

nhiều tạp khuẩn, phải tiệt trùng trước khi phân lập. Rửa sạch nốt sần, lấy kéo cắt nốt sần ra khỏi rễ. Chú ý không làm nốt sần sây sứt. Cho nốt rễ vào nước trong. Rửa thật sạch. Cho vào cồn 95<sup>0</sup> trong 3 phút. Cho tiếp vào dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 5 phút. Rửa bằng nước vô trùng 5 - 6 lần, mỗi lần 3 - 5 phút. Cho nốt sần vào hộp lồng có một ít nước vô trùng. Dùng kẹp sắt bóp nát và làm thành dung dịch nốt rễ. Dùng que cấy lấy dung dịch cấy lên môi trường thạch phẳng. Cấy thành nhiều đường thẳng song song với lượng dịch giảm dần. Sau đó đem nuôi ở tủ nuôi có 25 - 28<sup>0</sup>C, trong 2 - 3 ngày đối với vi khuẩn mọc nhanh. Để 5 - 7 ngày đối với vi khuẩn mọc chậm. Khuẩn lạc nốt sần có màu trong suốt hoặc 1/2 trong suốt. Biên khuẩn lạc đều. Nếu có công ô đỏ hay violet gentian, khuẩn lạc vẫn không bị nhuộm màu. Vi khuẩn gram âm, không bào tử, di động nhờ tiên mao.

### III - XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH NITƠ

#### 3.1. Thí nghiệm trồng cây trong ống thạch

Phương pháp này cho phép nhận biết có khả năng cố định nitơ của vi khuẩn nốt rễ.

##### 3.1.1. Chuẩn bị môi trường

- Môi trường Jenhsen (1942) hoặc môi trường Thornton (1930) :

Môi trường Jenhsen		Môi trường Thornton	
CaHPO <sub>4</sub>	1,0g	CaHPO <sub>4</sub>	2,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g
FeCl <sub>3</sub>	0,1g	NaCl	0,1g
Nước	1000ml	Nước	1000ml
Thạch	8 - 15g	Thạch	8 - 15g
pH = 6,5 - 7,0		pH = 6,5 - 7,0	

Có thể dùng ống môi trường thạch nghiêng hoặc đứng.

- Dùng dung dịch dinh dưỡng Gibson (1963) 1ml/lít môi trường.

Thành phần dung dịch như sau :

H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	0,05g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,05g
KCl	0,005g	NaBr	0,005g
ZnSO <sub>4</sub>	0,003g	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> .18H <sub>2</sub> O	0,003g
MnSO <sub>4</sub>	0,002g	Nước cất	1000ml

- Chuẩn bị ống môi trường :

Ống nghiệm 150 × 20mm cho hạt đậu nhỏ.

Ống nghiệm 200 × 30mm cho hạt đậu lớn.

- Lượng môi trường cho vào theo bảng sau :

Cỡ ống nghiệm (mm)	Thạch đứng (ml)	Thạch nghiêng (ml)
150 × 20	8	12
150 × 25	12	18
150 × 30	18	30
200 × 30	25	40

Cho môi trường trồng cây theo bảng hướng dẫn trên. Nút bông và khử trùng ở 1atm trong 20 phút. Sau đó đặt nghiêng nếu cần trồng cây trên ống thạch nghiêng.

### 3.1.2. Chuẩn bị hạt giống

Chọn hạt giống sạch không bị tổn thương. Khử trùng bằng etanol 95%, ngâm trong 3 phút hoặc 0,2%  $\text{HgCl}_2$  được axit hóa (50ml/lít HCl). Hạt được khử trùng phải được rửa sạch bằng nước vô trùng ít nhất là 5 lần. Sau đem ủ cho nảy mầm (ủ trên giấy lọc ẩm vô trùng hoặc ủ trên môi trường thạch đĩa hoặc trên cát vô trùng).

### 3.1.2. Nhiễm khuẩn

Những hạt đã nảy mầm được đưa ra một đĩa vô trùng. Cho dịch vi khuẩn vào. Hạt được nhiễm khuẩn có thể trồng ngay vào ống thạch vô trùng hoặc để sau 7 ngày rồi mới trồng (tốt hơn là để sau 7 ngày) vào ống nghiệm.

## 3.2. Gieo trồng cây vào ống nghiệm

Những ống nghiệm đã được khử trùng đem đặt lên giá sắt, thay cho nút bông đầu ống nghiệm môi trường bằng bọc giấy đen, giấy thiếc hoặc tốt hơn là bằng nút gỗ mềm có lỗ khoan dọc theo chiều dài của nút gỗ. Công việc này phải tiến hành trong điều kiện vô trùng. Đục một lỗ trên giấy bọc miệng ống nghiệm. Cho hạt đậu nảy mầm đã được nhiễm khuẩn cây vào ống nghiệm qua lỗ thủng. Có thể trồng 2 hạt, nhưng về sau chỉ để 1 cây. Cây mầm lúc đầu mọc ở phía trên đỉnh ống thạch đứng hoặc thạch nghiêng. Về sau đẩy vào vị trí ở ống thạch đứng, nằm trên bề mặt môi trường. Nếu là ống thạch nghiêng, thì đẩy cây nằm ở khoảng 1/3 mặt thạch về phía đầu ống nghiệm. Ở ống thạch đứng, rễ cây sẽ phát triển trên bề mặt thạch, còn ống thạch nghiêng rễ sẽ phát triển dọc theo mặt thạch.

Trồng cây xong để vào giá sắt trong phòng có chiếu sáng thích hợp. Có thể chiếu sáng từ trên xuống hoặc từ 2 bên vào.

### 3.3. Điều kiện

#### 3.3.1. Chiếu sáng

Tuỳ từng giống đậu khác nhau, tuổi của cây khác nhau, mức độ phát triển khác nhau mà cần cường độ chiếu sáng khác nhau (có thể dùng bóng đèn nê-ông 60W).

#### 3.3.2. Nhiệt độ và độ ẩm

Nhiệt độ từ 20 - 30°C, độ ẩm tối nhất là 60 - 70%.

#### 3.3.3. Chăm sóc

- Thường xuyên quan sát sự khác nhau giữa ống đối chứng và ống được nhiễm khuẩn.

- Nếu bổ sung đạm để nuôi cây với nồng độ 70ppm (0,05% KNO<sub>3</sub>), thì có thể cho vào môi trường thạch trong ống nghiệm trước khi gieo hạt hoặc vào lúc cây đã mọc. Tốt nhất là bón khi cây trồng được 5 - 7 ngày.

- Nếu quan sát thấy cây xấu, không đủ xanh (cả đối chứng lẫn nhiễm khuẩn) thì phải bổ sung thêm đạm ngay, nhưng lượng bón không được cao hơn 0,07% KNO<sub>3</sub>, nếu cao hơn có thể bị độc cho cây và vi khuẩn.

### 3.4. Đánh giá kết quả

Ở ống nghiệm nhiễm *Rhizobium* sẽ tạo được nốt sần ở rễ cây, sau trồng 3 - 6 tuần, còn ở công thức đối chứng sẽ không tạo nốt sần.

- Đánh giá mối liên quan giữa thời gian và sự phát triển của cây theo công thức sau :

$$Rw = \frac{\log W_2 - \log W_1}{t_2 - t_1}$$

Rw = mối liên quan giữa sự phát triển và thời gian.

W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub> = Khối lượng khô của cây ở thời gian t<sub>1</sub> và t<sub>2</sub>.

- Đánh giá mối liên quan giữa cố định đạm của cây và vi khuẩn qua các thời gian theo công thức :

$$Rn = \frac{\log N_2 - \log N_1}{t_2 - t_1}$$

Rn = liên quan cố định đạm

N<sub>1</sub> và N<sub>2</sub> = đạm tổng số của cây ở thời điểm t<sub>1</sub> và t<sub>2</sub>.

**QUÁ TRÌNH CHUYỂN HÓA NITƠ DƯỚI TÁC DỤNG CỦA VI SINH VẬT  
(CHUYỂN HÓA : AMÔN HÓA ; NITRAT HÓA ; PHẢN NITRAT HÓA)****I - VI KHUẨN AMÔN HOÁ**

Quá trình phân giải protein và các hợp chất hữu cơ chứa nitơ để thành  $\text{NH}_3$  gọi là quá trình amôn hóa. Việc phát hiện và xác định số lượng VSV amôn hóa được thực hiện bằng cách nuôi cấy mẫu phân tích lên môi trường canh thịt - peptôn hoặc lên bề mặt môi trường thạch bằng nước thịt - peptôn - thạch - mạch nha.

**1.1. Tiến hành trên môi trường thạch bằng**

Pha loãng dung dịch mẫu vật, lấy 1ml dung dịch pha loãng nhất định cho vào hộp petri. Đổ môi trường nước thịt - peptôn - thạch - mạch nha vào hộp petri sao cho dịch mẫu phân phối đều trong môi trường (thường để môi trường  $37 - 40^\circ\text{C}$  là vừa). Sau đó cho vào tủ nuôi ở  $28 - 30^\circ\text{C}$ , nuôi 2 - 3 ngày. Quan sát và đếm số lượng tế bào VSV theo công thức :

$$X = A \cdot K \cdot 10$$

X = Số lượng tế bào VSV trong 1g (ml).

A = Số lượng khuẩn lạc trung bình thực tế trong 1 hộp petri.

10 = Hệ số quy đổi 0,1ml về ml.

K = Hệ số khô kiệt.

**1.2. Trên môi trường dịch thể**

Môi trường canh thịt - peptôn được phân vào ống nghiệm khoảng 1/3 chiều cao mỗi ống, đem tiệt trùng ở 1atm/30 phút. Giấy quỳ và giấy thấm chì axetat được khử trùng ở 0,5at. Pha loãng dung dịch mẫu vật từ  $10^{-1} \dots 10^{-10}$ .

Mỗi độ pha loãng cấy lặp lại 4 lần, 3 ống nghiệm môi trường không cấy VSV để làm đối chứng. Dịch mẫu cho vào mỗi ống nghiệm là 0,2 - 0,5ml. Sau khi cấy, dùng kẹp sắt đã khử trùng lấy giấy quỳ và giấy thấm chì axetat cài vào miệng ống nghiệm nút bông. Đem nuôi ở nhiệt độ  $28 - 30^\circ\text{C}$ , thời gian 5 - 7 ngày. Sau đó ghi kết quả.

Dựa vào sự sản sinh ra  $\text{H}_2\text{S}$  và  $\text{NH}_3$  để kết luận sự phát triển của vi khuẩn amôn hóa. Ống nghiệm có vi khuẩn, thì giấy quỳ đỏ biến thành

xanh và giấy chì axetat biến thành đen (do PbS). Số lượng VSV được tính theo phương pháp thống kê toán học (phương pháp định tính) theo bảng Mc.Crady (xem phần Phụ lục).

## II - VI KHUẨN NITRAT HÓA

$\text{NH}_4^+$  dưới tác dụng của một số VSV tự dưỡng hoá năng đặc biệt được oxi hoá để biến thành  $\text{NO}_3^-$ , gọi là quá trình nitrat hoá.

### 2.1. Quá trình nitrit hóa

Đây là quá trình chuyển hóa từ  $\text{NH}_4^+$  thành  $\text{NO}_2^-$  dưới tác dụng của VSV.

#### 2.1.1. Dụng cụ và nguyên liệu

- Bình tam giác hay bình cầu 100, 250, 500, 1000 ml, hộp lồng, que cấy, đèn cồn, giá đựng ống nghiệm, ống nghiệm  $1,5 \times 10\text{cm}$ , thuốc thử.
- Dung dịch nước thử Griess I và Griess II.

Bản sứ có lỗ, ống hút 1ml, dung dịch đất  $10^{-1} \dots 10^{-5}$ .

#### 2.1.2. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn môi trường Vinogradskii

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2g	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1g
NaCl	2g	$\text{MgSO}_4$	0,5g
$\text{FeSO}_4$	0,4g	$\text{CaCO}_3$	5g
Nước cất	1000ml	pH = 8,5	

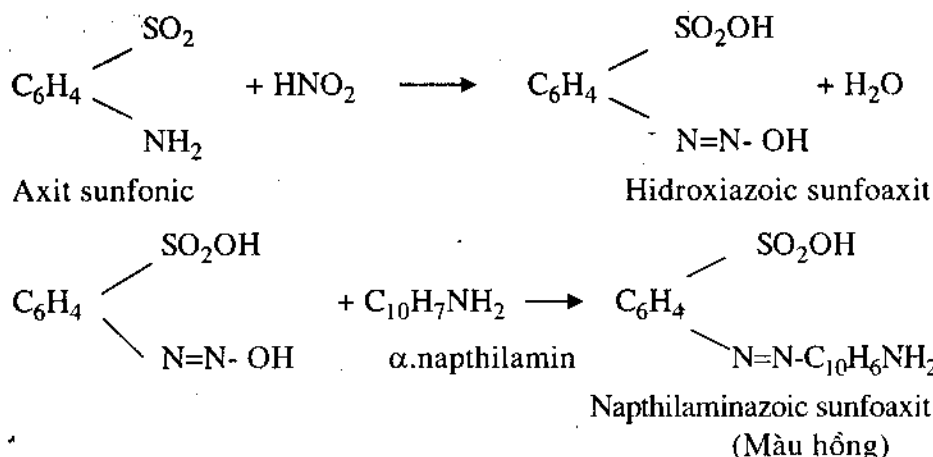
Cho môi trường vào ống nghiệm, mỗi ống 2 - 5ml. Tiệt trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong 30 phút.

#### 2.1.3. Phương pháp tiến hành

Dùng ống hút lấy 0,1ml môi trường cho vào bản sứ. Nhỏ dung dịch Griess I và Griess II vào, mỗi loại 1 giọt. Nếu không xuất hiện màu hồng nghĩa là không có  $\text{NO}_2^-$ , thì tiếp tục các bước tiếp theo. Cho 0,2ml dung dịch đất  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  vào ống nghiệm có môi trường. Dem nuôi ở nhiệt độ  $28 - 30^\circ\text{C}$ , trong 5 - 7 ngày.

#### 2.1.4. Quan sát vi khuẩn và kiểm tra kết quả

$\text{NO}_2^-$  tác dụng với dung dịch Griess I và Griess II sẽ tạo thành hợp chất màu hồng hoặc đỏ theo phản ứng sau :



Căn cứ vào màu hồng tạo được, sẽ xác định được cường độ hoạt động của vi khuẩn.

## 2.2. Quá trình nitrat

Đây là quá trình chuyển hoá  $\text{NO}_2^-$  thành  $\text{NO}_3^-$  dưới tác dụng của VSV.

### 2.2.1. Dụng cụ, hoá chất

Dung dịch diphenylamine ; Dung dịch Griess I và Griess II ; Axit axetic ;  
Bản sứ, Ống hút ; Kính hiển vi ; Thuốc nhuộm.

### 2.2.2. Môi trường Vinogradskii

$\text{NaNO}_2$	1,0g	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1,0g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5g	$\text{NaCl}$	0,5g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3g	$\text{FeSO}_4$	0,4g
Nước cất	1000ml		

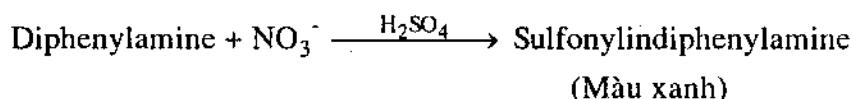
Chuẩn bị môi trường và khử trùng giống như môi trường ở giai đoạn 1.

Cho dịch vi khuẩn vào ống nghiệm có môi trường. Nuôi trong tủ ẩm nhiệt độ  $28 - 30^\circ\text{C}$ , trong 7 ngày.

### 2.2.3. Kiểm tra kết quả

Cho một ít môi trường đã nuôi cấy lên bản sứ. Cho 1 giọt  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc và 1 giọt diphenylamine. Nếu có màu xanh xuất hiện, tức có  $\text{NO}_3^-$ .

Cơ chế tác dụng như sau :



### III - VI KHUẨN PHẢN NITRAT

Là quá trình khử  $\text{NO}_3^-$  đến nitơ phân tử ( $\text{N}_2$ ) dưới tác dụng của VSV.

#### 3.1. Dụng cụ và nguyên liệu

Dung dịch đất  $10^{-1} \dots 10^{-5}$ ; Ống hút; Bàn sứ.

Thuốc thử Griess I, Griess II. Thuốc thử Nesler và Diphenylamine.

#### 3.2. Môi trường

$\text{KNO}_3 = 2\text{g}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1\text{g}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 2\text{g}$ ;  $\text{FeSO}_4 =$  vệt;

Kali xitrat 5g; Nước cất 1000ml.

Điều chỉnh pH môi trường đến 7, sau đó cho vào ống nghiệm, mỗi ống 3ml, đem tiệt trùng  $121^\circ\text{C}$  trong 30 phút.

#### 3.3. Phương pháp tiến hành

- Cho vào ống nghiệm có môi trường 0,5ml dung dịch đất. Để trong phòng ấm  $28 - 30^\circ\text{C}$  trong 4 - 5 ngày. Kiểm tra kết quả. Tiến hành kiểm tra như sau:

+ Nếu trong quá trình nuôi cấy không ngừng sinh bọt khí và trên mặt môi trường có 1 lớp bọt khí. Như thế tức là trong quá trình chuyển hóa  $\text{NO}_3^-$  có sinh  $\text{N}_2$ .

+ Lấy một ít dung dịch nuôi cấy vi khuẩn, cho vào bàn sứ và cho dung dịch Griess I, Griess II vào. Nếu có màu hồng đỏ xuất hiện, nghĩa là có phản nitrat hóa, sinh  $\text{NO}_2^-$  sinh  $\text{NO}_3^-$ .

+ Lấy một ít dung dịch vi khuẩn cho vào bàn sứ. Cho 1 vài giọt Nessler vào. Nếu có màu vàng xuất hiện tức có  $\text{NH}_4^+$  để tiếp tục chuyển thành  $\text{N}_2$ .

- Cách tính số lượng VSV theo phương pháp định tính theo bảng Mc. Grady):

Ví dụ: Ta có dãy pha loãng từ  $10^1$  đến  $10^9$ . Số lần cấy lặp lại = 3, nghĩa là có 3 đĩa môi trường được làm thí nghiệm ở 1 nồng độ pha loãng. (có thể cấy ở 3 nồng độ liên tiếp).

- Sau khi nuôi ta đọc được kết quả như sau:

$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$	$10^9$
+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
3	3	3	3	2	2	1	0	0

+ Nguyên tắc chọn số để tra bảng Mc. Crady. Chọn 3 chữ số nhỏ nhất trong dãy số, mà chữ số đầu có chữ số đứng đằng trước nó giống nó. Kết quả thí nghiệm trên ta phải chọn số 210.

+ Tra số 210 theo cột dọc đầu của bảng Mc. Crady, chiếu theo hàng ngang có số 3 (số lần nhắc lại) ta được số = 1,5.

+ Tính theo công thức :  $N = A \times n \times K$

N - số tế bào/1g đất khô, hoặc 1ml mẫu phân tích.

A - hệ số tra được ở bảng Mac. Crady (= 1,5).

n - số nghịch đảo của nồng độ pha loãng ( $10^6$ ).

K - hệ số khô kiệt (quy đổi từ độ ẩm mẫu phân tích. Ví dụ : K = 1,2).

Vậy số lượng tế bào VSV =  $1,5 \times 10^6 \times 1,2 = 1,8 \cdot 10^6$  tế bào/1g đất khô.

## Bài 11

### VI SINH VẬT PHÂN GIẢI LÂN (PHOTPHO)

#### I - VI KHUẨN PHÂN GIẢI LÂN HỮU CƠ

Lân hữu cơ có thể được phân giải bởi nhiều loại VSV. Có thể dùng môi trường có thành phần sau để phân lập.

##### 1.1. Môi trường phân lập

Loxitin	0,05g	MgSO <sub>4</sub>	0,3g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,3g	FeSO <sub>4</sub>	vết
CaCO <sub>3</sub>	5g	Glucosơ	10g
NaCl	0,3g	Nước	1000ml
MnSO <sub>4</sub>	vết	Thạch	15 - 18g

Lân hữu cơ có thể dùng loxitin hoặc axit nucleic.

##### 1.2. Dụng cụ, nguyên liệu

Ống nghiệm có 9ml nước vô trùng.

Ống hút 1ml và 10ml.

Hộp lồng đã tiệt trùng.

Ống nghiệm có thạch nghiêng.

##### 1.3. Các bước thực hiện

Cân 10g đất. Cho vào bình tam giác có 90ml nước vô trùng. Lắc 10 phút. Pha loãng  $10^{-2}$  -  $10^{-5}$ . Trong điều kiện không có axit nucleic hoặc loxitin thì dùng lòng đỏ trứng gà. Dùng dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1% tiệt trùng trứng. Dùng nước cất rồi nước vô trùng rửa sạch HgCl<sub>2</sub>. Luộc trứng. Lấy



lòng đỏ nghiền nhỏ. Ngâm cồn, gạn nước cồn. Làm như thế nhiều lần. Lọc. Dùng axeton kết tủa. Dùng rượu và axeton để hoà tan và kết tủa. Cuối cùng dùng rượu hoà tan, như thế có thể dùng được.

- Cho môi trường vào ống nghiệm  $1,8 \times 18\text{cm}$  mỗi ống 15ml. Tiệt trùng  $120^{\circ}\text{C}/15$  phút.

- Nấu chảy môi trường, để nguội  $50^{\circ}\text{C}$ . Đổ vào hộp lồng, mỗi hộp 15ml. Chờ môi trường đông lại. Dùng ống hút đã tiệt trùng lấy 0,1ml dung dịch đất ở nồng độ  $10^{-3}$  hoặc  $10^{-4}$ . Cấy lên trên mặt môi trường. Dùng que thuỷ tinh dàn đều khắp môi trường. Để ở  $28 - 30^{\circ}\text{C}$ , trong 3 - 4 ngày.

#### 1.4. Kiểm tra kết quả

Trên mặt môi trường sẽ xuất hiện khuẩn lạc màu trắng đục, có hình tròn, có nếp nhăn. Đây là khuẩn lạc của vi khuẩn phân giải lân hữu cơ.

Dùng que cấy lấy vi khuẩn làm tiêu bản - nhuộm đơn. Xem kính. Vi khuẩn hình que, hai đầu tròn, đứng riêng rẽ hoặc liên lại thành chuỗi. Lấy vi khuẩn này tiếp tục thuần hoá.

*Chú ý :* Có thể dùng lòng đỏ trứng trực tiếp, không qua rửa rượu và kết tủa bằng axeton. Cách làm như sau :

Rửa sạch vỏ trứng bằng  $\text{HgCl}_2$  0,1% hoặc bằng cồn 95%. Dùng nước cất rồi nước vô trùng rửa sạch  $\text{HgCl}_2$  hoặc cồn. Cho lòng đỏ trứng vào bình tam giác đã tiệt trùng. Cho vào 50ml nước vô trùng đánh vào cho đều. Cho vào mỗi hộp lồng 1ml nước lòng đỏ trứng. Đổ môi trường vào. Lắc nhẹ trộn đều và để đông lại. Lấy ống hút cho dung dịch cần phân lập vào. Mỗi hộp lồng cấy 0,5ml dung dịch đất. Để 2 - 3 hộp làm đối chứng. Để ở  $28 - 30^{\circ}\text{C}$  trong 24 giờ. Thời gian nuôi cấy không được quá lâu vì dễ nhiễm tạp vi khuẩn. Khuẩn lạc mọc. Lấy vi khuẩn làm tiêu bản, xem kính. Nếu đúng như vi khuẩn phân giải lân đã miêu tả trên thì tiếp tục cấy vào thạch nghiêng nhiều lần để thuần hoá.

## II - VI SINH VẬT PHÂN GIẢI LÂN VÔ CƠ KHÓ TAN

### 2.1. Môi trường

Saccarozơ	10g	$\text{MnSO}_4$	0,03g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5g	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03g
$\text{NaCl}$	0,3g	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	10g
$\text{KCl}$	0,3g	Thạch	20g
$\text{MgSO}_4$	0,3g	Nước cất	1000ml

## 2.2. Dụng cụ và nguyên liệu

Bình tam giác ; Hộp lồng ; Ống nghiệm ; Dung dịch  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ; HCl đậm đặc và 0,1N ; Bình định mức 50cc ; Dung dịch đất pha loãng ; Bèo dâu.

## 2.3. Các bước

Đổ môi trường vào các hộp lồng đã tiệt trùng. Dùng dung dịch đất 0,1ml đổ vào, san đều trên bề mặt môi trường. Để ở 28 - 30°C.

## 2.4. Đánh giá kết quả

- Sau 5 - 7 ngày, quan sát khuẩn lạc và hình thái vi khuẩn. Khuẩn lạc trong nhờ, lồi, đường biên thẳng. Xung quanh khuẩn lạc có vòng phân giải trong suốt. Vòng này lớn hay bé tùy vi khuẩn. Thường thì vòng phân giải bé và muốn xem phải lật ngược đĩa petri.

Muốn đánh giá chắc chắn hơn nên kết hợp chặt chẽ giữa quan sát bằng mắt thường và dùng dung dịch Molibdatamon để kiểm tra kết quả có lân dễ tiêu không. Nếu có, lân sẽ kết hợp với Molibdatamon thành hợp chất photpho molibdatamon, kết tủa màu vàng.

- Quan sát vi khuẩn :

+ Từ khuẩn lạc có vòng phân giải, lấy một ít vi khuẩn. Làm tiêu bản và quan sát dưới kính hiển vi. Vi khuẩn phân giải hợp chất lân khó tan thành dễ tan hình que. Đầu tròn có vỏ nhầy bé, có bào tử, gram dương. Muốn thuần khiết thì cấy vào thạch nghiêng nhiều lần. Mỗi lần cấy đều kiểm tra dưới kính hiển vi.

+ Để phân lập vi khuẩn phân giải hợp chất lân vô cơ khó tan thành dễ tan, có thể dùng bèo dâu. Ở cánh bèo dâu và rễ diễn thành có nhiều vi khuẩn phân giải lân khó tan thành dễ tan.

Lấy cánh bèo dâu. Rửa qua nước máy cho sạch, nghiền nhỏ trong một ít nước vô trùng để thành 1 dung dịch. Lấy dịch bèo dâu cấy trên môi trường thạch phẳng. Để ở 28 - 30°C trong 5 - 7 ngày, quan sát khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi.

*Chú ý :*

- Nghiền bèo dâu thành dịch để cho dễ cấy vào môi trường.
- Để xác định cường độ phân giải của vi khuẩn, ta định lượng lân dễ tiêu trên máy so màu.