

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN**

---oOo---

Thạc sĩ NGUYỄN TIẾN DŨNG

Tài liệu môn

**PHƯƠNG PHÁP KIỂM NGHIỆM
VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM**

(Tài liệu sử dụng nội bộ)

Thành phố Hồ Chí Minh - 2007

Chương I
**CHỈ TIÊU VI SINH VẬT THƯỜNG ĐƯỢC KIỂM SOÁT TRONG NƯỚC,
THỰC PHẨM VÀ MỸ PHẨM**

Có rất nhiều vụ ngộ độc hay các bệnh gây ra do thực phẩm đã và đang diễn ra, mặt dù có các luật về an toàn vệ sinh thực phẩm đã được ban hành và ngày càng chặt chẽ và được sự quan tâm của cộng đồng.

Cho đến nay vẫn còn có những cách hiểu và phân biệt không thống nhất về khái niệm các bệnh gây ra do thực phẩm hay ngộ độc thực phẩm. Song để phân biệt hai vấn đề này thông thường dựa vào các khái niệm này như sau:

- Ngộ độc thực phẩm là các biểu hiện bệnh do tiêu thụ thực phẩm có chứa số lượng lớn vi sinh vật, chúng nhân lên nhanh trong quá trình chế biến hay bảo quản. Các vi sinh vật có thể hiện diện một số lượng rất ít ban đầu trong thực phẩm hay nhiễm vào do sự tiếp xúc qua quá trình chế biến.
- Các bệnh có nguồn gốc từ thực phẩm do tiêu thụ những thức ăn chứa các vi sinh vật hay sản phẩm của chúng, không phụ thuộc vào số lượng nhiều hay ít do đó không phụ thuộc vào sự chế biến hay bảo quản.

1. Ngộ độc thực phẩm

Ngộ độc thực phẩm diễn ra ở nhiều người, có cùng một triệu chứng và cùng một thời điểm sau khi tiêu thụ thực phẩm. Tuy nhiên mức độ tác động đến từng người sẽ khác nhau bởi vì khả năng đáp ứng với độc tố của từng người khác nhau phụ thuộc vào thể trạng và khả năng trung hoà độc tố của từng người.

Triệu chứng của ngộ độc thực phẩm thường có các biểu hiện như tiêu chảy, chóng mặt, nôn mửa, đau nhức người, sốt, đau đầu. Các biểu hiện triệu chứng phụ thuộc vào từng loài vi sinh vật gây nên. Mức độ nguy hiểm và triệu chứng của bệnh có thể gây nên do độc tố của chúng tiết vào thực phẩm hay do chính tế bào của chúng gây nên. Để có thể gây ngộ độc thực phẩm, vi sinh phải hiện diện với số lượng tế bào lớn và phụ thuộc liều lượng của từng chủng loại nhiễm vào, thực phẩm phải có các điều kiện lý hoá thích hợp cho vi sinh vật đó phát triển, nhiệt độ và thời gian phải thích hợp cho quá trình tăng trưởng của chúng từ khi chúng nhiễm vào cho đến khi tiêu thụ để vi sinh vật nhân lên đến đủ liều lượng hay sản xuất đủ lượng độc tố gây hại.

2. Các vi sinh vật có thể gây ngộ độc thực phẩm

Salmonella

Số lượng *Salmonella* đủ để gây ngộ độc là khi chúng hiện diện cả triệu tế bào trong một gam thực phẩm. Các triệu chứng do *Salmonella* gây ra thường là tiêu chảy, ói mửa, buồn nôn. Thời gian ủ bệnh cho đến khi các triệu chứng biểu hiện thường sau 12-36 giờ kể từ khi tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm. Triệu chứng thường kéo dài ít nhất từ 2-7 ngày. Không phải tất cả mọi người khi tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm *Salmonella* đều có biểu hiện bệnh, ngược lại một số người không có triệu chứng lâm sàng khi tiêu thụ phải thực phẩm nhiễm vi sinh vật này khi đó chúng được bài tiết ra ngoài. Các loại thực phẩm có nguy cơ bị nhiễm *Salmonella* như thịt gia cầm, sản phẩm thịt, trứng và các sản phẩm của trứng, thủy sản. Nguồn nhiễm vi sinh vật vào các loại thực phẩm thường có nguồn gốc từ đường ruột của người và các loài động vật, chúng có thể được nhiễm gián tiếp hay trực tiếp. *Salmonella* gây nên bệnh sốt thương hàn thuộc các serotype *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A, B, C*. các dòng này thường không gây bệnh cho các loài động vật.

Campylobacter

Đây là vi sinh vật gây nên bệnh viêm nhiễm đường ruột, bằng các phương pháp phân lập đã chứng minh vi sinh vật này hiện diện khắp nơi. *Campylobacters* là một trong những hệ vi

sinh vật của nhiều loại động vật và chim. Nhưng các dòng có khả năng gây ngộ độc thực phẩm không thể phát triển khi nhiệt độ thấp hơn 30°C, đây là vi sinh vật ưa nhiệt bắt buộc. Sản phẩm sữa và thịt gia cầm là những nguồn có thể gây nên ngộ độc do vi sinh vật này. Nước cũng là một trong những nguồn mang bệnh này. *Campylobacters* là vi sinh vật rất nhạy với nhiệt độ, chúng bị tiêu diệt hoàn toàn bằng phương pháp thanh trùng Pasteur, chúng không thể sống sót trong thực phẩm có môi trường acid. Chúng không thể phát triển trong thực phẩm bảo quản trong điều kiện hiếu khí mà chỉ phát triển trong các loại thực phẩm hút chân không.

Khi xâm nhiễm *Campylobacter*, thời gian ủ bệnh thường từ 2-11 ngày. Các triệu chứng do vi sinh vật này gây nên như đau nhức, tiêu chảy, sốt, đau đầu, khó chịu, chuột rút, lạnh cóng, mê sảng. Thỉnh thoảng có những biểu hiện bệnh giống như cảm cúm.

Clostridium perfringens

Quan niệm về sự ngộ độc thực phẩm do *Clostridium perfringens* gây ra đã có những thay đổi trong những năm gần đây. Theo những quan niệm trước đây cho rằng các dòng *C.perfringens* kháng nhiệt, tạo bào tử và không làm tan máu mới có thể gây ngộ độc thực phẩm. Nhưng trong những năm gần đây các dòng nhạy cảm với nhiệt, không làm tan máu cũng được tìm thấy trong các vụ ngộ độc do vi sinh vật này gây nên.

Vì các bào tử của *C. perfringen* kháng nhiệt nên chúng thường sống sót qua quá trình nấu chín. Tuy nhiên cũng phụ thuộc vào thời gian tiếp xúc với nhiệt. Nếu những bào tử sống sót, khi gặp điều kiện thích hợp chúng sẽ nảy mầm và nhân lên. Khi đun nấu thức ăn ở nhiệt độ thấp và thời gian ngắn có thể làm cho các dòng kháng nhiệt tồn tại vì thế chúng sẽ gây tái nhiễm sau khi bảo quản. Các nguồn thực phẩm có thể gây ngộ độc với các vi sinh vật này thường là thịt gia cầm, nhất là các loại gia cầm lớn đông lạnh sâu, thịt trong các hầm chứa. *C. perfringens* cũng được tìm thấy trong đất, trong phân người và trong các loại thực phẩm khác. Các triệu chứng do vi sinh vật này gây ra thường là đau thắt vùng bụng, tiêu chảy. Thời gian ủ bệnh từ 12-24 giờ. Các triệu chứng lâm sàng gây nên do độc tố của chúng.

Clostridium botulinum

Đây là vi sinh vật phân bố khắp nơi trong đất, trong nước và trong các gia súc và các loài thủy sản. Vi sinh vật này sinh độc tố gây bệnh ngộ độc thịt cho người (botulism). Bệnh biểu hiện rất nghiêm trọng ở người. Bệnh gây ra do độc tố được hình thành bởi *C.botulinum* nhiễm trong thực phẩm. Triệu chứng lâm sàng của bệnh là ói mửa, buồn nôn, sau đó có những biểu hiện rối loạn thành kinh như choáng váng, rối loạn thị giác, rối loạn các cơ ở cổ và miệng, đau ở vùng ngực, khó thở và tê liệt, có thể dẫn đến tử vong. Các triệu chứng trên biểu hiện sau 12-36 giờ sau khi tiêu thụ thực phẩm nhiễm độc tố. Các triệu chứng thường kéo dài 2-6 ngày tùy theo tình trạng nhiễm độc và sức khỏe cũng từng bệnh nhân.

Các loại thực phẩm như thịt, rau quả không được bảo quản đúng qui định hay lây nhiễm từ đất, phân động vật hay do chế biến không đủ nhiệt độ trước khi dùng, các sản phẩm đóng hộp không đúng qui cách cũng có nguy cơ nhiễm vi sinh vật này rất cao. Điều kiện thích hợp cho việc hình thành độc tố của vi sinh vật này điều kiện môi trường kỵ khí, pH trung tính, không có các vi sinh vật khác cạnh tranh. Độc tố botuline do *C. botulinum* tiết ra gồm một số loại khác nhau như A, B, C1, C2, D, E, F, G. các độc tố này là những protein có trọng lượng phân tử lớn khoảng 1 triệu danton. Nhưng những dạng có tác động mạnh đến con người là A, B, và E. đây cũng là một trong những loại độc tố sinh học có cường độ mạnh nhất. Trong những năm gần đây, các vụ ngộ độc botulism gây ra do *C.botulinum* dòng E thường được phát hiện khi tiêu thụ cá và các sản phẩm thủy sản. Dòng vi sinh vật này thường xuyên phân lập được từ các mẫu bùn đáy tại các cửa sông.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus là VSV có khả năng sản sinh một số loại độc tố đường ruột bền nhiệt, không bị phân huỷ khi đun ở 100°C trong khoảng 30 phút. Khi vi sinh vật này xâm nhiễm

vào trong thực phẩm, chúng tiết độc tố vào trong sản phẩm và gây độc. Khi con người tiêu thụ loại thực phẩm có chứa độc tố này, sau 4-6 giờ ủ bệnh sẽ bộc phát các triệu chứng lâm sàng như tiêu chảy, nôn mửa, các triệu chứng này kéo dài từ 6-8 giờ. Các loại thực phẩm có chứa hàm lượng muối cao thường có nguy cơ nhiễm vi sinh vật này như jambon, kem tổng hợp, nước soup... vì các loại thực phẩm này ít khi được xử lý ở nhiệt độ cao hơn 40°C. Các loại thủy sản hay thực phẩm đóng hộp cũng thường hay bị nhiễm loài vi sinh vật này. Các nguồn lây nhiễm vào thực phẩm chủ yếu từ các khâu chế biến trong nhà bếp. Trong tự nhiên các vi sinh vật này thường tình thấy trên da, mũi, tóc hay lông của các loài động vật máu nóng.

Vibrio spp

Các loài *Vibrio* có nguồn gốc từ biển, chúng cần ion Na⁺ để phát triển. Giống *Vibrio* có một số loài có khả năng gây bệnh cho người như *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. hollisae*, *V. furnsii*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. alginolyticus*.

V. cholerae là tác nhân gây nên các vụ dịch tả trên toàn thế giới. Loài vi sinh vật này được chia thành hai kiểu huyết thanh chính đó là O1 và non-O1, kiểu huyết thanh O1 bao gồm ba kiểu huyết thanh phụ như sau: Ogawa; Inaba (hai kiểu này được gọi chung là kiểu cổ điển – Classic) và kiểu Eltor (kiểu Eltor còn được gọi là kiểu O139). Hai kiểu huyết thanh Inaba và Ogawa ngày nay chỉ còn được tìm thấy tại các nước thuộc khu vực châu Á. Trong khi đó các vụ dịch tả trên khắp thế giới gây ra do kiểu Eltor. Khi có các trận dịch do *V. cholerae* gây ra thường lan truyền rất nhanh vào trong nước, gây nhiễm vào thực phẩm, nếu điều kiện vệ sinh kém, vi khuẩn sẽ lan truyền qua con người và dịch bệnh càng thêm nghiêm trọng. Vi sinh vật này sản sinh độc tố cholera toxin, đây là loại độc tố đường ruột có cường độ mạnh, chỉ cần 5µg gây nhiễm qua đường miệng có thể gây tiêu chảy cho người trưởng thành. Một số độc tố khác cũng được vi sinh này tiết ra như hemolysine có độc tính tương tự tetrodotxin (độc tố cá nóc) hay độc tố tương tự shiga-toxin.

Các loại thực phẩm có thể lan truyền *V. cholerae* như nước uống, nước trái cây, rau quả, sữa và các sản phẩm sữa, thậm chí bia cũng có khả năng nhiễm vi sinh vật này. Các loại sản phẩm thủy sản tươi sống, không qua gia nhiệt, gia nhiệt nhẹ hay do sự nhiễm chéo sau khi gia nhiệt cũng được khuyến cáo là có nguy cơ mang *V. cholerae* khá nghiêm trọng.

V. parahaemolyticus là loài vi sinh vật tồn tại và phát triển trong môi trường có hàm lượng muối cao, chúng thường xuyên được phân lập từ các sản phẩm thủy sản, trong các vùng nước ấm ven bờ biển. Chúng sản sinh độc tố hemolysine bền nhiệt, chất này chịu trách nhiệm cho đặc tính kháng nguyên Kanagawa. Nhưng trong những năm gần đây các dòng *V. parahaemolyticus* có phản ứng Kanagawa âm tính cũng có thể gây bệnh. Triệu chứng biểu hiện của bệnh có thể xuất hiện trong khoảng 2-96 giờ sau khi tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm, thời gian này phụ thuộc vào liều lượng xâm nhiễm và thể trạng của từng bệnh nhân, loại thực phẩm tiêu thụ và hàm lượng acid trong dạ dày. Các biểu hiện bệnh lý khi vi sinh vật này xâm nhiễm và đau thắt vùng bụng, viêm nhiễm đường ruột và tiêu chảy nhẹ.

Các loài *Vibrio* khác khi xâm nhiễm vào trong thực phẩm cũng có thể gây nên các bệnh đường ruột và có biểu hiện bệnh lý tương tự như hai loài trên. Dĩ nhiên tùy từng loài và liều lượng mà có những biểu hiện bệnh nặng nhẹ khác nhau. Chỉ riêng loài *V. vulnificus* không gây các triệu chứng bệnh đường ruột mà chúng gây nhiễm trùng máu cho người.

Escherichia coli

E. coli là vi sinh vật hiếu khí phổ biến trong đường tiêu hoá của người và các loài động vật máu nóng. Hầu hết các dòng *E. coli* tồn tại một cách tự nhiên và không gây hại trong đường tiêu hoá, ngược lại chúng còn đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định sinh lý đường tiêu hoá. Tuy nhiên có ít nhất 4 dòng sau đây có thể gây bệnh cho người và một số loài động vật:

Enterobathogenic *E. coli* (EPEC)

Enterotogenic *E. coli* (ETEC)

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)/ verocytocin *E. coli* (VTEC) hay Ecoli O157: H7

Rõ ràng *E. coli* có thể phân lập được dễ dàng ở khắp nơi trong môi trường có thể bị ô nhiễm phân hay chất thải. Vi sinh vật này có thể phát triển và tồn tại rất lâu trong môi trường. Trong những năm gần đây các nhà nghiên cứu cũng chứng minh rằng *E. coli* cũng có thể phân lập được từ những vùng nước ấm, không bị ô nhiễm hữu cơ. Với sự phân bố rộng rãi như vậy, *E. coli* cũng dễ dàng phân lập được từ các mẫu thực phẩm do nhiễm vào từ nguyên liệu hay thông qua nguồn nước.

Các dòng *E. coli* gây bệnh khi chúng xâm nhiễm vào người qua con đường thực phẩm có thể gây nên các bệnh rối loạn đường tiêu hoá, các biểu hiện lâm sàng biến động có thể từ nhẹ đến rất nặng, có thể đe dọa mạng sống của con người phụ thuộc vào liều lượng, dòng gây nhiễm và khả năng đáp ứng của từng người.

Shigella

Giống *Shigella* cũng là một thành viên của họ vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae*, chúng gồm có 4 loài sau: *S. dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii*. Đây là giống vi sinh vật có tế bào chủ đặc hiệu, chúng chỉ thích nghi và phát triển trong tế bào chủ là người và các loài linh trưởng. Sự hiện diện của chúng trong môi trường là do sự nhiễm phân của người và các loài mang vi sinh vật này. *Shigella* có thể tồn tại hơn 6 tháng trong môi trường nước. Các vụ ngộ độc thực phẩm do *Shigella* gây ra chủ yếu tập trung ở các nước kém phát triển, chế biến thực phẩm trong điều kiện kém vệ sinh. Bệnh cũng có thể truyền trực tiếp từ người qua người.

Shigella chủ yếu gây nên các bệnh lỵ trực trùng. Thời gian ủ bệnh sau khi tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm là 1-7 ngày. Các biểu hiện triệu chứng bệnh có thể nhẹ, biểu hiện không rõ, chỉ thoáng qua như tiêu chảy nhẹ, nhưng đôi khi cũng có những biểu hiện nghiêm trọng như đi tiêu ra máu, có những mảnh niêm mạc ruột, mất nước, sốt cao và bị co rút thành bụng. Các triệu chứng trên có thể kéo dài 12-14 ngày hay lâu hơn. Đối với người lớn, các trường hợp tử vong do *Shigella* hiếm khi diễn ra, nhưng bệnh biểu hiện rất nghiêm trọng đối với trẻ em và người già. Hàng năm có khoảng nửa triệu người tử vong do vi sinh vật gây ra trên khắp thế giới.

Sự lây nhiễm vi khuẩn *Shigella* chủ yếu đường miệng. Nước là một môi trường truyền bệnh quan trọng, đặc biệt ở những nơi kém vệ sinh. Tuy nhiên các loại thực phẩm cũng là nguyên nhân gây nên các bệnh do *Shigella*. Vi sinh vật này nhiễm vào thực phẩm qua nguyên liệu hay quá trình chế biến. Đôi khi nhiễm bệnh do vệ sinh cá nhân kém.

Listeria monocytogenes

Trong những năm gần đây *L. monocytogenes* nổi lên như một một tác nhân gây bệnh nguy hiểm. Đối tượng gây bệnh của vi sinh vật này là trẻ em, phụ nữ mang thai hay những người già. Đối với những vi sinh vật gây bệnh ngộ độc thức phẩm khác, chúng bộc phát bệnh khi con người hấp thu đủ liều lượng, sau thời gian ủ bệnh các triệu chứng lâm sàng biểu hiện. Ngược lại *L. monocytogenes* hiện diện với một số lượng nhỏ trong thực phẩm, khi được đưa vào cơ thể, chúng tồn tại và chờ cơ hội. Khi có điều kiện thuận lợi, chúng nhân lên xâm nhiễm vào các mô sâu và gây bệnh. Các bệnh do vi sinh vật này gây nên bắt đầu từ đường tiêu hoá như tiêu chảy, sốt nhẹ. Sau đó chúng xâm nhiễm vào các đại thực bào gây nên bệnh nhiễm trùng máu, tác động lên hệ thần kinh trung ương, tim mạch, và có thể xâm nhập vào bào thai gây nên sẩy thai, đẻ non hay nhiễm trùng thai nhi.

L. monocytogenes thuộc loại vi sinh vật ưa lạnh, chúng có thể phát triển ở nhiệt độ từ 2-44°C. Chúng thường được phân lập từ các loại thực phẩm như phomat sữa, thịt cá rau quả và thậm chí phân lập được từ trong nước mặt. Trong tất cả các công đoạn chế biến thực phẩm, sữa hay rau quả đều có khả năng xâm nhiễm vi sinh vật này. Đặc biệt trong công đoạn bảo quản các sản phẩm ở nhiệt độ thấp, vi sinh vật này có cơ hội phát triển thành số lượng lớn. Các sản

phẩm thanh trùng Pasteur và được bảo quản ở nhiệt độ thấp trong các tủ lạnh có nguy cơ nhiễm vi sinh vật này rất cao.

Các virus gây bệnh trong thực phẩm

Các đợt dịch bệnh gây ra từ thực phẩm do tác nhân virus cho đến nay vẫn là vấn đề bí ẩn. Nhưng một số tác giả vẫn tin rằng virus trong thực phẩm là tác nhân gây nên các bệnh hiểm nghèo. Những tiến bộ trong các nghiên cứu về virus thực phẩm vẫn còn hạn chế. Cho đến nay các đặc điểm sinh lý của virus đường ruột vẫn còn biết rất hạn chế. Cho đến nay các phương pháp nuôi cấy để phát hiện virus trong thực phẩm cho đến nay vẫn chưa thể thực hiện được. Nhưng với các tiến bộ về kỹ thuật sinh học phân tử như kỹ thuật lai phân tử, kỹ thuật PCR có thể phát hiện được các virus có hại cho con người trong thực phẩm.

Sự lan truyền virus cho người qua con đường thực phẩm được biết từ những năm 1950. Các virus gây bệnh đường ruột cho người chủ yếu có nguồn gốc từ các sản phẩm thủy sản. Cho đến nay được biết có khoảng hơn 100 loại virus đường ruột. Nhưng chỉ một vài loài trong số đó có khả năng gây bệnh cho người. Theo Kilgen và Cole (1991) các loài virus sau đây có thể gây nguy hiểm cho người.

Hepatitis type A (HAV)

Virus Norwalk

Calicivirus

Astrovirus

Virus NonA và Non B.

Virus tồn tại ở thể không hoạt động khi ở bên ngoài tế bào, chúng không thể tự nhân lên trong nước hay trong các sản phẩm thực phẩm cho dù ở bất kỳ điều kiện hoá lý như thế nào. Chúng xâm nhiễm vào thực phẩm hoàn toàn do quá trình chế biến, từ nước bị ô nhiễm. Các loài nhuyễn thể ăn lọc có khả năng tích lũy nhiều virus trong nước. Hàng ngày một con nhuyễn thể có thể lọc 1500 lít nước, theo đó một số lượng lớn virus có thể vào cơ thể của con vật này và tích lũy tại đó. Vì thế mật độ virus trong cơ thể nhuyễn thể cao hơn rất nhiều so với môi trường nước chúng đang sinh sống.

Liều lượng gây bệnh của virus có thể thấp hơn rất nhiều so với vi khuẩn khi con người tiêu thụ thực phẩm bị nhiễm. Liều lượng gây nhiễm tối thiểu của một số loài virus đường ruột tương đương với số lượng hiện diện trong thực phẩm mà các phòng thí nghiệm có thể phát hiện được bằng phương pháp nuôi cấy.

Cơ thể người và các loài động vật là nguồn chứa các virus đường ruột. Virus được tìm thấy với số lượng lớn trong phân của những người bị nhiễm và tồn tại trong nhiều ngày đến nhiều tuần. Sự nhiễm phân vào trong thực phẩm bằng con đường gián tiếp hay trực tiếp là con đường xâm nhiễm virus vào thực phẩm.

Sự sống sót của virus trong môi trường hay trong thực phẩm phụ thuộc vào yếu tố như nhiệt độ, nồng độ muối, cường độ bức xạ mặt trời hay sự hiện diện của các thành phần hữu cơ khác. Virus đường ruột cũng có khả năng tồn tại nhiều tháng trong nước biển ở nhiệt độ 10°C thậm chí có thể lâu hơn. Vì thế đây cũng là nhân tố chỉ thị ô nhiễm phân. Tất cả các virus đường ruột đều kháng với acid, các enzym thủy giải, hay muối mật có trong đường tiêu hoá. Một số virus có thể kháng nhiệt như Hepatitis type A, một số khác có thể kháng với các chất tẩy uế như phenolic, ethanol Ozon và chlorine là những tác nhân có thể làm bất hoạt một vài loại virus đường ruột.

Để ngăn ngừa các bệnh do virus từ thực phẩm, các loại thức ăn phải được nấu chín, khử virus trước khi tiêu thụ, các loại nhuyễn thể ăn lọc phải được khai thác trong những vùng nước không nhiễm virus hay được nuôi trong các vùng nước sạch trước khi tiêu thụ.

Coliforms

Coliform và Feacal coliform được xem là vi sinh vật chỉ thị, bởi vì số lượng của chúng hiện diện trong mẫu chỉ thị khả năng có sự hiện diện của các vi sinh vật gây bệnh khác trong thực phẩm. Các nhà nghiên cứu cho rằng số lượng Coliform cao trong thực phẩm thì khả năng hiện diện các vi sinh vật gây bệnh khác cũng rất lớn. Tuy vậy mối liên hệ giữa số lượng vi sinh vật chỉ thị và vi sinh vật gây bệnh còn đang được tranh cãi về khoa học. Cho đến nay mối liên hệ này vẫn không được sự thống nhất trong các hội đồng khoa học. Theo định nghĩa, nhóm Coliform bao gồm cả những vi sinh vật hiếu khí và kỵ khí tùy nghi, có Gram âm, không sinh bào tử, cò hình que, lên men đường lactose và sinh hơi trong môi trường nuôi cấy lỏng.

Căn cứ vào nhiệt độ vi sinh vật có thể phát triển để chia nhóm Coliform thành hai nhóm. Nhóm Coliform có nguồn gốc từ phân của các loài động vật và, nhóm này được gọi là Coliform phân và nhóm không có nguồn gốc từ phân động vật. Trên thực tế, các phương pháp kiểm nghiệm chỉ xác định Coliform phân là xác định nhóm coliform có nguồn gốc từ ruột người và các động vật máu nóng bao gồm các giống như *Escherichia*; *Klebsiella* và *Enterobater*. Một câu hỏi được đặt ra là có phải tất cả các thành viên của nhóm Coliform phân có ý nghĩa chỉ thị vệ sinh như nhau hay không? Cho đến nay vấn đề này vẫn còn đang được bàn luận, tuy nhiên trong các thành viên của nhóm này thì *E. coli* là loài được sự quan tâm nhiều nhất của vấn đề vệ sinh an toàn thực phẩm.

Bảng 1: Các loại bệnh và các biểu hiện lâm sàng do các vi sinh vật trong thực phẩm gây ra

Thời gian ủ bệnh	Vi sinh vật	Nôn mửa	Tiêu chảy	Đau thắt	Sốt	Thời gian kéo dài	Các loại thực phẩm thường gặp
30 phút–4 giờ	<i>B.cereus</i> (emertic)	+++	(+) ^a	(+) ^a	-	Ngắn	Gạo
8-12 giờ	<i>B.cereus</i> (diarrhoeal)	-	++	++	-	1-2 ngày	Soup và các sản phẩm sữa
4-6 giờ	<i>S. aureus</i>	++	+	++	-	6-12 giờ	Thịt lạnh Sản phẩm sữa, salad, kem, trứng, sản phẩm lên men ...
8-22 giờ	<i>C. perfringens</i>	-	++	++	-	12-24 giờ	Sản phẩm thịt qua gia nhiệt
8-48 giờ	<i>V. paraheamolyticus</i>	-	+++	-	+	2-3 ngày	Hải sản
12-48 giờ	<i>Salmonella</i>	(+)	++	-	+	48giờ-7 ngày	Gia cầm, thị và sản phẩm trứng
24-72 giờ	<i>C.botulinum</i>	-	-	-	- ^b	3 ngày	Đồ, rau quả đóng hộp, thịt
2-11 ngày	<i>Campylobacter</i>	-	+++	++	++	3 ngày-3 tuần	Sữa, ước uống, thịt gia cầm, thịt tươi, cá nầm, sữa thanh trùng Pasteur

^a: Có thể biểu hiện hay không, ^b: Biểu hiện rối loạn

Chương II

KỸ THUẬT TRUYỀN THỐNG TRONG PHÂN TÍCH VI SINH VẬT

1. Định lượng vi sinh vật bằng phương pháp đếm trực tiếp trên kính hiển vi

Số lượng Vi sinh vật trong mẫu có thể được xác định bằng cách đếm trực tiếp trên kính hiển vi. Quy trình đếm trực tiếp cho phép xác định được số lượng vi sinh vật với kết quả cao nhất. Mặc dù phương pháp đếm trực tiếp bằng kính hiển vi cho phép ước lượng nhanh chóng số lượng vi sinh vật có trong mẫu. Tuy vậy phương pháp này có những điểm hạn chế nhất định như không phân biệt được số lượng tế bào sống và số lượng tế bào chết, dễ nhầm lẫn tế bào vi sinh vật với các mảnh vỡ nhỏ của mẫu và không cho phép tìm hiểu các đặc điểm khác của vi sinh vật được quan sát.

Đối với các vi sinh vật có kích thước lớn như nấm men, nấm mốc, tảo và protozoa, phương pháp đếm trực tiếp dễ dàng thực hiện với các loại buồng đếm. Có rất nhiều loại buồng đếm vi sinh vật khác nhau phù hợp với từng thể tích và kích thước của từng nhóm vi sinh vật. Ví dụ có thể sử dụng buồng đếm hồng cầu Petroff – Hauser để đếm vi khuẩn. Đối với các mẫu nước và các mẫu khác, buồng đếm Holber được sử dụng rộng rãi nhất. Buồng đếm Holber 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 thế khi phủ lên trên bằng kính đậy vật thì độ sâu của đĩa đếm sẽ đồng đều nhau. Vùng đĩa đếm có diện tích 1mm² và được chia thành 400 ô vuông nhỏ hơn, mỗi ô có diện tích 0.0025mm². thể tích của mỗi ô là 0,02 x 0,0025 mm², thể tích này tương đương với 0,00005ml.

Thêm vài giọt formalin vào trong những lọ chứa mẫu, trộn đều. Pha loãng mẫu cần đếm sao cho trong mỗi ô nhỏ của buồng đếm có khoảng 5 - 10 tế bào vi sinh vật. Để đạt được độ pha loãng như vậy cần phải ước lượng được số lượng vi sinh vật trong mẫu, đồng thời phải thử vài lần trong quá trình pha loãng. Mẫu phải được pha loãng bằng dung dịch pha loãng chứa 0,1% pepton và 0,1% laurylsulphat và 0,01% methyl blue. Tất cả các dung dịch pha loãng đều phải cần lọc trước khi sử dụng.

Đặt một giọt mẫu được pha loãng vào trong đĩa đếm trên buồng đếm, đậy bằng kính đậy vật. Tất cả các buồng đếm và kính đậy vật phải được lau thật sạch. Thể tích mẫu chứa trong buồng đếm là khoảng không gian giữa đĩa đếm và kính đậy vật, không để mẫu tràn ra bên ngoài rãnh của đĩa. Sau khi đặt mẫu, để yên khoảng 5 phút để ổn định vị trí của các tế bào trong buồng đếm. Đếm ngẫu nhiên khoảng 50-100 ô nhỏ. Tính trung bình số lượng vi khuẩn trong tất cả các ô đã đếm. Sau đó nhân với 20 000 và với độ pha loãng mẫu trước khi đếm để có được số lượng tế bào trong 1ml. Lặp lại hai lần hay nhiều hơn để lấy giá trị số đếm trung bình. Đối với các vi sinh vật tụ thành từng cụm, không thể phân biệt từng tế bào thì mỗi cụm được xem là một vi khuẩn.

Với những kinh nghiệm của mỗi cá nhân về độ pha loãng, thao tác kỹ thuật thành thạo có thể nhận được các số đếm chính xác. Tuy vậy kết quả có chính xác hay không còn phụ thuộc vào sự sạch sẽ của buồng đếm, kính đậy vật nhằm đảm bảo không có vi khuẩn khác không phải từ mẫu hiện diện trong buồng đếm và trong kính đậy vật.

Kỹ thuật đếm Breed

Kỹ thuật này rất hữu ích trong việc xác định tổng số vi sinh vật bằng phương pháp đếm trực tiếp. Lame kính Breed có một vùng có diện tích 1cm² được đánh dấu trên lame. Dùng bơm tiêm, hay que cấy vòng cho 0,01ml mẫu cần đếm vào trong vùng này, sấy khô bằng ngọn lửa sau đó nhuộm với methyl blue. Khi đếm, cho dầu nhúng lên diện tích vùng cần đếm. Thông

thường vùng này có đường kính 0,16 mm. Diện tích vùng đếm là πr^2 hay $3,14 \times 0,08 \times 0,08 = 0,02\text{mm}^2$. Với diện tích này chiếm 1/5000 trong tổng diện tích đặt mẫu là 100mm^2 hay thể tích trong vùng đếm là $1/5000 \times 0,01\text{ml}$. Như vậy nếu có 1 vi sinh vật trong vùng đếm thì tương đương với $5000/0,01\text{ml}$ hay 500 000 tế bào/ml. Số đếm của các vi sinh vật trong các vùng khác nhau của vùng qui ước được tính bằng công thức như sau:

$$C = \frac{N \times 4 \times 10^4}{\pi d^2 \square}$$

d: đường kính của vùng đếm

N: số lượng tế bào trong 1 vùng

C: số tế bào trong 1ml

Khi sử dụng kính hiển vi huỳnh quang với các chất nhuộm khác như acridin cam (AODC), 4',6-dianidino-2-phenyl-indol (DAPI), fluorescein isothiocyanate (FITC) cũng được sử dụng rộng rãi để đếm số lượng vi khuẩn. Các nghiên cứu của K.G. Porter và Y.S. Feig cho thấy rằng khi sử dụng DAPI để đếm số lượng vi khuẩn trong nước cho kết quả tốt hơn khi sử dụng chất nhuộm AODC khi trong mẫu nước có nhiều chất dinh dưỡng và nhiều phiêu sinh vật khác. Về độ bền tính phát huỳnh quang của DAPI cũng cao hơn AODC. Hai tác giả trên cũng chứng minh rằng khi nhuộm với DAPI có thể bảo quản trong tối đến 24 tuần mà cường độ phát quang không thay đổi. Trong khi đó AODC cường độ và số lượng phát quang bị giảm khi bảo quản trong vòng 1 tuần ở cùng điều kiện.

Một kỹ thuật khác dựa trên nguyên tắc nhuộm màu đặc hiệu DNA được gọi là Hoechst 33258 cũng được sử dụng để nhuộm và đếm số lượng vi sinh vật trên kính hiển vi huỳnh quang. Phương pháp này như sau: Bisbenzimidazole kết hợp với vùng DNA giàu adenine và thymine sau khi gắn phức hợp này sẽ phát huỳnh quang. Hoechst 33258 được sử dụng nhiều trong việc định lượng vi sinh vật trên bề mặt. Đặc biệt trên bề mặt có gắn các acridine orange. Một sự thuận lợi khác khi sử dụng phương pháp nhuộm màu bisbenzimidazole cho phép đếm số lượng vi sinh vật trong các dụng dịch chất tẩy rửa, trong muối dùng cho các phòng thí nghiệm hay trong các chế phẩm sinh học khác mà không có sự hiện diện của DNA. Phương pháp đếm số lượng vi sinh vật bằng phương pháp phát huỳnh quang được ứng dụng rộng rãi trong việc phân tích các mẫu môi trường như nước đất

Sử dụng dầu nhúng phát quang thấp là một phát minh quan trọng trong việc hạn chế sự phát huỳnh quang của các màng lọc. Màng carbonate Nuclepore là một màng cellulose cao cấp dùng trong việc đếm trực tiếp vi khuẩn bởi vì chúng có kích thước lỗ đồng nhất và bề mặt màng phẳng, chúng có thể giữ lại tất cả các vi sinh vật trên bề mặt của chúng. Màng Nuclepore có thể nhuộm với thuốc nhuộm Irgalan đen hay các loại thuốc nhuộm phù hợp khác để tạo nên một nền màu đen tương phản với màu phát quang của vi sinh vật vì thế việc đếm được thực hiện dễ dàng. Khi sử dụng thuốc nhuộm là acridine cam vi khuẩn và các vi sinh vật khác phát quang màu xanh hay màu cam. Màu phát quang xanh hay cam là phụ thuộc vào tình trạng sinh lý của từng vi sinh vật. Nhưng khả năng phân biệt tế bào đang sống hay tế bào đã chết bởi màu phát quang đôi khi đưa đến sự nhầm lẫn. Sử dụng ADPI nhuộm DNA của tế bào vi khuẩn chúng đưa đến sự phát quang màu xanh dương được cho là tối ưu hơn so với việc sử dụng acridin cam để nhuộm các vi khuẩn có kích thước nhỏ.

Số đếm nhận được từ phương pháp đếm trực tiếp trên kính hiển vi phát huỳnh quang luôn cho kết quả cao tương đương hai lần so với kết quả nhận được bằng kỹ thuật nuôi cấy

khác. Những vi khuẩn có kích thước nhỏ, có hình dạng bất thường khác cũng đều có thể nhìn thấy bằng phương pháp phát huỳnh quang. Một số dạng vi sinh vật không thể nuôi cấy trong các môi trường tổng hợp trong phòng thí nghiệm. Hiện tượng không thể nuôi cấy của các vi sinh vật cho đến nay vẫn chưa rõ là do chúng thoái hoá, không thể nhân lên trong các môi trường nhân tạo hay do không đáp ứng được các điều kiện sinh lý cần thiết cho sự phát triển của chúng. Trong một số trường hợp, sự tương quan cao giữa phương pháp đếm trực tiếp bằng phương pháp phát huỳnh quang và phương pháp đếm khuẩn. Tuy nhiên trong một số trường hợp khác sự tương quan này rất kém. Sự khác biệt giữa phương pháp đếm trực tiếp và phương pháp đếm khuẩn lạc phản ánh sự chọn lọc của môi trường và điều kiện nuôi cấy, một phần tế bào bị chết hay bị thương tổn và số loài cụ thể trong mẫu.

Bảng 2: Kết quả tổng số vi khuẩn nhận được từ phương pháp đếm trực tiếp trên kính hiển vi và phương pháp đếm khuẩn lạc ở 20°C và 4°C.

Mẫu	Đếm trực tiếp	Đếm khuẩn lạc	
		4°C	20°C
Nước biển	9.9×10^4	6.6×10^1	4.5×10^1
Nước đá	8.2×10^5	9.6×10^3	7.3×10^3
Nước tự nhiên	1.8×10^5	6.1×10^2	1.1×10^1
Nước từ vịnh	5.2×10^5	5.0×10^4	2.7×10^4
Alaska	3.0×10^5	1.0×10^2	5.2×10^2
Alaska	1.4×10^5	1.3×10^2	2.4×10^2

Giá trị của số đếm trực tiếp bằng phương pháp phát huỳnh quang trên kính hiển vi tương đương với với số lượng vi sinh vật thật sự có thể có với tất cả các loài khác nhau. Điều đó cho phép ước đoán được số lượng thật sự trong nước biển, trong nước tự nhiên, trong trong một loại mẫu nào đó, mặt dù các loài này có sự khác biệt lớn về số lượng của từng chủng loài, khác biệt về đặc điểm sinh lý diễn ra trong cùng điều kiện của mẫu. Số đếm trực tiếp thường phản ánh đúng với sinh khối, vì thế thường được dùng để ước lượng sinh khối vi sinh vật có trong mẫu. Tuy nhiên để có được số đếm chính xác bằng kính hiển vi phát huỳnh quang cần phải đếm nhiều lần và nhiều vị trí khác nhau trên mẫu.

Thêm vào đó nếu đếm nhiều tế bào đang phân chia có thể cho phép ước đoán tốc độ phát triển của vi sinh vật trong mẫu. Tần suất của tế bào đang phân chia được nhìn thấy có mối liên hệ với chỉ số đo khác của tốc độ phát triển vi sinh vật như tốc độ tổng hợp RNA được đo bởi sự phòng thích của adenine được đánh dấu. Tần xuất của tế bào đang phân chia được tính bằng thời gian giữa lúc bắt đầu sự thất của tế bào đến khi tế bào phân chia là một hằng số. Con số này không phải là bất biến. Thật khó khăn để nhận ra sự phân chia tế bào khi sử dụng kính hiển vi quang học mà không sử dụng kính hiển vi phát huỳnh quang.

2. Các kỹ thuật định lượng vi sinh vật trong mẫu bằng phương pháp nuôi cấy

Có hai cách để xác định số lượng vi khuẩn bằng phương pháp nuôi cấy: phương pháp đếm khuẩn lạc và phương pháp ước đoán số lượng vi khuẩn (MPN – Most probable number). Tất cả các phương pháp định lượng vi khuẩn trong mẫu bằng phương pháp nuôi cấy đều yêu cầu các tế bào phải được tách rời nhau, qua quá trình nuôi cấy các tế bào này phát triển thành các dòng riêng biệt. Tất cả các qui trình định lượng bằng phương pháp nuôi cấy nhằm chọn lọc một hay nhiều nhóm vi khuẩn nhất định nào đó, mức độ chọn lọc phụ thuộc và từng qui trình qui trình cụ thể. Để xác định tổng số vi sinh vật trong mẫu phải chọn qui trình giảm tối thiểu khả

năng chọn lọc. Nhưng dù mức độ chọn lọc ở mức tối thiểu cũng chỉ định lượng được số lượng vi sinh vật có thể nuôi cấy. Còn một số lượng lớn vi sinh vật khác không thể phát triển được trong quá trình nuôi cấy thì không thể định lượng được bằng phương pháp này. Có các phương pháp định lượng nuôi cấy như sau như sau:

1.1 Phương pháp đếm khuẩn lạc

Phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa được sử dụng rộng rãi để định lượng vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn, nhưng pháp này có những khuyết điểm và đã có những cách nhìn nhận khác nhau về mặt khoa học. Khuyết điểm của phương pháp này nằm trong sự lạm dụng để biểu đạt sai các kết quả. Tất cả mọi người đều mắc sai lầm khi nhận ra rằng phương pháp này không thể dùng để thu được kết quả tổng số vi sinh vật.

Phương pháp đếm khuẩn lạc sử dụng nhiều loại môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác nhau. Agar là chất thường được dùng để làm đặc các môi trường nuôi cấy vì hầu hết các vi sinh vật đều mất các gen tổng hợp enzym phân giải agar. Các mẫu đã được pha loãng để trải lên bề mặt môi trường agar (phương pháp trải) hay khuyết tán vào trong môi trường trước khi làm đặc (phương pháp đổ đĩa). Một vấn đề cần phải cân nhắc là các vi sinh vật cần xác định có thể tồn tại và phát triển trong môi trường agar hay không. Một số vi sinh vật có thể bị chết khi trải trên bề mặt môi trường trong qui trình cấy trải bề mặt. Một số loài vi khuẩn khác không thể sống trong điều kiện nhiệt độ duy trì trạng thái lỏng của agar trong qui trình đổ đĩa. Bởi vì agar chỉ là tác nhân làm rắn môi trường nuôi cấy trong qui trình định lượng vi sinh vật vì thế trong một số trường hợp agar có thể được thay thế bằng các tác nhân làm rắn khác. Trong một số trường hợp các vi sinh vật có các nhu cầu dinh dưỡng đặc biệt khác, các chất như silicagel có thể được thay thế để làm rắn môi trường. Nhưng vì chuẩn bị môi trường silicagel khó khăn hơn chuẩn bị môi trường agar nên chỉ dùng môi trường silicagel khi không thể thay thế được môi trường agar.

Phương pháp ống cuộn được dùng để định lượng các vi sinh vật kỵ khí bắt buộc. Đây là một phương pháp cải biên của phương pháp đổ đĩa. Các đĩa hay các ống sau khi cấy vi khuẩn được ủ trong điều kiện nhiệt độ đặc biệt trong một thời gian nhất định để cho sinh vật phát triển thành các khuẩn lạc có thể nhìn thấy bằng mắt thường, số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa sẽ được đếm. Số lượng khuẩn lạc sẽ được gán cho số tế bào đơn lẻ trong mẫu ban đầu. Để số lượng khuẩn lạc phản ánh được số lượng tế bào vi khuẩn, mẫu phải được phân tán đều vào trong môi trường hay trên bề mặt môi trường rắn. Những đĩa có quá nhiều khuẩn lạc xuất hiện thì không thể cho số lượng đếm chính xác bởi vì chúng có thể chồng lấp lên nhau. Những đĩa có quá ít khuẩn lạc cũng phải bỏ đi vì theo nguyên tắc của xác suất.

Những vấn đề chính yếu cần xem xét trong qui trình đếm khuẩn lạc là thành phần môi trường, điều kiện và thời gian nuôi ủ. Môi trường để định lượng các vi sinh vật dị dưỡng không thể cố định nitơ phải chứa các nguồn nitơ, carbon, phosphate dễ sử dụng và các cation, anion cần thiết như sắt, magie, calci, natri, clo và sulphate. Thành phần của các hàm lượng không nhất định, chúng đặt thù cho từng loại môi trường và từng loại mẫu nhất định để có thể nhận được số lượng vi sinh vật mục tiêu cao nhất. Như vậy môi trường nuôi cấy phải có các thành phần dinh dưỡng phù hợp với từng yêu cầu của loài vi sinh vật, bao gồm cả các nhân tố cần thiết khác cho sự phát triển của một hệ vi sinh vật nhất định. Mục đích chung của môi trường là hàm lượng dinh dưỡng phải cao hơn các thành phần có trong các mẫu đang phân tích. Hàm lượng dinh dưỡng trong các loại môi trường đếm tổng số vi sinh vật phải đủ cao, và độc tính của môi trường đối với sinh vật ở mức thấp nhất.

Để nâng cao hiệu quả của qui trình định lượng vi sinh vật bằng phương pháp đếm khuẩn lạc, các điều kiện cần phải điều chỉnh sao cho chỉ có các thành viên vi sinh vật cần phát hiện

theo định nghĩa được đếm. Các môi trường đếm đĩa được chọn lọc hay phân biệt với các thành viên vi sinh vật khác. Quy trình đếm đĩa chọn lọc được thiết kế cho thích hợp với sự phát triển của vi sinh vật mong muốn. Sự phát triển của các nhóm vi sinh vật khác được loại bỏ bởi các thành phần của môi trường hay điều kiện nuôi ủ. Môi trường phân biệt là môi trường không loại bỏ các nhóm vi sinh vật không mong muốn mà ngược lại cho phép chúng phát triển cũng trên môi trường đó nhưng có thể biệt phân biệt các nhóm vi sinh vật mong muốn với các nhóm khác bằng các đặc điểm nhận dạng.

Môi trường cũng có thể được thiết lập để chọn lọc các loài nấm mốc. Mặc dù kỹ thuật đếm khuẩn lạc không phải là phương pháp được chọn cho việc xác định số lượng nấm mốc trong các mẫu thực phẩm và trong môi trường. Bởi vì kỹ thuật này chỉ thích hợp cho việc định lượng các loài vi sinh vật không có sợi hay bào tử. Dĩ nhiên phương pháp đếm khuẩn lạc cũng thích hợp cho việc định lượng các loài nấm men. Vì số lượng của vi khuẩn luôn nhiều hơn số lượng của nấm mốc nên để ngăn cản sự phát triển của vi khuẩn trong các khuẩn lạc của nấm mốc, các tác nhân ức chế vi khuẩn được thêm vào trong các môi trường nuôi cấy. Các thuốc nhuộm bengal rose và các kháng sinh như streptomycine, neomycine thường được sử dụng là những tác nhân ức chế vi khuẩn. Một biện pháp đơn giản để ức chế sự phát triển của vi khuẩn là hạ thấp pH của môi trường nuôi cấy xuống khoảng 4,5 - 5,5. Hầu hết các nấm mốc đều không bị tác động khi phát triển trong khoảng pH này nhưng khi đó vi khuẩn bị ức chế.

Môi trường chọn được xác lập công thức để ức chế sự phát triển của nhóm vi sinh vật và cho phép một nhóm vi sinh vật khác phát triển. Ví dụ môi trường Saubouraud Dextrose Agar được dùng để định lượng nấm mốc dựa trên nguyên tắc pH thấp và nguồn carbohydrate. Bổ sung vào môi trường các chất kháng sinh khác như peniciline hay methyl bule là những tác nhân ức chế vi khuẩn gram âm. Các vi sinh vật kháng kháng sinh cũng có thể được định lượng trên môi trường bằng cách thêm vào đó một liều lượng kháng sinh.

Môi trường phân biệt được thiết lập dựa trên nhiều cách. Các thuốc thử được thêm vào trong môi trường để cho phép nhận ra các sự khác biệt của những vi sinh vật mong muốn. Có thể thêm thuốc thử vào môi trường sau khi nuôi cấy để nhận ra các loài vi sinh vật đặc trưng cần tìm. Chìa khoá nâng cao khả năng phân biệt của môi trường là quy trình nuôi cấy để cho phép môi trường phân biệt một cách tốt nhất với vi sinh vật cần định lượng và các vi sinh vật khác có trong mẫu.

Môi trường Eosin methyl blue (EMB) và MacConkey agar là những môi trường được sử dụng rộng rãi trong việc phân tích vi sinh vật trong nước. Những môi trường này bao gồm tính chọn lọc và tính phân biệt. Chúng chọn lọc cho sự phát triển của các vi khuẩn gram âm bởi trong đó có thêm vào các tác nhân ức chế các vi khuẩn gram dương. Môi trường này có thể phân biệt các vi khuẩn có thể sử dụng lactose bởi sự hình thành các khuẩn lạc có thể phân biệt bằng màu sắc. Trên môi trường EMB, vi khuẩn thuộc nhóm coliforms là nhóm gram âm tạo nên những khuẩn lạc có màu tím ánh kim. Định lượng số lượng coliform bằng cách đếm số lượng khuẩn lạc có các đặc điểm này. Cách này thường xuyên được sử dụng trong việc phân biệt các vi sinh vật chỉ thị trong nước và trong thực phẩm.

Với kỹ thuật đến 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 gán cho 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 iodine 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 chắc 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 đập 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 phân 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

Đây là phương pháp thay thế cho phương pháp đổ đĩa để phân tích các chỉ tiêu vi sinh trong thực phẩm, nhất là các chỉ tiêu vi sinh vật nhạy cảm với nhiệt độ như *Pseudomonas*, các vi sinh vật này sẽ bị suy yếu khi tiếp xúc với nhiệt độ của môi trường agar ở trạng thái lỏng. Phương pháp này cũng được dùng để phân tích các chỉ tiêu mà các dòng nhận được phải cấy chuyển ở các bước tiếp theo.

Cấy 0,1ml hay thể tích phù hợp lên bề mặt bằng pipettes hay bằng que cấy lên đĩa môi trường đã được làm khô và trải đều bằng que cấy trang hay que cấy vòng để trải mẫu 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 hợp kết quả được biểu diễn dưới dạng số đơn vị hình thành khuẩn lạc/g (ml) (cfu/g). Không biểu diễn kết quả dưới dạng số vi khuẩn/g(ml).

Phương pháp đếm khuẩn lạc trên ống

Thay vì dùng đĩa petri, có thể dùng ống nghiệm có đường kính lớn hay các chai nhỏ có nắp để thay thế. Cấy mẫu vào, cho môi trường vào, lắc theo chiều ngang cho đến khi môi trường trong chai hay ống đông đặc.

Phân phối 2-4 ml môi trường có hàm lượng agar cao hơn các môi trường dùng cho đổ đĩa khoảng 0,5-1% vào ống nghiệm có nắp với thể tích 25ml, môi trường đã được làm nguội đến 45°C, cấy vào ống nghiệm 0,1ml mẫu đã được pha loãng. Lắc các ống theo chiều ngang trong nước lạnh cho đến khi agar đông đặc tạo thành một màng film đồng nhất trên thành ống nghiệm. Vì thế kỹ thuật này cần có những kỹ năng khéo léo. Một phương pháp khác có thể được dùng là sử dụng một mẫu nước đá, đặt lên trên một mảnh vải và làm một đường rãnh bằng với ống nghiệm bằng các xoay tròn ống nghiệm đặt ngang trên miếng băng. Các ống nghiệm đã cấy mẫu và môi trường được xoay trên mảnh của miếng băng. Với phương pháp này, các người thực hiện có thể tiết kiệm được nhiều thời gian và sức lao động.

Các ống sau khi cấy mẫu được lật ngược để tránh sự ngưng tụ hơi nước gây nên vết loang sau khi ủ. Đếm các khuẩn lạc xuất hiện trong lớp màng film agar xung quanh ống, các khuẩn lạc nằm sâu bên trong có thể được quan sát bằng kính lúp.

Phương pháp dùng kỹ thuật ống xoay được sử dụng nhiều trong việc phân tích các mẫu sữa và các sản phẩm của sữa, các loại mẫu thực phẩm công nghiệp. Cho đến nay đã có những thiết bị thay thế cho việc xoay ống, đảm bảo các màng film trên thành ống đồng nhất và tiết kiệm được thời gian cũng như công lao động.

Phương pháp cấy theo đường xoắn ốc

Phương pháp này dựa trên sự hỗ trợ của một thiết bị xoay. Thiết bị này có thể hoạt động hoàn toàn tự động và cũng có thể hoạt động không tự động. Thiết bị này sẽ phân phối một lượng mẫu xác định lên bề mặt đĩa đang xoay tròn. Điểm tiếp xúc của mẫu và đĩa môi trường bắt đầu từ trung tâm đĩa và di chuyển dần ra bên ngoài theo đường xoắn ốc. Sau khi làm khô bề mặt môi trường, đĩa được ủ trong điều kiện xác định, vi khuẩn sẽ phát triển theo đường xoắn ốc. Càng xa tâm của đĩa, mật độ vi sinh vật sẽ giảm dần và sẽ xuất hiện các khuẩn lạc riêng biệt.

Căn cứ vào tốc độ xoay của thiết bị, thể tích mẫu phân phối và kích thước của đĩa, mật độ khuẩn lạc xuất hiện ở vòng xoắn cuối cùng sẽ tính được mật độ vi sinh vật trong mẫu. Kết quả tổng số đơn vị hình thành khuẩn lạc được xác định bằng phương pháp này được cho là tương đương với phương pháp đổ đĩa hay cấy trải trên bề mặt. Các hệ thống tự động được thiết kế dựa trên nguyên tắc cấy xoay được thiết kế với sự hỗ trợ của các máy đếm khuẩn lạc bắn tia laser đã được bán ngoài thị trường rất thuận tiện cho việc phân tích tổng số vi sinh vật và cho kết quả chính xác trong thời gian nuôi cấy ngắn.

Phương pháp đếm khuẩn lạc trên 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 hơn so với phương pháp ước đoán MPN. 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 ngấm sẵn 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 . Khi lọc tất cả các vi khuẩn đều được giữ lại trên màng. Khi đặc màng lọc sao cho bề trên của màng hướng lên phía trên, vi khuẩn không tiếp xúc trực tiếp với môi trường nhưng, các thành phần của môi trường dễ dàng thấm qua màng và nuôi vi khuẩn phát triển thành khuẩn lạc. Một số loại màng lọc có gắn các lưới kỵ nước chỉ cho phép khuẩn lạc phát triển trong mỗi ô của lưới và không cho lan sang các ô khác nhằm tạo điều kiện thuận tiện khi đếm.

1.2 Phương pháp ước đoán số lượng vi sinh bằng kỹ thuật MPN (Most Probable Number):

Phương pháp MPN là phương pháp có thể thay thế phương pháp đếm khuẩn lạc để xác định mật độ vi sinh vật trong mẫu, phương pháp này được dựa trên nguyên tắc xác suất thống kê sự phân bố vi sinh vật trong các độ pha loãng khác nhau của mẫu. Mỗi độ pha loãng được nuôi cấy lặp lại nhiều lần trong các môi trường lỏng đã được chọn, thông thường phải cấy lặp lại từ 3-10 lần tại mỗi nồng độ pha loãng. Các độ pha loãng được tiến hành sao cho trong các lần lặp lại có một số lần cho dấu hiệu dương tính và một số lần cho dấu hiệu âm tính. Số lần lặp lại cho dấu hiệu dương tính và âm tính được ghi nhận để đối chiếu với bảng thống kê sẽ được giá trị ước đoán số lượng vi sinh vật trong mẫu. Qui trình MPN cho giá trị số lượng vi sinh vật trong mẫu có ý nghĩa thống kê theo xác suất phân bố vi sinh vật trong mẫu khi sử dụng một số

lần lặp lại, vì thế khoảng tin cậy là rất lớn. Phương pháp MPN để định lượng vi sinh vật cho đến nay đã có nhiều cải tiến cho phép tiến hành qui trình dễ dàng và tốn ít sức lao động hơn và cho giá trị chính xác cao hơn.

Chọn nồng độ pha loãng sao cho trong các lần lặp lại có một số lần cho kết quả dương tính và một số lần cho kết quả âm tính, sự lựa chọn này rất quan trọng. Trong nhiều trường hợp qui trình MPN được thiết lập sao cho gia tăng số lượng lần lặp cho kết quả dương tính bằng tín hiệu phát triển của vi sinh vật. Trong một số trường hợp khác, qui trình được thiết lập có nhiều thử nghiệm khẳng định sau khi các lần lặp lại ở các độ pha loãng cho tín hiệu phát triển của vi sinh vật như phát hiện protein hay một emzym nào đó. Các thử nghiệm sau này cho kết quả dương tính thì các lần lặp lại ban đầu mới được khẳng định là dương tính. Cũng giống như qui trình đếm khuẩn lạc, qui trình MPN cũng được sử dụng các môi trường chọn lọc, không chọn lọc hay môi trường phân biệt.

Phương pháp MPN cũng được dùng để định lượng virus đường ruột. Trong phương pháp này, một chuỗi pha loãng của mẫu cần kiểm tra được cho vào trong các ống nghiệm chứa tế bào chủ thích hợp được nuôi cấy. Sau khi ủ, các ống nghiệm được kiểm tra hiệu ứng cytopathic (CPE), đó là các biểu hiện làm chết tế bào bị xâm nhiễm. Số lượng virus trong mẫu cũng nhận được từ bảng MPN bằng sự tham chiếu số lượng các ống nuôi cấy cho hiệu ứng CPE dương tính. Số lượng của virus cũng có thể được định lượng bằng chỉ số TCID₅₀ (Tissue culture infectious dose 50%). Nồng độ pha loãng thấp nhất có sự hiện diện của virus đó là nồng độ có tỉ số CPE là 50% trong các ống nghiệm.

Cũng giống như qui trình đếm đĩa, trong phương pháp MPN, môi trường và nồng độ nuôi cấy cũng được điều chỉnh để chọn lọc cho một nhóm vi sinh vật hay phân biệt các nhóm vi sinh vật này với các nhóm vi sinh vật khác với các đặc điểm mong muốn, rõ ràng rằng sự kết hợp giữa điều kiện nuôi cấy và môi trường cũng có thể định lượng những nhóm vi sinh vật đặc biệt nào đó theo định nghĩa cụ thể. Mỗi qui trình phải được chọn lọc một cách cụ thể và cẩn thận để có thể thu được kết quả một cách chính xác.

Theo quan điểm của C.H. Collins và Patricia M. Lyne thực chất con số MPN biểu diễn số lượng vi sinh vật trong mẫu là số lượng trung bình sau các lần lặp lại. Nếu số lượng vi sinh vật trong mẫu lớn thì sự khác biệt của các mẫu giữa các lần lặp lại là nhỏ, kết quả riêng lẻ của tất cả các lần lặp gần với kết quả trung bình. Nếu số lượng vi sinh vật trong mẫu nhỏ, sự khác biệt này sẽ lớn. Nếu trong một mẫu chất lỏng chứa 100 vi sinh vật/100 ml, thì trong 10 ml mẫu sẽ chứa trung bình 10 tế bào. Dĩ nhiên có một số phần mẫu nhiều hơn 10 tế bào, thậm chí có những phần mẫu có thể chứa 20 tế bào trong 10ml mẫu và một số phần mẫu chứa ít hơn. Nếu tất cả các phần mẫu trên được nuôi cấy trong môi trường và điều kiện thích hợp, các vi sinh vật trong mẫu sẽ phát triển và cho tín hiệu dương tính.

Tương tự như vậy, 1ml sẽ chứa trung bình 1 tế bào vi sinh vật, như vậy có những lần lấy sẽ có 2 hay 3 tế bào và có những lần lấy sẽ không có tế bào nào. Nếu các lần hút này được nuôi cấy trong môi trường và điều kiện thích hợp sẽ thu được những ống nghiệm cho kết quả dương tính và những ống cho kết quả âm tính.

Nếu hút 0,1ml thì sau 10 lần hút mới có khả năng nhận được 1 lần hút có 1 tế bào, như vậy hầu hết các lần nuôi cấy khi lấy 0,1ml thì đều cho kết quả âm tính.

Có thể tính toán con số chắc chắn số lượng vi sinh vật trong 100ml mẫu bằng sự kết hợp các kết quả nhận được từ các chuỗi cấy như trên. Bảng giá trị MPN khi sử dụng hệ thống cấy với các dây 5 ống 10ml, 5 ống 1ml và 5 ống 0.1ml đã được tính sẵn và dùng cho phân tích các mẫu nước hay các mẫu đã pha loãng. Cho đến nay có rất nhiều bảng giá trị MPN được

sử dụng với độ chính xác và các khoảng tin cậy khác nhau và được sử dụng cho các mục đích khác nhau.

Phương pháp MPN được dùng chủ yếu để phân tích Coliforms và các vi sinh vật khác khi chúng phát triển trong môi trường nuôi cấy lỏng cho các tín hiệu dễ dàng nhận dạng như sinh hơi, làm đục môi trường chọn lọc, thay đổi pH môi trường ... Ví dụ nấm men và nấm mốc trong nước trái cây hay rau quả, vi sinh vật kỵ khí hay các bào tử Clostridia.

1.3 Phương pháp lai khuẩn lạc

Lai khuẩn lạc là phương pháp kết hợp giữa phương pháp lai phân tử và phương pháp nuôi cấy truyền thống trong việc phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật trong các mẫu. Sau thời gian nuôi cấy trên bề mặt môi trường thạch, các khuẩn lạc vi khuẩn được chuyển lên màng lai, các khuẩn lạc này được ly giải trong môi trường kiềm hay xử lý bằng emzym, sau đó tiến hành lai phân tử. Phương pháp này phụ thuộc vào khả năng phát triển của vi sinh vật mục tiêu trên môi trường, chúng không phụ thuộc sự phát triển các các quần thể vi sinh vật khác. Sự phát triển của vi sinh vật mục tiêu trong môi trường làm gia tăng số lượng bản sao của các gen mục tiêu, vì thế chúng sẽ gia tăng khả năng phát hiện của các mẫu dò.

Nguyên tắc của phương pháp này được phát triển đầu tiên bởi M. Grunstein và S.D. Hogness (1975) nhằm mục đích sàng lọc trên đĩa có mật độ cao cho các dòng nuôi cấy thuần. Trong qui trình nuôi cấy khuẩn lạc vi khuẩn phát triển trên môi trường rắn được chuyển lên một giá đỡ phù hợp như màng nitrocellulose, ly giải để tách DNA và biến tính chúng sau đó cố định chúng trên màng. Màng lọc cố định DNA được ủ với mẫu dò. Mẫu dò được tách ra từ một đoạn thông tin di truyền. Và được đánh dấu bằng các các đồng vị phóng xạ như ^{32}P hay các chất phát quang khác như biotin. Hiện tượng lai được din ra nếu các trình tự base của các tế bào được ly giải tương đồng với các trình tự trên mẫu dò để hình thành các đoạn lai mạch đôi. Các đoạn lai này được phát hiện bằng bằng các film phóng xạ tự ghi khi các mẫu dò được đánh dấu bằng các đồng vị phóng xạ, hay các film nhạy sáng khi các mẫu dò được đánh dấu bằng biotin. Bằng phương pháp này, các đặc điểm di truyền đặc trưng được phát hiện một cách chuyên biệt. Nếu chọn mẫu dò đặc trưng cho một nhóm vi sinh vật, phương pháp này có thể phát hiện và định lượng nhóm vi sinh vật đó trong mẫu.

Mẫu dò được lai với các vi sinh vật có nguồn gốc từ mẫu, hay các dòng thuần được phân lập và nuôi cấy thứ cấp. Bằng phương pháp này có thể cải thiện được các bất tiện trong quá trình phân tích bằng phương pháp nuôi cấy thuần tuy như:

- Tránh được những sai lệch trong quá trình đếm khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy chọn lọc.
- Chắc chắn phát hiện được các dòng mang kiểu gen mục tiêu cần phát hiện dù các gen đó không hay biểu hiện rất kém trong một số điều kiện nuôi cấy.
- Có thể phân tích được các vi sinh vật bị tress hay không thể nuôi cấy được trên các môi trường chọn lọc bằng cách thay thế bằng môi trường không chọn lọc hay môi trường dinh dưỡng tối đa.
- Giảm được thời gian phân tích bằng cách giảm thời gian nuôi cấy, quá trình định lượng giả định và thời gian khẳng định kiểu gen hay kiểu hình.

Phương pháp lai khuẩn lạc cũng được sử dụng để khẳng định các dòng vi sinh vật nghi ngờ đã được làm thuần.

Ứng dụng chủ yếu của phương pháp lai khuẩn lạc là phát hiện, định lượng và phân lập các vi sinh vật có kiểu hình và kiểu gen đặc trưng. Và được sử dụng đặc biệt trong việc kiểm soát sự hiện diện và hoạt động của các dòng vi sinh vật trong môi trường. Nghiên cứu sự phân

<http://www.ebook.edu.vn>

bổ các vi sinh vật kháng kháng sinh, kháng kim loại nặng trong nước trong các mẫu môi trường và trong thực phẩm.

Chương 3

CÁC PHẢN ỨNG SINH HOÁ TRONG XÁC ĐỊNH VI DINH VẬT

Để xác định vi sinh vật dựa trên những đặc điểm về kiểu hình thì những vi sinh cần phát hiện trong mẫu phải có các đặc điểm để nhận ra chúng và có các biểu hiện khác biệt về kiểu hình trong suốt thời gian nuôi cấy *In vitro* (Atlas 1991). Trong một số trường hợp, quan sát một đặc điểm riêng biệt có thể đủ để nhận ra một số vi sinh vật mục tiêu. Trong những trường hợp khác, cần thiết phải xác định lần lượt nhiều đặc điểm khác biệt nhau để phân biệt các vi sinh vật mục tiêu với các vi sinh vật khác. Việc xác định rõ ràng một vi sinh vật trên cơ sở kiểu hình là công việc khó khăn bởi vì ngay cả những vi sinh vật có mối quan hệ họ hàng xa cũng có thể có kiểu hình tương tự ở một số đặc điểm.

Phương pháp cổ điển để xác định vi sinh vật là cấy chúng lên môi trường rắn (qui trình cấy đĩa) hay trong môi trường canh (qui trình tăng sinh) chứa tất cả các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật mục tiêu, ủ môi trường đã nuôi cấy trong điều kiện thích hợp cho sự phát triển của vi sinh vật đồng thời chúng biểu hiện kiểu hình có thể nhận ra.

Quá trình cấy lên đĩa nhằm tách biệt các tế bào các vi sinh vật để cho chúng rời nhau ở những vị trí độc lập trên môi trường rắn, khi tế bào vi sinh vật ở những vị trí riêng rẽ sinh sản, chúng hình thành những khuẩn lạc riêng biệt bao gồm những tế bào có nguồn gốc từ một tế bào khởi đầu. Qui trình cấy đĩa bao gồm hai giai đoạn: 1. Phân lập các vi sinh vật từ tập hợp các vi sinh vật trong quần thể tự nhiên sao cho kiểu hình của mỗi vi sinh vật được xác định trên cơ sở của phương pháp nuôi cấy thuần khiết của vi sinh vật học, 2. Chúng phát triển và thể hiện những dấu hiệu (kiểu hình) để có thể nhận ra thông qua sự sinh sản của tế bào. Đặc điểm kiểu hình của hàng triệu tế bào được cho là giống nhau trong một khuẩn lạc có thể được quan sát dễ dàng hơn nhiều so với các vi sinh vật riêng lẻ.

Phương pháp đếm đĩa có hiệu quả trong việc xác định một vi sinh vật cụ thể khi những vi sinh vật mục tiêu đó hiện diện một số lớn trong tập hợp vi sinh vật, sự hiện diện với số lượng thấp có thể không được phát hiện trong phương pháp này. Trong trường hợp một loài vi sinh vật chỉ chiếm một số lượng nhỏ trong tập hợp đó, thì có thể dùng môi trường nuôi cấy lỏng trong điều kiện thích hợp đặt hiệu cho sự phát triển của vi sinh vật đó để tăng sinh chúng.

Với sự điều chỉnh các thành phần hóa học trong môi trường và điều kiện nuôi cấy, qui trình cấy đĩa và tăng sinh được áp dụng để phân biệt hay chọn lọc để phát hiện các vi sinh vật mục tiêu. Khả năng phát triển của một vi sinh vật trên một môi trường cụ thể dựa vào khả năng sử dụng các thành phần dinh dưỡng hữu cơ hay vô cơ đặc hiệu trong môi trường đó. Môi trường nuôi cấy có tính chọn lọc là do các thành phần cấu thành nên chúng (như là nguồn carbon cụ thể, nồng độ muối và các phân khác). Điều kiện nuôi cấy cũng có thể gây chọn lọc bởi sự điều chỉnh điều kiện sinh lý tăng trưởng (như nhiệt độ, nồng độ oxygen...). Bổ sung thêm các hợp chất gây ức chế vào môi trường để hạn chế sự phát triển của một số lớn các vi sinh vật và kích thích sự phát triển các loài khác mong muốn.

Vì đặc điểm kiểu hình của vi sinh vật phụ thuộc vào đặc điểm trao đổi chất đặc hiệu với thành phần dinh dưỡng có mặt trong môi trường, thuốc nhuộm, tác nhân oxy hóa và nhiều thành phần khác có mặt trong môi trường để phản ánh sự trao đổi chất các chất dinh dưỡng đặc hiệu bởi các quần thể khác nhau và từ đó đưa đến sự biểu hiện khác nhau giữa các vi sinh vật mục tiêu.

Phương pháp phát hiện vi sinh vật bằng các dùng môi trường nuôi cấy thường theo một qui trình có hệ thống nhằm vào sự tiện lợi của những đặc điểm đặc hiệu của vi sinh vật như là khả năng sử dụng dinh dưỡng, tính kháng với các loại kháng sinh, từ đó vi sinh vật mục tiêu có

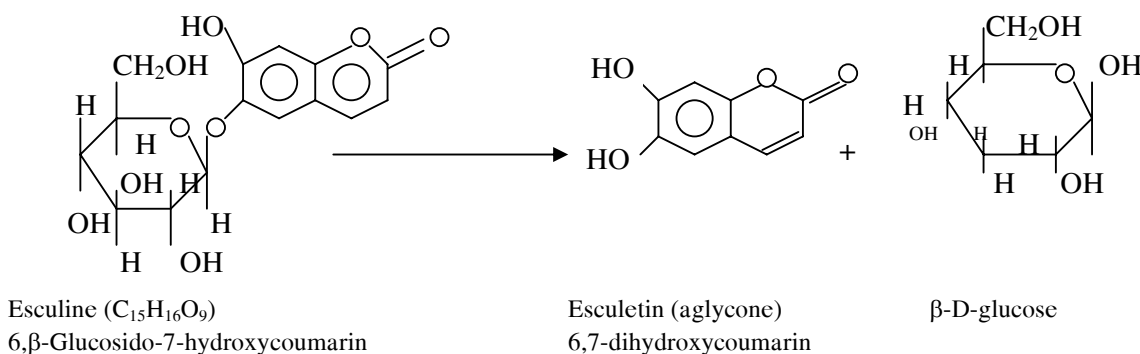
ưu thế phát triển hơn so với các loài khác. Tóm lại, đặc điểm có thể nhận thấy (như là sắc tố), khả năng sử dụng một cơ chất đặc hiệu hay tính kháng lại các kháng sinh hay kim loại nặng được dùng để phân biệt các vi sinh vật mục tiêu từ tập hợp các vi sinh vật.

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

1. Thử nghiệm Bile esculin

Nguyên tắc: Nhằm xác định khả năng của một vi sinh vật có thể thủy giải 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 giải 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*.

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:

Carbohydrate được chia thành các nhóm như sau 1. monosaccharide, polyhydroxylic aldehyde hay ketone, 2. polysaccharide hay oligosaccharide, 3. polyhydric alcohol và các cyclitol, các sản phẩm khử của monosaccharide.

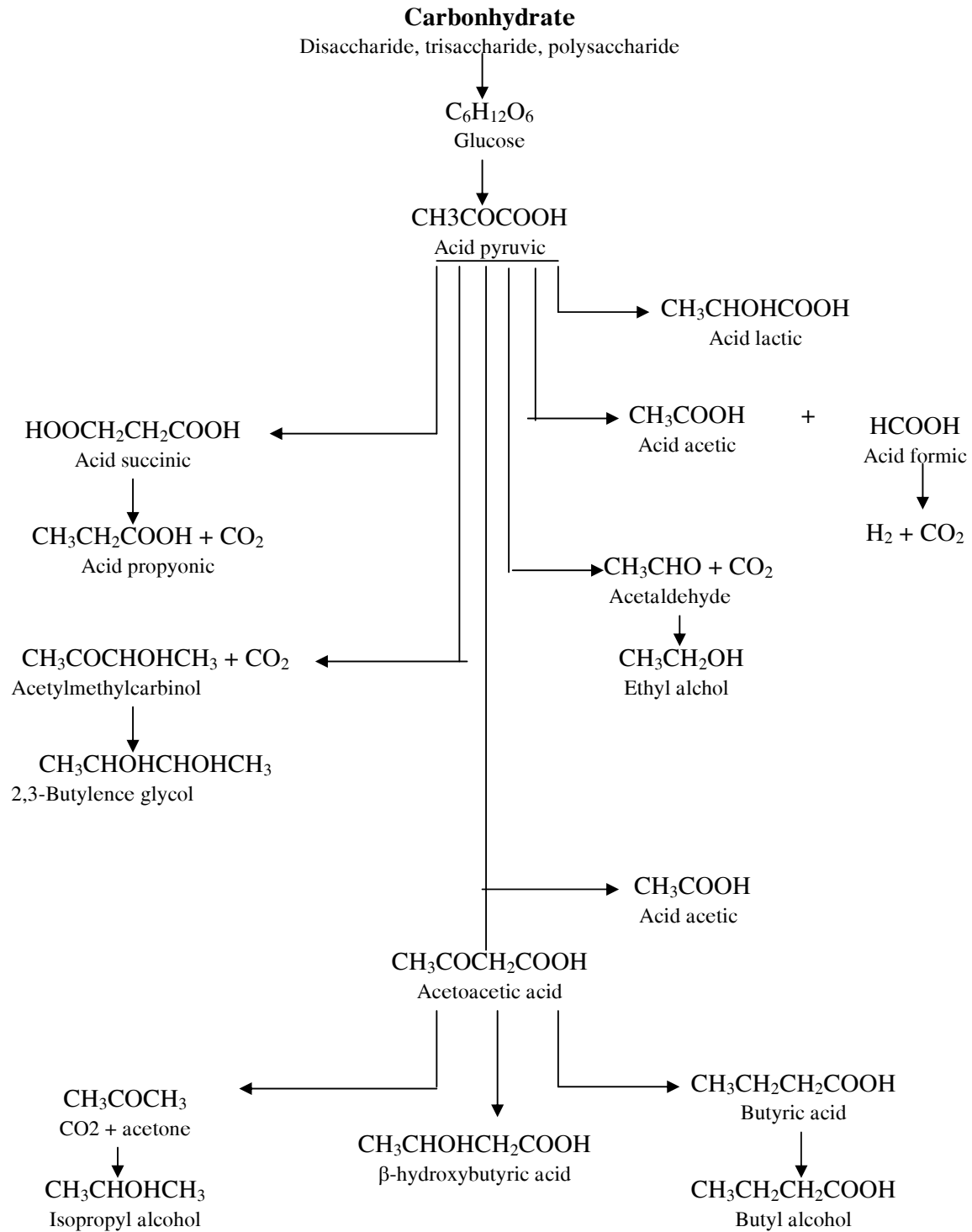
Một số alcohol được gọi là đường như adonitol, mannitol, sorbitol,... tất cả các sản phẩm này là kết quả của quá trình khử các monosaccharide. Các polysaccharide, trisaccharide và disaccharide là những hợp chất phức tạp, vi sinh vật không thể hấp thu một cách dễ dàng cho quá trình chuyển hoá. Để chúng có thể sử dụng được các carbohydrate này, vi sinh vật phải tổng hợp và tiết ra ngoài các emzym 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.

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 ...

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 hydrate carbon 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 Carbonhydrate 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)

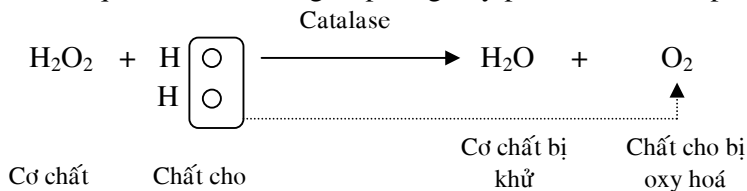
3. Thử nghiệm catalase

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

Cơ sở sinh hoá: Enzym 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 enzym catalase, vì thế chúng không có khả năng phân huỷ hydroperoxide. Những vi sinh vật kỵ khí bắt buộc như *Clostridium* có hệ thống peroxydase thay cho enzym catalase. Tuy thế enzym catalase hoạt động không chuyên biệt và chúng có thể can thiệp vào hoạt động của enzym peroxydase. Cả hai enzym catalase và oxydase được chia vào nhóm enzym hydroperoxydase, đây là hai nhóm enzym thường được tìm thấy trong thực vật (peroxydase) và trong động vật (catalase). Catalase là một homoprotein bao gồm bốn cấu tử protein và một nhân Fe^{3+} .

Nhưng theo Burrow và Moulder có những bằng chứng cho rằng một số vi khuẩn có những enzym catalase không chứa nhân Fe^{3+} , các nghiên cứu của Dacre và Sharpe cho thấy hoạt tính catalase có hai dạng mạnh và yếu trong lactobacillus, các nghiên cứu của Whittenbury cho thấy có hai dạng catalase trong vi khuẩn lactic: nhóm catalase phân huỷ hydroperoxyde, nhóm này không nhạy với điều kiện môi trường acid; và nhóm giả catalase, nhóm này bị mất hoạt tính trong môi trường acide. Một số nghiên cứu khác cũng chứng minh rằng có hai kiểu 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 ydroperoxide 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:



Cơ chế phản ứng phân huỷ hydroperoxyde bởi catalase

Phương pháp tiến hành thử nghiệm

Cách 1: Cho hỗn hợp nuôi cấy vi sinh vật vào 0,5ml dung dịch Tween 80, tất 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. faecalis*

4. Thử nghiệm citrate

Nguyên tắc: Nhằm xác định khả năng vi sinh vật sử dụng nguồn citrat như là nguồn carbon duy nhất.

Cơ sở sinh hoá: Năng lượng cung cấp cho vi sinh vật khi trong môi trường không có nguồn nguyên liệu sử dụng cho quá trình lên men hay tạo các sản phẩm lactic bằng cách sử dụng citrate như là nguồn carbon duy nhất. Trong thường, 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 vi khuẩn sự tách citrate bao gồm một hệ thống enzym không có sự

tham gia của enzym acetyl –CoA, enzym này được gọi là citratase (citrate axaloacetat – lyase) hay citate demolase. Enzym này đòi hỏi một cation có hoạt trị 2 cho hoạt động của chúng , thông thường các cation này là magne (Mg^{2+}) hay mangan (Mn^{2+}).

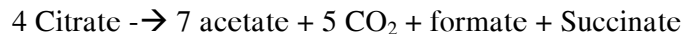
Bước đầu tiên vi sinh vật tách citrate thành oxaloacetate và acetate. Đây là hai sản phẩm trung gian trong quá trình đồng hoá citrate, còn sản phẩm nhận được từ quá trình này phụ thuộc vào pH của môi trường. Nếu pH kiềm thì trong môi trường sẽ nhận được nhiều acetate và formate, nếu pH acid thì sản phẩm tạo ra là lactate và CO_2 . pH trên 7,0 không có sản phẩm lactate trong môi trường và sản phẩm nhận được như sau:



Ở pH acid acetyl methycarbinol (acetoin) và latate là sản phẩm chính của quá trình sử dụng citate.

Môi trường sử dụng cho quá trình lên men citrate còn chứa muối vô cơ amonium. Một vi sinh vật có khả năng sử dụng citrate là nguồn carbon duy nhất cũng có thể sử dụng ammonium như là nguồn nitơ duy nhất, amonium bị phân huỷ để tạo thành amonia, chất này sẽ làm kiềm môi trường nuôi cấy.

Deffner và Franke thành lập công thức cho môi trường citrate cho các vi sinh vật đường ruột, sản phẩm thu được sau quá trình nuôi cấy như sau:



Sự sử dụng các acid hữu cơ ở dạng muối của chúng như là nguồn carbon tạo nên các carbonate hay bicarbonate kiềm tính.

Để sử dụng cho việc thử nghiệm citrate, có thể sử dụng môi trường Simmon citrate agar hay môi trường lỏng Koser. Nên cấy một lượng vi sinh vật vừa phải, nếu cấy với mật độ quá dày có thể gây nên hiện tượng dương tính giả. Sau khi cấy, ủ ở nhiệt độ 30-37°C, quan sát sự phát triển của vi sinh vật và sự chuyển sang kim của môi trường.

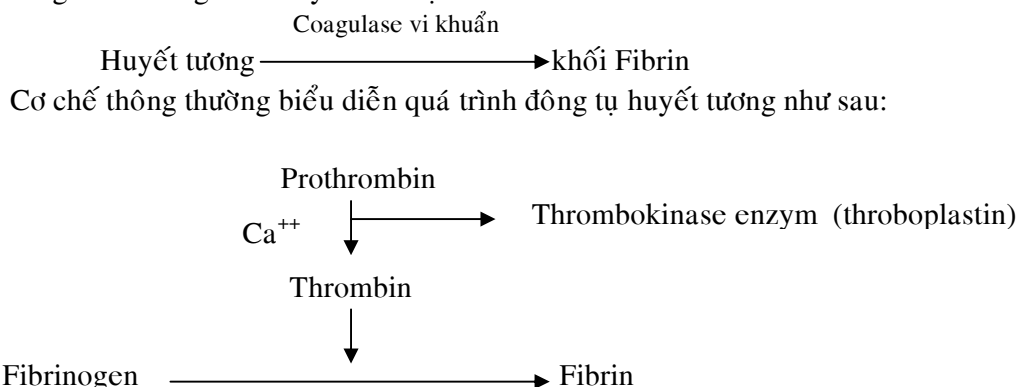
Các chủng vi sinh vật đối chứng: Đối chứng dương: *P. rettgeri*; đối chứng âm: *S. epidermidis*.

5. Thử nghiệm coagulase.

Nguyên tắc: Thử nghiệm khả năng của một số vi sinh vật làm đông tụ huyết tương bởi hoạt động của enzym coagulase.

Cơ sở sinh hoá: Coagulase là enzym được tạo ra bởi *S. aureus*, là một enzym liên quan đến khả năng bền nhiệt, có thể bền đến nhiệt độ 60°C trong gian 30 phút. Enzym 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 là enzym đóng vai trò đông tụ huyết tương, chúng kết hợp các cấu tử trong huyết tương thành từng khối hay thành cục.



Mô hình cơ chế đông tụ huyết tương

Oginsky và Umbreit cho rằng có những bằng chứng chứng minh rằng coagulase có một cơ chế ngưng kết huyết tương khác, chúng là những tác nhân hoạt hoá các thành phần trong huyết tương để chuyển fibrinogen thành khối fibrin. Smith và các đồng sự cho rằng coagulase là một cơ chất giống prothrombin, chất này phản ứng với các huyết tương tạo thành phức chất giống thrombin và chất này kết hợp các fibrinogen thành khối fibrin.

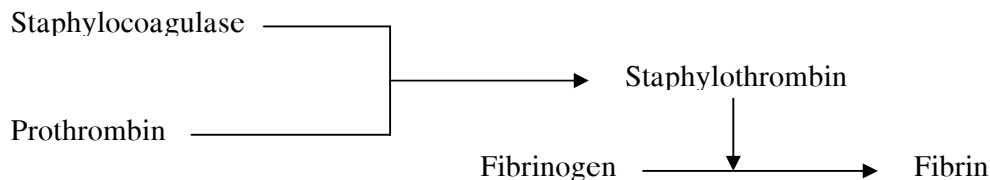
Theo Burrow và Moulder, sự đông tụ huyết tương diễn ra qua hai bước như sau:

Bước I: Phản ứng giữa enzym do vi khuẩn tiết ra (proenzym) với các nhân tố hoạt động hiện diện trong huyết tương để tạo thành coagulase.

Bước II: Coagulase hoạt động ngưng kết các thành tố fibrinogen thành fibrin.

Cũng theo Burrow và Moulder nhân tố do vi khuẩn tiết ra là procoagulase kết hợp với nhân tố trong huyết tương là một dạng globulin, nhưng chất này không được chứng minh có phải là prothrombin hay không. Tác giả Dithrie chứng minh rằng enzym coagulase do Burrow và Moulder thành lập chính là procoagulase, chúng hiện diện ở hai dạng: dạng coagulase giới hạn bên trong tế bào và dạng tự do. Trong các thử nghiệm coagulase được tiến hành trên lam kính chỉ có các coagulase giới hạn tham gia vào việc chuyển fibrinogen thành fibrin còn trong thử nghiệm coagulase trên ống cả hai dạng giới hạn và tự do tham gia vào việc ngưng kết này.

Còn theo các nghiên cứu của Soulier, Tager và Zajden kết luận rằng, coagulase và prothrombin không có hoạt tính enzym, như sự tham gia của chúng tạo nên các phức hợp bên với các hoạt động ly giải đặc hiệu gọi là taphylothrombin, 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:



Sơ đồ cơ chế tác động của Staphylocoagulase lên sự ngưng kết huyết tương

Cách tiến hành: Để phát hiện coagulase của vi khuẩn có hai cách tiến hành như sau:

Cách I: Tiến hành thử nghiệm trên Lam kính

Lấy 1 hay 2 khuẩn lạc của vi khuẩn huyền phù vào trong giọt nước trên lam kính, quan sát trong khoảng 10 giây, nếu không có hiện tượng ngưng kết, dùng que cấy đưa huyết tương thử hay người đã được cố định bằng EDTA hoà 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 II: 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 có glucose đặt 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.

Trên thị trường hiện nay có các loại huyết tương được cố định trong các giá thể khác nhau như EDTA, citrate hay trong oxalate. Nếu sử dụng huyết tương citrate có thể gây ngưng

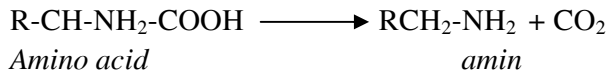
kết bởi các dòng vi sinh vật sử dụng citrate hay fecal Streptococci. Vì thế để kiểm tra Staphylocoagulase chỉ nên sử dụng loại huyết tương cố định trong EDTA hay trong oxalate.

Các thử nghiệm trên lam chỉ phát hiện các coagulase giới hạn, chúng sẽ hoạt động trực tiếp lên các fibrinogen. Thử nghiệm trên các ống nghiệm nhằm phát hiện cả coagulase tự do và coagulase giới hạn, chúng hoạt động làm ngưng kết các thành phần trong huyết tương. Hiện nay có nhiều kit đã được thương mại hoá nhằm phát hiện *S. aureus* như nhựa ngưng kết (latex kit) như slidex (biomerieux); Staphylex (Oxoid); Staphynuclease (API) ...

6. Thử nghiệm decarboxylase và dehydrolase của các amino acid

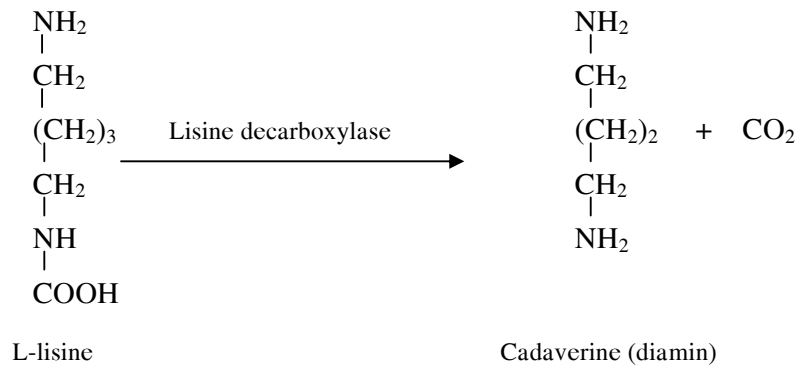
Nguyên tắc: Thử nghiệm dehydrolase và decarboxylase nhằm xác định khả năng của một vi sinh có thể tổng hợp các emzym khử nhóm carboxyl hay tách hydrogen từ các acid amin như lysine, ornithin, hay arginine, qua đó chúng làm kiềm môi trường nuôi cấy.

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.

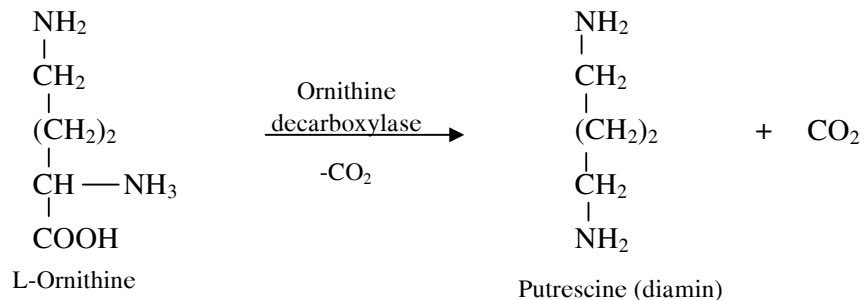


Enzym decarboxylase có nhất nhiều loại khác nhau, trong đó một loại sẽ tác động lên một cơ chất khác nhau. Trong các phòng thí nghiệm nghiên cứu vi sinh vật gây bệnh ba nhóm enzym decarboxylase quan trọng thường hay sử dụng là lysine, ornithine, arginine. Đây là những enzym cảm ứng, chúng chỉ được tổng hợp khi trong môi trường nuôi cấy có pH acid và có cơ chất đặc hiệu. Các sản phẩm của chúng sẽ làm cho môi trường chuyển sang kiềm. Quá trình này diễn ra trên các aminoacid có nhiều hơn một gốc NH₂ ngoài nhóm NH₂ ở C_α. trong điều kiện môi trường kỵ khí, và cần có một coenzym, thông thường coenzym này là pyridoxal phosphate.

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



Phản ứng khử amin bởi lysine decarboxylase

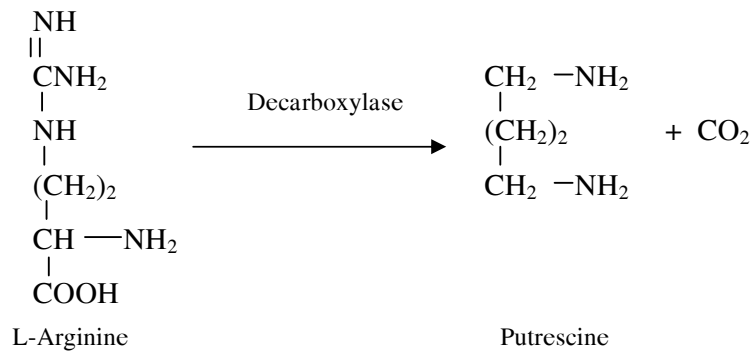


Phản ứng khử amin bởi Ornithine decarboxylase

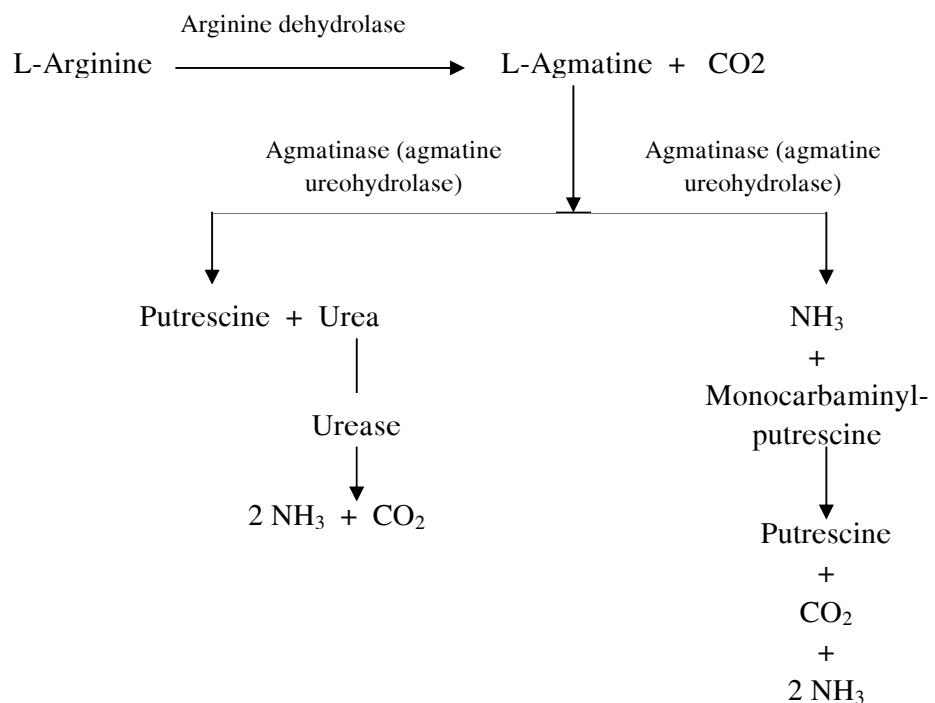
Acid amin L-ornithine bị khử nhóm carboxyl bởi enzym ornithine decarboxylase sẽ thu được một diamin là putrescine và CO₂. Cả hai chất putrescine và cadaverine đều bền trong điều kiện kỵ khí. Vì thế khi nuôi cấy vi sinh để thử nghiệm, phải nuôi trong điều kiện kỵ khí, trên bề mặt môi trường nuôi cấy phải được phủ một lớp parafin hay dầu khoáng để ngăn cản sự khuếch tán của oxy. Sau quá trình nuôi cấy, pH của môi trường sẽ thay đổi về phía kiềm, pH của môi trường có thể được kiểm soát do đó có thể nhận biết phản ứng trong môi trường nuôi cấy bởi các chất chỉ thị pH. Các chất chỉ thị pH thường được sử dụng trong thử nghiệm này là Bromcresol purple hay cresol red.

Riêng đối với L-arginine có thể được trao đổi bởi hai con đường trong quá trình nuôi cấy, thông qua hai enzym: arginine dehydrolase và Arginine decarboxylase. 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 enzym arginine dehydrolase được tiến hành theo sơ đồ sau:

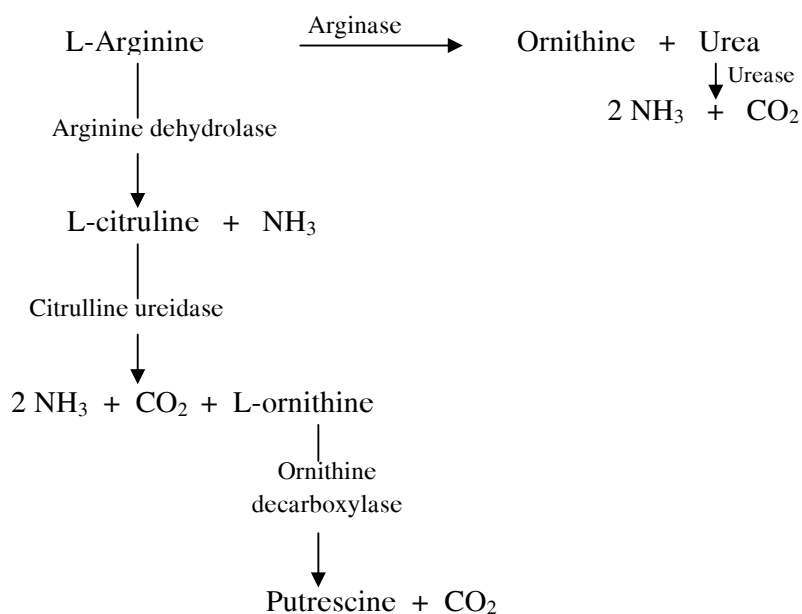


Hoạt động của toàn hệ thống như sau



Theo hệ thống này, sản phẩm sau quá trình trao đổi chất nhận được agmatine và một lượng lớn putrescine, nhưng chất này không phải là sản phẩm trao đổi chất cuối cùng mà chúng tham gia vào một loạt các phản ứng khác, cuối cùng sẽ thu được các sản phẩm là CO₂ và NH₃.

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



Hệ thống hoạt động của vi khuẩn có hệ enzym arginine dehydrolase

Bước đầu tiên của quá trình là tách hydro của gốc NH₂ từ arginine bởi enzym arginine dehydrolase để tạo thành citrulline và NH₃ và một phosphate vô cơ. Bước tiếp theo citrulline dưới tác dụng của enzym citrulline ureidase có sự hiện diện của H₃PO₄ để tạo thành ornithine và carbamyl phosphate, chất này sẽ được thủy giải để thu nhận ATP. Như vậy kết thúc quá trình sẽ thu nhận được ATP cho các hoạt động khác của vi sinh vật.

Sản phẩm cuối cùng của quá trình phân hủy arginine cùng những sản phẩm NH₃ và CO₂, đây là những chất làm kiềm môi trường nuôi cấy. Có thể nhận biết phản ứng này qua các chất chỉ thị pH hiện diện trong môi trường.

Phương pháp thử nghiệm của Falkow được sử dụng đối với các vi sinh vật có hình que, gram âm, nhưng phương pháp của Moeller cho kết quả tốt hơn đối với các vi sinh vật thuộc họ *Enterobacteriaceae*. Môi trường Falkow được sử dụng chỉ cho thử nghiệm Lysine Decarboxylase, trong khi đó môi trường Moeller được sử dụng cho tất cả các thử nghiệm đối với Lysine, Arginine và Ornithine.

Vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường Falkow, ủ ở 37°C trong 24 giờ, chất chỉ thị trong môi trường là bromocresol purple. Nếu phản ứng dương tính, môi trường giữ nguyên màu tím ban đầu, canh khuẩn đục, nếu phản ứng âm tính, môi trường chuyển từ màu tím sang vàng.

Nếu sử dụng môi trường Moeller cho các thử nghiệm này, phải 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 24-28

giờ. Trong môi trường có hai chất chỉ thị pH: bromothymol blue và cresol red. 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 đối chứng:

Lysin: dương tính: *S.marcescens*, âm tính: *P.rettgeri*

Arginine: dương tính: *E.cloacae*, âm tính: *E.aerogenes*

Ornithine: dương tính: *S.marcescens*, âm tính: *P.rettgeri*

7. Thử nghiệm DNase và thermonuclease

Nguyên tắc

- thử nghiệm DNase nhằm phát hiện khả năng tổng hợp enzym deoxyribonuclease (Dnase) để phân huỷ DNA.
- Thử nghiệm thermonuclease nhằm thử nghiệm tính bền nhiệt của Dnase từ *Staphylococcus aureus* khi vi sinh vật được đun nóng.

Cơ sở sinh hoá

Thử nghiệm DNase: Enzym nuclease là enzym phân huỷ acid nucleic được chia thành hai nhóm như sau: Nhóm 1. Endonuclease là những enzym phân huỷ các nối phosphodiester ở bên trong mạch DNA để tạo ra các đầu 3'-hydroxyl và 5'-phosphoryl hay 5'-hydroxyl và 3'-phosphoryl. Nhóm 2. Exonuclease chỉ phân huỷ các nucleotide ở các đầu tận cùng của chuỗi DNA. Một số nuclease có thể phân huỷ cả hai mạch trên sợi DNA, một số khác chỉ có thể phân huỷ một mạch đơn. DNA có các đặc tính vật lý và hoá học khác với nucleotide và oligonucleotide. Sự khác biệt này được dùng để phát hiện sự ly giải DNA bởi các enzym Dnase.

Dnase là một enzym ngoại bào, chúng chỉ phân huỷ các acid nucleic. Hầu hết tất cả các Dnase vi khuẩn đều cần một cation hóa trị hai để cho enzym này hoạt động. Cation thông thường hiện diện trong các pepton được sử dụng trong môi trường nuôi cấy thử nghiệm. Hoạt động của enzym xảy ra trong khoảng pH 5,5-8,5 nhưng thích hợp nhất tại pH 7,2. Có thể phân biệt nhiều loại DNase bằng các kháng thể hay bằng các tác nhân ức chế.

Khi phân giải, khoảng ¼ số nối phosphodiester hay nối hydrogen bị phân huỷ và thu được một hỗn hợp các oligonucleotide trong môi trường nuôi cấy. Trong hỗn hợp này gồm có các đoạn DNA có tận cùng là 3'-hydroxyl và 3'-phosphoryl; 5'-hydroxyl và 5'-phosphoryl. Khi DNA còn lại các mạch ngắn, nâng nhiệt độ hay pH cao quá bình thường sẽ làm biến tính các đoạn này. Khi có hiện tượng biến tính, hỗn hợp DNA sẽ giảm độ nhớt và gia tăng mức độ hấp thụ UV ở bước sóng 260nm. Hiệu ứng thay đổi này là do có nồng độ deoxyribonucleotide gia tăng trong dung dịch so với cơ chất DNA ban đầu.

DNA hiện diện trong các dịch chiết vi sinh vật. Nhưng DNase ngoại bào chỉ hiện diện ở một số loài như *S. aureus* hay *Streptococcus* nhóm A...

- **Thermonuclease của *S. aureus*:** cũng như tất cả các vi sinh vật khác *S. aureus* đều có thể tổng hợp DNase ngoại bào, như có điểm khác biệt so với tất cả các loài vi sinh vật khác, DNase của *S. aureus* bền nhiệt hơn và cần ligand Ca^{2+} cho sự hoạt động của chúng, chúng phân huỷ DNA mạnh ở pH kiềm 8,6-9,0. Sự hiện diện của DNase bền nhiệt ở *S. aureus* có liên quan đến sự có mặt coagulase ở loài vi sinh vật này. DNase của *S. aureus* có thể bảo toàn hoạt tính khi nâng nhiệt độ đến 100°C trong 15phút.

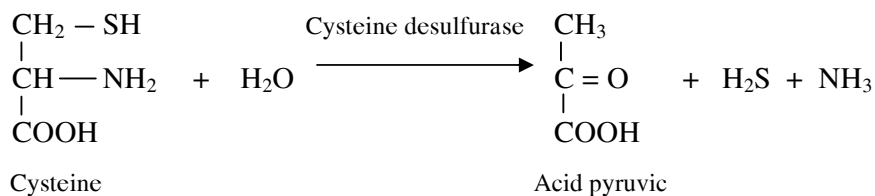
Phương pháp thử nghiệm: trải một tấm vi khuẩn dày lên môi trường Dnase agar, ủ qua đêm. Cho acid gập trên bề mặt môi trường sau khi ủ. Quan sát hiện tượng tủa của các muối có trong môi trường. Nếu xung quanh khuẩn lạc hay trên đĩa có những quầng trong suốt do không có tủa các các muối trong môi trường là phản ứng dương tính.

8. Thử nghiệm khả năng sinh H₂S

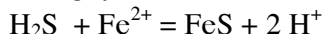
Nguyên tắc: Xác định khả năng sinh H₂S từ các hợp chất hữu cơ và vô cơ chứa lưu huỳnh trong quá trình phát triển của vi khuẩn tạo nên các vết màu đen trên môi trường nuôi cấy,

Cơ sở sinh hoá: Khi phân giải protein thu được các aminoacid, các vi sinh vật dị dưỡng có thể sử dụng các aminoacid để trao đổi trong quá trình sinh trưởng và phát triển và phóng thích khí H₂S từ những amonoacid chứa lưu huỳnh. 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. Các enzym của vi sinh vật tham gia vào quá trình này là desulphohydrase.

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.



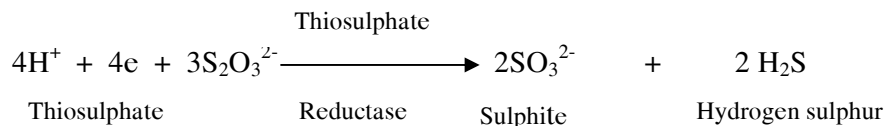
Trong môi trường có chứa các ion kim loại như ion sắt là dấu hiệu để nhận biết H₂S. Các hợp chất có thể nhận biết H₂S như sắt, FeSO₄, ferric amonium sulphate, sodium thiosulphate, bismuth sulphite. Nguyên tắc để nhận biết H₂S bằng các hợp chất trên như sau:



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

Trong các môi trường khác như Kligler Iron agar chất chỉ thị để nhận biết H₂S là các muối ferric ammonium citrate và một chất vô cơ sodium thiosulphate. Cả hai chất chỉ thị này đều phải hiện diện ngay từ đầu trong môi trường. Kết quả nhận biết sự tạo thành H₂S qua hai bước như sau:

Bước I: Vi sinh vật phát triển trong môi trường sẽ khử hợp chất thiosulphate để tạo thành sulphite và sulphate. Các nguồn carbohydrate có trong môi trường sẽ tạo thành môi trường acid trong phần sâu của môi trường KIA thông qua quá trình hô hấp kỵ khí. Môi trường acid trong phần sâu của ống nghiệm sẽ hỗ trợ cho phản ứng khử trên. Qua đó lưu huỳnh đóng vai trò là chất nhận điện tử cho quá trình oxy hóa-khử các hợp chất hữu cơ. Thiosulphate thay thế sulphate như là chất nhận điện tử và là nguồn cung cấp sulphur cho vi sinh vật.



H₂S tạo thành là một chất khí không màu. Một chất chỉ thị thứ hai cần thiết để nhận dạng chất khí này.

Bước II: Chất khí không màu H₂S phản ứng với các muối kim loại như ferric ammonium citrate để hình thành các hợp chất kết tủa có màu đen FeS. Ferric Ammonium citrate được sử

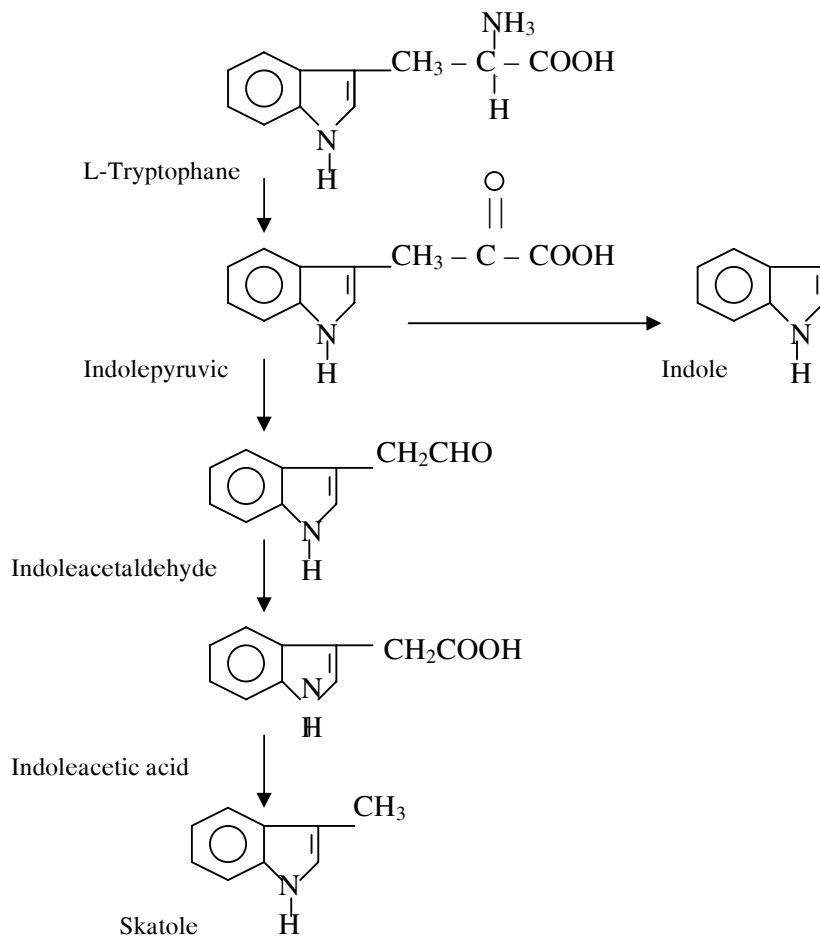
dụng nhiều hơn citrae sắt bởi vì chúng tan nhiều hơn trong môi trường. FeSO_4 cũng có thể được thay thế cho nguồn sắt trong môi trường. Ngoài ra khí H_2S cũng có thể được phát hiện bởi các kim loại khác như chì, bismuth, ... để hình thành nên các hợp chất sulphur kim loại có màu đen.

9. Thử nghiệm khả năng sinh indol

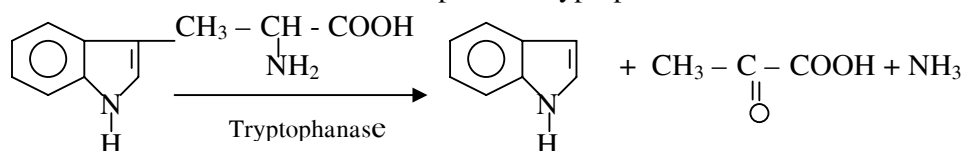
Nguyên tắc: Phát hiện khả năng của vi khuẩn có thể tạo indol trong môi trường canh trypton

Cơ sở sinh hoá: Tryptophan là một aminoacid có thể bị oxy hoá bởi một số vi sinh vật nhất định tạo nên các hợp chất indol hay các dẫn xuất của chúng như: indol, skatol (methyl indol) và indolacetic. Một số enzyme nội bào được gọi chung là tryptophanase tham gia trong quá trình tạo thành sản phẩm indol trong hoạt động thuỷ giải tryptophane.

Các hợp chất trung gian trong quá trình thuỷ giải tryptophan là acid indolepyruvic, từ đó indol được hình thành trong quá trình khử amin, hình thành skatol là quá trình khử carboxyl của acid indol acetic. Quá trình thuỷ giải tryptophan có thể được mô tả qua quá trình như sau:



Enzym 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.



Sự tách amin từ tryptophane là một dạng phản ứng khử. Qua quá trình này nhóm amin được tách ra và chuyển thành NH_3 , quá trình khử giải phóng một phần năng lượng được sử dụng cho hoạt động tăng trưởng của vi sinh vật. Đồng thời quá trình này còn tạo thành acid pyruvic, cơ chất tham gia vào chu trình Krebs' để tiếp tục thu năng lượng.

Phát hiện indol và các dẫn xuất của chúng trong môi trường nuôi cấy bằng thuốc thử Kovac's hay Ehrlich's. Cơ chất chính tham gia phát hiện indol trong môi trường nuôi cấy là p-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB). Chất này phản ứng với indol tạo thành một phức hợp màu đỏ. Phản ứng này là do nhân pyrrol của indol phản ứng với nhóm aldehyde của DMAB qua hai giai đoạn để tạo thành nhân quinone có màu đỏ, phản ứng như sau:

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.

10. Thử nghiệm trên môi trường Kligler Iron Agar hay trên môi trường Triple Sugar Iron agar

Nguyên tắc: Thử nghiệm này nhằm phát hiện khả năng sử dụng các nguồn carbohydrate có mặt trong môi trường, khả năng sinh H_2S và sinh khí trong môi trường.

Cơ sở sinh hoá: Môi trường Kligler Iron agar (KIA) và Triple 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 Carbohydrate 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 carbohydrate 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

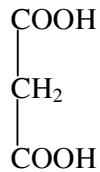
Môi trường KIA hay TSI được chuẩn bị trong các ống nghiệm với phần nghiêng cách nắp ống nghiệm khoảng 2,5cm và phần sâu có chiều cao khoảng 2,5cm. Dùng que cấy nhọn đưa vi sinh vật vào phần sâu của ống nhưng không đụng đáy ống, sau đó cấy ria trên phần nghiêng. Ủ các ống đã cấy ở 37°C trong 18-24 giờ. Ghi nhận các biểu hiện ở phần sâu, phần nghiêng, sự tích tụ khí và tạo thành H_2S .

11. Thử nghiệm malonate

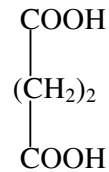
Nguyên tắc: Thử nghiệm nhằm xác định khả năng của vi sinh vật sử dụng malonate như là nguồn carbon duy nhất trong môi trường.

Cơ sở hoá học: Malonate là một tác nhân ức chế enzym 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 enzym succinic dehydrogenase. Acid malonic ức chế quá trình chuyển hoá

succinic bằng phương thức ức chế cạnh tranh do cấu trúc phân tử của malonic và succinic tương tự nhau.



Acid malonic



Acid succinic

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.

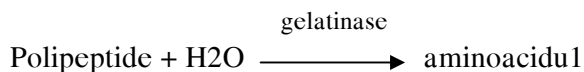
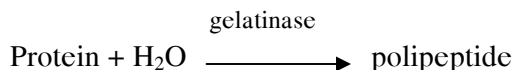
Phương pháp tiến hành: Cấy vi sinh vật vào trong môi trường malonate broth có chứa chất thị màu pH là bromothymol blue nuôi ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Phản ứng dương tính khi môi trường có dấu hiệu chuyển sang màu xanh dương. Phản ứng âm tính khi vi sinh vật không làm thay đổi màu môi trường.

12. Thử nghiệm làm tan gelatin

Nguyên tắc: Thử nghiệm khả năng của vi sinh vật có thể tổng hợp các enzym ngoại bào làm thuỷ giải gelatin.

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 enzym ngoại bào làm phân giải các phân tử gelatin thành các thành phần nhỏ hơn hay thành các monomer. Các enzym này thuộc nhóm gelatinase được tiết ra bên ngoài tế bào.

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



Phương pháp thực hiện: Để nhận biết khả năng làm tan gelatin của vi sinh vật, cơ chất này được thêm vào trong môi trường nuôi cấy, khi chưa cấy vi sinh vật, môi trường chứa gelatin sẽ ở dạng đông đặc. Sau khi nuôi cấy, vi sinh vật có khả năng tiết gelatinase sẽ làm môi trường tan chảy thành dạng lỏng. Phương pháp tiến hành như sau: 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. Cả hai ống sau khi ủ được cho vào trong tủ lạnh qua đêm. 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. Nhổ lên trên bề mặt đĩa 5-10ml dung dịch acid trichloacetic, các vi sinh vật cho khuẩn lạc có quần trong rỗ trên môi trường là các vi sinh vật làm tan chảy gelatin.

13. 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 tùy 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 $37^\circ C$.

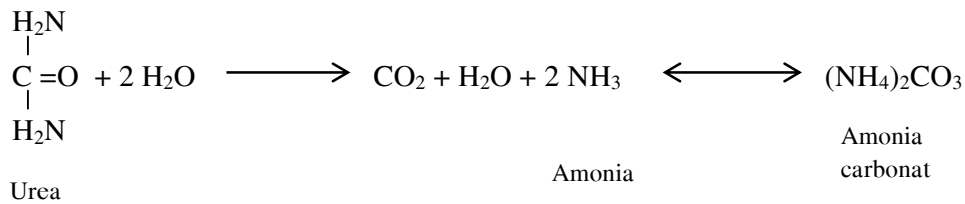
Phương pháp tiến hành: Nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường glucose phosphate (MR-VP broth) ủ trong khoảng 2-5 ngày. Thêm vào vài giọt thuốc thử methyl red được pha theo tỉ lệ 0,1g trong 300ml ml cồn và cho nước vào để đạt thể tích 500ml. Phản ứng dương tính khi môi trường chuyển sang màu đỏ. Phản ứng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

14. 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.

Thử nghiệm tính di động

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:



Enzym urease là một enzym quan trọng trong tế bào vi sinh vật, trong một số vi sinh vật đây là enzym cấu trúc, nhưng trong một số loài khác đây là enzym cảm ứng. Khi có cơ chất urea hiện diện trong môi trường, enzym 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.

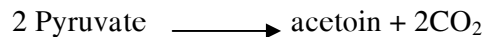
Phương pháp tiến hành: Cấy vi sinh vật vào môi trường canh urea có chứa chất chỉ thị là phenol red, ủ ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 12-18 giờ. Phản ứng dương tính khi môi trường chuyển sang màu đỏ hồng, phản ứng âm tính khi môi trường không chuyển màu.

17. Thử nghiệm Voges – Proskauer (VP)

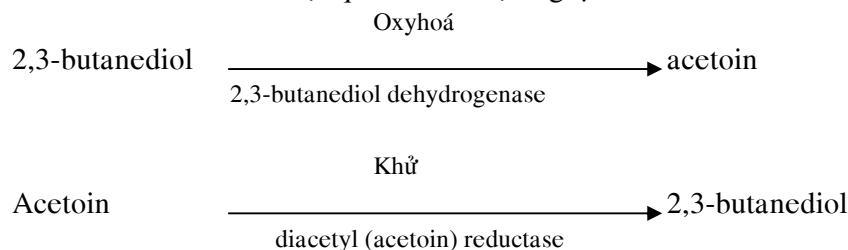
Nguyên tắc: Phát hiện khả năng vi sinh vật tạo thành một số sản phẩm trung tính acetylmethylcarbimol (acetoin) trong quá trình lên men glucose.

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:

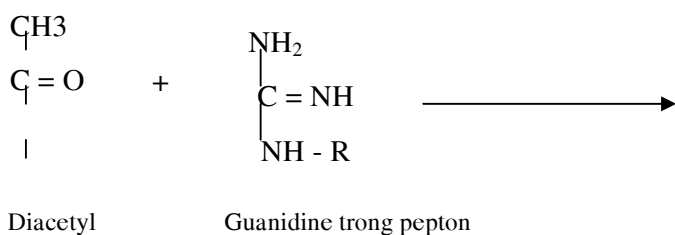
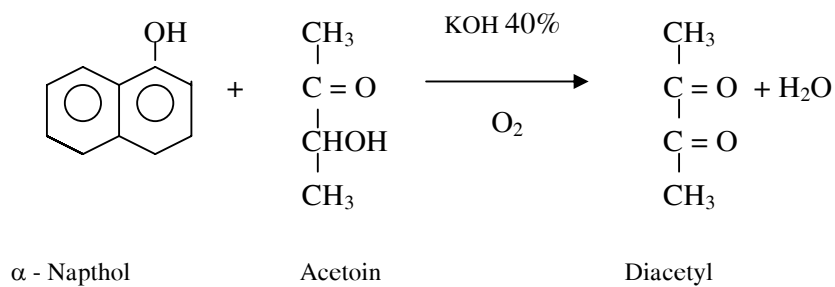
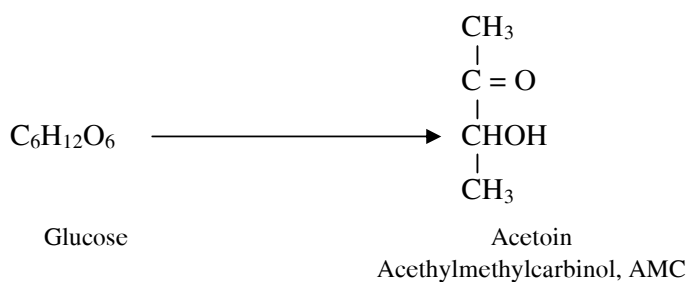


Vì acetoin là một sản phẩm trung gian trong bước tạo thành 2,3-butanediol nên trong môi trường nuôi cấy tích lũy một lượng rất ít tiền chất này. Để acetoin tích lũy nhiều, dễ dàng cho việc phát hiện, vi sinh vật phải nuôi trong điều kiện hiếu khí. Quá trình chuyển hoá giữa acetoin và 2,3-butanediol là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



C = O

CH₃

Phức hợp màu đỏ hồng

Trong các thành phần tham gia phản ứng để tạo phức chất có màu đỏ hồng có hợp chất guanidine, ví dụ arginine NH:C(NH₂)-NH-(CH₂)₃-CH(NH₂)-COOH, chất này hiện diện trong pepton được sử dụng trong môi trường nuôi cấy.

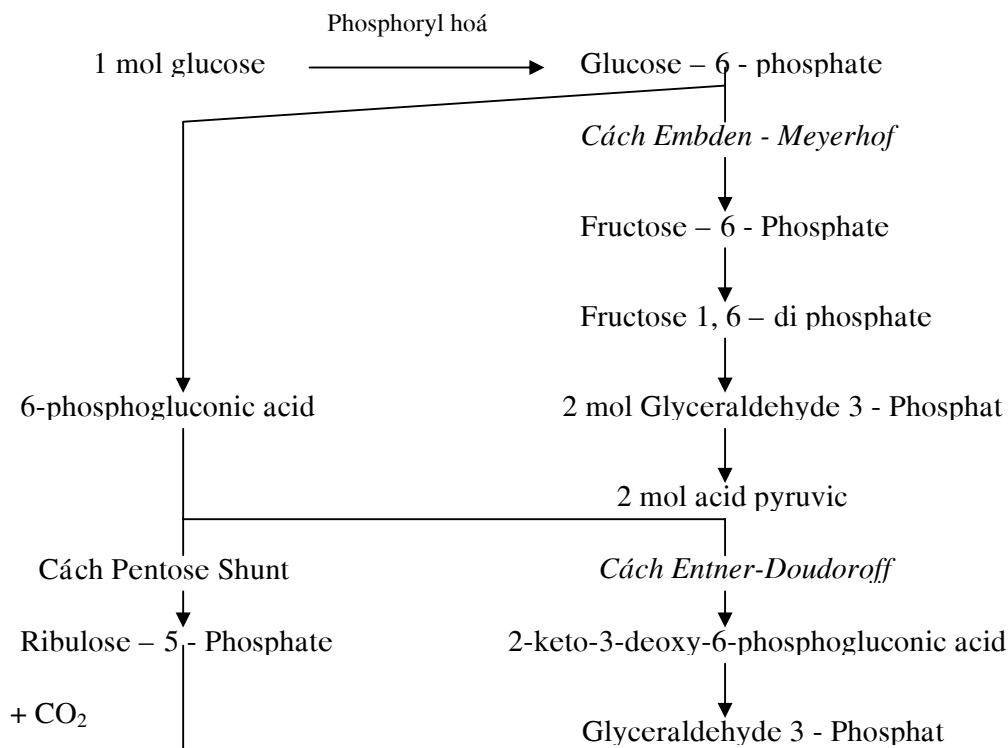
Phương pháp tiến hành: Cấy vi sinh vật vào trong môi trường canh glucose phosphate (MR-VP broth), ủ ở nhiệt độ 37°C trong khoảng 2-5 ngày. Thêm vào canh khuẩn sau nuôi cấy 3ml dung dịch 1-naphthol 5% trong cồn, bổ sung thêm 3ml dung dịch KOH hay NaOH 40%, lắc mạnh. Quan sát phản ứng trong khoảng 5 phút.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

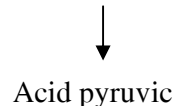
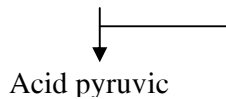
18. Thử nghiệm lên men – oxy hoá (Thử nghiệm Hugh&Leifson)

Nguyên tắc: Xác định vi sinh vật trao đổi carbohydrate bằng quá trình oxyhoá 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 tùy nghi.

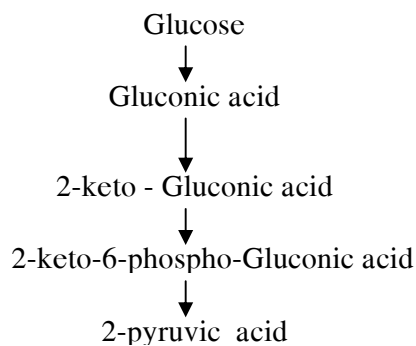
Lên men là một quá trình kỵ khí, vi khuẩn lên men là những vi khuẩn kỵ khí tùy nghi. Quá trình lên men glucose sẽ chia phân tử này thành hai đường triose (đường 3C). Sản phẩm cuối cùng của con đường lên men phụ thuộc vào từng loài vi sinh vật và phụ thuộc vào điều kiện môi trường. Tuy vậy điểm cốt yếu 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.





Sơ đồ các con đường lên men

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.



Con đường oxyhoá glucose

Phương pháp thực hiện: Cấy đâm 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.

Phản ứng oxy hoá khi ống kỵ khí bị acid hoá, ống hiếu khí không bị acid hoá trên mặt mà chỉ có acid ở phần đáy ống.

19. Thử nghiệm oxydase

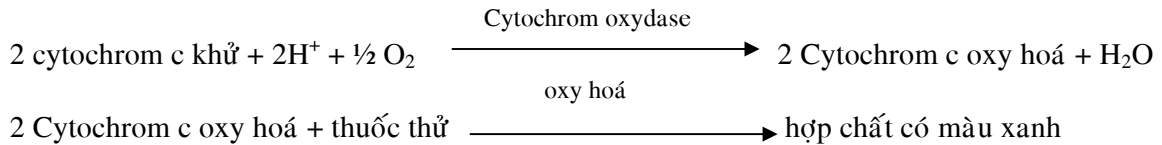
Nguyên tắc: thử nghiệm này nhằm phát hiện hệ enzym oxydase của vi sinh vật.

Cơ sở sinh hoá: Thử nghiệm oxydase nhằm mục đích phát hiện enzym 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 enzym 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 enzym của chúng.

Hệ thống cytochrom thường hiện diện chỉ trong các loài vi sinh vật hiếu khí hay kỵ khí tùy nghi. Các vi sinh vật kỵ khí bắt buộc không có hệ thống này. Có nhiều loại hệ thống cytochrom oxydase khác nhau tùy thuộc vào từng loài vi sinh vật, một số loài chỉ có một oxydase trong khi một số loài khác có hai hay ba oxydase. Cytochrom oxydase là hệ enzym cuối cùng trong toàn bộ hệ thống cytochrom, ngoài ra còn có các cytochrom khác như b, c₁, c.

Phát hiện hệ thống cytochrom oxydase nhờ thuốc thử p-phenylenediamin, đây là một dẫn xuất từ hợp chất phenol amin. Cytochrom oxydase không phản ứng trực tiếp với thuốc thử này mà phải qua trung gian oxyhoá cytochrom c. Quá trình này như sau:



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 nutrien 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 màu trắng, 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 (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.

Chương 4

PHƯƠNG PHÁP KHÔNG TRUYỀN THỐNG

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, công kênh 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.

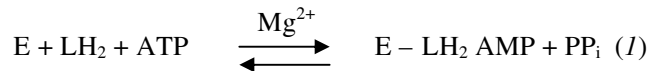
Các phương pháp nhanh và tự động hoá trong phân tích vi sinh vật thực phẩm đều dựa trên nguyên tắc của vi sinh học, sinh hoá học, hoá lý, miễn dịch học, sinh học phân tử học để phát hiện và định lượng vi sinh vật mục tiêu hay sản phẩm độc hại của chúng trong thực phẩm, môi trường. Tất cả các yêu cầu 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^{-15} g 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 :



Phản ứng phát sáng sinh học ở đom đóm có thể viết lại như sau:

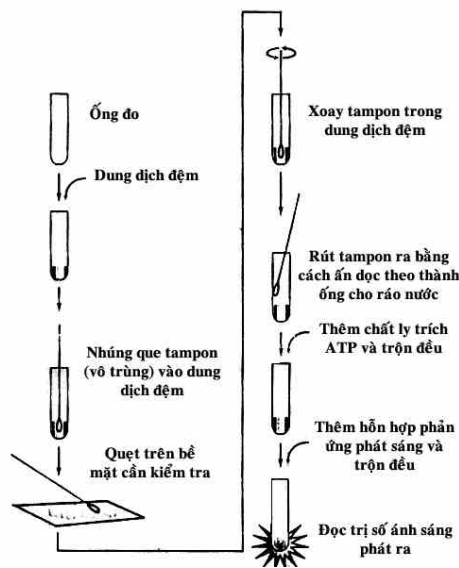


E : luciferase

LH₂ : luciferin

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.

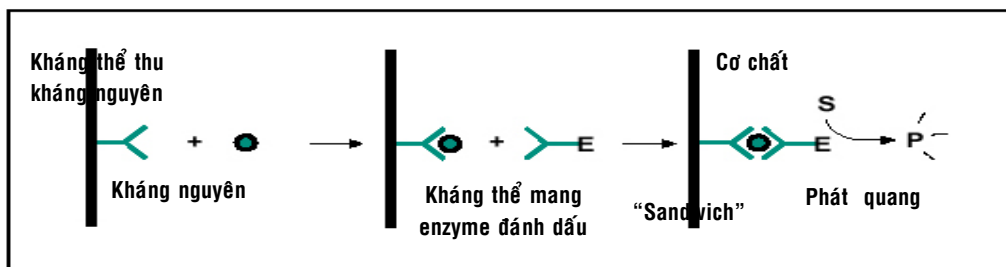


Sơ đồ các bước định lượng nhanh vi sinh vật hiện diện trên bề mặt bằng phản ứng phát sáng

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.



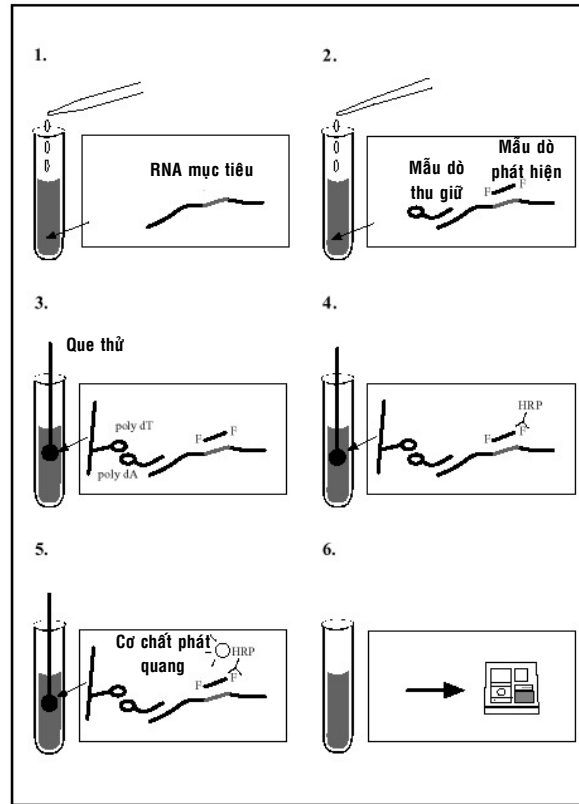
Qui trình thực hiện phân tích bằng ELISA có các chính như sau: đặc mẫu vào trong các giếng có chứa kháng thể sơ cấp, cho kháng thể thứ cấp có liên kết với enzyme tạo màu vào để tạo sandwich, rửa để loại bỏ các kháng thể mang enzyme không tham gia phản ứng, cho cơ chất tạo màu với enzyme liên kết quả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

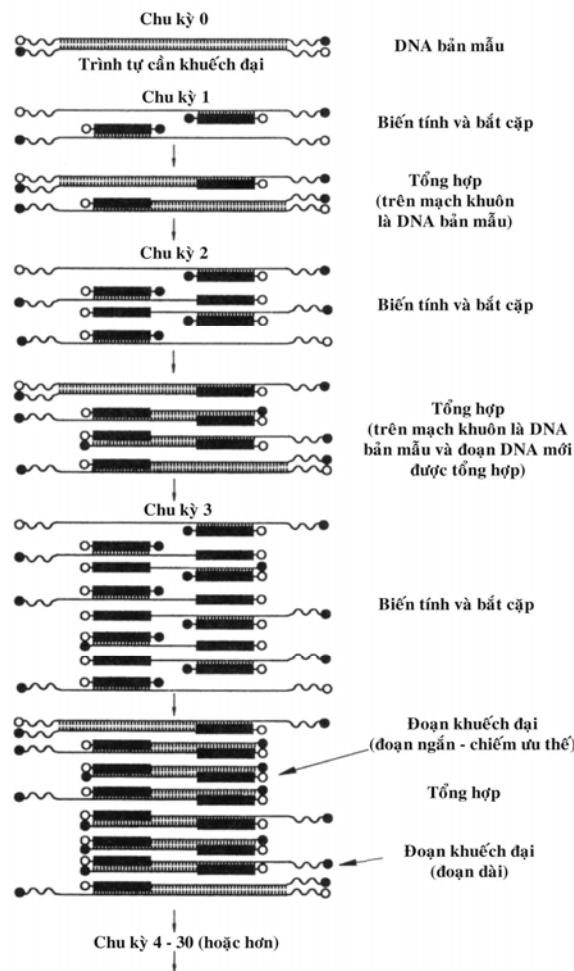


Sơ đồ quy trình phát hiện *Listeria* với mẫu dò phát quang

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. Mỗi 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 (sens primer) 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 (annealing), 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.



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 2,8 μ m (Dynabeads[®] M-280) và 4.5 μ m (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 thụ trực tiếp những hạt siêu hiển vi oxide sắt mang từ tính lên bề mặt tế bào (Safarik và cộng sự, 1995).

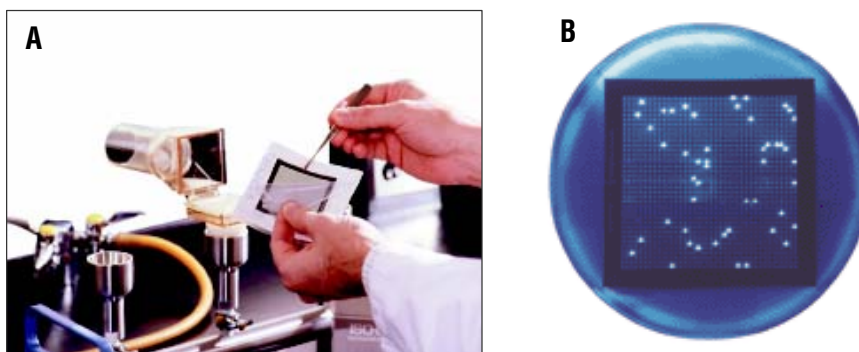
5.2. Kỹ thuật màng lọc phát huỳnh quang trực tiếp (Direct Epifluorescent Technique – DEFT) và màng lọc lưới kỵ nước (Hydrophobic Grid Membrane)

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).

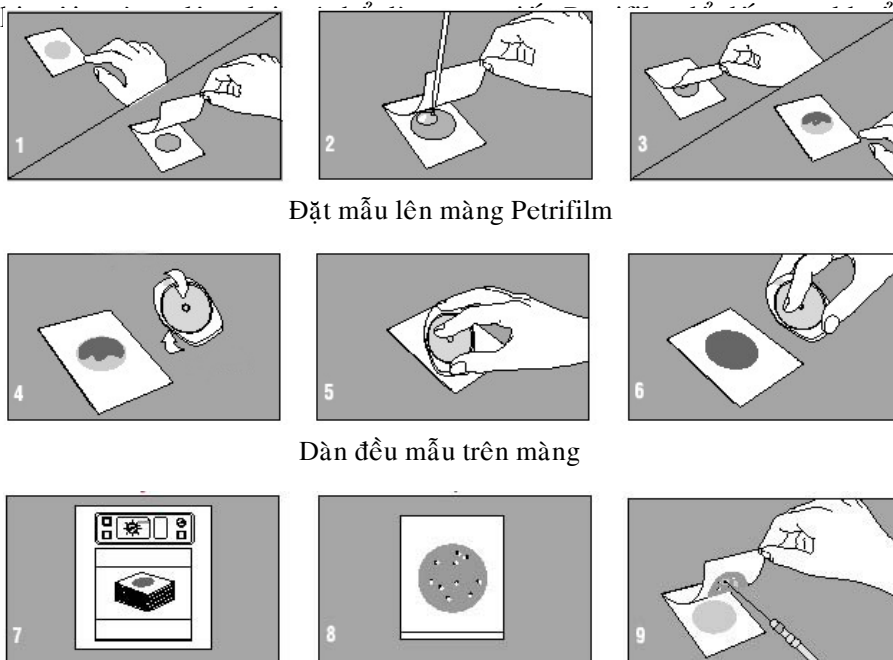


Hình 8: Hệ thống ISO-GRID[®]

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 đập 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 ủ Petrifilm, đếm trực tiếp hoặc phân lập bề mặt.

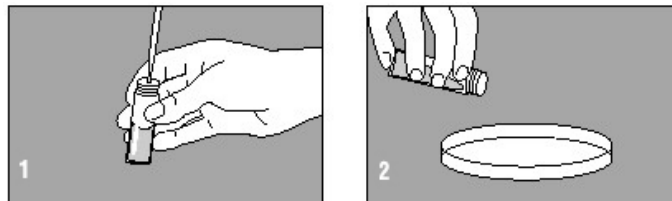


Đặt mẫu lên màng Petrifilm

Dàn đều mẫu trên màng

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 Ca-pectate 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: 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.

PHỤ LỤC

Bảng 1. Một số bộ kit sinh hoá và hệ thống tự động nhận dạng vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm được bán trên thị trường

Hệ thống phân tích	Đặc điểm phân tích	Nhà sản xuất	Đối tượng vi sinh vật
API ^b	Sinh hoá	bioMerieux	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Campylobacter</i> , không lên men, kỵ khí
Cobas IDA	Sinh hoá	Hoffmann LaRoche	<i>Enterobacteriaceae</i>
Micro-ID ^b	Sinh hoá	REMEL	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i>
EnterotubeII	Sinh hoá	Roche	<i>Enterobacteriaceae</i>
Spectrum 10	Sinh hoá	Austin Biological	<i>Enterobacteriaceae</i>
RapID	Sinh hoá	Innovative Diag.	<i>Enterobacteriaceae</i>
BBL Crystal	Sinh hoá	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Vibrionaceae</i> , không lên men, kỵ khí
Minitek	Sinh hoá	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i>
Microbact	Sinh hoá	Microgen	<i>Enterobacteriaceae</i> , Gram âm, không lên men, <i>Listeria</i>
Vitek ^b	Sinh hoá ^a	bioMerieux	<i>Enterobacteriaceae</i> , Gram âm, Gram dương
Microlog	Oxy hoá C ^a	Biolog	<i>Enterobacteriaceae</i> , Gram âm, Gram dương
MIS ^b	Acid béo ^a	Microbial-ID	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Campylobacter</i>
	Sinh hoá ^a	MicroScan	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Campylobacter</i>
Replianalyzer	Sinh hoá ^a	Oxoid	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Listeria</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Campylobacter</i>
Riboprinter	Acid nucleic ^a	Qualicon	<i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Escherichia coli</i>
Cobas Micro-ID	Sinh hoá ^a	Becton Dickinson	<i>Enterobacteriaceae</i> , Gram âm, không lên men
Malthus ^b	Độ dẫn ^a	Malthus	<i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , coliforms
Bactometer	Trở kháng ^a	bioMerieux	<i>Salmonella</i>

* Feng, P., App.I., FDA Bacteriological Analytical Manual, 8A ed.

^a Hệ thống tự động

^b Hệ thống được AOAC chính thức chấp nhận.

Bảng 2. Một số bộ kit thương mại dựa trên kỹ thuật phân tích nucleic acid dùng trong phát hiện vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm

Đối tượng vi sinh vật	Tên thương mại	Phương pháp phân tích	Nhà sản xuất
<i>Clostridium botulinum</i>	Probelia	PCR	BioControl
<i>Campylobacter</i>	AccuProbe	probe	GEN-PROBE
	GENE-TRAK	probe	GENE-TRAK
<i>Escherichia coli</i>	GENE-TRAK	probe	GENE-TRAK
<i>E. coli</i> O157:H7	BAX	PCR ^a	Qualicon
	Probelia	PCR	BioControl
<i>Listeria</i>	GENE-TRAK ^c	probe	GENE-TRAK
	AccuProbe	probe	GEN-PROBE
	BAX	PCR	Qualicon
	Probelia	PCR	BioControl
<i>Salmonella</i>	GENE-TRAK ^c	probe	GENE-TRAK
	BAX	PCR	Qualicon
	BIND ^b	phage	BioControl
	Probelia	PCR	BioControl
<i>Staphylococcus aureus</i>	AccuProbe	probe	GEN-PROBE
	GENE-TRAK	probe	GENE-TRAK
<i>Yersinia enterocolitica</i>	GENE-TRAK	probe	GENE-TRAK

* Nguồn trích dẫn: Feng, P., App.I, FDA Bacteriological Analytical Manual, 8A ed.

^a Polymerase chain reaction

^b Bacterial Ice Nucleation Diagnostics

^c Hệ thống được AOAC chính thức chấp nhận

Bảng 3. Một số bộ kit thương mại dựa trên kỹ thuật phân tích kháng thể dùng trong phát hiện tác nhân gây bệnh và độc tố trong thực phẩm

Vi sinh vật/ Độc tố	Tên thương mại	Kiểu phân tích^a	Nhà sản xuất
<i>Bacillus cereus</i> diarrhoeal toxin	TECRA	ELISA	TECRA
	BCET	RPLA	Unipath
<i>Campylobacter</i>	Campyslide	LA	Becton Dickinson
	Meritec-campy	LA	Meridian
	MicroScreen	LA	Mercia
	VIDAS	ELFA ^b	bioMerieux
	EiaFOSS	ELISA ^b	Foss
	TECRA	ELISA	TECRA
<i>Clostridium botulinum</i> toxin	ELCA	ELISA	Elcotech
<i>C. perfringens</i> enterotoxin	PET	RPLA	Unipath
<i>Escherichia coli</i>			
EHEC ^{**c} O157:H7	RIM	LA	REMEL
	<i>E. coli</i> O157	LA	Unipath
	Prolex	LA	PRO-LAB
	Ecolex O157	LA	Orion Diagnostica
	Wellcolex O157	LA	Murex
	<i>E. coli</i> O157	LA	TechLab
	O157&H7	sera	Difco
	PetriefilmHEC	Ab-blot	3M
	EZ COLI	Tube-EIA	Difco
	Dynabeads	Ab-beads	Dynal
	EHEC-TEK	ELISA	Organon-Teknika
	Assurance ^c	ELISA	BioControl
	HECO157	ELISA	3M Canada
	TECRA	ELISA	TECRA
	<i>E. coli</i> O157	ELISA	LMD Lab
	Premier O157	ELISA	Meridian
	<i>E. coli</i> O157:H7	ELISA	Binax
	<i>E. coli</i> Rapitest	ELISA	Microgen
	Transia card	ELISA	Transia
	<i>E. coli</i> O157	EIA/capture	TECRA
	VIP ^c	Ab-ppt	BioControl
	Reveal	Ab-ppt	Neogen
	Quix Rapid O157	Ab-ppt	Universal HealthWatch
	ImmunoCardSTAT	Ab-ppt	Meridian
VIDAS	ELFA ^b	bioMerieux	
EiaFOSS	ELISA ^b	Foss	
Shiga toxin (Stx)	VEROTEST	ELISA	MicroCarb
	Premier EHEC	ELISA	Meridian
	Verotox-F	RPLA	Denka Seiken
ETEC ^c			

Labile toxin (LT)	VET-RPLA	RPLA	Oxoid
Stabile toxin (ST)	E. coli ST	ELISA	Oxoid
<i>Listeria</i>	Microscreen	LA	Microgen
	Listeria Latex	LA	Microgen
	Listeria-TEK ^c	ELISA	Organon Teknika
	TECRA ^c	ELISA	TECRA
	Assurance ^c	ELISA	BioControl
	Transia Listeria	ELISA	Transia
	Pathalert	ELISA	Merck
	Listertest	Ab-beads	VICAM
	Dynabeads	Ab-beads	Dynal
	VIP ^c	Ab-ppt	BioControl
	Clearview	Ab-ppt	Unipath
	RAPIDTEST	Ab-ppt	Unipath
	VIDAS ^c	ELFA ^b	bioMerieux
	EiaFOSS	ELISA ^b	Foss
	UNIQUE	Capture-EIA	TECRA
<i>Salmonella</i>	Bactigen	LA	Wampole Labs
	Spectate	LA	Rhone-Poulenc
	Microscreen	LA	Mercia
	Wellcolex	LA	Laboratoire Wellcome
	Serobact	LA	REMEL
	RAPIDTEST	LA	Unipath
	Dynabeads	Ab-beads	Dynal
	Screen	Ab-beads	VICAM
	CHECKPOINT	Ab-blot	KPL
	1-2 Test ^c	diffusion	BioControl
	SalmonellaTEK ^c	ELISA	Organon Teknika
	TECRA ^c	ELISA	TECRA
	EQUATE	ELISA	Binax
	BacTrace	ELISA	KPL
	LOCATE	ELISA	Rhone-Poulenc
	Assurance ^c	ELISA	BioControl
	Salmonella	ELISA	GEM Biomedical
	Transia	ELISA	Transia
	Bioline	ELISA	Bioline
	VIDAS ^c	ELFA ^b	bioMerieux
	OPUS	ELISA ^b	TECRA
	PATH-STIK	Ab-ppt	LUMAC
	Reveal	Ab-ppt	Neogen
Clearview	Ab-ppt	Unipath	
UNIQUE ^c	Capture-EIA	TECRA	
<i>Shigella</i>	Bactigen	LA	Wampole Labs
	Wellcolex		Laboratoire Wellcome
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphyloslide	LA	Becton Dickinson
	AureusTest ^c	LA	Trisum
	Staph Latex	LA	Difco

	<i>S. aureus</i> VIA	ELISA	TECRA
enterotoxin	SET-EIA	ELISA	Toxin Technology
	SET-RPLA	RPLA	Unipath
	TECRA ^c	ELISA	TECRA
	Transia SE	ELISA	Transia
	RIDASCREEN	ELISA	R-Biopharm
	VIDAS	ELFA ^b	bioMerieux
	OPUS	ELISA ^b	TECRA
<i>Vibrio cholera</i>	choleraSMART	Ab-ppt	New Horizon
	bengalSMART	Ab-ppt	New Horizon
	choleraScreen	Agglutination	New Horizon
	bengalScreen	Agglutination	New Horizon
enterotoxin	VET-RPLA ^d	RPLA	Unipath

* Nguồn trích dẫn: Feng, P., App.I, FDA Bacteriological Analytical Manual, 8A ed.

^a Chữ viết tắt: ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; ELFA, enzyme linked fluorescent assay; RPLA, reverse passive latex agglutination; LA, latex agglutination; Ab-ppt, immunoprecipitation.

^b ELISA tự động

^c EHEC - Enterohemorrhagic *E. coli*; ETEC - enterotoxigenic *E. coli*

^d Cũng phát hiện độc tố đường ruột LT của *E. coli* (*E. coli* LT enterotoxin)

^e Hệ thống được AOAC chính thức chấp nhận

**** Chú ý:** Một số sản phẩm trên chỉ đặc hiệu phát hiện chủng O157 nhưng không hoàn toàn thuộc serotype H7 (những chủng O157 không phải H7 thường không tạo độc tố, Shiga toxin, nên thường không gây bệnh cho người). Một số kháng thể O157 có thể phản ứng chéo với *Citrobater*, *E. hermannii* và những vi sinh vật đường ruột khác.