

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
TRƯỜNG CAO ĐẲNG LƯƠNG THỰC – THỰC PHẨM



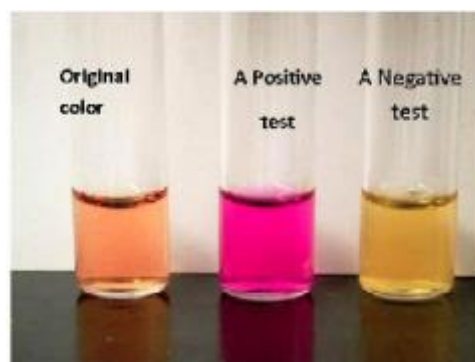
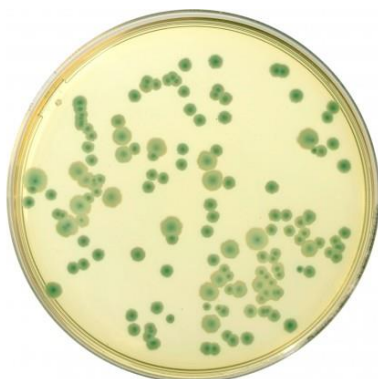
GIÁO TRÌNH

MÔ ĐUN: KIỂM NGHIỆM VI SINH VẬT

NGÀNH : CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG

*(Ban hành kèm theo Quyết định số: 761 /QĐ-CDLTTP-ĐT ngày 17 tháng 08 năm 2017
của Hiệu trưởng Trường Cao đẳng Lương thực Thực phẩm)*



Đà Nẵng, năm 2017

MỤC LỤC

NỘI DUNG	TRANG
Bài 1 – Phân loại, bảo quản và pha chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật	4
Mục tiêu	4
A. Nội dung	4
1. Các thành phần cơ bản của môi trường nuôi cấy vi sinh vật	4
2. Phân loại môi trường nuôi cấy vi sinh vật	5
3. Nguyên tắc pha chế, sử dụng và bảo quản môi trường	8
4. Nguyên nhân một số sai lệch trong pha chế và sử dụng môi trường	9
5. Kiểm tra lô môi trường mới	10
B. Câu hỏi và bài tập	11
Bài 2 - Lấy mẫu, vận chuyển và bảo quản mẫu kiểm vi sinh vật	12
Mục tiêu	12
A. Nội dung	12
1. Mục đích và yêu cầu	12
2. Thủ tục lấy mẫu và quản lý mẫu	13
3. Xử lý sơ bộ mẫu thực phẩm trong phòng phân tích vi sinh	16
B. Câu hỏi và bài tập	17
Bài 3. Nuôi cấy và định lượng mẫu trong kiểm nghiệm vi sinh vật	18
Mục tiêu	18
A. Nội dung	18
1. Nuôi cấy vi sinh vật	18
2. Quy trình nhân giống và bảo quản chủng vi sinh vật chuẩn	21
3. Kỹ thuật nghiên cứu hình thái vi sinh vật	22
4. Các phương pháp định lượng vi sinh vật	24
5. Khử trùng vật liệu nuôi cấy sau khi sử dụng	31
B. Câu hỏi và bài tập	31
Bài 4. Thử nghiệm sinh hóa trong xác định vi sinh vật	32
Mục tiêu	32
A. Nội dung	32
1. Một số thử nghiệm sinh hóa phổ biến trong xác định vi sinh vật	32
1.1. Thử nghiệm Bile esculin	32
1.2. Thử nghiệm khả năng lên men các nguồn carbonhydrat	32
1.3. Thử nghiệm catalase	35
1.4. Thử nghiệm citrate	36
1.5. Thử nghiệm coagulase	36
1.6. Thử nghiệm decarboxylase (LDC, ODC) và dehydrolase (ADH)	37
1.7. Thử nghiệm DNAase và thermonuclease	39
1.8. Thử nghiệm khả năng sinh H_2S	40
1.9. Thử nghiệm khả năng sinh indol	41
1.10. Thử nghiệm trên môi trường Kligler Iron Agar (KIA) hay trên	43

môi trường Triple Sugar Iron agar (TSI)	
1.11. Thử nghiệm malonate	44
1.12. Thử nghiệm làm tan gelatin	44
1.13. Thử nghiệm Methyl red	45
1.14. Thử nghiệm tính di động	46
1.15. Thử nghiệm urea	47
1.16. Thử nghiệm Voges - Proskauer (VP)	47
1.17. Thử nghiệm lên men - oxy hóa	48
1.18. Thử nghiệm oxydase	49
2. Bài tập và thảo luận	50
B. Câu hỏi và bài tập	50
Bài 5. Phân tích tổng số vi khuẩn hiếu khí	51
Mục tiêu	51
A. Nội dung	51
1. Sơ lược về chỉ tiêu	51
2. Dụng cụ và thiết bị	51
3. Môi trường và vật liệu phân tích	52
4. Pha chế môi trường	52
5. Quy trình phân tích	53
B. Câu hỏi và bài tập	54
Bài 6. Phân tích tổng số nấm men và nấm mốc	55
Mục tiêu	55
A. Nội dung	55
1. Sơ lược về chỉ tiêu	55
2. Dụng cụ và thiết bị	55
3. Môi trường và vật liệu phân tích	56
4. Pha chế môi trường	56
5. Quy trình phân tích	57
B. Câu hỏi và bài tập	58
Bài 7. Phân tích tổng số <i>Coliforms</i>	59
Mục tiêu	59
A. Nội dung	59
1. Sơ lược về chỉ tiêu	59
2. Dụng cụ và thiết bị	59
3. Môi trường và vật liệu phân tích	60
4. Pha chế môi trường	60
5. Quy trình phân tích	61
B. Câu hỏi và bài tập	63
Bài 8. Phân tích <i>E. Coli</i>	64
Mục tiêu	64
A. Nội dung	64

1. Sơ lược về chỉ tiêu	64
2. Dụng cụ và thiết bị	64
3. Môi trường và vật liệu phân tích	65
4. Pha chế môi trường	65
5. Quy trình phân tích	66
B. Câu hỏi và bài tập	68
Bài 9. Phân tích <i>Staphylococcus aureus</i>	69
Mục tiêu	69
A. Nội dung	69
1. Sơ lược về chỉ tiêu	69
2. Dụng cụ và thiết bị	69
3. Môi trường và vật liệu phân tích	70
4. Pha chế môi trường	70
5. Quy trình phân tích	71
B. Câu hỏi và bài tập	72
Bài 10 Phương pháp không truyền thống	73
1. Phương pháp phát quang sinh học ATP	73
2. Phương pháp ELISA	74
3. Phương pháp mẫu dò (Gene probes)	75
4. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)	77
5. Một số phương pháp thử nhanh khác	78
Tài liệu tham khảo	83

GIÁO TRÌNH MÔ ĐUN KIỂM NGHIỆM VI SINH
MÃ MÔ ĐUN 100406
BÀI 1 – PHÂN LOẠI, BẢO QUẢN VÀ PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY
VI SINH VẬT

Mục tiêu:

- Trình bày được các nguyên tắc cơ bản trong pha chế, sử dụng và bảo quản môi trường nuôi cấy vi sinh vật;
- Phân tích được một số nguyên nhân gây ra lỗi sai lệch trong pha chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật;
- Xây dựng được quy trình pha chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật cụ thể đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật.

A. NỘI DUNG

1. Các thành phần cơ bản của môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Các chất dinh dưỡng đối với vi sinh vật là các chất được vi sinh vật hấp thụ từ môi trường xung quanh và sử dụng làm nguyên liệu để cung cấp cho quá trình sinh tổng hợp tạo ra các thành phần của tế bào hoặc để cung cấp cho quá trình trao đổi năng lượng.

Quá trình hấp thụ các chất dinh dưỡng để thỏa mãn mọi nhu cầu sinh trưởng và phát triển được gọi là quá trình dinh dưỡng. Chất dinh dưỡng phải là những hợp chất có tham gia vào các quá trình trao đổi chất nội bào.

Phần lớn vi sinh vật tiêu hóa thức ăn bằng cách dùng enzyme thủy phân thức ăn. Nhờ các enzyme tương ứng, thức ăn như chất đường bột, chất béo và protein được phân ra thành các phân tử nhỏ hơn có thể tan được trong nước. Đường bột được cắt ra thành các dạng đường đơn (monosaccharide); chất béo được thủy phân thành các alcohol, glycerol hoặc các acid béo, còn protein được thủy phân thành các amino acid. Các phân tử này thường có kích thước nhỏ tan được trong nước nên có thể chui qua màng tế bào để vào trong tế bào chất của vi sinh vật. Sau đó, bên trong tế bào còn có hệ thống enzyme khác, biến các chất đơn giản này để biến chúng thành năng lượng hay các vật chất của tế bào.

Ngoài ra vách tế bào của vi sinh vật này có vô số các lỗ khuyết rất nhỏ, có công dụng như những cái miệng li ti, qua đó chất lỏng và các phân tử thức ăn đơn giản và nhỏ đi xuyên qua vách tế bào để vào trong tế bào chất. Sau khi vào trong tế bào, các phân tử thức ăn được tế bào vi sinh vật sử dụng giống như ở tế bào động vật, thực vật và các nguyên sinh.

1.1. Các chất dinh dưỡng cần thiết

Có hai nhóm vật chất cần thiết cho sự sống của vi sinh vật, nhóm thứ nhất là nước, là yếu tố quyết định sự dinh dưỡng của vi sinh vật; nhóm thứ hai gồm các vật chất cấu tạo bởi các nguyên tố C, H, O, N, P, S, K, Na, Ca... Các nguyên tố này cũng có thể chia ra các nguyên tố cơ bản cho vi sinh vật và các chất vi lượng.

1.1.1. Nguyên tố cơ bản

C, H, O, N, P, S và K. Các nguyên tố này hiện diện trong tất cả các hợp chất (như chất protein, chất béo, đường bột...) và ở dưới dạng cấu trúc giống nhau trong tất cả các loài vi sinh vật, ngay cả trong virus. Riêng các nguyên tố C, H, O, N chiếm tới

90 % đến 97% toàn bộ chất khô của tế bào. Ngoài ra một số nguyên tố khác cũng là nguyên tố cơ bản như Ca, Na, Fe, Mg...đáp ứng cho từng nhóm vi sinh vật. Ví dụ: Fe rất cần thiết cho vi khuẩn hiếu khí, các vi sinh vật có quang hợp rất cần Mg.

1.1.2. Các chất vi lượng

Gồm các nguyên tố mà vi sinh vật rất cần thiết cho sự tăng trưởng, nhưng với số lượng rất ít. Ví dụ như: Fe, Mn, Ca. Ngoài ra các vitamin là những chất phức tạp, cũng dự phần như những chất vi lượng vì chỉ cần một lượng nhỏ cũng kích thích được sự tăng trưởng.

Các chất vi lượng ở các vi sinh vật khác nhau là không giống nhau. Trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau, tương ứng với các giai đoạn phát triển khác nhau, lượng chất vi lượng trong cùng một loài vi sinh vật cũng không giống nhau.

1.2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật

Sự sinh trưởng của quần thể vi sinh vật trong môi trường dinh dưỡng nhân tạo được gọi là nuôi cấy (cultivation). Một kiểu nuôi cấy chỉ chứa một loại vi sinh vật được gọi là nuôi cấy thuần khiết (pure culture). Nuôi cấy hỗn hợp (mixed culture) là một loại nuôi cấy chứa nhiều hơn một loại vi sinh vật.

- Các bước cần thiết cho nuôi cấy vi sinh vật như sau:

- + Chuẩn bị môi trường nuôi cấy phù hợp với vi sinh vật, giúp cho sự sinh trưởng tốt nhất.
- + Tiệt trùng môi trường nuôi trước đó để loại bỏ các sinh vật sống không mong muốn có sẵn trong môi trường nuôi cấy.
- + Cấy vi sinh vật vào môi trường đã chuẩn bị.

Thông thường môi trường nuôi cấy được chuẩn bị trong các bình nuôi phổ biến như ống nghiệm, bình tam giác, đĩa petri, nồi lên men... Môi trường dinh dưỡng thường khác nhau về tỷ lệ các thành phần nguyên tố cơ bản và các chất vi lượng. Ngoài ra về hình thái môi trường nuôi cấy có hai dạng phổ biến là dạng rắn và dạng lỏng, dạng lỏng thường được áp dụng cho hệ thống nuôi cấy liên tục trong công nghiệp.

2. Phân loại môi trường nuôi cấy vi sinh vật (Culture medium)

2.1. Về thành phần

Có 4 loại môi trường nuôi cấy: môi trường tự nhiên còn gọi là môi trường thực nghiệm (empirical media), môi trường tổng hợp, môi trường bán tổng hợp và môi trường sống. Các loại môi trường này khác nhau rất nhiều về hình thức và thành phần tùy theo loài vi sinh vật cần nuôi cấy cũng như tùy thuộc vào mục đích của công tác nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy tự nhiên: thường chứa đựng nhiều chất hữu cơ và vô cơ tan trong nước có thể đáp ứng yêu cầu về dưỡng chất của một số lớn vi sinh vật (không phải là tất cả). Các môi trường tự nhiên được dùng phổ biến là: sữa, nước trích thịt bò, nước trích các loại rau củ hoặc ngũ cốc ... Các loại môi trường trong nhóm này dễ chuẩn bị và có thể sử dụng cho nhiều mục đích thông thường trong nghiên cứu vi sinh vật.

Khuyết điểm của loại môi trường tự nhiên là không thể biết chính xác thành phần dinh dưỡng cũng như thành phần dinh dưỡng của những lần chuẩn bị khác nhau,

sẽ rất khác nhau. Do đó, đôi khi kết quả nuôi cấy của các lần chuẩn bị môi trường khác nhau có thể sẽ không giống nhau.

Môi trường nuôi cấy tổng hợp: Để bổ sung khuyết điểm của môi trường nuôi cấy tự nhiên, người ta đã thiết lập các môi trường nuôi cấy tổng hợp. Là môi trường chỉ gồm các hợp chất hóa học tinh khiết, xác định và được lấy với những nồng độ cho trước.

Ưu điểm của các loại môi trường nuôi cấy tổng hợp là ta có thể biết rõ cũng như điều khiển thành phần dinh dưỡng của môi trường một cách dễ dàng. Ngoài ra, đây là loại môi trường rất chính xác nhờ đó chúng ta tránh được sự thay đổi trong các lần chuẩn bị môi trường, cũng như sẽ là môi trường rất tốt cho các loại vi sinh vật đã được biết rõ nhu cầu dinh dưỡng của chúng.

Khuyết điểm của môi trường tổng hợp là tương đối mắc tiền, chuẩn bị khá phức tạp và mất thời giờ hơn đối với môi trường tự nhiên, và chỉ sử dụng cho từng loài vi sinh vật xác định được nhu cầu dinh dưỡng. Trường hợp vi sinh vật chưa xác định, không thể nuôi cấy trên môi trường loại này một cách bảo đảm.

Môi trường nuôi cấy bán tổng hợp: Môi trường nuôi cấy bán tổng hợp là môi trường nuôi cấy tự nhiên được bổ sung thêm với một số chất dinh dưỡng được xác định.

Ví dụ: khi nuôi cấy vi khuẩn *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* người ta thường dùng môi trường Wakimoto. Tuy nhiên trong lúc cần phân lập và tách dòng vi khuẩn từ một tế bào thì vi khuẩn này mọc không được tốt trên môi trường Wakimoto. Để thực hiện công tác này người ta phải thêm vào môi trường Wakimoto một số lượng rất nhỏ Fe dưới dạng chelate hóa, gọi là môi trường Wakimoto biến đổi. Vi khuẩn sẽ mọc thành các khuẩn lạc (từ một tế bào) rất tốt trên môi trường mới này

Môi trường nuôi cấy sống: Dùng để nuôi cấy một số vi sinh vật đặc biệt có tính ký sinh bắt buộc. Ví dụ: Virus không nuôi cấy được trên môi trường nuôi cấy nhân tạo, do đó cần nuôi cấy chúng trên sinh vật đang sống.

Ví dụ: đối với virus gây bệnh đậu mùa, người ta nuôi cấy chúng trên con bò còn sống và sau đó thu thập virus trên con bò ấy để làm thuốc chủng bệnh đậu mùa. Phần lớn các virus ký sinh trên động vật chúng ta phải nuôi cấy trong phôi của trứng gà lộn hoặc trên chuột, thỏ...

2.2. Về trạng thái vật lý

Căn cứ vào trạng thái môi trường người ta chia môi trường nuôi cấy vi sinh vật thành môi trường đặc, môi trường bán đặc và môi trường dịch thể.

Môi trường đặc: đây là loại môi trường được làm đông đặc lại nhờ bổ sung thêm thạch (agar – agar), gelatin hay silicagel. Môi trường đặc phải đảm bảo được các yêu cầu sau đây:

- Không bị vi sinh vật nuôi cấy sử dụng
- Giữ được trạng thái đặc trong nhiệt độ nuôi cấy vi sinh vật. Dễ hòa tan khi đun nóng (thường được điều chỉnh bằng lượng chứa chất làm đặc trong môi trường)
- Nhiệt độ để làm đặc môi trường không quá thấp
- Chất làm đặc môi trường không có hại đối với vi sinh vật
- Giữ được trạng thái trong suốt của môi trường

- Giá thành không quá cao, pha chế môi trường dễ dàng

Đặc điểm	Thạch	Gelatin
Nồng độ thường dùng (%)	1,5-2,0	5-12
Nhiệt độ hòa tan ($^{\circ}\text{C}$)	96	25
Nhiệt độ đông ($^{\circ}\text{C}$)	40	20
pH	Hơi acid	Acid
Chất khoáng (%)	16	14-15
CaO (%)	1,15	0
MgO (%)	0,77	0
N (%)	0,4	18,3
Vi sinh vật có thể sử dụng làm chất dinh dưỡng	Tuyệt đại đa số không sử dụng	Nhiều vi sinh vật có thể sử dụng

Môi trường bán đặc (semisolid medium): Môi trường bán đặc là môi trường chỉ chứa 0,2-0,7% thạch và thường được sử dụng để quan sát khả năng di động của vi sinh vật, ...

Môi trường dịch thể (liquid medium): Môi trường dịch thể hay môi trường lỏng là các môi trường không bổ sung các chất tạo đông môi trường. Môi trường dịch thể ngoài việc sử dụng trong nghiên cứu tại phòng thí nghiệm còn được sử dụng rộng rãi trong sản xuất lớn tại các nhà máy lên men công nghiệp.

2.3. Về công dụng

Căn cứ vào mục đích sử dụng người ta chia môi trường nuôi cấy thành nhiều loại khác nhau:

Môi trường cơ sở (minimum medium): là môi trường có chứa các chất dinh dưỡng cơ bản cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển của đa số vi sinh vật. Môi trường cơ sở thông dụng là môi trường cao thịt - peptone.

Môi trường làm giàu hay còn gọi là môi trường gia phú (*enrichment medium*): Trên môi trường cơ sở cho thêm một số chất dinh dưỡng đặc biệt để thích hợp với việc nuôi cấy một số nhóm vi sinh vật. Các chất bổ sung thêm có thể là máu, huyết thanh, cao nấm men, mô động vật hay thực vật.

Ví dụ để nuôi cấy vi khuẩn *Bordetella pertussis* người ta dùng môi trường cơ sở Difco 0048 nhưng bổ sung bằng thao tác vô trùng máu thỏ (đã lọc qua nén lọc) sau khi đã khử trùng môi trường 15 phút ở 121°C , sao cho nồng độ cuối là 15%.

Môi trường giám biệt (differential medium): dùng trong việc giám định các loài vi sinh vật khác nhau để xác định vị trí phân loại của chúng. Như khi xác định khả năng sinh protease thì bổ sung casein hay gelatin, khả năng sinh amylase thì thêm tinh bột tan, khả năng sinh lipase thì thêm dầu ăn và chỉ thị màu, khả năng sinh H_2S thì thêm Pb acetat, ..

Môi trường chọn lọc (selective medium): dùng để phân lập từng nhóm vi sinh vật riêng biệt từ một quần thể vi sinh vật trong tự nhiên. Dựa vào yêu cầu dinh dưỡng

đặc biệt của từng nhóm vi sinh vật hoặc tính miễn cảm khác nhau đối với hóa chất, với chất kháng sinh mà đưa thêm vào môi trường những chất tương thích, nhằm ức chế sự sinh trưởng của các nhóm vi sinh vật khác và giúp cho phân lập được nhóm vi sinh vật cần nghiên cứu.

3. Nguyên tắc pha chế, sử dụng và bảo quản môi trường

Hiện nay tất cả các phòng kiểm nghiệm vi sinh vật đều sử dụng môi trường đông khô trong thực tế kiểm nghiệm. Môi trường đông khô hạn chế khả năng biến động giữa các lô môi trường so với việc tự pha từ các hợp phần riêng rẽ.

3.1. Bảo quản môi trường

- Môi trường đông khô cần được bảo quản nơi khô ráo, thoáng, tránh ánh sáng, nhiệt độ thích hợp khoảng 15-25⁰C, các bình, lọ chứa phải luôn đậy nắp kín để tránh bị ẩm gây vón cục môi trường
- Môi trường vón cục cần được loại bỏ bởi những thay đổi sinh hóa có thể xảy ra.
- Không để môi trường đã được pha chế ở ngoài ánh sáng và nhiệt độ phòng.
- Không dùng môi trường đã hết hạn sử dụng.

3.2. Pha chế môi trường

3.2.1. Hòa tan môi trường

- Sử dụng nước cất để pha môi trường
- Cân lượng môi trường cần thiết rồi trộn với lượng nước cất bằng 1/2 thể tích môi trường cần pha, lắc kỹ để tạo thành một dạng huyền phù đồng nhất. Đổ thêm phần nước còn lại sao cho không còn bột môi trường bám trên thành bình.
- Các môi trường đông khô không chứa thạch hoặc gelatin thường được hòa tan trong nước lạnh hoặc đun nhẹ.
- Môi trường chứa thạch hoặc gelatin được đun nóng để hòa tan hoàn toàn.

3.2.2. Điều chỉnh pH

- Giá trị pH của các môi trường đông được pha chế bằng nước cất trung tính trùng hợp với giá trị ở nhiệt độ nuôi cấy đặc trưng, tuy nhiên nếu cần cũng nên kiểm tra và điều chỉnh lại pH, đặc biệt là khi phải sử dụng các môi trường cũ.
- Giá trị pH phụ thuộc rất nhiều vào thành phần của môi trường nuôi cấy, nhiệt độ môi trường khi đo và cách thức xử lý môi trường trong thời gian pha chế (cách hòa tan, cách khử trùng, ...).
- Việc đo và chỉnh pH cần được thực hiện ở nhiệt độ khoảng 45⁰C với môi trường đặc hoặc nhiệt độ phòng với môi trường lỏng.
- Sử dụng dung dịch HCl hoặc NaOH 1N để điều chỉnh pH về giá trị yêu cầu.

3.2.3. Khử trùng

- Đọc hướng dẫn chi tiết trên từng hộp môi trường theo yêu cầu của nhà sản xuất.
- Môi trường thường được khử trùng bằng nồi hấp thanh trùng ở 121⁰C/15 phút.

3.2.4. Đổ đĩa

- Môi trường cần được đổ ra đĩa ở nhiệt độ khoảng 45-55⁰C nhằm tránh sự ngưng kết hơi nước trên nắp hộp petri.
- Cần lắc nhẹ môi trường trước khi đổ để đảm bảo sự đồng nhất của môi trường.

3.2.5. Pha môi trường nuôi cấy có phản ứng acid

- Các môi trường thạch có pH thấp hơn 6.0 cần được pha chế một cách cẩn thận bởi

thạch bị thủy phân khi đun nóng trong môi trường acid và độ rắn của môi trường sẽ giảm, vì vậy cần tránh sự chảy lỏng của môi trường.

- Có thể bổ sung thêm thạch trước khi pha chế môi trường, khoảng 5g/l.

3.2.6. Chuẩn bị môi trường thạch nghiêng

- Để có một bề mặt thạch đủ rộng cho việc nuôi cấy vi sinh vật trong ống nghiệm, người ta sử dụng phương pháp "thạch nghiêng"
- Các ống nghiệm chứa môi trường thạch đã được khử trùng vẫn còn chảy lỏng được đặt nghiêng sao cho phần mặt nghiêng và phần đáy đều dài khoảng 3cm và được để đông lại trong trạng thái ấy.

4. Nguyên nhân một số sai lệch trong pha chế và sử dụng môi trường

4.1. Môi trường vón cục

- Độ ẩm quá cao trong thời gian bảo quản.
- Dụng cụ chứa bị để mở quá lâu.
- Không đậy nắp kỹ sau khi đã mở.
- Môi trường quá cũ.

4.2. Môi trường bị đục hoặc kết tủa

- Nước không được khử ion một cách đầy đủ.
- Chai lọ dùng pha môi trường không sạch.
- pH không đúng.
- Môi trường bị đun nóng quá mức trong khi pha chế.
- Trong trường hợp môi trường tự pha trộn, các hợp phần cơ bản chứa tạp chất gây kết tủa.
- Môi trường bị đục hoặc tủa do vật liệu từ mẫu cấy.
- Môi trường đã pha bị mất nước do bốc hơi.

4.3. pH sai lệch

- Nước không trung tính.
- Dụng cụ chứa không đậy nắp kỹ sau khi đã khai mở.
- Môi trường bị đun nóng quá mức trong khi pha chế.
- Môi trường quá cũ.

4.4. Điểm đông đặc quá cao

Điều này quan trọng khi vật liệu mẫu hoặc các chất kém chịu nhiệt được trộn vào môi trường trong khi môi trường vẫn còn ở trạng thái lỏng.

- Cân quá nhiều môi trường khô.
- Thạch không thích hợp.

4.5. Mức ổn định của gel quá thấp

- Cân không đủ môi trường khô.
- Môi trường khô không tan hoàn toàn.
- Môi trường bị đun quá nhiệt hoặc pH thấp.
- Dụng cụ không được súc rửa kỹ trước khi đổ đĩa.
- Trong trường hợp môi trường tự pha trộn, thạch không thích hợp hoặc quá ít.
- Môi trường có tính acid không được pha chế theo những điều kiện thích hợp.

4.6. Môi trường bị đổi màu

- Trong trường hợp môi trường có chứa chất chỉ thị: pH không chuẩn.

- Môi trường có màu tối, các sắc tố bị phân hủy, các loại đường bị caramel hóa: môi trường bị đun quá nhiệt trong khi pha.
- Bình, lọ dùng pha chế không sạch.

4.7. Môi trường đã pha bị nhiễm

- Khử trùng không đầy đủ.
- Nhiễm sau khi khử trùng.
- Đĩa petri bị nhiễm.

5. Kiểm tra lô môi trường mới

5.1. Phạm vi áp dụng

Hướng dẫn này áp dụng cho tất cả các loại môi trường: rắn hay lỏng; chọn lọc hay không chọn lọc, dung dịch pha loãng.

Chuẩn bị môi trường tham chiếu (môi trường chứng) và chủng chuẩn

- Chọn môi trường tham chiếu phải là môi trường không chọn lọc:
 - + Đối với vi khuẩn: khi kiểm tra môi trường đặc thì sử dụng môi trường tham chiếu là TSA, môi trường lỏng thì sử dụng BHT.
 - + Đối với nấm men và nấm mốc: môi trường tham chiếu là SDA.
- Chọn chủng vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy theo môi trường cần kiểm nghiệm:
 - + Đối với môi trường rắn hay lỏng dùng cho phân lập hay nuôi cấy: dùng một chủng vi sinh vật theo quy định của nhà sản xuất.
 - + Đối với môi trường dùng thử phản ứng sinh hóa: dùng hai chủng vi sinh vật theo quy định của nhà sản xuất: một chủng có phản ứng dương tính và một chủng có phản ứng âm tính.

5.2. Kiểm tra

5.2.1. Môi trường rắn

- Môi trường cần kiểm được kiểm tra pH, đun tan và đổ đĩa. Làm khô trong tủ ẩm 37°C.
- Môi trường tham chiếu được kiểm tra pH, đun tan và đổ đĩa. Làm khô trong tủ ẩm 37°C.
- Dùng que cấy vòng lấy một khayen chủng vi sinh vật vào ống nghiệm của 10ml canh thang BHI (Brain Heart Infusion). Ủ qua đêm ở 37°C ± 1,0°C.
- Lắc kỹ ống nghiệm. Pha loãng canh trường theo các nồng độ pha loãng thập phân (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) đến nồng độ pha loãng phù hợp sao cho ở một nồng độ pha loãng nằm trong dãy đó có số lượng khuẩn lạc đếm được trên đĩa nằm trong khoảng 10-100.
- Dùng pipet vô trùng hút 0,1ml ở từng nồng độ pha loãng cho vào đĩa môi trường cần kiểm tra và môi trường tham chiếu. Dùng que cấy trang dàn đều trên mặt thạch. Đối với môi trường chọn lọc mỗi nồng độ cấy 1 đĩa; với môi trường không chọn lọc mỗi nồng độ cấy 2 đĩa.
- Ủ các đĩa ở nhiệt độ thích hợp với vi khuẩn và môi trường trong 48±3 giờ.
- Đếm các đĩa có số khuẩn lạc từ 10-100
- Tính chỉ số phát triển Pr (Productivity Ratio): $Pr = N_s/N_0$
 Trong đó: N_s - số khuẩn lạc tính được trên môi trường cần kiểm tra
 N_0 - số khuẩn lạc tính được trên môi trường tham chiếu
- Tiêu chí chấp nhận:

Đối với môi trường không chọn lọc: $1,3 \geq Pr \geq 0,7$

Đối với môi trường chọn lọc: $Pr \geq 0,3$

5.2.2. Môi trường dùng thử phản ứng sinh hóa

- Cây chủng vi khuẩn có phản ứng dương tính (chủng chứng dương) và chủng có phản ứng âm tính (chủng chứng âm) vào các ống riêng chứa canh thang BHI, ủ qua đêm ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

- Cây lần lượt từng chủng vi khuẩn đã nuôi trong BHI vào các ống môi trường thử sinh hóa, ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 24 ± 3 giờ.

- Đọc kết quả âm, dương tính và so sánh.

- Tiêu chí chấp nhận:

Ống cây chủng dương tính cho kết quả dương tính.

Ống cây chủng âm tính cho kết quả âm tính.

5.2.3. Môi trường lỏng chọn lọc

- Cây chủng chuẩn của dạng vi khuẩn cần chọn lọc vào ống nghiệm hay bình chứa môi trường lỏng chọn lọc đặc hiệu cho vi khuẩn đó. Ủ ở nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn trên trong 24 ± 3 giờ.

- Cây vi khuẩn vừa được nuôi cấy lên môi trường phân lập (dạng rắn) đặc hiệu cho vi khuẩn đó. Ủ ở $37^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ trong 48 ± 3 giờ.

- Đọc kết quả.

- Tiêu chí chấp nhận: vi khuẩn phát triển tốt trên môi trường phân lập.

5.2.3. Môi trường lỏng không chọn lọc

- Xác định nồng độ pha loãng tương ứng với số đếm từ 10-100 cfu/ml dung dịch khi cấy một khuyên chủng vi khuẩn vào ống nghiệm chứa 10ml canh thang BHI.

- Từ nồng độ pha loãng đó, hút 1ml dung dịch cho vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường cần kiểm tra. Ủ ở nhiệt độ thích hợp trong 24 ± 3 giờ.

- Xác định chỉ số phát triển của vi khuẩn trong ống dựa vào mức độ nhìn thấy các đường kẻ ngang ($\phi = 1/3\text{pt}$) trong bảng Wickerham (đặt phía sau ống) khi nhìn xuyên qua ống, theo các mức:

3+: khi các đường của bảng rất khó nhìn thấy thì sự phát triển của vi khuẩn.

2+ : khi các đường của bảng như những dải mờ.

1+: khi các đường của bảng rõ ràng nhưng các đường viền bị nhòe.

-: không nhìn thấy sự phát triển của vi khuẩn.

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Trình bày các nguyên tắc cơ bản trong pha chế, sử dụng và bảo quản môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

2. Phân tích một số nguyên nhân gây ra lỗi sai lệch trong pha chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật.

3. Pha chế môi trường đặc, pha chế môi trường lỏng.

BÀI 2. LẤY MẪU, VẬN CHUYỂN VÀ BẢO QUẢN MẪU KIỂM VI SINH VẬT

Mục tiêu:

- Nêu được các điều kiện cần và quy định của công việc lấy mẫu phân tích vi sinh vật;
- Trình bày được các phương pháp lấy mẫu, bảo quản và chuẩn bị mẫu phân tích vi sinh vật;
- Xây dựng được quy trình lấy mẫu, bảo quản và chuẩn bị mẫu phân tích vi sinh vật đúng quy định, đảm bảo yêu cầu kỹ thuật.

A. NỘI DUNG

1. Mục đích và yêu cầu

Trong kiểm nghiệm vi sinh, công đoạn lấy, vận chuyển và bảo quản mẫu mặc dù được thực hiện bên ngoài phòng kiểm nghiệm nhưng lại là công đoạn rất quan trọng trong quá trình thử nghiệm. Mọi sai sót trong công đoạn này (ví dụ: lượng mẫu không đủ, mẫu bị nhiễm bẩn từ môi trường bên ngoài, bị nhiễm bẩn từ dụng cụ, bị biến đổi do các quá trình lý, hóa, sinh học diễn ra trong khi bảo quản mẫu) đều có thể dẫn đến sai lệch nghiêm trọng kết quả thử nghiệm. Do vậy, thực hiện công đoạn này nghiêm túc và đúng quy cách sẽ góp phần không nhỏ vào sự chính xác của kết quả thử nghiệm.

Việc lấy mẫu phải bảo đảm hai điều kiện sau:

- Mẫu lấy phải đại diện được lô hàng hoặc nơi lấy mẫu (khi kiểm tra vệ sinh công nghiệp) và được nhận dạng rõ ràng.
- Hàm lượng các chất hay các vi sinh vật cần xác định không được biến đổi kể từ khi lấy mẫu đến khi phân tích.

1.1. Mục đích của việc lấy mẫu

Mục đích của việc lấy mẫu phân tích là chọn một thể tích nhỏ (hay khối lượng nhỏ) phù hợp và vừa đủ của đối tượng cần nghiên cứu phân tích để làm phân tích ngay tại hiện trường, hay đóng gói vận chuyển về phòng thí nghiệm để xử lý và xác định (định tính hay định lượng) các chất chúng ta mong muốn nhưng lại đảm bảo giữ nguyên đúng thành phần của đối tượng thực tế lấy mẫu. Do đó lấy mẫu là giai đoạn đầu của quá trình phân tích. Nếu lấy sai thì quá trình phân tích không thể hiện đúng kết quả phân tích phản ánh đúng thực tế. Mẫu lấy phân tích phải đảm bảo được các yêu cầu sau :

- + Đảm bảo thực hiện đúng và đủ về đảm bảo chất lượng và kiểm soát chất lượng (QA/QC, Quality Assurance/Quality Control)
- + Đại diện đúng cho đối tượng cần nghiên cứu hay phân tích
- + Đáp ứng đúng yêu cầu phân tích hay nghiên cứu xem xét
- + Lấy mẫu không làm mất hay nhiễm bẩn thêm chất phân tích vào mẫu
- + Phải phù hợp theo phương pháp chọn để phân tích
- + Có khối lượng đủ để phân tích, không quá nhỏ và đúng theo yêu cầu
- + Mẫu phải có lý lịch và các điều kiện rõ ràng.

1.2. Các điều kiện cần của công việc lấy mẫu

Chúng ta biết rằng, mục tiêu của việc lấy mẫu là chọn một phần thể tích hay khối lượng mẫu của đối tượng với lượng đủ cho cần thiết để nghiên cứu (hay phân

tích) để vận chuyển về phòng thí nghiệm để xác định các chỉ tiêu cần thiết mà vẫn bảo đảm thể hiện đúng các thành phần thực tế của mẫu đó. Do đó việc lấy mẫu cần tuân thủ những điều kiện nhất định:

- + Theo từng mẫu phân tích nhất định
- + Theo một quy trình chỉ tiêu nhất định đối với từng loại và đã được chấp nhận
- + Theo nguyên tố hay chất phân tích
- + Dụng cụ lấy mẫu phải theo đúng quy cách chuẩn và phải đảm bảo QA/QC
- + Người lấy mẫu phải có tay nghề, phải được huấn luyện để thực hiện
- + Có sổ sách ghi chép và có hồ sơ rõ ràng

Chỉ khi thỏa mãn các điều kiện và yêu cầu trên thì kết quả phân tích mới nói lên thành phần (hàm lượng của chất trong mẫu) phân tích. Còn nếu không thỏa mãn các điều kiện đó thì dù phương pháp phân tích có chính xác đi nữa cũng không nói lên được đúng nồng độ (hàm lượng của chất).

2. Thủ tục lấy mẫu và quản lý mẫu

Tài liệu “Hướng dẫn/ thủ tục lấy mẫu và quản lý mẫu” phải nêu rõ:

2.1. Trách nhiệm của người phụ trách

- Chỉ định người lấy mẫu cụ thể, người đã được đào tạo hoặc đã qua hướng dẫn kỹ thuật lấy mẫu.
- Đảm bảo mẫu được lấy theo đúng yêu cầu: có đầy đủ chương trình/kế hoạch, phương pháp lấy mẫu thích hợp.

2.2. Trách nhiệm của người lấy mẫu

- Đọc kỹ tài liệu làm căn cứ lấy mẫu tương ứng (tài liệu luôn có sẵn để dùng).
- Chuẩn bị đủ các trang bị, dụng cụ lấy mẫu và bảo quản mẫu phù hợp.
- Chuẩn bị biên bản lấy mẫu, nhãn mẫu.

2.3. Quy định lấy mẫu

2.3.1. Kế hoạch lấy mẫu

*** Lấy mẫu kiểm tra lô hàng**

Lượng mẫu kiểm tra lô hàng tùy thuộc vào sản phẩm cụ thể, nhưng không được ít hơn yêu cầu kiểm nghiệm. Theo TCVN thì lượng mẫu lấy không lớn hơn 0,1% lô hàng, lô hàng càng lớn tỷ lệ lấy mẫu càng thấp nhưng không ít hơn 2 đơn vị sản phẩm.

Mật độ các vi sinh vật trong thực phẩm được qui định giới hạn với một số lượng nhất định tùy theo từng nhóm vi sinh vật cần phân tích (tổng số vi khuẩn hiếu khí, tổng số coliform...) và yêu cầu của từng loại thực phẩm (hàng đông lạnh, hàng chín...) và luật về vệ sinh an toàn thực phẩm. Đối với các vi sinh vật gây bệnh thông thường yêu cầu không được hiện diện trong một khối lượng thực phẩm xác định.

Số lượng vi sinh vật được xác định trong thực phẩm có thể không bao giờ phản ánh chính xác số lượng vi sinh vật thực tế có trong mẫu, vì thế theo quy ước, một khoảng giới hạn tính theo cấp độ được thiết lập để nhận biết các mẫu thực phẩm không đạt yêu cầu.

Cấp 1: cách lấy mẫu cổ điển, trong đó việc đánh giá kết quả kiểm nghiệm dựa trên một giá trị duy nhất của mẫu, ví dụ TCVN và một số nước châu Á... cho phép tổng số vi khuẩn hiếu khí trong một hàng thủy sản đông lạnh là $< 1.000.000$ vsv/1gram sản phẩm.

Cấp 2: kế hoạch lấy mẫu loại 2 được dùng cho các thử nghiệm định tính vi sinh vật gây bệnh, ví dụ lấy một số lượng mẫu nhất định ($n=5, 10, 20$ hay nhiều hơn) để phân tích định tính vi sinh vật gây bệnh. Kết quả được coi là không đạt khi 1 trong số 5 mẫu ($n=5$) bị phát hiện có vi sinh vật gây bệnh ($c=0$). Số lượng mẫu thử phụ thuộc vào mối nguy hiểm của từng loại thực phẩm nếu có sự hiện diện của vi sinh vật gây bệnh. Thực phẩm có mối nguy hiểm cao là những loại thực phẩm không qua gia nhiệt trước khi sử dụng hay những thực phẩm có tính nhạy cảm cao, ví dụ thực phẩm dành cho người già và trẻ em ...

Cấp 3: Khoảng đạt yêu cầu khi mật độ vi sinh vật nhỏ hơn thông số giới hạn dưới (m); khoảng giới hạn chấp nhận có điều kiện (ví dụ: $c/n = 2/5$) khi mật độ vi sinh lớn hơn giới hạn dưới nhưng nhỏ hơn giới hạn trên (M). Khoảng không chấp nhận khi mật độ này cao hơn giới hạn trên M . Giới hạn trên M thường cao hơn ít nhất 10 lần so với thông số giới hạn dưới m . Ví dụ tổng số vi sinh vật trong sản phẩm trứng được thanh trùng Pasteur có yêu cầu như sau:

$$n = 5, c = 2, m = 5 \times 10^4, M = 10^6$$

Trong đó n là số mẫu thử nghiệm, c là số mẫu được phép nằm trong khoảng sát mép giữa m và M .

*** Lấy mẫu kiểm tra vệ sinh công nghiệp**

Lượng mẫu phải đủ để phân tích, thông thường trọng lượng mẫu tối thiểu được quy định như sau:

Dạng rắn (phần thịt): 200 gram

Dạng lỏng (nước dùng trong chế biến, nước mắm...): 500 ml

2.3.2. Vị trí lấy mẫu

Giá trị kết quả từ các phòng thí nghiệm phụ thuộc rất nhiều vào vị trí và cách lấy mẫu.

Trong các nhà máy chế biến thực phẩm, thông thường mẫu dùng cho kiểm tra vệ sinh công nghiệp được lấy với một khối lượng nhỏ tại nhiều thời điểm và nhiều công đoạn khác nhau trong quá trình chế biến. Có thể tập trung lấy mẫu tại công đoạn thành phẩm nhiều hơn, nhưng trong một số trường hợp cần thiết, điều này có thể áp dụng cho một vài công đoạn trọng yếu trong quá trình sản xuất.

Đối với các loại mẫu thịt hay cá, nơi nhiễm chủ yếu là bề mặt sản phẩm, vì thế có thể sử dụng các dụng cụ lấy mẫu bề mặt để quét trên bề mặt sản phẩm hay cắt mẫu trên bề mặt với độ dày khoảng 2-3mm.

Đối với các thực phẩm đã đóng gói, lấy mẫu từ các gói lớn từ đó lấy ra các đơn vị bao gói nhỏ hơn.

2.3.3. Dụng cụ lấy mẫu và thùng chứa mẫu

Thường sử dụng các bình nhựa có nắp bằng nhôm hay bằng chất dẻo, bao nylon để chứa mẫu. Không nên sử dụng các bình bằng thủy tinh để chứa mẫu bởi vì có thể bị vỡ gây nhiễm mẫu hay gây tai nạn cho người phân tích.

Dụng cụ lấy mẫu thường làm bằng các loại chất liệu khác nhau như vật dụng dùng để lấy mẫu đông lạnh là các khoan tay đã được vô trùng, hay các dao, thìa, kéo được hấp, sấy hoặc rửa trong các dung dịch tẩy trùng.

2.3.4. Ghi ký hiệu và nhận dạng mẫu thử

Phòng kiểm nghiệm phải có quy định riêng về ghi ký – mã hiệu của mẫu thử sao cho có thể nhận dạng được mẫu thử trong suốt quá trình từ khi lấy mẫu đến khi trả phiếu kết quả phân tích. Không để xảy ra nhầm lẫn do việc sử dụng ký hiệu không rõ ràng hoặc ghi sai với nguồn gốc của mẫu, ví dụ: việc ghi ký hiệu riêng cho từng phân xưởng, ký hiệu riêng trên bao bì nguyên liệu của khách hàng...

Ký - mã hiệu này sẽ xuất hiện trên mẫu và trên tất cả các giấy tờ, sổ sách có liên quan đến mẫu thử như: biên bản lấy mẫu, phiếu giao nhận mẫu, sổ nhận mẫu, báo cáo kết quả thử nghiệm, phần mẫu lưu (nếu có).

Ký – mã hiệu ghi trên mẫu phải đảm bảo bền vững với các tác nhân vật lý như không bị phai mực, được ghi trên nhãn có độ bám dính tốt.

2.3.5. Bảo quản và vận chuyển mẫu

* **Mẫu thực phẩm**

Các mẫu sau khi lấy được bảo quản tách biệt nhau trong các thùng bảo quản mẫu và được bảo quản lạnh trong suốt thời gian vận chuyển đến phòng kiểm nghiệm. Tại phòng kiểm nghiệm mẫu được chuyển vào trong tủ đông và được phân tích ngay trong thời gian có thể được.

Nếu không được phân tích ngay, mẫu phải được bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích. Nếu các mẫu không thể bảo quản đông, có thể bảo quản trong tủ lạnh $0-4^{\circ}\text{C}$ nhưng không quá 36 giờ.

Các loại thực phẩm như đồ hộp, thực phẩm có độ ẩm thấp, hay thực phẩm khó hư hỏng có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng cho đến khi phân tích.

Nên giữ mẫu trong các bao bì ban đầu. Nếu phải chuyển mẫu qua bao bì khác, mẫu phải được chứa trong bao bì sạch/ vô trùng và làm bằng vật liệu không ảnh hưởng đến chất lượng và tình trạng ban đầu của mẫu, làm sai lệch kết quả phân tích.

Mẫu phải được bảo quản trong điều kiện thích hợp trước khi vận chuyển về phòng kiểm nghiệm. Các vật dụng chứa mẫu phải được thiết kế sao cho mẫu không bị nhiễm bẩn và tránh thay đổi khác do các yếu tố cơ, lý, hóa học.

Chế độ bảo quản mẫu:

- + Mẫu mau hồng (sushi các loại, đông IQF, dạng hút chân không, dạng ướp đá): phải được bảo quản lạnh ngay sau khi lấy mẫu bằng thùng cách nhiệt có đá để duy trì mẫu ở nhiệt độ thấp ($0-4^{\circ}\text{C}$). Mẫu cần được để trong bao kín, tránh tiếp xúc trực tiếp với nước đá.

- + Mẫu dạng đông block: không được để tan đá một phần hoặc toàn phần trước khi về đến phòng kiểm nghiệm.

- + Mẫu không thuộc dạng mau hồng: sử dụng các bao túi kín, nhiệt độ bảo quản trong thời gian vận chuyển không vượt quá 45°C .

Yêu cầu về mẫu kiểm: mẫu được chấp nhận khi:

- + Dụng cụ chứa mẫu không rò rỉ, có nắp đậy kín, không bị nứt, thủng gây nhiễm bẩn mẫu.

- + Mẫu dạng hút chân không: bao bì kín, không có khí bên trong.

- + Mẫu dạng block, dạng nguyên con phải nguyên vẹn, không dập nát.

* **Mẫu nước**

Nếu có thể, phân tích các chỉ tiêu vi sinh ngay sau khi lấy mẫu để tránh những

thay đổi không lường trước được. Nếu mẫu không thể phân tích trong vòng 1 giờ sau khi lấy mẫu, phải bảo quản trong các thùng lạnh trước khi vận chuyển mẫu đến các phòng kiểm nghiệm. Nếu kết quả phân tích có liên quan đến pháp luật, phải sử dụng một phương tiện vận chuyển đặc biệt để chuyển mẫu đến phòng kiểm nghiệm chậm nhất là 6 giờ với một quy trình bảo quản đặc biệt.

Nhiệt độ bảo quản nước uống, nước suối, hay nước bị ô nhiễm là dưới 10⁰C và thời gian vận chuyển không quá 6 giờ. Bảo quản trong tủ lạnh tại các phòng kiểm nghiệm cũng không được quá 2 giờ. Trong điều kiện bắt buộc không thể vận chuyển mẫu về phòng kiểm nghiệm nhanh hơn 6 giờ, phải xem xét đến việc trang bị các phương tiện phân tích ngay tại vị trí lấy mẫu hoặc sử dụng quy trình ủ chờ.

Tuy nhiên các yêu cầu trên khó được đáp ứng. Trên thực tế các chỉ tiêu yêu cầu thời gian vận chuyển và bảo quản là không quá 24 giờ. Không chấp nhận các mẫu khi gửi đến phòng kiểm nghiệm bằng con đường bưu điện và không được bảo quản theo các yêu cầu. Thời gian và nhiệt độ bảo quản mẫu phải được ghi chép lại trong sổ theo dõi mẫu.

3. Xử lý sơ bộ mẫu thực phẩm trong phòng phân tích vi sinh

3.1. Phạm vi áp dụng

Phương pháp này hướng dẫn việc lấy mẫu và xử lý sơ bộ mẫu thực phẩm và được áp dụng để phân tích vi khuẩn, nấm men, nấm mốc đối với các mẫu dạng rắn, dạng mềm và dạng lỏng.

3.2. Nguyên tắc

Theo quy trình chuẩn, mẫu để phân tích tại phòng phân tích vi sinh được xác định bởi một phần thể tích, khối lượng hay bề mặt lấy từ một sản phẩm thực phẩm.

3.3. Thuốc thử

Ngoài dung dịch pha loãng saline pepton, trong trường hợp đặc biệt có thể sử dụng các dung dịch pha loãng chọn lọc khác.

3.4. Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

3.4.1. Định nghĩa

Mẫu kiểm (laboratory sample): một lượng thực phẩm được lấy mẫu, được chuyển đi hoặc được tiếp nhận để kiểm tra.

Mẫu phân tích: lượng mẫu được dùng để phân tích và là một phần của mẫu sản phẩm được đem phân tích.

3.4.2. Lấy mẫu

Mẫu kiểm phải mang tính chất đại diện cho lô thực phẩm.

Mẫu kiểm của một lô hàng lớn hoặc mẫu thực phẩm chưa bao gói tối thiểu phải đạt 200 gram, trong khi mẫu sản phẩm bao gói tối thiểu chỉ cần 100 gram.

Với sản phẩm bao gói, chỉ những sản phẩm còn nguyên bao mới được dùng để phân tích. Mẫu thức ăn cho động vật quá nhiều thành phần nên phải lấy tối thiểu 500 gram để phân tích.

3.4.3. Chuẩn bị mẫu

Mẫu kiểm còn trong bao gói được bảo quản theo hướng dẫn ghi trên nhãn, mẫu không bao gói được bảo quản ở 0-4⁰C. Mẫu phải được phân tích trong vòng 24 giờ từ khi lấy. Trong trường hợp xác định được thời gian sử dụng, yêu cầu về nhiệt độ và thời

gian chờ kiểm có thể dài hơn. Mẫu kiểm dạng đông phải được bọc để chống mất nước và giữ ở nhiệt độ tối đa 18°C cho đến khi phân tích.

Thực phẩm đông lạnh: Mẫu kiểm hàng đông phải được rã đông ở tối đa 4°C trong vòng 18 giờ. Những mẫu có kích thước nhỏ hoặc dễ tan có thể đặt trong tủ ấm ($\leq 37^{\circ}\text{C}$) để rã đông. Quá trình rã đông phải được hoàn tất trong vòng 15 phút.

3.5. Tiến hành

3.5.1. Xác định hệ vi sinh vật bên trong các loại thực phẩm rắn

Dùng dụng cụ vô trùng lấy một mẫu từ bên trong sản phẩm, ít nhất khoảng 10 gram trừ khi có yêu cầu khác theo các phương pháp phân tích đặc hiệu. Chuyển mẫu vào bao, rót dịch pha mẫu và cân. Tỷ lệ mẫu : dịch pha mẫu là 1:9. Đồng nhất mẫu trong túi đập mẫu 30 giây. Nếu mẫu khó đập có thể đồng nhất trong 1 phút. Mẫu phải được pha loãng ở nồng độ thích hợp để có thể sử dụng phân tích ngay.

3.5.2. Xác định hệ vi sinh vật bề mặt các loại thực phẩm rắn

Lấy một lớp mỏng bề mặt (dày 1-2 mm) với diện tích tối thiểu 10 cm², trừ khi có yêu cầu khác theo các phương pháp phân tích đặc hiệu. Cho vào bao, pha loãng tỷ theo tỷ lệ 1:9, 10 gram mẫu + 90ml dung dịch pha loãng.

Đồng nhất mẫu trong vòng 30 giây. Nếu mẫu khó đập có thể đồng nhất trong một phút. 1ml dịch pha loãng mẫu tương đương với số vi sinh vật trên 1/100 bề mặt đã chọn (1 ml đại diện cho 0,1cm² khi bề mặt lấy mẫu là 10 cm²) và có thể dùng để cấy vào trong hoặc lên trên các cơ chất tương ứng.

3.5.3. Xác định hệ vi sinh vật trung bình ở các loại thực phẩm rắn và mềm

*** Thực phẩm (bao gồm cả nguyên liệu)**

Lấy và cân một lượng mẫu xác định từ thực phẩm cần kiểm trong điều kiện vô trùng sao cho tỷ lệ bề mặt và bên trong tương xứng phù hợp cho việc đánh giá chất lượng vi sinh của thực phẩm. Lượng mẫu tối thiểu cần cho phân tích là 10 gram.

*** Thực phẩm dạng khô rời**

Trộn mẫu kiểm thật đều trước khi lấy mẫu phân tích. Nếu không thể trộn kỹ trong bao bì gốc thì chuyển mẫu sang lọ hoặc bình chứa vô trùng thích hợp để trộn.

Cân 10 gram mẫu, cho vào túi đập mẫu có chứa 90 ml dung dịch pha loãng (hoặc theo hướng dẫn cụ thể tùy phương pháp). Đồng nhất mẫu trong 30 giây.

3.5.4. Xác định hệ vi sinh vật trong thực phẩm lỏng

Trộn mẫu bằng các lắc đảo ngược chai 10 lần (hoặc theo hướng dẫn cụ thể tùy phương pháp). Dùng pipet cấy chuyển mẫu vào môi trường thích hợp. Có thể pha loãng mẫu tiếp nếu cần.

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Nêu được các điều kiện cần và quy định của công việc lấy mẫu phân tích vi sinh vật
2. Trình bày được các phương pháp lấy mẫu, bảo quản và chuẩn bị mẫu phân tích vi sinh vật;
3. Xây dựng quy trình lấy và bảo quản mẫu nước, mẫu thực phẩm

Bài 3.

NUÔI CÂY VÀ ĐỊNH LƯỢNG MẪU TRONG KIỂM NGHIỆM VI SINH

Mục tiêu:

- Trình bày được các phương pháp nuôi cấy và định lượng vi sinh vật, phương pháp khử trùng vật liệu nuôi cấy sau khi sử dụng;
- Áp dụng được một số kỹ thuật làm tiêu bản trong nghiên cứu hình thái vi sinh vật;
- Xác định được phương pháp định lượng vi sinh vật phù hợp với mẫu phân tích.

A. NỘI DUNG

1. Nuôi cấy vi sinh vật

Quá trình nuôi cấy vi sinh vật gồm 2 hoạt động: cấy và nuôi.

- Nuôi là quá trình đảm bảo, duy trì những điều kiện thuận lợi nhất cho sự hoạt động và phát triển của vi sinh vật.
 - Cấy là những thao tác chuyển vi sinh vật từ môi trường đang sống sang một môi trường thuận lợi hơn cho sự phát triển của chúng.
- Hai hoạt động này luôn gắn bó với nhau và không tách rời nhau trong quá trình nghiên cứu và ứng dụng vi sinh vật.

1.1. Mục đích nuôi cấy

- Phát hiện sự có mặt của vi sinh vật trong các mẫu phân tích
- Nhân giống vi sinh vật
- Bảo tồn các chủng giống vi sinh thuần
- Nghiên cứu các đặc tính sinh lý sinh hóa, sinh thái của vi sinh vật

1.2. Nguyên tắc

- Mọi thao tác nuôi cấy đều phải thực hiện trong điều kiện vô trùng để tránh ngoại nhiễm
- Môi trường, dụng cụ cần phải được khử trùng triệt để
- Duy trì tốt các điều kiện nuôi cấy để vi sinh vật phát triển

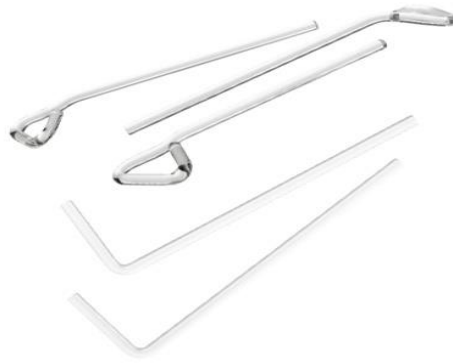
1.3. Các phương pháp cấy vi sinh vật

1.3.1. Dụng cụ cấy

- Que cấy thẳng: que cấy kim loại có đầu nhọn, thường dùng để cấy các chủng ở dạng khuẩn lạc từ môi trường rắn lên môi trường rắn hoặc lỏng
- Que cấy vòng: que cấy kim loại đầu có vòng tròn, thường dùng để cấy các chủng từ môi trường rắn hoặc lỏng lên môi trường rắn, lỏng.
- Que cấy trang: bằng kim loại hoặc bằng thủy tinh, đầu hình tam giác, dùng để dàn trải vi sinh vật trên bề mặt thạch rắn.
- Pipet thủy tinh dùng để chuyển một lượng vi sinh vật nhất định lên bề mặt môi trường rắn hoặc lỏng. Hoặc sử dụng các micropipet với các đầu tip vô trùng có thể tháo rời hoặc thay đổi.
- Đầu tăm bông vô trùng cấy giống từ môi trường lỏng lên bề mặt môi trường rắn.



Hình 3.1. Que cấy đầu nhọn và vòng



Hình 3.2. Que cấy trang



Hình 3.3. Micropipet – Đầu tip/đầu côn – Hộp đựng đầu côn

1.3.2. Các thao tác vô trùng

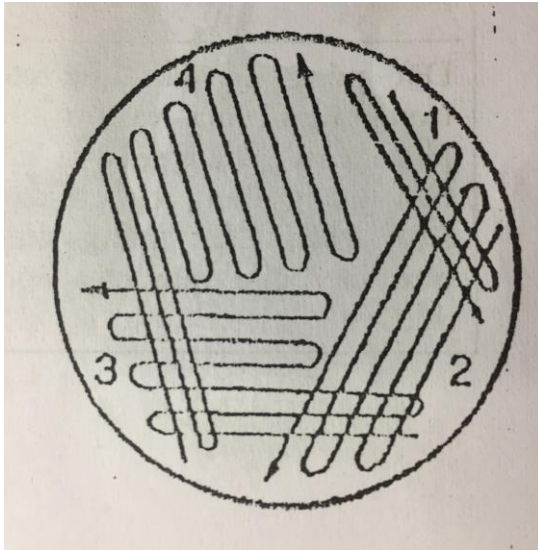
Thao tác cấy được thực hiện trong một không gian vô trùng: sử dụng tủ cấy dùng đèn cực tím khử trùng môi trường xung quanh, hoặc sử dụng ngọn lửa đèn cồn oxy hóa không khí tạo không gian vô trùng.

Người thực hiện thao tác cấy sử dụng găng tay hoặc khử trùng tay bằng cồn 70⁰ hoặc các dung dịch diệt khuẩn, tương tự như vậy khử trùng mặt bàn thao tác trước khi bắt đầu thao tác vô trùng. Sau khi hoàn tất, việc cấy chủng, tiến hành sát trùng tay, mặt bàn làm việc tương tự như khi bắt đầu.

1.3.3. Các kỹ thuật cấy

* Kỹ thuật cấy rìa

- Dùng que cấy vòng đã được khử trùng nhúng vào dịch mẫu, hoặc lấy một ít giống để có được các vi sinh vật cần phân lập.
- Cấy rìa các đường trên đĩa petri chứa môi trường thạch thích hợp như hình 3.4. Sau mỗi đường rìa liên tục, đốt khử trùng que cấy và làm nguội trước khi thực hiện đường rìa tiếp theo.
- Lật ngược đĩa, nuôi ở nhiệt độ và thời gian thích hợp trong tủ ẩm.



Hình 3.4. Phương pháp cấy ria

* Kỹ thuật cấy trang

- Dùng pipet chuyển 0,1ml dịch khuẩn lên bề mặt môi trường thạch trong đĩa petri.
- Sử dụng que cấy trang đã được khử trùng hoặc khử trùng trên ngọn lửa đèn cồn. Để đầu thanh gạt nguội trong không gian vô trùng.
- Mở nhẹ đĩa petri, đặt nhẹ thanh gạt lên bề mặt thạch của đĩa petri. Dùng đầu thanh gạt trải đều dịch khuẩn trên bề mặt thạch. Trong khi trải, thực hiện xoay đĩa một vài lần để tạo điều kiện cho thanh gạt trải dịch khuẩn đều khắp bề mặt môi trường.
- Lật ngược đĩa, nuôi ở nhiệt độ và thời gian thích hợp trong tủ ẩm.

* Kỹ thuật cấy đổ đĩa

- Dùng pipet chuyển 1ml dịch khuẩn vào đĩa petri chưa có môi trường
- Đổ một lớp môi trường thích hợp, ở nhiệt độ 45-50°C. Đậy nắp hộp petri
- Đảo nhẹ đĩa petri sang bên trái 5 vòng và bên phải 5 vòng.
- Để môi trường nguội, đông lại
- Lật ngược đĩa, nuôi ở nhiệt độ và thời gian thích hợp trong tủ ẩm.

* Kỹ thuật cấy chuyển

Cấy chuyển giống từ ống nghiệm này sang ống nghiệm khác hay sang bình tam giác...ta thường dùng que cấy vòng và tiến hành trong phòng vô trùng trên ngọn lửa đèn cồn.

Từ môi trường thạch nghiêng sang môi trường thạch nghiêng: Tay trái cầm hai ống nghiệm với độ nghiêng vừa phải (ống giống ở ngoài, ống môi trường ở trong) giữa hai ngón cái và trỏ, tựa lên ngón tay giữa, lòng bàn tay hướng lên trên. Dùng các ngón tay phải xoay lỏng nút bông. Tay phải cầm que cấy và đốt vô trùng trên ngọn lửa. Sau đó rút các nút bông bằng các kẽ ngón tay phải, hơ nóng các miệng nút bông trên ngọn lửa. Đưa que cấy vào ống giống lấy một ít giống trên vòng que cấy, rồi chuyển que cấy vào tận phần cuối phần thạch nghiêng của ống môi trường cấy theo hình chữ chi, hoặc hình vòng xoắn hoặc hình thẳng. Chú ý trước khi lấy giống cần đặt vòng que cấy vào bề mặt thạch chỗ không có giống vi sinh vật phát triển để làm nguội đầu que cấy và khi đã lấy giống đầu que cấy không để chạm vào thành ống nghiệm.

Từ môi trường lỏng trong ống nghiệm hoặc trong bình tam giác: Ta đặt vòng

que cây có giống và khua cho giống hoà vào dịch cấy, còn cây giống từ dịch nuôi cấy lỏng ta đặt vòng que cấy có giống lên thành ống nghiệm hoặc bình gần chỗ môi trường, rồi nghiêng môi trường cho cuốn đi. Trường hợp cấy dịch giống ta còn dùng pipet đã vô trùng.

Sau khi cấy xong đốt miệng ống nghiệm, hơ nóng các miệng nút bông trên ngọn lửa và đẩy nút bông lại và đem nuôi ở tủ ẩm thích hợp.

1.4. Nuôi ủ vi sinh vật

Để đảm bảo sự phát triển của vi sinh vật, sau khi cấy xong phải quan tâm đến các điều kiện nuôi dưỡng chúng.

- Nhiệt độ: phải chọn nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của mỗi chủng vi sinh vật và duy trì nhiệt độ ổn định trong quá trình nuôi.

- Độ ẩm: để duy trì độ ẩm trong quá trình nuôi ủ, cần: – đảm bảo đủ lượng nước khi làm môi trường; khi cần thiết có thể để nước bốc hơi trong tủ ẩm.

- Khí oxy

Đối với vi khuẩn hiếu khí cung cấp thường xuyên và đầy đủ không khí bằng cách thường xuyên lắc bình chứa môi trường trong quá trình nuôi ủ nếu nuôi trong môi trường dịch thể; môi trường thạch khi làm cần đổ môi trường đủ dày để oxy không khí có thể thấm vào.

Đối với vi khuẩn kỵ khí, hạn chế oxy bằng cách đổ paraffin lỏng trên bề mặt môi trường, hoặc cấy sâu vào trong môi trường đặc, hoặc nuôi trong tủ ẩm CO₂.

2. Quy trình nhân giống và bảo quản chủng vi sinh vật chuẩn

2.1. Nguồn gốc

Chủng chuẩn cung cấp cho phòng kiểm nghiệm phải có nguồn gốc từ các nhà cung cấp hay các tổ chức cung cấp giống có uy tín, có chức năng cung cấp chủng giống vi sinh vật.

Giống được cung cấp phải đảm bảo yêu cầu về chất lượng, hoạt tính, có các đặc điểm sinh hóa, tính chất kháng nguyên đáp ứng yêu cầu của phòng kiểm nghiệm.

Khi nhà cung cấp chuyển đến phòng kiểm nghiệm, các ống chủng phải có nhãn, ghi tên đầy đủ, mã số, ký hiệu chủng loại kèm theo hướng dẫn bảo quản, số lần cấy chuyển và các đặc điểm sinh hóa, kháng nguyên. Hình 3.5.

2.2. Nhân giống và bảo quản

Chủng giống dạng động khô từ các ngân hàng giống được coi là giống gốc. Từ đây chủng được nhân lên trong môi trường canh thang (lần cấy chuyển thứ nhất).

Vi sinh vật từ môi trường canh thang được cấy chuyển vào môi trường thạch dinh dưỡng Tryptone Soy Agar (TSA) và môi trường chọn lọc.

Khi ống chủng sắp hết thời gian bảo quản cho một lần cấy chuyển, các chủng giống được nhân lên trong môi trường canh thang dinh dưỡng và cấy chuyển vào các ống thạch nghiêng để bảo quản tương tự.

Với mỗi chủng chuẩn chỉ được cấy chuyển tối đa 5 lần kể cả lần nhân giống đầu tiên. Sau mỗi lần cấy chuyển đều phải kiểm tra lại hoạt tính và độ thuần của chủng. Khi hết thời hạn cấy chuyển phải thay chủng giống mới.



Hình 3.5. Chủng giống chuẩn

2.3. Sử dụng chủng chuẩn trong phân tích mẫu

Các chủng chuẩn trong môi trường thạch nghiêng trước khi sử dụng làm mẫu đối chứng dương được cấy sang môi trường thạch đĩa không chọn lọc (Plate Count Agar -PCA, TSA hoặc Nutrient Agar – NA) nhằm kiểm tra độ tinh khiết, các đĩa này được bảo quản và sử dụng trong 1 tuần.

2.4. Chú ý khi sử dụng chủng chuẩn

Chủng chuẩn phải được bảo quản cẩn thận ở 4⁰C, mỗi ống chủng phải có nhãn ghi thông tin như: tên, ký hiệu chủng, ngày, số lần cấy chuyển....

Kiểm nghiệm viên phải thận trọng và tuân thủ các quy định về an toàn trong phòng kiểm nghiệm khi cấy chuyển hoặc thao tác với các chủng chuẩn để tránh nhiễm bệnh hoặc làm lây lan mầm bệnh.

Dụng cụ sau khi tiếp xúc với các chủng chuẩn vi khuẩn phải được thanh trùng cẩn thận. Được hấp khử trùng ở 121⁰C trong 20 phút trước khi đem rửa, dụng cụ thủy tinh ngâm trong dung dịch chlorine, sau đó rửa bằng xà phòng và tráng lại nước sạch trước khi phơi khô.

3. Kỹ thuật nghiên cứu hình thái vi sinh vật

Để quan sát, nghiên cứu hình thái vi sinh vật thì phải quan sát dưới kính hiển vi nên cần phải làm tiêu bản các tế bào sống và tiêu bản các tế bào đã được cố định (tế bào chết).

3.1. Kỹ thuật soi tươi vi sinh vật

Đây là phương pháp đơn giản, nhanh, dùng để quan sát tế bào vi sinh vật đang sống, đang vận động, sinh sản, chỉ dùng một lần. Có một số loại tiêu bản tạm thời sau đây:

3.1.1. Tiêu bản giọt ép

Được dùng để xác định hình thái các tế bào vi sinh vật, xác định kích thước và sự sắp xếp của chúng, phương thức sinh bào tử, khả năng di động. Cách làm như sau:

Trên một phiến kính khô ta giở một giọt nước cất vô trùng hay nước muối sinh lý (0,5 ÷ 0,85%), dùng que cấy lấy một ít tế bào vi sinh vật hay các vật liệu cần nghiên cứu khác hoà đều vào giọt nước đó. Khi dùng dung dịch huyền phù mà trong đó mật độ các tế bào vi sinh vật không đặc lắm thì dùng que cấy hoặc pipet lấy một giọt dịch đó giở vào chính giữa một phiến kính thật sạch. Sau đó dùng lá kính ép lên giọt dịch mẫu sao cho không tạo bọt khí. Trường hợp giọt nước chưa choán hết bề mặt lá kính ta

giỏ thêm vào bên cạnh để cho tràn thêm vào hoặc trường hợp giọt nước tràn ra ngoài lá kính thì dùng giấy lọc để bên rìa cho thấm bớt đi. Đặt bản mẫu lên giá kính hiển vi và quan sát.

3.1.2. Tiêu bản giọt treo

Dùng để quan sát sự sinh sản của vi sinh vật, sự hình thành và sự nảy mầm của bào tử, phát hiện khả năng di động và mối quan hệ của các tế bào vi sinh vật với các kích thích hoá học. Cách làm như sau:

Dùng phiến kính có vết lõm ở giữa để chứa giọt treo dưới lá kính. Trước khi dùng cần bôi một ít mỡ vaselin xung quanh vết lõm. Sau đó dùng que cấy hoặc pipet lấy một giọt dịch nghiên cứu giỏ vào chính giữa lá kính, rồi dùng 2 ngón tay (ngón cái và ngón giữa) lật sập lá kính (cho giọt treo xuống dưới). Đặt nhẹ nhàng lá kính có giọt treo lên chỗ lõm của phiến kính. Chú ý không để giọt nghiên cứu chạm vào thành hoặc đáy vết lõm. Đặt bản mẫu lên giá kính và quan sát. So với phương pháp giọt ép thì phương pháp này quan sát dễ hơn và có thể dùng lâu hơn.

3.1.3. Tiêu bản tạm thời có nhuộm màu

Quan sát các tế bào sống không màu nhiều khi không rõ, để khắc phục điều đó ta dùng phương pháp nhuộm màu. Với phương pháp này còn có thể phân biệt được tế bào sống và tế bào chết: gặp thuốc nhuộm tế bào chết bắt màu ngay, còn tế bào sống sau vài phút mới bắt màu. Để tế bào sống và hoạt động trong thời gian quan sát, ta phải chọn loại thuốc nhuộm ít độc đối với chúng và dùng với nồng độ loãng ($0,01 \div 0,001\%$). Thuốc nhuộm thường dùng là xanh metylen hoặc fuchsin loãng. Cách làm như sau:

- Cho một giọt thuốc nhuộm và một giọt dịch nghiên cứu lên phiến kính, trộn đều rồi ép lá kính lên và đem soi ngay dưới kính hiển vi.
- Cho một giọt thuốc nhuộm lên phiến kính, dàn đều thành một vùng nhỏ rồi để khô. Sau đó giỏ một giọt dịch nghiên cứu lên vùng đó, rồi ép lá kính và đem soi dưới kính hiển vi.

+ Fuchsin loãng ($2 \div 3$ phút)

+ Xanh metylen ($3 \div 5$ phút)

Sau đó dùng nước rửa sạch, để khô và quan sát.

Cách pha các thuốc nhuộm trên như sau:

- Pha Fuchsin loãng. Muốn có thuốc nhuộm Fuchsin loãng trước tiên phải pha Fuchsin đặc theo Zil (Ziehl) có thành phần như sau:

Fuchsin bazơ:	1g
Phenol tinh thể:	5g
Cồn 96 ⁰ :	10ml
Glycerin:	vài giọt
Nước cất:	100ml

Nghiền Fuchsin với phenol trong cối, thêm vài giọt glycerin và từng ít một cồn cho đến hết. Khi hỗn hợp đã trộn đều, không còn cục nhỏ, ta thêm nước dần dần vào và khuấy đều, để yên trong 48 giờ, lọc. Thuốc nhuộm này có thể bảo quản trong nhiều tháng và thường dùng để nhuộm phức tạp.

Pha Fuchsin loãng: 1ml Fuchsin đặc theo Zil + 9ml nước cất.

- Pha xanh metylen bão hoà trong rượu: cho 3g xanh metylen vào 100ml rượu 96⁰, lắc đều, để vài ngày, mỗi ngày lắc vài lần, sau đó đem lọc. Dung dịch có thể bảo quản lâu. Khi dùng pha loãng 5 ÷ 10 lần bằng nước cất.

- Pha xanh metylen theo Loeffler:

Xanh metylen bão hoà trong rượu:	30ml
Dung dịch KOH 1%:	1ml
Nước cất:	100ml

3.2. Phương pháp nhuộm Gram

3.2.1. Chuẩn bị vết bôi

Giống như khi làm tiêu bản giọt ép: trên một phiến kính khô ta giở một giọt nước cất vô trùng hay nước muối sinh lý (0,5 ÷ 0,85%), dùng que cấy lấy một ít tế bào vi sinh vật hay các vật liệu cần nghiên cứu khác hoà đều vào giọt nước đó, rồi dàn thật mỏng. Khi dùng dung dịch huyền phù mà trong đó mật độ các tế bào vi sinh vật không đặc lắm thì dùng que cấy hoặc pipet lấy một giọt dịch đó giở lên phiến kính sạch rồi dàn thật đều, thật mỏng. Không nên làm các vết bôi có mật độ vi sinh vật quá lớn hay quá nhỏ.

3.2.2. Làm khô vết bôi

Tiêu bản được làm khô trong không khí ở nhiệt độ phòng. Vết bôi mỏng sẽ khô rất nhanh. Nếu nó khô chậm, có thể sấy nhẹ trong một luồng không khí nóng bằng cách cầm phiến kính hơi lên phía trên cao của ngọn lửa đèn cồn, hay đèn khí. Động tác này phải làm rất cẩn thận, không được làm quá nóng vết bôi, vì như vậy thì vi sinh vật sẽ bị biến dạng đi.

3.2.3. Cố định vết bôi

Có nhiều mục đích khác nhau: gắn các tế bào vi sinh vật lên phiến kính để tránh bị rửa trôi về sau, làm cho vết bôi bắt màu thuốc nhuộm dễ hơn bởi vì các tế bào chết dễ nhuộm màu hơn các tế bào sống và để an toàn sử dụng vết bôi hơn, nhất là khi sử dụng các vi sinh vật gây bệnh.

Có nhiều phương pháp cố định vết bôi, phương pháp đơn giản nhất là cố định bằng sức nóng (bản mẫu hơi trên ngọn lửa đèn cồn hai, ba lần. Chú ý chỉ hơi mặt dưới của bản mẫu trên phần ngọn lửa không nóng lắm, nghĩa là vết bôi nằm ở phía trên của phiến kính). Phương pháp cố định bằng nhiệt ít nhiều cũng làm biến dạng tế bào vi sinh vật. Có thể dùng phương pháp cố định bằng hoá chất: cồn 95⁰ trong 5 ÷ 20 phút, hoặc giở vài giọt cồn 90 ÷ 95⁰ lên vết bôi rồi đốt cháy và dập tắt ngay (làm vài lần, sau để khô). Dùng rượu metylic trong 5 phút, acetone trong 5 phút.

3.2.4. Nhuộm màu

Nhuộm Gram: Vi sinh vật thường chia thành hai nhóm: gram (+) và gram (-). Trong tế bào của vi sinh vật Gram dương có chứa phức chất đặc biệt, muối Mg ribonucleat, khi phức chất này kết hợp với thuốc nhuộm triphenylmetyn (như tím gentian, tím kết tinh, tím metylen...) và iot sẽ cho màu tím rất bền vững, chịu được tác dụng của cồn. Những vi sinh vật Gram âm không có đặc điểm này nên bắt màu hồng.

Các vi sinh vật Gram (+) gồm cầu khuẩn, trực khuẩn hiếu khí có nha bào (*Bacillus subtilis*, *Bacillus mentericus*, ...). Các vi sinh vật Gram (-) gồm vi khuẩn đường ruột (*Escherichia coli*, *Bacillus typhi*...).

Thuốc nhuộm Gram gồm có:

+ Dung dịch tím gentian cacbolic:

Tím gentian: 1g
Cồn 96⁰: 10ml
Acid cacbolic 5%: 100ml

Hoà tan thuốc nhuộm với cồn rồi cho acid vào, lắc đều. Sau đó thêm từng giọt cồn cho đến khi hết vẩn kim loại trên bề mặt.

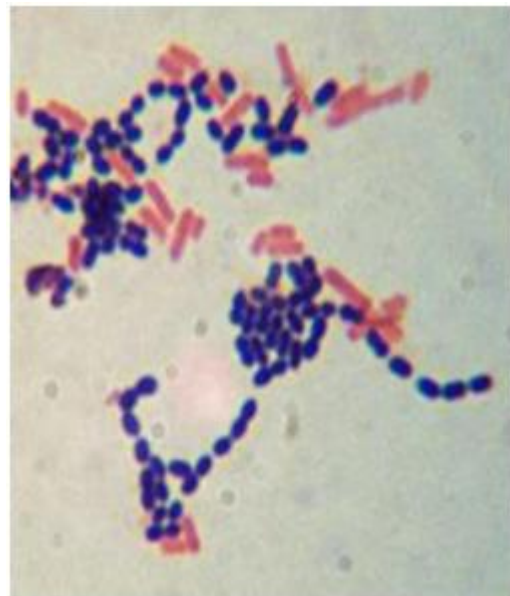
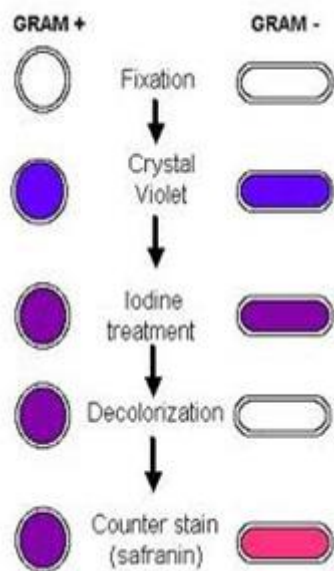
+ Dung dịch Lugol:

Iot: 1g
KI: 2g
Nước cất: 300ml

Hoà KI trong 5ml nước cất cho tan hết rồi cho iot vào và thêm đến 300ml.

* Cách nhuộm gồm các bước sau đây:

- Làm vết bôi, để khô
- Cố định vết bôi bằng cách hơi qua vài lần trên ngọn lửa đèn cồn
- Nhuộm bằng tím gentian trong 1 ÷ 2 phút
- Rửa hết thuốc đi, nhỏ dung dịch lugol và để trong 1 phút
- Rửa hết thuốc, rửa bằng nước, rồi nhúng vào cồn 95⁰ trong 30 ÷ 40 giây. Cần làm cẩn thận vì kết quả phụ thuộc nhiều vào động tác này
- Lại rửa bằng nước rồi nhuộm bổ sung bằng fuchsin loãng trong 0,5 ÷ 1 phút
- Rửa, để khô và soi kính. Kết quả: vi sinh vật gram (+) có màu tím, gram (-) có màu đỏ.



Hình.3.6. Sự bắt màu thuốc nhuộm ở tế bào Gram (-) và Gram (+)

4. Các phương pháp định lượng vi sinh vật

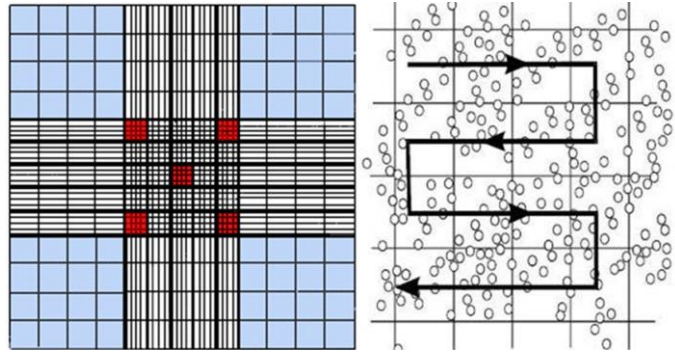
4.1. Phương pháp đếm trực tiếp

Số lượng vi sinh vật trong mẫu có thể được xác định bằng cách đếm trực tiếp trên kính hiển vi kết hợp sử dụng buồng đếm hồng cầu Petroff – Hausser. Là một lam kính dày 2-3mm có một vùng đĩa đếm nằm giữa lame kính vùng này được bao quanh bởi một rãnh. Đĩa đếm thấp hơn bề mặt của lame kính khoảng 0,02mm, có hình tròn vì

thể khi phủ lên trên bằng kính đáy vật thì độ sâu của đĩa đếm sẽ đồng đều nhau. Vùng đĩa đếm có diện tích 1mm^2 và được chia thành 400 ô vuông nhỏ hơn, mỗi ô có diện tích 0.0025mm^2 . thể tích của mỗi ô là $0,02 \times 0,0025 \text{ mm}^2$, thể tích này tương đương với $0,00005\text{ml}$.



Hình 3.7. Buồng đếm



Hình 3.8. Vùng đếm

Phương pháp đếm trực tiếp cho phép xác định nhanh số lượng vi sinh vật có trong mẫu. Song phương pháp này có những điểm hạn chế nhất định sau:

- +Không phân biệt được số lượng tế bào sống và số lượng tế bào chết.
- +Những tế bào nhỏ khó nhìn rõ dưới kính hiển vi và dễ nhầm lẫn tế bào vi sinh vật với các mảnh vỡ nhỏ của mẫu.
- +Khó đạt độ chính xác.
- +Phụ thuộc vào kỹ thuật và kinh nghiệm của mỗi cá nhân về độ pha loãng, thao tác kỹ thuật thành thạo có thể có các kết quả khác nhau.

Công thức:

$$N = [(a/b) \times 400/0,1] \times 10^3 \times 10^n$$

N – số tế bào trong 1ml mẫu nghiên cứu

a - số tế bào trong 5 ô vuông lớn

b - số ô vuông nhỏ trong 5 ô vuông lớn (80)

400 – tổng số ô vuông nhỏ trong buồng đếm

0,1 – số thể tích dịch tế bào (tính bằng mm^3) trong buồng đếm

1000 – số chuyển mm^3 thành ml

10^n - độ pha loãng mẫu

4.2. Phương pháp đếm khuẩn lạc

Phương pháp đếm khuẩn lạc khắc phục được nhược điểm của phương pháp đếm trực tiếp là các khuẩn lạc được đếm là những tế bào còn sống.

Có 2 phương pháp đếm đĩa là phương pháp cấy trang (spread plate method) và phương pháp đổ đĩa (pour plate method)

Với phương pháp đếm khuẩn lạc, các mẫu cần phân tích phải được pha loãng thành chuỗi pha loãng liên tiếp và được xác định một vài nồng độ pha loãng nhất định để cấy vào các môi trường đã chọn phù hợp với các đối tượng cần xác định. Mỗi khuẩn lạc được hình thành được xem là một đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu-colony forming units). Kỹ thuật thường qua các bước như sau:

Dung dịch pha loãng: một số dung dịch dùng để pha loãng có thể làm chết tế bào như: nước muối, nước cất. Các dung dịch pha loãng không được dùng ngay khi lấy ra từ tủ lạnh có thể gây sốc và làm cho vi sinh vật không thể phát triển được. Dung

dịch pepton water là dung dịch pha loãng được sử dụng nhiều nhất và được xem là dung dịch pha loãng cho tất cả các loại mẫu. Nếu trong mẫu còn có một ít các chất khử trùng thì phải thêm vào dung dịch pha loãng tác nhân giảm thiểu khả năng khử trùng của chúng, ví dụ: nếu trong mẫu còn dư lượng của các hợp chất amonium (NH_4^-) thì có thể thêm vào đó Tween 80 hay lecithin. Ngược lại nếu trong mẫu có chứa các hợp chất chlorin hay iodin thì cần thêm vào đó các muối như sodium thiosulphate.

Chuẩn bị các chuỗi pha loãng mẫu:

Bơm chính xác 9ml dung dịch pha loãng vào trong ống nghiệm có nắp đậy. Nếu sử dụng các ống nghiệm có nắp không đóng chặt được thì phải khử trùng ống nghiệm, sau đó bơm dung dịch pha loãng vào, các thao tác này phải được thực hiện một cách vô trùng. Phân phối dung dịch pha loãng vào các ống sau khi khử trùng còn có ý nghĩa đảm bảo thể tích dung dịch pha loãng không bị mất do quá trình khử trùng. Các thao tác pha loãng tùy thuộc vào từng loại mẫu.

Cụ thể như sau:

- Nếu pha loãng các mẫu là chất lỏng, trước khi pha loãng mẫu phải được lắc kỹ, cắm đầu pipette sâu vào trong mẫu khoảng 1” hút ra 1ml, cho vào trong ống chứa dung dịch pha loãng đầu tiên, lắc kỹ ống nghiệm chứa mẫu, bỏ pipette vừa sử dụng, dùng một pipette mới thực hiện lại thao tác như trên với các độ pha loãng tiếp theo. Cứ tiếp tục như vậy cho đến khi đạt được độ pha loãng mong muốn. Mỗi độ pha loãng chỉ được phép sử dụng 1 pipette. Hàm lượng mẫu trong 1ml dung dịch các độ pha loãng của dãy như sau:

Ống số	1	2	3	4
Tỉ lệ pha loãng	1/10	1/100	1/1000	1/10000
Thể tích mẫu ban đầu (ml)	0,1	0,01	0,001	0,0001
Độ pha loãng	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}

- Đối với các mẫu rắn hay bán lỏng, các thao tác được tiến hành như sau: cân 10 g mẫu vào trong các bao dập mẫu hay các máy xay vô trùng, thêm 90ml dung dịch pha loãng và đồng nhất mẫu, phải đảm bảo sao cho vi khuẩn phân tán đều vào trong dung dịch. Sau khi mẫu và dung dịch pha loãng được đồng nhất ta được dung dịch pha loãng 1/10. Các độ pha loãng sau được tiến hành tương tự như phần pha loãng mẫu lỏng. Trong 1ml các dung dịch pha loãng chứa hàm lượng mẫu như sau:

Ống số	1	2	3	4
Tỉ lệ pha loãng	1/10	1/100	1/1000	1/10000
Khối lượng mẫu ban đầu (g)	0,1	0,01	0,001	0,0001
Độ pha loãng	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}

Các ống nghiệm chứa các độ pha loãng khác nhau phải được đánh dấu để tránh nhầm lẫn.

** Cấy mẫu bằng phương pháp đổ đĩa*

Các môi trường agar được đun chảy trong các chai hay trong các ống nghiệm có thể tích phù hợp. Được làm mát trong các bể điều nhiệt ở 45°C.

Hút 1ml mỗi dung dịch pha loãng cho vào trong đĩa petri vô trùng. Mỗi độ pha loãng thường được cấy vào hai đĩa petri hay nhiều hơn. Cũng sử dụng các pipette sạch cho mỗi độ pha loãng. Chỉ chọn cấy vào đĩa petri những độ pha loãng có mật độ vi sinh vật phù hợp, thường trong khoảng 25-300 tế bào/ml. Đổ vào mỗi đĩa đã cấy 10-15ml môi trường đã được đun chảy và làm nguội, lắc đĩa theo chiều và ngược chiều kim đồng hồ khoảng 5-6 lần, đặc đĩa lên mặt phẳng ngang và đợi cho đến khi môi trường trong đĩa đông đặc. Lật ngược đĩa và ủ trong điều kiện nhiệt độ và thời gian xác định.

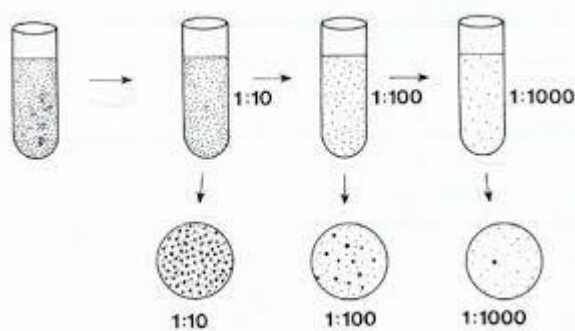
*** Cấy mẫu trên bề mặt**

Cấy 0,1ml mẫu lên bề mặt đĩa môi trường đã được làm khô và trải đều bằng que cấy trang trên khắp bề mặt môi trường. Ủ các đĩa đã cấy ở điều kiện nhiệt độ và thời gian xác định tùy theo từng chỉ tiêu phân tích, đếm các khuẩn lạc đặc trưng hay tất cả các khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa.

Khi đếm các khuẩn lạc, trong một số trường hợp xuất hiện các khuẩn lạc mọc lan, thông thường các khuẩn lạc khác cũng được nhìn thấy bên trong các vết khuẩn lạc loang. Khi đếm ta chỉ coi khuẩn lạc loang là một đơn vị hình thành khuẩn lạc và đến các khuẩn lạc khác trong khuẩn lạc loang. Các khuẩn lạc loang này là do các vi khuẩn tập trung thành từng tập đoàn trong quá trình phát triển.

*** Đếm khuẩn lạc trong trường hợp cấy trang hay đổ đĩa**

Đếm tất cả các khuẩn lạc đơn lẻ trên các đĩa cấy đã chọn, thông thường chọn các đĩa có số lượng khuẩn lạc trong khoảng 30 - 300 khuẩn lạc. Thường dùng các bút có thể viết lên thủy tinh để đánh dấu các khuẩn lạc đã đếm phía sau đĩa petri. Có thể dùng các thiết bị hỗ trợ trong quá trình đếm số lượng khuẩn lạc như máy đếm hay kính lúp. Tính toán số đơn vị hình thành khuẩn lạc theo các công thức thống kê dựa trên thể tích mẫu cấy, số lượng khuẩn lạc trên các đĩa, độ pha loãng đã cấy và số lượng đĩa của mỗi độ pha loãng. Thông thường số đơn vị hình thành khuẩn lạc trong một gram mẫu hay 1ml được tính toán ít nhất từ hai nồng độ pha loãng liên tiếp của mẫu. Các trường trình kết quả được biểu diễn dưới dạng số đơn vị hình thành khuẩn lạc/g) (cfu/g). Không biểu diễn kết quả dưới dạng số vi khuẩn/g(ml).



Hình 3.8. Phương pháp đếm khuẩn lạc

Số lượng tế bào trong 1ml mẫu được tính theo công thức sau đây:

$$N = n/v \times D \text{ (cfu/g)}$$

N là số đơn vị khuẩn lạc trong 1 gram mẫu nghiên cứu

n - số khuẩn lạc trung bình trong một đĩa petri ở một nồng độ pha loãng nhất định

v - thể tích mẫu cấy (0,1 - cấy bề mặt; 1 - cấy đổ)

D – hệ số pha loãng

4.3. Phương pháp màng lọc

Phương pháp này thường được áp dụng cho các mẫu lỏng như nước, sữa... và được đánh giá là cho kết quả chính xác.

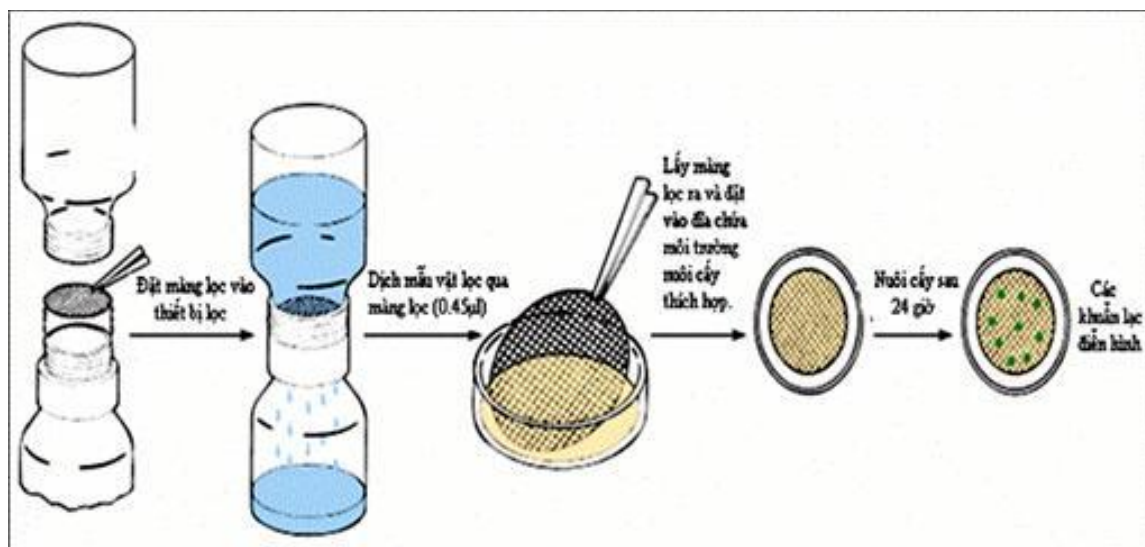
Các mẫu chất lỏng được lọc qua màng lọc có kích thước lỗ lọc nhỏ hơn kích thước của vi sinh vật. Vi sinh vật được giữ lại trên màng lọc. Màng được đặt trên môi trường agar hay trên giấy thấm được ngâm môi trường nuôi cấy lỏng đã chọn và ủ trong điều kiện xác định. Sau khi ủ, đếm các khuẩn lạc sẽ xuất hiện trên bề mặt màng lọc.

Thiết bị lọc có thể bằng thủy tinh, bằng kim loại hay bằng nhựa, bao gồm phễu lọc giá đỡ màng lọc, bộ thiết bị hỗ trợ hút chân không và bình chứa.

Màng lọc được làm bằng cellulose ester có lỗ lọc nằm trong khoảng 0,1-1 μm , các loại màng lọc dùng cho việc phân tích tổng số vi sinh vật thường có kích thước lỗ lọc là 0,47 μm , đường kính màng lọc có nhiều kích cỡ khác nhau phù hợp với đường kính của phễu lọc, bề dày của màng khoảng 120 μm .



Hình 3.9. Hệ thống màng lọc



Hình 3.10. Phương pháp màng lọc

4.4. Phương pháp MPN (Most Probable Number)

Phương pháp MPN dùng để đánh giá số lượng vi sinh vật theo *số có xác suất lớn nhất* của lượng vi sinh vật có trong một đơn vị thể tích mẫu với độ chính xác tương đối cao trên những thao tác và trang thiết bị khá đơn giản.

Cho vào một số ống nghiệm xác định (có chứa môi trường thích hợp cho chủng vi sinh vật cần định lượng) một thể tích chính xác dung dịch mẫu với các nồng độ pha loãng khác nhau (1/10, 1/100, 1/1000....). Sau khi ở điều kiện nhiệt độ và thời gian thích hợp, dựa trên những tính chất biểu hiện (như sinh hơi, đổi màu, chuyển đục...) xác định số ống nghiệm có vi sinh vật phát triển (ống dương tính) ở từng nồng độ pha loãng. Lập một chỉ số gồm các ống nghiệm dương tính ở mỗi nồng độ pha loãng (theo thứ tự giảm dần của nồng độ). Tra chỉ số trên theo bảng MPN của Mac Crady.

Ví dụ 1

Tỷ lệ pha loãng	0	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
Số ống môi trường cấy giống	2	2	2	2	2	2
Số ống dương	2	2	2	1	0	0

Số đặc trưng là 210, tra bảng Mac Credy ta được xác suất là 6, tỷ lệ pha loãng tương ứng với con số đầu của số đặc trưng là 1/100, do đó ta có số vi sinh vật trong 1ml là $6 \times 100 = 600$.

Ví dụ 2

Tỷ lệ pha loãng	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000	1/1000000
Số ống môi trường cấy giống	2	2	2	2	2	2
Số ống dương	2	2	0	1	0	0

Số đặc trưng là 201, tra bảng Mac Credy ta được xác suất là 5, tỷ lệ pha loãng tương ứng với con số đầu của số đặc trưng là 1/100, do đó ta có số vi sinh vật trong 1ml là $5 \times 100 = 500$.

Ví dụ 3

Tỷ lệ pha loãng	0	1/10	1/100	1/1000	1/10000	1/100000
Số ống môi trường cấy giống	5	5	5	5	5	5
Số ống dương	5	5	3	2	1	0

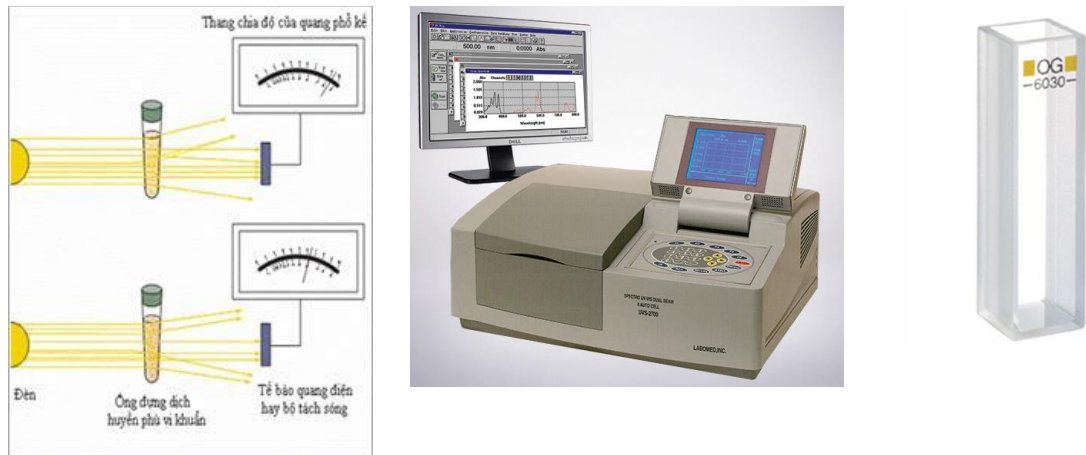
Số đặc trưng là 533, tra bảng Mac Credy ta được xác suất là 17,5, tỷ lệ pha loãng tương ứng với con số đầu của số đặc trưng là 1/10, do đó ta có số vi sinh vật trong 1ml là $17,5 \times 10 = 175$.

4.5. Phương pháp đo độ đục

Ngoài các phương pháp trên, mật độ vi sinh vật có thể xác định một cách gián tiếp thông qua đo độ đục.

Khi pha lỏng có chứa nhiều phân tử không tan thì sẽ hình thành một hệ huyền phù và có độ đục bởi các phân tử hiện diện trong môi trường lỏng cản ánh sáng, làm phân tán chùm ánh sáng tới. Tế bào vi sinh vật là một thực thể nên khi hiện diện trong môi trường cũng làm cho môi trường trở nên đục. Độ đục của dịch huyền phù tỷ lệ

thuận với mật độ tế bào. Do vậy có thể định lượng mật độ tế bào một cách gián tiếp thông qua độ đục bằng máy so màu ở các bước sóng từ 550 – 610 nm.



Hình 3.11. Phương pháp đo độ đục

5. Khử trùng vật liệu nuôi cấy sau khi sử dụng

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật và các vật liệu bị nhiễm cần được khử trùng, tiêu hủy hoặc làm sạch trước khi thải bỏ. Khử trùng ở nhiệt độ $121^{\circ}\text{C}/20-30$ phút.

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Trình bày các phương pháp nuôi cấy và định lượng vi sinh vật, phương pháp khử trùng vật liệu nuôi cấy sau khi sử dụng
2. Trình bày các bước làm tiêu bản trong nghiên cứu hình thái vi sinh vật.
3. Trình bày phương pháp đếm trực tiếp tế bào nấm men trong mẫu nước quả lên men.
4. Định lượng tế bào E. coli trong mẫu nước lọc đóng chai bằng phương pháp MPN
5. Định lượng tế bào Staphylococcus aureus bằng phương pháp đếm khuẩn lạc

BÀI 4. THỬ NGHIỆM SINH HÓA TRONG XÁC ĐỊNH VI SINH VẬT

Mục tiêu:

- Trình bày được nguyên tắc, cơ sở sinh hóa và phương pháp tiến hành của một số thử nghiệm sinh hóa phổ biến trong xác định vi sinh vật;
- Xác định được thử nghiệm sinh hóa cần thiết và phù hợp với chỉ tiêu vi sinh vật;
- Xây dựng được quy trình thử nghiệm sinh hóa đối với chỉ tiêu vi sinh vật đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật.

A. NỘI DUNG

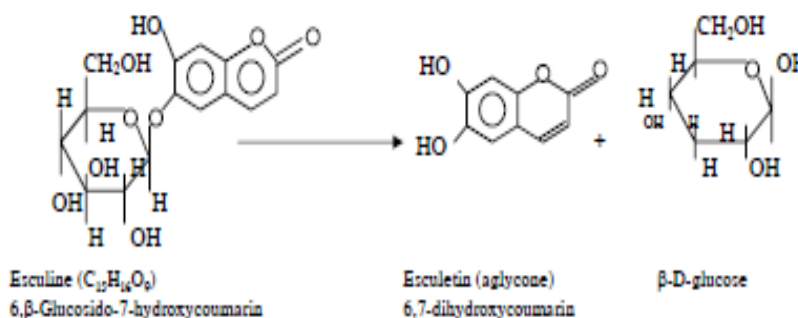
1. Một số thử nghiệm hóa sinh phổ biến trong xác định vi sinh vật

Trong kiểm nghiệm vi sinh vật, các thử nghiệm sau đây thường xuyên được sử dụng:

1.1. Thử nghiệm Bile Esculin

Nguyên tắc: Nhằm xác định khả năng của một vi sinh vật có thể thủy phân glucoside esculin thành esculetin và glucose khi có sự hiện diện của muối mật.

Cơ sở sinh hoá: Esculin là một glucoside, đây chính là dẫn xuất acetal của một monosaccharide. Khi một gốc không phải là một hydratcarbon liên kết với một đường tạo thành một hợp chất gọi là một glycoside, phần không phải đường được gọi là aglucon. Aglucon liên kết với đường qua nguyên tố oxy (liên kết glucoside).



Trong phản ứng này esculin bị thủy phân tại liên kết β với gốc acetal bị thủy giải bởi acid tạo thành esculetin và giải phóng phân tử glucose tự do.

Esculetin được phóng thích phản ứng với muối sắt tạo thành phức hợp màu đen hay màu nâu đen. Trong thử nghiệm này muối nitrat sắt được sử dụng trong môi như là cơ chất nhận dạng esculetin được hình thành. Sau khi cấy môi trường được ủ qua đêm, các vi sinh vật cho phản ứng dương tính là những vi sinh vật phân huỷ được esculin, chuyển môi trường thành màu đen hay màu nâu đen.

Các chủng vi sinh vật đối chứng cho các thử nghiệm này như sau: Đối chứng dương: *S. marcessens*; đối chứng âm: *E. tarda*.

1.2. Thử nghiệm khả năng lên men các nguồn carbohydrate

Nguyên tắc: Nhằm thử nghiệm khả năng lên men một nguồn carbohydrate xác định nào đó trong môi trường nuôi cấy để tạo acid và có thể tạo hơi.

Cơ chế sinh hóa: Quá trình sinh acid làm giảm pH thể hiện qua sự đổi màu của chất chỉ thị pH có trong môi trường.

Carbohydrate được chia thành các nhóm như sau:

- + Đường đơn (monosaccharide)

+ Polysaccharide hay oligosaccharide: sản phẩm trùng hợp từ 2 hay nhiều monosaccharide giống nhau hoặc khác nhau.

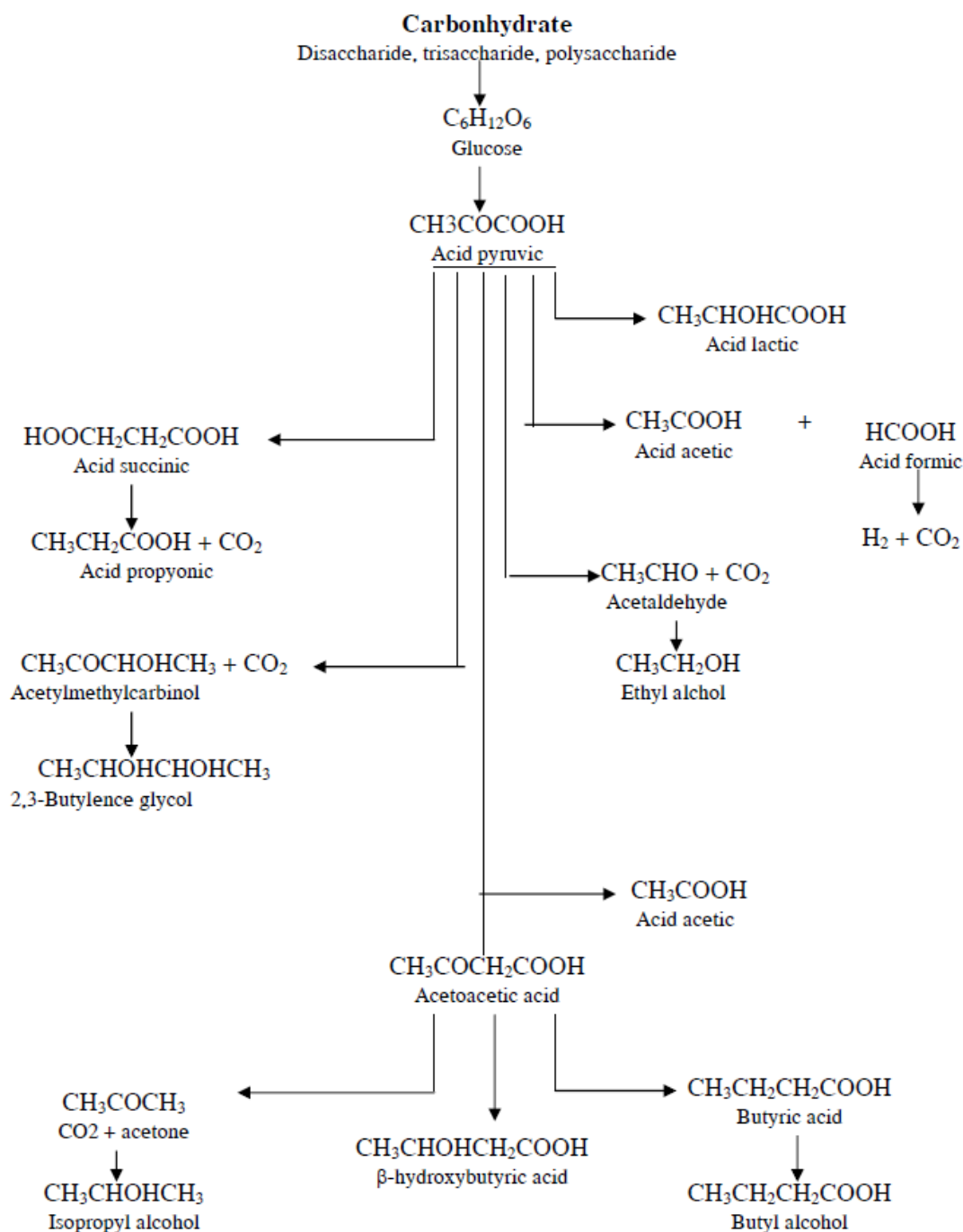
+ Rượu (alcohol): sản phẩm khử của monosaccharide.

Các carbohydrate thường được gọi chung là “đường”, song thực ra một số trong đó là rượu. Các loại carbohydrate thường được sử dụng nhất:

Glucose	Salicin	Raffinose	Galactose
Lactose	Adonitol	Rhamnose	Inulin
Sucrose	Inositol	Xylose	Fructose
Mannitol	Sorbitol	Trehalose	Melibiose
Dulcitol	Arabinose	Cellobiose	

Các polysaccharide, trisaccharide và disaccharide là những hợp chất phức tạp, vi sinh vật không thể hấp thu một cách dễ dàng cho quá trình chuyển hoá. Để chúng có thể sử dụng được các carbohydrate này, vi sinh vật phải tổng hợp và tiết ra ngoài các enzyme ngoại bào nhằm phân huỷ các phân tử này thành các phân tử đơn giản hơn, sau đó thẩm qua thành tế bào để chuyển hoá bên trong. Các sản phẩm tạo thành trong quá trình chuyển hóa các carbohydrate (Hình 4.1.)

Sự lên men là một quá trình trao đổi chất oxy hoá khử mà chất nhận điện tử cuối cùng không phải là oxy mà là cơ chất hữu cơ khác. Sự lên men của các cơ chất hữu cơ như carbohydrate thu được hai sản phẩm là chất khử và chất oxy hoá. Các sản phẩm cuối cùng nhận được từ sự lên men các cơ chất hydrate carbon này phụ thuộc vào các nhân tố như: (1) dòng vi sinh vật lên men; (2) cơ chất tự nhiên dùng để lên men; (3) thời gian, nhiệt độ và pH của môi trường. Các sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men các nguồn hydrate carbon và các alcohol thường là các dạng khí (H_2 , CO_2), các acid hữu cơ, các alcohol và một vài keton ...



Hình 4.1. Sơ đồ các sản phẩm tạo thành trong chuyển hóa carbonhydrate

Đối với nguồn carbon là glucose, một số vi sinh vật có thể lên men nguồn cơ chất này trong điều kiện kỵ khí, ngược lại, trong điều kiện hiếu khí chúng chuyển hoá theo con đường oxy hoá. Một số dòng vi sinh vật khác có thể chuyển hoá cơ chất này bằng cả hai cách. Sự khác biệt về các con đường chuyển hoá các nguồn cơ chất hữu cơ phụ thuộc vào nhóm vi sinh vật, giống hay loài, vì thế căn cứ vào các con đường khác biệt này cũng có thể phân biệt được các loài với nhau.

Các thử nghiệm khả năng chuyển hoá các nguồn hydrate carbon được tiến hành trên các môi trường lỏng hay rắn. Trong môi trường chứa một hay một vài nguồn hydratcarbon cần tiến hành thử nghiệm và một chất chỉ thị, thông thường sử dụng chất chỉ thị pH để phát hiện các sản phẩm acid được tạo ra trong quá trình chuyển hoá. Để

phát hiện các chất khí được tạo ra, một ống nghiệm có kích thước nhỏ lật ngược được cho vào trong các môi trường lỏng, các ống này sẽ giữ các sản phẩm khí tạo ra trong quá trình nuôi cấy. Trong các môi trường rắn, phát hiện các sản phẩm khí tạo ra bằng cách cấy sâu vào trong phần thạch đứng. Các sản phẩm khí tạo ra sẽ phá vỡ phần thạch này. Thông thường phát hiện sự tạo thành các sản phẩm khí được tiến hành trong các phản ứng lên men các nguồn mono hay disaccharide và được thực hiện trong môi trường nuôi cấy lỏng. Để gây kỵ khí trong quá trình nuôi cấy thử nghiệm các chất khử thường được thêm vào trong môi trường nuôi cấy. Một lượng nhỏ muối sắt cũng có thể gây nên môi trường kỵ khí.

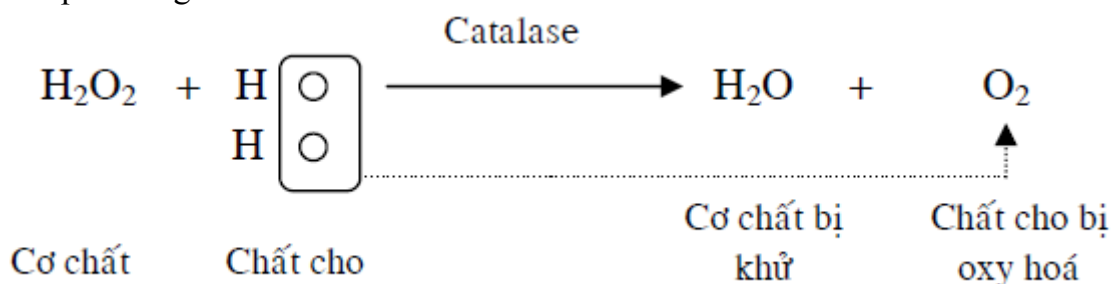
Các thử nghiệm khả năng sử dụng các nguồn Carbohydrate được tiến hành trên môi trường rắn phải thêm vào các chất chỉ thị pH, khi các vi sinh vật phát triển trên bề mặt hay, các sản phẩm acid được tạo thành làm thay đổi màu các chất chỉ thị xung quanh khuẩn lạc. Các sản phẩm tạo thành trong quá trình chuyển hoá các carbohydrate.

1.3. Thử nghiệm catalase

Nguyên tắc: thử nghiệm nhằm phát hiện sự hiện diện của enzyme catalase ở vi sinh vật.

Cơ sở sinh hoá: Enzyme catalase hiện diện trong hầu hết các vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí có hệ thống cytochrom. Thông thường những vi sinh vật không có hệ thống cytochrom thì cũng không có enzyme catalase, vì thế chúng không có khả năng phân huỷ hydroperoxide. Những vi sinh vật kỵ khí bắt buộc như *Clostridium* có hệ thống peroxylase thay cho enzyme catalase.

Catalase xúc tác phản ứng phân huỷ hợp chất hydroperoxide, trong phản ứng này một phân tử hydroperoxide đóng vai trò là một chất cho điện tử và một phân tử hydroperoxide khác đóng vai trò là một chất nhận điện tử. Cơ chất bị khử bởi nhân hydrogen cung cấp từ phân tử cho điện tử, quá trình diễn ra giải phóng oxy phân tử. Cơ chế phản ứng như sau:



Phương pháp tiến hành thử nghiệm

Cách 1: Cho hỗn hợp nuôi cấy vi sinh vật vào 0,5ml dung dịch Tween 80, tắt cả cho vào trong ống nghiệm có nắp đậy. Thêm vào 0,5ml dung dịch hydroperoxyde 20% vào, lắc và quan sát. Nếu có hiện tượng sủi bọt khí là có sự hiện diện của catalase.

Cách 2: Nhỏ hỗn hợp có tỉ lệ 1:1 hydroperoxyde và Tween 80 lên các khuẩn lạc vi sinh vật phát triển trên môi trường agar. Quan sát sau 5 phút, nếu có hiện tượng sủi bọt khí thì khuẩn lạc vi khuẩn có catalase.

Các chủng vi sinh vật đối chứng: đối chứng dương *S. epidermidis*, đối chứng

âm: *E. Feacalis*

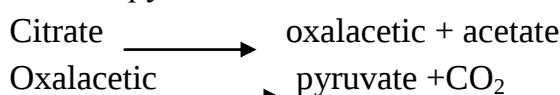
1.4. Thử nghiệm citrate

Nguyên tắc: Nhằm xác định khả năng vi sinh vật sử dụng nguồn citrate như là nguồn carbon duy nhất và làm kiềm hóa môi trường.

Cơ sở sinh hoá: Một số vi sinh vật có khả năng sử dụng citrate như một nguồn carbon duy nhất để lấy năng lượng mà không cần dùng quá trình lên men hoặc sinh acid lactic. Thông thường việc sự trao đổi chất citrate bao gồm các bước kết hợp acetyl-CoA để tạo thành oxalacetate để cho chúng đi vào chu trình Krebs.

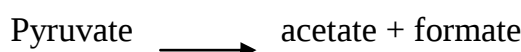
Con đường đồng hoá citrate ở các vi khuẩn thường rất nhanh qua chu trình tricarboxylic acid hay con đường lên men citrate. Ở một số vi khuẩn sự phân cắt citrate bao gồm một hệ thống enzyme không có sự can thiệp của coenzyme A. Enzyme này được gọi là citratase (citrate axaloacetat – lyase) hay citate demolase. Để enzyme này hoạt động cần có một cation có hoá trị 2, thường là magie (Mg^{2+}) hay mangan (Mn^{2+}).

Các sản phẩm thu được do quá trình trao đổi citrate phụ thuộc vào pH môi trường. Tuy nhiên, cho dù sản phẩm cuối là gì, bước đầu tiên trong quá trình lên men citrate vẫn là sự hình thành pyruvate.

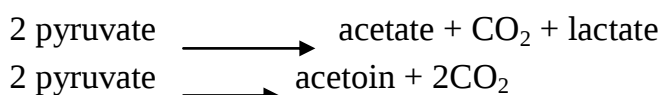


Sự phân giải tiếp theo của pyruvate phụ thuộc vào pH của môi trường:

+ Môi trường kiềm:



+ Môi trường acid:



Vi sinh vật khi có khả năng sử dụng citrate làm nguồn carbon duy nhất đều có thể dùng muối ammonium như nguồn nitrogen duy nhất (và ngược lại). Muối ammonium bị phân hủy sinh NH_3 cũng làm kiềm hóa môi trường. Do vậy, thực chất phép thử này dùng khả năng phân giải ammonium sinh NH_3 làm chỉ thị cho khả năng dùng citrate.

Phương pháp thử: sử dụng môi trường Simon Citrate Agar (SCA) với chất chỉ thị pH là bromothymol blue. Kết quả dương tính – môi trường kiềm (pH 7,6) màu xanh dương; âm tính – môi trường trung tính (pH 6,9) màu xanh lục.

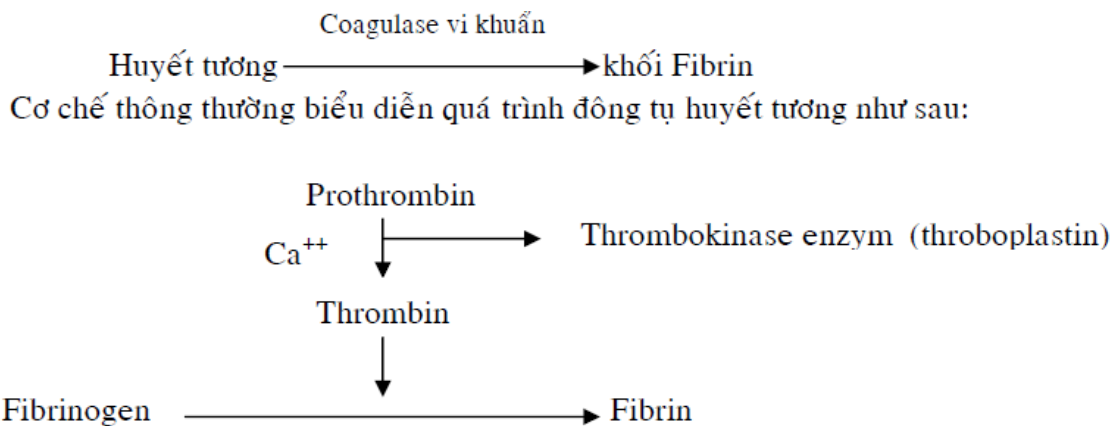
Các chủng vi sinh vật đối chứng: Đối chứng dương: *P. rettgeri*; đối chứng âm: *S.epidermidis*.

1.5. Thử nghiệm coagulase

Nguyên tắc: Kiểm tra khả năng của một số vi sinh vật làm đông tụ huyết tương do tác dụng của enzyme coagulase (staphylocoagulase)

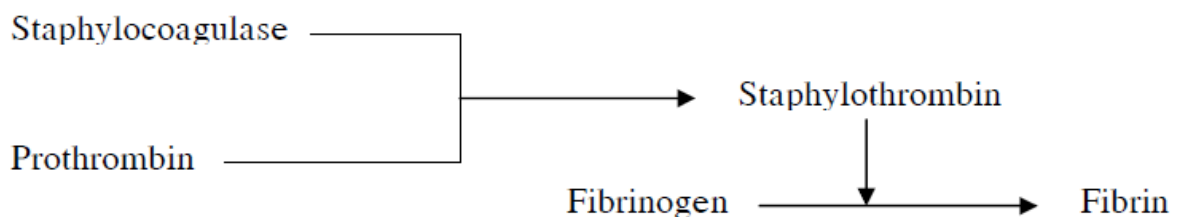
Cơ sở sinh hoá: Enzyme staphylocoagulase là coagulase được tạo ra do *Staphylococcus aureus*. Là một enzyme liên quan đến khả năng bền nhiệt, có thể chịu được nhiệt độ đến 60°C trong 30 phút. Enzyme này là một protein tự nhiên, chúng được tiết ra bên ngoài tế bào bởi các vi sinh vật *S. aureus*, chúng cũng dễ dàng bất hoạt bởi các protease.

Coagulase có vai trò trong sự đông kết. Nó tác động đến các cấu tử có trong huyết tương và tạo thành từng khối đông (fibrin)



Một nghiên cứu khác chứng minh coagulase vi khuẩn và prothrombin không có hoạt tính enzyme, như sự tham gia của chúng tạo nên các phức hợp bền với các hoạt động ly giải đặc hiệu gọi là staphylothrombin, staphylocogulase không có hoạt tính ly giải, chúng phản ứng một cách chuyên biệt với các prothrombin và hoạt hoá hợp chất này để đưa đến sự kết hợp các fibrinogen thành các khối fibrin.

Sơ đồ hoạt động như sau:



Phương pháp thử: Để phát hiện coagulase của vi khuẩn có hai cách tiến hành như sau:

Cách 1: Tiến hành thử nghiệm trên lam kính. Lấy 1 hay 2 khuẩn lạc của vi khuẩn cần kiểm tra hòa đều vào trong giọt nước cất hay nước muối sinh lý trên lam kính. Thêm một giọt huyết tương người hoặc thỏ vô trùng đã cố định bằng EDTA hòa tan vào trong huyền phù vi khuẩn. Quan sát trong sau 10 giây. Hiện tượng ngưng kết xảy ra có thể quan sát được bằng mắt thường. Tiến hành kiểm chứng song song với các dòng vi sinh vật có coagulase dương tính đã biết.

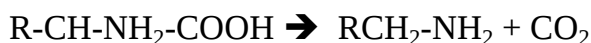
Cách 2: Tiến hành thử nghiệm trên ống, đây là phương pháp nhằm khẳng định các mẫu đã thử nghiệm âm tính trên lame. Cho 0,2ml huyết tương vào 0,8ml môi trường Nutrient Broth đã cấy vi khuẩn không ủ trong bể điều nhiệt ở 37°C, quan sát sau 3 giờ, nếu không có hiện tượng ngưng kết diễn ra, có thể để ở nhiệt độ phòng qua đêm và quan sát trở lại.

1.6. Thử nghiệm decarboxylase (LDC, ODC) và dehydrase (ADH)

Nguyên tắc: Dựa vào hoạt tính enzyme của vi sinh vật khử nhóm carboxyl của acid amin sinh ra một amin tạo tính kiềm.

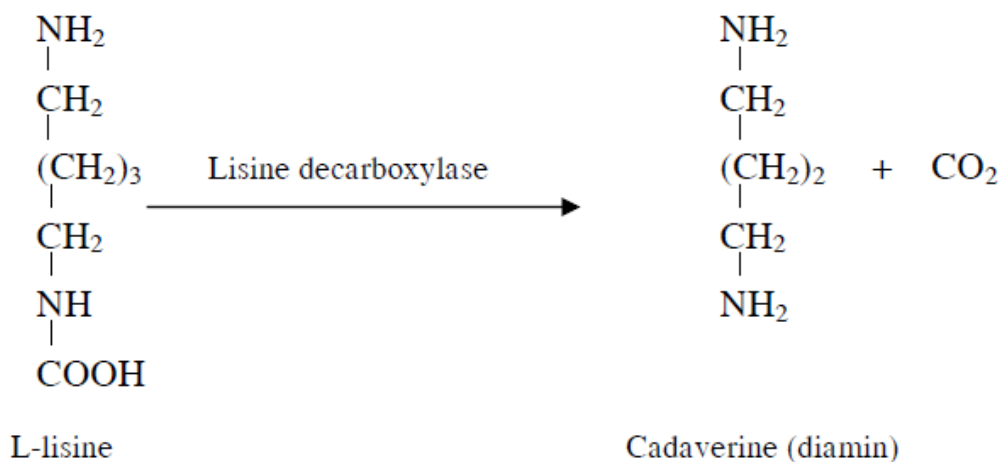
Cơ sở sinh hoá: khử nhóm carboxyl của một acid amin là quá trình vi sinh vật

tác động lên nhóm carboxyl (-COOH) của một acid amin để giải phóng ra các amin, hay di amin và CO₂.



Có nhiều loại enzyme decarboxylase, mỗi loại chỉ tác động lên một cơ chất nhất định. Trong thực tế kiểm nghiệm vi sinh vật có 3 loại decarboxylase quan trọng được dùng trong định danh vi sinh vật là các enzyme tác động lên lysine, ornithine và arginine.

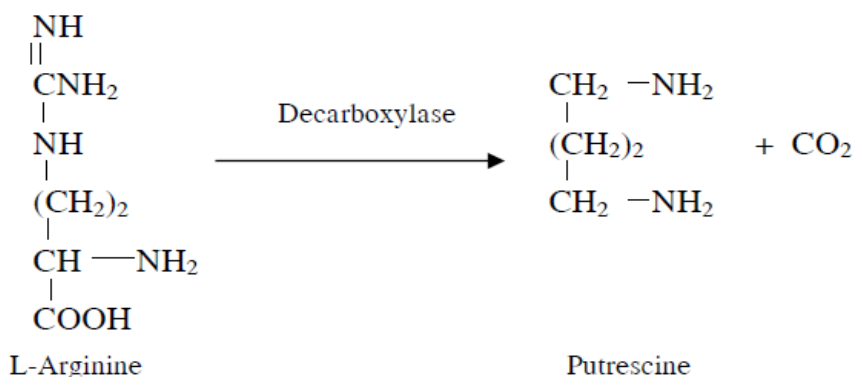
Khi enzyme lysine decarboxylase (LDC) tác động lên amino acid L-lisin và khử nhóm carboxyl, chúng tạo thành một di amin là cadaverine và CO₂, quá trình diễn ra theo phản ứng như sau:



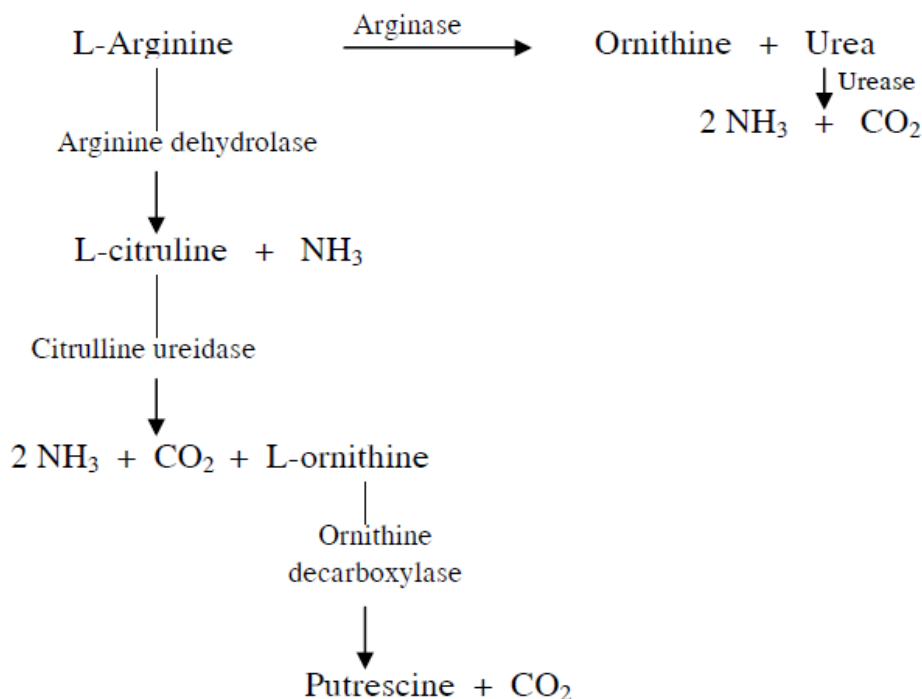
Tương tự acid amin L-ornithine bị khử nhóm carboxyl bởi enzyme ornithine decarboxylase (ODC) sẽ thu được một diamin là putrescine và CO₂.

Riêng đối với L-arginine có thể được trao đổi bởi hai con đường trong quá trình nuôi cấy, thông qua hai enzyme: arginine dehydrolase (ADH) và arginine decarboxylase (ADC). Hai con đường này có thể diễn ra đồng thời trong quá trình nuôi cấy hay có thể diễn ra riêng lẻ:

+ Phản ứng arginine decarboxylase: quá trình trao đổi arginine nhờ enzyme arginine decarboxylase được tiến hành theo sơ đồ sau:



+ Phản ứng arginine dehydrolase: quá trình trao đổi chất theo hướng khử hydro của arginine diễn ra theo sơ đồ như sau:



Phương pháp thử

Sử dụng môi trường Moeller decarboxylase

Chỉ thị màu: Bromcresol purple

Nuôi cấy vi sinh vật trong điều kiện kỵ khí với dầu parafin hay dầu khoáng trên bề mặt, ủ ở 37°C trong thời gian 24-96 giờ

Nếu sau khi nuôi cấy môi trường chuyển thành vàng là tín hiệu âm tính, ngược lại môi trường giữ nguyên màu ban đầu và đục canh nuôi cấy là tín hiệu dương tính.

Các vi sinh vật dùng kiểm chứng các phép thử ADH, LDC và ODC

Vi sinh vật	Arginine	Lysine	Ornithine
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	-	+	-
<i>Proteus morganii</i>	-	-	+
<i>Salmonella typhy</i>	+	+	+
<i>Enterobater cloacae</i>	+	-	+
<i>Enterobater aerogenes</i>	-	+	+
<i>Salmonella typhimorium</i>	-	+	+

Phép thử trên thường được dùng để phân loại và định danh các loài thuộc họ Enterobacteriaceae.

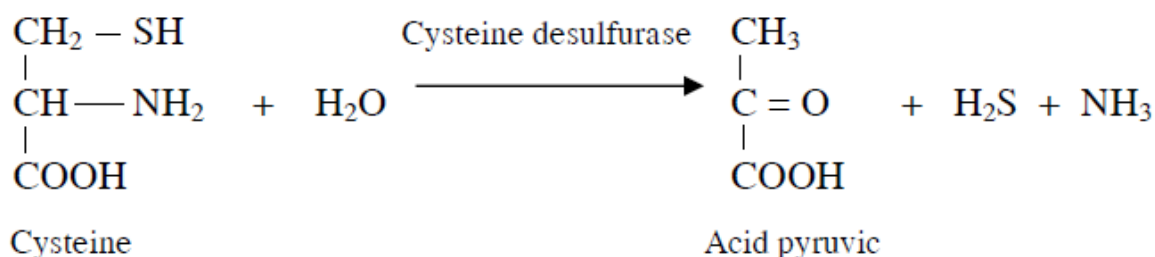
1.7. Thử nghiệm khả năng sinh H₂S

Nguyên tắc: Xác định khả năng sinh H₂S từ các hợp chất hữu cơ và vô cơ chứa lưu huỳnh trong quá trình phát triển của vi khuẩn tạo nên các vết màu đen trên môi trường nuôi cấy.

Cơ sở sinh hoá: Khi phân giải protein tạo ra các acid amin tự do; một số vi sinh vật dị dưỡng có khả năng dùng enzyme giải phóng lưu huỳnh từ các acid amin chứa lưu huỳnh khác nhau sinh ra khí H₂S.

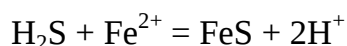
Các nguồn pepton, cystein, cystine, sulphite, thiosulphate là những nguồn chứa lưu huỳnh, nhưng các loài vi sinh vật khác nhau chỉ có thể sử dụng một số hợp chất chứa lưu huỳnh nhất định để tạo H₂S. Enzyme chịu trách nhiệm về hoạt tính trên được gọi là cysteine desulphohydase.

Một vi sinh vật tạo H₂S khi nuôi cấy trong môi trường chứa các hợp chất lưu huỳnh mà chúng có khả năng đồng hoá sẽ khử các hợp chất này để tạo nên khí H₂S.



Các acid amin có chứa lưu huỳnh là methionine, cysteine và cysteine.

Trong môi trường có chứa các ion kim loại như ion sắt là dấu hiệu để nhận biết H₂S. Các hợp chất có thể nhận biết H₂S như sắt, FeSO₄, ferric amonium sulphate, sodium thiosulphate, bismuth sulphite. Nguyên tắc để nhận biết H₂S bằng các hợp chất trên như sau:



Các hợp chất sulphur kim loại đều có dấu hiệu màu đen.

Phương pháp thử nghiệm

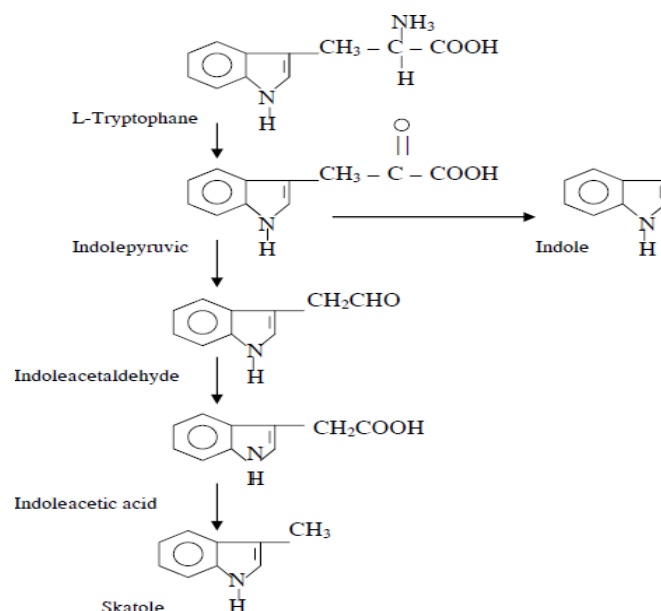
Các loại môi trường có thể sử dụng cho thử nghiệm sinh H₂S là môi trường KIA (Kligler Iron Agar), TSI (Triple Sugar Iron Agar), SIM (Sulfide Indol Motility Agar), PIA (Peptone Iron Agar), BSA (Bismuth Sulphite Agar). Tất cả các môi trường này đều được khử trùng ở 121°C trong 15 phút và được phân phối trong ống nghiệm vô trùng để làm môi trường thạch nghiêng đối với môi trường KIA, TSI và môi trường thạch đứng SIM, BSA và trong đĩa petri BSA. Ủ các ống đã cấy ở 37°C trong 24-48 giờ hoặc đến 7 ngày. Dương tính môi trường chuyển sang màu đen hoặc khuẩn lạc có màu đen.

1.8. Thử nghiệm khả năng sinh indol

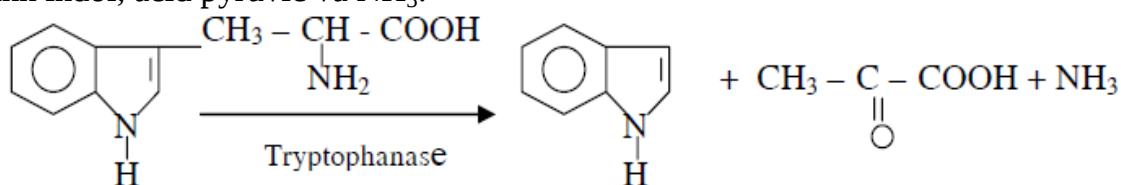
Nguyên tắc: Phát hiện khả năng của vi khuẩn có thể tạo indol từ tryptophan.

Cơ sở sinh hoá: Tryptophan là một acid amin có thể bị oxy hoá bởi một số vi sinh vật nhất định tạo nên 3 sản phẩm có chứa gốc indol: indol, skatol (methyl indol) và indolacetic acid (IAA), indolacetate. Một số enzyme nội bào được gọi chung là tryptophanase tham gia trong quá trình tạo thành sản phẩm indol trong hoạt động thủy phân tryptophane.

Sản phẩm trung gian chính khi phân giải tryptophan là acid indolpyruvic (IPA). Từ IPA sẽ tạo nên indol qua phản ứng khử amin (deamination) hoặc skatol qua phản ứng khử CO₂ (decarboxylase). Quá trình thủy giải tryptophan có thể được mô tả qua quá trình như sau:



Enzyme tryptophanase xúc tác phản ứng khử amin bởi sự tấn công vào phân tử tryptophan ở vị trí mạch nhánh và tách nhân thơm ra khỏi phân tử tryptophan hình thành indol, acid pyruvic và NH_3 .



Phương pháp thử: Vi sinh vật thử nghiệm được nuôi trong môi trường canh trypton khoảng 24 - 48 giờ. Nhỏ vài giọt ether vào canh khuẩn nhằm kéo indol lên bề mặt một trường, thêm vài giọt thuốc thử Kovac's hay Ehrlich. Quan sát sau vài phút, phản ứng dương tính nếu trên bề mặt môi trường có vòng màu đỏ xuất hiện. Ngược lại nếu không có sự xuất hiện của màu đỏ hồng được coi là phản ứng âm tính.

Thuốc thử

- Thuốc thử Ehrlich: Hoà tan 4g p-dimethylaminobenzaldehyde trong hỗn hợp gồm 80ml acid HCl đậm đặc và 380 ethanol tuyệt đối. Dung dịch sau khi pha có màu vàng nâu.

- Thuốc thử Kovac's hoà tan 5g p-dimethylaminobenzaldehyde trong hỗn hợp gồm 75 ml amyl alcohol và 25 ml H_2SO_4 đậm đặc.

Thử nghiệm này được dùng để phân biệt *E.coli* (+) với *Klebsiella* (-); *Proteus mirabilis* (-) với các loài *Proteus* khác (+); *Bacillus alvei* (+) với các loài *Bacillus* khác (-); *Haemophilus haemoglobinophilus* (+) với các loài *Haemophilus* (-).

Chủng làm đối chứng (+) là *Proteus rettgeri*, (-) *Serratia marcescens*.

1.9. Thử nghiệm trên môi trường KIA (Kligler Iron Agar) hay trên môi trường TSA (Triple Sugar Iron Agar)

Nguyên tắc: Thử nghiệm này nhằm phát hiện khả năng sử dụng các nguồn carbohydrate khác nhau (glucose, lactose) và khả năng sinh H_2S trong môi trường.

Cơ sở sinh hoá: Môi trường Kligler Iron agar (KIA) và Triple Sugar Iron agar (TSI) là các môi trường rắn dùng trong thử nghiệm sinh hoá. Môi trường được phân

phối vào trong các ống nghiệm, gồm hai phần: phần đứng sâu khoảng 2,5cm và phần nghiêng bên trên. Thử nghiệm này nhằm hai mục đích: phát hiện khả năng lên men các nguồn Carbonhydrate có trong môi trường và phát hiện khả năng sinh H_2S .

Môi trường KIA chứa hai nguồn carbohydrate: 1% lactose và 0,1% glucose, môi trường TSI tương tự như môi trường KIA như có thêm 1% Sucrose. Cơ chế sinh hoá của hai môi trường này tương tự nhau.

Trên môi trường KIA, vi sinh vật có thể sử dụng cả hai nguồn carbohydrate trên hay chỉ sử dụng glucose. Quá trình lên men này có thể tạo khí trong môi trường hay không tùy thuộc vào từng loài vi sinh vật. Sự sử dụng các nguồn carbonhydrate khác nhau ở hai điều kiện hiếu khí trên phần nghiêng và kỵ khí trong phần đứng. Trên phần nghiêng, glucose được trao đổi theo con đường oxy hoá trong chu trình Krebs để tạo sản phẩm là H_2O và CO_2 đồng thời thu được năng lượng. Lactose là đường đôi, để vi sinh vật có thể sử dụng chúng phải phân giải thành galactose và glucose, các đường đơn này sẽ đi vào trong tế bào và tham gia vào quá trình chuyển hoá nội bào.

Có ba trường hợp sẽ xảy ra khi nuôi cấy vi sinh vật trên môi trường KIA: chỉ lên men glucose, lên men cả hai nguồn carbohydrate trong môi trường, không lên men cả hai nguồn trên.

Nếu vi sinh vật chỉ lên men glucose sau 18-24 giờ nuôi cấy, trên phần nghiêng của môi trường có pH kiềm và ở phần sâu của ống có pH acid. Hiện tượng này được quan sát khi có chất chỉ thị pH trong môi trường nuôi cấy, thông thường trên môi trường này thường sử dụng chất chỉ thị pH là phenol red. Trên phần nghiêng, sau 24 giờ nuôi cấy, một lượng nhỏ glucose trong môi trường được vi sinh vật sử dụng hết hoàn toàn. Sau đó vi sinh vật sử dụng pepton trong môi trường, quá trình trao đổi pepton làm giải phóng NH_3 , sản phẩm này sẽ làm kiềm phần nghiêng của ống môi trường. Ở phần sâu môi trường có pH acid bởi sự lên men kỵ khí glucose, các sản phẩm thu được là những acid hữu cơ, chính các acid này làm cho pH giảm. Nếu trong môi trường có chất chỉ thị pH là phenol red thì trên phần nghiêng sẽ có màu đỏ và phần sâu sẽ có màu vàng.

Nếu vi sinh vật có thể sử dụng cả hai nguồn carbohydrate: cả hai phần sâu và phần nghiêng đều có tính acid sau 18-24 giờ nuôi cấy vì lượng đường lactose đủ để vi sinh vật sử dụng trong thời gian này, các sản phẩm tạo thành là các acid hữu cơ. Nếu kéo dài thời gian nuôi cấy đến sau 24 giờ, trên phần nghiêng có thể thu được màu đỏ do môi trường chuyển sang kiềm.

Trong trường hợp cả hai nguồn carbon trên không được vi sinh vật sử dụng, nguồn pepton trong môi trường trở thành nguồn cung cấp năng lượng và vật liệu cho quá trình tăng trưởng và phát triển của vi sinh vật. Nhưng thường pepton chỉ được chuyển hoá trong điều kiện hiếu khí do đó hiện tượng làm kiềm môi trường chỉ diễn ra trên phần nghiêng và môi trường chuyển thành màu đỏ. Trong khi đó phần sâu môi trường sẽ không có hiện tượng chuyển màu.

Trong các trường hợp trên nếu quá trình chuyển hoá của vi sinh vật có thể tạo thành các sản phẩm khí, chúng sẽ tích tụ trong môi trường và có thể làm vỡ thạch hay tạo thành các bọt khí bên trong môi trường.

Trong thử nghiệm này có thể phát hiện khả năng sinh H_2S từ việc chuyển hoá các thành phần trong môi trường. Sodium thiosulphate trong môi trường được sử dụng như nguồn cung cấp lưu huỳnh. Sản phẩm chuyển hoá các hợp chất lưu huỳnh là H_2S , đây là chất khí không màu, để nhận ra chúng, một chất chỉ thị khác là Fe^{2+} được cung cấp vào dưới dạng ferric ammonium citrate. H_2S phản ứng với Fe^{2+} sẽ tạo thành FeS kết tủa màu đen trong môi trường. Như vậy với thử nghiệm này có thể nhận biết được khả năng sử dụng các nguồn carbon khác nhau, khả năng tạo khí và tạo H_2S của vi sinh vật cần thử nghiệm.

Trong trường hợp sử dụng môi trường TSI, các hiện tượng cũng xảy ra tương tự. Tuy nhiên trong trường hợp cả hai phần nghiêng và phần sâu đều có hiện tượng acid là có thể có một trong hai hay cả hai nguồn lactose và sucrose được vi sinh vật sử dụng. Trong trường hợp này cần phải có các thử nghiệm trên các nguồn lactose hay sucrose một cách riêng lẻ.

Phương pháp thử nghiệm

Môi trường KIA hay TSI được chuẩn bị trong các ống nghiệm với phần nghiêng cách nắp ống nghiệm khoảng 2,5cm và phần sâu có chiều cao khoảng 2,5cm. Dùng que cấy nhọn đưa vi sinh vật vào phần sâu của ống nhưng không đụng đáy ống, sau đó cấy rìa trên phần nghiêng. U các ống đã cấy ở $37^\circ C$ trong 18-24 giờ. Ghi nhận màu, sự sinh khí ở phần sâu, màu ở mặt thạch nghiêng, sự tạo thành màu nâu bởi FeS .

1.10. Thử nghiệm malonate

Nguyên tắc: Thử nghiệm nhằm xác định khả năng của vi sinh vật sử dụng malonate như là nguồn carbon duy nhất trong môi trường.

Cơ sở hoá học: Malonate là một tác nhân ức chế enzyme được phát hiện lần đầu tiên khi nhận thấy acid malonic ức chế sự chuyển hoá succinic thành fumaric bởi sự tấn công vào tâm hoạt động của enzyme succinic dehydrogenase. Acid malonic ức chế quá trình chuyển hóa succinic bằng phương thức ức chế cạnh tranh do cấu trúc phân tử của malonic và succinic tương tự nhau.



Khi bị malonate ức chế con đường thu hồi năng lượng trong chu trình Krebs, vi sinh vật chuyển sang một số con đường chuyển hoá khác để thu hồi năng lượng như quá trình chuyển từ chu trình Krebs sang chu trình Glyoxylic acid. Tuy vậy để đảm bảo cho sự phát triển bình thường khi trong môi trường có malonate khi vi sinh vật đó sử dụng được cơ chất này như là một nguồn cung cấp năng lượng hay nguồn carbon. Nếu vi sinh vật không sử dụng malonate thì cơ chất này sẽ trở thành một chất

diệt khuẩn. Leifson cho rằng vi sinh vật sử dụng malonate như là một cơ chế lên men để thu năng lượng. Khi vi sinh vật sử dụng malonate để chuyển hoá như là nguồn carbon thì đồng thời chúng cũng sử dụng ammonium sulphate như là nguồn cung cấp nitơ. Kết quả cuối cùng là làm môi trường nuôi cấy chuyển thành kiềm do có sự tạo thành NaOH.

Phương pháp tiến hành: Sử dụng môi trường malonate broth có chứa chất thị màu pH là bromothymol blue nuôi ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Phản ứng dương tính khi môi trường có dấu hiệu chuyển sang màu xanh dương. Phản ứng âm tính khi vi sinh vật không làm thay đổi màu môi trường.

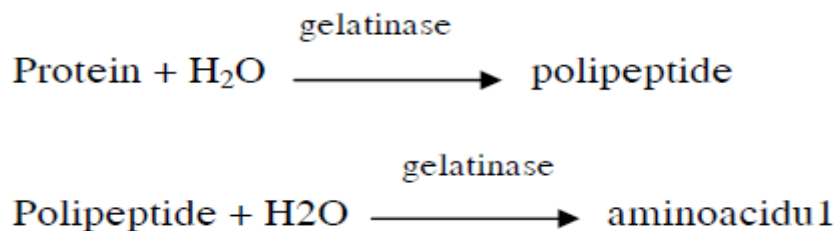
Chủng làm đối chứng (+) là *Enterobacter cloacae*, (-) là *Staphylococcus epidermidis*

1.11. Thử nghiệm làm tan gelatin

Nguyên tắc: Thử nghiệm khả năng của vi sinh vật có thể tổng hợp các enzyme ngoại bào thủy phân gelatin thành polypeptide và acid amin.

Cơ sở sinh hoá: Gelatin là một dạng protein có kích thước phân tử lớn, vi sinh vật muốn sử dụng các protein này như một nguồn cung cấp năng lượng hay vật liệu xây tổng hợp các thành phần khác của tế bào, chúng phải có khả năng sản xuất các loại enzyme ngoại bào làm phân giải các phân tử gelatin thành các thành phần nhỏ hơn hay thành các monomer. Các enzyme này thuộc nhóm gelatinase được tiết ra bên ngoài tế bào.

Quá trình thủy phân gelatin qua hai giai đoạn như sau:



Phương pháp thực hiện:

Sử dụng môi trường dinh dưỡng chứa gelatin Nutrient Gelatin trong các ống thạch sâu. Cấy đâm sâu vi sinh vật vào trong môi trường dinh dưỡng chứa gelatin, ủ ống sau khi cấy ở nhiệt độ phòng cùng với một ống nghiệm chứa môi trường nhưng không cấy vi sinh vật vào trong khoảng 14 ngày. Sau khi nuôi cấy, vi sinh vật có khả năng tiết gelatinase sẽ làm môi trường tan chảy thành dạng lỏng. Phản ứng dương tính khi ống đối chứng ở trạng thái đông đặc và ống có vi sinh vật bị tan chảy. Phản ứng âm tính khi cả hai ống ở trạng thái đông đặc.

Có thể cấy vi sinh vật lên môi trường chứa gelatine trên đĩa để tách được các khuẩn lạc riêng biệt sau khi ủ 3 ngày ở nhiệt độ phòng. Nhỏ lên trên bề mặt đĩa 5-10ml dung dịch trichloacetic acid (TCA). Các khuẩn lạc có gelatinase dương tính sẽ tạo vòng phân giải gelatin trong rõ trong khi môi trường trở nên đục khi nhuộm bởi TCA là các vi sinh vật làm tan chảy gelatin.

Chủng làm đối chứng (+) là *Aeromonas hydrophila*, (-) là *E.coli*.

1.12. Thử nghiệm Methyl Red (MR)

Nguyên tắc: Thử nghiệm methyl red nhằm xác định khả năng của vi sinh vật

sản xuất và duy trì các sản phẩm acid bền trong môi trường từ trong quá trình lên men glucose

Cơ sở sinh hoá: Thử nghiệm methyl red trên cơ sở sử dụng chất chỉ thị pH là methyl red để nhận biết lượng ion H^+ có trong môi trường sau khi vi sinh vật lên men glucose. Hàm lượng ion H^+ có trong môi trường phụ thuộc vào tỉ lệ CO_2 và H_2 , hàm lượng các chất này lại phụ thuộc vào con đường chuyển hoá của từng loài vi sinh vật.

Đối với các vi sinh vật đường ruột, thời gian nuôi cấy để thử nghiệm phản ứng MR thường được xác định trong khoảng 18-24 giờ. Tuy nhiên các vi sinh vật này đều tạo acid trong môi trường ngay từ khi chúng bắt đầu phát triển. Khi kéo dài thời gian nuôi cấy các vi sinh vật có phản ứng MR dương tính sẽ tích lũy acid trong môi trường ngày càng nhiều hơn, độ pH trong môi trường ngày càng giảm.

Đối với các vi sinh vật cho phản ứng MR âm tính, ngay ban đầu một lượng acid được hình thành trong môi trường, nhưng kéo dài thời gian nuôi cấy vi sinh vật này tiếp tục chuyển hoá các sản phẩm acid bằng các phản ứng như decarboxyl tạo nên các sản phẩm trung tính như acetoin (acetyl methylcarbinol) và kết quả là làm cho pH trong môi trường chuyển dần về phía trung tính.

Trong một số trường hợp khác vi sinh vật cũng sản sinh acid trong môi trường nhưng các acid này cho hàm lượng ion H^+ thấp như acid lactic, acid acetic, acid formic ... bởi vì các acid này có xu hướng chuyển về trung tính do hiện tượng tạo thành các carbonate và tạo thành các sản phẩm như CO_2 và các hợp chất amonium trong môi trường các sản phẩm này làm tăng pH trong môi trường.

Thử nghiệm MR phụ thuộc rất lớn vào thời gian nuôi cấy để xác định sự khác nhau trong các con đường chuyển hoá glucose. Thử nghiệm này thường được tiến hành trong thời gian khoảng 2-5 ngày ở $37^\circ C$.

Phương pháp tiến hành: Nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường glucose phosphate (MR-VP broth) ủ trong khoảng 2-5 ngày. Thêm vào vài giọt thuốc thử methyl red được pha theo tỉ lệ 0,1g trong 300ml ml cồn và cho nước vào để đạt thể tích 500ml. Phản ứng dương tính khi môi trường chuyển sang màu đỏ. Phản ứng âm tính khi môi trường giữ nguyên màu vàng.

Thử nghiệm này giúp phân biệt *E.coli* (+) với *Klebsiella* (-); *Enterobacter aerogenes* (+) với *Enterobacter cloacea* (-); *Yersinia* sp. (+) với các loài *Bacillus* (-); xác định *Listeria monocytogenes* (+)

Chủng làm đối chứng (+) là *Proteus rettgeri*, (-) là *Serratia marcescens*.

1.13. Thử nghiệm tính di động trong môi trường thạch mềm

Nguyên tắc: Nhằm xác định vi sinh vật có di động hay không. Vi sinh vật di động thường là các vi sinh vật có tiên mao. Tiên mao thường được tìm thấy tại các vi sinh vật hình que. Tuy nhiên có một số vi sinh vật hình cầu cũng có khả năng di động. Vi sinh vật di động có thể có 1 hay nhiều tiên mao có thể phân bố tại các vị trí khác nhau trên tế bào vi sinh vật. Một số vi sinh vật có thể chuyển từ trạng thái di động sang trạng thái không di động nhưng đa số không có khả năng chuyển từ trạng thái không di động sang trạng thái di động. Thông thường các vi sinh vật từ di động thành không di động là do mất tiên mao.

Cấy sâu vi sinh vật vào trong môi trường thạch mềm chứa 0,5 % agar. Ủ qua đêm ở nhiệt độ thích hợp với tính di động của từng vi sinh vật. Quan sát hiện tượng sau nuôi cấy. Nếu vi sinh vật di động sẽ làm đục môi trường, vi sinh phát triển lan ra khỏi vết cấy. Ngược lại vi sinh vật không di động sẽ phát triển sinh khối xung quanh đường cấy, môi trường không bị đục bởi sinh khối vi khuẩn.

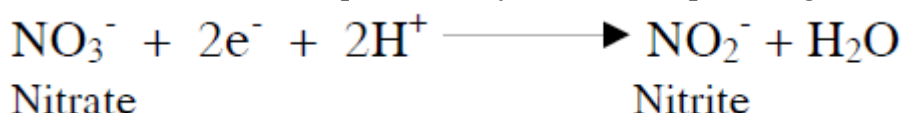
Chủng làm đối chứng (+) là *Serratia marcescens* , (-) là *Acinetobacter lwoffii*.

1.14. Thử nghiệm khử nitrate

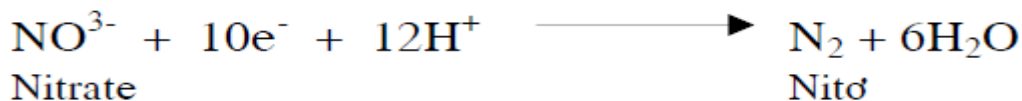
Nguyên tắc: Nhằm thử nghiệm khả năng vi sinh vật khử nitrat thành nitrite hay thành nitơ tự do. Tất cả các quá trình diễn ra trong tế bào vi sinh vật dưới sự xúc tác của enzyme nitratase.

Cơ sở sinh hoá: Sự khử nitrate thành nitrite hay nitơ tự do thường diễn ra trong điều kiện kỵ khí. Oxy từ nitrate được coi như là nhân tố nhận điện tử và proton cuối cùng. Hầu hết các vi sinh vật hiếu khí khử nitrate là những vi sinh vật hiếu khí tùy nghi, chúng chỉ thực hiện quá trình khử nitrate khi sống trong điều kiện kỵ khí, không có sự hiện diện của oxy phân tử. Trong chuỗi chuyển điện tử, nitrate đóng vai trò như một chất oxy hoá.

Sự khử nitrate thành nitrite: quá trình này diễn ra như phản ứng sau đây:



Sự khử các sản phẩm nitrate thành oxy phân tử theo phản ứng như sau:



Sản phẩm cuối cùng của sự khử này có thể là các chất như sau: nitrite (NO_2^-); ammonia (NH_3); nitơ phân tử (N_2), một hydroxylamine hay nitric oxyde (NO). Sự hình thành các sản phẩm cuối cùng này phụ thuộc vào từng loài vi sinh vật. Thông thường các sản phẩm cuối cùng là khí N_2 do sự khử tiếp tục các sản phẩm nitrite tạo thành. Sự hình thành sản phẩm cuối cùng còn phụ thuộc vào điều kiện môi trường.

Phương pháp thực hiện: Có thể phát hiện sự có mặt của nitratase trong môi trường bằng các cách như sau:

Cách 1: Cấy vi sinh vật vào trong môi trường nitrate broth và ủ qua đêm.

Cách 2: Khuếch tán dày đặc vi sinh vật thử nghiệm vào trong dung dịch sodium nitrate 0,01mol/l trong dung dịch đệm phosphate pH 7,0, ủ 37°C trong 24 giờ.

Cách 3: Nhỏ vài giọt dung dịch sodium nitrat 1% vào môi trường canh khuẩn dày đã được nuôi cấy trước đó. Ủ ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ.

Acid hoá các dung dịch thử nghiệm trên bằng vài giọt HCl 1N, thêm vào mỗi thử nghiệm 0,5ml dung dịch sulphanilamide 0,2% và 0,5ml N-naphtylethylenediamine hydrochloride, tất cả các thuốc thử này phải được bảo quản trong tủ lạnh. Nếu có xuất hiện màu hồng là dấu hiệu của nitratase dương tính. Nếu không có màu hồng xuất hiện có thể có một trong hai trường hợp như sau:

Không có nitratase trong môi trường, nitrate vẫn còn hiện diện. Thêm vào một

lượng rất nhỏ bụi kẽm vào các thử nghiệm để chuyển nitrate thành nitrite, khi đó màu hồng sẽ xuất hiện.

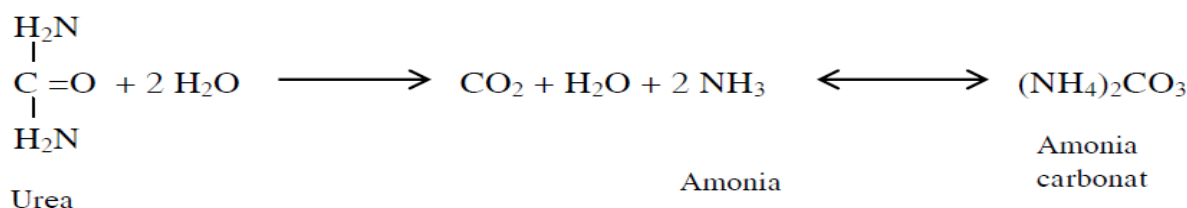
Nitrate không còn trong môi trường: thêm bụi kẽm vào môi trường vẫn không xuất hiện màu hồng.

Chủng làm đối chứng (+) là *Serratia marcescens*, (-) là *Acinetobacter lwoffii*.

1.15. Thử nghiệm urea

Nguyên tắc: Xác định vi sinh vật có khả năng phân huỷ urea thành ammonia và CO₂ dưới sự xúc tác của enzyme urease do vi sinh vật tiết ra.

Cơ sở sinh hoá: Urea là một hợp chất carbamide rất dễ bị thủy giải. Sự thủy giải của urea bởi sự xúc tác của urease sẽ giải phóng hai phân tử ammonia. Trong dung dịch các thành phần sau phản ứng sẽ chuyển hoá thuận nghịch, sản phẩm thu được sau phản ứng sẽ được biểu diễn trong cân bằng sau:



Enzyme urease là một enzyme quan trọng trong tế bào vi sinh vật, trong một số vi sinh vật đây là enzyme cấu trúc, nhưng trong một số loài khác đây là enzyme cảm ứng. Khi có cơ chất urea hiện diện trong môi trường, enzyme này được tổng hợp và phóng thích ra bên ngoài tế bào, xúc tác phản ứng thủy giải urea. Các sản phẩm sau phản ứng làm cho môi trường hoá kiềm và làm chuyển màu chất chỉ thị pH.

Phương pháp tiến hành: Cấy vi sinh vật vào môi trường canh urea có chứa chất chỉ thị là phenol red, ủ ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 12-18 giờ. Phản ứng dương tính khi môi trường chuyển sang màu đỏ hồng, phản ứng âm tính khi môi trường không chuyển màu.

Thử nghiệm urease là đặc trưng cho các loài *Proteus* sp. Và thường dùng để phân biệt các loài *Proteus* với các thành viên khác của *Enterobacteriaceae*.

Chủng làm đối chứng (+) là *Proteus rettgeri*, (-) là *Serratia marcescens*.

1.16. Thử nghiệm Voges – Prokauer (VP)

Nguyên tắc: Phát hiện khả năng vi sinh vật tạo thành một số sản phẩm trung tính acetylmethylcarbimol (acetoin) trong quá trình lên men glucose.

Cơ sở sinh hoá: Thử nghiệm VP nhằm mục đích phát hiện acetoin, một sản phẩm trung tính trong quá trình trao đổi glucose trong tế bào vi sinh vật. Quá trình phân huỷ glucose trong tế bào vi sinh vật tạo ra sản phẩm trung gian là acid pyruvic, từ đây có thể chia vi sinh vật thành hai nhóm theo hai con đường chuyển hoá pyruvic khác nhau như sau: Nhóm trao đổi không tạo thành 2,3-butanediol, ví dụ như *E.coli* được gọi là nhóm VP âm tính (VP-); nhóm thứ hai quá trình trao đổi này tạo thành sản phẩm trung gian là 2,3-butanediol, ví dụ như *Klebsiella*, được gọi là nhóm VP dương (VP+). Tuy nhiên thử nghiệm VP nhằm mục đích phát hiện acetoin (acetylmethylcarbimol, AMC) một tiền chất của 2,3-butanediol.

Phân tử acetoin được tạo thành do quá trình khử nhóm carboxyl của acid

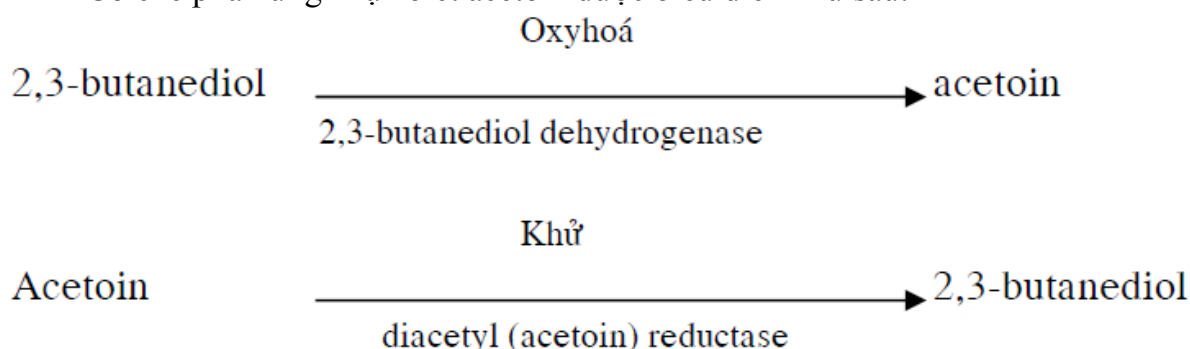
pyruvic, phản ứng như sau:



Vì acetoin là một sản phẩm trung gian trong bước tạo thành 2,3-butanediol nên trong môi trường nuôi cấy tích lũy một lượng rất ít tiền chất này. Để acetoin tích lũy nhiều, dễ dàng cho việc phát hiện, vi sinh vật phải nuôi trong điều kiện hiếu khí. Quá trình chuyển hoá giữa acetoin và 2,3-butanediol là một quá trình thuận nghịch, có thể biểu diễn quá trình này như sau:

Để phát hiện acetoin trong môi trường nuôi cấy 1-naphthol được sử dụng như một thuốc thử phát hiện trong môi trường kiểm mạnh được tạo ra do KOH 40% hay NaOH 40% được cho vào môi trường thử nghiệm.

Cơ chế phản ứng nhận biết acetoin được biểu diễn như sau:



Trong các thành phần tham gia phản ứng để tạo phức chất có màu đỏ hồng có hợp chất guanidine, ví dụ arginine $\text{NH}_2\text{C}(\text{NH}_2)\text{-NH}(\text{CH}_2)_3\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$, chất này hiện diện trong pepton được sử dụng trong môi trường nuôi cấy.

Phương pháp tiến hành: Cấy vi sinh vật vào trong môi trường canh glucose phosphate (MR-VP broth), ủ ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 2-5 ngày. Thêm vào canh khuẩn sau nuôi cấy 3ml dung dịch 1-naphthol 5% trong cồn, bổ sung thêm 3ml dung dịch KOH hay NaOH 40%, lắc mạnh. Quan sát phản ứng trong khoảng 5 phút. Phản ứng VP dương tính khi môi trường chuyển sang màu đỏ hay hồng sáng, phản ứng VP âm tính khi không có sự chuyển màu này.

Thử nghiệm VP được dùng để phân biệt *Klebsiella pneumonia* (+) và *Enterobacter* (+) với *E.coli* (-), phân biệt một số loài của *Klebsiella*, để xác định *Listeria monocytogenes*.

Chủng làm đối chứng (+) cho thử nghiệm này là *Serratia marcescens* và đối chứng (-) là *Proteus rettgeri*.

1.17. Thử nghiệm lên men – oxy hóa (Thử nghiệm Hugh & Leifson)

Nguyên tắc: Xác định vi sinh vật trao đổi carbohydrate bằng quá trình oxy hoá hay quá trình lên men.

Cơ sở sinh hoá: Vi sinh vật sử dụng carbohydrate trong quá trình trao đổi chất thông qua hai quá trình: oxy hoá và lên men. Một số vi sinh vật chỉ có thể sử dụng carbohydrate trong điều kiện hiếu khí, trong khi đó một số vi sinh vật khác có thể trao đổi cơ chất này trong cả hai điều kiện hiếu khí và kỵ khí. Đây được gọi là vi sinh vật kỵ khí tuỳ nghi.

Lên men là một quá trình kỵ khí, vi khuẩn lên men là những vi khuẩn kỵ khí tuỳ

nghi. Quá trình lên men glucose sẽ chia phân tử này thành hai đường triose (đường 3C). Sản phẩm cuối cùng của con đường lên men phụ thuộc vào từng loài vi sinh vật và phụ thuộc vào điều kiện môi trường. Tuy vậy điểm cốt yếu của con đường lên men là phân tử glucose bị phosphoryl hoá ở bước đầu tiên để thành glucose-6-phosphate. Quá trình lên men cần một chất nhận điện tử cuối cùng là một hợp chất hữu cơ. Glucose tham gia trong quá trình lên men thường được trao đổi theo con đường Embden-Meyerhof, cũng có trường hợp trao đổi theo con đường Entner- Doudoroff và con đường theo hướng trao đổi pentose.

Oxy hoá là quá trình chỉ diễn ra trong điều kiện có oxy. Trong quá trình này phân tử glucose không bị chia thành hai triose như trên, thay vào đó chúng oxy hoá nhóm chức aldehyde (-CHO) để tạo thành acid gluconic. Khác với quá trình lên men, quá trình oxy hoá không bị phosphoryl hoá ở giai đoạn đầu của quá trình phân giải glucose. Đồng thời trong quá trình oxy hoá chất nhận điện tử cuối cùng không phải là phân tử hữu cơ mà có thể là các chất vô cơ như oxy phân tử nitrat hay sulphate. Quá trình lên men thường tạo môi trường acid cao hơn trong quá trình oxy hoá.

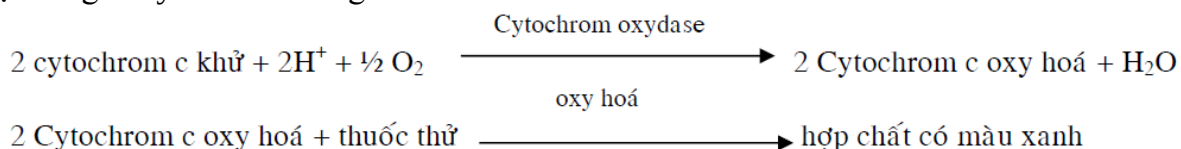
Phương pháp thực hiện: Cấy đậm sâu vi sinh vật thử nghiệm vào hai ống nghiệm môi trường Hugh & Leifson có chứa 2-5 g agar/ lít. Một trong hai ống được phủ lên bề mặt 1ml dầu khoáng hai parafine lỏng vô trùng để ngăn cản sự tiếp xúc với oxy không khí. Ủ cả hai ống trong cùng điều kiện khoảng 24-48 giờ. Phản ứng lên men khi cả hai ống đều bị acid hoá đều ở trên mặt và phần sâu của môi trường.

1.18. Thử nghiệm oxydase

Nguyên tắc: thử nghiệm này nhằm phát hiện hệ enzyme oxydase của vi sinh vật.

Cơ sở sinh hoá: Thử nghiệm oxydase nhằm mục đích phát hiện enzyme oxydase, một sản phẩm nội bào của vi sinh vật. Phản ứng oxydase xảy ra do sự có mặt của hệ thống cytochrom oxydase oxyhoá các cytochrom dạng khử bởi oxy phân tử.

Tất cả các vi sinh vật nhận năng lượng từ các nguồn vật chất bằng cơ chế hô hấp, đây là quá trình oxy hoá. Hệ thống hô hấp là một chuỗi các enzyme và các chất chịu trách nhiệm cho sự vận chuyển điện tử từ các cơ chất đến oxy phân tử. Oxy là chất nhận proton hydro cuối cùng trong chuỗi hô hấp để tạo thành nước hay hydro peroxyde, sản phẩm cuối cùng được hình thành phụ thuộc vào từng loài vi sinh vật và hệ thống enzyme của chúng.



Hợp chất có màu xanh này là một indolphenol blue, đây là một loại thuốc nhuộm có nhân quinon.

Các tiến hành: Nuôi cấy vi sinh vật trên môi trường nutrient agar qua đêm, lấy một ít sinh khối vi sinh vật bằng que cấy vòng được làm bằng nhựa hay gỗ đặt lên giấy lọc, đánh dấu vị trí đặt sinh khối vi sinh vật. Nhỏ lên vị trí đánh dấu một giọt thuốc thử N,N,N',N'- tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD), quan sát sau

vài phút. Phản ứng oxydase dương tính khi sinh khối vi sinh vật chuyển thành này xanh dương đậm. Phản ứng âm tính khi không có hiện tượng chuyển màu.

Chúng làm đối chứng (+) là *Pseudomonas aeruginosa*, (-) là *Acinetobacter lwoffii*.

2. Bài tập và thảo luận

2.1. Xây dựng quy trình thử nghiệm sinh hóa đối với chỉ tiêu *E. coli*

2.2. Xây dựng quy trình thử nghiệm sinh hóa đối với chỉ tiêu *Salmonella*

2.3. Xây dựng quy trình thử nghiệm sinh hóa đối với chỉ tiêu *Staphylococcus aureus*

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Trình bày các nguyên tắc, cơ sở sinh hóa và phương pháp tiến hành của một số thử nghiệm sinh hóa phổ biến trong xác định vi sinh vật

BÀI 5. PHÂN TÍCH TỔNG SỐ VI SINH VẬT HIẾU KHÍ

Mục tiêu:

- Trình bày được quy trình phân tích tổng số vi khuẩn hiếu khí trong thực phẩm;
- Pha chế được môi trường và các loại dung dịch đệm sử dụng trong phân tích tổng số vi khuẩn hiếu khí đúng nồng độ yêu cầu;
- Tiến hành các thao tác xử lý mẫu, pha loãng và cấy mẫu theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

A. NỘI DUNG

1. Sơ lược về chỉ tiêu

Vi sinh vật hiếu khí: là những vi sinh vật phát triển để hình thành khuẩn lạc trong điều kiện có sự hiện diện của ôxy phân tử.

Số đơn vị hình thành khuẩn lạc (cfu – colony forming unit) là số khuẩn lạc xuất hiện trong môi trường nuôi cấy. Số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc cho phép ước đoán được số lượng vi sinh vật trong một đơn vị khối lượng thực phẩm.

Để xác định số lượng vi sinh vật trong một đơn vị khối lượng thực phẩm bằng phương pháp đếm số lượng khuẩn lạc phải qua quá trình đồng nhất, pha loãng mẫu thành các nồng độ xác định. Chuyển một thể tích xác định các độ pha loãng đã đồng nhất vào trong môi trường nuôi cấy. Các khuẩn lạc được hình thành trong môi trường sau khi ủ được xem như là chúng hình thành từ một tế bào đơn lẻ.

Tuỳ theo các yêu cầu cụ thể trong việc phân tích, các đĩa môi trường sau khi cấy mẫu được ủ ở các điều kiện nhiệt độ và thời gian khác nhau. Theo yêu cầu của các tiêu chuẩn của nhiều quốc gia, chỉ tiêu này được ủ ở 30°C trong khoảng thời gian khoảng 3 ngày. Tuy nhiên một số yêu cầu khác có thể ủ ở nhiệt độ 20 - 22°C trong cùng thời gian trên.

Đếm tất cả các khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa, căn cứ vào độ pha loãng cũng như thể tích cấy để quy về tổng số vi sinh vật trong một đơn vị khối lượng mẫu thực phẩm. Chỉ tiêu tổng số vi sinh vật hiếu khí được dùng để đánh giá chất lượng của mẫu về khía cạnh vi sinh vật, qua đó đánh giá khả năng hư hỏng, cũng như thời hạn bảo quản các sản phẩm thực phẩm. Tổng số vi sinh vật hiếu khí còn là chỉ tiêu đánh giá mức độ vệ sinh trong quá trình chế biến, bảo quản thực phẩm, nước uống hay các sản phẩm khác.

2. Dụng cụ và thiết bị

2.1. Dụng cụ

- Hộp petri
- Pipet
- Bình tam giác
- Ống nghiệm

2.2. Thiết bị

- Tủ ấm
- Tủ sấy

- Nồi hấp thanh trùng
- Máy pH kế
- Lò vi sóng

3. Môi trường và vật liệu phân tích

3.1. Môi trường

- Môi trường Plate Count Agar có pH 7.0 ± 0.2 . Môi trường được phân phối vào trong các bình thủy tinh hay trong các ống nghiệm. Hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Bảo quản ở trong tủ lạnh từ $2-8^{\circ}\text{C}$. Trước khi sử dụng môi trường phải được đun chảy và làm nguội ở 45°C trong bể điều nhiệt.

- Dung dịch pha loãng nước muối peptone (saline pepton water): gồm 8.5 gam NaCl và 1.0gam pepton. Dung dịch được phân phối vào trong các bình chứa 0.5-1.0 lít và phân phối vào trong các ống nghiệm với thể tích chính xác 9.0ml sau khi khử trùng.

3.2. Vật liệu phân tích

- Các sản phẩm thực phẩm dùng cho người hoặc thức ăn chăn nuôi. Đối với thực phẩm và thức ăn chăn nuôi đã lên men thì bị hạn chế hơn.

4. Pha chế môi trường

4.1. Tạo hỗn hợp

*Cân các thành phần có trong môi trường PCA theo công thức sau:

- Tryptone/Peptone : 5,0 g
- Cao nấm men: 2,5g
- Glucose: 10g
- Agar: 15g
- Nước cất 1000ml

Cho vào cốc thủy tinh 1000ml, hòa tan và đun sôi trong lò vi sóng.

*Cân các thành phần có trong nước muối peptone, theo công thức sau:

- NaCl: 8,5g
- Peptone: 1,0g
- Nước cất: 1000ml

Cho vào cốc thủy tinh 1000ml, hòa tan và đun sôi trong lò vi sóng.

4.2. Kiểm tra pH

- Sử dụng thiết bị máy pH kế đo
- Sử dụng dung dịch đệm điều chỉnh pH khi cần thiết

4.3. Rót

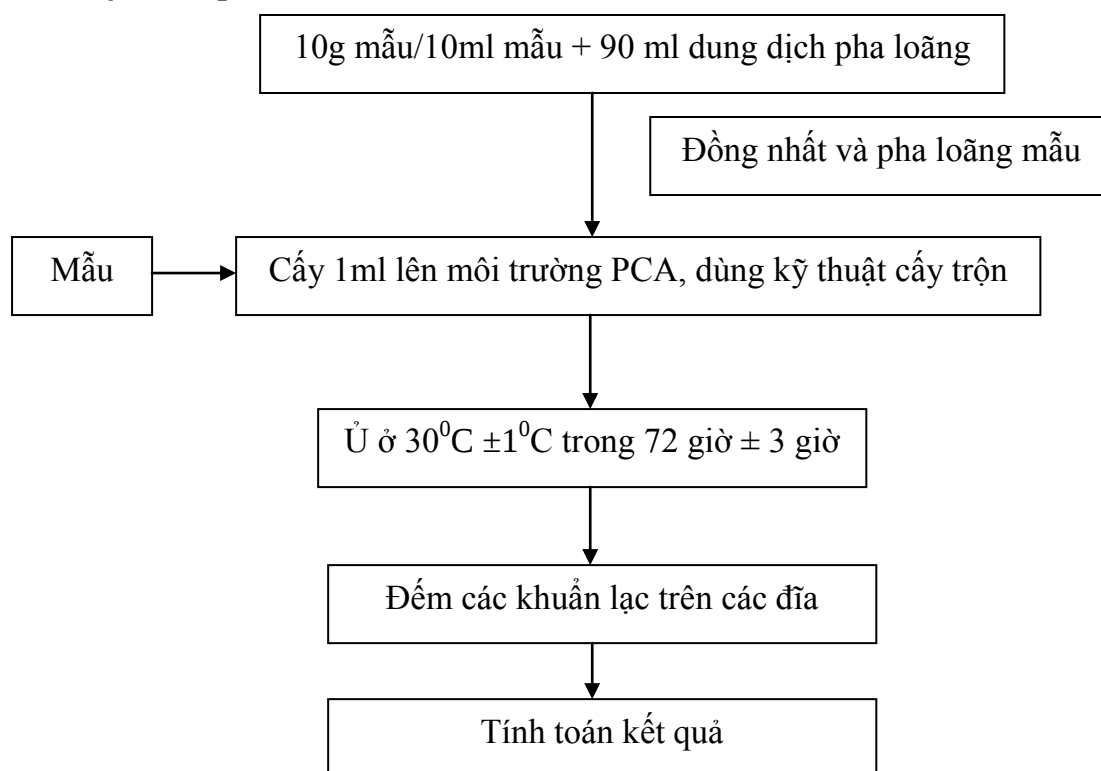
- Rót môi trường vào các bình tam giác, thể tích môi trường chiếm $\leq 50\%$ thể tích bình tam giác; hoặc rót môi trường vào các bình Duran

- Rót dung dịch pha loãng 9ml vào ống nghiệm; 90 ml, 225ml vào bình tam giác hoặc vào các bình Duran.

4.4. Khử trùng

- Khử trùng môi trường, dung dịch pha loãng ở 121°C trong 20 phút bằng nồi thanh trùng.

5. Quy trình phân tích



5.1. Xử lý mẫu

- Dùng các dụng cụ như kéo, kẹp đã được khử trùng cân chính xác 10.0g mẫu vào trong bao PE. Tất cả các điều kiện làm việc và thao tác phải tiến hành trong điều kiện vô trùng. Thêm vào lượng mẫu này 90 ml dung dịch pha loãng Saline Pepton Water. Sau khi đồng nhất nhận được dung dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-1} .

- Đồng nhất mẫu bằng máy đập mẫu, thời gian đập mẫu phụ thuộc vào tính chất cơ lý của mẫu, nhưng không quá 2,5 phút.

- Dịch mẫu ngay sau khi đồng nhất được pha loãng theo dãy thập phân bằng cách dùng pipet vô trùng chuyển 1 ml dịch mẫu vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch pha loãng Saline Pepton Water, tránh tiếp xúc pipet với dung dịch pha loãng, đồng nhất mẫu trong ống nghiệm bằng máy lắc hoặc dùng pipet vô trùng khác hút đảo dịch mẫu lên xuống 5 -10 lần. Dùng pipet đó chuyển 1 ml dịch mẫu vào ống thứ hai chứa 9 ml dung dịch pha loãng. Tiếp tục như vậy sẽ có các dung dịch mẫu với các độ pha loãng 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; ...cho đến khi có đủ các nồng độ pha loãng cần thiết.

5.2. Cấy mẫu

Chọn hai hay ba độ pha loãng liên tiếp sao cho trong 1 ml chứa 25-250 tế bào vi sinh vật để cấy. Dùng pipet vô trùng chuyển 1 ml dịch mẫu pha loãng đã chọn vào giữa đĩa petri vô trùng. Mỗi nồng độ cấy ít nhất vào 2 hay 3 đĩa. Sau khi cấy, đổ vào mỗi đĩa 10-15 ml môi trường Plate Count Agar đã được đun chảy và để ổn định ở 45°C. Trộn đều dịch mẫu với môi trường bằng cách lắc tròn đĩa petri xuôi và ngược chiều kim đồng hồ, mỗi chiều 3-5 lần ngay sau khi đổ môi trường. Đặt các đĩa trên mặt phẳng ngang cho agar đông đặc.

5.3. Nuôi mẫu

Sau khi các đĩa thạch đã đông tự nhiên ở nhiệt độ phòng, lật ngược và ủ các đĩa trong tủ ẩm ở nhiệt độ $30 \pm 1^\circ\text{C}$ trong thời gian 72 giờ. Trong một số yêu cầu, nhiệt độ ủ đĩa và thời gian ủ có thể thay đổi.

5.4. Đếm kết quả

Đếm tất cả số các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa sau khi ủ. Chọn các đĩa có số đếm từ 25 đến 250 khuẩn lạc để tính kết quả. Số lượng tổng số vi sinh vật trong 1 gam mẫu được tính như sau:

$$A = \frac{N}{n_1 \times V_1 \times f_1 + \dots + n_i \times V_i \times f_i} \text{ (cfu/g)}$$

Trong đó: A: số lượng vi sinh vật trong 1 gam mẫu

N: tất cả các khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn.

n_i : số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i

V: thể tích dịch mẫu cấy vào trong 1 đĩa.

f_i : độ pha loãng tương ứng.

Ví dụ trong một trường hợp phân tích mẫu cụ thể nhận được kết quả như sau:

Nồng độ pha loãng	10^{-3}	10^{-4}
Kết quả: Đĩa 1	235	26
Đĩa 2	246	21

$$A = \frac{235 + 246 + 26}{2 \times 1 \times 0,001 + 1 \times 1 \times 0.0001} \cong 2.4 \times 10^5 \text{ (cfu/g)}$$

Các kết quả tổng số vi sinh vật hiếu khí thường được biểu diễn dưới dạng số mũ của cơ số thập phân.

Trường hợp có các vi sinh vật mọc loang, tính mỗi vết loang là 1 khuẩn lạc. Nếu số khuẩn lạc loang chiếm hơn 1/3 đĩa thì phải ghi nhận điều này và đánh dấu kết quả nhận được.

Nếu ở độ pha loãng cao nhất, số khuẩn lạc đếm được trên 1 đĩa >250 , ví dụ ở nồng độ 10^{-5} số đếm lớn hơn 250, kết quả được ghi: $>2.5 \times 10^7$ CFU/g. Nếu ở độ pha loãng thấp nhất, số khuẩn lạc đếm được trên 1 đĩa <25 , ví dụ ở nồng độ 10^{-1} số đếm nhỏ hơn 25, kết quả được ghi: $<2.5 \times 10^2$ CFU/g.

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Trình bày và mô tả quy trình phân tích tổng số vi khuẩn hiếu khí trong thực phẩm.

Bài 6. PHÂN TÍCH TỔNG SỐ NẤM MEN VÀ NẤM MỐC

Mục tiêu:

- Trình bày được quy trình phân tích tổng số nấm men và nấm mốc trong thực phẩm;
- Pha chế được môi trường và các loại dung dịch đệm sử dụng trong phân tích tổng số nấm men và nấm mốc đúng nồng độ yêu cầu;
- Thực hiện các thao tác xử lý mẫu, pha loãng và cấy mẫu theo đúng trình tự và yêu cầu kỹ thuật;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

A. NỘI DUNG

1. Sơ lược về chỉ tiêu

Nấm men và nấm mốc là nhóm vi sinh vật rất đa dạng, cho đến nay có hơn 400 000 loài nấm men và nấm mốc đã được mô tả. Đây là nhóm vi sinh vật nhân thật, có vách tế bào là lớp vỏ chitin, có nhân và các bào quan khác. Tất cả các loài men và mốc đều thuộc nhóm vi sinh vật dị dưỡng, chúng cần nguồn dinh dưỡng cung cấp năng lượng từ môi trường bên ngoài, vì thế vi sinh vật này thường xuyên được phân lập từ thực phẩm hay các nguồn giàu dinh dưỡng khác. Phân biệt nấm men và nấm mốc theo khái niệm đơn giản như sau:

Nấm mốc là vi nấm dạng sợi, sinh sản bằng bào tử hoặc khuẩn ty.

Nấm men là những tế bào đơn tính phát triển theo kiểu nảy chồi. Hình thái có thể nhìn thấy các tế bào kết nhau thành chuỗi.

Đơn vị hình thành khuẩn lạc của mốc và men là mầm tạo nên một khuẩn lạc khi nuôi cấy trong môi trường. Mầm có thể là một bào tử, một tế bào hay một đoạn của khuẩn ty.

Trong thực phẩm, khi có sự hiện diện của nấm mốc và nấm men, chúng phát triển làm thay đổi màu của thực phẩm, gây mùi hay vị lạ, làm hư hỏng hay thay đổi cơ cấu của thực phẩm. Một số loài có thể tạo độc tố gây ngộ độc thực phẩm.

Xác định số lượng mốc hay men trong mẫu bằng kỹ thuật pha loãng và đổ đĩa, một khối lượng mẫu xác định được cấy vào môi trường Sabouraud ở 25°C trong 3-5 ngày, đếm số khuẩn lạc nấm men và nấm mốc riêng biệt.

2. Dụng cụ và thiết bị

2.1. Dụng cụ

- Hộp petri
- Pipet
- Bình tam giác
- Ống nghiệm

2.2. Thiết bị

- Tủ ẩm
- Tủ sấy
- Nồi hấp thanh trùng
- Máy pH kế
- Lò vi sóng

3. Môi trường và vật liệu phân tích

3.1. Môi trường

- Môi trường Sabouroad có pH 5,6 – 6,2. Môi trường được phân phối vào trong các bình thủy tinh hay trong các ống nghiệm. Hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Bảo quản ở trong tủ lạnh từ 2–8°C. Trước khi sử dụng môi trường phải được đun chảy và làm nguội ở 45°C trong bể điều nhiệt.

- Dung dịch pha loãng nước muối peptone (saline pepton water): gồm 8.5 gam NaCl và 1.0gam pepton. Dung dịch được phân phối vào trong các bình chứa 0.5-1.0 lít và phân phối vào trong các ống nghiệm với thể tích chính xác 9.0ml sau khi khử trùng.

3.2. Vật liệu phân tích

- Các sản phẩm thực phẩm dùng cho người, thức ăn chăn nuôi, mỹ phẩm.

4. Pha chế môi trường

4.1. Tạo hỗn hợp

*Cân các thành phần có trong môi trường Sabouroad theo công thức sau:

- Peptone : 10,0 g
- Glucose: 40,0g
- Agar: 15g
- Nước cất 1000ml

Cho vào cốc thủy tinh 1000ml, hòa tan và đun sôi trong lò vi sóng.

*Cân các thành phần có trong nước muối peptone, theo công thức sau:

- NaCl: 8,5g
- Peptone: 1,0g
- Nước cất: 1000ml

Cho vào cốc thủy tinh 1000ml, hòa tan và đun sôi trong lò vi sóng.

4.2. Kiểm tra pH

- Sử dụng thiết bị máy pH kế đo
- Sử dụng dung dịch đệm điều chỉnh pH khi cần thiết

4.3. Rót

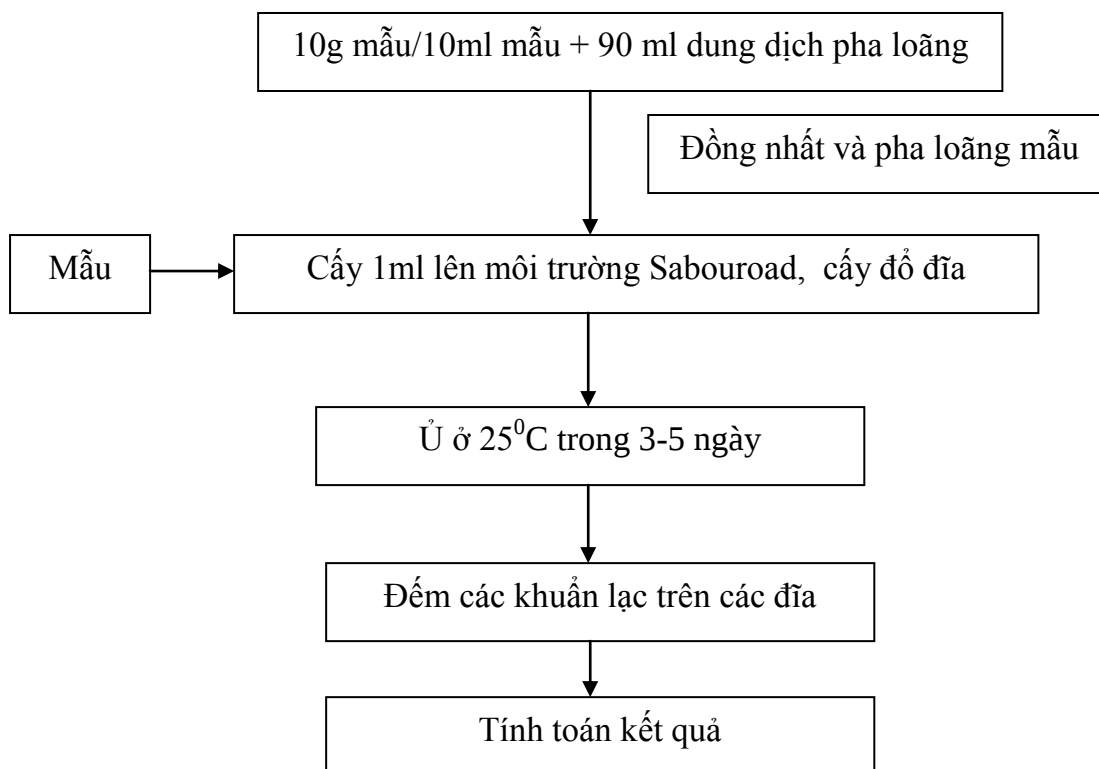
- Rót môi trường vào các bình tam giác, thể tích môi trường chiếm $\leq 50\%$ thể tích bình tam giác; hoặc rót môi trường vào các bình Duran

- Rót dung dịch pha loãng 9ml vào ống nghiệm; 90 ml, 225ml vào bình tam giác hoặc vào các bình Duran.

4.4. Khử trùng

- Khử trùng môi trường, dung dịch pha loãng ở 121°C trong 20 phút bằng nồi thanh trùng.

5. Quy trình phân tích



5.1. Xử lý mẫu

- Dùng các dụng cụ như kéo, kẹp đã được khử trùng cân chính xác 10.0g mẫu vào trong bao PE. Tất cả các điều kiện làm việc và thao tác phải tiến hành trong điều kiện vô trùng. Thêm vào lượng mẫu này 90 ml dung dịch pha loãng Saline Pepton Water. Sau khi đồng nhất nhận được dung dịch mẫu có độ pha loãng 10^{-1} .

- Đồng nhất mẫu bằng máy đập mẫu, thời gian đập mẫu phụ thuộc vào tính chất cơ lý của mẫu, nhưng không quá 2,5 phút.

- Dịch mẫu ngay sau khi đồng nhất được pha loãng theo dãy thập phân bằng cách dùng pipet vô trùng chuyển 1 ml dịch mẫu vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch pha loãng Saline Pepton Water, tránh tiếp xúc pipet với dung dịch pha loãng, đồng nhất mẫu trong ống nghiệm bằng máy lắc hoặc dùng pipet vô trùng khác hút đảo dịch mẫu lên xuống 5 -10 lần. Dùng pipet đó chuyển 1 ml dịch mẫu vào ống thứ hai chứa 9 ml dung dịch pha loãng. Tiếp tục như vậy sẽ có các dung dịch mẫu với các độ pha loãng 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; ...cho đến khi có đủ các nồng độ pha loãng cần thiết.

5.2. Cấy mẫu

Chọn hai hay ba độ pha loãng liên tiếp sao cho trong 1 ml chứa 25-250 tế bào vi sinh vật để cấy. Dùng pipet vô trùng chuyển 1 ml dịch mẫu pha loãng đã chọn vào giữa đĩa petri vô trùng. Mỗi nồng độ cấy ít nhất vào 2 hay 3 đĩa. Sau khi cấy, đổ vào mỗi đĩa 10-15 ml môi trường Sabouroad đã được đun chảy và để ổn định ở 45°C. Trộn đều dịch mẫu với môi trường bằng cách lắc tròn đĩa petri xuôi và ngược chiều kim đồng hồ, mỗi chiều 3-5 lần ngay sau khi đổ môi trường. Đặt các đĩa trên mặt phẳng ngang cho agar đông đặc.

5.3. Nuôi mẫu

Sau khi các đĩa thạch đã đông tự nhiên ở nhiệt độ phòng, lật ngược và ủ các đĩa trong tủ ẩm ở nhiệt độ 25°C trong 3-5. Trong một số yêu cầu, nhiệt độ ủ đĩa và thời gian ủ có thể thay đổi.

5.4. Đếm kết quả

Đếm tất cả số các khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa sau khi ủ. Chọn các đĩa có số đếm từ 25 đến 250 khuẩn lạc để tính kết quả. Số lượng tổng số vi sinh vật trong 1 gam mẫu được tính như sau:

$$M = \frac{\frac{c \times d}{n}}{V}$$

Trong đó:

M: Số lượng nấm men, nấm mốc sống lại được có trong 1g mẫu

c: Tổng số khuẩn lạc đếm được ở các đĩa petri có cùng một độ pha loãng

d: Độ pha loãng

n: số đĩa trong một độ pha loãng

V: thể tích cấy mẫu

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Trình bày và mô tả quy trình phân tích tổng số nấm men và nấm mốc trong thực phẩm.

Bài 7. PHÂN TÍCH TỔNG SỐ COLIFORMS

Mục tiêu:

- Trình bày được quy trình phân tích tổng số *Coliforms* trong nước;
- Pha chế được các loại môi trường và dung dịch đệm sử dụng trong phân tích tổng số *Coliforms* đúng nồng độ yêu cầu;
- Thao tác thành thạo xử lý mẫu, pha loãng, cấy mẫu và thử nghiệm khẳng định *Coliforms* theo đúng quy trình và an toàn;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

A. NỘI DUNG

1. Sơ lược về chỉ tiêu

Coliforms là nhóm vi sinh vật chỉ thị vì số lượng hiện diện của chúng trong thực phẩm, nước hay các loại mẫu môi trường được dùng như dấu hiệu chỉ thị khả năng hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác. Các nhà nghiên cứu đều cho thấy rằng với số lượng cao của coliform trong thực phẩm thì khả năng hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác cao. Tuy nhiên mối liên hệ giữa vi sinh vật gây bệnh và vi sinh vật chỉ thị còn có nhiều tranh cãi.

Coliform tổng số là nhóm vi sinh vật hiếu khí tùy nghi, thuộc nhóm vi khuẩn gram âm, không sinh bào tử, có hình que, lên men lactose và sinh hơi từ nguồn carbon này trong vòng 24-48 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Khi nâng cao nhiệt độ nuôi cấy lên 44°C có thể phân biệt Coliform phân với nhóm Coliform tổng số và nhóm không phải Coliform. Coliform được định nghĩa như sau: Coliform phân là nhóm vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí tùy ý, thuộc nhóm vi sinh vật gram âm, không sinh bào tử và có khả năng lên men lactose và sinh hơi trong khoảng thời gian nuôi cấy 24-48 giờ ở nhiệt độ 44°C.

Nhóm Coliform phân là một phần của hệ vi sinh ruột đường ở người và các động vật máu nóng khác, các nhóm vi sinh vật sau được liệt vào nhóm Coliform phân: *Escherichia*; *Klebsiella*, *Citrobacter* và *Enterobacter*. Nhóm vi sinh vật này được sử dụng như yếu tố chỉ thị mức độ vệ sinh trong quá trình chế biến, bảo quản và vận chuyển thực phẩm, nước uống và môi trường.

2. Dụng cụ và thiết bị

2.1. Dụng cụ

- Hộp petri
- Pipet
- Bình tam giác
- Ống nghiệm

2.2. Thiết bị

- Tủ ẩm
- Tủ sấy
- Nồi hấp thanh trùng
- Máy pH kế
- Lò vi sóng

3. Môi trường và vật liệu phân tích

3.1. Môi trường

- Tryptone Soya Agar (TSA) được chuẩn bị trong các bình hay chai thủy tinh, khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút bằng nồi hấp. Bảo quản ở nhiệt độ 4-8°C. Trước khi sử dụng, môi trường được đun chảy và làm nguội ở 45°C trong bể điều nhiệt.

- Violet Red Bile Agar (VRB) được chuẩn bị vô trùng trong các chai thủy tinh, đun chảy và làm nguội ở nhiệt độ 45°C trong bể điều nhiệt trước khi sử dụng. Có thể sử dụng các môi trường khác như Desoxycholate agar cũng được chuẩn bị như trên.

- Brilliant Green Bile Lactose Broth (BGBL) được phân phối vào trong các ống nghiệm, mỗi ống 10ml và có ống Durham đặt ngược bên trong. Khử trùng ở 110°C trong 15 phút. Sau khi khử trùng phải đảm bảo không có bọt khí trong các ống Durham ngược.

- E.C broth: được chuẩn bị tương tự như môi trường BGBL.

- Canh trypton: được phân phối vào trong các ống nghiệm, mỗi ống 5ml. Môi trường khử trùng ở 121°C trong 15 phút.

- Thuốc thử Kovac's hay Ehrlich

3.2. Vật liệu phân tích

- Các sản phẩm thực phẩm dùng cho người, thức ăn chăn nuôi.

4. Pha chế môi trường

4.1. Pha chế môi trường VRB

- Cao nấm men 3g
- Peptone 7g
- Muối mật 1,5g
- Lactose 10g
- Sodium chloride 5g
- Neutral red 0,03g
- Tím tinh thể 2mg
- Agar 15g
- Nước 1 lít

Hòa tan, đun sôi, khử trùng ở 121°C trong 15 phút.

4.2. Pha chế môi trường BGBL

- Pepton 10g
- Lactose 10g
- Mật bò 20g
- Brilliant green 0,0133g
- Nước cất 1l

Hòa tan peptone và lactose vào trong 500ml nước cất, mật bò vào trong khoảng 200ml và brilliant green trong khoảng 100ml nước cất. Trộn đều 3 dung dịch để đạt thể tích cuối cùng là 1 lít, chỉnh pH môi trường khoảng 7,4. Rót vào mỗi ống nghiệm có chứa ống Durham 10ml môi trường BGBL. Hấp 110°C trong 15 phút

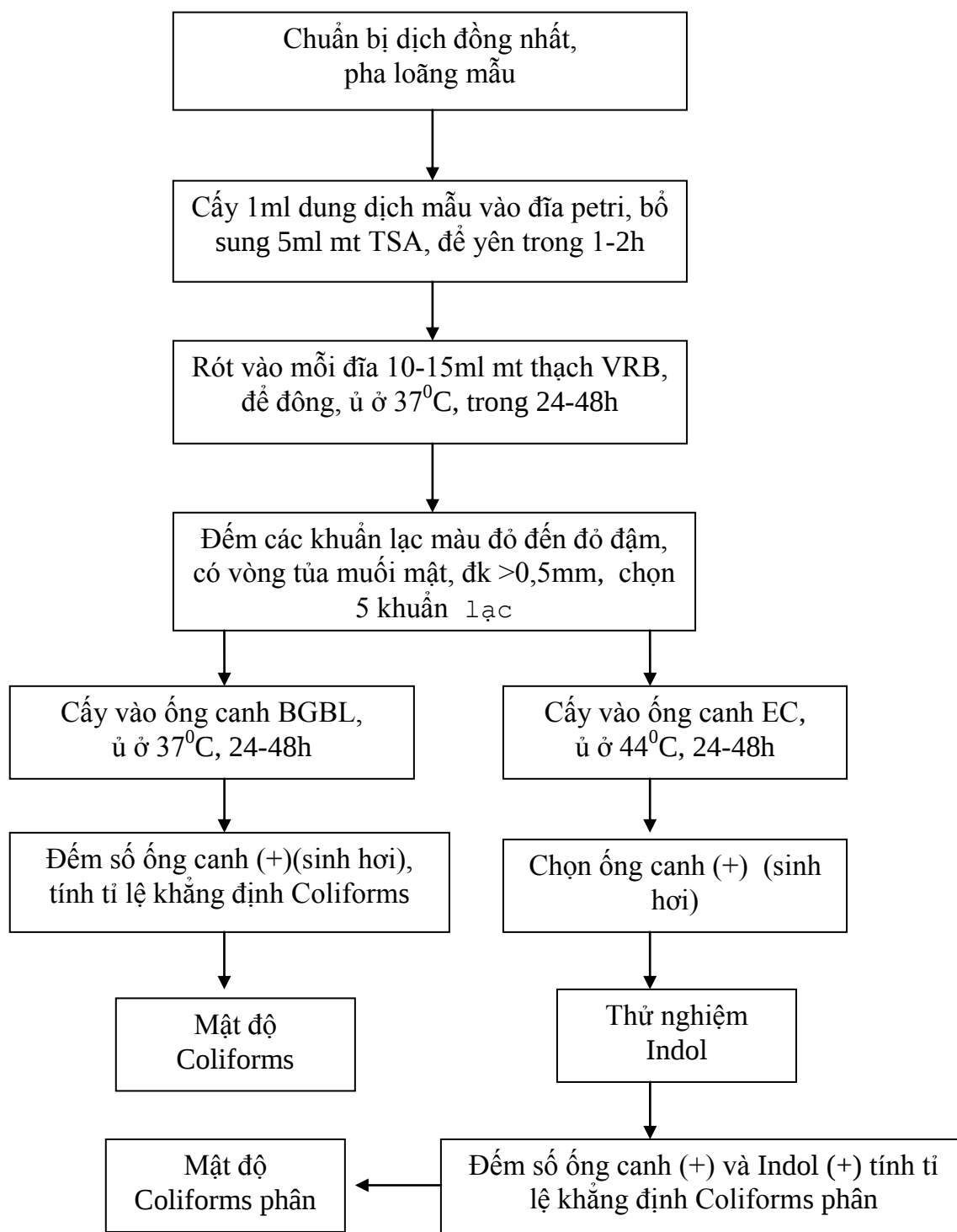
4.3. Pha chế dung dịch đệm

Cân các thành phần có trong nước muối peptone, theo công thức sau:

- NaCl: 8,5g
- Peptone: 1,0g
- Nước cất: 1000ml

Cho vào cốc thủy tinh 1000ml, hòa tan và đun sôi trong lò vi sóng

5. Qui trình phân tích



5.1. Xử lý mẫu

Quá trình chuẩn bị mẫu tương tự như phần định lượng tổng số vi sinh vật hiếu khí. Nhưng quá trình pha loãng mẫu sao cho trong 1ml dung dịch pha loãng chứa khoảng <100 tế bào *Coliform*.

5.2. Cấy mẫu

Cấy chuyển 1 ml dịch pha loãng mẫu đã chọn vào đĩa petri, mỗi nồng độ cấy ít nhất vào hai đĩa petri, chọn 2 nồng độ pha loãng liên tiếp để cấy sao cho sau khi ủ mỗi đĩa xuất hiện dưới 100 khuẩn lạc.

Cho vào mỗi đĩa đã cấy mẫu khoảng 5ml môi trường TSA đã được đun chảy và ổn định trong bể điều nhiệt ở 45°C, trộn đều dịch mẫu với môi trường bằng cách lắc tròn đĩa petri xuôi và ngược chiều kim đồng hồ, mỗi chiều 3-5 lần ngay sau khi đổ môi trường và để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 1-2 giờ nhằm phục hồi các tế bào bị tổn thương hay các tế bào bị suy thoái do quá trình chế biến. Đổ thêm 10 -15 ml môi trường VRB lên trên môi trường TSA. Chờ cho môi trường trong đĩa đông đặc, lật ngược đĩa và ủ ở 37°C + 1°C trong 24 - 48 giờ.

5.3. Nuôi mẫu

Sau khi các đĩa thạch đã đông tự nhiên ở nhiệt độ phòng, lật ngược và ủ các đĩa trong tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong 24-48 giờ.

5.4. Thử nghiệm khẳng định *Coliform*

Trong trường hợp phân tích các mẫu thực phẩm có chứa các nguồn carbon khác không phải lactose, để tránh các trường hợp vi sinh vật sử dụng các nguồn carbon trong mẫu để lên men và có biểu hiện hình dạng khuẩn lạc tương tự *Coliform*, giai đoạn khẳng định là cần thiết. Quy trình khẳng định được tiến hành như sau: chọn ít nhất 5 khuẩn lạc nghi ngờ đã đếm với các hình dạng khác nhau, cấy chuyển sang các ống có chứa môi trường khẳng định. BGBL được sử dụng khi khẳng định *Coliform* tổng số, E.C được sử dụng để khẳng định *Coliform* phân. Ủ các ống nghiệm BGBL đã cấy ở nhiệt độ 37 ± 1°C và các ống nghiệm E.C broth ở 44°C trong thời gian 24-48 giờ. Kết quả dương tính khi vi khuẩn phát triển và sinh hơi trong môi trường nuôi cấy, hơi tạo ra được giữ lại trong các ống Durham ngược hay tụ lại trên bề mặt ống nghiệm. Tỷ lệ xác nhận là tỉ số giữa khuẩn lạc cho kết quả dương tính với số khuẩn lạc khẳng định.

Trong trường hợp khẳng định *Coliform* phân, các khuẩn lạc sinh hơi trong môi trường E.C broth được thử nghiệm indol ở 44°C. Tỷ lệ dương tính chỉ được tính cho các khuẩn lạc có khả năng sinh hơi và phản ứng indol dương tính.

5.5. Tính kết quả

Chọn các đĩa có số đếm từ dưới 100 khuẩn lạc *Coliforms* để tính kết quả. Khuẩn lạc *Coliforms* có màu đỏ đến màu đỏ đậm và có đường kính > 0.5 mm, xung quanh khuẩn lạc có vùng tủa của muối mật.

$$A(\text{coliform/coliform phân}) = \frac{N}{n_1 v_1 f_1 + \dots + n_i v_i f_i} \times R(\text{cfu/g(ml)})$$

Trong đó: N : tổng số khuẩn lạc đếm được
 n_i : số đĩa có số khuẩn lạc được chọn tại mỗi độ pha loãng
 v : Thể tích cấy vào mỗi đĩa
 f_i : Độ pha loãng có số khuẩn lạc được chọn tại các đĩa đếm
 R : Tỷ lệ xác nhận

Kết quả *coliform* hay *coliform* phân được làm tròn chẵn chục và được biểu diễn dưới dạng số mũ có cơ số thập phân.

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Trình bày và mô tả quy trình phân tích tổng số *Coliforms* trong nước.

Bài 8. PHÂN TÍCH *ESCHERICHIA COLI*

Mục tiêu:

- Trình bày được quy trình phân tích *E. coli* trong nước;
- Pha chế được các loại môi trường và dung dịch đệm sử dụng trong phân tích *E. coli* đúng nồng độ yêu cầu;
- Thao tác thành thạo xử lý mẫu, pha loãng, cấy mẫu, tăng sinh mẫu và thử nghiệm khẳng định *E. coli* theo đúng quy trình và an toàn;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

A. NỘI DUNG

1. Sơ lược về chỉ tiêu

E.coli là loài vi sinh vật thuộc nhóm *Coliform* phân, có hình que, gram âm, di động, có khả năng lên men và tạo acid và sinh hơi từ đường lactose ở 44°C hay nhiệt độ thấp hơn, có khả năng sinh indol ở 44°C và 37°C, có phản ứng Voges Proskauer âm tính, không có khả năng sử dụng citrate như nguồn carbon duy nhất.

Trong một số phương pháp kiểm nghiệm thực phẩm, có những định nghĩa phân biệt số lượng *E.coli* khẳng định và số lượng *E.coli* giả định. Số lượng *E.coli* giả định được coi là những *Coliform* phân, chúng có phản ứng Indol dương tính, không tiến hành khẳng định các phản ứng khác.

E.coli còn được gọi là faecal coli, chúng hiện diện thường xuyên trong ruột người và các loài động vật. Chúng phân bố rộng khắp trong tự nhiên, mặt dù có nguồn gốc từ phân, nhưng sự hiện diện của chúng với một số lượng nhỏ trong thực phẩm không có nghĩa là thực phẩm đó bị nhiễm phân. Sự hiện diện của vi sinh vật trong thực phẩm, nước uống là dấu hiệu chỉ thị sự kém chất lượng về mặt vệ sinh.

Khi xâm nhiễm một liều lượng lớn vào trong cơ thể người và động vật, *E.coli* là loài phổ biến nhất gây viêm nhiễm đường tiêu, thỉnh thoảng có thể tìm thấy chúng gây lở loét và tạo mủ, nhiễm trùng máu và có thể tìm thấy vi sinh vật này gây viêm não.

Cho đến nay người các nhà khoa học đã tìm được ít nhất 4 loài gây bệnh đường ruột cho người. Theo phân loại của Gorbach chúng được chia thành: enterobathogenic (EPEC); enterotoxigenic (ETEC), enteroinvasive (EIEC), và verotoxigenic (ETEC).

2. Dụng cụ và thiết bị

2.1. Dụng cụ

- Hộp petri
- Pipet
- Bình tam giác
- Ống nghiệm

2.2. Thiết bị

- Tủ ẩm
- Tủ sấy
- Nồi hấp thanh trùng
- Máy pH kế
- Lò vi sóng

3. Môi trường và vật liệu phân tích

3.1. Môi trường

Tryptone soya agar (TSA) (chuẩn bị tương tự phần coliform)

Violet red bile agar (VRB) (chuẩn bị tương tự phần coliform)

Escherichia coli broth (EC broth): được phân phối trong các nghiệm, mỗi ống chứa 10ml, cho vào bên trong ống durham ngược, hấp khử trùng bằng nồi hấp và làm nguội từ từ để không còn các bọt khí trong ống durham. Bảo quản các ống môi trường ở nhiệt độ 2-8°C cho đến khi sử dụng.

Lactose tryptone lauryl sulphate broth (LST Broth): (Chuẩn bị tương tự như EC broth).

Tryptone broth (chuẩn bị tương tự phần coliform)

Thuốc thử Kovac's

MR-VP broth: phân phối vào trong các ống nghiệm, mỗi ống 5ml. Hấp khử trùng bằng nồi hấp. Bảo quản 2-8°C cho đến khi sử dụng.

Simmon citrate: được chuẩn bị như là các môi trường thạch nghiêng trong các ống nghiệm. Môi trường sau khi pha chế có màu xanh lục.

3.2. Vật liệu phân tích

- Các sản phẩm thực phẩm dùng cho người, đặc biệt là các sản phẩm thủy sản đông lạnh

4. Pha chế môi trường

4.1. Pha chế môi trường LSB

- Tryptose 20g
- Lactose 5g
- Sodium chloride 5g
- KH_2PO_4 2,75g
- K_2HPO_4 2,75g
- Lauryl sulphate 0,1g
- Nước cất 1 lít
- Hấp 121°C trong 15 phút, pH 6,8

4.2. Pha chế môi trường EC

- Tryptose 20g
- Lactose 5g
- Muối mật 1,5g
- KH_2PO_4 1,5g
- K_2HPO_4 4g
- NaCl 5g
- Nước cất 1 lít

Rót môi trường trong ống nghiệm có chứa ống Durham. Hấp 121°C trong 15 phút, pH 6,9

4.3. Pha chế dung dịch đệm

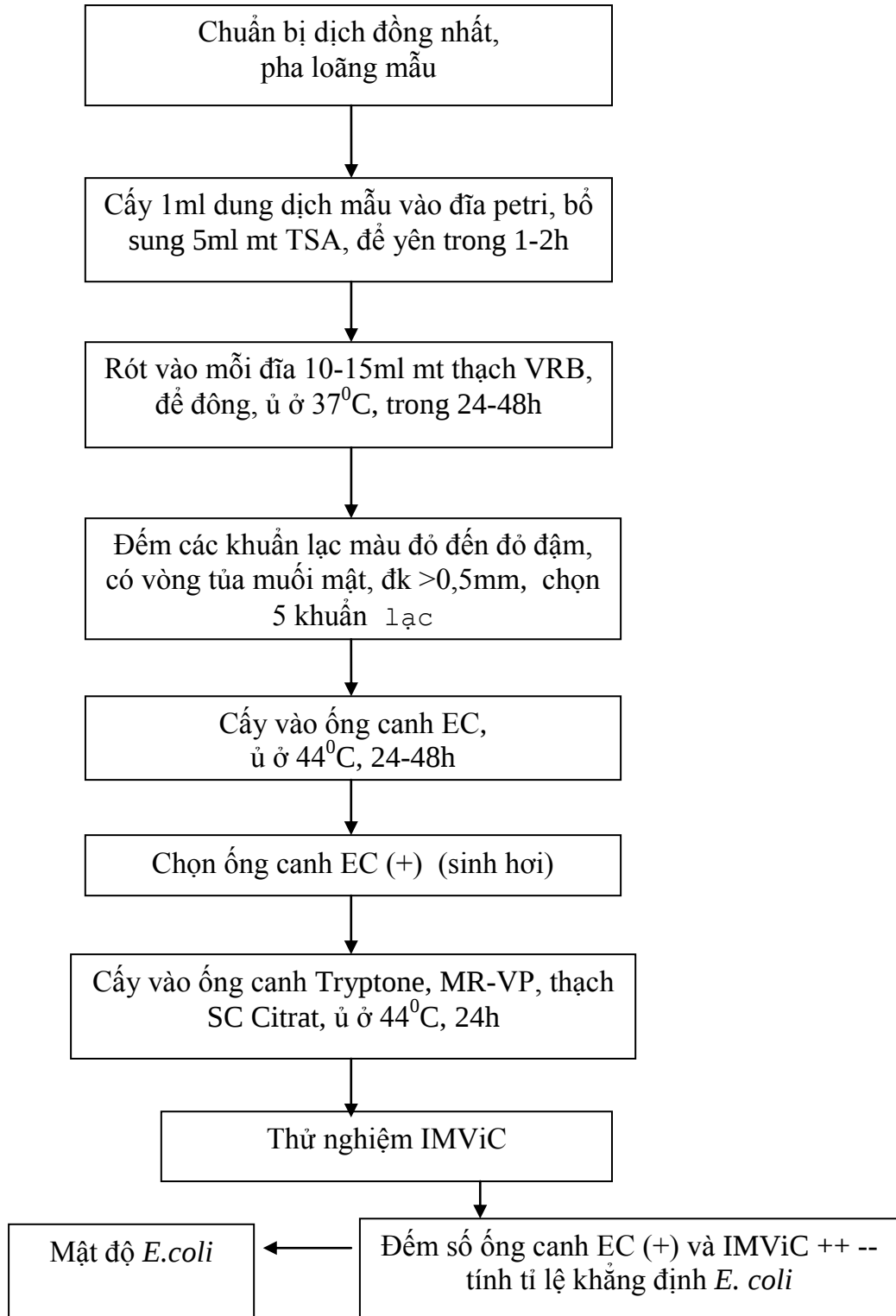
Cân các thành phần có trong nước muối peptone, theo công thức sau:

- NaCl: 8,5g

- Peptone: 1,0g
- Nước cất: 1000ml

Cho vào cốc thủy tinh 1000ml, hòa tan và đun sôi trong lò vi sóng

5. Qui trình phân tích



5.1. Xử lý mẫu

Tương tự như phần chuẩn bị mẫu cho kiểm nghiệm coliform và coliform phân.

5.2. Tăng sinh mẫu

Cấy 1ml dịch mẫu nồng độ 10^{-1} vào ống nghiệm chứa 5ml môi trường tăng sinh (BGBL), ủ 44°C trong 24h.

5.3. Cấy phân lập

Sau 24h, cấy dịch mẫu từ ống nghiệm có phản ứng dương tính (môi trường chuyển sang đục và sinh hơi) sang môi trường EMB.

5.4. Nuôi mẫu

Nuôi ở nhiệt độ 37°C , 24h.

5.5. Thử nghiệm khẳng định *E. coli*

Đối với mỗi dạng khuẩn lạc, chọn 5 khuẩn lạc nghi ngờ cấy chuyển sang canh thang EC. Ủ ở $44 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 24 giờ, kết quả dương tính khi vi sinh vật có khả năng sinh sinh hơi trong môi trường, được biểu hiện bằng bọt khí được giữ lại trong các ống Durham hay đọng lại trên bề mặt môi trường.

Chọn các ống canh thang EC có sinh hơi để cấy chuyển sang các môi trường sau: canh thang Tryptone, canh thang MRVP, simmoncitrate. Ủ các môi trường trên ở $44 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ trong khoảng 24 giờ. Thử phản ứng indol, methylred; vogesproskauer, citrate (xem phần thử nghiệm các phản ứng sinh hoá). Tỷ lệ xác nhận số lượng khuẩn lạc thử nghiệm cho kết quả đúng là *E.coli* bằng tỷ số giữa số lượng khuẩn lạc xác nhận ban đầu và số lượng khuẩn lạc cho kết quả là *E.coli*.

5.6. Tính kết quả

Chọn các đĩa có từ 10 - 100 khuẩn lạc. Đối với những đĩa có số khuẩn lạc nhiều thì kích thước các khuẩn lạc thường nhỏ và không rõ. Đếm những khuẩn lạc màu đỏ đến đỏ sậm và có đường kính lớn hơn 0.5 mm, xung quanh có vùng tủa của muối mật.

Số lượng *E.coli* được tính như sau:

$$\text{Số CFU } E.coli = \frac{N}{n \times V \times f} \times R$$

Trong đó: N: số lượng khuẩn lạc coliform đã đếm
V: thể tích mẫu cấy vào đĩa
n: số lượng đĩa cấy cho một mẫu
f: độ pha loãng của mẫu
R: tỷ lệ xác nhận của *E.coli*

Có thể tính số lượng *E.coli* giả định bằng cách tính tỷ lệ số lượng khuẩn lạc cho phản ứng indol dương tính, công thức tính tương tự như trên.

Kết quả *E.coli* được thể hiện bằng số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc *E.coli* trong một gram hay mililitre mẫu.

Ngoài phương pháp nuôi cấy theo qui trình như trên, *E.coli* còn được định lượng bằng phương pháp màng lọc nuôi cấy trên các môi trường chuyên biệt hay phương pháp MPN. Đến nay có những phương pháp màng lọc có thể phân biệt được số lượng *E.coli* trong tổng số coliform. Các phương pháp miễn dịch học hay sinh học phân tử có thể phân biệt các loài *E.coli* gây bệnh với các loài không gây bệnh

khác.

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Trình bày và mô tả được quy trình phân tích *E. coli* trong mẫu thực phẩm.

Bài 9. PHÂN TÍCH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Mục tiêu:

- Trình bày được quy trình phân tích tổng số *Staphylococcus aureus* trong thực phẩm;
- Pha chế được các loại môi trường và dung dịch đệm sử dụng trong phân tích tổng số *Staphylococcus aureus* đúng nồng độ yêu cầu;
- Thao tác thành thạo xử lý mẫu, pha loãng, cấy mẫu, tăng sinh mẫu và thử nghiệm khẳng định *Staphylococcus aureus* theo đúng quy trình và an toàn;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác;
- Tuân thủ nội qui của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

A. NỘI DUNG

1. Sơ lược về chỉ tiêu

Staphylococcus aureus là vi khuẩn hiếu khí hay kỵ khí tùy nghi, có hình cầu, gram dương, có phản ứng đông huyết tương dương tính do chúng tiết ra enzyme coagulase. Ngoài ra còn các đặc điểm như có phản ứng Dnase, phosphatase dương tính, có khả năng lên men và sinh acid từ mannitol, trehalose, sucrose. Tất cả các dòng *S. aureus* đều nhạy với novobiocine, có khả năng phát triển trong môi trường chứa đến 15% muối NaCl.

Một số dòng *S. aureus* có khả năng gây tan máu trên môi trường thạch máu, vòng tan máu phụ thuộc vào từng chủng nhưng chúng đều có vòng tan máu hẹp so với đường kính của khuẩn lạc. Hầu hết các vi sinh vật này đều sản sinh sắc tố vàng. Nhưng các sắc tố này ít thấy khi quá trình nuôi cấy còn non, sắc tố này thường thấy rõ sau 1-2 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ phòng. Sắc tố được tạo ra nhiều hơn khi trong môi trường có hiện diện của lactose hay các nguồn carbohydrate khác mà vi sinh vật này có thể bẻ gãy và sử dụng chúng

Hầu hết các dòng thuộc loài này có thể tổng hợp enterotoxin. Ngoài ra các loài *S. intermedius*, và *S. hyicus* cũng có thể tạo enterotoxin, nhưng hai loài này có phản ứng coagulase âm tính. Độc tố được sản sinh chỉ khi vi sinh vật phát triển trong môi trường có nhiệt độ trên 15°C, độc tố được sản sinh nhiều nhất khi chúng phát triển trong nhiệt độ 35-37°C.

S. aureus phân bố khắp nơi, nhưng chủ yếu phân lập được từ da, màng nhầy của người và động vật máu nóng. Trong thực phẩm vi sinh vật được nhiễm vào chủ yếu qua con đường chế biến có các công đoạn tiếp xúc trực tiếp với người. Nếu có sự hiện diện với mật độ cao của vi sinh vật này trong thực phẩm cho thấy điều kiện vệ sinh của quá trình chế biến kém, kiểm soát nhiệt độ trong các công đoạn chế biến không tốt.

2. Dụng cụ và thiết bị

2.1. Dụng cụ

- Hộp petri
- Pipet
- Bình tam giác
- Ống nghiệm

2.2. Thiết bị

- Tủ ấm

- Tủ sấy
- Nồi hấp thanh trùng
- Máy pH kế
- Lò vi sóng

3. Môi trường và vật liệu phân tích

3.1. Môi trường

- Môi trường canh Mannitol Salt Broth (MSB): môi trường này được dùng để phân tích định tính *S.aureus* hay trong định lượng bằng phương pháp MPN

- Môi trường thạch máu: máu được sử dụng là máu cừu hay bê non dưới 5 tháng tuổi đã được loại bỏ các sợi máu hay máu đã được bổ sung chất chống đông citrate. Môi trường cần được pha chế ít nhất 2 ngày trước khi sử dụng để kiểm tra khả năng bị nhiễm.

- Môi trường thạch Baird Parker Agar (BPA): thành phần lòng đỏ trứng tươi và potassium tellurite chỉ được bổ sung vào môi trường sau khi khử trùng và làm nguội đến khoảng 60°C.

- Môi trường thạch Tellurite Glycine Agar

- Môi trường Brain Heart Infusion (BHI)

- Huyết tương thỏ: huyết tương thỏ được cố định với 0.1% EDTA hay cố định trong sodium oxalate. Phân phối vào trong các ống nghiệm nhỏ, mỗi ống 0,3 ml. Có thể thử phản ứng này trên lam kính.

3.2. Vật liệu phân tích

- Các sản phẩm thực phẩm dùng cho người.

4. Pha chế môi trường

4.1. Pha chế môi trường Mannitol Salt Broth (MSB)

- Cao thịt 1g
- Polypeptone 10g
- NaCl 75g
- Mannitol 10g
- Phenol red 0,025g
- Agar 15g
- Nước cất 1lit

Đun sôi và lắc để hòa tan agar, hấp 121°C trong 15 phút, pH cuối 7,4

4.2. Pha chế môi trường BPA

- Tryptone 10g
- Cao thịt 5g
- Cao nấm men 1g
- Sodium pyruvate 10g
- Glycine 12g
- Lithium chloride.6H₂O 5g
- Agar 20g

Hấp ở 121°C trong 15 phút, pH cuối 7,0. Giữ môi trường rắn ở 4°C, làm nóng chảy và bổ sung Bacto EY tellurite enrichment. Nếu muốn sử dụng ngay, giữ môi trường nóng

chảy ở 49-50°C trước khi thêm Bacto EY tellurite enrichment.

4.3. Pha chế dung dịch đậm

Cân các thành phần có trong nước muối peptone, theo công thức sau:

- NaCl: 8,5g
- Peptone: 1,0g
- Nước cất: 1000ml

Cho vào cốc thủy tinh 1000ml, hòa tan và đun sôi trong lò vi sóng

5. Quy trình phân tích

5.1. Xử lý và pha loãng mẫu

Cân $10 \pm 0,1$ gram mẫu trong túi vô trùng, thêm 90 ml dung dịch pha loãng, đồng nhất bằng máy đập mẫu khoảng 30 giây. Chuẩn bị dãy pha loãng thích hợp tùy theo mức nhiễm của từng loại mẫu sao cho khi cấy một thể tích xác định lên đĩa BP sau khi ủ có khoảng <100 khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa.

5.2. Cấy mẫu

Cấy 0,1ml mẫu nguyên hoặc đã pha loãng vào đĩa môi trường Baird Parker Agar, nếu mật độ *S.aureus* trong mẫu thấp có thể cấy 1ml dung dịch pha loãng phân phối vào 3 đĩa môi trường BP, dùng que cấy tam giác trang đều trên bề mặt cho đến khi khô mặt. Thực hiện tương tự như trên với môi trường thạch máu.

5.3. Nuôi mẫu

Lật ngược đĩa, ủ ở $37 \pm 1.0^\circ\text{C}$ trong thời gian 24-48 giờ đối với môi trường Baird Parker, 24 giờ với môi trường thạch máu.

5.5. Thử nghiệm khẳng định

Trên môi trường BP: Cấy 5 khuẩn lạc đặc trưng và 5 khuẩn lạc không đặc trưng từ môi trường Baird Parker vào môi trường TSA. Ủ ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 24 giờ. Cấy vi khuẩn từ môi trường TSA vào các ống nghiệm chứa huyết tương đã đã đông, ủ ở $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Theo dõi kết quả phản ứng đông huyết tương sau các khoảng thời gian 2, 4, 6, 8 và 24 giờ. Tính tỉ lệ khẳng định trên các khuẩn lạc đặc trưng và không đặc trưng.

Thực hiện tương tự với các khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường thạch máu.

5.6. Tính kết quả

Sau 24 giờ, trên môi trường Baird Parker Agar, khuẩn lạc *Staphylococcus aureus* có đường kính khoảng 0.5 - 1mm, lõi, đen bóng có vòng sáng rộng khoảng 1 - 2 mm bao quanh. Đánh dấu trên mặt đáy của đĩa các khuẩn lạc có đặc điểm như trên và tiếp tục ủ đến 48 giờ. Sau 48 giờ khuẩn lạc *S. aureus* có đường kính khoảng 1 - 1.5 mm, màu đen bóng, lõi, có vòng trắng đục hẹp và vòng sáng rộng khoảng 2 - 4 mm bao quanh. Có một số dòng *S. aureus* cho khuẩn lạc không đặc trưng (không tạo các vòng quanh khuẩn lạc như miêu tả trên). Cần đếm và đánh dấu cả hai dạng khuẩn lạc.

Trên môi trường thạch máu sau 24 giờ ủ *S. aureus* cho khuẩn lạc bóng loáng, đục, lõi có màu xám hay vàng nhạt. Đường kính khuẩn lạc khoảng 1-2 mm. Hầu hết *S.aureus* có vùng tan huyết, tuy nhiên một số dòng có không có vùng tan huyết này.

- Dương tính: Có khối đông huyết tương hình thành. Mọi mức độ đông kết đều được coi là dương tính.

- Âm tính: Không có khối đông, hỗn dịch vẫn đồng nhất như ống không cấy.

Ngoài *S. aureus*, chỉ có *S. intermedius* và một số ít *S. hyicus* cho phản ứng đông huyết tương dương tính. Không giống như *S. aureus* và *S. intermedius*, đa số loài *S. hyicus* subsp *hyius* cho phản ứng dương tính chậm và yếu. *S. intermedius* và *S. hyius* subsp *hyius* có phản ứng dương tính nhưng có khuẩn lạc nhỏ không đặc trưng trên môi trường Baird Parker Agar, không có vòng tan máu và không sinh sắc tố trên môi trường thạch máu.

Số lượng *S.aureus* trong mẫu được tính như sau:

$$\text{Số } S. aureus \text{ [CFU/g(ml)]} = \frac{10}{F_1 + F_2} (N_t \times H_t + N_a \times H_a)$$

Trong đó: F: độ pha loãng

N_t : tổng số khuẩn lạc đặc trưng

N_a : tổng số khuẩn lạc không đặc trưng

Số khuẩn lạc đặc trưng cho kết quả ĐHT dương tính

$$H_t = \frac{\text{Số khuẩn lạc đặc trưng cho kết quả ĐHT dương tính}}{\text{Số khuẩn lạc đặc trưng}}$$

Số khuẩn lạc không đặc trưng cho kết quả dương tính

$$H_a = \frac{\text{Số khuẩn lạc không đặc trưng cho kết quả dương tính}}{\text{Số khuẩn lạc không đặc trưng}}$$

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Trình bày các bước phân tích *Staphylococcus aureus*.

Bài 10. PHƯƠNG PHÁP KHÔNG TRUYỀN THÔNG

Phát hiện vi sinh vật bằng phương pháp nuôi cấy được xây dựng và phát triển trong thời gian dài, được nhiều nước công nhận và chúng đã trở thành những phương pháp tiêu chuẩn. Tuy vậy nhược điểm lớn nhất của phương pháp nuôi cấy là tốn nhiều thời gian, cho kết quả chậm, mất nhiều công sức, cồng kềnh và ngày càng tỏ ra không đáp ứng được các yêu cầu phân tích phục vụ nhu cầu thực tế hiện nay. Để khắc phục những nhược điểm trên của phương pháp nuôi cấy, nhiều phương pháp nhanh và tự động đã được hình thành và phát triển dựa trên nhiều nguyên tắc sinh học và vi sinh vật học khác nhau. Các phương pháp mới này nhằm mục đích rút ngắn thời gian phân tích, giảm thiểu sự phức tạp trong thao tác, dễ dàng thực hiện và có độ nhạy và độ chính xác cao.

Các phương pháp nhanh và tự động hoá trong phân tích vi sinh vật thực phẩm đều dựa trên nguyên tắc của vi sinh học, sinh hoá học, hoá lý, miễn dịch học, sinh học phân tử học để phát hiện và định lượng vi sinh vật mục tiêu hay sản phẩm độc hại của chúng trong thực phẩm, môi trường. Tất cả các yêu cầu kỹ thuật liên quan đến việc thu và chuẩn bị mẫu, phân tích ... đều được nghiên cứu cải tiến theo hướng tự động hoá, đơn giản hoá cho kết quả nhanh và chính xác.

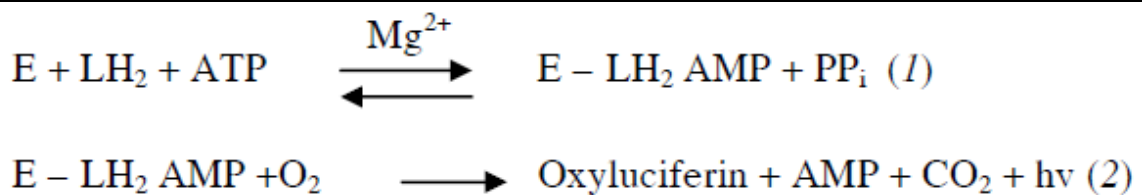
1. Phương pháp phát quang sinh học ATP

Phân tử Adenosine triphosphate (ATP) có mặt trong tất cả các tế bào sống, nên sự phát hiện ATP là dấu hiệu để nhận biết vật chất sống đang tồn tại. ATP có thể được phát hiện và định lượng thông qua cường độ ánh sáng phát ra do sự kết hợp với enzyme Luciferase. Kỹ thuật này có thể phát hiện được 1pg ATP, tương ứng với khoảng 1000 tế bào vi khuẩn (10-15g ATP/ tế bào). Quá trình phân tích chỉ diễn ra trong vài phút và vì thế phương pháp này được xem là nhanh hơn và thuận lợi hơn so với phương pháp đếm khuẩn lạc.

Việc dùng phương pháp đo hàm lượng ATP để xác định rõ số vi sinh vật đang hiện diện đã được biết đến vào năm 1960. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi nhiều sự cải tiến trong việc thiết kế thiết bị đo cường độ ánh sáng phát ra và những hóa chất để ổn định sự phát sáng.

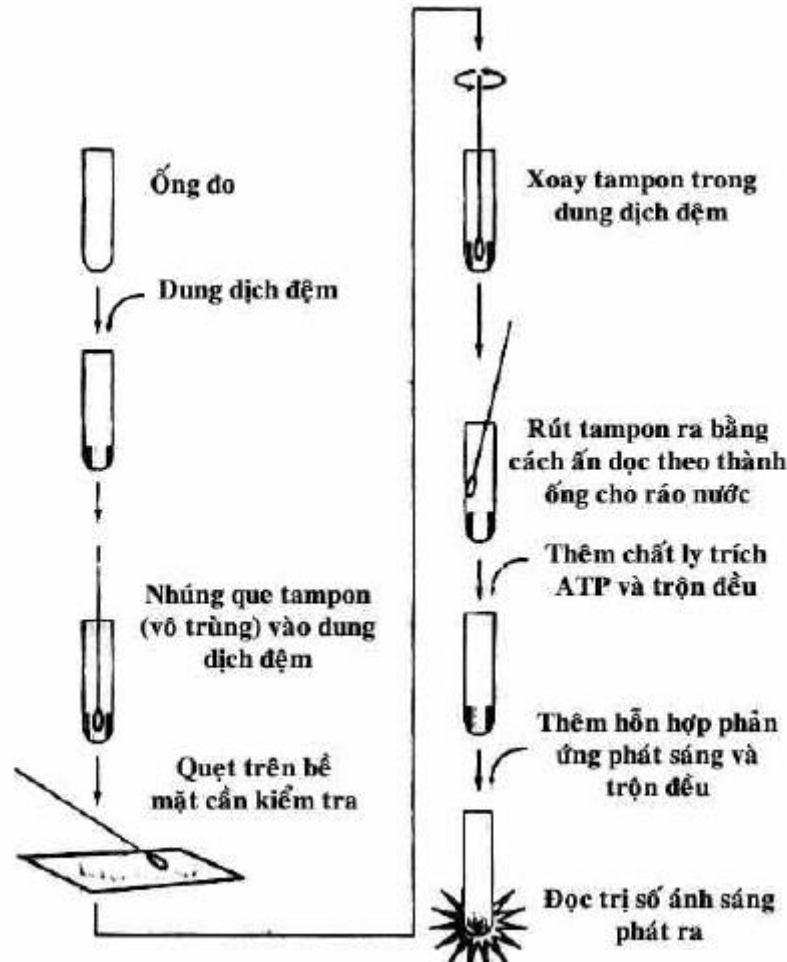
Ngày nay phương pháp này được ứng dụng trong 3 lĩnh vực: giám sát vệ sinh, kiểm tra những loại chất lỏng như nước rửa làm sạch hệ thống, đánh giá chất lượng vi sinh của thực phẩm. Để đánh giá chất lượng vi sinh của thực phẩm thì lượng ATP của vi sinh vật phải được đo và điều này đòi hỏi những quy trình tách chiết ATP ra khỏi tế bào vi sinh vật.

Phản ứng phát sáng sinh học trải qua hai giai đoạn :



Ánh sáng phát ra có bước sóng 562nm, có màu vàng.

Mẫu được lấy bằng cách quét những vi sinh vật ở trên bề mặt dụng cụ và thiết bị, sau đó đo lượng ATP thông qua một loạt quá trình ly trích. Những thiết bị được chế tạo đầu tiên đòi hỏi người thực hiện quét mẫu trên một vị trí (thường là 10cm²), sau đó nhúng hoàn toàn que quét mẫu vào trong dung dịch chứa những tác nhân làm phóng thích ATP, trộn với dung dịch luciferase – luciferin và đặt vào trong một cuvette để đọc trị số ánh sáng.



Hình 10.1. Sơ đồ các bước định lượng nhanh vi sinh vật hiện diện trên bề mặt bằng phản ứng phát sáng

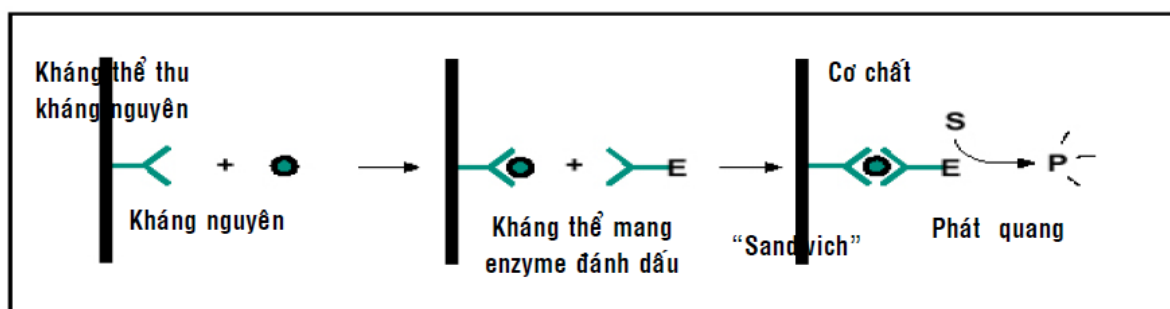
2. Phương pháp ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Những tiến bộ của khoa học trong những năm gần đây đã thúc đẩy sự phát triển của các kỹ thuật chẩn đoán bằng huyết thanh. Các phương pháp này tỏ ra rất hiệu quả trong việc chẩn đoán nhanh và chính xác các vi sinh vật gây bệnh. Ngày nay phương pháp này còn được phát triển để xác định các chất độc hại trong môi trường như độc tố, dư lượng kháng sinh... Nguyên tắc của phương pháp ELISA dựa trên phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên với một kháng thể đặc hiệu. Phản ứng miễn dịch xảy ra được phát hiện bằng cách sử dụng những kháng thể đã được đánh dấu (bằng chất nhuộm phát huỳnh quang, đồng vị phóng xạ, hay enzyme).

Phương pháp ELISA là phương pháp hấp phụ miễn dịch liên kết enzyme

(enzyme-linked immunosorbent assay). Nguyên tắc kỹ thuật ELISA là sử dụng kháng thể đơn dòng (kháng thể sơ cấp) phủ bên ngoài những giếng (well) nhỏ nhằm mục đích thu giữ những kháng nguyên mục tiêu. Những kháng nguyên thu giữ được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ hai có gắn với enzyme phát tính hiệu (thường là horseradish peroxidase hay alkaline phosphatase).

Khi cho vào hỗn hợp phản ứng một cơ chất đặc hiệu của enzyme, phản ứng xảy ra và tạo ra các sản phẩm làm đổi màu phản ứng. Như vậy, chúng ta có thể phát hiện được sự hiện diện của kháng nguyên.



Hình 10.2. Nguyên tắc phản ứng ELISA - S: cơ chất, E: enzyme, P: phát quang

Qui trình thực hiện phân tích bằng ELISA có các chính như sau: đặc mẫu vào trong các giếng có chứa kháng thể sơ cấp, cho kháng thể thứ cấp có liên kết với enzyme tạo màu vào để tạo sandwich, rửa để loại bỏ các kháng thể mang enzyme không tham gia phản ứng, cho cơ chất tạo màu với enzyme liên kết quả hỗn hợp, đo cường độ màu tạo thành để xác định lượng kháng nguyên trong mẫu.

Hiện nay ELISA đã được sử dụng rộng rãi để phân tích *Salmonella*, *E. coli* gây bệnh, *Listeria*, độc tố *Staphylococcus*, thuốc trừ sâu, dư lượng kháng sinh... đối với vi sinh vật, phương pháp ELISA có thể sử dụng phát hiện và định lượng vi sinh trong thực phẩm sau vài giờ tăng sinh nhằm tăng độ nhạy của phương pháp.

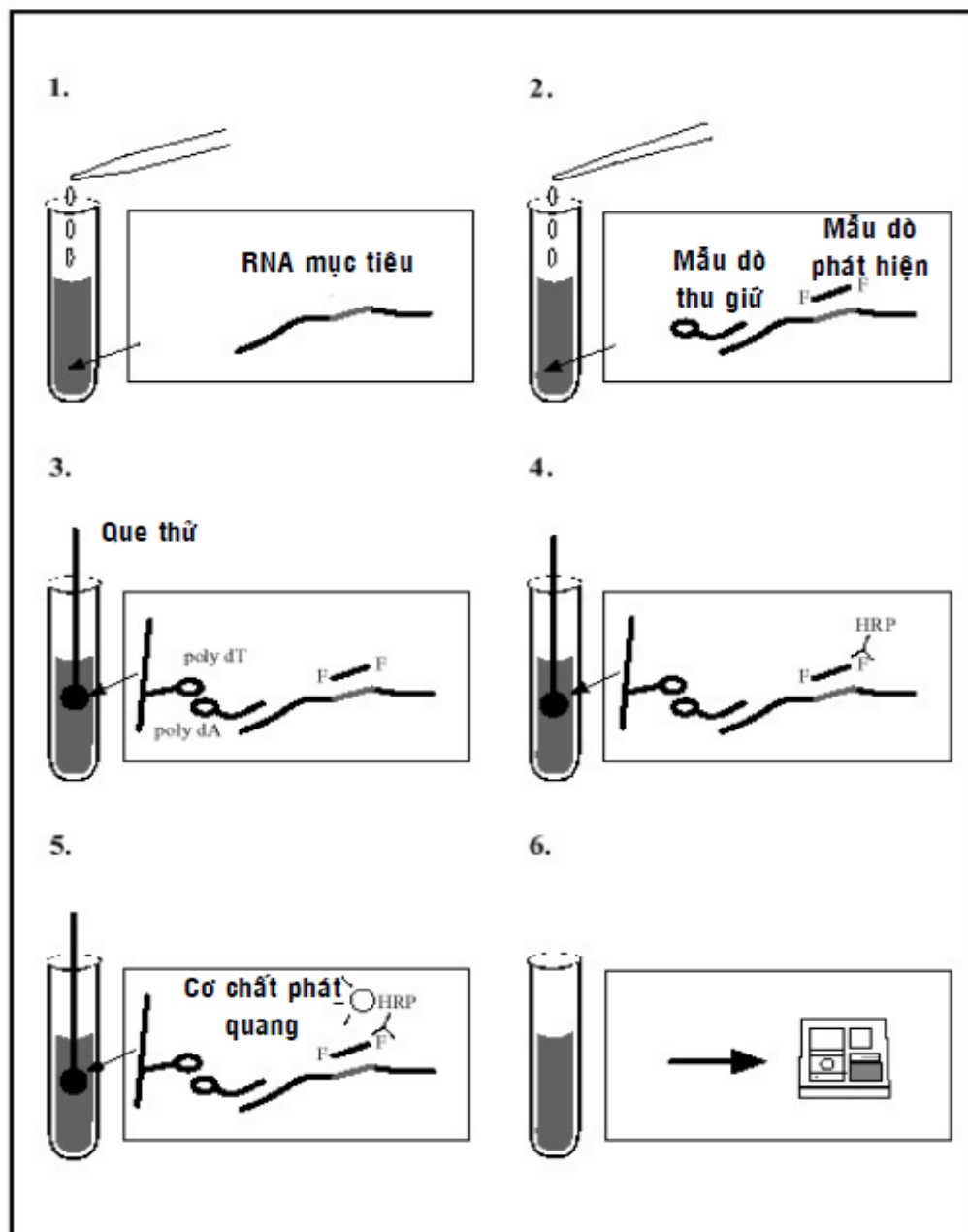
3. Phương pháp mẫu dò (Gene probes)

Vào những năm 1980, có nhiều nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học vào lĩnh vực thực phẩm, đặc biệt là trong chẩn đoán vi sinh. Phương pháp sử dụng mẫu dò (probe) trong việc phát hiện vi sinh vật trong thực phẩm thông qua sự phát hiện một trình tự DNA đặc trưng. Các mẫu dò thường sử dụng RNA ribosome (rRNA) làm mục tiêu, do trong cơ thể số lượng bản sao rRNA lớn, đủ để làm tăng độ nhạy của phương pháp phân tích. Nguyên tắc của phương pháp mẫu dò là lai phân tử, đó là bắt cặp giữa hai trình tự DNA tương đồng. Một trong hai trình tự (thường là trình tự đích, tức là trình tự DNA của tế bào vi sinh vật) được cố định trên một giá thể rắn hoặc trên tế bào hay mô. Sự lai phân tử xảy ra khi các trình tự bổ sung gặp nhau do chuyển động nhiệt và khi nhiệt độ môi trường thấp hơn T_m ít nhất vài độ. Sự lai phân tử còn có thể xảy ra giữa DNA và RNA. Quá trình lai phân tử chịu ảnh hưởng rất nhiều bởi các yếu tố: nồng độ DNA trong môi trường, nhiệt độ và thời gian phản ứng, kích thước các trình tự lai và lực ion của môi trường.

Một ví dụ về hệ thống phát hiện bằng mẫu dò là thống Gentrak (Framingham, USA). Phương pháp phân tích này sử dụng mẫu dò để phát hiện *Listeria* trong mẫu bơ sữa và mẫu môi trường. Mẫu dò là những đoạn oligomer DNA đánh dấu bằng hoá chất

phát quang. Quy trình phân tích có thể được chia thành 6 bước:

1. Phá vỡ tế bào thu nhận rRNA
2. Mẫu dò DNA thu giữ có đuôi deoxyadenylic nucleotide (dA) và mẫu dò phát hiện (reporter probe) chứa fluorescein isothiocyanate (F) ở đầu 5' và 3' của phân tử
3. Que thử được bao bọc bởi polydeoxythymidine (dT) được đặt vào với mục đích gắn những mẫu dò với với que thử
4. Que thử được đặt vào ống chứa enzyme liên kết với mẫu dò phát hiện
5. Sau khi rửa loại phần enzyme thừa, que thử được đặt vào ống chứa cơ chất tạo màu
6. Sau khi ủ để hiện màu, màu được phát hiện ở bước sóng 450 nm.



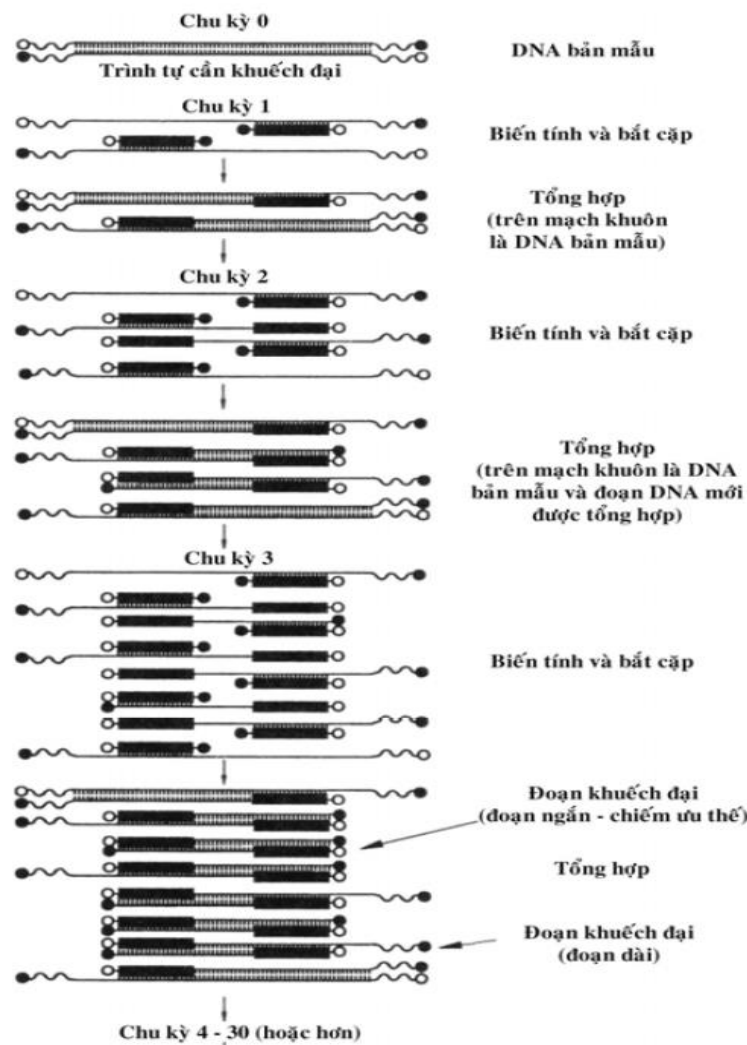
Hình 10.3. Sơ đồ quy trình phát hiện *Listeria* với mẫu dò phát quang

4. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

Tất cả các DNA polymerase đều cần những môi chuyên biệt để tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch khuôn. Mạch khuôn thường là những trình tự DNA của gen quy đặc trưng cho loài vi sinh vật mục tiêu hoặc các gen quy định việc tổng hợp một loại độc tố chuyên biệt.

Môi là những đoạn DNA ngắn, có khả năng bắt cặp bổ sung với một đầu của mạch khuôn và nhờ hoạt động của DNA polymerase đoạn môi này được nối dài để hình thành mạch mới. Khi cung cấp hai môi chuyên biệt bắt cặp bổ sung với hai đầu của một trình tự DNA, với điều kiện DNA polymerase hoạt động trong phản ứng PCR, một đoạn DNA nằm giữa hai môi sẽ được tạo nên. Như vậy, để khuếch đại một trình tự DNA xác định, ta phải có những thông tin tối thiểu về trình tự đó đủ để tạo các môi bổ sung chuyên biệt. Các môi này gồm một môi xuôi (sensprimer) và một môi ngược (antisens primer) so với chiều phiên mã của gen.

Phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ nối tiếp nhau. Mỗi chu kỳ gồm ba bước: biến tính (denaturation), lai (anealation), tổng hợp (elongation). Phân tích sản phẩm khuếch đại bằng sự điện di trên gel agarose. Đặc trưng của phản ứng khuếch đại đối với từng vi sinh vật mục tiêu thông qua kích thước của sản phẩm khuếch đại.



Hình 10.4. Sơ đồ phản ứng PCR

Ưu điểm của phương pháp PCR:

- Thời gian cho kết quả nhanh
- Có thể nhận diện những vi sinh vật khó nuôi cấy. Việc nuôi cấy tăng sinh là đơn giản hơn và có khi không cần thiết.
- Hóa chất cần cho phản ứng PCR sẵn có hơn và dễ tồn trữ hơn so với trường hợp huyết thanh học. Không cần dụng cụ và môi trường chẩn đoán phức tạp, có thể thực hiện ở hiện trường.
- Ít tốn kém về mặt nhân sự. Có thể được tự động hóa để làm giảm chi phí phát hiện các vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm.

Mặc dù vậy phương pháp PCR vẫn còn một số khuyết điểm cần khắc phục:

- Sự ức chế hoạt tính của *Taq* DNA polymerase bởi thành phần của mẫu vật. Mẫu thực phẩm thường có những thành phần phức tạp. Việc chiết tách và tinh chế DNA từ thực phẩm hay môi trường trước khi thực hiện phương pháp PCR cho phép loại bỏ những hợp chất ức chế. Tuy nhiên, một vài quy trình phát hiện vi sinh vật gây bệnh thực phẩm bằng PCR không cần tách chiết, tinh chế DNA.

- Mật độ vi sinh vật gây bệnh hiện diện trong mẫu thực phẩm thường thấp, nên trong đa số trường hợp cần có bước nuôi cấy làm giàu để có được mật độ đủ để phát hiện bằng PCR.

- Phương pháp này không phân biệt được tế bào sống với tế bào chết. Do vậy có thể dẫn đến trường hợp dương tính giả do DNA từ tế bào chết. Ngược lại phương pháp này cho phép phát hiện bào tử, dạng tiềm sinh, hay tế bào đã chết của các vi sinh vật gây bệnh hoặc gây ngộ độc.

5. Một số phương pháp thử nhanh khác

5.1. Kỹ thuật phân tách và tăng mật độ

Trong quá trình đồng nhất mẫu, mẫu thường được pha loãng bậc 10 tạo một thể tích lớn nguyên liệu ban đầu (250ml). Nhưng có thể chỉ dùng vài mililite cho những bước tiếp theo trong quy trình phát hiện. Như vậy chúng ta có thể dùng bước tăng mật độ các vi sinh vật mục tiêu trong mẫu để rút ngắn thời gian và tăng hiệu quả phát hiện.

Một kỹ thuật phân tách được sử dụng rộng rãi là miễn dịch phân tách (Immunomagnetic separation - IMS). Với phương pháp này, giai đoạn phân lập có thể được rút ngắn bằng cách thay thế môi trường tăng sinh chọn lọc bằng quy trình tương tự không cần nuôi cấy. IMS sử dụng những hạt siêu thuận từ được bao bọc bên ngoài bởi những kháng thể của vi sinh vật mục tiêu. Các hạt này có chức năng phân tách chọn lọc vi sinh vật mục tiêu này ra khỏi một hỗn hợp quần thể. Các vi sinh vật mục tiêu này có thể được phát hiện bằng các quy trình vi sinh truyền thống. Tính siêu thuận từ của các hạt chỉ được thể hiện khi chịu sự tác động của một lực từ tính bên ngoài tác động.

Dynabeads® (Dynal A/S, Oslo, Norway) là một sản phẩm dựa trên kỹ thuật IMS. Quy trình này sử dụng những hạt polystyren siêu thuận từ có đường kính 2,8µm (Dynabeads® M- 280) và 4,5µm (Dynabeads® M-450). Cả hai loại M-280 và M-450 đều có thể được bao bọc bên ngoài bởi lớp kháng thể do người dùng lựa chọn. Một ví dụ về chất hấp thụ từ tính khác có thể được lựa chọn là BioMag (Metachem Diagnostics

Ltd, Northampton). Các hạt từ tính oxide sắt (đường kính 0.5 - 1.5 μ m) được bao phủ bên ngoài bởi các nhóm amino-, carboxy- hoặc thiol-. Ngoài ra một số hệ thống khác còn có khả năng tạo từ tính cho các tế bào vi sinh vật bằng cách cho chúng hấp thu trực tiếp những hạt siêu hiển vi oxide sắt mang từ tính lên bề mặt tế bào (Safarik và cộng sự, 1995).

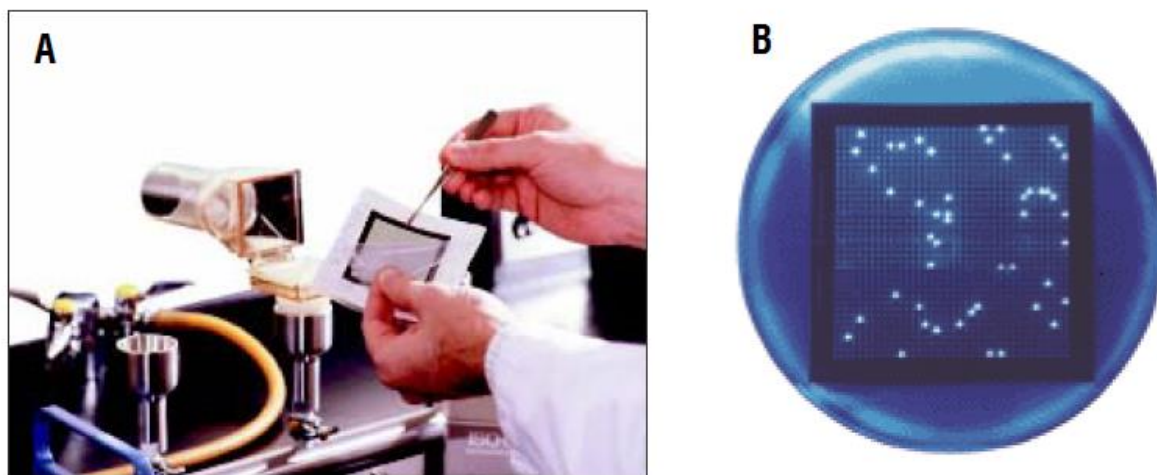
5.2. Kỹ thuật màng lọc phát huỳnh quang trực tiếp (Direct Epifluorescent Technique – DEFT) và màng lọc lưới kỵ nước (Hydrophobic Grid Membrane)

Cơ sở của việc sử dụng phương pháp màng lọc là thu nhận tế bào từ một lượng lớn thể tích được lọc. Sau đó có thể kiểm tra bằng kính hiển vi hoặc bằng cách đếm khuẩn lạc. Phương pháp này thích hợp đối với mẫu có mật độ tế bào thấp.

Màng lọc có thể được làm bằng nitrocellulose, cellulose acetate ester, nylon, polyvinyl chloride và polyester (Sharpe, 1994). Kích thước lỗ sử dụng là 0,45 μ m (hoặc 0,22 μ m) đường kính 13mm đến 150mm. Tạo lực đẩy qua lọc bằng hút chân không hoặc lực ép. Màng lọc được sử dụng như một biến thể của kỹ thuật truyền thống với nhiều mục đích: tăng mật độ vi sinh vật mục tiêu trong một thể tích lớn nhằm tận dụng giới hạn phát hiện; loại bỏ tác nhân ức chế sự tăng trưởng.

Độ nhạy của kỹ thuật phát huỳnh quang trực tiếp (DEFT) phụ thuộc vào mật độ tế bào trước khi nhuộm được lọc bởi màng lọc. Có thể phân biệt tế bào sống và tế bào chết bằng cách nhuộm nhân với fluorochrome acridine orange. Màu sắc phát quang trong tế bào thay đổi trong suốt các quá trình tăng trưởng. Thuốc nhuộm phát màu đỏ với RNA và màu xanh với DNA.

Thông thường thì tế bào sống cho màu đỏ da cam trong khi các tế bào chết cho màu cho màu xanh lục. Năm 1991, phương pháp ISO-GRID® ứng dụng trên đối tượng *Salmonella* đã được AOAC công nhận áp dụng cho mọi loại thực phẩm (Method 991.12).



Hình 10.5. Hệ thống ISO-GRID®

5.3. Kỹ thuật màng petri (Petrifilm)

Môi trường dinh dưỡng dạng đông khô được cố định vào các màng mỏng gọi là Petrifilm. Khi sử dụng, lớp màng bảo vệ bên trên được nâng lên và nhỏ vào một 1ml dịch mẫu rồi đặt lại. Một đĩa petri nhựa được đặt lên màng bảo vệ để tạo một khuôn tròn. Môi trường dinh dưỡng sẽ hỗ trợ cho sự phát triển của vi sinh vật trong thời gian

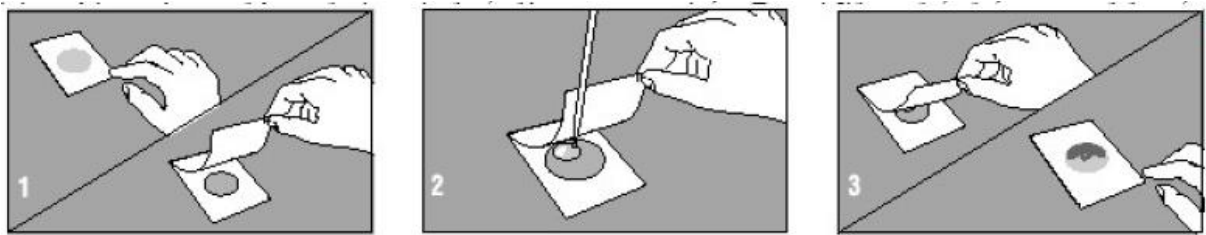
ủ. Có thể đếm trực tiếp số khuẩn lạc trên Petrifilm.

Petrifilm đã được dùng để kiểm tra tổng số vi sinh vật hiếu khí, số coliform, coliform phân, nấm mốc, nấm men. Ưu điểm của kỹ thuật Petrifilm là dễ thao tác, tiết kiệm không gian ủ và bảo quản. Thời hạn sử dụng lâu do dùng môi trường đông khô và không cần xử lý nhiệt như phương pháp thông thường. Có thể dùng nước cất vô trùng để làm ướt lại môi trường đông khô. Sau khi môi trường đông lại, có thể dùng trực tiếp Petrifilm để đếm tập khuẩn bề mặt.

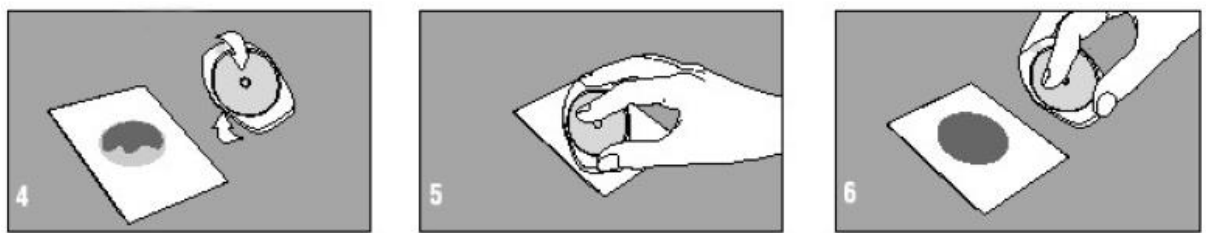
Đặt mẫu lên màng Petrifilm

Dàn đều mẫu trên màng

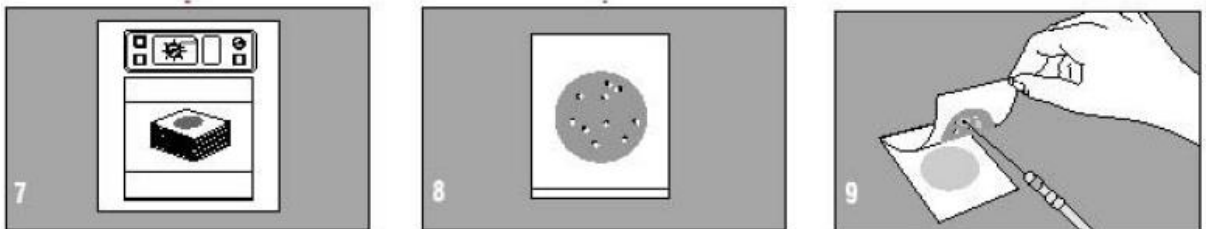
Ủ Petrifilm, đếm trực tiếp hoặc phân lập



Đặt mẫu lên màng Petrifilm



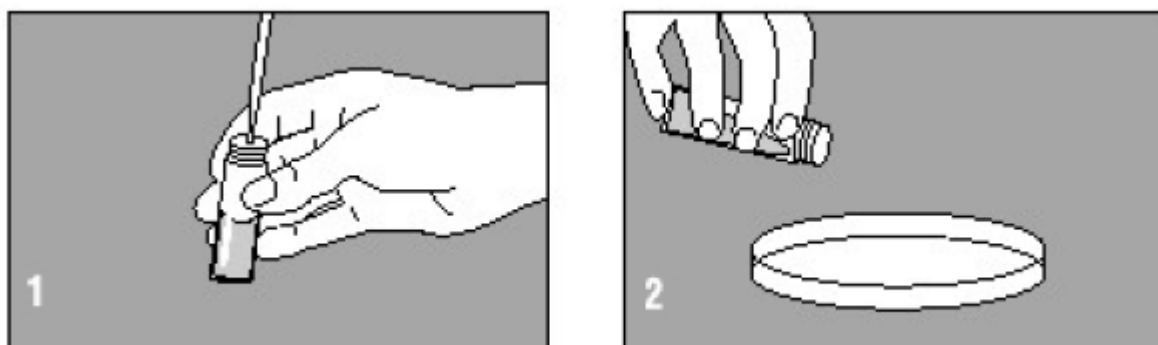
Dàn đều mẫu trên màng



Hình 10.6. Cách sử dụng hệ thống Petrifilm của 3M Microbiology

5.4. Kỹ thuật Redigel

Kỹ thuật này sử dụng các chất dinh dưỡng và pectin gel chứa trong một ống nghiệm. Có thể sử dụng ống nghiệm này bất cứ lúc nào mà không cần phải đun chảy thạch. Trước tiên nhỏ 1ml mẫu vào ống nghiệm, trộn đều. Sau đó đổ tất cả vào một đĩa petri đặc biệt đã được tráng sẵn một lớp calci. Khi chất lỏng tiếp xúc với calci, gel Capectate sẽ hình thành và phức chất này sẽ trương lên như môi trường thạch thông thường. Sau khi ủ ở chế độ thích hợp có thể đếm khuẩn lạc giống như phương pháp đếm đĩa thông thường.



Hình 10.7. Thao tác sử dụng hệ thống Redigen của 3M

5.3. Kỹ thuật trở kháng vi sinh vật (conductance / impedance)

Vi sinh trở kháng dùng để phát hiện trực tiếp vi sinh vật thông qua tính ion trong sản phẩm của quá trình trao đổi chất hoặc trực tiếp từ sự giải phóng CO₂ (carbon dioxide). Những mô tả chi tiết về kỹ thuật này được công bố trong báo cáo của Kell & Davey (1990) và Silley & Forsythe (1996).

Người ta sử dụng môi trường nuôi cấy chọn lọc làm dung dịch điện phân. Sự trao đổi chất của vi sinh vật tạo ra những sản phẩm mang tính ion trong môi trường nuôi cấy (acid hữu cơ và ion amonium) và vì vậy làm tăng tính dẫn điện của môi trường. Sự thay đổi về điện dẫn được ghi nhận bởi các thiết bị đo phản ánh sự hiện diện của vi sinh vật trong môi trường nuôi cấy.

Phương pháp này không thể áp dụng cho những môi trường có lực ion cao, như môi trường chọn lọc *Listeria* lỏng, vì trong môi trường này, ngay từ ban đầu, giá trị điện dẫn đã nằm ngoài giới hạn đo của thiết bị.

Kỹ thuật giám sát trực tiếp độ dẫn phức tạp hơn do liên quan đến cầu KOH (potassium hydroxide). KOH được cố định trong môi trường (agar) và tạo thành cầu nối dẫn điện giữa hai đầu điện cực. Cầu nối này và mẫu phân tích được ngăn cách với nhau bằng một khoảng không gian nhất định. Khi quá trình phát triển, vi sinh vật sinh ra CO₂ và khí này làm phân rã cầu nối KOH. Kết quả của hiện tượng này là làm giảm tính dẫn điện và sự thay đổi này có thể quan sát được bằng thiết bị giám sát. Thời gian tính dẫn thay đổi được gọi là thời gian phát hiện.

Thông thường thì các thiết bị giám sát bằng trở kháng đều có những chương trình tự động xác định sự hiện diện của vi sinh vật khi độ dẫn vượt qua một giá trị quy ước. Giới hạn phát hiện của phương pháp này là một tế bào sống. Bởi theo lý thuyết, từ một tế bào này sẽ sinh ra nhiều tế bào khác và được phát hiện do làm thay đổi độ dẫn. Hiện nay đã có nhiều thiết bị giám sát sự thay đổi điện dẫn trên thị trường như Bactometer 123 (Bactomatic Ltd.), Malthus 2000 (Malthus Instruments Ltd) và kỹ thuật RABIT (Rapid Automated Bacterial Impedance Technique, Don Whitley Scientific Ltd). Những phương pháp trở kháng vi sinh vật hầu như ứng dụng rất sớm trong công nghiệp thực phẩm và công nghiệp sữa.

Phương pháp này áp dụng trong nhiều trường hợp tương quan với phương pháp đếm khuẩn lạc (ở nhiều loại sản phẩm); giảm gánh nặng về thời gian phát hiện. Tuy nhiên nó yêu cầu điều kiện môi trường chuẩn, ổn định; các thiết bị và môi trường đặc

biệt.

5.4. Kỹ thuật định lượng bằng đo vi lượng calorie (Microcalorimetry)

Phương pháp này sử dụng những thiết bị rất nhạy để đo nhiệt lượng rất nhỏ sinh ra trong quá trình trao đổi chất của vi sinh vật. Qua đó có thể định lượng cá thể trong mẫu bằng cách đo lượng nhiệt tạo ra hoặc xác định thời gian lượng nhiệt sinh ra đến ngưỡng đo. Phương pháp này còn dùng để định danh vi sinh vật bằng cách đo nhiệt lượng tạo ra của vi sinh vật đó trên những nền cơ chất khác nhau.

5.5. Kỹ thuật định lượng vi sinh vật bằng đo mức phóng xạ (Radiometry)

Người ta sử dụng cơ chất có carbon 14 đánh dấu đồng vị phóng xạ (C^{14} labelled) trong môi trường nuôi cấy vi sinh vật. Trong quá trình trao đổi chất, vi sinh vật giải phóng ra CO_2 có chứa C^{14} . Người ta có thể định lượng vi sinh vật dựa vào lượng C^{14} giải phóng hoặc dựa thời gian cần thiết để lượng C^{14} đạt đến ngưỡng phát hiện. Hệ thống phát hiện đồng vị phóng xạ này rất nhạy nhưng do tính độc hại nên không được ưa dùng trong công nghiệp thực phẩm.

HƯỚNG DẪN GIẢNG DẠY MÔ ĐUN

I. Vị trí, tính chất, ý nghĩa và vai trò của môn học

- *Vị trí:* Kiểm nghiệm vi sinh vật là mô đun chuyên môn ngành trong chương trình đào tạo trình độ cao đẳng ngành *Công nghệ sinh học*, được giảng dạy sau môn học vi sinh vật học.

- *Tính chất:* Là mô đun tích hợp lý thuyết và thực hành, trang bị cho người học những kiến thức cơ bản về vi sinh vật gây bệnh, các chỉ tiêu vi sinh trong thực phẩm, nước, mỹ phẩm; phân loại, pha chế các loại môi trường; phương pháp lấy và bảo quản mẫu cần phân tích; nguyên tắc và cơ sở của các phương pháp đánh giá vi sinh vật; cơ sở xác định một số đặc tính sinh hóa của vi sinh vật; quy trình phân tích một số vi sinh vật gây bệnh trong nước, thực phẩm; cần tổ chức giảng dạy tại phòng học có đầy đủ trang thiết bị cần thiết cho việc dạy, học lý thuyết và thực hành.

- Ý nghĩa và vai trò: Trang bị các kiến thức và kỹ năng cơ bản về phân tích một số chỉ tiêu vi sinh vật trong một số mẫu thử.

II. Mục tiêu của môn học/mô đun:

1. Kiến thức

- Nêu được các nguyên tắc cơ bản trong pha chế, sử dụng và bảo quản môi trường nuôi cấy vi sinh vật;
- Trình bày được các phương pháp lấy mẫu, bảo quản và chuẩn bị mẫu phân tích;
- Phân tích được quy trình kiểm tra một số chỉ tiêu vi sinh vật chủ yếu trong thực phẩm và nước (*Coliforms*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*,...);
- Áp dụng được các phương pháp phân tích, kỹ thuật cơ bản và thử nghiệm sinh hóa trong kiểm nghiệm vi sinh vật.

2. Kỹ năng

- Pha chế được các loại môi trường và dung dịch đệm sử dụng trong phân tích vi sinh vật đúng thành phần và nồng độ yêu cầu;
- Thực hiện thành thạo các thao tác xử lý mẫu, pha loãng, cấy mẫu, tăng sinh mẫu và thử nghiệm khẳng định vi sinh vật theo đúng quy trình và an toàn;
- Đọc đúng kết quả, tính toán và xử lý số liệu chính xác.

3. Năng lực tự chủ và trách nhiệm

- Ý thức được tầm quan trọng của việc kiểm tra các vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm, nước, ...đối với chất lượng sản phẩm, sản xuất, đời sống;
- Rèn luyện cho sinh viên tinh thần tự giác, chuyên cần, cẩn thận, trung thực trong thực hành và tính toán kết quả;
- Tuân thủ nội quy của phòng thí nghiệm và đảm bảo vô trùng.

III. Nội dung chính của mô đun

Mã bài	Tên bài	Loại bài dạy	Địa điểm	Thời lượng			
				Tổng số	Lý thuyết	Thực hành	Kiểm tra
1	Phân loại, bảo quản và pha chế môi trường nuôi cấy vi sinh vật	Tích hợp	Phòng TH CNVS	6	3	3	0
2	Lấy mẫu, vận chuyển và bảo quản mẫu kiểm	Tích	Phòng	4	3	1	0

Mã bài	Tên bài	Loại bài dạy	Địa điểm	Thời lượng			
				Tổng số	Lý thuyết	Thực hành	Kiểm tra
	vi sinh vật	hợp	TH CNVS				
3	Nuôi cấy và định lượng mẫu trong kiểm nghiệm vi sinh vật	Tích hợp	Phòng TH CNVS	8	3	4	1
4	Thử nghiệm sinh hóa trong xác định vi sinh vật	Tích hợp	Phòng TH CNVS	4	2	2	0
5	Phân tích tổng số vi khuẩn hiếu khí	Tích hợp	Phòng TH CNVS	8	1	7	0
6	Phân tích tổng số nấm men và nấm mốc	Tích hợp	Phòng TH CNVS	8	1	7	0
7	Phân tích tổng số <i>Coliforms</i>	Tích hợp	Phòng TH CNVS	12	1	10	1
8	Phân tích <i>E. coli</i>	Tích hợp	Phòng TH CNVS	12	1	10	1
9	Phân tích <i>Staphylococcus aureus</i>		Phòng TH CNVS	12	1	10	1
	Cộng			76	16	56	4

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bộ Thủy sản (2004), *Sổ tay kiểm nghiệm vi sinh thực phẩm thủy sản*, Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
- [2]. Ths. Nguyễn Tiến Dũng (2007), *Bài giảng Phương pháp kiểm nghiệm vi sinh vật trong thực phẩm*, Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
- [3]. Trần Linh Thước (2007), *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. Nhà xuất bản Giáo dục.