

Phương pháp thực nghiệm dùng để nhận diện các loài vi khuẩn

1. ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI:

1.1. Nhuộm Gram (phương pháp Hucker cải tiến)

Vật liệu, hoá chất:

- Dung dịch Tím kết tinh (Crystal violet):
2g tím kết tinh hoà tan trong 20 ml etanol 95%
0,8 g ammon oxalat hoà tan trong 80 ml nước cất
Trộn hai dịch nói trên lại với nhau, gạn 48 giờ rồi lọc. Bảo quản trong lọ tối, sử dụng vài tháng.
- Dung dịch Iod:

Hoà tan 1 g Iod (Iodine) trong 3-5ml nước cất, thêm 2g KI (Kali iodide), khuấy cho tan hết, thêm nước cất cho đủ 300ml. Bảo quản trong lọ tối.
- Dung dịch tẩy màu:

Etanol 95% hoặc trộn lẫn 70ml etanol 95% với 30ml acetone.
- Dung dịch nhuộm bổ sung:
Chứa 0,25% dung dịch Safranin O 2,5%, trước khi dùng pha với nước cất theo tỷ lệ 1:5 (vol/vol) có dung dịch 0,5%.

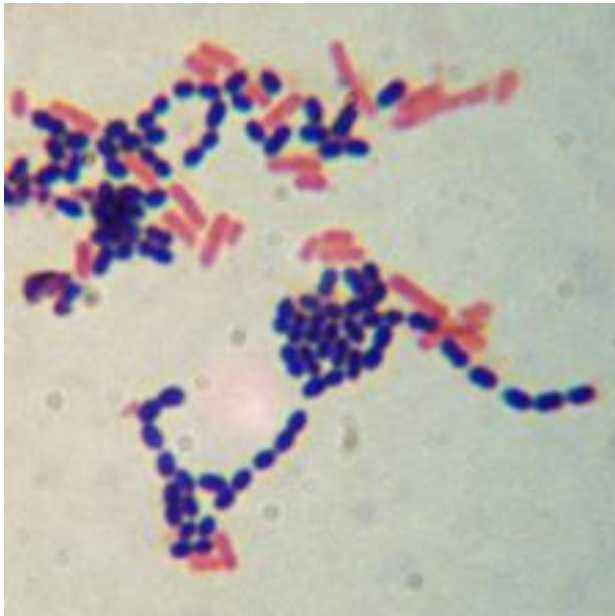
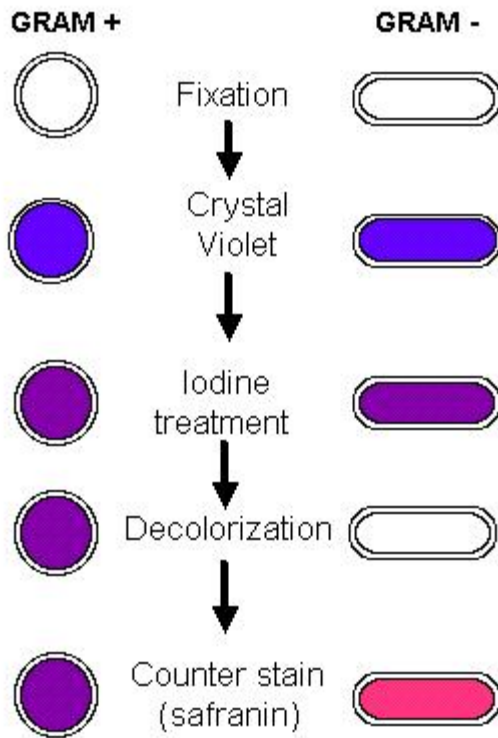
Các bước tiến hành:

- Chuẩn bị vật bôi: dùng que cấy vô trùng lấy một ít vi khuẩn cấy lên slide (sau khi cấy 24 giờ) hoà vào 1 giọt nước cất giữa phiến kính, làm khô trong không khí.
- Cố định: nhanh vật bôi trên ngọn lửa đèn cồn 2-3 lần.
- Nhuộm bằng dung dịch Tím kết tinh trong 1 phút, rửa nước, thổi khô.
- Nhuộm lại bằng dung dịch Iod trong 1 phút, rửa nước, thổi khô.
- Rửa sạch tẩy màu, gạn khoảng 30 giây (cho nước khi vẩy mạnh tẩy màu), rửa nước, thổi khô.
- Nhuộm bổ sung bằng dung dịch Safranin trong 2-3 phút, rửa nước, thổi khô trong không khí.
- Soi kính: dùng vật kính độ 100x.

Kết quả:

Vi khuẩn Gram (+) bắt màu tím, Gram (-) bắt màu đỏ.

Trào i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html



Hình 1.1. Các bước tiến hành nhuộm Gram và ví dụ minh họa kết quả.

1.2. Nhuộm tiên mao

Vật liệu, hoá chất:

- Dung dịch A: Acid tannic 5 g
FeCl₃ 1,5 g
Formalin 2 ml

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

NaOH 1%	1 ml
Nước cất	100 ml

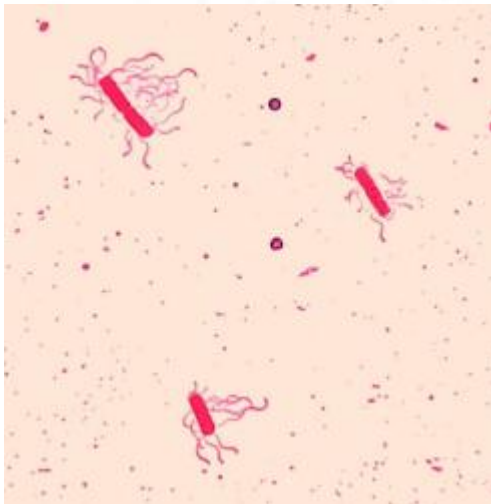
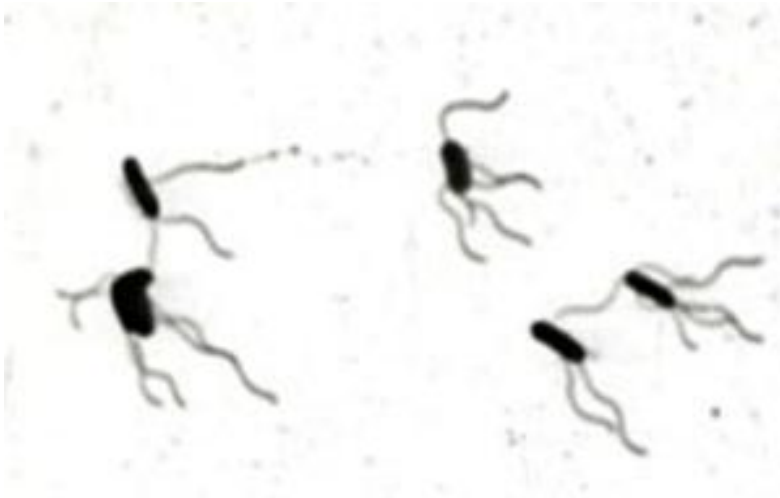
- Dung dịch B: 2 g AgNO_3 hoà tan trong 100 ml nước cất, lấy 10 ml để riêng. Nhỏ dung dịch NH_4OH đậm đặc vào 90 ml còn lại, thấy hình thành tủa rất đặc, tiếp tục nhỏ NH_4OH vào cho đến khi tan hết tủa. Lấy 10ml AgNO_3 đã bỏ ra ban đầu nhỏ từ từ vào dung dịch, thấy xuất hiện vẩn mỏng, tiếp tục nhỏ vào cho đến khi vừa tan hết vẩn thì thôi.
- Chuẩn bị phiến kính: rửa thật sạch, ngâm trong cồn, đốt cháy hết cồn rồi mới sử dụng.

Các bước tiến hành:

- Hoạt hoá vi khuẩn 2-3 lần trước khi tiến hành nhuộm.
- Dùng que cấy vô trùng lấy vi khuẩn từ mặt thạch (mới cấy 18-24 giờ) hoà vào 1 giọt nước cất đặt giữa phiến kính, để nghiêng cho chảy về một phía, làm khô trong không khí.
- Cố định tế bào: hơ nhanh trên ngọn lửa đèn cồn 2-3 lần.
- Nhỏ dịch A lên vết bôi, giữ 10 phút, rửa bằng nước cất.
- Dùng dịch B cho chảy qua để loại hết nước. Nhuộm bằng dịch B trong 30-60 giây. Hơ nóng, để nguội rồi rửa lại bằng nước cất.
- Soi kính: dùng vật kính dầu 100x.

Kết quả:

Tế bào vi khuẩn bắt màu nâu thẫm, tiên mao bắt màu nâu.



Hình 1.2. Ví dụ minh họa kết quả nhuộm mao tu của vi khuẩn và tiêm mao

1.3. Kiểm tra khả năng di động

Vật liệu, hoá chất:

- Chuẩn bị ống nghiệm chứa môi trường thạch bán lỏng (0,3-0,6% thạch).

Các bước tiến hành:

- Dùng que cấy có đầu nhọn cấy vi khuẩn theo kỹ thuật chích sâu vào môi trường thạch bán lỏng.
- Để ống nghiệm thẳng đứng, nhiệt thích hợp và quan sát sau 1-3 ngày, có khi lâu hơn.

Kết quả:

Vi khuẩn mọc lan rộng quanh vết cấy là chúng có khả năng di động.

Vi khuẩn chỉ mọc theo vết cấy là chúng không có khả năng di động.

Chú ý: với vi khuẩn hiếu khí quan sát phần trên của vết cấy.

1.4. Nhuộm bào tử

Có hai phương pháp nhuộm

1.4.1. Nhuộm Lục Malachit (phương pháp Schaeffer-Fulton)

Vật liệu, hoá chất:

- Dung dịch Lục Malachite (Malachite green) bão hòa (khối lượng 7,6%)

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Dung dịch Safranin 0,5% (xem nhu m Gram)

Các bước tiến hành:

- Làm v t sôi và c nh t bào nh i v i nhu m Gram.
- Nhu m b ng dung dịch L c Malachite trong 10 phút, r a n c.
- Nhu m l i b ng dung dịch Safranin trong 30 giây, r a n c, th m khô.
- Soi kính: dùng v t kính đ u 100×

Kết quả:

Bào t có màu l c, t bào có màu .

Chú ý: phân biệt bào t v i các h t đ nhi m c ng b t màu l c

1.4.2. Nhuộm Carbollic Fuchsin

Vật liệu, hoá chất:

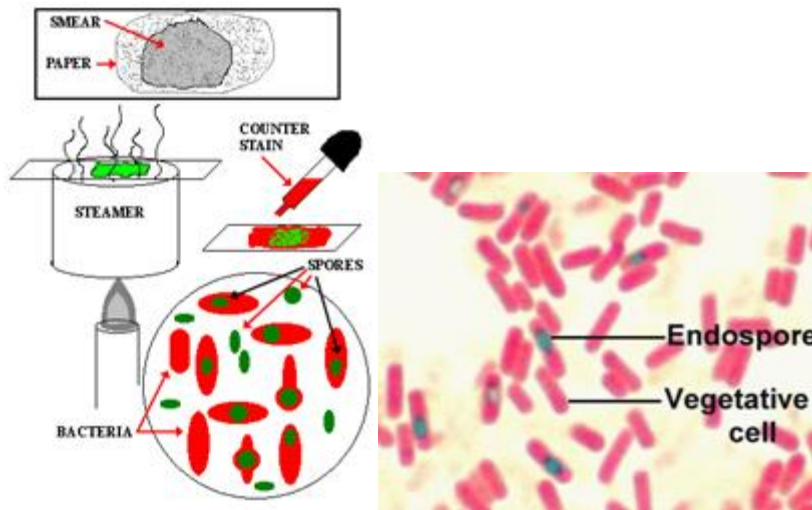
- Dung dịch A:
 - 10 ml dung dịch Fuchsin kĩ m bão hoà trong etanol (kho ng 10%)
 - 100 ml dung dịch acid carbollic (phenol) 5% (trong n c).
 - Tr n u v i nhau (chu n b tr c khi dùng)
- Dung dịch B:
 - 100 ml Etanol 95%
 - 3 ml HCl m c
- Dung dịch C:
 - 30 ml dung dịch Xanh metylen (Methylene blue) bão hoà trong etanol (kho ng 2%)
 - 100 ml dung dịch KOH 0,01% trong n c.
 - Tr n u v i nhau, càng lâu càng t t.

Các bước tiến hành:

- Làm v t sôi trên phi n kính, c nh t bào.
- Nh dung dịch A lên v t sôi, h nóng nh bên đ i bay h i, tránh sôi. Thêm đ n đ n thu c nhu m không b khô c n, gi trong 5 phút. i ngu i, thu c nhu m i.
- Dùng dịch B r a cho n khi v a th y v a h t màu , r a n c.
- Nhu m l i b ng dung dịch B trong 2-3 phút, r a n c, th m khô.
- Soi kính: dùng v t kính đ u.

Kết quả:

Bào tử bắt màu đỏ, tế bào bắt màu xanh



Hình 1.3. Các bước tiến hành nhuộm Carbol Fuchsin và ví dụ minh họa kết quả.

1.5. Nhuộm vỏ nhầy (Capsule)

Có hai phương pháp

1.5.1. Phương pháp nhuộm âm bản

Vật liệu, hoá chất:

- M c tầu
- Metanol
- Dung dịch safranin 0,5%

Các bước tiến hành:

- Lấy vi khuẩn hoà vào giọt nước trên phiến kính.
- Nhỏ thêm 1 giọt m c tầu, trộn đều. Dùng c nh lamen dàn mỏng v t bôi, làm khô trong không khí.
- Cố định v t bôi bằng cách nhúng metanol lên v t bôi, giữ trong 1 phút.
- Thêm dần dần dung dịch Safranin 0,5% lên v t bôi rửa metanol, sau đó giữ trong 30 giây nhuộm lại, rửa sạch, thấm khô.
- Soi kính: dùng v t kính độ 100x.

Kết quả:

Hiện vi khuẩn nhuộm màu đen, t bào màu trắng, v nh y màu hồng.

1.5.2. Phương pháp Đỏ Congo

Vật liệu, hoá chất:

- Dung dịch Congo (Congo red) 2% trong nước
- Dung dịch gelatin 0,01-0,1% trong nước
- Dung dịch HCl 1%
- Hỗn hợp 30 ml dung dịch Xanh metylen bão hòa (khối lượng 2%) trộn với 100 ml dung dịch KOH 0,01%.

Các bước tiến hành:

- Nhỏ 1 giọt dung dịch Congo và 1 giọt dung dịch gelatin lên phiến kính sạch.
- Lấy vi khuẩn trộn đều với 2 giọt nước trên phiến kính làm v t bôi, làm khô trong không khí.
- Nhúng dung dịch HCl lên phiến kính, phiến kính có màu xanh.

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

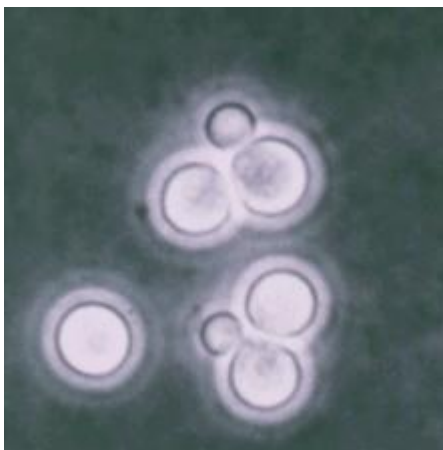
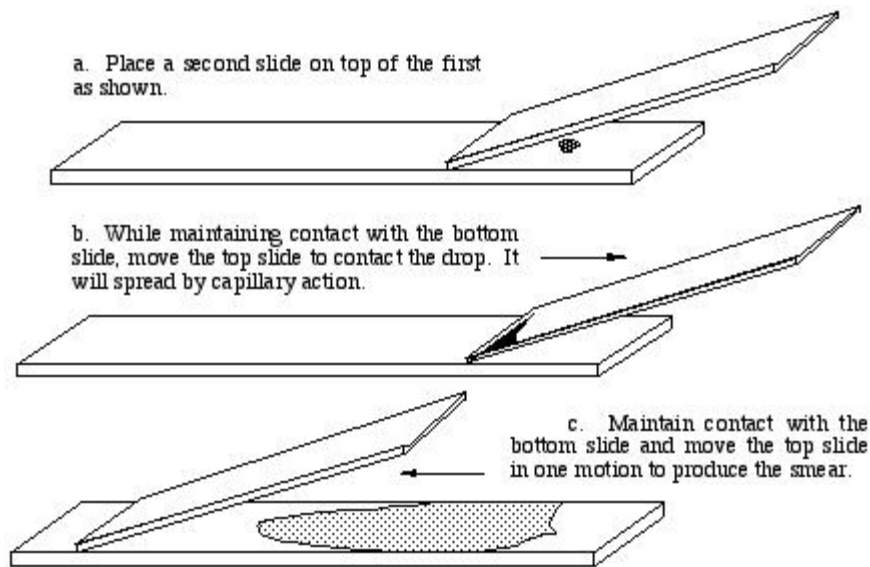
- Rửa bằng nước lọc dùng dịch HCl.
- Nhuộm bằng Xanh metylen trong 1 phút, rửa sạch, hong khô.
- Soi kính: dùng vật kính độ 100×.

Kết quả:

Nhiên vật nhuộm màu xanh, tế bào màu hồng, vi khuẩn không màu.

1.5.3. Phương pháp nhuộm âm bản nigrosin (Hình 1.4):

- Nhỏ giọt Nigrosin vào một phiến kính sạch.
- Lấy 1 vòng que cấy vi khuẩn trên vi giọt nigrosin.
- Lấy một phiến kính khác nghiêng 45° và kéo giọt nigrosin về phía phiến kính một chút sau đó kéo nhẹ về phía trái dần dần thành một vệt bôi. Không thổi (không hút).
- Quan sát dưới kính hiển vi sử dụng vật kính màu sáng nhìn lên trên mặt nền màu đen.



Hình 1.4. Nhuộm âm bản dùng Nigrosin và ví dụ minh họa kết quả.

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

1.5.4. Phương pháp dùng Tím kết tinh (Crystal violet)

Vật liệu, hoá chất:

- Dung dịch Tím kết tinh 1% trong nước
- Dung dịch Sulfat đồng CuSO_4 20% trong nước

Các bước tiến hành:

- Nhúng vài giọt dung dịch tím kết tinh lên phiến kính sạch
- Lấy vi khuẩn đang thích nghi (48 giờ) trên vi khuẩn dung dịch tím kết tinh, dùng cùn lam kính dàn đều trên toàn bộ phiến kính làm vệt bôi, giữ trong không khí 5-7 phút làm khô, không cần nóng.
- Rửa vệt bôi bằng dung dịch sulfat đồng 20%, thấm khô.
- Soi kính: dùng vi khuẩn kính độ 100×

Kết quả:

- Tế bào có màu sẫm, vệt nhày màu nhợt nhạt xung quanh.

1.6. Nhuộm thành tế bào

Vật liệu, hoá chất:

- Dung dịch acid tannic 5%
- Dung dịch Tím kết tinh 0,2%

Các bước tiến hành:

- Làm vệt bôi vi khuẩn
- Nhuộm bằng dung dịch acid tannic trong 5 phút, rửa sạch.
- Nhuộm bằng dung dịch Tím kết tinh trong 3-5 phút, rửa sạch, thấm khô.
- Soi kính: dùng vi khuẩn kính độ 100×

Kết quả:

- Thành tế bào bắt màu tím, tế bào chết màu tím nhạt.

1.7. Nhuộm hạt dị nhiễm

Vật liệu, hoá chất:

- | | | |
|----------------|--------------------------------|--------|
| • Dung dịch A: | Xanh Toluidin (Toluidine blue) | 0,15 g |
| | Lục malachite | 0,2 g |
| | Acid acetic (glacial) | 1 ml |
| | Ethanol 95% | 2 ml |
| | Nước cất | 100 ml |
| • Dung dịch B: | Iod (I) | 2 g |
| | Iodid kali (IK) | 3 g |
| | Nước cất | 300 ml |

Các bước tiến hành:

- Làm vệt bôi, cùn nh vệt bôi.
- Nhuộm bằng dung dịch A trong 5 phút, rửa sạch.
- Tráng bằng dung dịch B, nhuộm thêm trong 1 phút, rửa sạch, thấm khô.
- Soi kính: dùng vi khuẩn kính độ 100×

Kết quả:

Các hạt dị nhiễm có màu đen.

Các thành phần khác của tế bào bắt màu lục hay lục nhạt

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

1.8. Nhuộm hạt PHB (Poly- β -hydroxybutyric acid)

Vật liệu, hoá chất:

- Dung dịch A: Eosin Sudan B (Sudan black B) 0,3 g
Etanol 70% 100 ml.
Trộn đều, lọc mịn, qua màng lọc.
- Dung dịch B: Xylene
- Dung dịch C: Dung dịch Safranin 0,5% trong nước.

Các bước tiến hành:

- Làm vệt bôi, cấy vệt bôi.
- Nhuộm bằng dịch A trong 10 phút, rửa sạch, thấm khô.
- Dùng dịch B rửa cho đến khi mất màu.
- Nhuộm bằng dịch C trong 1-2 phút, rửa sạch, thấm khô.
- Soi kính: dùng vệt kính độ 100×

Kết quả:

Hạt PHB bắt màu lam đen. Tế bào và các thành phần khác có màu trắng.

1.9. Nhuộm tinh thể protein (ở *Bacillus thuringiensis*)

Vật liệu, hoá chất:

- Dung dịch nhuộm:
1 ml dung dịch Fuchsin bão hòa bão hòa (xem nhuộm carbolic fuchsin) trộn với 100 ml dung dịch acid carbolic 5% trong nước.
Khi dùng pha loãng 10 lần.

Các bước tiến hành:

- Làm vệt bôi, cấy vệt bôi
- Nhuộm trong 1 phút, rửa sạch, hong khô
- Soi kính: dùng vệt kính độ 100×

Kết quả:

Tinh thể bắt màu đỏ. Bào tử tách rời có vòng màu trắng.

1.10. Nhuộm vi khuẩn kháng acid

Vật liệu, hoá chất:

- Dung dịch A:
Dung dịch Fuchsin kiềm bão hòa trong nước ($\approx 10\%$) 10 ml
Dung dịch acid carbolic 5% trong nước 100 ml
Trộn đều 2 dung dịch với nhau.
- Dung dịch B:
Etanol 95% 100 ml
HCl đặc 3 ml
- Dung dịch C:
Dung dịch Xanh metylen bão hòa trong etanol ($\approx 2\%$) 30 ml
Dung dịch KOH 0,01% trong nước 100 ml

Các bước tiến hành:

- Làm vệt bôi, cấy vệt bôi
- Nhúng dịch A lên vệt bôi, đun nóng dưới phiến kính cho bay hơi hơi nước sôi. Thả giấy thấm vào để thấm thêm dịch A tránh khô vệt bôi. Giữ trong 5 phút. Rửa sạch, thấm khô, nhuộm dịch A tiếp.
- Dùng dịch B rửa cho đến khi thấy vắng màu đỏ. Rửa sạch.

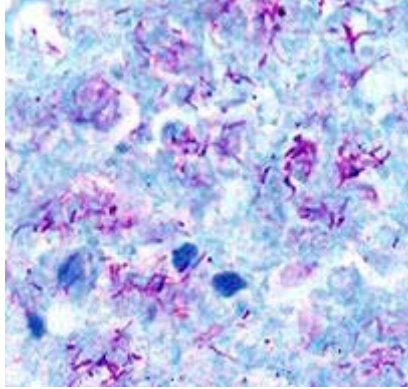
Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Nhuộm bằng dịch C trong 2-3 phút, rửa sạch, thấm khô.
- Soi kính: dùng vật kính 40×

Kết quả:

Vi khuẩn kháng acid bắt màu .

Vi khuẩn không kháng acid bắt màu xanh.

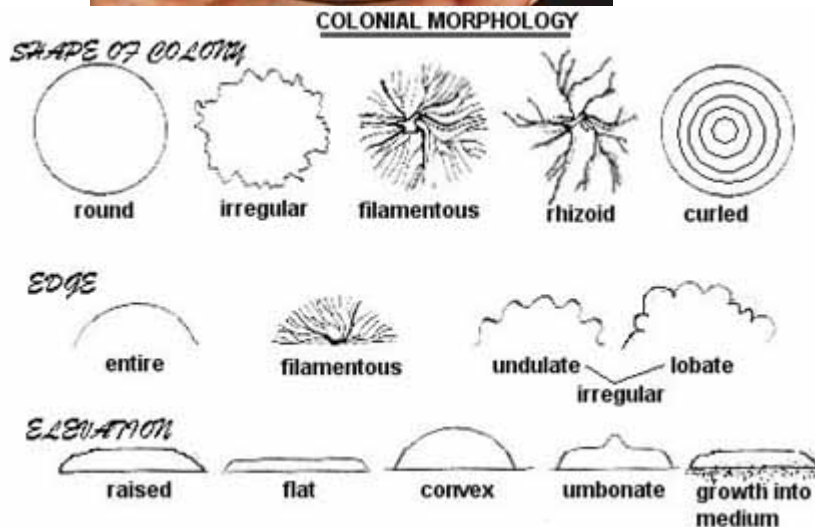


Hình 1.5. Ví dụ minh họa kết quả xác định tính kháng acid của vi khuẩn.

2. ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY VÀ ĐẶC ĐIỂM SINH LÝ:

2.1. Hình thái khuẩn lạc

- Lấy 15-20ml môi trường thạch vô trùng, nguội ở 50 °C rồi đổ vào đĩa Petri (thao tác vô trùng). Nếu có nồng độ trên nắp để nguội vào tủ 30-37 °C làm khô mặt thạch.
- Lấy một vòng que cấy 3-4 ml trên mặt thạch ở góc. Quay đĩa thạch sang hướng khác và chia cấy thành 3-4 vòng khác sao cho không trùng với các vòng trước. Lấy pipet theo mặt thạch thành ba pha loãng liên tiếp để cấy vi khuẩn dính trên que cấy. Chú ý không nhấc tay lên và không thay đổi hướng của vòng que cấy.
- Đậy nắp vào rồi thích hợp trong 1-2 ngày để nhìn ra các khuẩn lạc riêng rẽ.
- Tiến hành quan sát các khuẩn lạc này từ các phía (từ trên xuống, từ bên cạnh), chú ý về kích thước, hình dạng khuẩn lạc, hình dạng mép, bề mặt, độ dày, có núm hay không, trong, màu sắc (trên, dưới, có khuếch tán ra môi trường hay không)



Hình 2.1. Các kiểu hình khuẩn lạc và các đặc điểm khuẩn lạc thông thường.

2.2. Nhiệt độ sinh trưởng và tính bền nhiệt

- Lấy một vòng que cấy sinh học cấy vào các ống nghiệm có môi trường dinh dưỡng thích hợp (môi trường thạch hoặc dịch thể).
- Đặt các ống nghiệm khác nhau (3 ống trong một nhiệt độ). Vì vậy các loài ưa ấm (mesophiles), nhiệt độ sinh trưởng và tính bền nhiệt thường có khi m tra v i thang nhiệt độ 4, 20, 30, 37, 41, 45 và 65 °C. Từ 37 °C trở lên có thể dùng các nhiệt độ thích hợp.
- Quan sát khả năng sinh trưởng của vi khuẩn (tạo sinh khối trên môi trường thạch, hoặc ở OD nếu thí nghiệm định lượng trên môi trường dịch thể)

c biệt, tính bền nhiệt cần xác định khi phân loại các liên cầu khuẩn, cách làm như sau:

- Cấy 1 giọt dịch nuôi cấy 24 giờ vào ống nghiệm môi trường dịch thể thích hợp.
- Giữ nhiệt độ 60 °C trong 30 phút sau đó đặt vào tủ ấm 35-37 °C, nuôi trong 48 giờ.

Nếu vi khuẩn phát triển được là có tính bền nhiệt. Dùng chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis* làm đối chứng dương tính.

2.3. Nhu cầu về O₂ và CO₂

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Cần chú ý vào nhu cầu về vi ôxy, vì khu vực thành các nhóm hi u khí, k khí, k khí không b t bu c và vi hi u khí.

2.3.1. Nhu c u i v i ôxy

- Vi khu n ã ho t hoá c y vào môi tr ãng d ch th thích h p.
- t các i u ki n: - không khí ch a 5% CO₂ và 10% O₂
- không khí bình th ãng.
Theo dõi s phát tri n c a vi khu n.

2.3.2. Tính k khí c a vi khu n sinh bào t

- Chu n b môi tr ãng th ch k khí:

Casein th y phân	20 g
NaCl	5 g
Na-mercaptoacetat	2 g
Na-formaldehyd sulfoxylate	1 g
Th ch	15 g
N c c t	1000 ml.
- C y vi khu n theo ki u chích sâu 1 vòng que c y (ãng kính 1,5 mm) vào môi tr ãng nói trên.
- Nuôi 30 °C, ki m tra k t qu sau 3 ngày và 7 ngày. N u vi khu n m c phía trên là thu c lo i hi u khí; n u m c d c ãng c y là k khí không b t bu c; n u ch m c bên d i là k khí b t bu c.

2.4. Kh n ãng ãng hóa các ngu n carbon

- Môi tr ãng khoáng c b n (g/l):

(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
N c c t	1000 ml
- Ngu n carbon (ãng, polysaccarid, r u, axit béo, axit amin, axit h u c , hydroxy axit (alcohol axit, dicarboxylic axit...) c kh ãng tr ãng qua màng l c.
- B sung ngu n carbon vào môi tr ãng khoáng c b n (ãng và r u n ãng 0,5-1%, các lo i khác ãng 0,1-0,2%), chia môi tr ãng vào các ãng nghi m ã ti t tr ãng.
- C y vi khu n vào môi tr ãng, s d ãng 3 ãng nghi m i v i m i lo i ngu n carbon.
- Theo dõi s phát tri n ãng giá kh n ãng ãng hóa ngu n carbon.

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Cách khác là chu n b môi tr ng khoáng c s có th ch và a Petri. Vi khu n c c y dần u trên a b ng que g t. Ngu n carbon đ ng tinh th c a lên a (kho ng b ng h t g o) cho khuy ch tán đ n ra xung quanh. N u vi khu n ng hóa c ngu n carbon nào s m c thành vòng xung quanh ch có t ngu n carbon ó.

Các ngu n carbon th ng c dùng trong thí nghi m:

- ng 5C Arabinoza, Riboza, Xyloza, Fucoza, Rhamnoza
- ng 6C Glucoza hay Dextroza, Mannoza, Sorboza, Fructoza hay Levuloza, Galactoza
- ng kép Saccharoza hay Sucroza- ng kính, Maltoza, Sorboza, Lactoza, Trehaloza, Cellobioza, Melibioza
- ng tam Raffinoza, Melizitoza
- ng a Tinh b t (Starch), Dextrin, Inulin, Glycogen
- R u b c 3 Glycerol
- R u b c 4 Erythritol
- R u b c 5 Adonitol, Arabitol, Xylitol
- R u b c 6 Mannitol, Sorbitol, Dulcitol
- R u b c 6 m ch vòng Inozitol
- Glucoside Salicin, Coniferrin, Aesculin, Arbutyl, Amygdalin, alpha-Methylglucosid

2.5. Kh n ng ng hóa các ngu n nit

- Môi tr ng c s :

KH ₂ PO ₄	1,36 g
CaCl ₂	5 ml
NaHPO ₄	2,13 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 ml
Glucoza	10 g
N c c t	1000 ml

Glucoza có th c thay th b ng ngu n carbon thích h p khác nh Citrat, Acetat, Mannit... v i n ng 0,2-0,5%. Các ngu n nit khác nhau (mu i ammon, mu i nit rat) c a vào môi tr ng v i n ng 0,05-0,1%. i ch ng là môi tr ng hoàn toàn không b sung ngu n nit . Ch nh pH t i 7,0-7,2.

Chia môi tr ng vào các ng nghi m (4-5 ml/ ng), kh trùng 112 °C trong 20-30 phút.

- C y vi khu n ã ho t hoá 18-24 gi (3 ng cho m i lo i ngu n nit).
- t nhi t thích h p trong 3 ngày và 7 ngày. So sánh s phát tri n v i i ch ng (o c c a đ ch t bào) xác nh kh n ng ng hóa ngu n nit .

2.6. Kh n ng sinh s c t hu nh quang

- Môi tr ng làm ng th ch nghiêng:

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

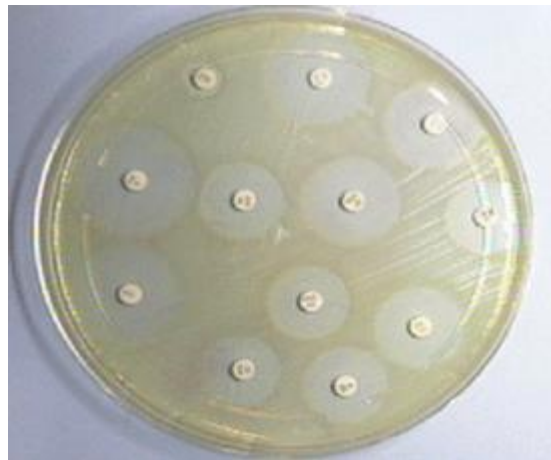
Pepton	20 g
Glyxerin	10 g
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Thạch	15 g
Nước cất	1000 ml
pH = 7,2.	

Khử trùng 121 °C trong 20 phút, để thạch nguội.

- Cấy vi khuẩn đã hoạt hóa 24 giờ lên mặt thạch, đổ vào khay và theo dõi sau 1, 3, 5 ngày.
- Quan sát ngưng tụ nấm đùn để kiểm tra xem có sản sinh sản phẩm như quang hay không?

2.7. Tính miễn dịch và tính kháng khuẩn

- Chuẩn bị môi trường thạch thích hợp với nồng độ vi khuẩn.
- Cấy giọt vi khuẩn lên mặt thạch (có thể trộn vi khuẩn vào môi trường thạch đã làm nguội ở 50 °C rồi đổ).
- Đặt lên mặt thạch các khoanh giấy (tích hoặc mua sẵn) thấm chất kháng khuẩn các nồng độ khác nhau.
- Nuôi trong khay 30 °C trong 24-48 giờ.
- Quan sát các vòng vô khuẩn tạo thành xung quanh các khoanh giấy thấm chất kháng khuẩn. Vòng vô khuẩn càng lớn tức là vi khuẩn càng miễn dịch.



Hình 2.2. Vòng vô khuẩn tạo thành quanh các khoanh giấy thấm chất kháng khuẩn.

2.8. Hoạt hóa Malonat

- Môi trường dịch thể:

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Cao men	1 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
K_2HPO_4	0,6 g
KH_2PO_4	0,4 g
Natri malonat	3 g
Bromophenol blue (BPB)	0,025 cg
Nước cất	1000ml

pH= 7,0-7,4

- Chia môi trường vào ống nghiệm, khử trùng 121°C trong 15 phút.
Chỉ định là môi trường không có Natri-malonat.
- cấy vi khuẩn đã hoạt hóa, thử nghiệm thích hợp trong 1-2 ngày.
- Quan sát sự biến đổi màu môi trường: nếu chuyển màu từ lục sang lam là có hoạt hóa malonat (dương tính), nếu không là âm tính.



Hình 2.3. Sự biến đổi màu môi trường khi vi khuẩn hoạt hóa malonat.

2.9. Xét nghiệm ngưng hóa Citrat

Mục đích: phân biệt các nhóm vi khuẩn ngưng ru t đ a trên kh n ngưng hoá citrat.

- Môi trường Simmons:

NaCl	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1 g
Natri xitrat	2 g
BPB 1% trong nước	10 ml
Thạch (agarose)	12 g
Nước cất	990 ml.

un tan thạch, chỉnh pH đến 7,0, thêm chất màu BPB và phân vào ống nghiệm làm thạch nghiêng. Khử trùng 121 °C trong 15 phút.

- Cấy vi khuẩn vào ống thạch, thử nghiệm thích hợp trong 3-7 ngày.
- Môi trường bị nhiễm màu tím lam sang ào t c là vi khuẩn có khả năng ngưng hóa citrat (dương tính).
- Vi các loài *Bacillus cereus* dùng môi trường sau:

NaCl	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5 g
Natri xitrat	2 g
Nước cất	1000 ml
phenol (Phenol red) 0,04%	20 ml.

2.10. Nhu cầu muối và tính chủ muối

- Chuẩn bị môi trường dịch thạch thích hợp để cấy từng loài vi khuẩn.
- Bổ sung NaCl các nồng độ 2, 5, 7, 10%, môi trường cấy trong suốt.
- Cấy vi khuẩn đã hoạt hóa, trong 3-7 ngày.
- Theo dõi mọc sinh trưởng của vi khuẩn (môi trường không cấy vi khuẩn làm chứng).

2.11. Khả năng ngưng hóa Tartrat

- Môi trường dịch thạch kiểm tra:

Pepton	10 g
NaCl	5 g
Nước cất	1000 ml
BPB (0,2%)	12,5 ml
Kali tartrat	10 g
- Chỉnh pH = 7,4.

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Phân môi trường vào ống nghiệm, khetrung 115 °C trong 20 phút, nên dùng ngay. Nếu môi trường quá 14 ngày thì cần khetrung lại bằng cách thay 10 phút.

- Cấy vi khuẩn vào môi trường, hàng ngày theo dõi sự đổi màu.
- Sau 14 ngày thêm một lượng dung dịch chì acetat bão hòa trung tính bằng thể tích môi trường (vol/vol). Chỉ cần là môi trường không cấy vi khuẩn.
- Nếu có chuyển sang màu lục vàng và có ít chì acetat kết tủa là có khả năng hóa tartrat (đông tính). Nếu màu vàng hay màu lục và có nhiều chì acetat kết tủa là xét nghiệm âm tính.
- Phản ứng này dùng để phân biệt *Salmonella zava* (đông tính) và *Salmonella paratyphi B* (âm tính).

2.12. Khetrung sinh trưởng vi KCN

KCN có tác dụng ức chế *Escherichia coli* nhưng không ức chế *Citrobacter freundii*, vì thế thường dùng để phân biệt 2 loài này.

- Môi trường cấy:
 - Pepton 3 g
 - NaCl 5 g
 - KH₂PO₄ 0,22 g
 - K₂HPO₄ 5,64 g
 - Nước cất 1000 ml.
- pH = 7,6.

Khetrung 115 °C trong 20 phút. Môi trường vào ống nghiệm cho nguội ở 4 °C, thêm 15ml dung dịch KCN 0,5%, phân vào mỗi ống nghiệm 1ml (thao tác vô trùng); có thể bảo quản ở 2 tuấn. Môi trường chỉ cần không thêm dung dịch KCN.

- Cấy vi khuẩn từ môi trường hóa (24 giờ) vào các môi trường chuẩn bị trên, tiến hành thích hợp trong 4 ngày và quan sát sự chuyển màu của môi trường.
- Nếu môi trường chuyển màu là sinh trưởng dương tính (*Citrobacter freundii*), nếu môi trường vẫn không màu là sinh trưởng âm tính (*Escherichia coli*).

3. CÁC CẤM SINH HÓA:

3.1. Xét nghiệm oxidaza

Mục đích: phân biệt các nhóm vi khuẩn dựa trên hoạt tính cytochrom oxidaza

- Pha dung dịch Tetramethyl-p-phenylen diamin dihydrochlorid (TPPDD) 1% trong nước, bảo quản trong lọ màu tối ở 4 °C, sử dụng trong 2 tuấn.
- Đặt một miếng giấy lọc trong nắp Petri sếch, nhúng dung dịch TPPDD 1% lên trên miếng giấy lọc sao cho vừa, không quá ướt.
- Dùng que cấy có đầu que làm bằng sợi platín hay dùng đĩa thạch tinh (không dùng đầu que cấy bằng sợi kim loại sắt, niken...) lấy một ít vi khuẩn đã hóa (18-24 giờ) bôi lên miếng giấy lọc.
- Sau 10 giây nếu vi khuẩn chuyển sang màu hồng tía là có oxydaza dương tính; nếu sau 60 giây miếng giấy chuyển màu là oxydaza âm tính.

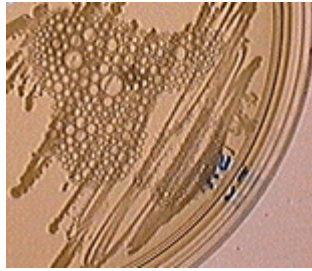
Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Chú ý: nếu dung dịch chuyển sang màu hồng thì không cần đun. Nếu giã vụn quá thì sẽ cần thêm nước để tiếp xúc với không khí nên chuyển màu trắng, tốt nên âm tính lại.

3.2. Xét nghiệm catalaza

Mục đích: kiểm tra khả năng phân huỷ H_2O_2 của vi sinh vật nhằm sản sinh ra enzyme catalaza.

- Chọn 10 chủng vi khuẩn H_2O_2 nồng độ 3-10%, nhuộm tủa lên phiến kính.
- Dùng đũa que cấy platin lẩy một ít vi khuẩn mới cho vào ống nghiệm H_2O_2 trên phiến kính.
- Nếu thấy sủi bọt là dương tính, không sủi bọt là âm tính.
- Có thể thử trực tiếp dung dịch H_2O_2 lên khuẩn lạc trên thạch để kiểm tra kết quả nhanh.



Hình 3.1. Phản ứng sủi bọt khi tiếp xúc với dung dịch H_2O_2 của vi khuẩn có catalaza dương tính.

3.3. Khả năng lên men/ôxy hóa glucoza

Có thể dùng một trong hai môi trường sau làm thí nghiệm

- Môi trường I:

Pepton	2 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	0,2 g
Glucoza	10 g
Thạch	6 g

Dung dịch BTB 1% 3 ml (pha trong một ít cồn 95%, sau đó mới thêm nước thành dung dịch 1%)

Nồng độ 1000 ml.

pH = 7,0 - 7,2.

Phân môi trường vào các ống nghiệm (4-5 ml), khử trùng $115^{\circ}C$ trong 20 phút.

- Môi trường II:

$NH_4H_2PO_4$	0,5 g
K_2HPO_4	0,5 g
Cao men	0,5 g
Glucoza	10 g
Thạch	5-6 g

Dung dịch BTB 1% 3 ml (pha như trên)

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Nồng độ 1000 ml
pH = 7,0 - 7,2.

Phân môi trường vào ống nghiệm và khử trùng như trên.

- Lấy vi khuẩn mịch hoá (18-24 h) cấy chính sâu vào môi trường bằng que cấy thẳng (mịch vi khuẩn cấy vào 4 ống). Bịt kín 2 ống nút bông bằng vaselin-paraffin (lấy vaselin làm chày ra, thêm 1/3 dầu paraffin) cách ly với không khí. Ngoài ra lấy thêm 2 ống không cấy vi khuẩn làm đối chứng. Theo dõi kết quả sau 1,2,3,7 và 14 ngày.
- Kết quả :- Nếu có ống không bịt kín sinh axit (chuyển màu vàng)
thì cấy là vi khuẩn thu được oxy hóa.
- Nếu có ống không bịt và ống bịt kín đều sinh axit (chuyển màu vàng) thì cấy là vi khuẩn thu được lên men.

3.4. Khảo nghiệm lên men đường, rượu

- Môi trường:
Cao thịt 3 g
Pepton 10 g
NaCl 5 g
Chất chỉ thị màu Andrade* 10 ml
(hay dung dịch Xanh bromophenol 0,2%)
Nồng độ thêm vào 1000 ml
- Bổ sung đường và rượu 0,5%. Phân môi trường vào các ống nghiệm, mỗi ống 1 ml.
- Cấy vào mỗi ống nghiệm 1 ống nhỏ (ống Durham) lấy nước uế khí CO₂ sinh ra từ vi khuẩn có khả năng lên men đường. Khử trùng trong 15 phút ở 121 °C. Ống arabinosa, xyloza, và các ống kép cần khử trùng riêng bằng màng lọc rimi bổ sung vào môi trường.

* Cách pha chất chỉ thị màu Andrade:

Fuchsin axit 0,5 g
NaOH 1M 16 ml
Nồng độ 100 ml

Nếu dung dịch có màu hồng, dùng NaOH 0,1 M (1-2 ml) trung hòa cho đến khi mất màu.

Xanh bromophenol (BPB):

2 g BPB, bổ sung đến 5 ml NaOH 0,1M, nghiền trong cối sứ, hòa vào nước cho 100 ml.

- Cấy vi khuẩn mịch hoá vào các ống nghiệm, ở 36 °C, theo dõi hiện tượng sinh axit sau 1-3 ngày. Có thể dùng paraffin bịt kín nút bông và theo dõi trong 14-30 ngày
- Nếu vi khuẩn có khả năng lên men đường (sinh axit) thì chất chỉ thị Andrade sẽ chuyển màu , chất chỉ thị BPB sẽ chuyển màu vàng lục.

Có thể làm cách khác như sau:

- Với vi khuẩn nói chung dùng môi trường I (xem mục 3.3), thay glucoza các ống khác hay rượu (nồng độ 1).
- Với vi khuẩn sinh bào tử dùng môi trường sau:

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

(NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄	0,2 g
Cao men	0,2 g
Th ch	5-6 g
ng hay r u	10 g
N c c t	1000 ml
Dung d ch BTB 0,04%	15 ml

pH = 7,0-7,2.

Phân môi tr ng vào các ng nghi m (4-5 ml), kh trùng 112 °C trong 30 phút.

- V i vi khu n lactic dùng môi tr ng sau:

Pepton	5 g
Cao th t	5 g
Cao men	5 g
Tween 80	0,5 ml
Th ch	5-6 g
N c c t (hay n c máy)	1000 ml
Dung d ch BTB 1,6%	1,4 ml

pH = 6,8-7,0.

Phân môi tr ng vào ng nghi m, kh trùng t i 112 °C trong 30 phút.

- L y vi khu n m i ho t hoá (18-24 gi) c y trích sâu vào môi tr ng th ch, t nhi t thích h p và quan sát sau 1,3,5 ngày.
- N u ch th màu bi n vàng là vi khu n có kh n ng lên men sinh axit (ph n ng d ng tính); n u v n gi màu lam là ph n ng âm tính.

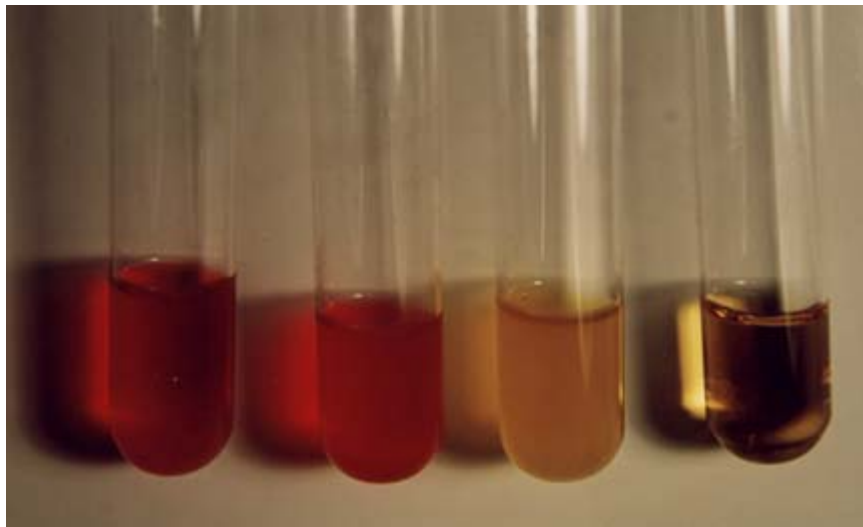
Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

3.5. Ph n ng M.R. (Methyl - Methyl Red)

- Môi tr ng:
Pepton 5 g
Glucosa 5 g
K₂HPO₄ ho c NaCl 5 g
N c c t 1000 ml.
pH = 7,0 - 7,2.

Phân môi tr ng vào ng nghi m (4-5 ml), kh trùng 115 °C trong 30 phút.

- Thu c th :
Methyl 0,1 g
Etanol 95% 300 ml
N c c t 200 ml.
- C y vi khu n vào môi tr ng (l p l i 2 l n), t nhi t thích h p trong 2-6 ngày (n u k t qu âm tính c n kéo dài thêm th i gian). V i Vi khu n ng ru t thu c h Enterobacteriaceae, t ng nuôi c y 37 °C và ki m tra sau 4 ngày.
- Nh 1 gi t thu c th vào d ch nuôi c y, n u chuy n màu là ph n ng đ ng tính, màu vàng là âm tính (màu pH 4,4; màu vàng pH 6,0).



Hình 3.2. Ch t ch th methyl chuy n màu khi ti p xúc v i d ch nuôi c y vi khu n lên men ng.

3.6. Ph n ng V.P. (Voges-Proskauer)

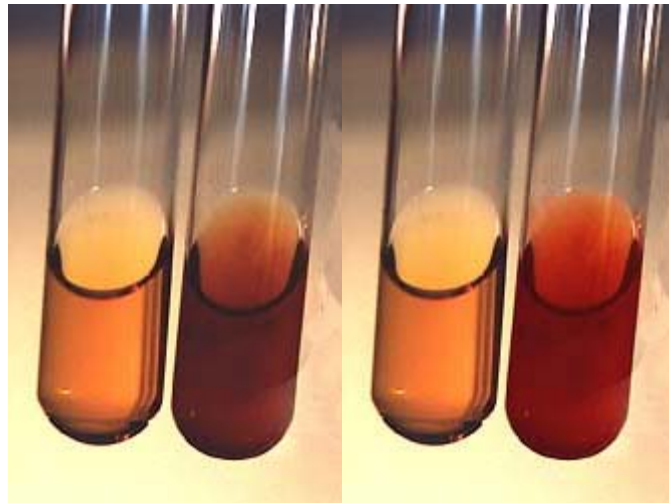
- Môi tr ng: xem ph n 3.5.
- Thu c th :
Creatin 0,3% (ho c nguyên d ng tinh th)
NaOH 40%
- C y vi khu n m i ho t hoá, t nhi t thích h p trong 2-6 ngày.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Bổ sung NaOH 40% (bằng thể tích dịch nuôi cấy), sau đó thêm một ít dung dịch creatin (hoặc thêm một ít tinh thể), rồi khuấy 10 phút (có khi lâu hơn). Nếu dịch chuyển màu là phản ứng dương tính.

Cách khác:

- Môi trường Clark-Lubs:
Pepton 3 g
K₂HPO₄ 5 g
Glucose 5 g
pH = 7,5.
- Phản ứng V.P: thêm 5 giọt dung dịch alpha naphthol 6% (trong cồn 90%, giữ 4 °C trong khi dùng) và 5 giọt NaOH 16% (trong nước), lắc nhẹ. Nếu dịch chuyển sang màu nâu là phản ứng dương tính, màu vàng nhạt là âm tính.
- Phản ứng M.R: thêm 2-3 giọt dung dịch methyl 0,5% (trong cồn 60%), lắc nhẹ. Nếu dịch chuyển màu là phản ứng dương tính, màu vàng nhạt hay không màu là âm tính.



Hình 3.3. Ví dụ minh họa kết quả phản ứng V.P. và M.R.

3.7. Phản ứng ONPG-aza (O-nitrophenyl- -D-galactopyranosidase)

- Môi trường:
ONPG 0,6 g
m phosphat 0,01M pH 7,5 100 ml
Dung dịch pepton 1% (pH 7,5) 300 ml.

(Hoà 0,6 g ONPG trong 100 ml dung dịch muối, khử trùng bằng màng lọc, sau đó trộn với 300 ml dung dịch pepton đã khử trùng).

Bằng thao tác vô khuẩn phân môi trường vào các ống nghiệm nhỏ, bảo quản 4 °C trong vòng 1 năm.

- Kiểm tra bằng khoan giấy lọc, khử trùng 112 °C, 30 phút.
- Nhúng vào mũi khoan giấy lọc một giọt dung dịch sau:
ONPG 0,06 g

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,017 g
Nồng độ 10 ml

Làm khô 37°C trong 24 giờ, bỏ vào ống nghiệm có nút xoay nhiệt phòng.

- Cấy vi khuẩn mồi vào ống nghiệm (1 vòng que cấy) vào môi trường chuẩn bị như trên, để nhiệt thích hợp trong 24 giờ.
- Lấy tâm dịch nuôi cấy thu thập, làm dịch huyền phù trong 0,5 ml nước muối sinh lý.
- Thêm khoảng 1 ống ONPG vào dịch huyền phù, để $35-37^\circ\text{C}$ trong 24 giờ.

Quan sát kết quả: màu vàng là phản ứng dương tính (*Escherichia coli*); không màu là âm tính (*Salmonella paratyphi B*).



Proteus mirabilis- ONPG (ống thử 8) âm tính

Serratia marcescens- ONPG (ống thử 8) dương tính

Hình 3.4. Ví dụ minh họa kết quả phản ứng ONPG-aza

3.8. Kỹ thuật phân tích bột

- Môi trường: Bổ sung tinh bột tan (0,2%) vào môi trường nước thịt pepton, khử trùng 121°C trong 20 phút, đổ vào Petri.
- Lấy vi khuẩn mồi cấy vào vial hay cấy lên đĩa thạch. Sau 2-5 ngày nhận thu cấy Lugol (xem phần nhuộm Gram) lên vial để quan sát kỹ năng phân giải tinh bột. Nếu thu cấy Lugol không bắt màu quanh vial cấy là vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột.

Hình 3.5. Phân tích dịch Lugol kiểm tra khả năng phân giải tinh bột của vi khuẩn.

3.9. Kỹ thuật tinh thể Dextrin

- Môi trường: hoà 50 g bột tinh thể vào 200 ml nước, khuấy kỹ, thêm 20 g CaCO_3 , sau đó bổ sung dần dần 750 ml nước sôi, đun sôi kỹ và đun sôi 10 phút. Phân môi trường vào các ống nghiệm (15 ml/ống), khử trùng 121°C trong 30 phút.

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Cấy vi khuẩn mị ho t hoá (18-24 giờ) vào môi trường trên, ủ 30°C trong 5-10 ngày.
- Bổ sung 1ml dung dịch tinh bột 3%, ủ 40°C trong 15 phút.
- Lấy 3 giọt dịch trong phía trên hoà với 1 giọt dung dịch Lugol và dần lên phiến kính, làm khô trong không khí và quan sát dưới kính hiển vi.
- Nếu có sự sinh ra, nhúng tinh thể dextrin hình lục giác bột màu lam có thể quan sát được sát mép vệt bột.

3.10. Kỹ thuật phân giải cellulosa

- Môi trường khoáng:

NH ₄ NO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
NaCl	1 g
CaCl ₂	0,1 g
FeCl ₃	0,02 g
Cao men	0,05 g
Nước cất	1000 ml

pH = 7,0- 7,2.

Phân môi trường vào ống nghiệm, khử trùng 121°C trong 20 phút.

- Môi trường Pepton:

Pepton	5 g
NaCl	5 g
Nước máy	1000 ml

pH = 7,0-7,2

Phân môi trường vào ống nghiệm, khử trùng 121°C trong 20 phút.

- Cho vào ống nghiệm mồi cấy gel dài 5-7 cm (vị vi khuẩn hiếu khí mọc phần bề mặt gel và nhô lên khỏi môi trường; vị vi khuẩn kỵ khí mọc phần đáy gel trong môi trường).
- Cấy vi khuẩn mị ho t hoá, thử nghiệm thích hợp, quan sát hình dạng của vi khuẩn trên bề mặt gel sau 1-4 tuần. Nếu vi khuẩn phát triển và làm nát gel cấy cấy là chúng có khả năng phân giải cellulosa (phản ứng dương tính); âm tính là không làm biến đổi gel.

Cách khác:

- Vào đĩa Petri mồi thạch 2% (15 ml thạch cho mồi đĩa Ø 9 cm).
- Bổ sung bột cellulosa (0,8%) và thạch (1,5%) vào môi trường ghi trên, đổ 5 ml lên trên thạch 2% đã chuẩn bị trong đĩa Petri.
- Cấy vi khuẩn mị ho t hoá thành vệt trên môi trường, thử nghiệm thích hợp trong 1-4 tuần và quan sát vòng phân giải cellulosa có thể có quanh vết cấy.

3.11. Kỹ thuật phân giải pectin

- Môi trường:

Cao men	5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5 g

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Thạch	8 g
Na-polypectat	10 g
Nước cất	1000 ml
NaOH 1N	9 ml
Dung dịch BTB 0,2%	12,5 ml.

hoà tan Na-polypectat và các thành phần khác cần khuấy mạnh và làm nóng môi trường trong nồi cách thủy. Khử trùng 121 °C không quá 5 phút rồi cấy vào Petri.

- Cấy vi khuẩn mủi hoại thành 8 chấm trên thạch agar, ủ nhiệt thích hợp 3 ngày rồi quan sát. Nếu quanh vết cấy có vết lõm xuống là dương tính (*Erwinia carotova*); không có vết lõm xuống là âm tính (*Erwinia herbicola*).

3.12. Khảo nghiệm thủy phân Esculin

- Môi trường:
Bổ sung Esculin (0,1%) và citrat sắt (0,05%) vào môi trường nước thịt pepton. Phân môi trường vào các ống nghiệm làm thạch nghiêng. Khử trùng 121 °C trong 20 phút.
- Cấy vi khuẩn mủi hoại (18-24 giờ), ủ nhiệt thích hợp sau 3,7 và 14 ngày rồi lấy ra quan sát.
- Kết quả: xuất hiện sắc tố màu nâu là phản ứng dương tính, không có là âm tính

3.13. Khảo nghiệm Dextran và Levan

- Môi trường
Casein thủy phân 15 g
Pepton 5 g
 ống kính 50 g
K₂HPO₄ 4 g
Thạch 10 g
Nước cất 1000 ml
Dung dịch Xanh Trypan (Tripan blue) 1% trong nước 7,5 ml
Dung dịch Tím kết tinh 1% trong nước 0,1 ml
pH 7,0

Khử trùng 115 °C trong 20 phút. Ủ nguội ở 50 °C, thêm 1ml dung dịch Kali-tellurit 1% (đã khử trùng bằng màng lọc) rồi cấy vào Petri.

- Cấy ria tủa khuẩn lactic ở 37 °C trong 24 giờ, sau đó giờ thêm nhiệt phòng trong 24 giờ.
- Vi khuẩn sinh dextran có khuẩn lạc nhũ, màu lam tím, bám dính và mọc lõm vào thạch (loài *Streptococcus sanguis*).
Vi khuẩn sinh levutan có khuẩn lạc nhũ màu phớt hồng (*Streptococcus salivarius*).
Nếu không sinh dextran và levan thì vi khuẩn có màu lam nhạt hoặc tím, kích thước nhỏ, di hóa sơ cấp (*Streptococcus mitis*).

3.14. Xác nh 3-Ketolactoza

- Môi tr ng:
Lactoza 10 g
Cao men 1 g
Th ch 20 g
N c c t 1000 ml
pH = 7,0-7,2

Kh trùng 115 °C trong 20-30 phút, a Petri.

- L y vi khu n m i ho t hoá (18-24 gi) c y i m lên th ch a, t nhi t thich h p trong 2 ngày t o khu n l c r r t.

- Pha thu c th Benedict:
CuSO₄.5H₂O 17,3 g
Na₂CO₃ (khan) 100 g
Na-Citrat 173 g
N c c t thêm t i 1000 ml

Cách pha: hoà Na₂CO₃ và Na-Citrat trong 600 ml n c c t, l c trong, sau ó thêm n c t i 850ml. Hoà tan CuSO₄ trong 100 ml n c, b sung n c cho t i 150 ml. Cu i cùng tr n dung d ch CuSO₄ vào dung d ch u, v a v a khu y.

- Nh thu c th Benedict lên khu n l c trên m t a th ch, t 30 phút tr lên nhi t phòng.
- K t qu : n u quanh khu n l c xu t hi n nh ng k t t a màu nâu thì là ph n ng d ng tính, n u không thì là âm tính.

3.15. Kh n ng kh Nitrat

- Môi tr ng:
N c th t pepton 1000 ml
KNO₃ 1 g
pH = 7,0-7,6

Phân môi tr ng vào các ng nghi m (4-5 ml/ ng), kh trùng 121 °C trong 15-20 phút.

- Chu n b thu c th Griess:
Dung d ch A: Acid sulfanilic 0,5 g
Acid acetic loãng (kho ng 10%) 150 ml.
Dung d ch B: Alpha Naphtylamin 0,1 g
N c c t 20 ml
Acid acetic loãng (kho ng 10%) 150 ml.
- Chu n b thu c th Diphenylamin: 0,5 g Diphenylamin hòa vào 100 ml H₂SO₄ c, thêm 20ml n c c t.
- C y vi khu n m i ho t hoá vào môi tr ng (m i ch ng c y 2 ng), t nhi t thich h p trong 1,3,5 ngày. Ch n 2 ng không c y vi khu n làm i ch ng.
- L y ng nghi m s ch và b sung l n l t các dung d ch nh sau:
D ch nuôi c y vi khu n (ho c môi tr ng ng i ch ng)
1 gi t dung d ch A

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

1 gi t dung d ch B

- K t qu :
 - N u d ch nuôi c y chuy n màu (, h ng, da cam hay nâu) là bi u th có nit rit, t c là vi khu n có kh n ng kh Nitrat.
 - N u d ch nuôi c y không chuy n màu, thêm 1-2 gi t thu c th Diphenylamin ki m tra s có m t c a Nitrat (chuy n màu xanh lam là có Nitrat ch ng t vi khu n không kh Nitrat; không chuy n màu t c là Nitrat ã c kh h t và nit rit c kh ti p t c thành các ch t khác nh N₂).
- Chú ý: ph n ng kh Nitrat th c hi n trong i u ki n k khí, vì v y không c phân vào ng nghi m quá ít môi tr ng.
 - i v i các vi khu n khác nhau nit rit có th là s n ph m cu i cùng c a quá trình kh Nitrat, nh ng c ngó th ch là s n ph m trung gian. Ngoài ra, t c kh c a các loài c ng khác nhau, vì th c n theo dõi th ng xuyên màu s c c a môi tr ng. Trong m i tr ng h p c n ph i làm thêm ph n ng v i ch t ch th diphenylamin.

3.16. Kh n ng kh Nitrit

- Môi tr ng:

Peptone	5 g
NaNO ₂	1 g
N c c t	1000 ml

pH = 7,3-7,4

Phân môi tr ng vào các ng nghi m, kh trùng 121 °C trong 15 phút.

- Chu n b thu c th Griess: gi ng nh ph n kh Nitrat.
- C y vi khu n, t 30 °C trong 1,3,7 ngày r i làm ph n ng xác nh.
- Nh vào d ch nuôi c y 1 gi t dung d ch A và 1 gi t dung d ch B (xem ph n kh Nitrat), 1 c nh . N u m t màu và sinh ra NH₃ là k t qu d ng tính (*Alcaligenes odorans*); n u v n gi màu là ph n ng âm tính, không kh nit rit (*Acinetobacter calcoaceticus*).

3.17. Kh n ng ph n nitrat hóa (Denitrification)

- Môi tr ng:

N c th t pepton	100 ml
KNO ₃	1 g

pH = 7,2-7,4

Phân môi tr ng vào các ng nghi m (4-5 ml), kh trùng 121 °C trong 30 phút.

- C y vi khu n m i ho t hoá. Dùng vaselin b t kín nút ng n ôxy, t nhi t thích h p trong 1-7 ngày và quan sát s phát tri n c a vi khu n (t ng c c a d ch nuôi c y, sinh khí NH₃). Vi khu n có phát tri n là ph n ng d ng tính, không phát tri n là âm tính.

3.18. Kh n ng sinh amonia

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Môi trường:
Pepton 5 g
Nước cất 1000 ml
pH= 7,2

Phân môi trường vào các ống nghiệm, khử trùng 121 °C trong 15-20 phút.

- Chuẩn bị thuốc thử Nessler:
Hoà tan 20 g IK trong 50 ml nước; bổ sung I₂Hg cho đến khi bão hòa (khoảng 32g), sau đó thêm 460 ml nước. Cuối cùng bổ sung 134 g KOH. Bảo quản trong lọ tối nhiệt phòng.
- Cấy vi khuẩn mị hoá (18-24 giờ), tối nhiệt thích hợp trong 1,3,5 ngày.
- Lấy vào ống nghiệm sạch mới để cấy nuôi cấy, nhúng vài giọt thuốc thử Nessler. Nếu xuất hiện kết tủa màu vàng nâu là phản ứng dương tính.

3.19. Xét nghiệm Ureaza

Mục đích: kiểm tra khả năng phân huỷ urê nhờ enzyme ureaza

- Môi trường:
Pepton 1 g
NaCl 5 g
Glucose 1 g
KH₂PO₄ 2 g
Dung dịch phenol 0,2% trong nước 6 ml
Thạch 20 g
Nước cất 1000 ml

Khử trùng xong chỉnh pH đến 6,8-6,9, môi trường có màu vàng hơi ánh là. Phân môi trường vào các ống nghiệm làm thạch nghiêng. Khử trùng lại 115 °C trong 30 phút.

- Chuẩn bị dung dịch Urê 20%, khử trùng bằng màng lọc, bổ sung vào các ống nghiệm khi đã nguội đến 50-55 °C (tên gọi Urê 2%), tối nhiệt thích hợp.
- Cấy vi khuẩn mị hoá, tối nhiệt thích hợp, sau 2-4 giờ lấy ra quan sát. Kiểm tra âm tính cần tiếp tục quan sát sau 4 ngày.
- Kiểm tra: môi trường chuyển màu cánh đào là phản ứng dương tính, màu sắc không thay đổi là âm tính.
- Chú ý: cần làm i-chenge âm tính (không bổ sung Urê), nhiệt là khi xác định các loài *Pseudomonas*, và i-chenge dương tính (so sánh với i-chenge âm tính có hoạt tính ureaza).

Làm cách khác:

- Cấy vi khuẩn vào môi trường thạch nghiêng nói trên và xác định hoạt tính ureaza sau 3 ngày và 7 ngày.
- Lấy vi khuẩn từ thạch nghiêng làm dịch huyền phù loãng trong ống nghiệm sạch.
- Nhúng 1 giọt phenol vào dịch huyền phù, chỉnh pH đến 7 (phenol chuyển từ vàng sang da cam).
- Chia dịch huyền phù vào 2 ống nghiệm sạch. Trong ống 1 thêm vài tinh thể Urê (khoảng 0,05-0,1 g), ống 2 giữ nguyên làm i-chenge. Sau vài phút ngưng dịch trong ống 1 (có

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Urê) chuy n sang ki m (phenol chuy n màu), bi u th vi khu n có ho t tính Ureaza; n u không thì là âm tính.

3.20. Xét nghi m sinh Indol

- Môi tr ng:

Dung d ch Pepton 1% trong n c
pH n 7,2- 7,6.

Phân môi tr ng vào các ng nghi m (1/3-1/4 th tích ng), kh trùng 115 °C trong 30 phút.

- Chu n b thu c th :

Para-dimethyl-amino-benzaldehyde	8g
Etanol 95%	760 ml
HCl c	160 ml

- C y vi khu n m i ho t hoá (18-24 gi), t nhi t thích h p và làm phép th t i các th i i m 1, 2, 4, 7 ngày.
- Nh thu c th theo mép ng nghi m (t o thành l p dày 3-5 mm). Gi a hai l p thu c th và d ch nuôi c y n u có màu là ph n ng d ng tính. N u màu s c không rõ r t thì thêm 4-5 gi t eter vào d ch nuôi c y, l c nh làm cho eter khu ch tán vào l p d ch, yên m t lát khi eter n i lên b m t thì l i thêm thu c th nói trên. N u trong môi tr ng có indol thì s xu t hi n màu trong l p eter.

Hình 3.5. Thu c th chuy n màu khi trong d ch nuôi c y có indol.

3.21. Xét nghi m Phenylalanin desaminaza

(ki m tra kh n ng chuy n hoá nhóm amin (-NH₂) trong acid amin)

- Môi tr ng:

Cao men	3 g
Na ₂ HPO ₄	1 g
DL-Phenylalanin (ho c L-Phenylalanin)	1 g
NaCl	5 g
Th ch	12 g
N c c t	1000 ml
pH = 7,0	

Phân môi tr ng vào các ng nghi m, kh trùng 121 °C trong 10 phút, t th ch nghiêng.

- Thu c th : dung d ch FeCl₃ 10% (W/V)
- C y vi khu n m i ho t hoá, t 37 °C, làm phép th sau 4 gi ho c 8-24 gi .
- Nh 4-5 gi t thu c th lên b m t th ch nghiêng có vi khu n phát tri n, n u xu t hi n màu l c là ph n ng d ng tính (do s n sinh ra acid Phenylpyruvic), n u không i màu thì là ph n ng âm tính.

Hình 3.6. Thí nghi m ki m tra phenylalanin desaminaza.

3.22. Tryptophan desaminaza

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Có hai cách ki m tra:

Cách th nh t:

xác nh ng th i Tryptophan desaminaza, Ureaza và kh n ng sinh Indol.

- Môi tr ng:

L-Tryptophan	3 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NaCl	5 g
Etanol 95%	10 ml
N c c t	900 ml.

Thêm phenol (kho ng 25- 30mg)
pH = 6,8-6,9

Phân môi tr ng vào các bình tam giác, kh trùng 121 °C trong 20 phút.

- Hoà 20 g Urê vào 100ml n c, kh trùng b ng màng l c, b sung vào môi tr ng ã chu n b trên (thao tác vô trùng). Phân môi tr ng vào các ng nghi m vô khu n (3-4 ml).
- C y vi khu n m i ho t hoá (18-24 gi), nuôi nhi t thích h p trong 24 gi .
- L y ra 2-4 gi t d ch nuôi c y, thêm 1 gi t dung d ch FeCl₃ (kho ng 33%). N u hi n màu nâu là ph n ng Tryptophan desaminaza đ ng tính, không hi n màu là ph n ng âm tính. Dùng vi khu n *Proteus* làm i ch ng d ng tính.
- N u môi tr ng sau khi nuôi c y vi khu n chuy n t màu vàng sang là bi u hi n có ho t tính Ureaza. Dùng thu c th para-dimethylaminobenzaldehyd ki m tra s hình thành indol. N u không nh ki m tra ureaza thì không c n b sung phenol và Urê vào môi tr ng.

Cách 2 th hai:

- Chu n b hoá ch t:

L-Tryptophan	0,2-0,5%
--------------	----------

N c mu i sinh lý ho c dung d ch m phosphat pH 6,8

D ch A:	50 ml KH ₂ PO ₄ 0,2 M (27,2g/L)
D ch B:	23,6 ml Na ₂ CO ₃ 0,2 M (8g/L)

Tr n d ch A và B v i nhau

FeCl₃ 33%
- C y vi khu n vào môi tr ng th ch nghiêng n c th t pepton, t nhi t thích h p trong 24 gi .
- L y 4 ng nghi m s ch, thêm vào m i ng 4 gi t dung d ch L- Tryptophan 0,2-0,5% và 4 gi t n c mu i sinh lý (hay dung d ch m phosphat pH 6,8).
- L y vi khu n t th ch nghiêng làm thành d ch huy n phù m c trong 2 ng, l i 2 ng làm i ch ng, gi nhi t phòng trong 15-20 phút.
- Thêm vào m i ng 1 gi t dung d ch FeCl₃ (33%). N u hi n màu nâu là ph n ng đ ng tính, không i màu là âm tính. Có th dùng vi khu n *Proteus* làm i ch ng d ng tính.

3.23. Carboxylaza i v i Ornithin, Lysin, và Arginin

- Môi tr ng:

Pepton	5 g
Cao th t	5 g
D-Glucoza	0,5 g
Bromocresol purple (BCP) 1,6%	0,625 ml
Cresol 0,2%	2,5 ml
Th ch	3-6 g
N c c t	1000 ml

Hòa tan các thành ph n trên trong n i cách th y, ch nh n pH 6, thêm ch th màu.

- Chia môi tr ng thành 4 ph n u nhau, b sung t ng ch t L-Ornithin, L-Lysin, L-Arginin v i n ng 1% (n u dùng DL-acid amin thì l y n ng 2%), sau ó ch nh pH n 6,0-6,3. M t ph n không thêm acid amin dùng làm i ch ng. Phân vào các ng nghi m nh (m i ng 3-4 ml), kh trùng 121 °C trong 10 phút. Môi tr ng ch a Ornithin có th t o m t ít k t t a nh ng không nh h ng n k t qu thí nghi m.
- C y vi khu n m i ho t hoá (18-24 gi), sau ó vasetin b t kín nút, nuôi i u ki n thích h p. Vi khu n ng ru t thu c h Enterobacteriaceae c n nuôi 37 °C trong 4 ngày và theo dõi k t qu hàng ngày. Các vi khu n phi lâm sàng nuôi 30 °C, quan sát trong 7 ngày. N u ch th màu chuy n sang màu tía hay màu tía có ánh là d ng tính, n u màu vàng (nh ng i ch ng) là âm tính. Vi khu n ng ru t th ng bi u hi n ph n ng d ng tính sau 1-2 ngày, nh ng c ng có khi ch m h n, c n theo dõi qua 3-4 ngày.

3.24. Arginin dihydrolaza

- Môi tr ng Thornley:

Pepton	1 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Th ch	6 g
Phenol	0,01 g
L-Arginat	10 g
N c c t	1000 ml

pH = 7,0-7,2.

Phân môi tr ng vào các ng nghi m (4-5 ml), kh trùng 121 °C trong 15 phút. Chú ý làm ng i ch ng không có Arginat.

- C y vi khu n m i ho t hoá, dùng vasetin b t kín nút ng nghi m, nuôi nhi t thích h p trong 3, 7, 14 ngày quan sát. Môi tr ng chuy n sang màu là d ng tính, không chuy n màu là âm tính.

3.25. Acetylamin

- Dung d ch Acetylamin:

Acetylamin	2 g
------------	-----

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- | | |
|-----------------------|-------|
| Nước cất | 20 ml |
| (không cần khử trùng) | |
- Dung dịch mẫu:

K ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
KCl	8 g
Nước cất	1000 ml

Khử trùng 115 °C trong 20 phút.
 - Dung dịch làm thí nghiệm: Pha loãng dung dịch Acetylamin trong dung dịch mẫu theo tỷ lệ 1:99 vol/vol.
 - Thuốc thử Nessler:

KI	5 g
Nước cất	5 ml

Thêm dung dịch HgCl₂ bão hòa, 1 ml cho đến khi lọc mẫu mà vẫn còn một ít kết tủa thì dừng. Thêm 40ml NaOH 9N rồi bổ sung nước đến 100 ml.

Lấy 1 vòng que cấy vi khuẩn từ vỉ đĩa thí nghiệm nói trên, cấy nhiễm thích hợp trong 24 giờ. Thêm 1 giọt thuốc thử Nessler. Phản ứng là dương tính khi có kết tủa màu nâu hay nâu (vi khuẩn *Comamonas acidovorans*), phản ứng âm tính khi thấy màu vàng (*Pseudomonas stutzeri*).

3.26. Thủy phân Hippurat ; Phương pháp Yong & Thompson

(dùng khi nhuộm tên *Streptococcus*, *Campylobacter* và *Gardnerella vaginalis*):

- Dung dịch cơ chất:

Na-Hippurat	0,25 g
Nước cất	25 ml

Khử trùng bằng màng lọc
- Thuốc thử:

Ninhydrin	3,5 g
Aceton-butanol (1:1 vol/vol)	100 ml

Bổ sung trong lọ thí
- Cấy 2 giọt huyền phù vi khuẩn vào dung dịch cơ chất, giữ 37 °C trong 1 giờ. Thêm 2 giọt thuốc thử, giữ 15 phút.
- Phản ứng là dương tính nếu xuất hiện màu tím (*Campylobacter jejuni*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae*), phản ứng là âm tính nếu sau 15 phút chuyển màu (*Campylobacter coli*, *Streptococcus agalactiae*).
- Chú ý: Lấy vi khuẩn cấy pha loãng, thí nghiệm trước và sau khi thêm thuốc thử phải chú ý xác. Tránh ánh sáng khi giữ thuốc thử.

Phương pháp Baird-Parker:

- Môi trường:

Pepton typtin	10 g
Cao thịt	1 g
Glucose	1 g
NaH ₂ PO ₄	5 g
Na-Hyppurat	10 g
Nước cất	1000 ml

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Phân môi trường vào các ống nghiệm, khử trùng 121 °C trong 30 phút.

- Thuộc tính:
H₂SO₄ c 50 ml
N c c t 50 ml
t t H₂SO₄ c vào n c c t
- Cấy vi khuẩn m i ho t hoá (18-24 gi) vào môi trường trên, nuôi nhi t thích h p trong th i gian 4-6 tu n.
- Ph n ng xét nghi m: tr n 1 ml d ch nuôi c y v i 1,5 ml thu c th . Ph n ng là đ ng tính khi xu t hi n tinh th (do Hyppyrat c chuy n hoá thành Benzoin); không xu t hi n tinh th là âm tính.

3.27. Hoạt tính ADN-aza

Môi trường:	
Pepton casein	
Pepton đậu tương	10 g
NaCl	5 g
ADN	5 g
Toluid-Blue	2 g
Thạch	0,1 g (có thể pha thành dung dịch rồi cho vào)
Nước cất	15 g 1000 ml

Hoà tan các thành phần của môi trường bằng nhi t, sau ó bổ sung ADN và Toluid-blue, tr n u r i phân vào bình. Khử trùng 121 °C trong 30 phút, th ch a.

- Cấy vi khuẩn m i ho t hoá (18-24 gi) thành i m trên a th ch, nuôi i u ki n thích h p trong 2 ngày.
- Ph n ng là đ ng tính trong tr ng h p quanh c m c y có vòng màu (dùng ch ng *Salmonella* làm i ch ng đ ng tính).

3.28. Hoạt tính Phosphatasa

- Môi trường:
Làm nóng ch y môi trường th ch-n c th t-pepton (ã kh trùng)
Thêm 1% Phenolphthalein diphosphat (kh trùng bằng màng l c).
th ch a.
- Cấy vi khuẩn m i ho t hoá thành i m trên th ch a, nuôi i u ki n thích h p trong 2 ngày.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Phân ứng xét nghiệm: lấy 0,1ml nước amonia pha loãng để thử, sau 20 phút xem kết quả. Phân ứng là dương tính nếu khuẩn lạc chuyển màu phenol (*Staphylococcus aureus*); không chuyển màu là âm tính.

3.29. Khả năng làm dịch hóa Gelatin

- Môi trường:

Pepton	5 g
Gelatin	100-150 g
Nước cất	1000 ml

pH = 7,2-7,4

Phân môi trường vào các ống nghiệm (4-5 ml), khử trùng 115 °C trong 20 phút.

- Cấy vi khuẩn mới cấy (18-24 giờ) chính sâu vào môi trường gelatin, giữ 2 ống không cấy làm đối chứng, nuôi 20 °C trong thời gian 2,7,10,14,30 ngày.
- Quan sát khả năng làm dịch hóa gelatin tại nhiệt phòng 20 °C trở xuống. Nếu bề mặt môi trường gelatin không lõm xuống, gelatin vẫn trạng thái rắn thì là phản ứng âm tính (không sinh gelatinaza); nếu mặt phẳng hay toàn bộ gelatin hóa lỏng thì là phản ứng dương tính. Nếu so với đối chứng âm tính thì vi khuẩn âm tính, gelatin chuyển hóa lỏng nhưng bề mặt lõm xuống thì cần xem xét là dương tính (mức độ dịch hóa thấp). Nếu vi khuẩn hoàn toàn không sinh trưởng thì có thể là không mọc trên gelatin hoặc môi trường cấy thích hợp.
- Chú ý:
 - Nếu vi khuẩn chỉ sinh trưởng nhiệt trên 20 °C, lúc quan sát gelatin hóa lỏng cần đợi môi trường nuôi cấy mới lúc vào nhiệt độ phòng để so sánh với đối chứng âm tính.
 - Khử trùng nhiệt quá cao hay quá thấp như hình ảnh kết quả, nên khử trùng 115 °C trong 15 phút.
 - Gelatin chất lượng không đều nhau, lỏng dùng khó thao tác, nên chọn nồng độ tổng thể 20 °C là tốt. Nên dùng thao tác mới loại gelatin cho toàn bộ thí nghiệm.



Hình 3.7. Ví dụ minh họa kết quả kiểm tra khả năng làm dịch hóa gelatin (sinh gelatinaza), *Escherichia coli*- âm tính, *Pseudomonas aeruginosa*- dương tính.

3.30. Hoạt tính Lipaza (với Tween 80)

- Môi trường:

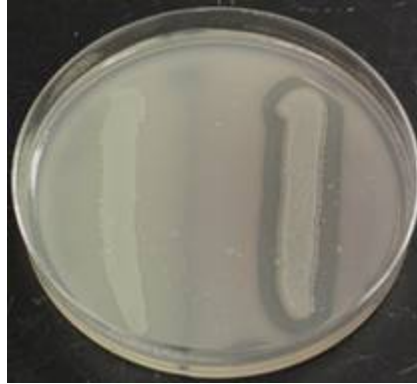
Pepton	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,1 g

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Thạch 9 g
Nồng độ 1000 ml
pH = 7,4.

Khử trùng 121 °C trong 20 phút, nguội rồi thêm Tween 80 nồng độ 1%, thạch a (có thể thay Tween 80 bằng dầu tributyrin).

- Cấy vi khuẩn mủi ho t hoá (18-24 giờ) thành vạch, nuôi trong 7 ngày, hàng ngày lấy ra quan sát.
- Phấn ng là độ tính n u quanh v t c y có v ch trong, n u không có thì là âm tính.



Hình 3.8. Ví dụ minh họa kết quả phản ứng thử hoạt tính Lipaza: âm tính - *Salmonella typhimurium* (bên trái), dương tính - *P. aeruginosa* (bên phải).

3.31. Hoạt tính Lipaza (với dầu ngô)

- Môi trường:
Pepton 10 g
Cao 3 g
NaCl 3 g
Thạch 20 g
Xanh Victoria (Victoria Blue)
dung dịch 1:5000 trong nước 100 ml
Dầu ngô 50 ml
Nồng độ 900 ml.

Hoà tan các thành phần của môi trường (trừ dầu ngô) bằng đun nóng, sau đó bổ sung dầu ngô, khuấy đều bằng máy khuấy tay, chỉnh pH 7,8. Phân môi trường vào các ống nghiệm, khử trùng 115 °C trong 30 phút. Thạch nghiêng hoặc thạch a, môi trường có màu nhợt.

- Cấy vi khuẩn mủi ho t hoá (18-24 giờ), nuôi nhiệt thích hợp trong 24 giờ.
- Quan sát: phản ứng là độ tính khi môi trường chuyển sang màu lam, không chuyển màu là âm tính.

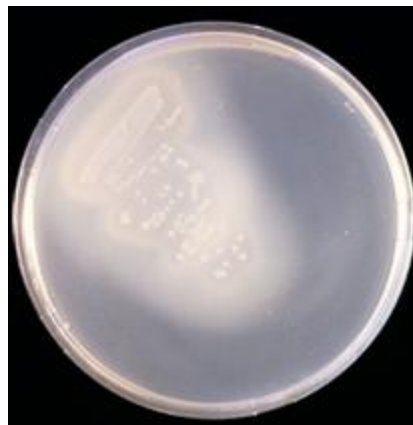
Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html



Hình 3.9. Ví dụ minh họa kết quả phân tích hoạt tính lipaza vi khuẩn.

3.32. Hoạt tính Lecithinaza

- Trộn lòng trắng trứng với cùng trứng lòng trắng trứng muối (thao tác vô trùng) tạo thành dịch huyền phù.
- Lấy ra 10 ml dịch huyền phù trên hòa tan vào môi trường thạch-nếu thạch-pepton và khử trùng, ngưng tụ ở 50-55 °C rồi đổ vào Petri.
- Cấy vi khuẩn mới nuôi cấy (18-24 giờ) thành hình trên thạch, mỗi hình kính khoảng 2-3mm. Cấy 5-7 chủng trên một đĩa. Với vi khuẩn kỵ khí có thể cấy lá kính mỏng (lamelle) lên bề mặt, tuy nhiên tốt nhất là cấy vào tủ nuôi kỵ khí.
- Kiểm tra thích hợp trong 18-24 giờ, mất thạch (như chi *Bacillus*) cần thời gian lâu hơn (48 giờ) và quan sát bề mặt của môi trường thạch.
- Nhuộm quang và đặc biệt có vết trong là phân giải lecithin (Lecithinase chuyển hóa thành lipid do vi khuẩn sinh men lecithinaza).
- Chú ý: khi trộn dịch huyền phù lòng trắng trứng vào môi trường thạch không nên tiến hành nhiệt quá cao vì sẽ làm ngưng kết lecithin có trong lòng trắng trứng.



Hình 3.10. Khả năng phân hủy Lecithin của *Clostridium*

3.33. Khả năng sản sinh H₂S

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Phương pháp cấy cấy

- Môi trường:

Pepton	10 g
NaCl	5 g
Cao thạch	10 g
Cystein	0,5 g
Nước cất	1000 ml

pH = 7,0-7,4

Phân môi trường vào các ống nghiệm (4-5 ml), khử trùng 112°C trong 20-30 phút.

- Cấy cấy thành đờm 0,5-1cm, dài tùy thuộc vào ống nghiệm và cao cao môi trường. Thêm vào ống nghiệm dung dịch Chì-acetat, sấy khô ống nghiệm trong tủ sấy ở nhiệt độ phòng Petri và khử trùng.
- Cấy vi khuẩn hiếu khí (18-24 giờ). Dùng panh vô khuẩn cấy cấy vào ống nghiệm, dài nút bông như không chạm vào môi trường. Nuôi vi khuẩn hiếu khí thích hợp, sau 3,7,14 ngày thì lấy ra quan sát. Nếu cấy cấy bình thường là phản ứng dương tính, nếu không cấy cấy là âm tính.
- Chú ý: phương pháp này rất nhạy, không thích hợp cấy cấy vi khuẩn kỵ khí. Không cấy cấy môi trường chì-acetat gần môi trường quá tránh bị hút ẩm, nhưng cấy cấy không nên cấy cấy xa quá. Ngoài cấy cấy không cấy cấy vi khuẩn nên lấy cấy cấy vi khuẩn cấy cấy là âm tính làm cấy cấy.

Phương pháp cấy cấy Triclinic vi khuẩn kỵ khí

- Môi trường:

Cao thạch	7,5 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Gelatin	100-120 g (hay thay thế 15 g)
Dung dịch FeCl_2 10%	5 ml (khử trùng riêng bằng màng lọc)
Nước cất	1000 ml

pH = 7,0

Khử trùng 112°C trong 20 phút, bổ sung dung dịch FeCl_2 (đã khử trùng) vào khi thạch hay gelatin chưa đông. Phân vào các ống nghiệm vô khuẩn (4-5 ml), ngay lập tức nhúng vào nước lạnh cho đông lại.

- Cấy cấy sâu vi khuẩn vào các ống, nuôi 30°C trong 1,3,7 ngày. Nếu môi trường chuyển thành màu đen là phản ứng dương tính, nếu không cấy cấy là âm tính.
- Chú ý: phương pháp này dùng khi cần nhận vi khuẩn thuộc Enterobacteriaceae. Có thể dùng FeSO_4 thay thế cho FeCl_2 . Nếu nuôi cấy 20°C có thể dùng kỹ thuật xác định gelatinaza.

3.34. Khả năng phân giải sữa (Litmus Milk Reaction)

- Môi trường: sữa tiệt trùng, lọc qua đệm, ly tâm và hút bỏ lớp trên, phần dĩnh là sữa không chứa lipid. Có thể dùng sữa bột đã lọc để cấy cấy (hoà tan 100 g sữa bột vào 1000 ml nước).

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- **Thuốc thử Litmus:**

hoà tan 2,5 g Litmus trong 100 ml nước cất, lọc bỏ giấy lọc, qua màng lọc. Có thể bảo quản lâu.

- **Môi trường sữa - Litmus:**

Dung dịch Litmus 2,5% 4 ml

Sữa 1000 ml

Môi trường có màu trắng.

Phân môi trường vào các ống nghiệm (4 ml), khử trùng gián tiếp hoặc khử trùng 112 °C trong 20-30 phút.

- Cấy vi khuẩn mới hoá (18-24 giờ), nuôi nhiệt thích hợp, sau 1,3,5,7,14 ngày lấy ra quan sát.
- Đưa vào bình của môi trường mà có những kết luận như sau:
Môi trường chuyển thành màu trắng → phản ứng khử Litmus
Môi trường trở nên trong → phản ứng pepton hoá
Môi trường chuyển màu → phản ứng sinh acid
Môi trường chuyển màu xanh lam → phản ứng sinh kiềm
Môi trường chuyển màu đỏ, sữa đông kết → sinh acid và đông kết
Nồng độ do men: không chuyển màu hoặc có màu lam, sữa vón cục và đông kết
- **Chú ý:** tất nhiên nên dùng sữa tiệt trùng, không cần kiểm tra pH.

3.35. Khả năng oxy hóa Gluconat

- m Kali phosphat 1/15 mol/L, pH 7,2:

A) KH_2PO_4 9,078 g/L

B) $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23,876 g/L

Trộn 3 ml dung dịch A với 7 ml dung dịch B có dung dịch m phosphat 1/15 mol/L, pH 7,2

- **Thuốc thử Feling:**

Dung dịch A: CuSO_4 tinh thể 34,64 g

Nước cất thêm tới 500 ml

Dung dịch B: Na-Tartrat 173 g

KOH 125 g

Nước cất thêm tới 500 ml

Trộn khi dùng trộn hai dung dịch A và B theo tỉ lệ 1:1 (vol/vol), sử dụng trong ngày.

- Chuẩn bị dung dịch gluconat 1% trong m phosphat pH 7,2, phân vào các ống nghiệm, mỗi ống 2ml. Khử trùng 112 °C trong 30 phút.
- Lấy vi khuẩn mới hoá (18-24 giờ) cấy vào ống nghiệm phù hợp trong m phosphat, giữ 30 °C qua đêm.
- Thêm vào mỗi ống 0,5 ml thuốc thử Feling, lắc trong bình cách thủy sôi 10 phút.
- Kết quả: nếu dung dịch chuyển từ màu lam sang màu vàng lục, lọc đa cam hoặc có kết tủa là phản ứng dương tính; nếu không có màu là âm tính.
- **Chú ý:** nếu dùng gluconat canxi thì để tránh kết tủa với các phosphat, tuy nhiên không nên ngừng kết quả thí nghiệm.

3.36. Khả năng oxy hóa Etanol

- Môi trường *Acetobacter* dùng môi trường sau:
Cao men 10 g
Nước máy 1000 ml
Xanh Bromophenol (BPB) 0,04% 20 ml.
pH = 6,8-7,0

Phân môi trường vào các ống nghiệm (4-5 ml), khử trùng 121 °C trong 20 phút. Lúc sôi thêm ethanol vào môi trường nồng độ 2-10% (vol/vol)

- Với các vi khuẩn khác: dùng môi trường như trong thí nghiệm oxy hóa/lên men, thay nồng độ ethanol với nồng độ 1%. Có thể không cần thiết.
- Các vi khuẩn mị hoại, nuôi 1,3,7,14 ngày trong điều kiện thích hợp
- Kết quả: nếu môi trường chuyển màu vàng (do sinh acid) thì là dương tính, không đổi màu là âm tính.

Phương pháp khác (dùng phân lập và kiểm tra *Acetobacter*):

- Thêm vào các môi trường nói trên 2% thạch và 1% CaCO₃; nồng độ ethanol cuối cùng là 2%; không thêm chất màu. Thạch.
- Các vi khuẩn trên thạch, nuôi 3, 7, 14 ngày điều kiện thích hợp.
- Kết quả: nếu xung quanh khuẩn lạc có vòng phân giải trong là kết quả dương tính, nếu không là âm tính (*Acetobacter* lúc phân giải CaCO₃ nên tạo vòng trong, nhưng sau đó acetat canxi tạo ra bởi oxy hóa tiếp chuyển thành CaCO₃ vòng trong chuyển màu trắng sáng do acid acetic ãb oxy hóa).

3.37. Khả năng oxy hóa acid acetic

- Môi trường:
Cao men 10 g
Ca-Acetate 10 g
Thạch 20 g
Nước máy 1000 ml
pH 7,0-7,2

Phân môi trường vào bình tam giác hoặc các ống nghiệm lớn khử trùng, thạch hoặc làm ống thạch nghiêng.

- Các vi khuẩn mị hoại (18-24 giờ), nuôi 3-5 ngày điều kiện thích hợp
- Kết quả: nếu xung quanh khuẩn lạc có vòng trắng là phản ứng dương tính (acetat ãb oxy hóa, canxi giải phóng ra tạo màu trắng), nếu không thì là âm tính.

3.38. Xác định Indol-Pyruvic acid (IPA)

- Môi trường SIM:
Cao thịt 3 g
Pepton 30 g
Na₂S₂O₃.5H₂O 0,05 g
Cystin hydrochlorid 0,2 g

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Ammonium-ferric-citrat	0,5 g
Thạch	4 g
Nước cất	1000 ml

Hoà tan các thành phần môi trường trong nồi cách thủy, chỉnh pH đến 7,4, phân vào các ống nghiệm nhỏ, khử trùng 121 °C trong 15 phút, để nguội.

- Thuốc thử Kovac (có thể mua sẵn hoặc tự pha):
p-dimethyl aminobenzaldehyd 8 g
Etanol 760 ml
HCl 160 ml
- cấy vi khuẩn mới hoặc tái (18-24 giờ) vào môi trường SIM, nuôi 30°C trong 24 giờ.
- Kết quả: nếu phản ứng trên cả môi trường chuyển màu nâu là phản ứng IPA dương tính, nếu không là phản ứng âm tính.
- Sau đó thêm thuốc thử Kovac vào và quan sát. Nếu trên mặt thạch xuất hiện màu nâu là phản ứng Indol dương tính.



Hình 3.11. Ví dụ minh họa phản ứng Indol dương tính

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

www.mientayvn.com

Dịch tiếng anh chuyên ngành khoa học tự nhiên và kĩ thuật.

Dịch các bài giảng trong chương trình học liệu mở của học viện MIT, Yale.

Tìm và dịch tài liệu phục vụ cho sinh viên làm seminar, luận văn.

Tại sao mọi thứ đều miễn phí và chuyên nghiệp ???

Trao i tr c tuy n t i:

http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html