI TRƯỜNG

1. Môi trường MR-VP (môi trường Clark Club)

- Thành phần (g/l)

Peptone	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Dextrose	5 g

- Cách pha: đun tan các chất trên trong 1000 ml nước cất, chỉnh pH 7,5, phân phối vào các ống nghiệm đường kính cỡ 16 mm, mỗi ống khoảng 4 ml, hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút.

2. Môi trường Simmons citrate agar

- Thành phần (g/l)

NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g	K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g	Natri citrate	2 g
MgSO ₄	0,2 g	Bromothymol blue	0,08 g
Agar	12,5 g		

- Cách pha: đun tan các chất trên trong 1000 ml nước cất, điều chỉnh pH 6,6, phân phối vào các ống nghiệm, hấp khử trùng 121°C trong 15 phút, làm thạch nghiêng.

3. Môi trường KIA (Kligler Iron Agar)

- Thành phần (g/l)

Cao thịt	3 g
Cao nấm men	3 g
Peptone	15 g
Proteose peptone	5 g
NaCl	5 g
Lactose	10 g
Glucose	1 g
Ferrous sulfate	0,2 g
Sodium thiosulfate	0,3 g
Dung dịch methyl red 0,5%	0,6 ml
Agar	12 g

- Cách pha: hòa các chất trên trong 1000 ml nước cất, đun sôi để hòa tan hoàn toàn, điều chỉnh pH 7,4, phân phối vào các ống nghiệm, hấp khử trùng 121°C trong 15 phút, làm thạch nghiêng sâu (thể tích phần đáy gấp đôi thể tích phần nghiêng).

4. Môi trường MIU (Motility Indol Urea)

- Thành phần (g/l)

Tryptone	30 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaCl	5 g
Phenol red 1%	2,5 ml
Agar	4 g (thạch mềm)

- Cách pha: đun tan các chất trên trong 1000 ml nước cất, hấp khử trùng 121°C trong 15 phút. Dùng nước cất pha dung dịch urea 20%, khử trùng bằng bộ lọc vi khuẩn. Thêm dung dịch urea vào môi trường thạch để nguội khoảng 45°C theo tỉ lệ 1 : 9. Phân phối môi trường vào các ống nghiệm vô trùng, mỗi ống 5 ml và để thẳng đứng (làm thạch đứng).

5. Huyết tương dùng thử phản ứng ngưng kết

Hòa tan 10 g sodium citrate vào nước cất để có dung dịch 10%. Mỗi 100 ml máu cần 3 ml dung dịch citrate. Cho dung dịch citrate vào trong ống nghiệm có nắp, khử trùng bằng autoclave. Dùng xylanh vô trùng hút máu thỏ (đang đói) cho vào ống nghiệm, lắc nhẹ để trộn đều cho máu không đông. Quay ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút. Lấy phần dịch trong ở trên, đó chính là huyết tương. Phân phối vào trong các ống nghiệm vô trùng, bảo quản trong tủ lạnh.

6. Bile Esculin Medium

Peptone	5 g
Oxgall (Bile)	40 g
Feriric citrate	0,5 g
Beef extract	3 g
Esculine	1 g
Agar	15 g
Nước cất	1000 ml

7. KCN broth

Peptone	3 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	0,225 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,64 g
Nước cất	1000 ml

Khử trùng 121°C trong 15 phút, để nguội 45°C. Cứ 100 ml môi trường cho thêm 1,5 ml dung dịch KCN 0,5%. Phân phối vào ống nghiệm trong điều kiện vô trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Ngọc Hải và Nguyễn Thị Kim Loan, 2009. *Thực hành Nghiên cứu vi sinh vật*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
2. Nguyễn Xuân Thành (chủ biên). *Giáo trình thực tập vi sinh vật*, trường ĐH Nông Nghiệp Hà Nội. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
3. Ted R. Johnson and Christine L. Case. *Laboratory Experiments in Microbiology*. An Imprint of Addison Wesley Longman.
4. *Thực hành vi sinh vật đại cương*. Trường ĐH Khoa học Tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh
5. Vương Thị Việt Hoa, 2002. *Thực tập Vi sinh đại cương*. Tủ sách Đại học Nông Lâm TP.HCM.