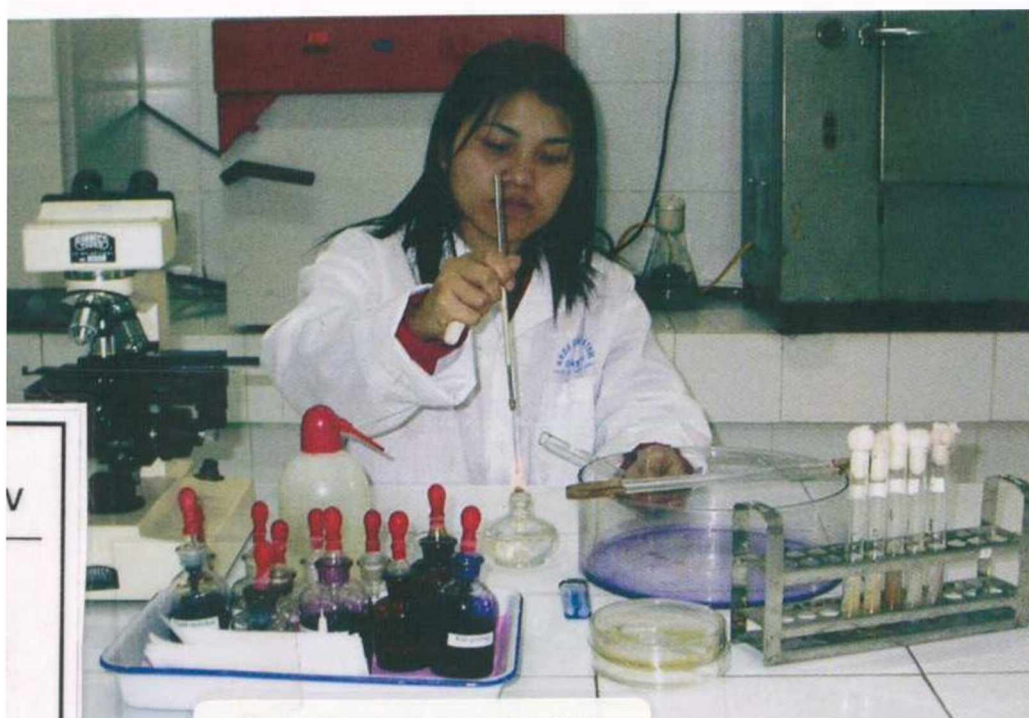


MAI THỊ HẰNG  
ĐINH THỊ KIM NHUNG  
VƯƠNG TRỌNG HÀO

# Thực hành VI SINH VẬT HỌC



DT.021719



NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC SƯ PHẠM



MÀI THỊ HẰNG  
ĐINH THỊ KIM NHUNG – VƯƠNG TRỌNG HÀO

# THỰC HÀNH VI SINH VẬT HỌC

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC SƯ PHẠM





B. Nội dung.....	86
I. Phương pháp nhuộm Gram.....	86
II. Nhuộm màng nhày .....	88
III. Nhuộm nội bào tử của vi khuẩn .....	89
IV. Nhuộm các hạt ẩn nhập .....	91
V. Hướng dẫn kiểm tra, đánh giá kết quả thí nghiệm .....	93
VI. Pha chế thuốc nhuộm, hoá chất.....	94
<b>Chương IV. NGHIÊN CỨU MỘT SỐ HOẠT TÍNH CỦA VI SINH VẬT .....</b>	<b>95</b>
<b>Bài 6. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH ENZIM VÀ CHẤT KHÁNG SINH Ở VI SINH VẬT.....</b>	<b>95</b>
A. Mục tiêu.....	95
B. Nội dung.....	95
I. Khả năng sinh enzym của vi sinh vật.....	95
II. Hoạt tính đối kháng của vi sinh vật .....	101
Phụ Lục II: CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG CHO BÀI 6 .....	106
<b>Chương V. SỰ CHUYỂN HÓA CÁC HỢP CHẤT HỮU CƠ KHÔNG CHỨA NITƠ</b>	
<b>BẰNG VI SINH VẬT.....</b>	<b>107</b>
<b>Bài 7. MỘT SỐ QUÁ TRÌNH LÊN MEN .....</b>	<b>107</b>
A. Mục tiêu.....	107
B. Nội dung.....	107
I. Xác định khả năng lên men rượu etylic .....	107
II. Xác định khả năng lên men lactic .....	110
III. Xác định khả năng "lên men" axetic.....	112
IV. Xác định khả năng lên men butyric .....	114
V. Sự phân giải xenlulôzơ .....	115
VI. Kiểm tra đánh giá kết quả.....	117
VII. Một số câu hỏi.....	117
<b>Chương VI. SỰ TUẦN HOÀN CỦA NITƠ TRONG TỰ NHIÊN NHỜ VI SINH VẬT.....</b>	<b>118</b>
<b>Bài 8. SỰ CHUYỂN HOÁ CÁC HỢP CHẤT HỮU CƠ CHỨA NITƠ.....</b>	<b>118</b>
A. Mục tiêu.....	118
B. Nội dung.....	118
I. Quá trình amôn hoá .....	118
II. Quá trình nitrat hóa .....	124
III. Quá trình phản nitrat hoá .....	127
<b>Bài 9. VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ (N<sub>2</sub>) .....</b>	<b>130</b>
A. Mục tiêu.....	130
B. Nội dung.....	130
I. Vi khuẩn cố định nitơ sống tự do .....	130
II. Vi sinh vật cố định nitơ sống cộng sinh.....	134
III. Ứng dụng .....	136
<b>HƯỚNG DẪN THỰC HIỆN VÀ ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ BÀI THỰC HÀNH CHƯƠNG VI .....</b>	<b>138</b>
<b>Phụ lục bài 7, 8, 9: PHA CHẾ THUỐC THỬ HOÁ CHẤT VÀ MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG .....</b>	<b>139</b>
<b>Tài liệu tham khảo.....</b>	<b>143</b>

## CÁC TỪ VIẾT TẮT

Kính hiển vi	:	KHV
Vi sinh vật	:	VSV
Vi khuẩn	:	VK
Môi trường	:	MT
Vi khuẩn Gram âm	:	Vi khuẩn G <sup>-</sup> hoặc VK G <sup>-</sup>
Vi khuẩn Gram dương	:	Vi khuẩn G <sup>+</sup> hoặc VK G <sup>+</sup>
Khuẩn lạc (colony forming unit)	:	KL (CFU)

## PHIÊN ÂM CÁC THUẬT NGỮ KHOA HỌC

Từ gốc	Phiên âm	Viết tắt
<i>glucose</i>	glucôzơ	
<i>lactose</i>	lactôzơ	
<i>sucrose</i>	sacarôzơ	
<i>cellulose</i>	xenlulôzơ	
<i>enzyme</i>	enzim	
<i>cellulase</i>	xenlulaza	
<i>amylase</i>	amylaza	
<i>catalase</i>	catalaza	
<i>peroxidase</i>	perôxidaza	
<i>protease</i>	prôteaza	
<i>ortho - phthalaldehyde</i>	ôctô - phtalaldehyt	OP
<i>ethylene oxide</i>	êtylen ôxit	EO
<i>isopropanol</i>	izôprôpanol	
<i>xylene</i>	xylen	
<i>toluen</i>	tôluen	
<i>ethylene</i>	etylen	
<i>glutaraldehyde</i>	glutaraldehyt	
<i>thioglycolate</i>	thiôglicôlat	







Chương trình thực hành VSV được chia làm 6 chương gồm 9 bài. Tham gia biên soạn giáo trình gồm:

TS. Mai Thị Hằng (chủ biên) biên soạn các chương 1, 2, 4

PGS.TS. Đinh Thị Kim Nhung biên soạn các chương 3 và 5

PGS.TS. Vương Trọng Hòa biên soạn chương 6

Một số hình ảnh minh họa trong giáo trình do TS. Trần Thị Thúy, bộ môn Công nghệ Sinh học – Vi sinh, trường Đại học Sư phạm Hà Nội cung cấp.

Chúng tôi rất mong nhận được sự góp ý chân thành của các đồng nghiệp và sinh viên để giáo trình được hoàn thiện hơn.

Xin chân thành cảm ơn!

**Các tác giả**

# CHƯƠNG I

## MỘT SỐ CHỈ DẪN CHUNG

### A. MỤC TIÊU

– Giới thiệu cho sinh viên những nguyên tắc cơ bản khi tiến hành thực hiện thí nghiệm tại phòng thí nghiệm VSV.

Sinh viên cần:

- Biết chuẩn bị các vật liệu, dụng cụ trong thực hành VSV.
- Nắm được nguyên tắc và cách sử dụng các dụng cụ, trang thiết bị của phòng thí nghiệm VSV trong thực hành VSV.
- Nắm được nguyên tắc và cách tiến hành các phương pháp vô trùng khi làm thí nghiệm trong phòng thí nghiệm VSV.

### B. NỘI DUNG

#### I. QUY ĐỊNH TRONG KHI THỰC HÀNH VI SINH VẬT HỌC

1. Tuyệt đối không: nói chuyện, hút thuốc, ăn uống, trang điểm trong phòng thí nghiệm. Đầu tóc phải buộc gọn gàng, tránh lây nhiễm sang các thí nghiệm và tránh gây cháy.

2. Cần mặc áo khoác blu khi làm thí nghiệm VSV để tránh dây VSV, hoá chất và thuốc nhuộm vào quần áo. Tốt nhất, các áo khoác này phải được giặt và khử trùng sau khi làm thí nghiệm VSV.

3. Cần thu dọn, lau sạch bề bàn làm việc trước và sau khi làm việc. Lau mặt bàn bằng các chất khử trùng như 5% phenol hoặc 1% cloramin hay cồn 70%.

4. Cần đeo găng tay cao su khi làm việc với các chất nhuộm màu, máu và các sản phẩm máu (ví dụ: dịch huyết tương, huyết thanh, kháng huyết thanh hoặc máu).

5. Khi phải dùng đến pipet hút dịch VSV, phải dùng ống bóp chuyên dụng để hút dịch nghiên cứu, không được hút bằng miệng.

6. Các thí nghiệm có các hóa chất độc hại hoặc khi cần đun nóng để nhuộm tế bào phải tiến hành trong các tủ hút khí độc

7. Không được đem theo bất cứ loại hóa chất và VSV nào từ phòng thí nghiệm đi nơi khác sau khi rời phòng làm việc.





– Các dụng cụ khác: Bình đựng nước có vòi phun, ống nghiệm, đĩa Petri (hộp lòng), bình cầu, bình nón (bình tam giác), que cấy (có thể sử dụng que cấy vòng, que cấy móc hoặc que cấy hình kim), que trang (que gạt) bằng thủy tinh, bông, dầu bách hương (dầu set) hoặc dầu khoáng (mineral oil), giấy hoặc máy đo pH,... là những thứ cần thiết cho tất cả các bài thực hành VSV.

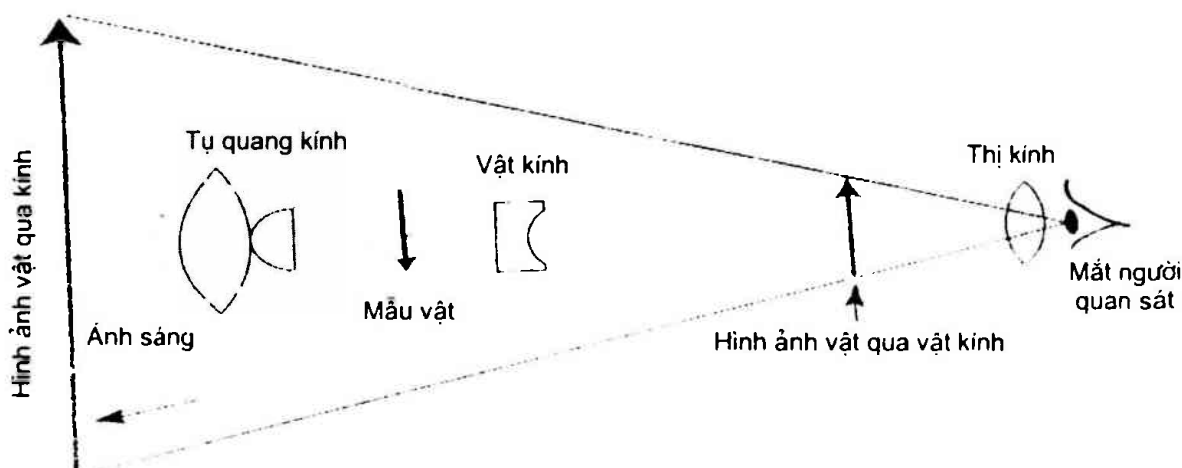
**2.3. Các hoá chất, các loại thuốc nhuộm, môi trường:** Danh lục và cách pha chế các hoá chất, thuốc nhuộm và môi trường cho từng bài thí nghiệm được trình bày cụ thể ở phần phụ lục của từng bài.

### III. KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC VÀ CÁCH SỬ DỤNG

Vì VSV quá nhỏ bé, không thể thấy bằng mắt thường nên để quan sát được chúng người ta sử dụng nhiều loại KHV khác nhau. Ở đây chỉ xin giới thiệu sơ bộ về KHV quang học được dùng cho các bài thực hành VSV này. Cấu trúc và cách sử dụng các loại KHV khác (KHV đối pha, KHV nền đen, KHV huỳnh quang, KHV giao thoa và KHV điện tử) có thể tham khảo ở giáo trình “Vi Sinh Vật học” của Nguyễn Thành Đạt (2005); “Microbiology, 6 edition” của John Prescott Harley (2007).

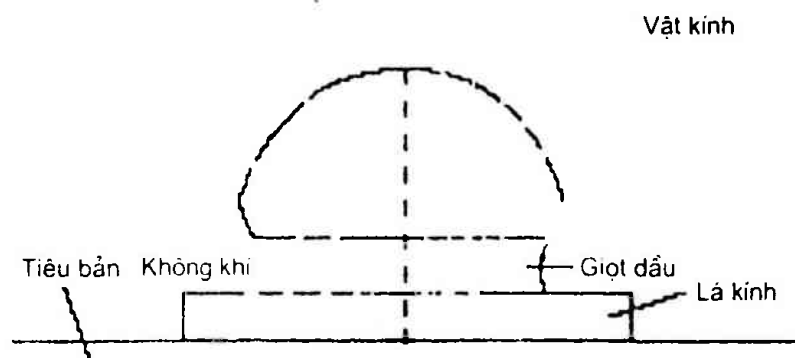
**3.1. Cấu tạo:** KHV quang học gồm có giá kính và hệ thống quang học. Giá kính gồm chân kính, trụ mang ống kính, bàn kính, ống kính, các ốc điều chỉnh sơ cấp (ốc thô) và thứ cấp (ốc tinh). Hệ thống quang học gồm thị kính, vật kính, tụ quang kính, hệ thống đèn chiếu sáng hoặc gương phản quang (hình 1.5).

Nguồn ánh sáng (thường là 450nm) và tụ quang kính nằm phía dưới bàn kính. Ánh sáng từ nguồn sáng được hội tụ nhờ tụ quang kính thành chùm xuyên qua lỗ bàn kính đến tiêu bản đặt trên bàn kính, các thấu kính rồi đến mắt người quan sát (hình 1.2). Tụ quang kính thường có màn chắn sáng, dùng để điều chỉnh cường độ sáng.



Hình 1.2. Hình ảnh của mẫu vật được phóng đại dưới kính hiển vi quang học

Khi ánh sáng đi qua các vật chất khác nhau (thủy tinh, không khí...) sẽ bị khúc xạ, gọi là hiện tượng tán xạ. Độ tán xạ là khả năng của vật chất làm ánh sáng bị khúc xạ. Khả năng tán xạ của các chất khác nhau là khác nhau. Trong KHV, khi ánh sáng xuyên qua tiêu bản là thủy tinh để đi đến vật kính, ánh sáng sẽ bị tán xạ bởi khoảng không khí giữa vật kính và tiêu bản. Sự tán xạ này làm cho hình ảnh vật thể bị méo đi ít hay nhiều phụ thuộc vào độ phóng đại của vật kính. Độ tán xạ của kính nhỏ khi ta sử dụng các vật kính có bội giác nhỏ hơn  $\times 40$ , nhưng lớn hơn rất nhiều khi sử dụng các vật kính bội giác lớn (lớn hơn  $\times 40$ ), dẫn đến hình ảnh các vật thể sẽ mờ. Vì thế, giải pháp cho vấn đề này là nhỏ các giọt dầu lên tiêu bản. Dầu có độ khúc xạ ánh sáng gần giống với thủy tinh nên ánh sáng được hội tụ, không bị khúc xạ nhiều trong khoảng không khí giữa vật kính và tiêu bản (hình 1.3).



Hình 1.3 Ảnh hưởng của giọt dầu lên chùm ánh sáng đi vào KHV:  
Phía bên trái là không có giọt dầu, bên phải có giọt dầu

Độ phóng đại của KHV được hiểu là khả năng phóng đại kích thước của vật thể lên  $n$  lần nhờ các thấu kính (vật kính và thị kính).

Thị kính thường có hệ số phóng đại  $\times 10$  hoặc  $\times 15$ .

Các vật kính sử dụng trong KHV quang học thường có hệ số phóng đại  $\times 4$ ,  $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 60$ ,  $\times 90$ ,  $\times 100$ .

Hệ số phóng đại của KHV quang học được tính như sau:

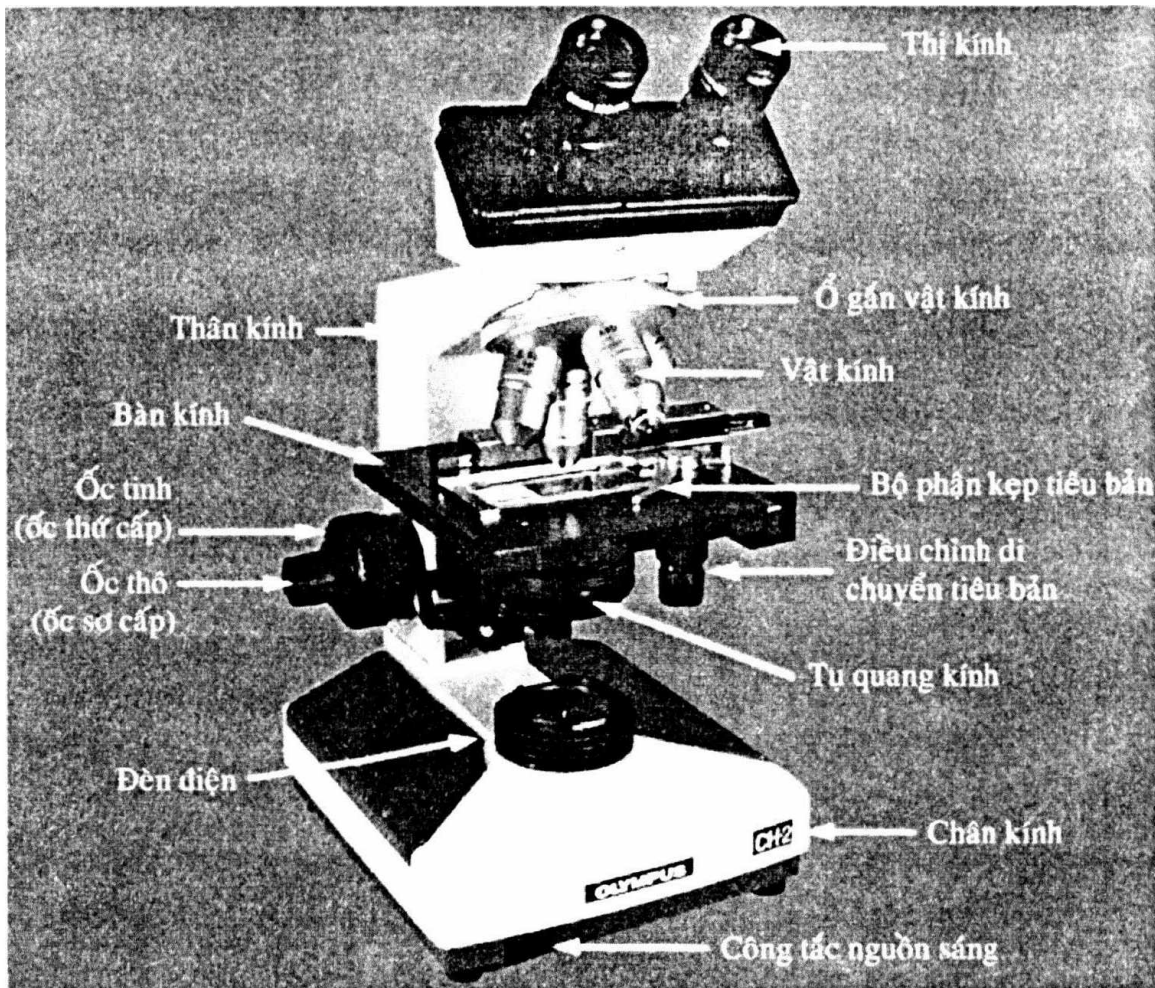
**Hệ số phóng đại của kính = Hệ số phóng đại của vật kính  $\times$  hệ số phóng đại thị kính.**

Ví dụ: Thị kính  $\times 15$ , vật kính là  $\times 100$  thì hệ số phóng đại của KHV là  $\times 1500$ . Đây là độ phóng đại tốt nhất mà KHV quang học có thể đạt được, ở độ phóng đại cao hơn vật thể không còn được rõ nét nữa.









Hình 1.5. Cấu tạo ngoài của KHV quang học thông thường (Olimpus CH2)

### 3.3. Cách sử dụng kính hiển vi

Ảnh thu được rõ hay không phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó có nguồn sáng. Nguồn sáng có thể là ánh sáng tự nhiên (dùng gương phản xạ), hoặc nguồn ánh sáng điện (KHV điện). Khi đã có nguồn sáng tốt có thể xem tiêu bản.

**3.3.1. Xem tiêu bản ở hệ kính khô:** là khi quan sát tiêu bản chỉ sử dụng vật kính có hệ số phóng đại  $\leq \times 60$ .

Hạ thấp bàn kính, xoay mâm vật kính về vị trí  $\times 4$ , hoặc  $\times 10$ . Đặt tiêu bản lên bàn kính, chỉnh về vị trí cần quan sát và hạ thấp vật kính cho gần sát vào tiêu bản. Quan sát qua thị kính và dùng ốc thô để từ từ nâng vật kính lên cho tới khi nhìn thấy vùng VSV cần quan sát trên tiêu bản.

– Khi đã xác định được vị trí cần xem, đổi vật kính sang bội giác lớn hơn ( $\times 40$ ,  $\times 60$ ), sau đó điều chỉnh bằng ốc thứ cấp để thấy rõ hình ảnh VSV.

### 3.3.2. Xem tiêu bản ở hệ kính dầu ( $\times 90$ , $\times 100$ )

– Sử dụng vật kính ít nhất  $\times 60$  (thường sử dụng vật kính  $\times 90$ , hoặc  $\times 100$ ) tức là khi cần độ phóng đại lớn mới dùng hệ kính dầu. Khi sử dụng vật kính dầu, trước hết phải nhỏ một giọt dầu khoáng lên tiêu bản, sau đó đầu của vật kính phải được nhúng chìm vào trong giọt dầu để giảm sự tán sắc của ánh sáng khi đi qua phiến kính – lá kính để vào vật kính.

– Đầu tiên cũng dùng vật kính có bội giác nhỏ để xác định vị trí cần tìm trên tiêu bản như phân trên. Sau đó nhỏ một giọt dầu lên tiêu bản.

– Đổi vật kính sang bội giác lớn ( $\times 90$ , hoặc  $\times 100$ ), nhúng đầu vật kính chìm vào giọt dầu. Khẽ điều chỉnh ốc vi cấp để tìm thấy hình ảnh của VSV khi vật kính vẫn chìm trong giọt dầu.

Để tăng hoặc giảm cường độ của ánh sáng đi vào vật kính có thể điều chỉnh màng chắn sáng trên kính tụ quang kính.

## IV. XỬ LÝ CÁC DỤNG CỤ THÍ NGHIỆM

### 4.1. Các dụng cụ thủy tinh

– Các dụng cụ còn mới: đem đun sôi trong nước xà phòng, sau đó rửa sạch nhiều lần bằng nước, tráng lại bằng nước cất, sau đó để khô rồi đem sử dụng.

– Các phiến kính, lá kính và các dụng cụ bản đã qua sử dụng cần đun trong nước xà phòng, sau đó cọ sạch và ngâm vào hỗn hợp  $K_2Cr_2O_7$  với  $H_2SO_4$  (100g  $H_2SO_4$  đặc, 50g  $K_2Cr_2O_7$  và 1 lít nước) hoặc dung dịch gồm 9 phần axit sulphuric đậm đặc – 1 phần dung dịch  $K_2Cr_2O_7$  (gồm 20g  $K_2Cr_2O_7$  trong 200ml nước cất) ít nhất 2 giờ. Sau khi ngâm rửa sạch bằng nước đem đun trong dịch 1% soda ( $NaHCO_3$ ). Đun xong rửa sạch bằng nước, sau đó tráng lại bằng nước cất rồi để khô tự nhiên hay sấy khô trong tủ sấy ở  $60^\circ C$ .

### 4.2. Các dụng cụ bằng kim loại, nhựa hay gỗ

– Phải rửa sạch.

– Có thể khử trùng bằng phenol 5% (hoặc cồn 70%), hay hấp ở nồi áp lực, sau đó sấy khô trong tủ sấy ở  $50 - 60^\circ C$  hoặc để khô tự nhiên.

## V. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG

### 5.1. Khử trùng bằng nhiệt

Khả năng khử trùng của nhiệt rất mạnh (xem bảng 1.1).

**Bảng 1.1. Khả năng tiệt trùng bằng sức nóng ướt**

<b>Vi sinh vật</b>	<b>Tế bào dinh dưỡng</b>	<b>Bào tử</b>
Nấm men	5 phút ở 50 – 60°C	5 phút ở 70 – 80°C
Nấm mốc	30 phút ở 62°C	30 phút ở 80°C
Vi khuẩn	10 phút ở 60 – 70°C	20 – 80 phút ở 121°C
Virus: 30 phút ở 60°C hoặc 0,5 – 12 phút ở 121°C		
Prions: 30 phút ở 134°C		

### **5.1.1. Khử trùng bằng sức nóng ướt**

a) *Phương pháp đun sôi trực tiếp trong nước*: khi đun sôi trong nước 10 – 20 phút có thể diệt hết các tế bào dinh dưỡng của VSV kể cả virus và các bào tử không chịu nhiệt của nấm, một số bào tử của vi khuẩn. Tuy nhiên, hầu hết các bào tử chịu nhiệt của vi khuẩn và prion không diệt được bằng đun sôi. Phương pháp này thường sử dụng để tiệt trùng các dụng cụ kim loại (kim tiêm, xi lanh,...), thức ăn và đồ uống.

b) *Phương pháp khử trùng Paxto*: Đa số các tế bào dinh dưỡng của VSV bị chết khi đun ở nhiệt độ từ 60 – 80°C trong 15 – 20 phút. Bởi vậy người ta có thể khử trùng ở 60°C trong 30 phút, hay ở 70°C trong 15 phút hoặc 80°C trong 10 phút. Phương pháp khử trùng này áp dụng cho môi trường có chứa các chất dễ bị biến chất dưới tác động của nhiệt độ (ví dụ: bia, sữa, rượu vang, dấm ăn...).

Sữa có thể được khử trùng Paxto theo hai cách: (i) khử trùng ở nhiệt độ thấp: đun nóng sữa ở 63°C trong 30 phút và (ii) khử trùng ở nhiệt độ cao: đun nóng sữa ở 71,7°C trong 15 giây, hoặc 88,3°C trong 1 giây (phương pháp khử trùng ở nhiệt độ cao trong thời gian ngắn).

Cách tiến hành: Trong công nghiệp, người ta đưa vật liệu đựng trong các bình chứa đã vô trùng vào nồi hấp ở 63°C trong 30 phút.

Trong đời sống hàng ngày, chúng ta có thể rửa vật liệu cần thanh trùng vào các dụng cụ sạch đã vô trùng bằng đun sôi 15 phút, sau đó đặt vào nồi nước ở 63°C – 65°C trong 30 phút.

#### *c) Phương pháp khử trùng Tyndal (Phương pháp hấp gián đoạn)*

Nguyên lý của phương pháp khử trùng Tyndal là tế bào dinh dưỡng của các vi khuẩn sinh bào tử sẽ bị chết sau khi đã bị xử lý bằng phương pháp đun sôi, các bào tử còn sót lại được ủ thêm một thời gian để chúng nảy mầm thành các tế bào dinh dưỡng, sau đó tiếp tục đun sôi để diệt các tế bào dinh dưỡng vừa được nảy mầm từ các bào tử chịu nhiệt này.

*Cách tiến hành:* Chất cần khử trùng được đun sôi (thường dùng nồi hấp Arnol hoặc Kock) 20 phút, sau đó được giữ ở 37°C trong 24 giờ. Lặp lại quy trình này 3 lần ta sẽ có môi trường vô trùng. Phương pháp này không diệt được các prion, thường dùng để khử trùng các môi trường nuôi cấy ở những nơi không có điều kiện sử dụng nồi hấp cao áp.

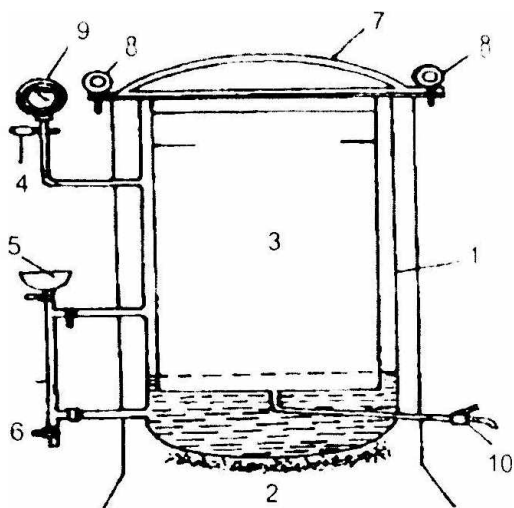
*d) Khử trùng bằng nồi hấp cao áp (Autoclave)*

– Nguyên tắc của phương pháp khử trùng bằng nồi cao áp là sự kết hợp giữa tác động của áp lực và nhiệt độ cao để tiêu diệt VSV (kể cả các nội bào tử chịu nhiệt của vi khuẩn). Trong nồi hấp cao áp, môi trường bị làm nóng bằng hơi nước bão hoà khi nhiệt độ sôi lớn hơn 100°C, tạo ra áp suất lớn hơn so với áp suất không khí. Thường khử trùng các chất ở 121°C, 1atm trong 15 – 20 phút. Nhưng khi khử trùng một lượng lớn các chất thì thời gian cần kéo dài hơn để phần giữa của vật liệu cũng đạt được nhiệt độ và áp suất này. Ví dụ, khi khử trùng 5 lít môi trường lỏng phải kéo dài đến 7 giờ. Prion bị chết khi khử trùng ở 134°C, 2 atm, trong 30 phút.

– Cấu trúc của nồi hấp cao áp:

Nồi hấp cao áp có nhiều mẫu khác nhau song về mặt nguyên tắc chúng được làm bằng kim loại có cấu trúc hai lớp vỏ tạo thành hai khoang riêng (Hình 1.7).

Phần đáy khoang ngoài là nơi chứa nước (1) có bộ phận đun nóng để tạo hơi nước bão hoà trong nồi (2). Khoang bên trong (3) là nơi để các vật liệu cần thanh trùng, có lỗ thông với khoang ngoài để cho hơi nước lưu thông giữa hai khoang. Trên thùng có gắn van bảo hiểm (4) để điều chỉnh áp suất khỏi vượt quá mức cần thiết. Phía gần đáy thùng có gắn bộ phận đưa nước vào (5) và thải nước ra (6) khi cần thiết. Nồi được đậy và khoá kín bằng nắp (7) với các khóa xung quanh đối xứng từng đôi một (8). Nồi được đậy và khoá kín bằng nắp (7) với các khóa xung quanh đối xứng từng đôi một (8).



Hình 1.7 Sơ đồ chung của nồi hấp cao áp

1. Khoang ngoài chứa nước của nồi cao áp
2. Bộ phận đun nóng
3. Khoang khử trùng (nơi đặt các vật liệu cần khử trùng)
4. Van bảo hiểm điều chỉnh ổn định áp suất
5. Bộ phận đưa nước vào nồi
6. Bộ phận thải nước ra
7. Nắp nồi
8. Các khóa nối đối xứng từng đôi một
9. Đồng hồ áp lực
10. Van xả hơi nước

\* *Cách sử dụng:*

- Đổ nước vào nồi cao áp đến đúng mức quy định
- Xếp vật liệu cần khử trùng vào khoang khử trùng (xếp ngay ngắn, cẩn thận, không quá dày hoặc quá chặt để hơi nước lưu thông phân bố đều trên các vật liệu khử trùng).
- Đóng nắp nồi hấp, vặn chặt từng đôi khoá đối xứng nhau trên nắp nồi.
- Cắm điện nguồn.
- Đặt áp suất ở mức cần thiết.
- Đặt thời gian khử trùng theo ý muốn nhờ hệ thống định giờ trên nồi.
- Bật công tắc trên nồi cao áp để tiến hành khử trùng.
- Khi kim đồng hồ áp kế chỉ khoảng 0,2 atm, dùng van xả hết hơi nước cho đến khi kim đồng hồ áp kế trở về số 0 (để loại hết không khí còn sót lại trong nồi).
- Đóng van lại và đưa áp suất đến mức cần thiết, giữ đủ thời gian theo yêu cầu.
- Khi còi báo thời gian khử trùng kết thúc, đợi kim đồng hồ áp kế hạ xuống số 0 khoảng 5 – 7 phút mới mở nồi lấy vật liệu hấp ra. Nếu cần lấy dùng gấp, chỉnh van xả để từ từ giải phóng hơi nước. Nếu xả nhanh, áp suất trong nồi sẽ đột ngột giảm, làm bật nút và chất lỏng chứa trong các bình (do chênh lệch áp suất trong nồi với áp suất chất lỏng trong các bình nút kín).
- Rút phích điện nguồn.

\* *Lưu ý:*

- Cách vận hành có thể có đôi chỗ khác nhau tùy vào mẫu của hãng sản xuất (cần đọc kỹ hướng dẫn của hãng sản xuất).
- Giữa áp suất và nhiệt độ tạo ra trong nồi có mối tương quan nhất định (bảng 1.2).

**Bảng 1.2. Quan hệ giữa áp suất và nhiệt độ trong nồi hấp cao áp**

Chỉ số trên áp kế	0	0.2	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.5	2.0	3.0
Nhiệt độ (°C)	100	105	110	114	116	117	119	121	127	134	145

- Các môi trường với độ pH thấp (< 5,0) khi khử trùng xong không có khả năng tạo gel, còn nếu pH > 8,0 sẽ dễ làm caramel hoá các loại đường. Bởi vậy, khi

các môi trường có pH kiềm hay axit thì khi khử trùng phải để ở pH trung tính, chỉ điều chỉnh pH sau khi môi trường đã khử trùng.

– Sau khi khử trùng cần để môi trường vào tủ ấm ở 24 – 48 giờ để kiểm tra độ vô trùng.

### **5.1.2. Phương pháp khử trùng bằng sức nóng khô**

*a) Khử trùng bằng sức nóng của ngọn lửa (thường dùng đèn cồn hoặc đèn khí gas):* áp dụng để khử trùng que cấy, que trang, các dụng cụ bằng sắt (kẹp, dao, kéo...).

*b) Khử trùng bằng khí nóng khô trong tủ sấy:* Nguyên lí là dùng khí nóng để diệt các tế bào. Khả năng diệt trùng của khí nóng khô không mạnh bằng khí nóng ướt, vì thế cần nhiệt độ cao hơn và thời gian lâu hơn diệt trùng bằng khí nóng ướt. Thiết bị tạo khí nóng là tủ sấy. Phương pháp này dùng để diệt trùng các vật liệu và dụng cụ khô, chịu nhiệt (thủy tinh, sắt, giấy...), không sử dụng để khử trùng chất lỏng.

Cách tiến hành:

– Đặt các dụng cụ cần khử trùng vào tủ sấy. Trước khi đem khử trùng các dụng cụ (đĩa Petri, que trang, ống nghiệm...) phải được bọc bằng giấy chịu nhiệt, hoặc đựng trong hộp kim loại kín, ống nghiệm được nút bằng bông.

– Đặt thời gian và nhiệt độ khử trùng theo ý muốn

Khử trùng trong tủ sấy thường ở 160 – 180°C trong 2 giờ. Với nhiệt độ này tất cả VSV đều bị tiêu diệt (kể cả bào tử chịu nhiệt). Nếu cần khử trùng nhanh các vật liệu thì sấy ở 190°C – 200°C trong 6 phút đối với vật liệu không bao gói và 12 phút với vật liệu bao gói.

– Sau khi khử trùng kết thúc, để nguội đèn 60°C mới lấy dụng cụ ra để tránh vỡ các đồ thủy tinh do chênh lệch nhiệt độ đột ngột.

## **5.2. Khử trùng không bằng nhiệt**

### **5.2.1. Khử trùng bằng phễu lọc vi khuẩn**

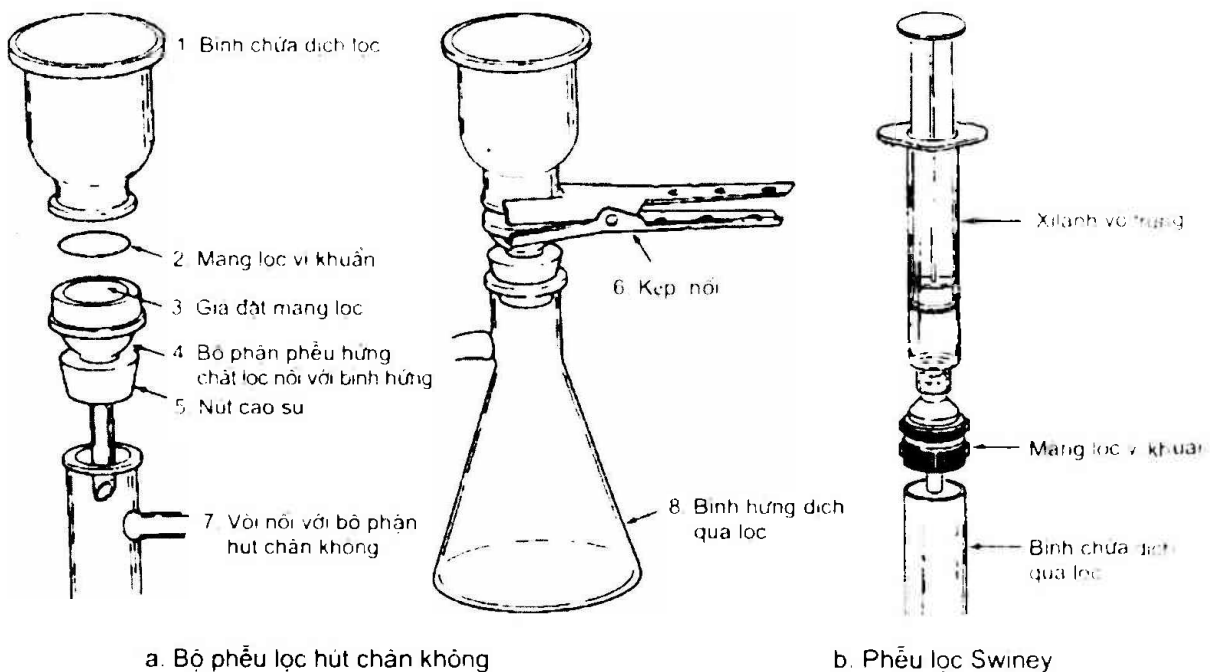
Các chất dễ bị nhiệt độ phá hủy như vitamin, huyết thanh, kháng sinh, enzym, axit nucleic... được khử trùng bằng phễu lọc. Nguyên lí của phương pháp này là các VSV hầu hết không đi qua được màng lọc có các lỗ kích thước nhỏ hơn 0,2µm. Hình 1.8a là cấu trúc của bộ phễu lọc.

Bộ phận phễu lọc bao gồm bình chứa dịch lọc (1) và phần phễu lọc bao gồm giá đặt màng lọc (3), phễu hứng (4) và nút cao su (5).

Bình chứa và phễu lọc được nối với nhau bằng một kẹp kim loại (6). Mỗi lần dùng người ta đặt một màng lọc (2) làm bằng xenlulôzơ hay poliacacbonat có các lỗ kích thước 0,45 $\mu$ m (hoặc 0,2 $\mu$ m) giữa hai bộ phận này (Màng lọc chỉ dùng được một lần).

Phễu lọc được gắn với bình hứng dịch qua lọc vô trùng (6) có vòi (7) nối với bộ phận hút chân không (xem hình 1.9).

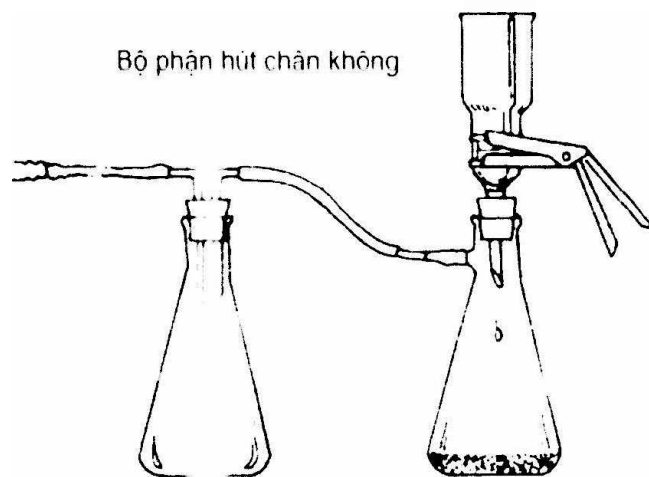
Khi cần khử trùng một lượng nhỏ các chất người ta dùng phễu lọc Swiney (hình 1.8b).



Hình 1.8. Khử trùng bằng phễu lọc vi khuẩn

**Cách tiến hành:**

Lắp ráp bộ lọc theo hình 1.8a, nối bình hứng với thiết bị hút chân không, đổ dịch cần lọc vào bình chứa, mở máy hút chân không để dịch lọc chảy xuống bình chứa. Đậy bình dịch đã qua lọc bằng nút đã vô trùng.



Hình 1.9. Lắp ráp bộ phễu lọc

### 5.2.2. Khử trùng bằng phương pháp hoá học

Một số hoá chất có khả năng diệt VSV được sử dụng để bảo quản và khử trùng các nguyên vật liệu, phòng thí nghiệm và bệnh viện, ví dụ: ethylen oxit, ozôn, clorin, axit benzoic, glutaraldehyt, fommaldehyt, hydrogên perôxít...

a) *Ethylen oxit* (EO hay EtO) là khí dùng để khử trùng các vật liệu mẫn cảm với nhiệt độ cao hơn 60°C (nhựa, phim ảnh...). Phương pháp này thường được tiến hành ở 30°C – 60°C với độ ẩm cao hơn 30% và nồng độ khí là 200 – 800 mg/l trong ít nhất 3 giờ. EO có khả năng thấm sâu vào các loại giấy, vải và các loại phim ảnh nên hiệu quả diệt trùng cao. Nhược điểm của phương pháp này là EO rất dễ cháy, thời gian khử trùng dài hơn các phương pháp khác và còn cần một giai đoạn khử độc sau khử trùng. Tuy nhiên, EO vẫn được sử dụng nhiều trong thực tế (chiếm 70% trong số các phương pháp khử trùng), 50% các dụng cụ y tế được khử trùng bằng EO.

b) *Ôzôn* được sử dụng ở quy mô công nghiệp để khử trùng nước, không khí và khử trùng bề mặt. Ôzôn có khả năng oxi hóa hầu hết các vật liệu hữu cơ. Tuy nhiên, đây là loại khí độc hại và không bền vững, vì vậy ít được áp dụng rộng rãi trong thực tiễn.

c) *Clorin*: là chất tẩy trắng, chứa 5,25% hypoclorit natri, thường được pha loãng 10 lần trước khi sử dụng (để diệt *Mycobacterium tuberculosis* pha loãng 2 lần). Dịch này có thể làm chết ngay các VSV, nhưng triệt để nhất là sau 20 phút. Tuy nhiên, một số loại bào tử chịu nhiệt vẫn có thể sống sót. Clorin có tính ăn mòn mạnh các dụng cụ kim loại kể cả các dụng cụ là thép không gỉ.

d) *Glutaraldehyt* và *fommaldehyt*. Đây là những chất bay hơi. Glutaraldehyt đắt và độc, còn fommaldehyt cũng độc cho da và hô hấp, nhưng rẻ hơn. Nếu khử trùng chất lỏng mất khoảng 12 giờ, còn khử trùng các chất rắn cần thời gian dài hơn.

e) *Ortho – phthalaldehyt* (OPA). Đây là chất được Cơ quan quản lý dược và thực phẩm Mỹ (FDA) cho phép sử dụng để khử trùng thực phẩm và dược phẩm. OPA có khả năng diệt vi khuẩn lao mạnh hơn glutaraldehyt và có thể diệt được các loại bào tử không mẫn cảm với glutaraldehyt. Thường dùng dung dịch 0,55% OPA. Khả năng diệt trùng của OPA nhanh hơn và không gây dị ứng da, nhưng đắt hơn và làm các protein có màu nâu.

f) *Hydrogên perôxít* ( $H_2O_2$ ). Đây là loại chất khử trùng tốt, không độc và không để lại chất dẫn xuất độc hại sau khi khử trùng. Thường dùng ở nồng độ 3%.



\* *Lưu ý:* Khi sử dụng hóa chất cần lưu ý tới nồng độ thích hợp của các chất để không ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Ví dụ, bảo quản thức ăn bằng 0,03% axit bezoic, bảo quản hạt giống bằng 0,1% canxihipoclorit từ 5 – 10 phút, hay lau sàn nhà, chỗ làm việc, bàn ghế trong phòng bằng dung dịch cloramin 0,5 – 3%, nước phenol 5%, cồn 70% hoặc cồn 70% kết hợp với 10% izôprôpanol.

### 5.3. Khử trùng bằng các tia xạ (Radiation sterilization)

Các tia xạ được dùng để khử trùng như chùm electron (electron beam), tia X, tia gamma, tia cực tím...

Tia gamma có tính xuyên thấu mạnh, thường được sử dụng khử trùng các vật liệu và dụng cụ y tế. Phương pháp này cần có chất phóng xạ (thường là Cobalt - 60) phân rã liên tục để tạo ra tia gamma và cần được đặt vào nơi đặc biệt để bảo đảm an toàn khi sử dụng tia này.

Tia X có tính xuyên thấu kém hơn tia gamma nên cần thời gian lâu hơn để khử trùng, nhưng không cần nơi chứa và được sinh ra bởi máy phát tia X có thể kiểm soát được khi cần dùng. Mặc dù tia X và tia gamma là các tia xạ, nhưng các vật liệu sẽ không bị nhiễm xạ khi được khử trùng bằng các tia này.

Tia UV (từ đèn tử ngoại) chỉ có thể khử trùng bề mặt một số các chất có tính xuyên sáng cao. Rất nhiều các vật liệu cho ánh sáng nhìn thấy đi qua có thể hấp thụ tia UV. Thường sử dụng các tia UV có bước sóng 130 – 400Å<sup>0</sup>. Tia UV thường được sử dụng để vô trùng phòng hoặc buồng thao tác cấy vi sinh vật, khử trùng nước.

Trong đời sống hàng ngày, con người sử dụng ánh nắng mặt trời có chứa các tia sóng ngắn để tiệt trùng các dụng cụ gia đình (chăn màn, quần áo, bát đĩa, ...) hay hạt giống (hạt ngô, thóc và các loại hạt khác...).

## CHƯƠNG II

# MÔI TRƯỜNG, PHÂN LẬP, NUÔI CẤY VI SINH VẬT

## Bài 1. CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG CHO PHÂN LẬP VÀ NUÔI CẤY VI SINH VẬT

### A. MỤC TIÊU

Sau khi học xong bài này sinh viên phải

- Củng cố và nâng cao kiến thức về các loại môi trường dinh dưỡng dành cho vi sinh vật.
- Pha chế được một số môi trường thông dụng để nuôi cấy các loại vi sinh vật.
- Nắm được một số phương pháp khử trùng các môi trường dinh dưỡng.

### B. NỘI DUNG

#### I. MỘT SỐ KHÁI NIỆM CƠ BẢN VỀ MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG

Môi trường dinh dưỡng gồm các chất dinh dưỡng và các yếu tố vật lí cần thiết cho sự sinh trưởng của VSV.

##### 1.1. Yêu cầu của môi trường dinh dưỡng

- Phải đảm bảo đầy đủ chất dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng của VSV (nguồn cacbon, nitơ, các chất khoáng, các chất sinh trưởng...).
- Phải có độ pH thích hợp cho mỗi loại VSV.
- Phải có độ nhớt nhất định và thế oxi hoá khử thích hợp.
- Phải hoàn toàn vô trùng, không lẫn các chất độc đối với VSV.

##### 1.2. Phân loại môi trường dinh dưỡng

Người ta có thể phân loại môi trường theo nhiều cách, dưới đây là một số cách phân loại cơ bản.

###### 1.2.1. Phân loại dựa vào thành phần chất dinh dưỡng của môi trường

1.2.1.1. *Môi trường tự nhiên* (môi trường phức tạp – complex media): Thành phần bao gồm các chất có nguồn gốc thiên nhiên (các tế bào hay mô động vật, mô thực vật hoặc VSV), hoặc các sản phẩm thủy phân của các chất đó bằng axit hay enzym

(ví dụ: pepton hay trypton là sản phẩm thủy phân các protein động vật, hay casein là sản phẩm thủy phân của casein...). Vì thế, thành phần chính xác của môi trường này hầu như không xác định được. Các chất phức tạp này cung cấp khá đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho VSV như nguồn cacbon, nitơ, các chất khoáng cần thiết và các chất kích thích sinh trưởng).

*1.2.1.2. Môi trường hóa tổng hợp (Chemical defined media):* Thành phần gồm các chất hoá học xác định, tinh khiết, được lấy với số lượng hoặc nồng độ cho trước.

*1.2.1.3. Môi trường bán tổng hợp:* Là môi trường trung gian giữa môi trường hóa tổng hợp và môi trường tự nhiên.

### **1.2.2. Phân loại dựa vào trạng thái vật lý của môi trường**

*1.2.2.1. Môi trường dịch thể (lỏng):* thành phần chỉ có các chất dinh dưỡng và nước.

*1.2.2.2. Môi trường đặc (hay rắn):* là môi trường dịch thể được bổ sung chất làm cứng môi trường. Các chất làm cứng môi trường không phải là chất dinh dưỡng đối với VSV. Các chất này có thể là gelatin (12 – 15%), hoặc 1,5 – 2% thạch (agar – agar) hay silicagel. Thạch được thu nhận từ tảo biển tinh chế và làm khô. Thành phần của thạch là galactan mà hầu hết các VSV không có khả năng phân giải, vì vậy nó được dùng phổ biến để làm cứng môi trường trong các phòng thí nghiệm. Thạch nóng chảy ở 97 – 100°C và đông lại ở 42°C. Nếu cần cấy VSV trước khi môi trường đông đặc, người ta để môi trường nguội đến 45 – 50°C rồi trộn VSV vào.

Khi cần nuôi cấy các vi khuẩn tự dưỡng (môi trường tuyệt đối không có các chất hữu cơ) người ta phải sử dụng chất làm cứng là silicagel ( $\text{Na}_2\text{SiO}_4$ ), hoặc thạch có độ tinh khiết cao.

*1.2.2.3. Môi trường bán lỏng* là môi trường dịch thể chứa 0,35 – 0,75% thạch.

*1.2.2.4. Môi trường xốp* là môi trường có sử dụng các nguyên liệu để làm xốp (cám, cơm, bánh mì, thạch anh, cát,...) thấm dung dịch chất dinh dưỡng.

### **1.2.3. Phân loại dựa theo mục đích sử dụng**

*1.2.3.1. Môi trường tối thiểu (Minimal medium):* là môi trường chỉ chứa một số các chất đơn giản và cơ bản mà trên đó các VSV có thể sinh trưởng được. Đối với các VSV không đòi hỏi cao về dinh dưỡng (non – fastidious microbes), loại môi trường này có thể rất đơn giản, bao gồm một số chất khoáng và nguồn cacbon (thường là glucôza). Tuy nhiên, đối với một số VSV đòi hỏi cao về chất dinh dưỡng (fastidious microbes) thì môi trường tối thiểu cũng phức tạp. Ví dụ, để nuôi cấy *Leuconostoc mesenteroides* thì môi trường gồm có glucôza và 7 loại muối khoáng, 19 axit amin, 4 loại nucleotit và 10 loại vitamin.

1.2.3.2. *Môi trường thông dụng*: Là loại môi trường nhiều loại VSV có thể sinh trưởng được, ví dụ môi trường: MPA (chứa thịt và pepton), Hanxen, Czapek...

1.2.3.3. *Môi trường chọn lọc (selective media)*: Trong loại môi trường này có chứa các chất (ví dụ NaCl, một số loại chất nhuộm, kháng sinh, ...) có tác dụng ức chế sự sinh trưởng của một số loại (nhóm) VSV nhưng lại tạo điều kiện tốt cho các loại (nhóm) VSV khác sinh trưởng. Ví dụ, môi trường Manitol – muối – Agar chứa NaCl ở nồng độ cao (7,5% NaCl) ức chế các vi khuẩn không chịu NaCl nhưng lại rất thích hợp cho các loài *Staphylococcus* chịu mặn. Hoặc, khi ta bổ sung kháng sinh chloramphenicol vào môi trường nuôi cấy nấm mốc, chất này sẽ hạn chế sự nhiễm vi khuẩn bởi chloramphenicol, ức chế sự sinh trưởng của nhiều loài vi khuẩn, trong khi đó nấm mốc phát triển bình thường do không chịu tác động của chloramphenicol.

1.2.3.4. *Môi trường phân biệt (differential medium)*: Trong môi trường loại này có chứa các chất chỉ thị cho phép phân biệt nhóm VSV này với nhóm VSV khác. Ví dụ khi sinh trưởng trên môi trường thạch MacConkey có chứa axit mật, các loài coliform có khả năng lên men lactôzơ dễ dàng phân biệt được với những loài coliform không có khả năng này. Khuẩn lạc của các loại coliform có khả năng lên men lactôzơ sẽ có màu hồng tươi trên môi trường này, trong khi đó các loài coliform không có khả năng lên men lactic sẽ không có màu, trong suốt.

Môi trường thạch máu cho phép phân biệt các loại vi khuẩn có khả năng làm tan hồng cầu với các vi khuẩn không có khả năng này.

1.2.3.5. *Môi trường làm giàu VSV (enriched medium)*: Môi trường này cần các chất dinh dưỡng đặc trưng kích thích sự sinh trưởng của một nhóm VSV nhất định, nhằm làm tăng số lượng quần thể các loài này trước khi đem phân lập. Ví dụ: khi cần phân lập *Salmonella* từ phân, người ta ủ phân trong môi trường đặc trưng dành cho nó một thời gian, rồi từ đó mới đem ra phân lập trên môi trường thích hợp.

1.2.3.6. *Một số môi trường vừa là môi trường phân biệt vừa là môi trường chọn lọc (selective – differential medium)*: Trong môi trường đó có chứa cả chất chọn lọc và chất chỉ thị để phân biệt hoặc chất kích thích sự sinh trưởng của VSV đích.

Ví dụ:

→ Môi trường Mac Conkey: Chất chọn lọc ở đây là chất nhuộm tím và axit mật (các chất này ức chế các vi khuẩn G<sup>+</sup>). Chất phân biệt ở đây là đường lactôzơ. Nếu vi khuẩn có khả năng lên men lactôzơ nó sẽ axit hóa môi trường làm cho chất chỉ thị là phenol biến thành màu hồng tươi, và ngược lại, nếu không lên men lactôzơ sẽ không có màu. Vì thế, ta có thể phân biệt được các vi khuẩn có khả năng lên men hoặc không lên men lactôzơ.

+ Môi trường SS – Agar là môi trường có chứa các chất (axit mật, chất màu brilliant green và xitrat) ức chế các vi khuẩn G<sup>+</sup>, đồng thời có chứa các chất để phân biệt giữa các nhóm vi khuẩn lên men lactic và không lên men lactic. Ngoài ra, còn chứa natri tiosulfat và sắt xitrat nhằm nhận biết sự tạo hydrogen sulfit, nếu các vi khuẩn có khả năng sinh H<sub>2</sub>S sẽ tạo ra các chấm đen ở trung tâm khuẩn lạc.

## II. PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG

### 2.1. Các vật liệu dụng cụ và hóa chất (xem cụ thể trong bảng sau)

Cho cả lớp thực hành	Cho mỗi nhóm thực hành
<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Hóa chất để làm môi trường:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Môi trường Mac Conkey (mua trên thị trường, nếu có điều kiện).</li> <li>- Cao thịt (mua trên thị trường) hoặc nước thịt (tự chế).</li> <li>- Bột Peptôn; Cao nấm men (mua trên thị trường).</li> <li>- Các loại muối vô cơ: NaNO<sub>3</sub>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; KCl; FeSO<sub>4</sub>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; KNO<sub>3</sub>.</li> </ul> </li> <li>◆ Thiết bị:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cân robecvan hoặc cân điện tử</li> <li>- Máy đo pH, nếu không có thì dùng giấy chỉ thị pH.</li> </ul> </li> <li>◆ Các vật liệu, dụng cụ khác:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bông không thấm nước để làm nút bình nón hoặc ống nghiệm.</li> <li>- Giấy chịu nhiệt, ít thấm nước (giấy dầu) để bọc các dụng cụ, nếu không có có thể dùng giấy báo thay thế.</li> <li>- Chày, cối sứ.</li> <li>- Dao bằng thép không rỉ.</li> <li>- Thìa múc hóa chất bằng thủy tinh, sứ hoặc thép không rỉ.</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 4 – 5 bình nón dung tích 150/250ml (để đựng môi trường).</li> <li>◆ 1 bình nón dung tích 150ml để đựng nước.</li> <li>◆ 15 ống nghiệm (6 ống để đựng 9ml nước, 9 ống nghiệm khác dùng để đựng 3 loại môi trường dinh dưỡng ở các trạng thái khác nhau).</li> <li>◆ 5 – 6 đĩa Petri.</li> <li>◆ 3 que trang thủy tinh.</li> <li>◆ 3 pipet thủy tinh.</li> <li>◆ 1 phễu thủy tinh.</li> <li>◆ Bút viết trên kính.</li> <li>◆ Giấy dán nhãn.</li> </ul>

## 2.2. Các bước tiến hành

Trong bài này sinh viên cần tiến hành các công việc sau:

### 2.2.1. Chuẩn bị các dụng cụ, vật liệu cần thiết

a) Chuẩn bị các ống nghiệm và bình nón chứa nước cất:

- Lấy 99ml nước cất cho vào bình nón dung tích 150ml, nút kín bằng bông.
- Lấy 6 ống nghiệm mỗi ống chứa 9ml nước cất, nút kín bằng bông.
- Khử trùng trong nồi hấp cao áp ở 121°C trong 20 phút.

b) Chuẩn bị các dụng cụ cần thiết (que cấy, que trang, đĩa petri...)

- Gói que trang, que cấy, pipét, đĩa thủy tinh, đĩa petri vào giấy dầu.
- Dao, cối sứ đem rửa sạch, sấy khô...
- Khử trùng các dụng cụ trong tủ sấy ở nhiệt độ 160 – 165°C trong 2 giờ.

### 2.2.2. Pha chế một số loại môi trường dinh dưỡng

a) Các môi trường sử dụng

- ◆ Môi trường MPA (phân lập và nuôi cấy vi khuẩn).
- ◆ Môi trường Hanxen hoặc Saboraand (phân lập và nuôi cấy nấm men).
- ◆ Môi trường Gauze 1: phân lập và nuôi cấy xạ khuẩn.
- ◆ Môi trường Czapek hoặc PDA (Potato Dextrose Agar) nuôi cấy nấm mốc.
- ◆ Môi trường MacConkey để phân lập *E.coli* (nếu có điều kiện).

Để pha chế môi trường người ta thường dựa theo các công thức của đơn đã có sẵn. Thành phần một số loại môi trường sử dụng trong bài thực hành 1 được ghi ở phần phụ lục ở cuối chương.

b) Các bước cơ bản trong pha chế môi trường

*Bước 1:* Cân đúng đầy đủ các thành phần theo đơn. Sau đó dùng đĩa thủy tinh khuấy tan các thành phần môi trường.

*Bước 2:* Đo và điều chỉnh độ pH của môi trường (nếu cần thiết).

Nếu cân đo chính xác các thành phần môi trường với các hóa chất đạt tiêu chuẩn thì môi trường pha chế sẽ đạt được ngay giá trị pH cần có.

Sau khi đã khuấy tan các thành phần môi trường trong nước, dùng giấy chỉ thị độ pH (hoặc máy đo pH) để xác định độ pH của môi trường.

Nếu cần điều chỉnh độ pH của môi trường theo ý muốn thì dùng dung dịch 1N HCl (hoặc các muối có phản ứng axit như  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) hoặc dùng dung dịch 20% NaOH (hay các muối có phản ứng kiềm  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

*Lưu ý:* Do quá trình khử trùng ở nhiệt độ và áp suất cao, pH môi trường sẽ bị thay đổi ít nhiều, vì vậy cần tiến hành điều chỉnh độ pH môi trường khi đun đến 45 – 50°C để tránh sự thay đổi pH quá nhiều sau khi khử trùng. Trong những trường hợp cần độ pH tuyệt đối chính xác, cần phải điều chỉnh pH môi trường sau khi đã khử trùng.

*Bước 3 (nếu cần làm môi trường rắn):*

- Thêm thạch (hoặc gelatin), đun và khuấy cho tan

*Bước 4:*

- Dùng phễu thủy tinh phân phối môi trường vào các bình chứa (bình nón, hoặc các ống nghiệm). Lưu ý, thể tích môi trường chỉ được phép chiếm nhiều nhất 2/3 thể tích của bình đựng môi trường, tránh đầy môi trường lên miệng bình.
- Làm nút bằng bông không thấm nước để nút miệng bình (nút không được quá chặt hoặc quá lỏng, thường dài khoảng 4 – 5cm).
- Bọc miệng bình bằng giấy dầu để tránh bớt sự đọng nước trên nút bông khi khử trùng.

*Bước 5. Khử trùng môi trường:*

- Sau khi kết thúc bước 4 cần khử trùng môi trường ngay bằng phương pháp thích hợp.
- Thông thường các môi trường được khử trùng ở 110°C trong 30 phút, hoặc ở 121°C trong 15 – 20 phút. Nếu thể tích môi trường lớn từ 1 lít trở lên thì khử trùng ở 121°C trong 30 – 45 phút hoặc lâu hơn.
- Các môi trường có chứa urê, hyposulphit, phải khử trùng theo kiểu Tyndal, hoặc qua phễu lọc Zeits.
- Những chất dễ bị biến đổi bởi nhiệt độ và pH cần phải được tiệt trùng riêng rồi bổ sung vào môi trường đã vô trùng. Ví dụ: các loại môi trường có chứa đường đơn hoặc đường đôi phải khử trùng ở nhiệt độ thấp hoặc hấp Tyndal, hoặc tách các đường ra khử trùng riêng bằng các phương pháp đun ở 70 – 80°C từ 15 – 20 phút, hoặc lọc qua phễu lọc Zeits, rồi bổ sung sau khi đã khử trùng các thành phần khác ở 121°C.
- Một số chất như máu, huyết thanh tốt nhất là lọc qua phễu lọc Zeits.

*c) Pha chế môi trường cho bài 1*

◆ Mỗi nhóm cần chuẩn bị:

- 200ml môi trường mỗi loại (MPA, Sabouraud, Czapek, Gauze I, Mac Conkey).

– Để cho mỗi thành viên trong nhóm tiến hành thí nghiệm ở bài sau, chuẩn bị cho mỗi người 3 ống nghiệm môi trường: 1) Môi trường dịch thể, 2) Môi trường thạch nghiêng và 3) Môi trường thạch đứng (hình 2.1). Cách chuẩn bị như sau:

+ Khi chưa cho thạch vào môi trường: Lấy 3ml môi trường cho vào 1 ống nghiệm (mỗi người có thể tùy chọn một trong số các loại môi trường: MPA, Sarbouraud, Czapek, Gauze I). Đánh dấu tên môi trường, để thẳng đứng trên giá ống nghiệm. Loại môi trường này gọi là *Môi trường dịch thể*.

+ Khi đã cho thạch vào môi trường và đun cho tan, lấy:

- 3ml môi trường thạch (tùy chọn) cho vào 1 ống nghiệm. Nút miệng ống nghiệm bằng bông, sau khi khử trùng đặt nằm nghiêng 15 – 20° trên mặt bàn sạch (*môi trường thạch nghiêng*).

- 10ml môi trường thạch (tùy chọn) cho vào 1 ống nghiệm (kích thước 15mm × 10mm), nút bông và để đứng trên giá ống nghiệm (*môi trường thạch đứng*).

- Số môi trường còn lại đổ vào các bình nón. Sau khi khử trùng đem phân phối vào các đĩa petri (mỗi đĩa petri khoảng 30ml) như trình bày ở bài 2.

- Ghi trên ống nghiệm hoặc bình nón các thông tin: Tên môi trường, tên người (hoặc nhóm), ngày, tháng chuẩn bị..., nút kín bằng bông, sau đó cuộn miệng ống nghiệm bằng giấy dầu.

+ Khử trùng các loại môi trường theo phương pháp thích hợp.

*Lưu ý:*

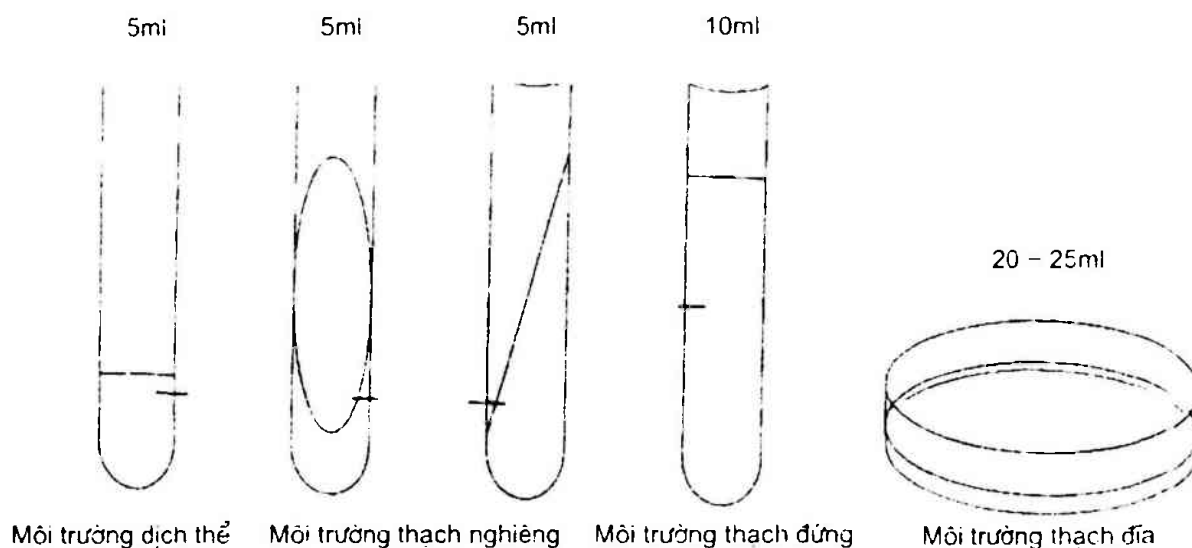
– Người chuẩn bị phải ghi đầy đủ các thông tin: tên môi trường, ngày tháng chuẩn bị, người chuẩn bị... vào tất cả các ống nghiệm, bình nón, đĩa Petri đựng môi trường...

– Giáo viên thực hành sẽ hướng dẫn và kiểm tra cụ thể các kỹ thuật làm môi trường, làm nút bông, gói đĩa Petri, que trang, que cấy, các dụng cụ khác để khử trùng.

– Giáo viên thực hành sẽ hướng dẫn các phương pháp khử trùng các vật liệu dụng cụ trên.

Sau bài thực hành này, ta đã có đủ các loại môi trường và các dụng cụ cần thiết để nghiên cứu phân lập và nuôi cấy VSV ở bài 2.





Hình 2.1. Các kiểu môi trường trong ống nghiệm và đĩa Petri

### 2.3. Kiểm tra đánh giá bài 1

– Kiểm tra cách chuẩn bị các dụng cụ phân lập: cách bao gói, đánh dấu trên các dụng cụ và vật liệu thí nghiệm.

– Kiểm tra kỹ năng sử dụng các thiết bị vô trùng của sinh viên.

– Kiểm tra kỹ thuật chuẩn bị môi trường: Cách sử dụng cân, cách cân đong và pha chế các thành phần môi trường, cách đổ môi trường vào các dụng cụ chứa (ống nghiệm, bình nón), cách bao gói dụng cụ thí nghiệm, làm nút bông. Cần kiểm tra xem môi trường có đông hay không, bình đựng có đúng kỹ thuật, sau 1 ngày các môi trường có còn vô trùng hay đã bị nhiễm...

– Kiểm tra vở: Giáo viên hướng dẫn sinh viên cách ghi chép tiến trình thực hiện 1 bài thí nghiệm và ghi nhận xét các kết quả của bài thực hành.

*Lưu ý:* Mỗi sinh viên phải có 1 quyển vở thực hành (không được dùng các tờ giấy để viết tường trình các bài thực hành). Các bài tường trình phải được ghi bằng mực, rõ ràng, không được dùng bút chì. Trong phần tường trình phải ghi rõ những mục sau:

√ Ngày, tháng, tên thí nghiệm.

√ Mục đích thí nghiệm.

√ Những vật liệu hóa chất, dụng cụ, VSV sử dụng.

√ Viết sơ đồ tiến hành thí nghiệm một cách cụ thể.

√ Kết quả thí nghiệm: cần trình bày rõ kết quả thu được của mỗi thí nghiệm, có thể dùng hình, bảng biểu nếu cần thiết.

v Tóm tắt: Kết luận về thí nghiệm, những vấn đề nảy sinh trong thí nghiệm. Trong phần này cũng phải nói lên được mình có học được gì ở bài này, biện luận cho các kết quả mà mình thu được, các số liệu thu được nói lên điều gì và có ý nghĩa gì. Giải thích các kết quả thu được không đúng như dự kiến, hoặc các vấn đề bất thường xảy ra trong thí nghiệm, đề xuất phương án giải quyết.

## 2.4. Một số câu hỏi và bài tập

*Câu 1.* Phân tích vai trò của từng thành phần có trong các môi trường phân lập và nuôi cấy VSV sau: Gauze, Manitol, MacConkey.

*Câu 2.* Hãy phân biệt các loại môi trường ở bảng sau theo đặc điểm dinh dưỡng.

Môi trường	Các thành phần	Hàm lượng	Vai trò của các thành phần
Môi trường 1	Sacarôzơ	10,0g	
	$K_2HPO_4$	2,5g	
	$KH_2PO_4$	2,5g	
	$(NH_4)_2HPO_4$	1,0g	
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,20g	
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01g	
	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,007g	
	$H_2O$	985ml	
	pH 7.0		
Môi trường 2	$NH_4Cl$	0,52g	
	$KH_2PO_4$	0,28g	
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25g	
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,07g	
	$Na_2HSO_4$	1,56g	
	$CO_2$	5%	
	Nước	1000ml	
	pH 3.0		

Môi trường	Các thành phần	Hàm lượng	Vai trò của các thành phần
Môi trường 3	Cao thịt	1,5g	
	Cao nấm men	3,0g	
	Peptôn	6,0g	
	Glucôzơ	1,0g	
	Thạch	15,0g	
	Nước	1000ml	
	pH 6.6		

*Câu 3.* Tại sao sau khi chuẩn bị đầy đủ các thành phần môi trường lại phải khử trùng ngay?

*Câu 4.* Tại sao khi chuẩn bị môi trường nuôi cấy VSV trong các bình nón và trong ống nghiệm ta phải đậy nút?

*Câu 5.* Giả sử, mục tiêu của chúng ta là phân lập các VSV ưa mặn có khả năng phân giải tinh bột, làm thế nào để có một môi trường chọn lọc dành cho chúng?

*Câu 6.* Hãy giải thích hiện tượng khi thức ăn ta ăn thừa nếu đun sôi lại thì ngày hôm sau vẫn không bị thiu, còn thức ăn không đun lại sẽ bị thiu?

*Câu 7.* Nồi hấp cao áp dùng để tiệt trùng VSV. Vậy nồi áp suất ta dùng ở gia đình có khả năng này không?

*Câu 8.* Làm thế nào để nhận biết môi trường đã được vô trùng?

## **Bài 2: KỸ THUẬT PHÂN LẬP VÀ NUÔI CẤY VI SINH VẬT**

### **A. MỤC TIÊU**

Sau khi học xong bài này sinh viên phải có khả năng thực hiện:

- Thành thạo một số thao tác cơ bản trong thực hành VSV.
- Kỹ thuật phân lập và thuần chủng VSV.
- Kỹ thuật nuôi cấy VSV.
- Tụ phân lập được một số VSV từ đất hoặc các cơ chất khác trên môi trường thạch.
- Nhận biết và mô tả được một số dạng khuẩn lạc đặc trưng cho vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc, nấm men trên môi trường thạch.

### **B. NỘI DUNG**

#### **1. MỘT SỐ THAO TÁC VÔ TRÙNG CƠ BẢN TRONG THỰC HÀNH VI SINH VẬT**

Các thao tác vô trùng khi làm việc với VSV là việc làm tối cần thiết không những để đảm bảo cho thí nghiệm thành công mà còn đảm bảo an toàn cho sức khỏe và môi sinh.

Khi tiến hành các thí nghiệm với VSV phải đi găng tay vô trùng hoặc sát trùng tay bằng dung dịch cồn 70% hoặc dung dịch hỗn hợp cồn (70%) và propanol (10%). Sát trùng mặt bàn làm việc trước và sau khi làm việc bằng dung dịch hỗn hợp cồn isopropanol.

Thao tác vô trùng được thực hiện trong một không gian vô trùng bởi ngọn lửa đèn cồn hoặc đèn khí gas. Sức nóng của ngọn lửa đèn cồn hoặc đèn khí gas sẽ tạo ra một vùng không khí nhỏ vô trùng xung quanh nó. Ở các phòng thí nghiệm có điều kiện, các thao tác này được tiến hành gần ngọn đèn cồn hoặc khí gas đặt trong buồng vô trùng.

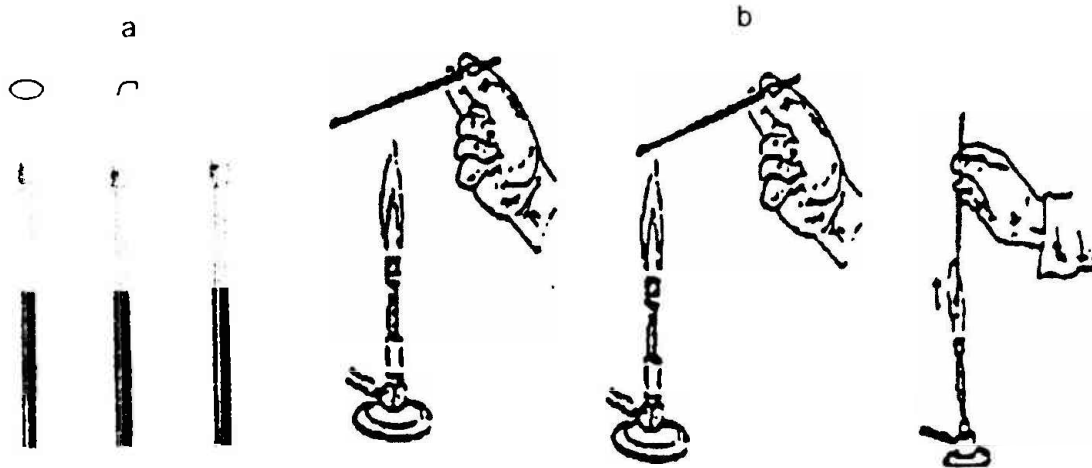
Que cấy, que trang, pipet... phải được khử trùng trước và sau khi lấy mẫu VSV bằng những phương pháp đã trình bày ở chương 1 hoặc có thể khử trùng nhanh như trình bày sau đây.

##### **1.1. Khử trùng que cấy**

Que cấy (hình 2.2.a) là dụng cụ để cấy VSV, được làm bằng thanh kim loại có đường kính khoảng 2 – 3mm, dài khoảng 25 – 30cm. Một đầu thanh kim loại này được bọc bằng 1 lớp nhựa polime làm tay cầm để tránh bị bỏng khi thao tác, đầu khác được gắn với 1 thanh kim loại mảnh (0,1mm) bằng thép không gỉ hoặc bạch kim, dài cỡ 5 – 7cm. Đầu của thanh kim loại mảnh này có thể được để thẳng (que cấy hình kim) hoặc được uốn thành hình móc (que cấy móc), hoặc uốn thành hình tròn (que cấy vòng).

Que cấy cần được khử trùng cả trước và sau khi sử dụng, như sau:

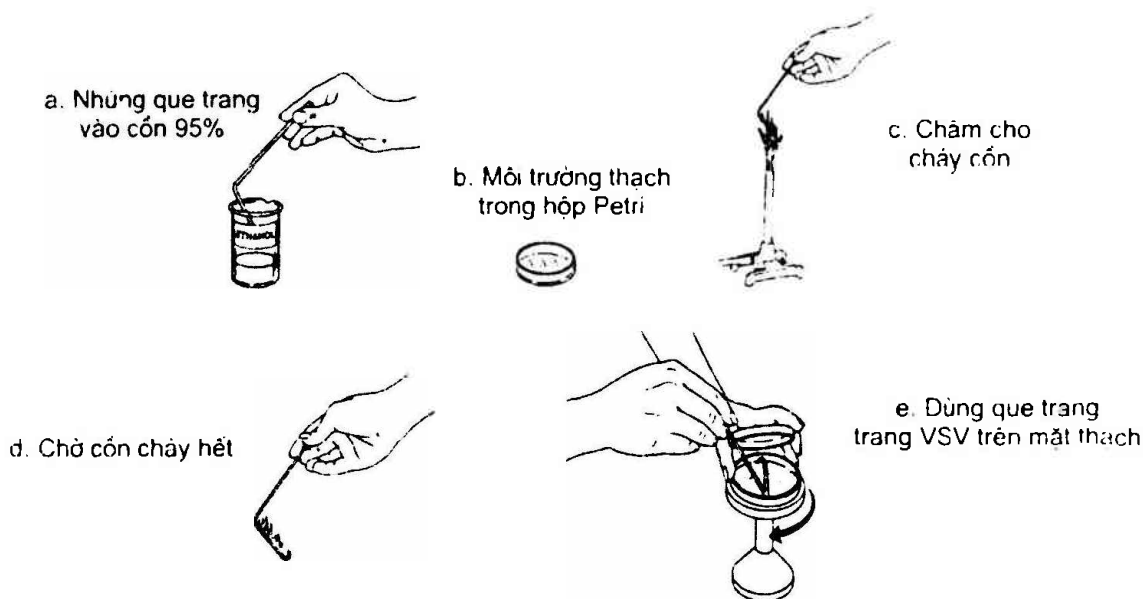
- Đưa ngang đồng thời xoay phần kim loại trên ngọn đèn vài ba lần.
- Cắm que cấy thẳng đứng trên ngọn đèn cho đến khi đầu que cấy nóng do ta có que cấy vô trùng (Hình 2.2b).
- Để que cấy gần ngọn đèn cho nguội bớt trước khi sử dụng cấy VSV ở bước tiếp theo.



Hình 2.2. Que cấy (a) và khử trùng que cấy (b) trước và sau khi làm việc

## 1.2. Khử trùng que trang

Que trang được làm bằng thủy tinh hoặc thép không gỉ, thường dùng để trải đều giọt dịch huyền phù VSV trên mặt thạch trong đĩa Petri khi phân lập hay khi nuôi cấy VSV. Để khử trùng nhanh, nhúng đầu que trang vào cồn, rồi đốt cho cháy hết cồn (Hình 2.3).



Hình 2.3. Khử trùng que trang để cấy trải VSV

### 1.3. Khử trùng pipet

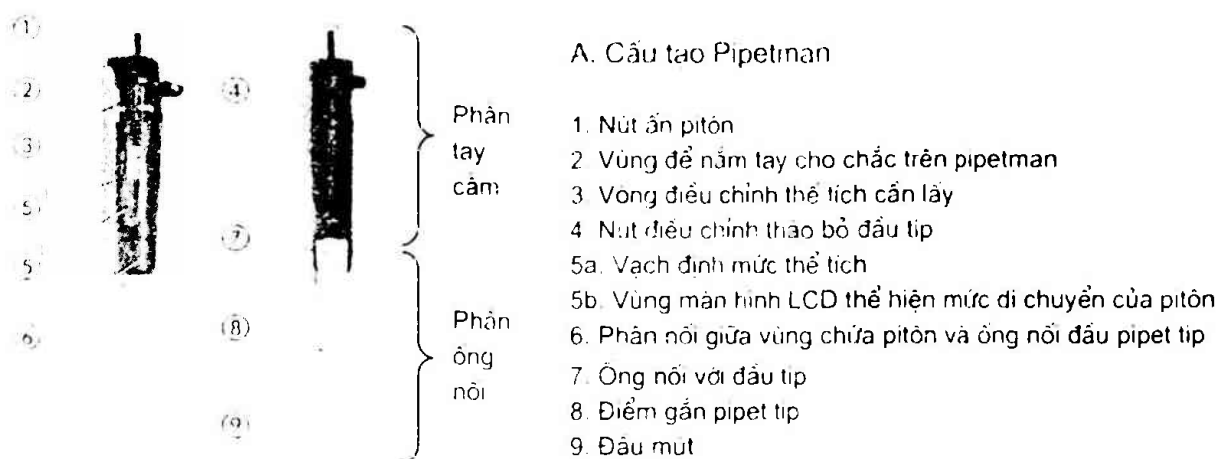
#### 1.3.1. Pipet thủy tinh

Các pipet bằng thủy tinh phải rửa sạch, để khô. Dùng bông không thấm nước nút nhẹ ở đầu trên của pipet. Gói kín từng pipet vào giấy dầu hoặc giấy báo. Cũng có thể cho tất cả pipet vào một ống đựng pipet bằng thép không gỉ có nắp đậy. Trước khi cho pipet vào ống đựng, cho một ít bông vào đáy ống đựng pipet để tránh làm vỡ miệng pipet. Khử trùng ở tủ sấy 160 – 180°C trong 2 giờ hoặc ở 121°C trong 20 phút, sau đó sấy khô ở 60°C trong tủ sấy.

#### 1.3.2. Pipetman và pipet tip

a) Pipetman (hình 2.4.A) là loại pipet cho phép định lượng sẵn chính xác một thể tích nhất định của một chất lỏng. Cấu tạo của nó gồm 2 phần chính: Phần tay cầm bên trong là một khoang chứa 1 piton. Piton được thiết kế thẳng đứng trong phần tay cầm của pipet. Phần tay cầm được nối với phần ống có rãnh nhỏ ở trung tâm (khoảng 0,01cm) cho chất lỏng hoặc không khí đi qua. Ở đầu mút của ống nối này là phần gắn pipet tip để hút chất lỏng (pipet tip thường có các thể tích khác nhau, từ 0,001ml cho đến 5ml tùy loại pipetman và tùy theo mục đích của người sử dụng). Khi piton được đẩy xuống sẽ tạo ra một thể tích chân không ở quãng đường mà nó đã trượt qua. Không khí đi từ tip sẽ lấp đầy khoảng chân không đó khi piton bật trở lại vị trí lúc đầu. Nếu nhúng tip vào dịch lỏng thì dịch lỏng sẽ đi vào tip đúng bằng thể tích không khí mà piton đã tạo ra. Vì thế, ta có thể lấy 1 thể tích nhất định của một chất lỏng nào đó theo đúng ý muốn nhờ vào mức phân chia trong pipetman.

Bình thường, khi sử dụng pipetman chỉ cần lau chùi sạch bằng cồn 70%. Khi cần, từng bộ phận của Pipetman có thể thanh trùng theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các pipet tip bằng nhựa thì luôn phải vô trùng. Sau khi sử dụng, các pipet tip có thể tái sử dụng bằng cách rửa sạch bằng chất tẩy rửa nhẹ, sau đó rửa sạch lại bằng nước cất, cắm vào các hộp đựng chuyên dụng, để khô, sau đó gói lại, thanh trùng ở 121°C trong 20 phút, rồi sấy khô ở 40 – 50°C. Trong các nghiên cứu di truyền phân tử không tái sử dụng các pipet tip.





Hình 2.4. Pipetman và Pipet tip

## II. NỘI DUNG CHÍNH CỦA BÀI THỰC HÀNH

### 2.1. Kỹ thuật phân lập vi sinh vật

#### 2.1.1. Phân lập vi sinh vật đất

a) Nguyên tắc: Để phân lập được VSV phải dùng môi trường đặc. Chỉ trên môi trường đặc thì các tế bào VSV mới tách biệt khỏi quần thể đa dạng VSV trong mẫu phân tích thành các khuẩn lạc (colony) riêng biệt, có hình dạng, kích thước và các đặc điểm hình thái khác nhau. Mỗi khuẩn lạc (KL) VSV thường được tạo thành từ 1 tế bào của một loại VSV nhất định, được gọi là đơn vị KL, kí hiệu là 1 CFU (Colony Forming Unit). VSV trong một KL thường sinh trưởng nhanh ở vùng mép, chậm nhất ở tâm KL. Hình thái KL thường rất đặc trưng cho từng loại VSV và được coi là một tiêu chuẩn để phân loại.

#### b) Vật liệu

– Các môi trường phân lập và các dụng cụ cần thiết đã chuẩn bị ở phần 2.2.2. ở bài 1. Môi trường trong các bình nón được đun cho nóng chảy, để nguội và phân phối vào các đĩa Petri vô trùng như trình bày dưới đây. Mỗi nhóm có ít nhất 3 đĩa Petri môi trường thạch mỗi loại để phân lập.

– Các mẫu muốn phân lập: đất, nước, bùn... (tùy chọn).

#### c) Phương pháp

Có thể dùng phương pháp cấy trải trên bề mặt môi trường thạch đĩa (spread plate method) hoặc trộn trong thạch (Agar diluting method):

\* *Phân lập bằng phương pháp cấy trải trên bề mặt môi trường thạch đĩa.*

*Bước 1:* Phân phối môi trường vô trùng vào đĩa Petri vô trùng (hình 2.5).



- Đun MT cho tan thạch, để nguội đến 45 – 50 C
- Lật ngược đĩa Petri
  - Ghi tên MT, ngày tháng, người chuẩn bị lên mặt đĩa nhỏ của đĩa Petri



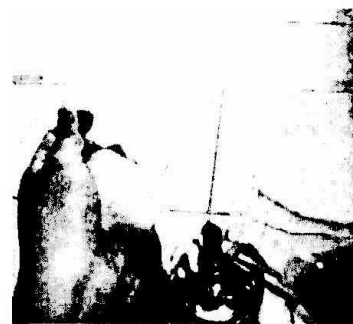
- Đặt đĩa Petri trên một giá đỡ gắn ngón đen còn lại cho đĩa Petri ngang bằng ngón lửa của đèn



- Tay phải cầm bình MT. Dùng ngón út và ngón nhẫn của bàn tay trái mở nút MT (lúc này giữ miệng bình MT gắn ngón đen còn).



- Dùng các ngón tay còn lại của bàn tay trái để mở nắp đĩa Petri, rót MT vào đĩa Petri (khoảng 20 – 25ml cho đĩa Petri loại 10cm x 10cm).
  - Tránh làm rơi MT lên thành của đĩa Petri.
  - Đậy nắp đĩa Petri



- Đưa nhanh nút bông qua ngón lửa đèn, nút bình lại nêu trong bình còn dư môi trường.
  - Đặt đĩa Petri xuống mặt bàn phẳng, để nguội.

Hình 2.5. Phân phối môi trường vào hộp Petri

Tất cả các thao tác trên đây cần làm nhanh, gọn ở gần ngọn đèn. Nếu có điều kiện, nên tiến hành ở trong tủ (hoặc buồng) vô trùng. Nếu làm ở phòng làm việc thì nên tránh gió lùa.

#### *Bước 2:* Chuẩn bị và pha loãng dịch huyền phù đất (Hình 2.6)

- Dùng dao vô trùng lấy khoảng 10 – 15g đất trồng cho vào cối sứ nghiền nhỏ, tròn đều, sau đó cân lấy 1g cho vào bình nón chứa 99ml nước cất vô trùng, khuấy bằng đũa thủy tinh cho tan hết đất (có thể khuấy trên máy khuấy từ hay lắc trên máy lắc đảo 2 – 3 phút). Ta có dịch đất pha loãng  $10^2$  lần.

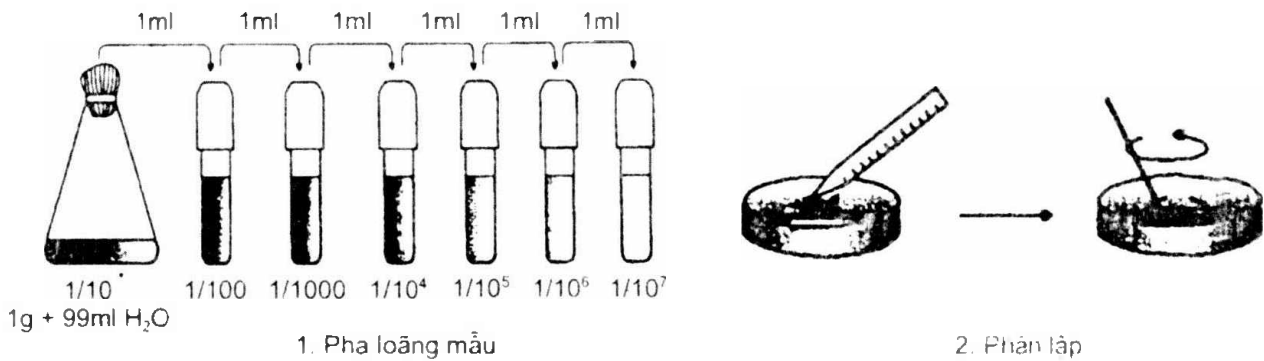
- Lấy 1ml dịch huyền phù đất ở độ pha loãng  $10^2$  đưa vào ống nghiệm chứa 9ml nước cất vô trùng. Trộn đều bằng máy trộn dung dịch, hoặc lắc bằng tay vài phút. Ta có độ pha loãng  $10^3$ .

- Dùng pipet vô trùng lấy 1 ml dịch pha loãng  $10^3$  đưa sang ống nghiệm thứ 2 chứa 9 ml nước cất vô trùng, trộn đều. Ta có dung dịch đất pha loãng  $10^4$ .

- Tiếp tục làm như trên ta có một loạt độ pha loãng liên tục dịch đất khác nhau như ý ở cấp độ pha loãng  $10^5$ .



*Chú ý:* Tùy theo đất chứa nhiều hay ít VSV mà pha loãng ở nồng độ thích hợp để khi phân lập thu được mật độ các khuẩn lạc VSV không quá dày hoặc quá thưa thớt trong mỗi đĩa Petri (từ 30 – 300 KL là được)

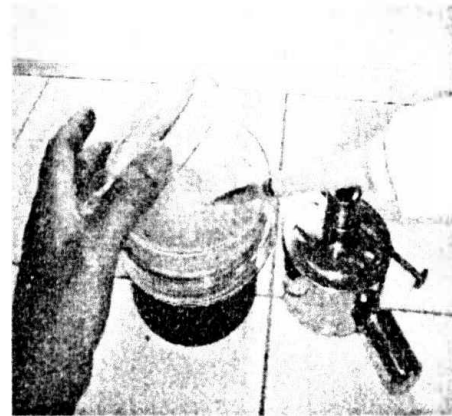


Hình 2.6. Pha loãng dịch đất

**Bước 3.** Cấy dịch huyền phù đất lên môi trường thạch trong đĩa Petri (hình 2.7)

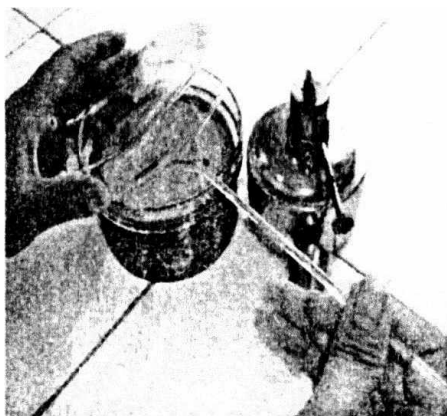


1. Lật ngược đĩa Petri, ghi tên MT, người phân lập, mẫu phân lập, ngày, tháng phân lập...



2. Đặt đĩa Petri lên giá đỡ.

3. Dùng pipet vô trùng nhỏ 0,1ml dịch huyền phù lên bề mặt MT



4. Dùng que trang vô trùng trải đều giọt dịch huyền phù trên toàn bộ mặt MT.  
Đậy đĩa Petri



5. Gói đĩa Petri.

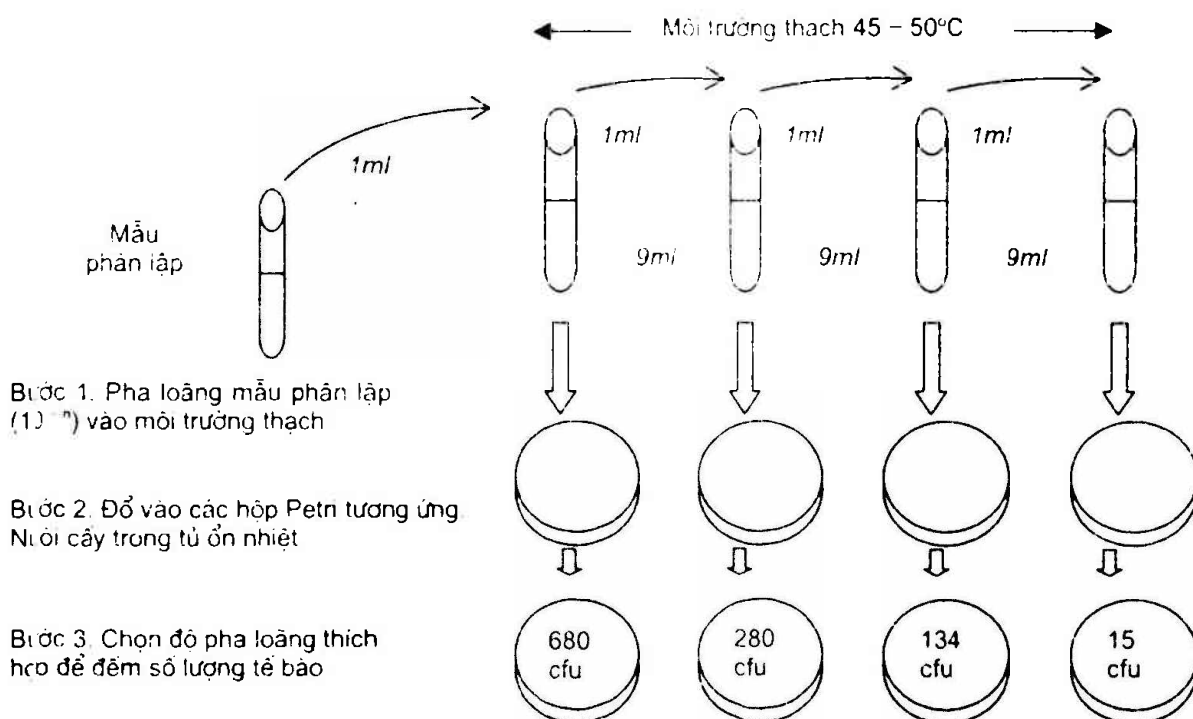
Lưu ý: trước khi gói, nhớ lật ngược các đĩa Petri

6. Để các đĩa Petri trong tủ ấm ở nhiệt độ khoảng 28 – 30°C trong 2 – 7 ngày (tùy thuộc vào loài VSV)

Hình 2.7. Cấy dịch đất lên bề mặt môi trường thạch

\* *Phân lập bằng phương pháp pha loãng dịch đất trong môi trường thạch nóng chảy*

Tiến hành cân mẫu tương tự như trên, song dịch đất sau khi đã pha loãng sơ bộ ( $10^{-1}$ ), được tiếp tục pha loãng ở môi trường thạch nóng chảy đã để nguội đến 45 – 50°C trong bình nón (hoặc ống nghiệm). Lắc đều môi trường rồi đổ vào các đĩa Petri. Gói các đĩa Petri lại và để vào tủ ấm. Sau đó đem ra chọn đĩa Petri có số lượng KL nằm trong khoảng 30 – 300 CFU/đĩa để tính số CFU trong 1ml mẫu ban đầu (hình 2.8).



Hình 2.8. Phương pháp phân lập bằng trộn mẫu pha loãng trong thạch nóng chảy

\* Trong bài này mỗi nhóm tiến hành phân lập VSV đất bằng phương pháp cấy trải trên môi trường thạch (MPA, Czapek, Gauze hoặc khoáng tinh bột). Riêng nấm men ít có mặt trong đất nên tiến hành phân lập nấm men từ quả, hoa hoặc lá cây, sử dụng môi trường Hanxen hoặc Sabouraud.

### 2.1.2. Phân lập vi sinh vật từ các cơ chất khác

1) *Phân lập các VSV từ các cơ chất rắn khác* (các thực phẩm nhiễm VSV, các bệnh phẩm, các loại hoa quả lá cây...) cũng tiến hành tương tự như phân lập VSV từ đất.

2) *Phân lập các VSV từ môi trường lỏng* (máu, nước tiểu, nước bùn...) thì lấy 1ml cơ chất nghiền cứu đem pha loãng và phân lập tương tự như trên.

c) *Phân lập các VSV từ không khí*: Chỉ cần mở nắp đĩa Petri có chứa môi trường dinh dưỡng trong 3 – 5 phút ở một địa điểm cần nghiên cứu, sau đó đậy nắp, gói lại, để vào tủ ấm ở nhiệt độ thích hợp.

### 2.1.3. *Kiểm tra kết quả phân lập vi sinh vật*

– Sơ bộ nhận biết và mô tả hình dạng KL của các loại VSV thông thường thu được trên môi trường phân lập:

Vi khuẩn, nấm men và nấm mốc sau 2 – 3 ngày đã sinh trưởng tốt tạo thành các KL rõ trên môi trường phân lập. Xạ khuẩn có thể cần từ 5 – 7 ngày mới tạo thành KL rõ rệt. Lấy các đĩa Petri đã nuôi cấy từ tủ ấm ra quan sát là có thể phân biệt được các loại VSV thông thường này.

Khi sinh trưởng trên môi trường đặc trong đĩa Petri, VSV tạo thành các KL riêng rẽ, có hình thái khác nhau phụ thuộc vào từng loại và từng loài VSV. Vì thế, ta có thể sơ bộ phân biệt KL của các nhóm VSV thông thường bằng mắt thường như sau:

*Vi khuẩn*: KL thường là dạng bột nhão, đục (hoặc trong), khô hoặc ướt, đôi khi nhầy nhớt, có các hình thù đặc trưng riêng cho từng chủng, từng loài (tham khảo hình mô tả). Chúng cũng có thể có các màu sắc như: vàng, xanh, hồng, nâu, đỏ... tùy loài. KL thường có kích thước từ 0,5mm đến 2 – 3cm tùy loài.

*Nấm men*: cũng có KL dạng bột nhão, thường tròn, bóng, KL khô hơn KL vi khuẩn, ít khi nhầy nhớt. KL cũng có những hình thù, màu sắc khác nhau, nhưng không đa dạng như ở vi khuẩn, thường thấy là màu trắng ngà.

*Nấm sợi*: KL khô, bóng xốp, nhìn rõ hệ sợi dày đặc ở trong thạch (hệ sợi cơ chất) và vươn ra khỏi bề mặt thạch (hệ sợi khí sinh). Sợi khí sinh có thể mang theo cơ quan sinh bào tử dài, ngắn khác nhau vươn ra không khí với các chùm bao tử nhiều hoặc ít, có màu sắc khác nhau: trắng, xanh, đen, đỏ, vàng, nâu... KL có thể có kích thước từ 1 – 2mm đến 5 – 10cm (tùy loài).

*Xạ khuẩn*: KL của xạ khuẩn có cấu tạo tương tự như nấm sợi, có hệ sợi cơ chất và hệ sợi khí sinh. Hệ sợi khí sinh cũng mang các cuống sinh bào tử, với các bào tử có màu sắc khác nhau: trắng, xanh, lục, vàng, tím, đen... đặc thù cho từng nhóm, từng loài. Tuy nhiên, KL của xạ khuẩn cũng rất dễ dàng phân biệt được với các KL của nấm sợi. Kích thước của sợi xạ khuẩn nhỏ nên KL của xạ khuẩn nhỏ hơn (1 – 2mm – 1,2cm) và khô hơn, thường là dạng vôi bột. KL đôi khi có hình dạng của các hình tròn đồng tâm phóng xạ. Đặc biệt, da số xạ khuẩn có mùi đặc trưng của đất.

Hình thái của KL là một trong những tiêu chuẩn phân loại đến loài. Những đặc điểm chuẩn dùng để mô tả gồm: Kích thước của KL, màu sắc, hình dạng, KL (đục, nhão, khô, ráp, nhầy nhót...), sự thay đổi môi trường nuôi cấy (màu sắc, làm loãng hoặc làm rõ bề mặt môi trường...), mùi (mỗi loại VSV sẽ tạo ra các mùi riêng biệt trên môi trường nuôi cấy)

Hình dạng KL của VSV rất đa dạng, để mô tả hình dạng của các loại KL, người ta đưa ra cách mô tả như sơ đồ ở hình 2.9.

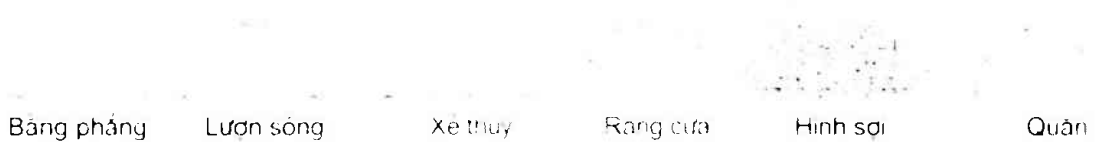
1 Hình khuẩn lạc từ trên xuống



2 Hình dạng khuẩn lạc nhìn nghiêng



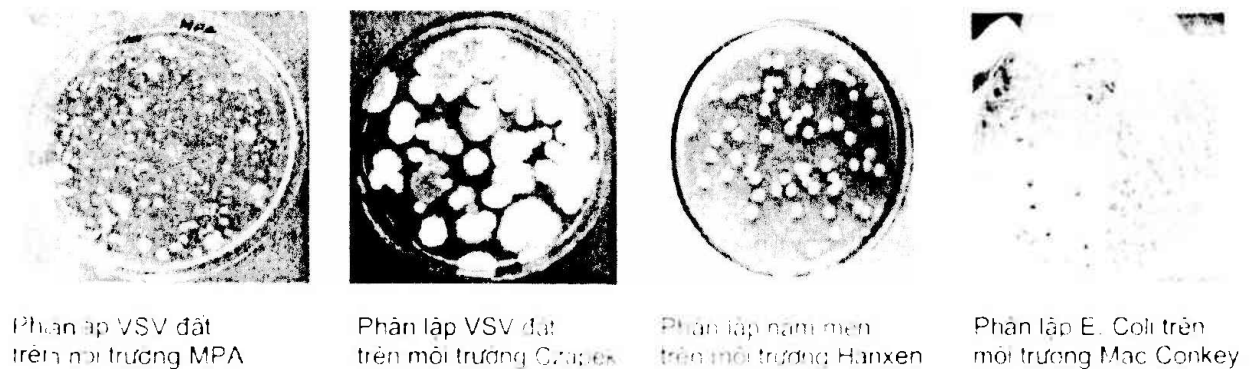
3 Mép khuẩn lạc



Hình 2.9. Đặc điểm mô tả hình thái khuẩn lạc

Đôi khi, hình thái KL của nấm men và vi khuẩn, hay của nấm mốc và xạ khuẩn khá giống nhau. Vì thế, ngoài quan sát hình thái KL còn phải soi hình dạng sợi hoặc tế bào của các VSV này dưới KHV để phân biệt.

Dưới đây là một số ví dụ minh họa hình dạng của một số KL của vi khuẩn, nấm sợi, nấm men và xạ khuẩn (hình 2.10 và 2.11).



Phân lập VSV đất trên môi trường MPA

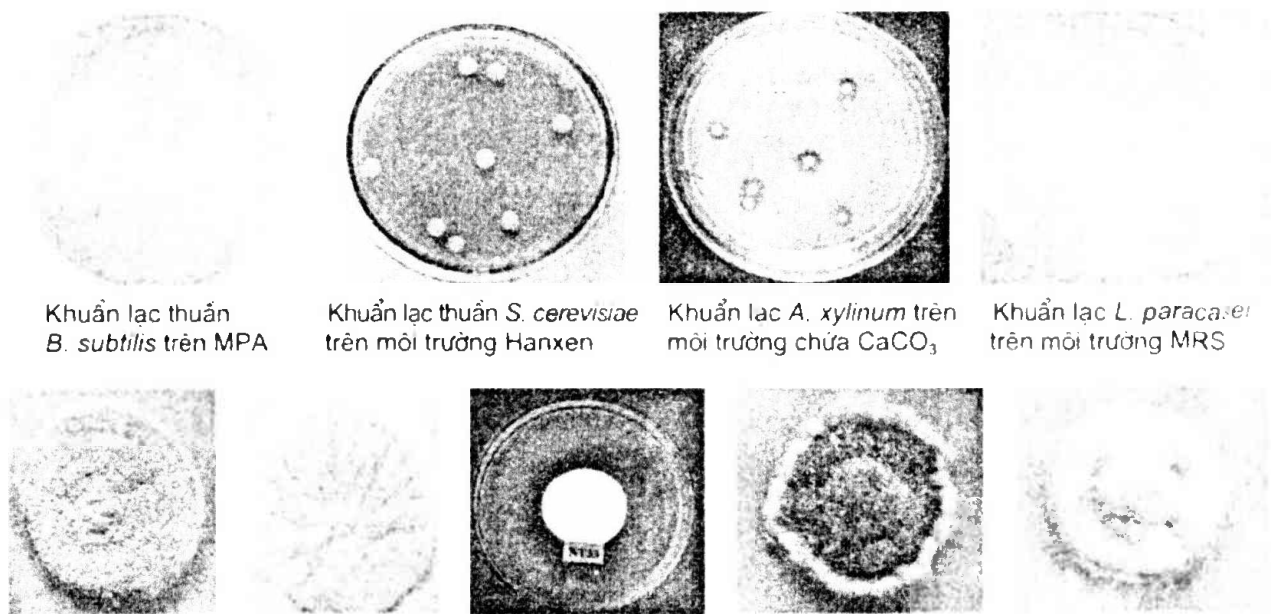
Phân lập VSV đất trên môi trường Czapek

Phân lập nấm men trên môi trường Hanxer

Phân lập E. Coli trên môi trường Mac Conkey

(Nguồn internet)

Hình 2.10. Một số kiểu phân lập của VSV

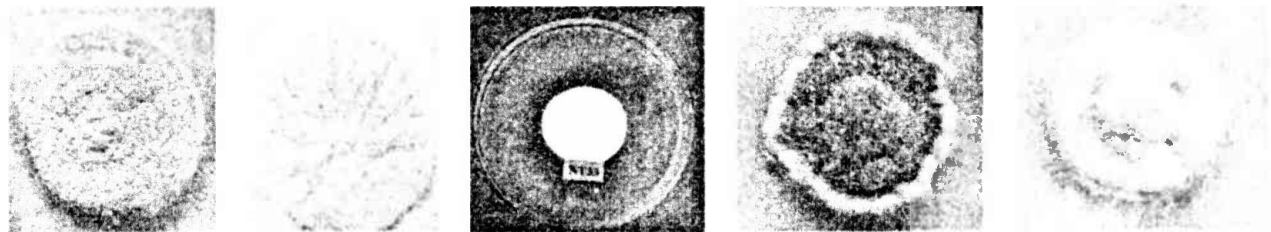


Khuẩn lạc thuần *B. subtilis* trên MPA

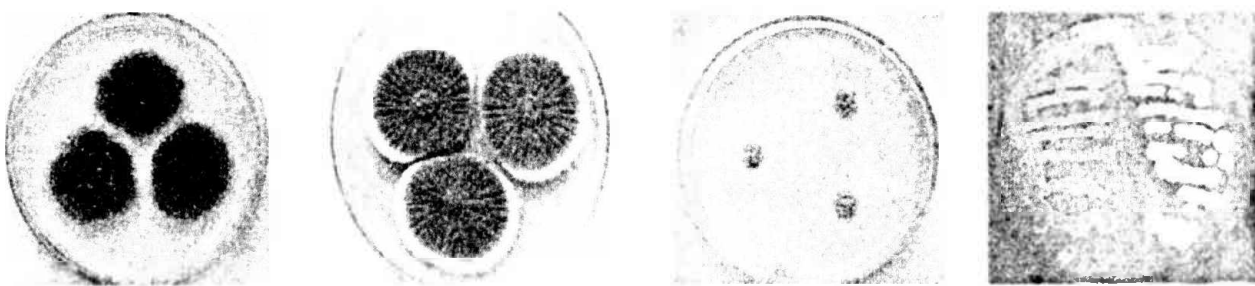
Khuẩn lạc thuần *S. cerevisiae* trên môi trường Hanxan

Khuẩn lạc *A. xylinum* trên môi trường chứa  $\text{CaCO}_3$

Khuẩn lạc *L. paracasei* trên môi trường MRS



Một số kiểu hình dạng khuẩn lạc thuần của nấm mốc



*Aspergillus* (cây châm điểm)

*Penicillium* (cây châm điểm)

*Streptomyces* (cây châm điểm)

*Streptomyces* (cây zíc zác)

Hình 2.11. Một số kiểu hình dạng khuẩn lạc thuần của Vi sinh vật

## 2.2. Kỹ thuật nuôi cấy VSV

### 2.2.1. Vật liệu

– Các ống giống VSV thuần chủng: *E. coli*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Streptomyces*.

- 3 đĩa Petri chứa môi trường thạch.
- 1 ống môi trường dịch thể.
- 1 ống môi trường thạch nghiêng.
- 1 ống môi trường thạch đứng.
- Que cấy vòng.
- Đèn cồn, que trang.
- Pipet.

\* Tất cả các môi trường và dụng cụ này đều đã được chuẩn bị và vô trùng từ bài 1.

### 2.2.2. Các kĩ thuật cơ bản

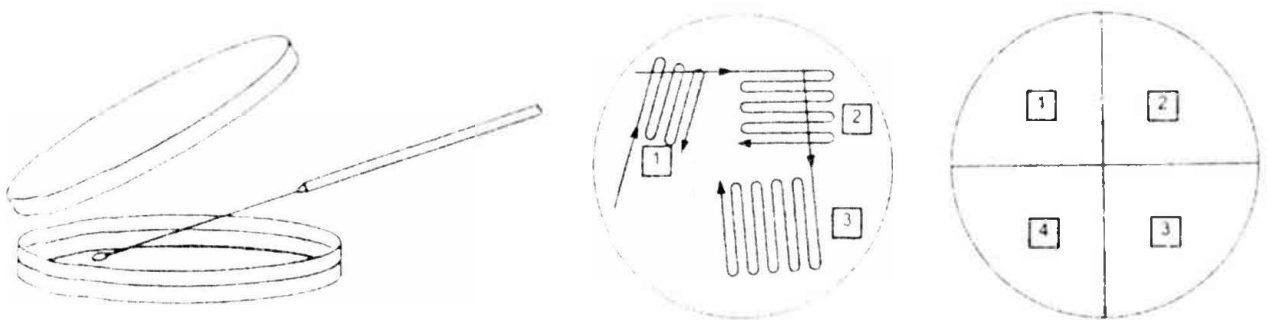
a) Thuần chủng VSV bằng que cấy vòng (Phương pháp cấy rìa 3 pha trên môi trường thạch) (Hình 2.12)

– Dùng que cấy lấy một vòng dịch huyền phù (hoặc tế bào VSV), cấy rìa thành đường zíc zắc ở một góc trên bề mặt môi trường thạch trong đĩa Petri (1) → sau đó khử trùng que cấy trên ngọn đèn → để nguội.

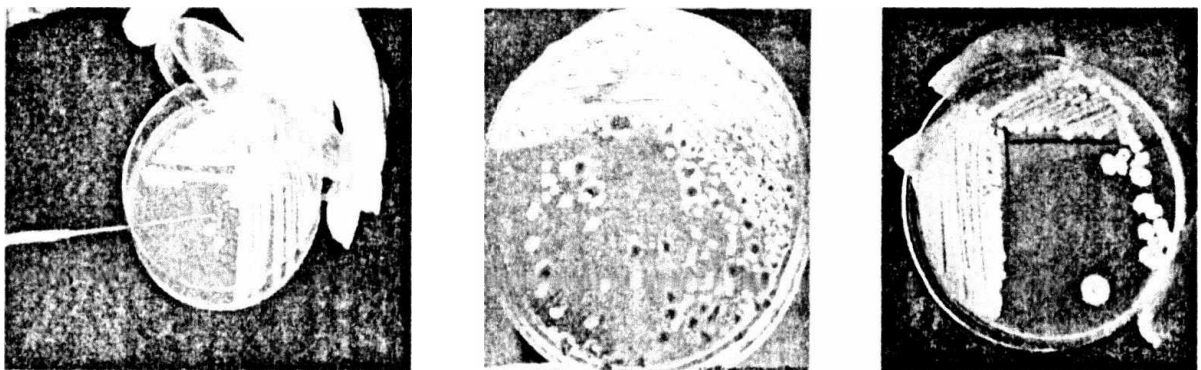
– Đặt que cấy bắt đầu từ vùng (1) vừa cấy, từ đó rìa những đường zíc zắc sang góc bên cạnh nó (2) → sau đó khử trùng que cấy → để nguội.

– Tiếp tục đặt que cấy bắt đầu từ vùng (2) cấy sang vùng (3), rồi từ vùng (3) cấy sang vùng (4),... ta có thể thu được các khuẩn lạc VSV tách biệt ở các lần cấy sau cùng (Hình 2.12).

a) Mô tả phương pháp



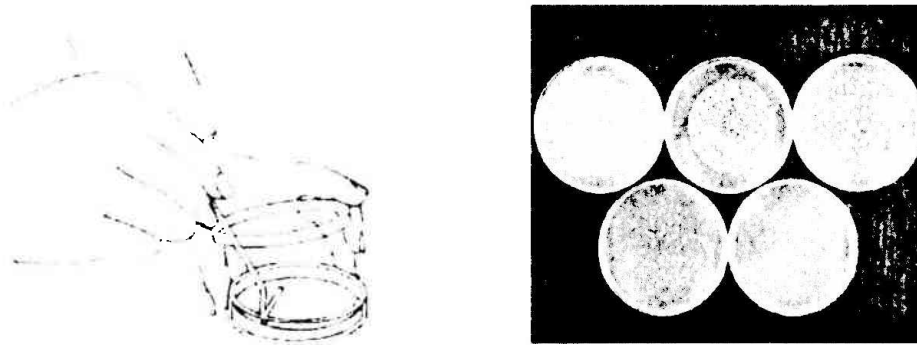
b) Kết quả thuần chủng một số vi khuẩn



Hình 2.12. Thuần chủng vi sinh vật bằng que cấy vòng

b) Thuần chủng VSV bằng que trang

Nhỏ một giọt dịch huyền phù lên mặt thạch, dùng que trang vô trùng dàn đều giọt dịch này trên bề mặt môi trường thạch trong đĩa Petri 1, sau đó dùng chính que trang này tiếp tục chải lên khắp bề mặt môi trường thạch trong đĩa Petri 2, rồi đĩa Petri thứ 3, thứ 4,... ta sẽ có các khuẩn lạc VSV thuần chủng trong các đĩa Petri cuối (thường chỉ đến đĩa Petri thứ 3 đã cho kết quả tốt) (hình 2.13).



Hình 2.13. Thuần chủng vi khuẩn bằng que trang

Hai phương pháp này thuận tiện cho việc phân lập lại để thuần chủng các chủng giống bị nhiễm khi nuôi cấy giữ giống, hoặc nghi ngờ chưa thuần chủng sau khi phân lập từ các cơ chất. Tất cả các dụng cụ và các thao tác trên đây đều phải thực hiện trong điều kiện vô trùng như đã hướng dẫn ở bài 1.

*c) Cấy chuyển VSV sang đĩa Petri bằng que cấy*

Sau khi đã phân lập được các khuẩn lạc VSV thuần chủng trên đĩa Petri, dùng que cấy để cấy chuyển chúng sang các môi trường tương ứng để nghiên cứu.

– Dùng que cấy vô trùng lấy một ít sinh khối VSV thuần chủng, cấy chuyển sang môi trường thạch trong đĩa Petri.

Có thể dùng phương pháp cấy chấm điểm, hoặc cấy zíc zắc (hình 2.14) tùy vào mục đích nghiên cứu.



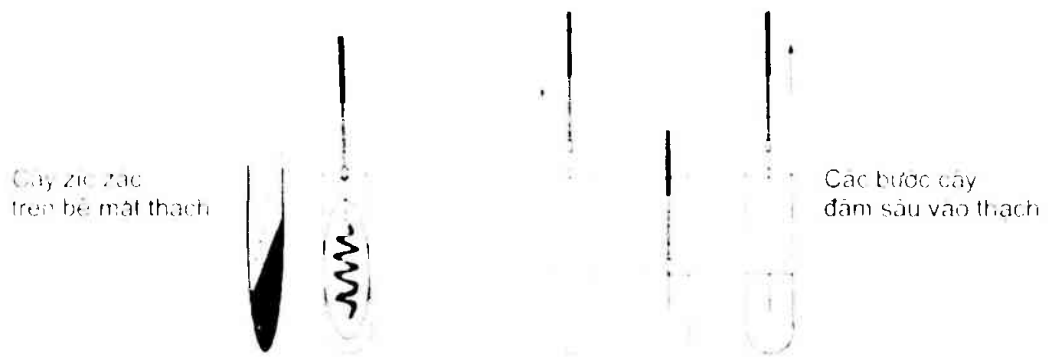
Hình 2.14. Cấy chuyển sang đĩa Petri bằng que cấy

*d) Cấy chuyển VSV sang các ống nghiệm bằng que cấy*

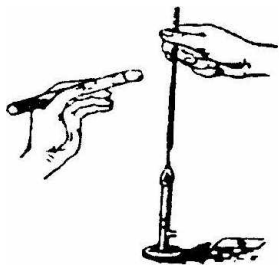
Khi nuôi VSV trong ống nghiệm có thể cấy trong môi trường dịch thể, có thể cấy đâm sâu vào môi trường thạch đứng hoặc cấy trên bề mặt môi trường thạch nghiêng.

– *Cấy chuyển từ các ống giống thuần từ môi trường thạch:*

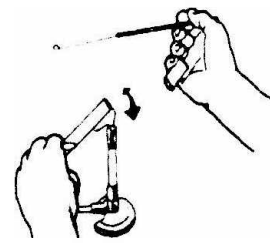
Phương pháp cấy chuyển giống thuần từ môi trường thạch được mô tả ở hình 2.15 và hình 2.16.



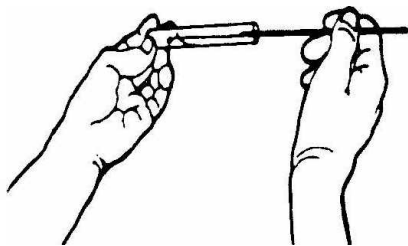
Hình 2.15 Các kiểu cây bằng que cây trên môi trường thạch trong ống nghiệm



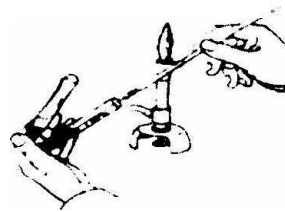
1. Cầm ống giống giữa ngón trỏ và ngón cái của bàn tay trái ở vị trí nằm ngang sao cho mặt môi trường có VSV mọc quay lên phía trên. Tay phải cầm que cây như cầm bút, khử trùng que cây trên ngọn đèn rồi để ngược gần ngọn đèn.



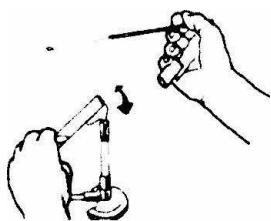
2. Dùng ngón tay út và ngón nhẫn của bàn tay phải mở nút của ống giống. Không được đặt nút ống nghiệm xuống bàn. Giữ miệng ống nghiệm gần ngọn đèn.



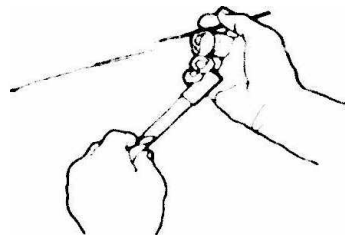
3. Để que cây nguội rồi lấy một vòng VSV từ ống giống thuần.



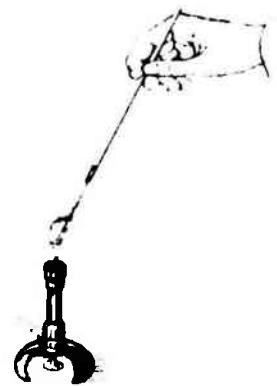
4. Cây VSV vào ống MT mới.



5. Hạ miệng ống nghiệm và nút bung trên ngọn đèn.



6. Nút ống nghiệm lại.



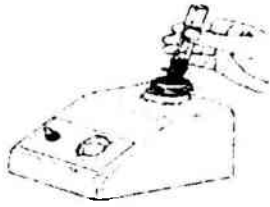
7. Khử trùng lại que cây trên ngọn đèn còn.

Hình 2.16. Kỹ thuật cấy chuyển VSV trong ống nghiệm bằng que cấy

– Cấy chuyển vi sinh vật từ môi trường dịch thể bằng pipet:

Cách cấy truyền VSV từ môi trường dịch thể sang môi trường mới như hình 2.17.





1. Trộn đều dịch huyền phù VSV bằng máy trộn dung dịch hoặc lắc nhẹ bằng tay



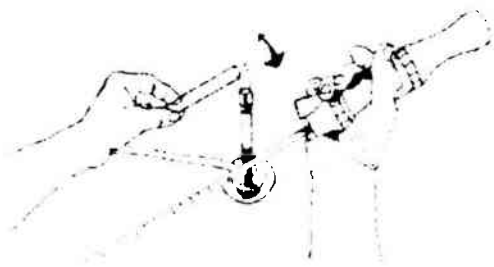
2. Dùng pipet thủy tinh đã được vô trùng



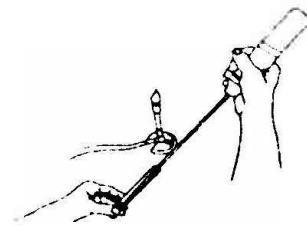
3. Gắn đầu pipet vào chuỗi có bộ phận điều chỉnh hút dịch. Nếu không có bộ phận này, có thể gắn đầu pipet bằng quả bóp cao su



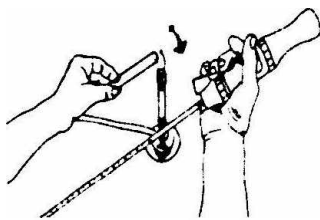
4. Dùng ngón tay út của bàn tay phải mở nút ống nghiệm chứa dịch huyền phù VSV



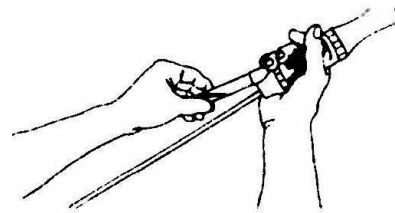
5. Hơ nhanh miệng ống nghiệm trên ngọn đèn vài lần để khử trùng



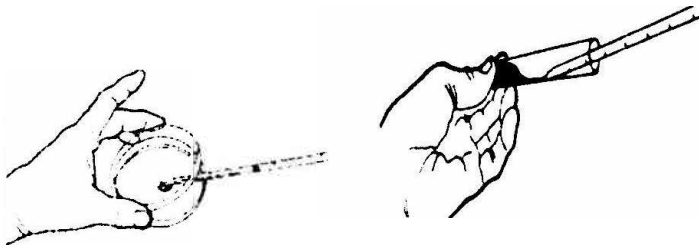
6. Dùng pipet hút dịch trong ống nghiệm



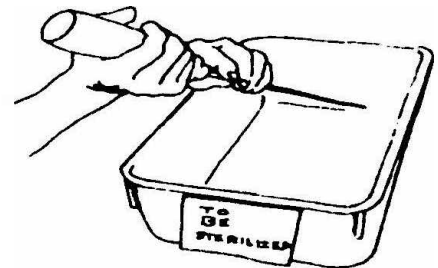
6. Khử trùng lại miệng ống nghiệm và nút bông trên ngọn đèn



7. Nút ống nghiệm gắn ngọn đèn



8. Nhỏ 1 giọt dịch từ pipet lên mặt MT thạch trong đĩa Petri hoặc vào môi trường trong ống nghiệm hoặc làm tiêu bản



9. Bỏ pipet vào nơi quy định, đem khử trùng trước khi rửa

Hình 2.17. Lấy VSV từ môi trường dịch thể bằng pipet

### 2.3. Các thí nghiệm cụ thể của bài 2

- Mỗi nhóm có 3 đĩa Petri môi trường thạch, dùng một đĩa để thuần chủng 1 loại VSV bằng que cấy: 1 đĩa dùng cấy zíc zắc, một đĩa dùng cấy chấm chấm VSV (tương ứng với môi trường đã chuẩn bị).

- Mỗi sinh viên có 3 ống nghiệm đã chuẩn bị ở bài 1: hãy cấy các VSV vào các ống nghiệm này bằng các phương pháp phù hợp trong số các phương pháp đã trình bày ở trên.

### 2.4. Hướng dẫn kiểm tra đánh giá kết quả bài thí nghiệm 2

Yêu cầu của bài 2 là nắm vững các thao tác vô trùng trong thực hành VSV, kỹ thuật phân lập và nuôi cấy VSV.

Để kiểm tra các thao tác vô trùng, giáo viên cần trực tiếp kiểm tra thao tác của từng sinh viên hoặc qua các kết quả cấy chuyển VSV sang ống môi trường mới. Ống mới thu được phải thuần, không bị nhiễm các VSV khác do thao tác vô trùng kém.

Kết quả phân lập đạt yêu cầu khi phân lập trên môi trường đặc trưng dành cho từng nhóm VSV thì chủ yếu là nhóm VSV đó mọc. Các KL phải tách biệt nhau, số KL trên 1 đĩa Petri không được vượt quá 250 – 300 và không ít dưới 30 KL.

Kết quả cấy chuyển: VSV phải thuần, không nhiễm, đường cấy phải gọn và đẹp.

- Sinh viên cần nắm bài tường trình, ví dụ như ở bảng sau:

Thí nghiệm	Phương pháp sử dụng	Độ pha loãng mẫu	Kết quả
I. Phân lập VSV	?	?	<ul style="list-style-type: none"><li>- Nhận biết sơ bộ các loại VSV thông thường: vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc, nấm men (quan sát hình thái KL).</li><li>- Vẽ mô tả loại KL của từng nhóm VSV (nấm men, nấm mốc, vi khuẩn, xạ khuẩn) phân lập được.</li><li>- Nhận xét các kết quả phân lập (thành công hay thất bại), biện luận các kết quả.</li></ul>

2. Cây chuyên VSV	?	?	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Loại VSV cây, nhận xét sự sinh trưởng của các loại VSV này:</li> <li>- Trên môi trường thạch nghiêng theo đường cấy lúc đầu, VSV mọc tốt xấu, mọc theo đường cấy, mọc tràn ra ngoài đường cấy...</li> <li>- Trên môi trường dịch thể: sự biến đổi màu của môi trường, vị trí mọc của VSV, giải thích kết quả của phương pháp nuôi cấy này.</li> <li>- Cây đâm sâu vi khuẩn trong thạch: có mọc hay không mọc, mức độ mọc, giải thích tại sao lại có kết quả này.</li> </ul>
-------------------	---	---	--

- Giáo viên cần nêu ra một số câu hỏi kiểm tra sự nhận thức các kiến thức cơ bản của bài, kiểm tra trực tiếp các kết quả thí nghiệm của từng sinh viên, phân tích sự thành bại của các thí nghiệm để giúp họ hiểu kỹ bài hơn.

## 2.5. Một số câu hỏi

1. Có phải trên các môi trường dành cho vi khuẩn có thành phần như trình bày trong bài chúng ta sẽ thấy chỉ có các vi khuẩn mọc không, vì sao? Hãy đặt câu hỏi tương tự như vậy và trả lời đối với các môi trường dành cho nấm men, xạ khuẩn, nấm.

2. Tại sao khi cấy VSV lên mặt môi trường trong ống nghiệm ta phải cầm ống nghiệm ngang mà không cầm thẳng đứng?

3. Tại sao phải khử trùng que cấy trước và sau khi cấy VSV?

4. Khái niệm VSV thuần chủng, tầm quan trọng của việc thuần chủng VSV?

5. Những đặc điểm nào nói lên hình thái của khuẩn lạc VSV?

6. Tại sao ta lại phải hở miệng ống nghiệm gần ngọn lửa đèn khi mở nút?

7. Những dấu hiệu nào cho biết có sự sinh trưởng của VSV trong môi trường dịch thể?

8. Tại sao phải khử trùng mặt bàn trước và sau khi thực hành?

9. Hãy giải thích vì sao trong cùng một KL, VSV thường sinh trưởng mạnh ở vùng mép, chậm nhất ở tâm KL?

### III. PHÂN NỘI DUNG THAM KHẢO

#### 3.1. Phân lập một số vi sinh vật thông thường

##### 3.1.1. Phân lập một số loài thuộc chi *Bacillus*

Chi *Bacillus* gồm các VK hiếu khí sinh bào tử chịu nhiệt. Vì thế, để phân lập được các loài thuộc chi *Bacillus* một cách dễ dàng, người ta thường đun sôi mẫu phải lập 15 phút để loại bỏ các VSV không sinh bào tử, sau đó dùng các môi trường thích hợp để phân lập.

##### 3.1.2. Phân lập *Bacillus subtilis* (trực khuẩn cỏ khô)

Dùng dao (kéo) cắt nhỏ cỏ khô cho vào bình nón, thêm nước sạch vừa ngập cỏ khô, bổ sung thêm một ít phân chuồng, đun sôi 15 – 20 phút. Đậy nút bông và để ở tủ ấm ở 37°C trong 2 – 3 ngày.

Trên bề mặt lớp dịch cỏ khô sẽ tạo thành các váng màu xám đỏ chính là vi khuẩn *B. subtilis*. Dùng que cấy vòng lấy váng này phân lập trên bề mặt môi trường thạch trong đĩa Petri. Sau khi nuôi cấy, trên bề mặt môi trường sẽ xuất hiện các khuẩn lạc *B. subtilis* hình dẹt nhàn nheo, bề mặt gấp nếp. Tế bào *B. subtilis* có hình gậy mảnh ( $0.8 - 1.2\mu\text{m}$ )  $\times$  ( $1.0 - 10\mu\text{m}$ ), hai đầu thường tròn, đứng đơn hoặc xếp hàng chuỗi. Bào tử hình ôvan nằm ở trung tâm hoặc lệch tâm tế bào, ít khi làm ế bào phồng lên tại chỗ có bào tử.

##### 3.1.3. Phân lập *B. mesentericus* (trực khuẩn khoai tây)

– Chuẩn bị môi trường miếng khoai tây: Chọn củ khoai tây không bị bệnh, rửa sạch, không gọt bỏ vỏ rồi ngâm vào dung dịch 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  trong 2 phút để trung hòa axit có trong khoai tây.

– Thái ngang củ khoai tây thành các lát dày 2 – 3mm, rắc một lớp mỏng bột phải viết bằng, hoặc bột  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  lên bề mặt các miếng khoai tây. Hấp cách thủy 30 phút, rồi đặt vào hộp Petri đã lót sẵn một miếng giấy lọc vô trùng. Sau đó để ở tủ ấm ở 37°C trong 2 – 3 ngày. Trên bề mặt miếng khoai tây sẽ xuất hiện các KL dạng màng nhàn nheo đó là *B. mesentericus*. Có thể tiếp tục thuần chủng bằng que cấy vòng trên môi trường MPA ta sẽ có các khuẩn lạc *B. mesentericus* hình tròn nhàn nheo, mép khuẩn lạc hình răng cưa. Tế bào của *B. mesentericus* hình gậy kích thước (1,5 – 5,0mm). Các loại *Bacillus* thường gặp khác như *B. mycooides*, hay *B. megatherium* có thể dễ dàng phân lập từ đất sau khi đã xử lý ở 100°C trong 15 – 20 phút trên môi trường MPA.

### 3.1.4. Phân lập *Clostridium*

Chi *Clostridium* cũng sinh bào tử, song khác với *Bacillus*, *Clostridium* là VK kỵ khí tuyệt đối nên ngoài thao tác xử lý nhiệt phải phân lập trong điều kiện kỵ khí.

Đổ môi trường vô trùng vào các ống nghiệm. Lấy 1ml dịch pha loãng đất đưa vào môi trường thạch nóng chảy có bổ sung thêm 1g natri tioglicolat hoặc cystein làm chất khử oxi ở trong ống nghiệm. Đun sôi cách thủy 15 – 20 phút để loại bỏ các VSV không sinh bào tử, sau đó làm nguội nhanh môi trường để đuổi hết oxi tự do. Đổ thêm môi trường vô trùng vào cho đầy ống nghiệm. Đậy nút cao su cho kín, tạo điều kiện kỵ khí. Để vào tủ ấm 48 giờ ở 37°C. Trong môi trường thạch sẽ xuất hiện các KL nhỏ của *Clostridium*.

### 3.1.5. Phân lập *Staphylococcus*

*Staphylococcus* là VK kỵ khí không bắt buộc. Để phân lập được *Staphylococcus* trước hết cần làm giàu bằng cách ủ với môi trường Manitol chứa 7% NaCl trong điều kiện kỵ khí 48 giờ (ở điều kiện này sẽ ức chế sự phát triển của *Bacillus* và *Micrococcus* hiếu khí). Sau đó phân lập trên môi trường MPA trong đĩa Petri. Soi KHV, nhuộm Gram, kiểm tra khả năng sinh catalaza và lên men glucôzơ. Nếu các VK phân lập được là các cầu khuẩn G<sup>+</sup>, có hoạt tính catalaza, có khả năng lên men glucôzơ thì đó là các loài của chi *Staphylococcus*.

### 3.1.6. Phân lập *Pseudomonas*

*Pseudomonas* là các trực khuẩn G<sup>-</sup> hiếu khí, không chịu tác động của penixilin và cyclohexamid. Vì thế, để hạn chế sự sinh trưởng của các VK G<sup>+</sup> người ta bổ sung penixilin và cyclohexamid vào môi trường phân lập.

– Lấy 1g mẫu đất hoặc cơ chất định phân lập cho vào 20ml môi trường dinh dưỡng lỏng ở 20°C trong 24 giờ.

– Phân lập bằng que cấy vòng trên môi trường thạch chứa Penixilin, Nôvôbiôxin và cyclohexamid chống nấm. Để ở 28 – 30°C trong 48 giờ.

– Khi các KL mọc trên môi trường thạch chứa kháng sinh, tiến hành nhuộm Gram, thử hoạt tính oxidaza, thử khả năng lên men glucôzơ. Nếu là VK G<sup>-</sup> có hoạt tính oxidaza, không lên men glucôzơ đó là *Pseudomonas*.

### 3.1.7. Phân lập các vi khuẩn *Lactic*

Vi khuẩn lactic là các VK G<sup>+</sup>, hầu hết không có catalaza, không sinh bào tử, thường là các VK vi hiếu khí và kỵ khí không bắt buộc. Thường gặp nhiều trong các sản phẩm lên men, trong đường ruột của người và động vật.

Đặc điểm của VK lactic là không có xitôcrôm bởi thế nó không bị ức chế bởi natri azit (NaN<sub>3</sub>), vì vậy người ta thường cho thêm chất này vào để ức chế bớt các VSV có xitôcrôm.

Trước khi phân lập cần tiến hành ủ trên môi trường làm giàu để làm tăng số lượng cá thể vi khuẩn này, sau đó dùng môi trường phân biệt dành cho VK lactic để phân lập.

Quy trình phân lập:

- *Làm giàu số lượng VK lactic:*

Lấy hai ống nghiệm chứa môi trường cao nấm men và 0,005% (50 ppm) Na – azit (nếu muốn phân lập các *Lactobacillus* cần dùng môi trường APT – Azit natri chứa 0,01% cyclohexamid), cho vào đó 1g đất hoặc 5 thìa cà phê sữa chua, nước dứa chua...), đổ lên bề mặt môi trường một lớp sáp hoặc dầu khoáng, ủ ở nhiệt độ tương ứng. Mẫu lấy phân lập trong 24 – 48 giờ.

Dùng một trong những phương pháp phân lập ở bài 2 để phân lập, sử dụng môi trường APT thạch có chứa 50ppm NaN<sub>3</sub>, 100ppm Cyclohexamid và 0,3% CaCO<sub>3</sub>, ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ như trên. Sau khi xuất hiện các KL với vòng phân giải CaCO<sub>3</sub>, tiến hành phản ứng catalaza, chọn các KL catalaza âm tính. Lấy các KL này cấy trở lại trên môi trường dịch thể APT – azit, sau đó dùng phương pháp thuần chủng bằng que cấy vòng hoặc que trang.

- *Test khẳng định:*

Sau khi có các KL thuần, tiến hành nghiên cứu để khẳng định đó là VK lactic với các đặc điểm đặc trưng: G<sup>+</sup>, không sinh bào tử, cầu khuẩn (song cầu, tứ cầu và liên cầu) hoặc hình gậy (đơn hoặc chuỗi).

Cũng có thể dùng môi trường MRS (Maltose - de Man Rogosa Sharpe: M - MRS) để phân lập VK lactic. Đây là môi trường chọn lọc dành phân lập VK lactic từ sữa chua.

### **3.2. Phân lập phage kí sinh trên *E. coli* (*E. coli* phage) từ nước cống**

*Phage* có thể phân lập được từ nhiều mẫu cơ chất trong thiên nhiên bởi vật chủ của chúng là vi khuẩn, nhất là trên *E. coli*. *E. coli* có mặt nhiều ở trong đường ruột của động vật máu nóng, trong phân của chúng. Nước thải chưa xử lí chính là nguồn chứa nhiều *E. coli* và *E. coli* phage.

a) Nguyên tắc chung: Để phân lập được *E. coli* phage, trước tiên, nước cống được thu thập, bổ sung thêm vật chủ là *E. coli*, ủ ở 37°C, sau đó lọc qua phin lọc (0,45µm hoặc 0,22µm), thu dịch lọc, diệt các tế bào vi khuẩn khác có khả năng qua lọc bằng chlorofooc. Ta thu được dịch lọc chứa *E. coli* phage, dịch này có thể cất giữ ở tủ lạnh nhiều tháng.

Tiến hành phân lập *E. coli* phage từ dịch lọc bằng cách tiếp tục trộn với *E. coli* vật chủ, sau đó cấy trải dịch trộn này trên môi trường thạch dành cho *E. coli*. Trong thực tế, người ta thường dùng phương pháp 2 lớp thạch: đầu tiên đổ vào đĩa Petri một lớp thạch dinh dưỡng dành cho *E. coli* (lớp thạch nền), mặt khác, trộn dịch lọc với *E. coli* vào môi trường thạch khác, sau đó đổ lên bề mặt lớp thạch nền, tạo thành lớp thạch bề mặt. Trong quá trình nhân lên, virus có mặt trong thạch bề mặt sẽ tấn công các tế bào *E. coli* lân cận, tạo thành các đám tế bào bị tan (vết tan – Plaque). Mỗi vết tan tế bào này được coi là do một hạt virus lúc đầu gây ra, vì thế, đơn vị gây tan tế bào được gọi là PFU (plaque forming unit – PFU).

Lấy vùng tế bào chết này cấy lên môi trường mới chứa *E. coli* chúng ta sẽ thu được *E. coli* phage.

#### b) Quy trình phân lập:

– Giai đoạn cấy làm giàu phage gồm các bước sau (xem hình 2.18):

1. Lấy 25ml nước cống, li tâm 10 phút ở 3000 – 4000v/p, thu dịch nổi.
2. Lọc dịch nổi qua phin lọc 0,22µm loại bỏ các VSV khác
3. Lấy 20ml dịch phin lọc và 1ml dịch nuôi *E. coli* 12 giờ tuổi đã nuôi cấy ở môi trường Trypticsoy (khoảng  $10^8$ CFU/ml) cho vào 20ml môi trường T chứa trong bình tam giác 500ml, bọc bên ngoài bằng giấy nhôm.
4. Nuôi ở 35°C trong 24 giờ.

– Giai đoạn phân lập phage gồm các bước sau (hình 2.18):

5. Lọc dịch nuôi cấy *E. coli* ở bước 4 bằng phin lọc 0,45µm.
6. Lấy 8,0ml dịch lọc vào các ống nghiệm cổ nút xoay.
7. Thêm 2ml clorofooc vào mỗi ống nghiệm đó, lắc đều, thu được các ống giống phage.
8. Ống giống phage có thể dùng ngay hoặc giữ ở tủ lạnh để dùng dần.

9. Pha loãng dịch giống phage: Dùng pipet hút 1 giọt dịch giống phage (không những sau đầu pipet vào dịch môi trường giống) chuyển sang ống nghiệm tiếp theo (nhúng đầu pipet vào môi trường, bơm qua bơm lại vài lần). Thay pipet này bằng pipet khác và lặp lại như trên để pha loãng liên tiếp dịch phage theo ý muốn.

10. Sau khi pha loãng dịch phage, lấy 2 giọt dịch *E. coli* đã nuôi cấy 12 giờ ở môi trường T vào các ống môi trường lớp mặt đã làm nóng chảy và để nguội ở 48 – 50°C (dùng các pipet thủy tinh có nút bông ở 1 đầu để thực hiện thao tác này). Trong suốt quá trình thực hiện thao tác này phải giữ các ống nghiệm trong bể nước ổn nhiệt.

11. Ngay sau khi thực hiện bước 10 xong, dùng pipet vô trùng lấy 0,5ml từ ống pha loãng  $10^{-7}$  dịch phage chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường thạch lớp mặt đã cấy *E. coli* ở bước 10, lắc đều rồi đổ lên trên bề mặt lớp thạch đáy trong đĩa Petri. Nghiêng đĩa Petri đều về các phía để lớp thạch này dàn đều trên lớp đáy, để lớp thạch bề mặt đông lại.

\* *Ghi chú:* Lớp thạch đáy trong đĩa Petri được chuẩn bị trước như sau: Đun tan 12 ống nghiệm chứa 15ml môi trường thạch lớp đáy, để nguội đến 48 – 50°C, đổ vào 12 đĩa Petri, chờ cho đông lại. Sau đó để lớp thạch này khô qua đêm ở tủ ấm 35°C.

Các độ pha loãng khác cũng tiến hành tương tự như vậy.

12. Lật ngược các đĩa petri, gói lại và để vào tủ ấm từ 8 – 24 giờ. Sau đó có thể để trong tủ lạnh rồi phân tích kết quả.

### c. Phân tích kết quả

- Quan sát kỹ các đĩa petri ở bước 13, đếm số lượng các vùng tế bào bị tan (plaque).

- Dùng 1 đĩa Petri ở độ pha loãng có số plaque thích hợp (25 – 250 PFU/đĩa Petri) đếm tổng số PFU/ml nước công lúc đầu bằng công thức:

$$A = X : V : df$$

Trong đó: A là tổng số PFU/ml nước công

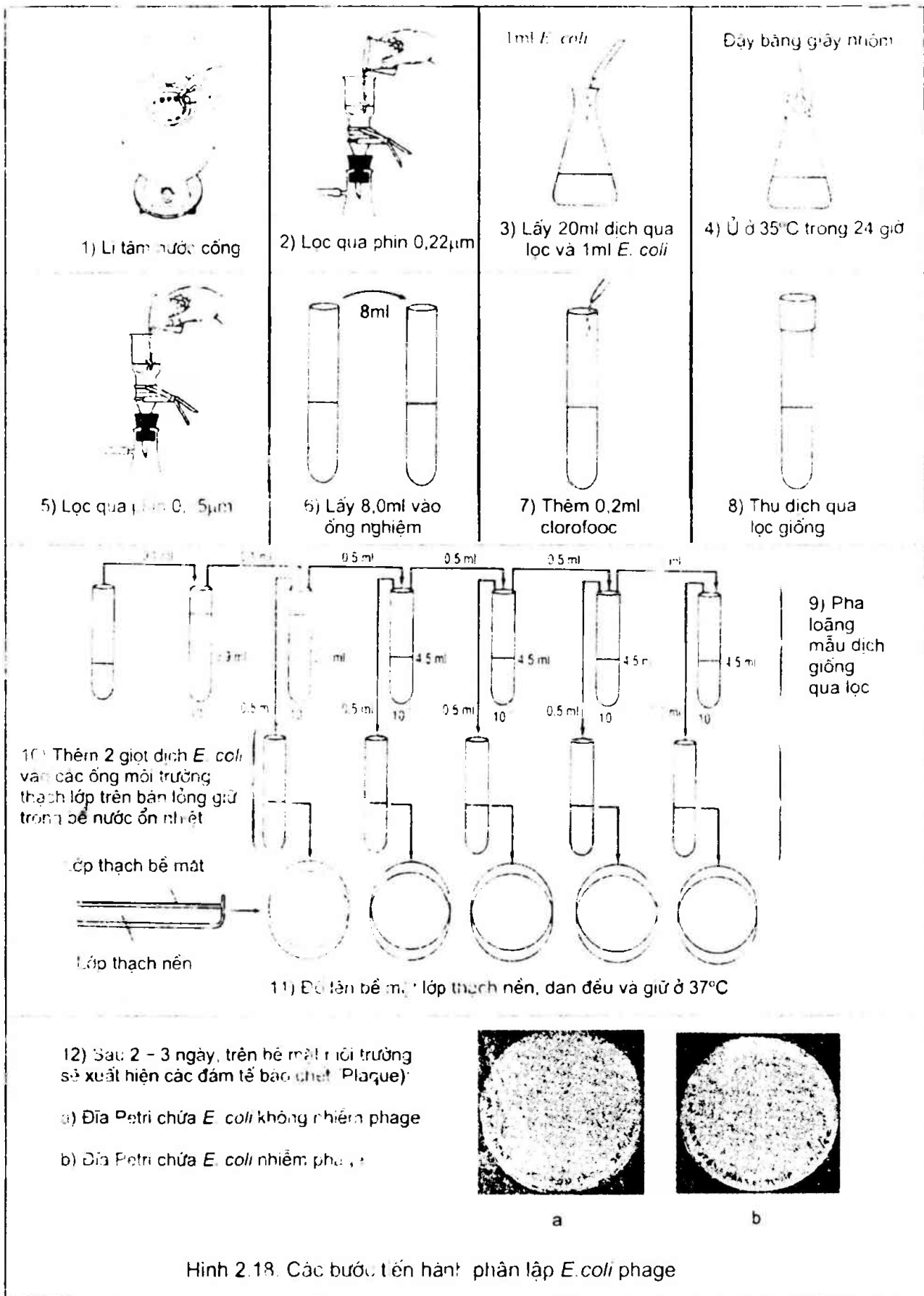
X là số PFU/đĩa Petri

df là độ pha loãng mẫu

Ví dụ: V = 0,5ml, X = 250 PFU, độ pha loãng là  $10^{-6}$

$$A = 250 : 0,5 : 10^{-6} = 500.10^6 = 5.10^8 \text{ PFU/ml}$$





# Bài 3. ĐẾM SỐ LƯỢNG VÀ ĐO KÍCH THƯỚC TẾ BÀO VI SINH VẬT

## A. MỤC TIÊU

Sau khi học xong bài này, sinh viên có được các kĩ năng sau đây:

- Đếm được số lượng tế bào VSV bằng các phương pháp khác nhau.
- Đo được kích thước tế bào VSV dưới KHV.

## B. NỘI DUNG

### I. PHƯƠNG PHÁP ĐẾM SỐ LƯỢNG TẾ BÀO VI SINH VẬT

Đếm số lượng tế bào VSV là một trong những phương pháp được sử dụng nhiều trong nghiên cứu VSV, đặc biệt là khi nghiên cứu sự sinh trưởng của chúng.

Có nhiều phương pháp đếm số lượng tế bào VSV. Ta có thể chia thành 3 nhóm:

- Phương pháp đếm gián tiếp: đếm số lượng tế bào sống khi nuôi cấy trên môi trường thạch, trên phin lọc vi khuẩn...
- Phương pháp đếm trực tiếp: bằng phòng đếm tế bào.
- Phương pháp đo độ đục của sinh khối (phương pháp cho kết quả nhanh song không phân biệt được tế bào sống hay tế bào chết).

#### 1.1. Phương pháp đếm số lượng tế bào sống trên đĩa thạch

Số lượng tế bào sống trong các mẫu cơ chất phân lập trên môi trường dinh dưỡng đặc được biểu thị bằng đơn vị CFU (Colony Forming Unit = đơn vị hình thành khuẩn lạc). Mỗi CFU (một khuẩn lạc) được hình thành từ sự sinh trưởng của một tế bào (hay bào tử) lúc đầu của một loại VSV trên môi trường dinh dưỡng thạch, mà mắt thường có thể nhìn thấy.

##### a. Vật liệu

Trong bài thực hành này, sử dụng kết quả phân lập VSV đạt ở bài 2 để đếm số lượng VSV sống.

##### b. Phương pháp đếm

Tiến hành pha loãng mẫu và phân lập như phương pháp phân lập VSV đạt trên môi trường thạch ở phần 3.1 của bài 2. Sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ và thời gian thích hợp trong tủ ẩm đem ra đếm số lượng khuẩn lạc VSV mọc trong một đĩa Petri, từ đó tính ra số lượng tế bào trong 1g (hay 1ml) cơ chất lúc đầu theo công thức:

$$N = (A : V) : Df$$

Trong đó: N là tổng số CFU/gam (hoặc 1ml) mẫu cơ chất đem phân tích; A là số CFU trung bình đếm được trên một đĩa Petri ở độ pha loãng nhất định (n); V là thể tích mẫu cấy trên một đĩa Petri; Df: độ pha loãng mẫu (n lần).

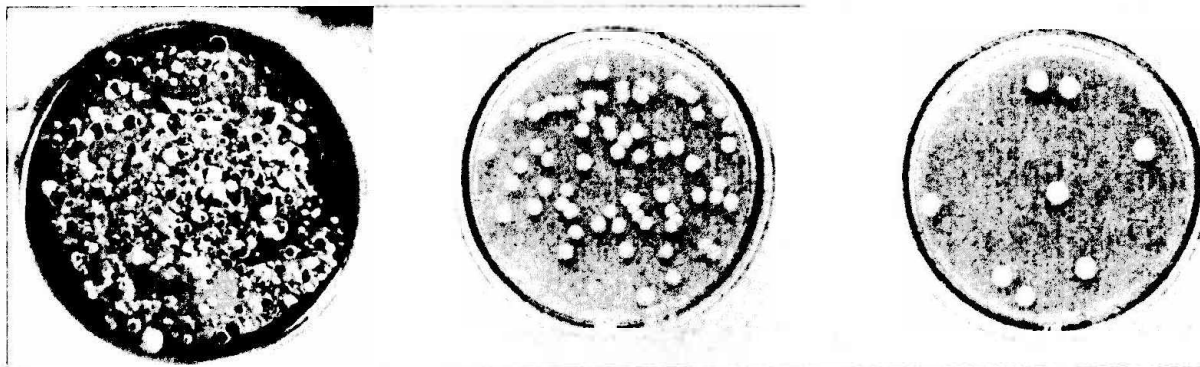
Ví dụ: Khi phân lập 0,1ml dịch huyền phù đất ở độ pha loãng  $10^{-6}$ , ta đếm được 45 CFU/đĩa Petri

$$\text{Ta có: } N = 45 : 0,1 : 10^{-6} = 45 \times 10^7 \text{ CFU/g (ml)}$$

Trong một số trường hợp phải tính số lượng VSV trên 1g cơ chất khô, lúc đó ta phải biết 1g cơ chất đem phân lập chứa bao nhiêu phần trăm nước, hay nói một cách khác, trọng lượng khô của chất có trong 1 gam đem phân lập. Ví dụ, ta lấy đất vườn để phân lập (đất ẩm), khi sấy khô 1g đất đó ta chỉ có 0,9 gam đất, còn 0,1g là nước đã bay hơi. Vậy ta có thể tính được số CFU vi sinh vật trong 1g đất khô là:

$$N = 45 \times 10^7 : 0,9 \times 1 = 50 \times 10^7 \text{ CFU/g (khô)}$$

Số khuẩn lạc trên một đĩa Petri được coi là thích hợp để tính tổng CFU nếu khi cấy 0,1ml dịch pha loãng mẫu có khoảng từ trên 30 và nhỏ hơn 300 khuẩn lạc trên môi trường thạch. Nếu số lượng này nhỏ hơn 10 hoặc lớn hơn 300 thì kết quả phải loại bỏ. Hình 3.1 minh chứng mật độ thích hợp để tính tổng CFU/g mẫu phân tích.



a) Số lượng KL qua nhiều

b) Số lượng KL trung bình

c) Số lượng KL qua ít

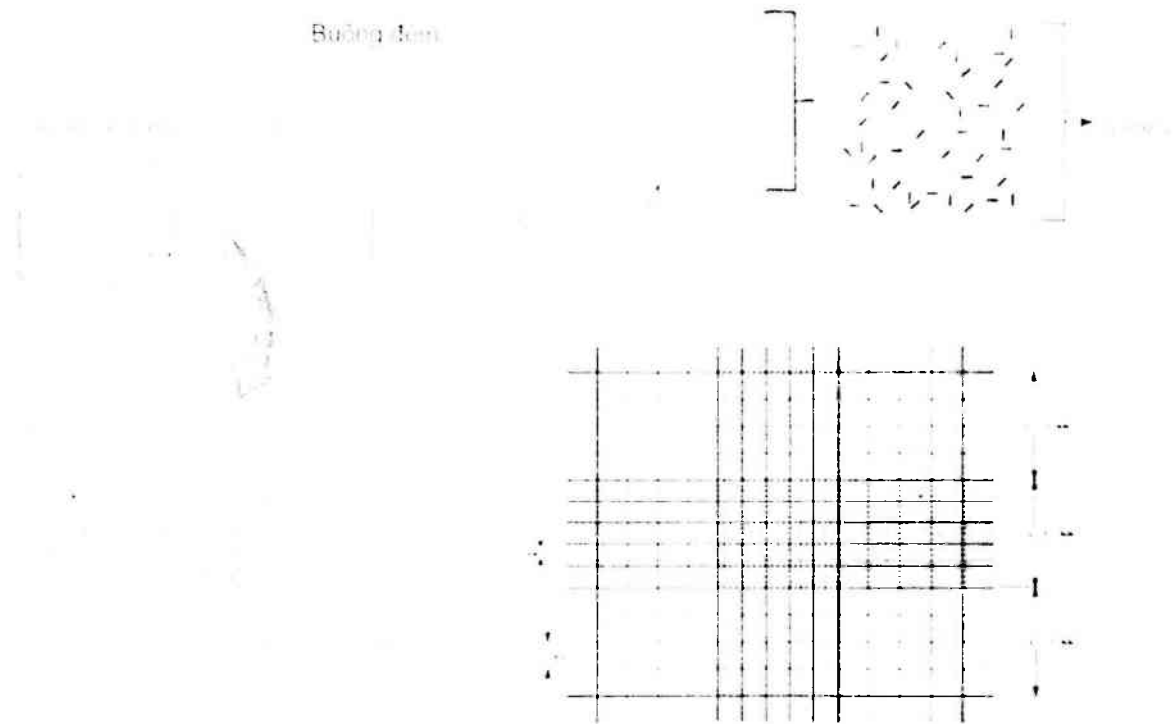
Hình 3.1. Mật độ khuẩn lạc trên môi trường thạch

## 1.2. Đếm số lượng tế bào bằng phòng đếm

Đây là phương pháp đếm trực tiếp số lượng tế bào VSV có trong mẫu phân tích và là phương pháp được sử dụng nhiều nhất. Phương pháp này không những cho phép đếm được số tế bào VSV mà còn phân biệt các tế bào chết và tế bào sống nếu trước đó tế bào được nhuộm màu. Tế bào chết sẽ bắt màu đậm hơn tế bào sống do tính thấm thấu chọn lọc của màng tế bào bị mất. Có thể dùng buồng đếm hồng cầu của Thom – Goriaep (đếm cả tế bào nhân chuẩn và nhân sơ) hoặc buồng đếm Petroff Housser (chỉ dùng đếm tế bào nhân sơ, xem hình 3.2).

Lá kính

Buồng đếm



Hình 3.2. Cấu tạo buồng đếm Petroff – Housser

Các buồng đếm đều có cấu tạo là một phiến kính dày, ở giữa có xẻ một rãnh sâu, trên rãnh này có một buồng đếm hình vuông với diện tích là  $1\text{mm}^2$  chia thành 25 ô lớn. Mỗi ô lớn này lại chia ra 16 ô nhỏ. Như vậy, buồng đếm này có tổng số 400 ô nhỏ. Độ sâu của buồng đếm Petroff Housser là  $0,02\text{mm}$  cho nên thể tích của toàn buồng đếm sẽ là  $1\text{mm}^2 \times 0,02\text{mm} = 0,02\text{mm}^3$ , vì thế thể tích của một ô lớn sẽ là  $0,0008\text{mm}^3 = 1/1250\text{mm}^3 = 1/1250000\text{cm}^3 = 1/1250000\text{ml}$ . Buồng đếm hồng cầu có độ sâu là  $0,1\text{mm}$ , thể tích toàn buồng đếm sẽ là  $1\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3$ , thể tích 1 ô lớn bằng  $0,004\text{mm}^3$ .

#### ***a. Vật liệu, hóa chất, dụng cụ***

- 1 buồng đếm;
- 1 ống năm men, hoặc vi khuẩn, hoặc bào tử xạ khuẩn hoặc nấm mốc;
- 4 ống nghiệm chứa 9ml nước cất để pha loãng mẫu;
- Pipet;
- Lá kính;
- Thuốc nhuộm tế bào (xanh methylen hoặc fucsín loãng).

**b. Cách đếm (Hình 3.3)**

– Pha loãng dịch huyền phù VSV đến  $10^{-6}$  (có thể nhuộm dịch huyền phù trước khi pha loãng bằng thuốc nhuộm thích hợp, bằng cách nhỏ vào ống dịch mẫu 1 giọt thuốc nhuộm).

– Nhỏ một giọt dịch huyền phù VSV ở độ pha loãng (n) vào giữa khung đếm và đáy lá kính. Di chuyển nhẹ khung đếm cho dịch chiếm đầy khoang. Phần dịch thừa sẽ trào ra hai rãnh bên. Có thể dùng vazơlin để cố định lá kính.

– Đếm số lượng tế bào trong các ô theo đường chéo hoặc theo các góc ở trung tâm khung đếm. Khi đếm nếu tế bào nằm ở ranh giới giữa hai ô thì quy ước chỉ đếm các tế bào nằm ở cạnh trên và phía bên trái của ô đó. Thường đếm khoảng 4 – 5 ô lớn ở trung tâm của khung đếm để tính số lượng tế bào trung bình của 1 ô lớn. Sau đó dùng công thức sau để tính số tế bào trong 1ml lúc đầu:

$$N = A \times 25 : V : n$$

Trong đó: N – số lượng tế bào trong 1ml dịch huyền phù lúc đầu;

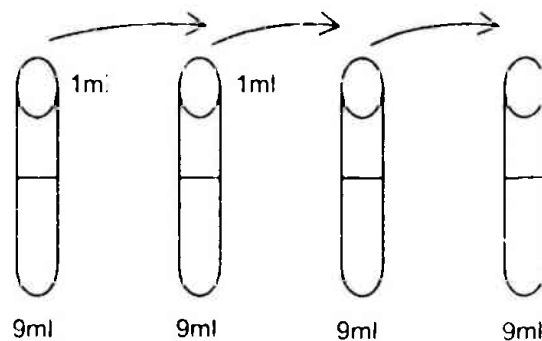
A – số lượng tế bào trung bình trong 1 ô lớn;

V – thể tích của 1 ô lớn;

n – là độ pha loãng của mẫu ( $10^{-n}$ );

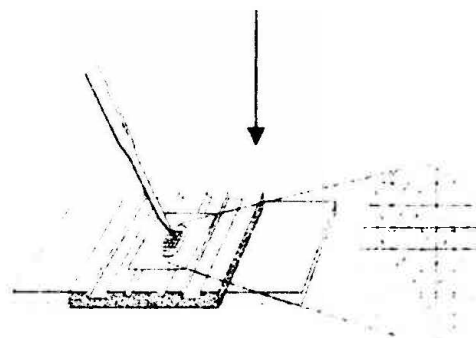
25 là số ô lớn của toàn khung đếm.

Bước 1. Pha loãng mẫu tới hạn, nếu cần có thể nhuộm màu



Bước 2. Nhỏ dịch ở độ pha loãng nhất định lên khung đếm cho đầy ô đếm, đáy lá kính lên ô đếm, tránh tạo bọt khí

Bước 3: Lúc đầu soi ở vật kính  $\times 10$ , sau đó chuyển sang vật kính  $\times 40$ , đếm số tế bào trong 3 – 5 ô lớn ở vùng trung tâm, tính giá trị trung bình



Hình 3.3. Đếm số lượng tế bào bằng buồng đếm Petroff - Housser

*Ví dụ:* Khi đếm trong 1 ô lớn của buồng đếm có 28 tế bào tu dịch pha loãng  $10^{-5}$ , số tế bào trong 1ml dịch nghiền của béc đái sẽ là:

$$N = (28 \times 25) : 2 \times 10^{-5} : 10^{-2} = 350 \cdot 10^{-3} = 35 \cdot 10^{-2} \text{ tế bào/ml}$$

*Lưu ý:* Người ta cũng có thể tính số tế bào đếm được trong 1 ô nhỏ, sau đó nhân với 400 ô nhỏ rồi chia cho thể tích của buồng đếm và độ pha loãng mẫu.

## II. ĐO KÍCH THƯỚC TẾ BÀO VI SINH VẬT DƯỚI KÍNH HIỂN VI

Kích thước tế bào VSV thường được biểu thị bằng micromet ( $\mu\text{m}$ ) =  $10^{-6}$  mm =  $10^{-9}$  m, hoặc bằng nanomet (1n =  $10^{-9}$  m), hoặc angstrom (1A<sup>o</sup> =  $10^{-10}$  m).

Để đo được kích thước của tế bào VSV phải dùng đến KHV và 2 thước đo: Thước đo thị kính (trắc vi thị kính) và thước đo vật kính (trắc vi vật kính).

Trắc vi thị kính được làm bằng thủy tinh hoặc bằng chất nhựa tổng hợp cao cấp, trong suốt, ở chính giữa có một thước nhỏ chia thành 10 khoảng lớn, 10 khoảng lớn này lại chia thành 50 khoảng nhỏ bằng nhau (hình 3.4a). Giá trị của các khoảng này được xác định nhờ trắc vi vật kính.

Trắc vi vật kính là tấm kim loại ở giữa có miếng thủy tinh tròn, trên đó có một thước nhỏ dài 2,2mm và được chia thành các khoảng chia chính, mỗi khoảng có độ lớn là 0,1mm (100 $\mu\text{m}$ ). Hai trong số các khoảng chia chính này được chọn làm khoảng đánh dấu và được chia nhỏ thành 20 khoảng nhỏ, mỗi khoảng chia nhỏ này có giá trị là 0,01mm hay 10 $\mu\text{m}$  (hình 3.4b).

Giá trị của các khoảng đo của trắc vi thị kính ở mỗi độ phóng đại của kính được xác định dựa trên trắc vi vật kính. Cách xác định như sau:

- Tháo thấu kính trên của thị kính ra, lắp trắc vi thị kính vào đó sao cho các vạch chia của thước đo nằm ở mặt dưới

- Đặt thước đo vật kính lên bàn kính nơi vẫn thường để tiêu bản.

- Dùng vật kính có bội giác nhỏ lay tiêu cự và dịch thước đo vật kính vào giữa trường kính.

- Quay trắc vi thị kính sao cho các vạch chia trên thước đo của nó nằm song song với các vạch chia của vật kính. Điều chỉnh sao cho một vạch chia đầu tiên phía bên trái của trắc vi thị kính trùng khít vạch đánh dấu thứ 2 của trắc vi vật kính (hình 3.4c).

- Đếm số vạch của trắc vi thị kính nằm trong khoảng cách từ vạch trùng khít đầu tiên với trắc vi vật kính đến vạch trùng khít thứ hai tiếp sau đó của hai thước đo (hình 3.4c). Từ đó ta có thể tính được một khoảng chia của thị kính là bao nhiêu micromet ( $\mu\text{m}$ ).

a. Thước đo trên trắc vi thị kính: gồm 50 khoảng đo chưa rõ kích thước

b. Thước đo trên trắc vi vật kính: Thước đo có độ dài 2,2mm chia thành 22 khoảng đo lớn (mỗi khoảng có độ lớn 0,1mm). 2 khoảng đầu trong số đó mỗi khoảng lại được chia nhỏ thành 10 khoảng nhỏ (mỗi khoảng có độ lớn 0,01mm), dùng làm các ô đánh dấu.



c. Đặt vạch đầu tiên phía bên trái thước đo của trắc vi thị kính lên vạch cuối của phân đánh dấu trên thước đo của trắc vi vật kính. Tìm điểm trùng khít của các vạch chia trên trắc vi vật kính và trắc vi thị kính. Tính số vạch chia của thước đo thị kính tương ứng với số vạch chia trên thước đo vật kính trong khoảng trùng khít này, từ đó tính giá trị của mỗi khoảng chia của trắc vi thị kính.

Hình 3.4. Cấu tạo và cách tính giá trị mỗi khoảng đo trắc vi thị kính dựa trên giá trị của trắc vi vật kính (nguồn: B.E. Pierce & M.J. Leboffe, 1999)

Ví dụ: Trên hình, điểm trùng khít thứ nhất của hai thước đo tính từ điểm đánh dấu là tại 0,8mm của trắc vi vật kính, ứng với 25 đơn vị trên trắc vi thị kính. Điểm trùng khít thứ hai tính từ điểm đánh dấu là 1,5mm và ứng với 47 vạch chia trắc vi thị kính (hình 3.4.c).

Ghi tất cả những kết quả này vào bảng 3.1

Bảng 3.1. Các giá trị tương ứng giữa trắc vi thị kính và trắc vi vật kính

Trắc vi thị kính	Trắc vi vật kính
0,8mm	25 đơn vị vạch thước đo vật kính
1,5mm	47 đơn vị vạch thước đo vật kính

Để tính được độ dài của mỗi đơn vị chia trên trắc vi thị kính ta lấy độ dài khoảng cách của hai thước đo trên trắc vi vật kính chia cho số đơn vị tìm được trên trắc vi thị kính ( $\mu\text{m}$ ).

Ví dụ:

$$\frac{0,8\text{mm}}{25 \text{ đơn vị trắc vi thị kính}} = 0,032\text{mm}/\text{đơn vị trắc vi thị kính} = 32\mu\text{m}$$

Tương tự:

$$\frac{1,5\text{mm}}{47 \text{ đơn vị trục vi thị kính}} = 0,0319 \text{ mm/đơn vị trục vi thị kính} = 32\mu\text{m}$$

- Bỏ vật kính ra, thay thế tiêu bản VSV vào bản kính, xác định kích thước của VSV nhờ trục vi thị kính.

Khi đo các tế bào hình cầu ta đo đường kính tế bào, còn khi đo tế bào hình gậy thì đo chiều ngang và chiều dài của tế bào.

Ví dụ: Nhìn tiêu bản tế bào trong sợi nấm *Aspergillus* thấy chiều dài tế bào của nó nằm trong 1 khoảng chia của thước đo thị kính, vì thế kích thước của nó là  $32\mu\text{m}$ , còn chiều ngang của nó nằm trong khoảng 0,25 khoảng chia trên thị kính, vậy kích thước của nó là  $0,25 \times 32\mu\text{m} = 8\mu\text{m}$ .

*Lưu ý:* Trên đây là ví dụ cách tính độ dài của khoảng đo trục vi thị kính khi dùng ô vật kính bội giác nhỏ (thị kính  $\times 10$ , vật kính  $\times 4$ ). Mỗi lần thay đổi thị kính và vật kính với các bội giác khác nhau thì phải tính lại giá trị mỗi khoảng chia của trục vi thị kính.

#### \* Một số câu hỏi

1. Khi đếm tổng số lượng VSV có mặt trong 1 gam cơ chất bằng phương pháp đếm gián tiếp trên môi trường thạch đĩa chỉ cho kết quả tương đối không phản ánh số lượng thực của tất cả các loài VSV có trong đó, hãy giải thích vì sao.

2. Giả sử khi phân lập 0,1ml dịch đất bằng phương pháp trải dịch pha loãng liên tục trên môi trường thạch đĩa, từ đó pha loãng  $10^{-2}$  thu được 800 khuẩn lạc/đĩa,  $10^{-3}$  được 78 CFU/đĩa,  $10^{-4}$  thu được 6 CFU/đĩa. Tính số lượng tế bào trong 1 gam lúc đầu? Đây là số tế bào có thể chấp nhận?

### III. NỘI DUNG THAM KHẢO

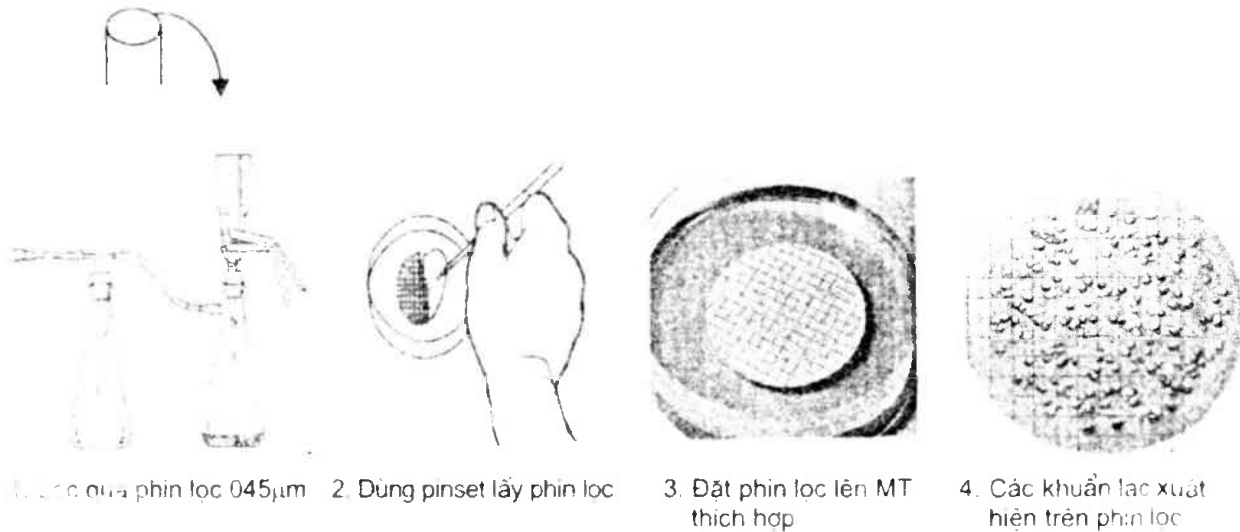
#### 3.1. Đếm số lượng vi sinh vật bằng phin lọc

Phương pháp này chủ yếu được sử dụng kết hợp với các phương pháp khác để phát hiện và đếm số lượng *E. coli* và các vi khuẩn đường ruột, tuy nhiên cũng có thể dùng cho các VSV khác.

**3.1.1. Nguyên tắc:** Sự ô nhiễm phân ở nước bề mặt là nguyên nhân tiềm ẩn của nhiều bệnh đường ruột. Các vi khuẩn trong phân sống một giai đoạn ngắn trong nước và với số lượng ít, khó phát hiện, vì thế kỹ thuật phin lọc là phương pháp cô đặc, làm tăng số lượng vi khuẩn đường ruột.



**3.1.2. Phương pháp tiến hành:** lấy một thể tích (V) nước nhất định, lọc qua màng lọc kích thước lỗ 0,45µm. Màng lọc này sau đó đặt lên bề mặt của môi trường Endo – agar và ủ 24 – 48 giờ ở 37°C (hình 3.5).

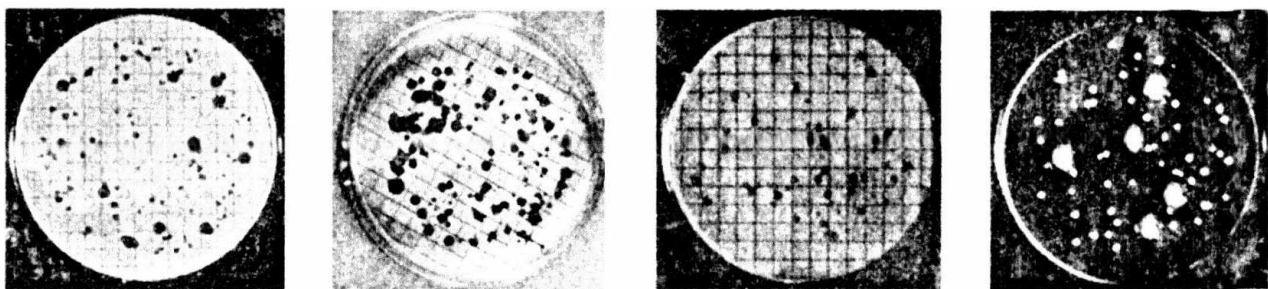


Hình 3.5. Các bước tiến hành phân lập bằng cách lọc qua phin lọc (0,45µm)

Tất cả các khuẩn lạc màu tím tía sẫm hoặc màu của kim loại được xếp vào nhóm các vi khuẩn coliform. Trong coliform/100ml nước được tính theo công thức:

$$\text{Số coliform/100ml} = \frac{\text{Số coliform/phin lọc} \times 100}{V \text{ đem lọc}}$$

Số KL đếm được/phin lọc nằm ở khoảng 20 – 80 CFU/phin và tổng số coliform khoảng 200 CFU/100ml là thích hợp. Hình 3.6 là một số kiểu khuẩn lạc vi khuẩn trong nước khi đếm bằng phương pháp pi in lọc.

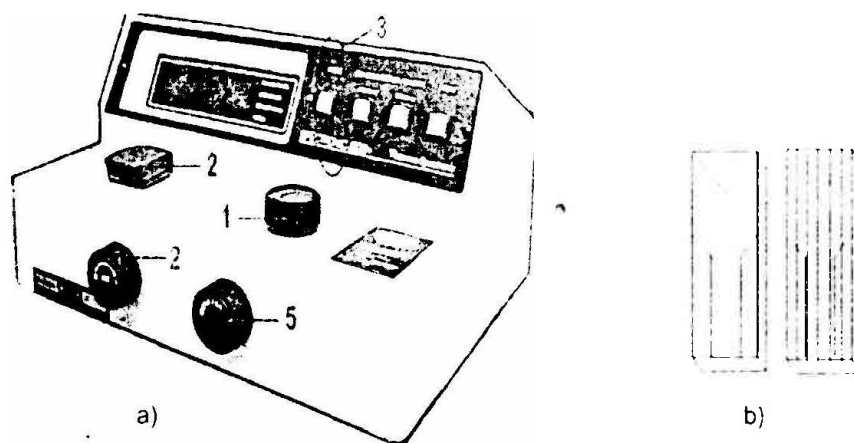


Hình 3.6. Một số kiểu khuẩn lạc mọc trên phin lọc (nguồn internet từ McGraw – Hill companies,inc.)

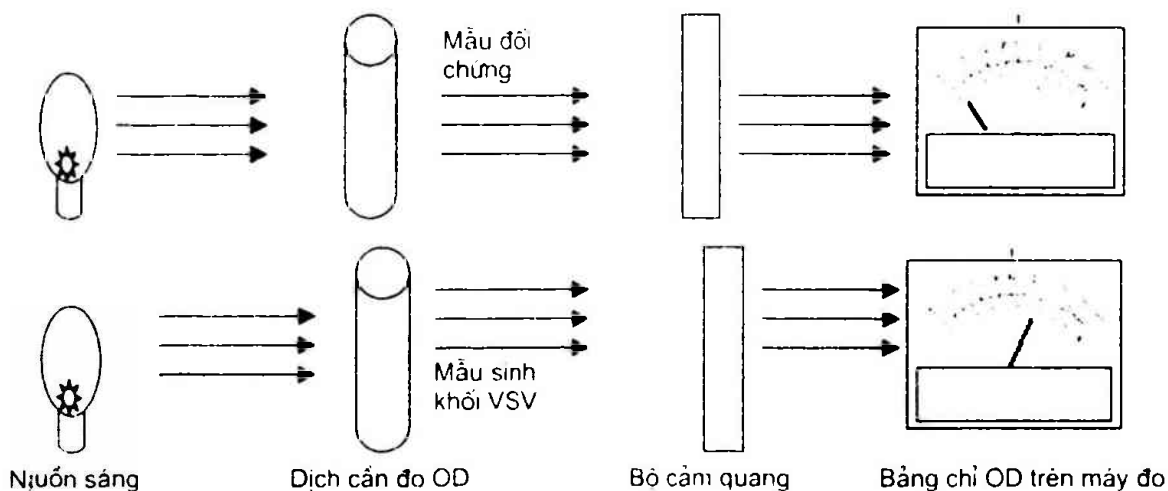
### 3.2. Đếm số lượng tế bào bằng phương pháp đo độ đục trên máy quang phổ (đo mật độ quang – OD)

Một trong những phương pháp xác định số lượng tế bào VSV được sử dụng phổ biến là phương pháp đo độ đục (hình 3.7 và 3.8). Nguyên tắc của phương pháp

này là khi số lượng tế bào trong quần thể tăng thì dung dịch trở nên đục. Sở dĩ ta nhìn thấy dung dịch đục là do ánh sáng đi qua dung dịch đó bị phân tán, nên độ đục tỉ lệ thuận với số lượng tế bào.



Hình 3.7. Máy đo độ đục (a) và cuvet (b)



Hình 3.8. Đo độ đục bằng quang phổ kế

Để đo độ đục của dung dịch người ta sử dụng máy đo quang phổ. Vi sinh vật có thể chứa nhiều các phân tử lớn có khả năng hấp thụ ánh sáng khác nhau. Ví dụ: DNA (254 – 260nm), protein (280nm), xitochrôm (400 – 500nm)... Khi đo độ đục tế bào người ta thường chọn các bước sóng có độ hấp thụ nhỏ, hầu hết các loài vi khuẩn được đo ở 600 – 620nm. Tuy nhiên, các bước sóng khác nhau được sử dụng tùy vào từng đối tượng.

Lượng ánh sáng truyền qua mẫu sinh khối tỉ lệ thuận với lượng tế bào và có thể được tính bằng công thức sau:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Trong đó: T là độ truyền ánh sáng, I<sub>0</sub> là ánh sáng đi vào mẫu vật (mẫu vật hấp thụ) và I là ánh sáng đi tới thiết bị phát hiện.

Do ánh sáng có tính tán xạ, vì thế cường độ ánh sáng truyền đi giảm khi số lượng tế bào tăng. Để có được đơn vị đo thích hợp hơn sao cho nó tỉ lệ thuận với mật độ VSV, người ta sử dụng đơn vị hấp thụ ánh sáng của vật chất (A: absorance) thay cho đơn vị truyền ánh sáng (T).

$$A = -\log_{10} [T]$$

Độ hấp thụ tăng tỉ lệ thuận với mật độ tế bào. Thuật ngữ độ hấp thụ (A) thường được thay bằng mật độ quang (OD). Hầu hết, mật độ tế bào của các cơ thể đơn bào tỉ lệ thuận với OD (trong khoảng giới hạn nhất định, thường nhỏ hơn 0,8 theo định luật Beer – Lambert). Độ đục của dịch nuôi cấy còn phụ thuộc vào kích thước và khả năng hấp thụ ánh sáng của các thành phần bên trong của tế bào, bởi thế mà xác định đường chuẩn sinh khối của mỗi loại VSV theo phương pháp này mang tính đặc thù riêng, không thể dùng chung một đường chuẩn mật độ tế bào cho tất cả các loại VSV. Ngay cả trong một chủng VSV, do sự khác nhau về kích thước và hình dạng của tế bào ở mỗi giai đoạn sinh trưởng nên những kết quả về số lượng vẫn không hoàn toàn chính xác khi dùng phương pháp này. Tuy nhiên, đây là một phương pháp nhanh và đơn giản, cho kết quả tương đối chính xác nếu được tiến hành thận trọng.

#### *a. Cách tiến hành:*

– Lấy 1 ống giống VSV và 4 ống môi trường vô trùng rồi tiến hành pha loãng mẫu như trình bày ở hình 3.8.

– Chuẩn bị máy quang phổ để đo độ đục. Có thể dùng loại máy quang phổ đơn giản (máy đo độ đục) hoặc dùng máy đo quang phổ UV – vis.

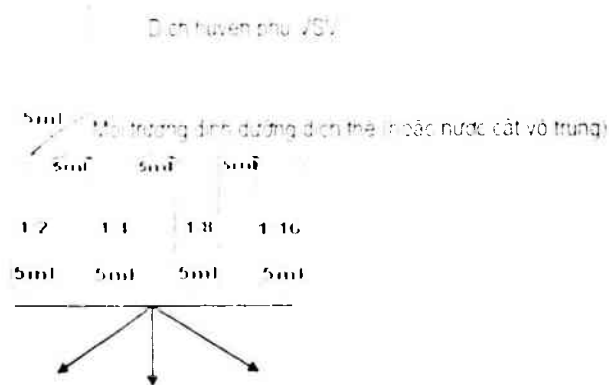
– Tiến hành đo độ đục của các mẫu đã pha loãng trên quang phổ kế, ứng với mỗi độ pha loãng mẫu sẽ có một giá trị mật độ quang (OD). Lưu ý, theo định luật Lambert thì độ hấp thụ chỉ tỉ lệ thuận với mật độ vật chất trong khoảng giá trị từ 0,1 – 0,8. Nếu lớn hơn 0,8 sẽ không còn chính xác do mật độ tế bào quá cao, sẽ tạo ra các bóng che lấp lẫn nhau.

– Song song với đo độ đục cần tiến hành nuôi cấy và đếm số lượng tế bào các VSV ở các độ pha loãng tương ứng trên môi trường thạch, sau đó tính hàm tương quan giữa độ hấp thụ và lượng tế bào sống,  $Y = aX + b$  (hình 3.9).

Trong đó Y là độ hấp thụ (mật độ quang OD) của dịch huyền phù VSV tại bước sóng đo (VD: 600nm), X là số tế bào, a là hệ số tương quan.

Có thể tóm tắt như sơ đồ sau: (hình 3.8)

- *Bước 1.* Pha loãng dịch sinh khối VSV.



- *Bước 2.* Đo mật độ quang của các ống dịch sinh khối ở các độ pha loãng trên quang phổ kế, đồng thời cấy và đếm số tế bào tương ứng trên môi trường thạch.



Hình 3.8. Đếm số lượng tế bào bằng phương pháp đo độ đục

- *Bước 3.* Ghi lại số liệu vào bảng (ví dụ)

ĐC (MPA dịch thể)	OD 620	Số CFU/ml ( $\times 10^6$ )
1/2	0.756	120
1/4	0.368	71
1/8	0.189	35
1/16	0.096	17

- *Bước 4.* Tính hàm tương quan giữa OD và sinh khối.

+ Dùng đồ thị trong excel, sau đó tính hàm tương quan.

+ Dựa vào hàm tương quan này để tính số lượng VSV trong các mẫu nghiên cứu.

- *Bước 5.* Sau khi đã có hàm tương quan giữa OD và sinh khối của VSV mà ta đang nghiên cứu, các lần tiếp theo không cần làm như trên nữa, các mẫu nuôi VSV này chỉ cần đo mật độ quang ở bước sóng tương tự, sau đó dựa vào hàm tương quan đã lập ở trên để tính.

**Ví dụ:** Sau 24 giờ nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường MPA, lấy dịch nuôi cấy này pha loãng  $10^6$  lần rồi đo mật độ quang ở 605nm như ở mẫu chuẩn. Biết được OD là 0,56, biết hàm tương quan giữa mật độ quang và số lượng tế bào (ví dụ  $Y = 2.5X + 4$ , Y là OD, X là số tế bào), ta có thể tính được X:

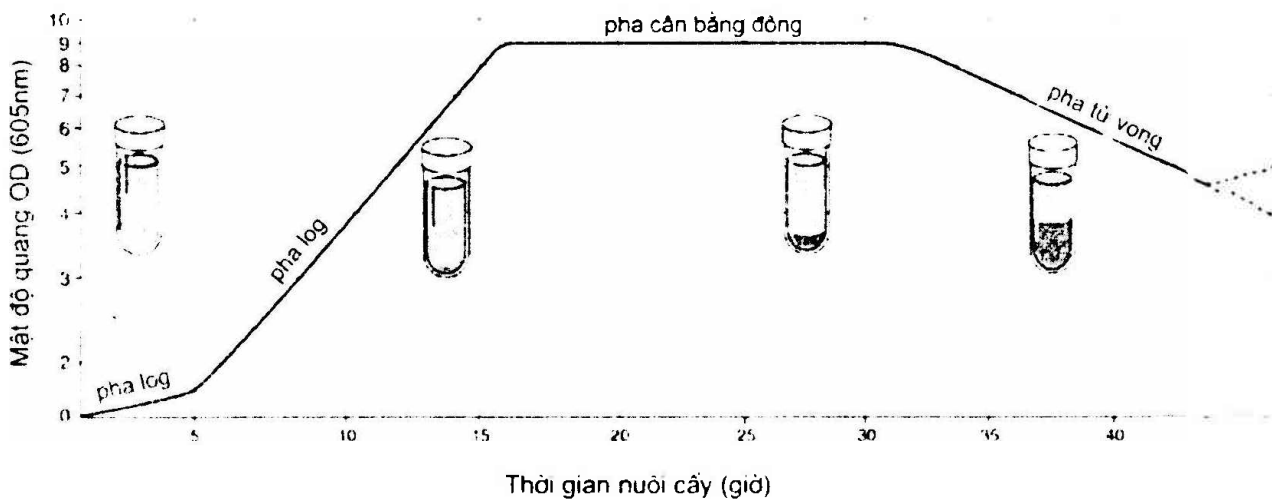
$$0,56 = 2.5X + 4,$$

$$X = \frac{0,56}{2,5} - 4 = 1(\times 10^6)$$

*Lưu ý:*

+ Nếu mật độ quang của dịch huyền phù VSV quá cao thì phải pha loãng sao cho  $OD < 0.8$ . Khi tính kết quả cần nhân với độ pha loãng của dịch nuôi VSV.

+ Bằng phương pháp này cũng có thể xác định được đường cong sinh trưởng của vi khuẩn, nếu xác định được OD ở các thời điểm sinh trưởng khác nhau (hình 3.9).



Hình 3.9. Xác định đường cong sinh trưởng của vi khuẩn

Sử dụng các phương pháp trên ta có thể đếm số lượng tế bào của các loại vi khuẩn, nấm men, ít dùng để đếm nấm mốc, xạ khuẩn và không đếm được virus. Phân lập và đếm số lượng virus được tiến hành bằng các phương pháp khác.

## Phụ lục I. PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG

### 1. 1. Môi trường nước thịt pepton (dành cho đa số vi khuẩn)

#### – Thành phần (g/l):

Nước thịt : 1000ml

Pepton bột : 10

NaCl : 5

pH = 7,4 – 8,8

#### – Cách pha:

- + Khuấy đều cho tan hết pepton và muối, sau đó đun sôi 2 phút và để nguội.
- + Đo và điều chỉnh đến pH = 7,6 – 7,8 (để ổn định độ pH của môi trường có thể thêm một vài giọt dung dịch đệm photphat 1N, pH = 7,5).
- + Đun 30 – 45 phút và để lắng. Chất bỏ cặn, lọc qua giấy lọc rồi thêm nước cho đủ thể tích lúc đầu. Kiểm tra lại độ pH, nếu đạt từ 7,4 – 7,6 là được. Phân phối vào các dụng cụ chứa (bình nón, ống nghiệm, ...) và khử trùng ở 121°C trong 15 – 20 phút.

Từ môi trường nước thịt pepton, có thể điều chế các môi trường khác, ví dụ như môi trường thạch – thịt – Pepton (MPA), môi trường nước thịt gelatin (xem bảng).

a. Môi trường MPA: thạch – thịt – pepton (g/l)	b. Môi trường nước thịt pepton gelatin (g/l)
- Nước thịt – pepton 1000ml	- Nước thịt pepton 1000ml
- Thạch 20	- Gelatin 10 – 20
Cách pha: Đun cho tan thạch, phân phối vào các dụng cụ chứa, khử trùng ở 1atm, 15 – 20 phút.	Ngâm gelatin 10 – 15 phút cho trương lên sau đó đun cách thủy cho tan hết, phân phối vào các dụng cụ chứa, khử trùng ở 0,5 atm trong 15 phút (chỉ khử trùng một lần, khử trùng hai lần gelatin mất khả năng tạo gel)

#### – Chuẩn bị nước thịt:

- + Thịt bò nạc tươi: 500 gam
- + Dung dịch 1N NaOH: 25ml

Nghiền hoặc thái nhỏ thịt, trộn với 25ml dung dịch 1N NaOH, thêm nước cho đủ 1 lít. Đun nhỏ lửa cho sôi, khuấy nhẹ liên tục trong vòng 20 phút, để nguội đến 25°C, hớt bỏ váng và mỡ, sau đó lọc qua vải màn hoặc giấy lọc rồi thêm nước cho đủ thể tích lúc đầu.

+ Phân phối vào các bình nón, khử trùng 120°C trong 30 – 40 phút. Nước thịt làm đúng có độ axit nhẹ (pH = 6,2), trong suốt, màu vàng rơm, chứa nhiều chất dinh dưỡng: các peptit, các axit nucleic, protein, các axit amin, muối khoáng, cacbohydrat, các chất sinh trưởng và một số chất khác.

*Lưu ý:* Hiện trên thị trường có bán cao thịt bò của các công ty như Difco (Mỹ) hay Merck (Đức), nếu có điều kiện nên mua các sản phẩm này, pha chế theo chỉ dẫn của nhà sản xuất để tiết kiệm thời gian.

## 1.2. Môi trường đĩa thạch đếm (plate count agar)

Môi trường dùng để đếm tổng số lượng các vi vật hiếu khí (trong sữa và các thực phẩm, trong nước và các vật liệu khác).

*Thành phần (g/lit):*

Peptôn chế từ casein:	5,0;	Cao nấm men:	2,5;
D-glucoza:	1,0;	Thạch:	14,0;
pH:	7,0 ± 0,2 ở 25°C.		

## 1.3. Môi trường để phân lập và nuôi cấy nấm mốc

Để phân lập và nuôi cấy nấm mốc người ta thường sử dụng môi trường Czapek và các dạng cải tiến của môi trường này hoặc một số môi trường khác như PDA (Môi trường khoai tây, glucôzơ và thạch), MEA (Môi trường cao man thạch – Malt – Extract – Agar), môi trường cao nấm men thạch (Yeast extract agar – YEA)...

### 1.3.1. Các loại môi trường Czapek nuôi cấy nấm

Czapeck Cơ sở (g/l)	Czapek – Thom (g/l)	Czapek – Dox (g/l)
Sacaroza: 30,0	30,0	30,0
NaNO <sub>3</sub> : 3,0	2,0	3,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 1,0	1,0	1,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O: 0,5	0,5	0,5
KCl: 0,5	0,5	0,5
FeSO <sub>4</sub> : 0,1	0,01	0,1
Nước: 1000ml	1000ml	1000ml
pH = 5,0 – 5,5	pH = 5,0 – 5,5	pH = 5,0 – 5,5

### **1.3.2. Môi trường khoai tây, glucoza và thạch (PDA – potato dextrose agar) (g/l)**

Glucôzơ:	20;
Nước chiết khoai tây:	1 lít;
Thạch:	20.

Cách chế nước chiết khoai tây: Lấy 200 gam khoai tây, gọt vỏ, rửa sạch, cắt lát nhỏ, cho vào 1000ml nước, đun nhỏ lửa, chiết lấy nước trong, bổ sung nước cho đủ 1 lít.

### **1.3.3. Môi trường malt thạch (Malt Extract Agar – MEA) (g/l)**

Cao malt bột:	20,0;	Peptôn:	1,0;
Glucôzơ:	20,0;	Thạch:	20,0;
Nước cất:	1,0/;	pH:	5,6 ± 0,2 ở 25 °C.

### **1.3.4. Môi trường cao nấm men thạch (Yeast extract agar – YEA) (g/l)**

Cao nấm men:	5,0;	Glucôzơ:	10,0;
Thạch:	20,0;	pH:	6,5 ± 0,2 ở 25 °C.

## **1.4. Môi trường phân lập và nuôi cấy nấm men**

### **1.4.1. Môi trường Hanxen**

Glucôzơ:	50g;	Peptôn:	10g;
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	3g;	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O:	2g;
Nước:	1000ml;	Thạch Agar:	15 – 20g;
pH = 5,6.			

### **1.4.2. Môi trường Sabouraud**

Glucôzơ:	40g;	Peptôn:	10g;
Thạch:	15g;	Nước:	1000ml;
pH = 5,5.			

Môi trường MEA, YEA cũng có thể dùng nuôi cấy nấm men.

## **1.5. Môi trường để phân lập và nuôi cấy xạ khuẩn**

1.5.1. Có thể thay đường sacarôzơ bằng glucozơ và thêm 2 – 3% CaCO<sub>3</sub> vào các môi trường Czapek, pH = 7,2 – 7,4 để phân lập và nuôi cấy xạ khuẩn.



### 1.5.2. Môi trường khoáng – tinh bột (Môi trường Gauze I)(g/l)

Tinh bột tan:	20	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ :	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :	0,5	$\text{KNO}_3$ :	1,0
$\text{NaCl}$ :	0,5	$\text{FeSO}_4$ :	0,01
Nước:	1000ml	Thạch:	20

pH = 7,2 – 7,4

Cách pha: Hoà tan các chất hoá học trong thành phần môi trường vào nước, hoà tan tinh bột trong nước ấm, khuấy cho tan đều rồi trộn với nhau, thêm nước cho đủ 1000ml.

### 1.5.3. Môi trường Gauze II (g/l)

Cao thịt:	3	Thạch:	20
Peptôn:	5	Nước:	1000ml
Glucôzơ:	10	pH:	7,0 – 7,2

### 1.5.4. Môi trường khoáng – tinh bột (ISP – 4) (g/l)

Tinh bột tan:	10	$\text{CaCO}_3$ :	2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ :	1	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :	1	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ :	0,1
$\text{NaCl}$ :	1	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :	0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :	2	Nước cất:	1000ml

pH không điều chỉnh: 7,0 – 7,4.

## 1.6. Một số loại môi trường khác dùng phân lập VSV đất

### 1.6.1. Môi trường nước chiết đất (g/l)

Nước chiết đất: 1000ml

Thạch: 20

Chuẩn bị dịch chiết đất: Đất màu, đập vụn, cân 0,5 – 1kg đất khô hoà tan vào 1 lít nước. Khuấy đều cho đến khi đất hoà tan trong nước tạo thành dung dịch huyền phù.

Đun dung dịch đất trên trong vòng 45 phút – 1 giờ, để nguội chờ cho phân cận lắng xuống. Lọc lấy phần dung dịch màu vàng tươi ở phía trên (chú ý không lấy phần cận), lọc qua giấy lọc. Bổ sung nước cho đủ 1 lít. Dung dịch này để làm môi trường.

### 1.6.2. Môi trường thạch đất

Đất trồng để khô, nghiền nhỏ, dây qua dây lọc 1mm để loại bỏ xác thực vật và các chất lẫn khác.

Cho đất vào bình nón, thêm nước với tỉ lệ 1 : 9. Lắc trên máy lắc cho tan hết vào nước. Nếu cần trung hòa môi trường thì bổ sung  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , sau đó bổ sung thạch và vô trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong 1 giờ, để qua đêm, sau đó thanh trùng lại một lần nữa.

## 1.7. Một số môi trường chọn lọc

### 1.7.1. Môi trường MacConkey

Môi trường MacConkey là môi trường chọn lọc đặc trưng dùng để phát hiện các loài của chi *Escherichia* và phân biệt các loài vi khuẩn đường ruột gây bệnh có khả năng lên men hoặc không lên men lactôzơ. Trên môi trường này, các vi khuẩn lên men lactôzơ sẽ tạo ra các KL màu hồng hoặc đỏ hồng, các loài không lên men sẽ tạo ra KL không màu hoặc trong suốt. Môi trường này cũng thường dùng để nghiên cứu chỉ thị độ bẩn của nước bởi coliform

*Thành phần (g/l):*

Bacto – peptôn:	17,0	Thuốc chỉ thị màu đỏ trung tính:	0,03
Proteôzơ peptôn:	3,0	Thuốc nhuộm tím kết tinh:	0,001
Lactôzơ:	10,0	Thạch:	13,5
NaCl:	5,0	Nước cất:	1,0
Hỗn hợp axit mật:	1,5	pH = 7,1 ± 0,02 ở 25°C	

### 1.7.2. Môi trường SS thạch (*Salmonella – Shigella agar*)

Môi trường này lúc đầu dùng để phân lập những loại vi khuẩn đường ruột không lên men lactôzơ. Ngày nay được dùng để phân lập và nhận dạng *Salmonella*.

*Thành phần (g/l):*

Proteôzơ peptôn:	5,0
Lactôzơ:	10,0
Axit mật số 3:	8,5
Cao thịt:	5,0
Xitrat natri:	8,5
Tiôsulfat Natri:	8,5g
Xitrat sắt:	1,0
Thạch:	13,5
Thuốc nhuộm xanh sáng (Brilliant Green):	0,33mg
Đỏ trung tính (Neutral Red):	25,0mg
pH = 7,0	

### 1.7.3. Môi trường Manitol – NaCl – Thạch (MSA – Manitol Salt Agar):

Đây là môi trường chọn lọc dành cho *Staphylococcus* gây bệnh, có khả năng chịu NaCl ở nồng độ cao (7,5% NaCl). Các loại vi khuẩn khác có thể sinh trưởng được nhưng rất yếu. Môi trường có chứa manitol là loại đường có thể được vi khuẩn lên men và có chứa chất chỉ thị pH (Phenol màu đỏ). Nếu sản phẩm lên men đường là axit sẽ làm cho môi trường hóa màu vàng. Hầu hết *Staphylococcus* gây bệnh có khả năng lên men manitol. Ngược lại, hầu hết các loài *Saphylococcus* không gây bệnh không có khả năng lên men loại đường này. Đây là môi trường dùng để phân biệt các loài của chi *Staphylococcus*.

Ví dụ:

- + *S. aureus* sinh trưởng mạnh trên MSA và lên men lactôzơ.
- + *S. agalactiae* không sinh trưởng trên MSA do không chịu muối.
- + *S. epidermidis* sinh trưởng trên MSA nhưng không lên men lactôzơ.

Thành phần môi trường MSA (g/l):

Cao thịt:	1,0	Peptôn từ thịt:	5,0
Cazein peptôn:	5,0	NaCl:	75,0
D – Mannitol:	10,0	Phenol màu đỏ:	0,025
Agar:	15,0	pH = 7,4 ± 0,2 ở 25°C	

### 1.7.4. Môi trường phân lập vi khuẩn Lactic

Môi trường MRS (Man, Rogosa and Sharpe)

Thành phần (g/l):

Cao thịt:	8,0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> :	2,0
Cao nấm men:	5,0	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O*:	0,2
Peptôn từ casein:	10,0	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O*:	0,05
Glucôzơ:	20,0	CH <sub>3</sub> COONa.3H <sub>2</sub> O:	3,0
Thạch:	20,0	Tween 80:	1,0ml
Nước cất:	1000ml	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	2,0
pH = 6,2 – 6,5			

### 1.7.5. Môi trường phân lập *Pseudomonas*

1.7.5.1. Môi trường King B. Hòa tan các thành phần vào nước, trừ MgSO<sub>4</sub>. Cho thạch vào đun cho tan, điều chỉnh pH đến 7,2 ± 0,2, sau đó cho MgSO<sub>4</sub> và khuấy từ từ cho tan hết, thanh trùng trong 15 phút ở 121°C.

*Thành phần môi trường (g/l):*

Prôteo-zơ peptôn No.3:	20	MgSO <sub>4</sub> :	1,5
Glixerin, C.P.:	10ml	Thạch:	15
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> :	1,5	Nước cất:	1 lít

**1.7.5.2. Môi trường King B cải tiến**

Đây là môi trường dành cho phân lập *Pseudomonas*, đặc biệt là để phân biệt *P. aeruginosa* với các loại *Pseudomonas* khác vì có chứa chất kích thích tạo sắc tố phycoyanin (sắc tố màu xanh lục). Glixerin vừa là nguồn cacbon, vừa là chất kích thích tạo sắc tố. Magiê là cofactor của rất nhiều phản ứng enzym, cùng với sulphat kali cũng kích thích sự tạo sắc tố phycoyanin. Irgasan là loại kháng sinh ức chế các VK G<sup>+</sup> và các VK G<sup>-</sup> khác trừ các loài *Pseudomonas*.

*Thành phần môi trường (g/l)*

Peptôn:	20,0	Irgasan (triclosan):	0,025
Thạch:	13,6	Glixerin:	20,0ml
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	10,0	pH: 7,0 ± 0,2 (25°C)	
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O:	1,4		

**1.7.6. Môi trường phân lập Vibrio**

Các loài *Vibrio* là các vi khuẩn gây bệnh đường ruột, ví dụ: *V. cholerae* và *V. parahaemolyticus diarr* là những loài gây bệnh toàn cầu. Môi trường chọn lọc phổ biến để phân lập các loài *Vibrio* là TCBSA (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Aga). Trong môi trường này có chứa hàm lượng cao các muối thiôsulphat và xitrat tạo ra độ pH kiềm mạnh, ức chế mọi loài vi khuẩn đường ruột khác thuộc Enterobacteriaceae. Axit mật (Oxgall bile) và colat (cholate) ức chế sự phát triển của *Enterococcus*. Các loài coliform nào có khả năng sinh trưởng được trên môi trường này đều không có khả năng sử dụng sacarôza là nguồn C. Chỉ có một số loài *Proteus* có khả năng sử dụng sacarôza thì có thể sinh trưởng trên môi trường này và tạo thành các KI có màu vàng gần giống như KI các chủng *Vibrio*. Tổ hợp xanh timol và xanh bromotimol thay đổi màu từ xanh sang vàng khi VSV tiết ra axit rên môi trường này.

*Thành phần (g/lit):*

Peptôn từ casein:	5,0;	Na-thiôsulphat:	10,0;
Peptôn từ thịt:	5,0;	Na-xitrat:	10,0;
Cao nấm men:	5,0;	Axit mật (Oxgall bile):	5,0;
Natri colat:	3,0;	Sacarôzơ:	20,0;
NaCl:	10,0;	Xanh timol:	0,04;
Xanh bromotimol:	0,04;	Sat (III) xitrat:	1,0;
Thạch:	14,0	pH: 8,6 ± 0,2 ở 25°C.	

### 1.7.7. Môi trường RCA (*Reinforced Clostridial Agar*) phân lập *Clostridium*

Môi trường RCA chứa Peptôn và cao thịt là nguồn C, N, vitamin và khoáng; cao nấm men cung cấp các vitamin nhóm B kích thích sự sinh trưởng của vi khuẩn; Dextrose (D – glucoza) là nguồn C dễ hấp thụ; NaCl giữ sự cân bằng thẩm thấu; tinh bột ở lượng nhỏ giữ chức năng loại các độc tố của các sản phẩm phụ trao đổi chất; xystein hydroclorit giữ chức năng là chất khử O<sub>2</sub>; Na-axetat giữ chức năng điều chỉnh pH; 1 lượng nhỏ thạch làm môi trường bán lỏng.

*Thành phần (g/l):*

Cazein thủy phân bằng dịch tụy (panceatic Digest of Casein):	5,0
D – glucozơ:	5,0

*Proteoza*

Peptôn No. 3:	5,0
Cao thịt:	10,0
Tinh bột tan:	1,0
Cao men:	3,0
L – Xystein Hydroclorit:	0,5
NaCl:	5,0
Na – axetat:	3,0
Thạch:	12,5
pH = 6,8 ± 0,2 ở 25°C	

### 1.7.8. Môi trường T (phân lập *E. coli* phage)

*Thành phần (g/l):*

Dịch dinh dưỡng:	8,0
Peptôn:	5,0
NaCl:	5,0
Glucôzơ:	1,0
Nước cất:	1 lít
pH = 7,3	

\* *Lưu ý:* Hiện trên thị trường đã có các loại môi trường chuẩn bị sẵn, nếu có điều kiện có thể mua các môi trường có sẵn và pha chế theo chỉ dẫn của nhà sản xuất cho thuận tiện.