

Chương 10. Môi trường nuôi cấy

Mục lục

Chương 10. Môi trường nuôi cấy	1
10.1. Giới thiệu.....	2
10.2. Thành phần của môi trường	2
10.2.1. Thạch	2
10.2.2. Peptone.....	3
10.2.3. Các thành phần khác	3
10.3. Các loại môi trường nuôi cấy	3
10.3.1. Môi trường lỏng.....	3
10.3.2. Môi trường rắn.....	5
10.3.3. Môi trường bán rắn	6
10.4. Phân loại môi trường.....	6
10.4.1. Môi trường đơn giản	6
10.4.3. Môi trường xác định	7
10.4.4. Môi trường đặc biệt	7

10.1. Giới thiệu

Việc phát hiện vi sinh vật tại phòng thí nghiệm thường được tiến hành qua các bước phân lập và nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường tổng hợp. Vi khuẩn và nấm được nuôi cấy hoặc trong môi trường lỏng tổng hợp hoặc trên môi trường đặc dạng thạch tổng hợp. Nhà vi sinh vật học người Đức, Heinrich Hermann Robert Koch (1843 - 1910) là người tiên phong trong việc sử dụng thạch làm chất nền cơ bản cho môi trường nuôi cấy dạng rắn. Ông đã phát triển kỹ thuật đổ đĩa và cũng là người đầu tiên sử dụng môi trường rắn để nuôi cấy vi khuẩn. Trước đó Robert Koch đã nuôi cấy vi khuẩn trên bề mặt cắt vô trùng là khoai tây đã qua luộc. Tuy nhiên ông nhận thấy môi trường này không đáp ứng được bởi vì không phải vi khuẩn nào cũng tăng trưởng được trên khoai tây. Sau đó ông đã cố gắng làm đặc từ từ môi trường lỏng bằng cách thêm gelatin. Các khuẩn lạc tách biệt phát triển trên bề mặt sau đó được cấy trải với mẫu vi khuẩn. Mẫu này cũng có thể được trộn với môi trường lỏng có gelatin. Khi môi trường gelatin đặc lại, từng vi khuẩn tạo ra khuẩn lạc tách rời. Mặc dù gelatin mang lại một số thuận lợi nhưng chất này cũng không phải là yếu tố làm đặc lý tưởng bởi vì nó bị nhiều vi khuẩn tiêu hóa và bị tan chảy khi nhiệt độ trên 28°C. Tiếp sau đó Fannie Eilshemius Hesse vợ của Walther Hesse, người trợ lý cho Robert Koch đã đề nghị lựa chọn khác tốt hơn đó là sử dụng thạch (agar) để làm đặc. Vì tinh thể chất này vẫn được cô lại để sử dụng làm kẹo thạch. Agar gần như không bị vi khuẩn tấn công và chỉ tan chảy khi nhiệt độ đạt 100°C. Một trợ lý khác của Koch là Richard Petri đã phát triển đĩa Petri dùng làm vật chứa cho môi trường rắn.

10.2. Thành phần của môi trường

Thành phần cơ bản của môi trường nuôi cấy gồm:

10.2.1. Thạch

Thạch (agar) là thành phần chính được sử dụng để pha chế nhiều môi trường rắn. Chất này được thu nhận từ rong biển qua quá trình tinh chế để thành dạng bột, tiện lợi cho sử dụng. Agar chủ yếu được cấu tạo từ: (a). Chuỗi polysaccharide dài, gồm các đơn vị D-galactopyranose; (b). Nhiều muối vô cơ, một ít vật liệu tương tự protein, chuỗi acid béo dài ở hàm lượng vết và (c). Chất khoáng như calcium và magnesium.

Agar thường được sử dụng ở nồng độ 2 - 3%. Chất này bị thủy giải ở nhiệt độ cao

và trong điều kiện có acid cao hay pH kiềm. Agar có đặc tính đặc đáo là tan chảy ở 98°C và đông đặc ở 42°C. Đặc tính đông lại của agar thì dao động phụ thuộc vào loại agar sử dụng. Ví dụ agar New Zealand thì đông đặc hơn so với agar của Nhật. Agar không mang giá trị dinh dưỡng cho vi khuẩn và cũng không làm ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của vi sinh vật.

10.2.2. Peptone

Peptone là một thành phần quan trọng khác của môi trường nuôi cấy. Chất này là một hỗn hợp phức hợp của các protein thành phần đã được phân cắt. Peptone thu nhận được bằng cách phân cắt thịt nạc hay các nguồn protein khác như cơ tim, casein, fibrin, hay bột đậu nành bằng enzyme phân giải protein như pepsin, trypsin hay papain.

Peptone đóng vai trò làm nguồn cung cấp dinh dưỡng quan trọng cho vi khuẩn tăng trưởng. Chất này có peptone, proteose, amino acid, muối vô cơ và khoáng chất như phosphate, potassium và magnesium, ngoài ra còn một số yếu tố hỗ trợ khác như nicotinic acid và riboflavin. Neopeptone và proteose peptone là dạng đặc biệt của peptone có giá trị dinh dưỡng cao. Môi trường lỏng đậm peptone (BPW) được sử dụng để tăng sinh vi khuẩn.

10.2.3. Các thành phần khác

Các thành phần phổ biến khác của môi trường gồm nước, sodium chloride và các chất điện giải khác, chất chiết từ thịt, cao nấm men, chiết từ malt, máu và huyết thanh. Chất chiết từ thịt chứa muối vô cơ, carbohydrate, một số yếu tố thiết yếu cho sự tăng trưởng và sản phẩm phân giải protein, máu và huyết thanh thường được sử dụng trong các môi trường nuôi cấy làm giàu. Thường sử dụng 5 - 10% máu cừu đã qua khử xơ, máu thỏ hay máu người cũng được sử dụng.

10.3. Các loại môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy được phân loại theo một số cách như sau: môi trường lỏng, môi trường bán rắn và môi trường đặc

10.3.1. Môi trường lỏng

Môi trường lỏng được sử dụng tăng sinh vi sinh vật nhằm làm tăng độ nhạy cho phương pháp phát hiện định tính đối với mẫu có một lượng nhỏ vi sinh vật (*Salmonella*

trong mẫu thực phẩm) hay môi trường lỏng được sử dụng để thử nghiệm phản ứng sinh hóa Các môi trường lỏng gồm môi trường dinh dưỡng, môi trường chứa đường và môi trường tăng sinh.

Bảng 10.1. Thành phần và mục đích sử dụng một số môi trường lỏng phổ biến.

Môi trường	Thành phần	Mục đích sử dụng
Dung dịch peptone, petone từ casein	Peptone, sodium chloride, nước	Nuôi cấy thường quy, thử nghiệm indole
Môi trường lỏng dinh dưỡng	Dung dịch peptone, dịch chiết thịt	Nuôi cấy thường quy
Môi trường lỏng glucose	Môi trường lỏng dinh dưỡng, đường glucose	Nuôi cấy vi khuẩn có trong máu, vi khuẩn yêu cầu dinh dưỡng khó tính như <i>Streptococcus</i> chẳng hạn
Môi trường lỏng Brain heart infusion	Sodium citrate, sodium chloride, sodium phosphate, dextrose, peptone, dịch chiết não và tim bò, sodium polyanethol sulfonate	Nuôi cấy vi khuẩn từ: máu, tủy xương, dịch cơ thể
Alkaline peptone water	Nước peptone (pH 8,6)	Dùng làm môi trường tăng sinh <i>Vibrio</i>
Môi trường lỏng tetrathionate	Môi trường lỏng dinh dưỡng, sodium thiosulfate, calcium carbonate, dung dịch iodine	Nuôi cấy <i>Salmonella</i>
Môi trường thịt lức Robertson (RCM)	Môi trường lỏng dinh dưỡng, có dịch chiết xuất thịt tim bò	Chủng vi khuẩn kỵ khí

Thành phần và mục đích sử dụng của một số môi trường phổ biến được liệt kê tại Bảng 10.1. Môi trường lỏng có những thuận lợi sau: (a). Xác định chủng vi khuẩn hỗn hợp đang tăng trưởng trong môi trường lỏng đòi hỏi phải nuôi cấy chuyển trên môi trường rắn vì vậy các khuẩn lạc phân lập có thể được xử lý riêng biệt dùng để định danh.

(b). Sự tăng trưởng trong môi trường lỏng có thể không được định lượng theo cách thông thường. (c). Vi khuẩn tăng trưởng trong môi trường lỏng thường hình thành huyền phù.

10.3.2. Môi trường rắn

Agar được sử dụng làm chất đông đặc trong hầu hết môi trường nuôi cấy. Bằng cách thay đổi hàm lượng thạch, sẽ tạo ra môi trường rắn hoặc bán rắn. Môi trường rắn được cho là có phần ít nhạy cảm hơn môi trường lỏng, môi trường rắn được sử dụng để phân lập, có thể định lượng và định danh vi sinh vật. Một số giống và loài vi khuẩn có thể được nhận biết nhờ đặc điểm cơ bản về hình thái khuẩn lạc. Thạch dinh dưỡng được điều chế bằng cách thêm 2% agar vào môi trường lỏng dinh dưỡng, là môi trường đơn giản nhất và phổ biến nhất được sử dụng thường quy trong phòng thí nghiệm. Các ví dụ khác về môi trường rắn gồm thạch máu, thạch MacConkey, XLS,được trình bày tại Bảng 10.2.

Bảng 10.2. Thành phần và mục đích sử dụng của một số môi trường rắn.

Môi trường	Thành phần	Sử dụng
Thạch dinh dưỡng	Môi trường lỏng dinh dưỡng, agar 2%	Nuôi cấy vi khuẩn
Môi trường MacConkey	Peptone, lactose, sodium taurocholate, agar, neutral red	Nuôi cấy vi khuẩn Gram âm như <i>E. coli</i>
Thạch máu	Thạch dinh dưỡng, 5% máu cừu hay máu người	Nuôi cấy vi khuẩn, vi khuẩn khó tính như <i>Streptococcus</i> spp.
Thạch chocolate	Thạch máu gia nhiệt	Nuôi cấy <i>Haemophilus influenzae</i> và <i>Neisseria</i>
Thạch deoxycholate citrate	Thạch dinh dưỡng, sodium deoxycholate, sodium citrate, lactose, neutral red,	Nuôi cấy <i>Shigella</i> spp. Và <i>Salmonella</i> spp.
TCBS	Thiosulfate, citrate, bile salt, sucrose, bromothymol blue,	Nuôi cấy <i>Vibrio cholerae</i>

	thymolblue	
Loeffler's serum slope	Môi trường dinh dưỡng lỏng, glucose, Huyết thanh ngựa	Nuôi cấy <i>Corynebacterium Diphtheriae</i>
Lowenstein–Jensen medium	Trứng gà đông lại, Dung dịch muối khoáng, Asparagine, malachite green	Nuôi cấy <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

10.3.3. Môi trường bán rắn

Khi giảm hàm lượng agar xuống còn 0,2 – 0,4% sẽ làm cho môi trường đặc trở nên bán rắn, môi trường này tạo thuận lợi để vi khuẩn lan ra trong môi trường.

10.4. Phân loại môi trường

Các loại môi trường được phân theo mức độ phức tạp của chúng như: (a). Môi trường đơn giản, (b). Môi trường phức hợp, (c). Môi trường xác định và (d). Môi trường đặc biệt là các kiểu môi trường khác nhau được sử dụng trong nuôi cấy vi khuẩn.

10.4.1. Môi trường đơn giản

Môi trường đơn giản hay môi trường cơ bản gồm môi trường lỏng và nước peptone hình thành nên các môi trường cơ bản khác. Ví dụ (i). Môi trường lỏng dinh dưỡng là một ví dụ về môi trường đơn giản ở dạng lỏng gồm peptone, chiết xuất thịt, sodium chloride và nước. Thêm 0,5% glucose vào môi trường lỏng dinh dưỡng để tạo môi trường dinh dưỡng có glucose. (ii). Môi trường thạch dinh dưỡng là một ví dụ về môi trường rắn đơn giản. Môi trường này thường được sử dụng để phân lập nhiều vi khuẩn từ mẫu thực phẩm, bệnh phẩm và môi trường.

10.4.2. Môi trường phức hợp

Hầu hết các môi trường này có thành phần phức tạp hơn nhiều so với môi trường dinh dưỡng cơ bản. Ví dụ thạch chocolate, thạch MacConkey, môi trường thịt luộc Robertson (RCM), môi trường Lowenstein - Jensen (LJ), Môi trường phức hợp có một số thành phần phức tạp, các thành phần này gồm hỗn hợp nhiều hóa chất có tỷ lệ không biết. Đây là môi trường không xác định, bởi vì nguồn aminoacid có các hợp chất đa dạng, không biết chính xác thành phần. Môi trường phức hợp gồm: (a). Nước, (b).

Nguồn carbon cho vi khuẩn tăng trưởng, (c). Các loại muối cần thiết và (d). Nguồn amino acid và nitrogen như chiết xuất thịt và nấm men.

10.4.3. Môi trường xác định

Môi trường này còn gọi là môi trường tổng hợp, có các thành phần định lượng biết được. Trong môi trường này biết được tất cả các chất hóa học. Môi trường này không chứa bất kỳ mô động vật, thực vật hay nấm men. Môi trường xác định gồm: (i). Các nguyên tố vết và vitamin; (ii). Nguồn carbon và nitrogen xác định cần thiết cho vi sinh vật. Glucose hay glycerol thường được sử dụng làm nguồn carbon và muối ammonium hay nitrate làm nguồn nitrogen vô cơ. Môi trường Dubos' có Tween 80 là một ví dụ về môi trường này.

10.4.4. Môi trường đặc biệt

Các môi trường này gồm (i) môi trường làm giàu, (ii) môi trường tăng sinh, (iii) môi trường chọn lọc, (iv) môi trường chỉ thị hay môi trường dùng để phân biệt, (v) môi trường vận chuyển và (vi) môi trường đường.

Môi trường làm giàu (Enriched media): môi trường làm giàu thường là môi trường rắn có những thành phần dinh dưỡng đặc biệt nhằm tạo thuận lợi cho một số vi khuẩn khó tính tăng trưởng. Các môi trường này được điều chế bằng cách thêm các thành phần như máu, huyết thanh và trứng vào môi trường cơ bản để đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng khó tính của một số vi khuẩn. Thạch máu, thạch chocolate, Loeffler's serum slope (LSS) và LJ là một số ví dụ về môi trường được làm giàu. Thạch máu là môi trường được làm giàu theo đó máu nguyên chất cung cấp các chất bổ sung các thành phần dinh dưỡng cơ bản. Thạch chocolate là môi trường được làm giàu bằng cách xử lý với máu ở nhiệt độ 80°C, khi đó môi trường này sẽ trở nên màu nâu và vì vậy có tên là môi trường chocolate.

Môi trường tăng sinh: còn gọi là môi trường tăng sinh chọn lọc, môi trường này có thành phần kích thích hay ức chế sự tăng trưởng của một số vi khuẩn cần quan tâm trong đó có cả vi khuẩn gây bệnh. Vi khuẩn hội sinh như *Escherichia coli* hiện diện trong phân, có khuynh hướng tăng trưởng quá mức so với vi khuẩn gây bệnh có trong mẫu phân. Trong các trường hợp như vậy, môi trường tăng sinh ví dụ như môi trường lỏng tetrathionate, Rapaport vassiliadis, BGBL, ... được sử dụng để chọn lọc *Salmonella* spp.,

Shigellaspp. và *E.coli* có trong mẫu thử.

Môi trường tăng sinh được sử dụng để phân lập vi khuẩn mong muốn từ phân và các mẫu thử khác có nhiều hơn một loài vi khuẩn.

Môi trường chọn lọc: là những môi trường rắn có các chất ức chế sự tăng trưởng của tất cả vi sinh vật nhưng một số ít vi khuẩn có thể tăng trưởng được nên dùng để phân lập chúng. Một số ví dụ về môi trường chọn lọc gồm: (i). Môi trường thạch có thiosulfate citrate, muối mật, bile, sucrose (TCBS) dùng để phân lập *Vibrio cholerae*. (ii). XLD, DCA dùng để phân lập trực khuẩn đường ruột như *Salmonella spp.* và *Shigella spp.* (iii). Môi trường chọn lọc LJ dùng để phân lập *Mycobacterium tuberculosis*. Thạch Hektoen enteric (HE) dùng để chọn lọc vi khuẩn Gram âm nhất là *Shigella*, (iv). Môi trường thạch muối, mannitol (MSA) dùng để chọn lọc vi khuẩn Gram dương. (v). Buffered charcoal yeast extract agar dùng để chọn lọc vi khuẩn Gram âm như *Legionella pneumophila*. Một số môi trường chọn lọc thường sử dụng trong phòng thí nghiệm vi sinh vật học được trình bày tại Bảng 10.3.

Bảng 10.3. Một số môi trường chọn lọc được sử dụng thường quy trong phòng thí nghiệm vi sinh vật.

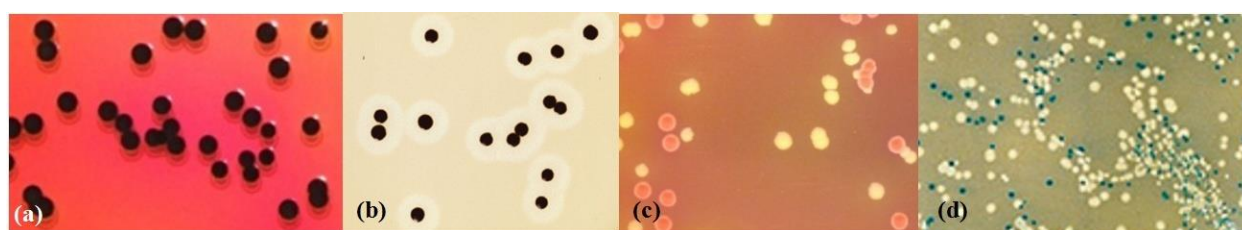
Môi trường	Đặc điểm khuẩn lạc		Khuẩn bị ức chế
Thạch muối mannitol	Khuẩn lạc lớn có màu vàng là <i>Staphylococcus aureus</i>	Khuẩn lạc nhỏ có màu hồng là <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
Môi trường Thayer–Martin	Khuẩn lạc có màu xám là <i>Neisseria meningitidis</i> và <i>N.eisseria gonorrhoeae</i>		Cầu khuẩn Gram dương
Thạch MacConkey	Vi khuẩn lên men lactose Ví dụ	Vi khuẩn không lên men lactose nên khuẩn lạc	Cầu khuẩn Gram dương

	<i>Escherichia coli</i>	không màu như <i>Salmonella</i> spp.	
Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar	Vi khuẩn lên men sucrose: khuẩn lạc có màu vàng <i>Vibrio</i> <i>cholerae</i>	Vi khuẩn lên men sucrose: khuẩn lạc có màu xanh <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	Trực khuẩn đường ruột
Charcoal yeast extract	Khuẩn lạc hoa văn thuỷ tinh <i>Legionella</i> spp.		Cầu khuẩn Gram dương
Lowenstein - Jensen medium	Khuẩn lạc <i>Mycobacterium</i> <i>tuberculosis</i> xù xì, dai, màu da bò	Khuẩn lạc không điển hình <i>Mycobacterium</i> spp. nhẵn và có sắc tố	Cầu khuẩn
Sabouraud	Hầu hết vi nấm		Hầu hết vi khuẩn

Môi trường môi trường chỉ thị: môi trường phân biệt hay môi trường chỉ thị dùng để phân biệt một vi sinh vật này với vi sinh vật khác trên cùng một môi trường nhờ vào đặc điểm tăng trưởng của chúng.

Môi trường chỉ thị phụ thuộc vào đặc điểm sinh hóa của vi sinh vật đang tăng trưởng khi có mặt của chất dinh dưỡng đặc biệt hay chất chỉ thị như neutral red, phenolred, eosin hoặc methylene blue. Môi trường này thay đổi màu sắc khi vi khuẩn tăng trưởng. Ví dụ *S. typhi* tăng trưởng hình thành khuẩn lạc màu đen trên môi trường XLD do chúng phân giải sodium thiosulphate thành hydrogen sulphite (H₂S) có màu đen. Hay trên môi trường Baird Parker khuẩn lạc *Staphylococcus* có màu đen là do khuẩn này khử tellurite có trong môi trường. Môi trường thạch MacConkey, vi khuẩn lên men lactose như *E. coli* tạo khuẩn lạc màu hồng, ngược lại vi khuẩn không lên men lactose *Salmonella* spp. sẽ hình thành khuẩn lạc có màu đục mờ hay không màu. Việc lên men lactose sẽ làm môi trường bị acid nên hình thành khuẩn lạc có màu hồng do có chỉ thị neutral red. Các ví dụ về môi trường phân biệt gồm: (i). Eosin methylene blue (EMB) dùng để phân biệt vi khuẩn lên men lactose và sucrose; (ii). MacConkey dùng để phân

biệt vi khuẩn lên men lactose; (iii). Mannitol salt agar (MSA), dùng để phân biệt vi khuẩn lên men mannitol; (iv). Môi trường có X-gal, dùng để phân biệt thể đột biến operon lac, ứng dụng trong phát hiện các chủng vi khuẩn tái tổ hợp trong nghiên cứu sinh học phân tử, theo đó vi khuẩn có β -galactosidase, sẽ thủy giải X-gal thành 5-bromo-4-chloro-indoxyl, chất này đồng thời tạo dimer để hình thành sắc tố màu xanh không tan được là 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo. Khuẩn lạc của tế bào không tái tổ hợp sẽ có màu xanh, ngược lại tế bào tái tổ hợp khuẩn lạc có màu trắng (Hình 1). Trong thực nghiệm còn vô số ví dụ khác nữa.



Hình 10.1. Ví dụ minh họa về môi trường chỉ thị dùng để phân biệt vi sinh vật. (a). XLD dùng để phân lập *Salmonella*. Trên môi trường này một số khuẩn lạc *Salmonella* có tâm đen do phân giải sodium thiosulphate thành hydrogen sulphite; (b). Môi trường Bair-Parker dùng để phân lập *Staphylococcus aureus*, khuẩn này khử tellurite nên khuẩn lạc có màu đen, vòng sáng xung quanh khuẩn lạc là *S. aureus* thủy giải protein hay lipid tạo ra; (c). Môi trường thạch MacconKey, *E. coli* lên men được lactose nên khuẩn lạc có màu vàng, *Salmonella* không lên men được lactose nên khuẩn lạc có màu đục mờ; (d). Môi trường có Xgal, vi khuẩn tái tổ hợp có khuẩn lạc màu trắng, vi khuẩn không tái tổ hợp hình thành khuẩn lạc màu xanh.

Môi trường vận chuyển: môi trường vận chuyển được sử dụng để duy trì sự sống của một số vi sinh vật có sự sống mỏng manh trong quá trình chuyển về phòng thí nghiệm. Môi trường này thường chứa đệm và muối, không có carbon, nitrogen và các yếu tố tăng trưởng hữu cơ nên không tạo thuận lợi cho vi sinh vật sinh sản. Ví dụ môi trường vận chuyển Carry - Blair cho *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus* hay *Yersinia* spp.; môi trường Ameis và Stuart dùng để duy trì sự sống cho khuẩn lậu *Neisseria gonorrhoeae*.

Môi trường đường: môi trường này chứa khoảng 1% đường, dùng để biểu thị cho

bất kỳ loại đường nào mà vi khuẩn có thể lên men. Đường thường sử dụng là glucose, sucrose, lactose và mannitol nhằm kiểm tra khả năng lên men của vi khuẩn. Môi trường đường biểu hiện những đặc điểm sau: (i). Môi trường gồm 1% đường trong peptone (ii). Chất chỉ thị được sử dụng trong môi trường đường là chỉ thị Andrade gồm 0.005% acid fuchsin trong 1 N NaOH. Acid sẽ được tạo ra sau khi lên men đường làm cho môi trường chuyển đổi sang màu hồng nhờ chất chỉ thị. (iii). Ống Durham bỏ ngược vào trong ống thử nghiệm đường để chứng minh sự hình thành khí do vi khuẩn. Vi khuẩn sinh khí sẽ xuất hiện bọt khí trong ống Durham.

Ngày nay môi trường khô dạng thương mại được sử dụng rộng rãi trong phòng thí nghiệm sinh học vì chúng mang lại đơn giản khi chuẩn bị. Các môi trường khô này chỉ cần hoàn nguyên với nước cất, thanh trùng trước khi sử dụng.