

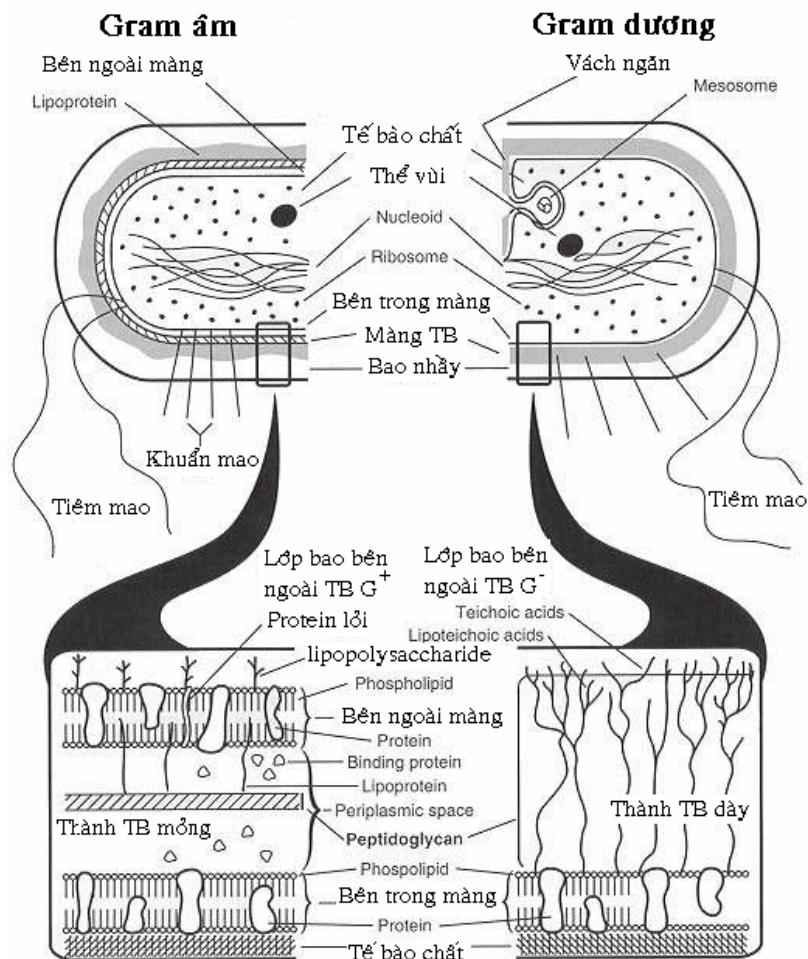
ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
KHOA CÔNG NGHỆ MÔI TRƯỜNG
☪

Lê Quốc Tuấn

Thực Tập

VI SINH VẬT HỌC

(Dành cho sinh viên ngành Công nghệ Môi trường)



Lưu hành nội bộ

-2004-

MỤC ĐÍCH VÀ YÊU CẦU

I. MỤC ĐÍCH.

Cuốn thực tập vi sinh vật học được biên soạn cho sinh viên Ngành Công nghệ Môi trường, Trường Đại Học Nông Lâm – TP. Hồ Chí Minh với mục đích giúp sinh viên làm quen với những kỹ năng thao tác trong phòng thí nghiệm vi sinh vật như : Pha chế môi trường; Khử trùng môi trường; Phân lập, Nuôi cấy và Bảo quản vi sinh vật...Nội dung thực hành được chia làm 2 phần:

Phần I. Phần thực tập vi sinh đại cương.

Trong phần này sinh viên thực hành chuẩn bị môi trường, thao tác vô trùng phương pháp lấy mẫu và bảo quản, nhuộm màu và quan sát vi sinh vật.

Phần II. Phần thực tập vi sinh môi trường.

Trong phần này sinh viên tiến hành nuôi cấy vi sinh vật để phát hiện và định lượng chúng. Mỗi nhóm có thể chọn một đề tài nghiên cứu về chủng vi sinh vật có trong hoặc ngoài giáo trình thực tập để tiến hành phân tích chúng.

Kết quả mỗi phần thực tập được đánh giá dựa vào mức độ chuyên cần, mức độ hiểu biết các nguyên tắc, kỹ năng thao tác chính của mỗi bài thực tập. Kết quả được đánh giá qua bài kiểm tra viết và thực hành của mỗi phần thực tập.

II. YÊU CẦU.

Sinh viên phải thực hiện nghiêm túc một số quy tắc cơ bản sau:

1. Không ăn uống trong phòng thí nghiệm, không ngậm bất cứ vật gì dùng để thao tác trong quá trình thực hành.
2. Mang áo blouse trong suốt thời gian thực hành, không mang nó ở bất cứ một nơi nào khác.
3. Mang găng tay và các thiết bị bảo hộ trong quá trình tiếp xúc với các chất độc hại.
4. Luôn luôn sử dụng quả bóp cao su khi thao tác ống hút định lượng (pipette), không hút bằng miệng.
5. Sử dụng giấy thấm có tẩm chất khử trùng để lau sạch xung quanh khu vực đang tiến hành thí nghiệm. Nếu lỡ tay làm đổ, nhiễm dịch vi sinh vật lên bàn thực tập cũng tiến hành lau như trên sau đó khử trùng lại bàn thực tập.
6. Khi làm vỡ các vật dụng bằng thủy tinh, phải mang găng tay để thu gom chúng vào một túi rác riêng.
7. Loại thải tất cả các chất độc hại đúng nơi quy định.
8. Phải cẩn thận khi thao tác vô trùng với đèn cồn. Dập tắt lửa khi không có nhu cầu sử dụng trong thời gian dài.
9. Báo cáo ngay với cán bộ hướng dẫn khi có những tình huống khẩn cấp xảy ra để giải quyết kịp thời.
10. Lau chùi sạch sẽ các thiết bị, bàn thí nghiệm bằng chất khử trùng, rửa tay bằng xà bông khi hoàn tất công việc.
11. Trước khi rời phòng thí nghiệm, cởi áo blouse cho vào túi nilon về nhà giặt ngay để sử dụng vào lần thí nghiệm tiếp theo.

PHẦN I : VI SINH ĐẠI CƯỜNG

**CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG, THAO TÁC VÔ TRÙNG
PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU, PHÂN LẬP
VÀ BẢO QUẢN VI SINH VẬT**

BÀI 1

KỸ THUẬT THAO TÁC VÔ TRÙNG

1. Nguyên tắc

Vi sinh vật cần được nuôi cấy để định danh, khảo sát tính năng sinh trưởng và phát triển. Một môi trường nuôi cấy có thể thích hợp cho sự phát triển của nhiều loại vi khuẩn cho nên trong tiến trình thao tác phải hạn chế tối đa việc đưa các loại vi khuẩn khác vào. Kỹ thuật thao tác vô trùng được sử dụng trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật nhằm loại trừ các vi sinh vật gây nhiễm.

Môi trường, các vật dụng cần thiết cho việc nuôi cấy phải được khử trùng thích hợp và ở trạng thái vô trùng trước khi được sử dụng.

Các thao tác vô trùng được thực hiện trong một không gian vô trùng được tạo ra bởi ngọn lửa đèn cồn. Ngọn lửa có tác dụng oxy hoá không khí tạo không gian vô trùng, đồng thời còn được dùng để đốt khử trùng que cấy, miệng chai lọ, ống nghiệm khi mở nắp, nút bông.

Để đảm bảo tính vô trùng cao, đèn vô trùng còn được đặt trong một không gian cách ly gọi là tủ cấy vô trùng. Không khí trong tủ cấy vô trùng sẽ được khử trùng bằng tia cực tím và bằng màng lọc. Thông thường, trước khi sử dụng cần bật đèn cực tím trước 30 – 60 phút và bật quạt thông gió khi tiến hành thao tác.

Để tránh việc gây nhiễm thông qua tiếp xúc, người thao tác cần mang găng tay hoặc được sát trùng trước khi bắt đầu thao tác.

Ngoài ra, cần tiến hành sát trùng bề mặt bàn thao tác bằng các lau với cồn 70⁰ hoặc các dung dịch diệt khuẩn khác trước khi thao tác.

2. Nội dung thực hành

Sinh viên thực hiện các bước chuẩn bị trước khi thao tác vô trùng và thực hành các kỹ thuật vô trùng để cấy vi sinh vật.

3. Vật liệu

- Que cấy vòng, kim cấy
- Đèn cồn
- Ống môi trường, ống giống.

4. Thực hành

- Bật đèn cực tím 15 phút sau đó tắt đèn và chờ 10 phút trước khi tiến hành nuôi cấy.
- Rửa tay bằng xà bông, lau khô sau đó khử trùng tay bằng cồn 70⁰.
- Khử trùng que cấy, đĩa tam giác bằng ngọn lửa đèn cồn.
- Trước khi cấy cần ghi chú cẩn thận lên thành bình hoặc ống nghiệm hoặc petri tên giống vi sinh vật và ngày cấy.

Phương pháp khử trùng que cấy.

Đốt nóng đỏ đầu que cấy trong ngọn lửa và đốt nhẹ phần cán sẽ đưa vào bên trong dụng cụ chứa vi sinh vật. Mở nút bông và đưa ngay que cấy đã khử trùng vào dụng cụ chứa giống. Làm nguội que cấy bằng cách áp đầu que cấy vào thành ống nghiệm, bình chứa thuỷ tinh hoặc đặt nhẹ lên phần môi trường không chứa vi sinh vật cho nguội trước khi thu lấy một lượng nhỏ sinh khối vi sinh vật

1. Cây giống từ môi trường lỏng sang ống nghiệm chứa môi trường lỏng.
2. Cây giống từ ống thạch nghiêng (môi trường rắn) sang môi trường lỏng.
3. Cây giống từ môi trường lỏng (dịch nuôi cấy, huyền phù tế bào) lên bề mặt thạch nghiêng.

BÀI 2

CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG

1. Nguyên tắc

Để phân lập, nuôi cấy và bảo quản các loại vi sinh vật người ta phải sử dụng các môi trường dinh dưỡng đặc hoặc lỏng. Môi trường dinh dưỡng phải đảm bảo các thành phần dinh dưỡng thích hợp cho sự phát triển của vi sinh vật.

Môi trường dinh dưỡng thích hợp không những là môi trường có đầy đủ các thành phần vô cơ và hữu cơ cần thiết cho vi sinh vật có thể sử dụng được mà còn phải đảm bảo pH, thế oxy hoá khử thích hợp, không chứa các độc tố và hoàn toàn vô trùng.

Vì vậy, khi cần thiết lập một môi trường dinh dưỡng cho một loại vi sinh vật nào đó thì cần phải biết rõ nhu cầu về các chất dinh dưỡng và đặc điểm trao đổi chất của nó. Cần phải lưu ý về nồng độ các chất dinh dưỡng để duy trì sự cân bằng về áp suất thẩm thấu giữa môi trường và tế bào vi sinh vật.

Người ta thường gọi tên các môi trường bằng cách dựa vào tên người tìm ra chúng (vd : môi trường Czapek, Hansen, Pikovskaia...) hoặc ghi theo nguồn chất dinh dưỡng chính của môi trường (vd : môi trường Glucose-peptone, potato-glucose-agar...)

Chúng loại, thành phần và đặc tính của môi trường được pha chế tùy thuộc vào một số yếu tố sau:

- Tùy vào mục đích yêu cầu thực tập hay nghiên cứu.
- Tùy nhu cầu dinh dưỡng của vi sinh vật.

Môi trường có thể được phân loại dựa vào thành phần tính chất hoá – lý hay công dụng của môi trường. Dựa vào thành phần có thể phân biệt các loại môi trường như sau:

- Môi trường dinh dưỡng tự nhiên : dùng các sản phẩm có sẵn trong tự nhiên như sữa, huyết thanh, khoai tây, cám, đường,...Thành phần hoá học của các sản phẩm này không ổn định và phức tạp.
- Môi trường tổng hợp : dùng các hoá chất nhất định với hàm lượng xác định để pha chế môi trường.
- Môi trường bán tổng hợp : kết hợp với việc dùng các sản phẩm tự nhiên và các hoá chất tổng hợp.

Dựa vào tính chất vật lý có thể phân biệt các loại môi trường sau đây:

- Môi trường lỏng hay môi trường dịch thể
- Môi trường rắn là môi trường chứa 1,5 – 2% agar hoặc 10 – 20% gelatin.
- Môi trường rắn mềm là môi trường có chứa 0.35 – 0.7% agar.

Dựa vào công dụng có thể phân biệt thành các môi trường sau :

- Môi trường chọn lọc : là môi trường đảm bảo sự phát triển ưu thế của một loại hoặc một nhóm vi khuẩn xác định nào đó. Ví dụ : môi trường dùng để phân lập hoặc nuôi cấy vi sinh vật cố định đạm, vi khuẩn nitrat hoá, vi khuẩn phân giải cellulose,...
- Môi trường kiểm định : là môi trường cho phép phân biệt được một số đặc điểm của một số loại vi khuẩn cần xác định. Thường người ta cho vào các môi trường kiểm

định một số chất chỉ thị màu hoặc một số hoá chất có thể giúp cho việc tạo ra những phản ứng màu để quan sát thấy. Ví dụ : môi trường lên men đường, môi trường thạch chiti..

Chuẩn bị môi trường là một trong những khâu quan trọng trong việc nghiên cứu vi sinh vật, cần được thực hiện cẩn thận và chính xác. Trình tự thiết lập môi trường như sau:

- Cân, đong chính xác từng thành phần của môi trường.
- Với môi trường lỏng : các chất được hoà tan vào nước ngay sau khi cân đong. Đối với môi trường rắn cần bổ sung thêm agar.
- Môi trường cần phải trong để dễ quan sát nếu cần thiết thì phải lọc qua giấy lọc
- Tuỳ theo đối tượng sinh vật được nuôi cấy và tuỳ theo yêu cầu nghiên cứu, môi trường được điều chỉnh pH bằng HCl 10% hoặc NaOH 10%, hoặc các dung dịch khác như H_3PO_4 , H_2SO_4 , KOH, Na_2CO_3 ...trước khi được khử trùng. Việc điều chỉnh này được theo dõi bằng máy đo pH.
- Chỉ sử dụng một phần trong dung tích tổng của bình chứa để chứa môi trường. Với bình cầu thường dùng khoảng 1/3 – 1/2 dung tích bình; với ống nghiệm thường dùng khoảng 5ml/ống khi làm môi trường lỏng và 5 – 7ml khi làm môi trường thạch nghiêng.

2. Nội dung thực hành

Sinh viên thực hành chuẩn bị pha chế một số môi trường để nuôi cấy vi sinh vật.

3. Vật liệu.

- Bình tam giác 100ml, ống nghiệm, phễu thuỷ tinh
- Ống hút 5ml, 10ml, ống đong 100ml
- Cân, nồi hấp áp lực
- Thịt bò, lúa, agar

4. Thực hành

Các bước chuẩn bị môi trường nuôi cấy vi sinh vật : cân, đong, đo chính xác từng thành phần của môi trường nuôi cấy.

Dùng cốc thuỷ tinh 500ml cho 200ml nước cất vào trong cốc, sau đó cân chính xác từng thành phần hoá chất để pha chế môi trường cho vào trong cốc đã có nước, vừa cho vào vừa khuấy đều cho chúng tan ra, nếu cần thiết thì đun nóng trên bếp điện có tấm lưới amian.

Sau đó đo pH của dung dịch vừa pha xong, cho vào bình tam giác 1000ml rồi thêm nước cất đến 500ml. Làm nút bông, gói lại đem khử trùng trong nồi hấp áp lực.

Phương pháp chuẩn bị một số môi trường tự nhiên khi chúng không có sẵn trong phòng thí nghiệm.

4.1. Nước chiết thịt

1kg thịt bò nạc, lọc bỏ hết gân và mỡ, sau đó thái nhỏ và cho vào cối xay thịt, xay nhỏ. Cho vào xoong và cho 2 lít nước để tiến hành chiết trong điều kiện mát lạnh (để ở trong tủ lạnh, ngăn làm mát) kéo dài 24 giờ. Sau đó mang đun nhỏ lửa nhưng liên tục cho đến khi sôi, duy trì nhiệt độ sôi trong 30 phút. Lọc lấy nước và tiếp tục bổ sung nước cất

cho đủ 2 lít và phân vào bình bảo quản, nhưng trước đó phải khử trùng ở 1.5 – 2 atm trong thời gian 20 phút.

4.2. Nước chiết đất.

Dùng để phát triển nhiều nhóm vi sinh vật đất : lấy 1kg đất màu mỡ (hay đất ở chỗ nghiên cứu) cho 1 lít nước sạch khử trùng ở 120⁰C thời gian 30 phút. Sau đó đem lọc, dịch ở dạng kiềm thêm K₂HPO₄ và khử trùng.

4.3. Nước mạch nha.

Có thể hoàn toàn chủ động làm trong phòng thí nghiệm. Ngâm thóc cho nảy mầm, độ dài mầm tốt nhất 1 - 2cm. Tách lấy mầm và sấy khô. Lấy 250mg mẫu khô nghiền nhỏ và cho 1 lít nước vào ngâm, duy trì ở nhiệt độ 45⁰C (để ở nồi cách thuỷ, trong tủ ấm hay đun nhỏ lửa trên bếp đều được). Khấy liên tục, thời gian 30 phút, sau thời gian này điều chỉnh cho nhiệt độ tăng lên 65⁰C và duy trì 1 giờ. Trong thời gian này enzyme diastase sẽ đường hoá tinh bột, kiểm tra quá trình đường hoá tinh bột bằng cách sử dụng dung dịch iod. Sau khi đường hoá tinh bột xong đem lọc lấy nước, và có thể làm đặc lại bằng cách cho bốc hơi nước, tỉ lệ đường là 10%.

4.4. Pha chế một số môi trường để nuôi cấy vi sinh vật.

4.4.1. Môi trường Gause 1 (g.l⁻¹) : dùng để nuôi cấy xạ khuẩn – Actinomycetes

KNO ₃	1,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,5
NaCl	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Agar	15,0
Tinh Bột	20,0
Nước cất	1lít
pH	7,4

4.4.2. Môi trường Czapek (g.l⁻¹) : dùng để nuôi cấy vi nấm

NaNO ₃	3,0
K ₂ HPO ₄	1,0
KCl	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Sacarose	30,0
FeSO ₄	0,01
Agar	20,0
Nước cất	1lít

* Làm chua bằng 1,8ml acid lactic sau khi khử trùng

4.4.3. Môi trường TPA + MN (nước chiết thịt – pepton – agar + nước mạch nha) dùng để xác định nhóm vi khuẩn amon hoá hình thành bào tử.

Thành phần môi trường (g.l⁻¹)

Cao thịt	3
Cao mạch nha	3
Pepton	5.0
NaCl	2.5
Agar	20.0
pH	7 – 7.2

3.4.4. Môi trường TAA (tinh bột + amon + agar (thạch)) dùng để xác định nhóm vi khuẩn sử dụng nitơ khoáng

Thành phần môi trường (g.l⁻¹)

Tinh bột	10.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ .H ₂ O	1.0
NaCl	1.0
CaCO ₃	3.0
Agar	15
Nước cất	1lít
pH	7.0

4.4.5. Môi trường Hutchinson (g.l⁻¹) : dùng để xác định vi sinh vật phân giải cellulose)

KNO ₃	2.5
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄	0.3
CaCl ₂	0.1
NaCl	0.1
FeCl ₃	0.01
Agar	15.0
Nước cất	1lít
pH	7.2 – 7.3 Dùng NaCO ₃ 20% để điều chỉnh pH

4.4.6. *Môi trường pikovskaia (g.l⁻¹)* : dùng để xác định nhóm vi sinh vật phân giải hợp chất phosphore khó tan.

Glucosa	10.0
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
NaCl	0.2
MgSO ₄	0.1
KCl	0.2
Cao nấm men	0.5
MnSO ₄	Vết
FeSO ₄ .7H ₂ O	Vết
Agar	20g
Nước cất	1 lít
pH	7.0

4.4.7. *Môi trường Ashby (g.l⁻¹)* : dùng để xác định nhóm vi sinh vật cố định nitơ sống tự do trong đất.

Matitol (Glucose)	20.0
K ₂ HPO ₄	0.2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	0.2
CaSO ₄	0.1
CaCO ₃	5.0
Agar	20.0
Nước cất	1 lít
pH	6.5 – 7.0

4.4.8. *Môi trường dịch thể Vinogradski (g.l⁻¹)* : dùng để xác định *Clostridium pasteurianum* – là vi khuẩn cố định nitơ tự do sống trong điều kiện yếm khí.

Glucose	10.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
NaCl	0.5
FeSO ₄	Vết
MnSO ₄	Vết
Nước cất	1 lít
pH	6.8 – 7.2

BÀI 3

PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG

1. Nguyên tắc.

Có thể khử trùng bằng một số tác nhân lý hoá như nhiệt độ, bức xạ, lọc và hoá chất.

Nhiệt độ cao có thể tiêu diệt vi sinh vật bằng cách làm biến tính enzyme, mất nước và oxy hóa các thành phần của tế bào; nhiệt độ thấp ức chế sự tăng trưởng của chúng. Có thể khử trùng bằng phương pháp nhiệt khô (sấy 170°C trong 2 giờ; đốt) hoặc nhiệt ẩm (đun ở 63°C trong 30 phút hoặc 72°C trong 15 phút để diệt vi sinh gây bệnh hoặc vi sinh gây hỏng thực phẩm; đun sôi ở 100°C trong 10 phút để diệt tế bào sinh dưỡng và hấp bằng hơi nước ở 1atm, 121°C trong 15 – 30 phút để tiệt trùng hoàn toàn).

Năng lượng chiếu xạ ở bước sóng ngắn (tia X, tia gamma) có khả năng ion hoá phân tử nước tạo gốc tự do tác dụng phá huỷ DNA, màng lipid, protein trong tế bào; tia xạ có bước sóng dài hơn như tia tử ngoại không có tác dụng ion hoá nhưng có thể cảm ứng việc tạo thành liên kết giữa các base T trong nucleic acid tạo nên đột biến, có thể gây chết tế bào.

Các dịch lỏng có thể được khử trùng bằng cách lọc qua màng có kích thước giới hạn ($0.2\mu\text{m}$), cho phép dịch lỏng đi qua và giữ lại tất cả vi khuẩn và các vi sinh vật có kích thước lớn hơn.

Nhiều hoá chất có thể kiểm soát sự tăng trưởng của vi sinh vật. Ethylen oxide, triethyl glycol, chất diệt khuẩn, kháng sinh,...được sử dụng để khử trùng, ức chế sự sống và tăng trưởng của vi sinh vật.

Tác nhân khử trùng được tùy chọn tùy vào mục đích và vật liệu cần khử trùng. **Trường hợp cần khử trùng môi trường nuôi cấy vi sinh vật, phương pháp nhiệt ẩm bằng nồi áp suất (1atm, 121°C) thường được sử dụng để các thành phần hữu cơ của môi trường không bị cháy, biến tính và mất nước.**

Trường hợp môi trường chứa các chất phân tử lượng nhỏ như vitamin, amino acid, hoặc huyết thanh chứa các protein là nhân tố tăng trưởng, phương pháp nhiệt ẩm có thể làm biến tính các thành phần này, nên các thành phần này thường được khử trùng riêng bằng phương pháp lọc qua màng.

Các dụng cụ thủy tinh bền với nhiệt nên thường được khử trùng bằng phương pháp nhiệt khô trong tủ sấy. Các thanh gạt thủy tinh được khử trùng bằng cách đốt với cồn 70° và các que cấy kim loại được khử trùng bằng cách đốt trực tiếp trong ngọn lửa.

1.1. *Khử trùng môi trường bằng nồi hấp áp lực.*

Phương pháp khử trùng này còn được gọi là phương pháp nhiệt ẩm. Khi nhiệt độ tăng cao thì áp suất cũng tăng lên. Phương pháp này cho phép diệt cả tế bào sinh dưỡng lẫn bào tử của vi sinh vật.

Quá trình được tiến hành qua các bước:

- Kiểm tra và bổ sung nước trong nồi hấp vạch quy định.
- Xếp dụng cụ và vật liệu cần khử trùng vào giá đặt, không nên xếp quá chặt để hơi nước lưu thông dễ dàng.
- Đậy kín nắp nồi, nếu nồi có ốc vặn thì phải vặn theo từng cặp đối xứng nhau.
- Bật công tắc điện bắt đầu đun nồi hấp.
- Khi áp suất trong nồi lên đến áp suất cần hấp thì bắt đầu tính thời gian.

- Khi đủ thời gian khử trùng, tắt điện, chờ nhiệt độ và áp suất hạ xuống giá trị 0 mới mở nắp để tránh gây tai nạn hoặc tránh áp suất thay đổi đột ngột làm hỏng môi trường.

Các bình tam giác, chai lọ, ống nghiệm chứa môi trường trước khi được khử trùng bằng phương pháp nhiệt ẩm cần được đậy chặt nhưng bảo đảm cho phép không khí và hơi nước thông qua bằng cách dùng nút bông không thấm nước, nút silicon.

Thông thường, các hộp petri hoặc nút bông còn được bao gói bằng giấy hoặc giấy nhôm để tránh nguy cơ nhiễm sau khi khử trùng

Sau khi hấp, các hộp petri cần được sấy khô trước khi dùng.

1.2. Khử trùng dụng cụ thủy tinh bằng phương pháp nhiệt khô.

Các hộp petri, ống hút thủy tinh bên với nhiệt có thể được khử trùng bằng phương pháp sấy ở 170⁰C trong 2 giờ trong tủ sấy. Trong trường hợp này, các ống hút cần được nhét nút bông không thấm nước ở đầu hút. Hộp petri, ống hút, các dụng cụ cần khử trùng khác được gói kín bằng giấy hoặc bằng nhôm trước khi sấy.

2. Nội dung thực hành

Sinh viên thực tập làm nút bông, gói petri và hấp khử trùng trên các thiết bị sấy và nồi hấp áp lực.

3. Vật liệu

- Bình tam giác, ống nghiệm, hộp petri, ống hút
- Bông không thấm, giấy gói
- Tủ sấy, nồi hấp áp suất.

4. Thực hành

- Làm nút bông ống nghiệm, bình tam giác, đầu ống hút.
- Gói hộp petri
- Sấy và hấp khử trùng.

BÀI 4.

KỸ THUẬT TẠO KHUẨN LẠC ĐƠN.

1. Nguyên tắc

Vi sinh vật hiện diện trong tự nhiên là tập hợp của nhiều quần thể. Việc nghiên cứu một quần thể vi sinh vật nhất định trong quần xã sẽ phụ thuộc nhiều vào khả năng phân lập để tạo chủng thuần.

Hầu hết các phương pháp tạo chủng thuần đều dựa trên một số kỹ thuật pha loãng kết hợp với điều kiện nuôi cấy chọn lọc tạo ưu thế tăng trưởng cho chủng quan tâm. Có một số phương pháp pha loãng sau:

- Phương pháp hộp ria : là phương pháp pha loãng hữu hiệu và dễ thực hiện nhất. Hỗn hợp vi sinh vật được trải và ria trên bề mặt môi trường sao cho các tế bào riêng biệt tách nhau ra. Sau khi được ủ trong tủ ấp một khoảng thời gian nhất định (tùy theo chủng vi sinh vật mà chúng ta tiến hành phân lập), mỗi tế bào phát triển thành khuẩn lạc đơn.

- Phương pháp hộp trải : là phương pháp pha loãng bậc 10 dịch chứa vi sinh vật thành các mức pha loãng khác nhau sau đó trải đều trên môi trường nuôi cấy bằng que cấy (đũa tam giác)

Mức độ thuần khiết của chủng có thể được kiểm tra như sau:

- Việc tạo ra hộp ria từ khuẩn lạc đơn của chủng thuần chỉ tạo ra một loại khuẩn lạc duy nhất trên bề mặt môi trường có hình thái giống với khuẩn lạc của chủng ban đầu.
- Mỗi khuẩn lạc đơn chỉ chứa một loại tế bào có hình thái hiển vi giống nhau

Trong thao tác tạo khuẩn lạc đơn cần lưu ý hạn chế thấp nhất nguy cơ bị nhiễm

2. Nội dung thực hành

Sinh viên thực hành tạo khuẩn lạc đơn bằng hộp ria và hộp trải.

- Tạo hộp ria : Dùng que cấy vòng lấy mẫu vi sinh vật từ một khuẩn lạc đã xuất hiện đĩa petri sau đó ria trên bề mặt môi trường thạch theo các đường hình sinh hoặc zích zắc.

- Tạo hộp trải : lấy 0.1ml hoặc 1m dung dịch vi sinh vật từ dịch lỏng cho vào đĩa petri đã có sẵn môi trường nuôi cấy. Sau đó dùng đũa tam giác dàn đều giọt dịch trên bề mặt đĩa petri.

Ghi chú : Sau khi cấy xong nhớ lật úp đĩa petri lại sao cho bề mặt có môi trường nằm phía bên trên. Việc này giúp tránh được hiện tượng đọng hơi nước trên môi trường nuôi cấy có thể gây nhiễm. Ghi ngày tháng, ký hiệu mẫu và tên người cấy lên đĩa petri hoặc ống nghiệm

3. Vật liệu

- Que cấy vòng, đũa tam giác, hộp petri môi trường thạch
- Đèn cồn, cốc thủy tinh chứa cồn
- Pipetman và đầu tip 0.2ml vô trùng
- Ống giống E. coli

4. Thực hành

4.1. Kỹ thuật hộp ria

- Dùng que cấy thao tác vô trùng
- Ria các đường trên hộp petri. Sau mỗi đường ria, đốt khử trùng que cấy và làm nguội trước khi thực hiện đường ria tiếp theo.
- Gói hộp petri, ủ ở 37⁰C trong tủ ấm 2 ngày.

4.2. Kỹ thuật hộp trải

- Dùng pipetman và đầu tip vô trùng, thao tác vô trùng, chuyển 0.1ml dịch chứa hỗn hợp vi sinh vật lên bề mặt môi trường trong hộp petri.
- Dùng đũa tam giác đã khử trùng, trải đều vi sinh vật lên trên bề mặt môi trường.
- Gói hộp petri, ủ ở 37⁰C trong tủ ấm 2 ngày.

4.3. Kỹ thuật cấy vào ống thạch nghiêng

- Dùng que cấy vòng đã khử trùng, lấy một ít vi sinh vật từ một khuẩn lạc có trên đĩa petri, sau đó cấy theo đường hình sin từ dưới lên, đập nút bông lại và giữ trong tủ ấm. Trước và sau khi cấy cần phải khử trùng miệng ống nghiệm.

BÀI 5

PHƯƠNG PHÁP THU MẪU, BẢO QUẢN MẪU.

PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN GIỐNG VI SINH VẬT, QUAN SÁT VI SINH VẬT.

I. PHƯƠNG PHÁP THU MẪU

1. Lấy mẫu đất để phân tích

1.1. Nguyên tắc

Mọi dụng cụ lấy mẫu đều phải vô trùng, mẫu lấy về phải được bảo quản ngay trong điều kiện nhiệt độ 4°C ở tủ lạnh, và phải phân tích chậm nhất sau 1 tuần bảo quản. Trước khi phân tích phải đặt mẫu vào điều kiện thuận lợi về nhiệt độ để vi sinh vật có trong mẫu đất hoạt động trở lại bình thường (để mẫu ở $28 - 30^{\circ}\text{C}$ trong tủ ấm từ đêm hôm trước nếu như hôm sau phân tích). Tốt nhất là phân tích ngay trong phòng thí nghiệm sau khi lấy mẫu về.

1.2. Các phương pháp lấy mẫu đất.

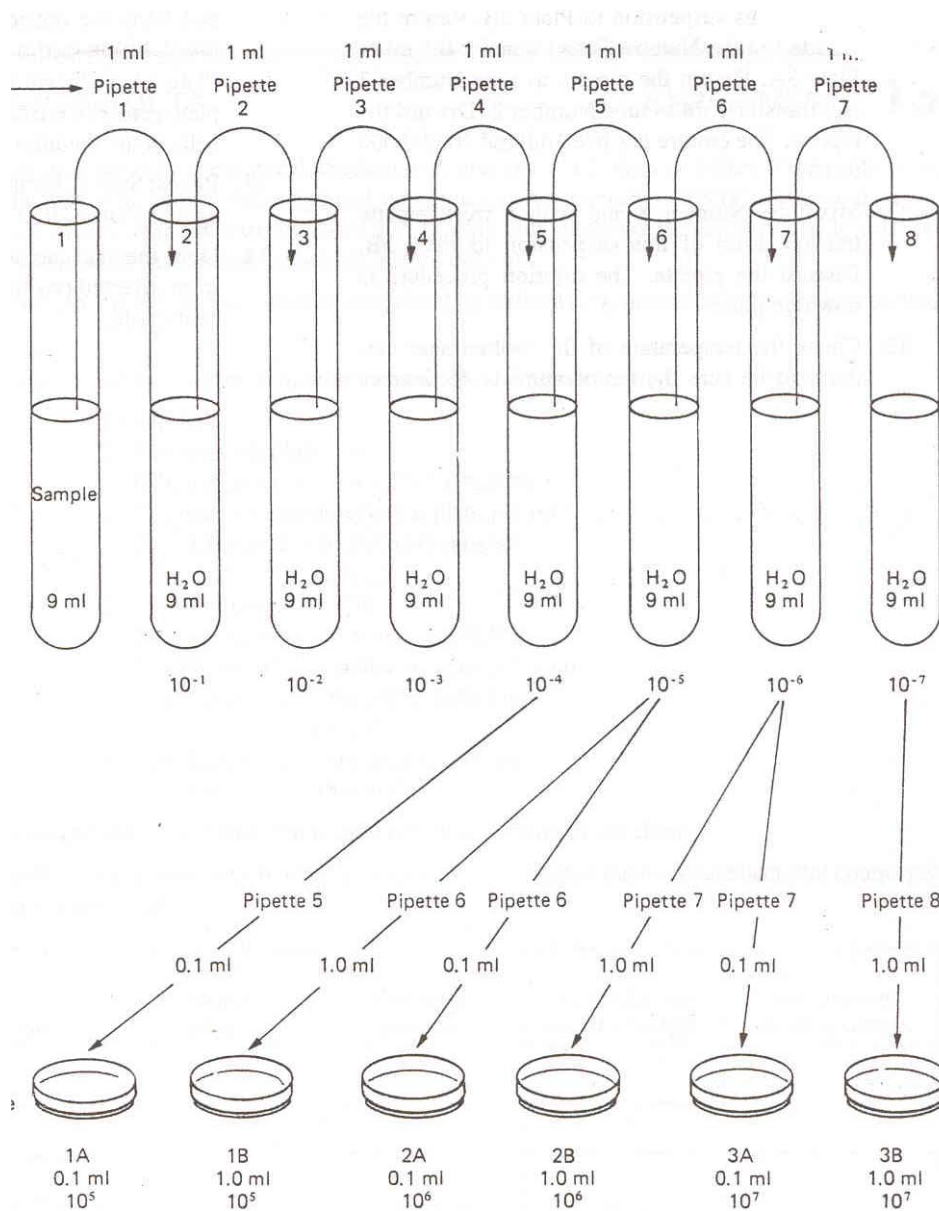
Nếu nghiên cứu vi sinh vật theo độ sâu của đất thì phải lấy theo độ sâu của phẫu diện đất, lấy theo tầng phát sinh. Trong tất cả mọi trường hợp phải loại bỏ lớp đất trên mặt (1-3cm) vì lớp đất này đã bị xâm chiếm bởi các vi sinh vật bên ngoài. Mẫu được lấy bằng dụng cụ vô trùng (hớ dụng cụ vào lửa hoặc lau bằng cồn trước khi lấy mẫu). Cũng có thể khử trùng bằng chính lớp đất ở tầng cần lấy mẫu, sau đó lấy mẫu đất ngay ở tầng đó.

Khi lấy mẫu trên diện rộng thì phải lấy nhiều mẫu theo đường chéo của khu đất, mỗi mẫu chừng 0.5-1kg, các mẫu được trộn đều với nhau sau đó lấy 0.5-1kg cho vào vật chứa vô trùng. Trên diện tích $100-200\text{m}^2$ cần lấy từ 8-10 mẫu, sau đó lấy trung bình. Phải ghi rõ địa điểm, ngày tháng, thời gian, đặc điểm nơi lấy mẫu.

1.3. Chuẩn bị mẫu để phân tích.

Mẫu phải được trộn đều, cân 10g đất cho vào bình tam giác hoặc ống đong chứa 90ml nước cất vô trùng (ta được dung dịch có độ pha loãng 10^{-1}), sau đó tiến hành pha loãng dịch huyền phù.

- Lấy 1 ml dung dịch 10^{-1} cho vào 9 ml nước cất ta được dung dịch 10^{-2}
- Lấy 1 ml dung dịch 10^{-2} cho vào 9 ml nước cất ta được dung dịch 10^{-3}
- Và cứ tiếp tục làm như vậy cho đến dung mức pha loãng cần thiết



1.4. Phương pháp đếm số lượng vi khuẩn.

- Có thể đếm trực tiếp trong buồng đếm dưới kính hiển vi.
- Hoặc đếm khuẩn lạc được tạo thành (CFU – Colony Forming Unit – đơn vị hình thành khuẩn lạc). Độ pha loãng được coi là tốt nhất để cấy trên môi trường đặc khi môi trường đặc phát hiện từ 30-300 khuẩn lạc. Nếu số lượng khuẩn lạc này nhỏ hơn 10 thì kết quả phải loại bỏ. Số lượng tế bào vi sinh vật có trong 1g đất khô (hoặc cơ chất) được tính theo công thức:

$$B = \frac{A \cdot DF}{W}$$

Trong đó :

B : Số lượng CFU/g đất khô (hay cơ chất)

A : Số lượng CFU trung bình ở độ pha loãng tốt nhất (30-300 CFU/hộp petri)

DF : Độ pha loãng

W : Trọng lượng khô của 1g đất (cơ chất) khi phân tích.

1.5. Phương pháp xác định số lượng vi sinh vật nuôi cấy trong môi trường lỏng.

Môi trường lỏng được phân vào các ống nghiệm, sau đó đem khử trùng. Cấy dịch ở các độ pha loãng khác nhau của mẫu nghiên cứu vào ống nghiệm, mỗi độ pha loãng lặp lại từ 3 – 5 lần và nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ thích hợp. Sau thời gian nuôi trong tủ ấm mang ra xác định số lượng vi sinh vật theo bảng MPN (Most probable numbers – Số lượng có khả năng nhất).

Các tra bảng : ghi cụ thể sự xuất hiện vi sinh vật ở mỗi độ pha loãng của mẫu. Ví dụ : mỗi độ pha loãng cấy lặp lại 5 lần, sau khi nuôi cấy xác định số ống có xuất hiện vi sinh vật.

Độ pha loãng	Số ống nghiệm phát hiện có vi sinh vật	Chỉ số
10^{-2}	5	
10^{-3}	5	1
10^{-4}	4	2
10^{-5}	2	3
10^{-6}	0	

Như vậy chỉ số xuất hiện là 5, 4, 2 ở độ pha loãng trung bình là 10^{-4} . Từ đó tra bảng có số 2,2. Các tra bảng : tìm chỉ số $N_1 = 5$, $N_2 = 4$, hai chỉ số này thẳng hàng ngang tìm $N_3 = 2$, chiếu thẳng góc chỉ số 2 ở N_3 với chỉ số 5, 4 ở bảng ngang ta được 2,2. Chỉ số này là chỉ số số lượng có khả năng nhất của vi sinh vật được nuôi cấy ở độ pha loãng trung bình của dịch nuôi cấy (10^{-4}). Vậy ở độ pha loãng 10^{-4} có số lượng vi sinh vật là 22.000 CFU/g đất (hoặc cơ chất) ($2,2 \times 10.000 = 22.000$). Nếu biết được độ ẩm của mẫu thì có thể tính được số lượng của vi sinh vật có trong 1g đất khô hoặc cơ chất.

**Bảng xác định số lượng có khả năng nhất
(Table of Most Probable Numbers – MPN)**

Số chỉ số		N ₃					
N ₁	N ₂	0	1	2	3	4	5
0	0	-	0.018	0.036	0.054	0.072	0.090
0	1	0.018	0.036	0.055	0.073	0.091	0.11
0	2	0.037	0.055	0.074	0.092	0.11	0.13
0	3	0.056	0.074	0.093	0.11	0.13	0.15
0	4	0.075	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17
0	5	0.094	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19
1	0	0.020	0.040	0.060	0.080	0.10	0.12
1	1	0.040	0.061	0.081	0.10	0.12	0.14
1	2	0.061	0.082	0.10	0.12	0.15	0.17
1	3	0.083	0.10	0.13	0.15	0.17	0.19
1	4	0.11	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22
1	5	0.13	0.15	0.17	0.19	0.22	0.24
2	0	0.045	0.068	0.091	0.12	0.14	0.16
2	1	0.068	0.091	0.12	0.14	0.17	0.19
2	2	0.093	0.12	0.14	0.17	0.19	0.22
2	3	0.12	0.14	0.17	0.20	0.22	0.25
2	4	0.15	0.17	0.20	0.22	0.25	0.28
2	5	0.17	0.20	0.23	0.26	0.29	0.32
3	0	0.078	0.11	0.13	0.16	0.20	0.23
3	1	0.11	0.14	0.17	0.20	0.23	0.27
3	2	0.14	0.17	0.20	0.24	0.27	0.31
3	3	0.17	0.21	0.24	0.28	0.31	0.35
3	4	0.21	0.24	0.28	0.32	0.36	0.40
3	5	0.25	0.29	0.32	0.37	0.41	0.45
4	0	0.13	0.17	0.21	0.25	0.30	0.36
4	1	0.17	0.21	0.26	0.31	0.36	0.42
4	2	0.22	0.26	0.32	0.38	0.44	0.50
4	3	0.27	0.33	0.39	0.45	0.52	0.59
4	4	0.34	0.40	0.47	0.54	0.62	0.69
4	5	0.41	0.48	0.56	0.64	0.72	0.81
5	0	0.23	0.31	0.43	0.58	0.76	0.95
5	1	0.33	0.46	0.64	0.84	1.1	1.3
5	2	0.49	0.70	0.95	1.2	1.5	1.8
5	3	0.79	1.1	1.4	1.8	2.1	2.5
5	4	1.3	1.7	2.2	2.8	3.5	4.3
5	5	2.4	3.5	5.4	9.2	16	-

II. BẢO QUẢN GIỐNG VI SINH VẬT

1. Nguyên tắc.

Sau khi đã tạo được chủng thuần, chủng cần được bảo quản bằng các phương pháp thích hợp cho những nghiên cứu tiếp theo. Phương pháp bảo quản cần đảm bảo được sức

sống và ngăn ngừa những thay đổi về di truyền, sinh lý của giống. Có một số phương pháp bảo quản giống như : cấy chuyền, giữ lạnh hoặc lạnh sâu và làm khô.

Cấy chuyền là phương pháp giữ giống đơn giản nhất. Vi sinh vật được cấy chuyền và giữ trong ống thạch nghiêng. Vi sinh vật kỵ khí thì cấy sâu vào trong thạch tạo điều kiện không có oxy.

Nhược điểm của phương pháp cấy chuyền là có nguy cơ làm thay đổi di truyền và sinh lý cao, đồng thời làm mất thời gian, đặc biệt là khi cần bảo quản với số lượng lớn. Phương pháp này chỉ dùng để giữ giống trong thời gian ngắn, phải cấy chuyền cách vài tuần. Nếu giữ ở nhiệt độ thấp hơn có thể bảo quản lâu hơn kéo dài 3-5 tháng.

Nếu dùng tủ lạnh sâu hoặc nitrogen lỏng nhưng phải làm lạnh nhanh để tránh sự hình thành tinh thể nước trong tế bào làm chết tế bào. Ngoài ra, người ta còn sử dụng glycerol để bảo vệ tế bào khi bảo quản lạnh sâu.

2. Nội dung thực hành

Sinh viên thực hành bảo quản giống bằng phương pháp cấy chuyền và bảo quản vi sinh vật trong tủ lạnh sâu.

3. Vật liệu

- Que cấy vòng, đèn cồn
- Ống thạch nghiêng nước pepton

4. Thực hành.

Tiến hành cấy chuyền vi sinh vật từ môi trường rắn sang lỏng, rắn sang rắn, lỏng sang rắn.

III. PHƯƠNG PHÁP QUAN SÁT VI SINH VẬT

1. Nguyên tắc

Tùy theo kích thước, vi sinh vật có thể được quan sát bằng mắt thường, hoặc cần đến những thiết bị đặc biệt như kính lúp, kính hiển vi...

Kính hiển vi là công cụ quan trọng trong nghiên cứu hình thái và nhận diện vi sinh vật. Kính hiển vi được thiết kế nhằm đáp ứng những yêu cầu cho phép phóng đại và quan sát rõ, thật các đối tượng vi sinh vật. Một số kính hiển vi thường gặp

- Kính hiển vi soi nổi : là dạng kính lúp có độ phóng đại từ 10-60 lần để quan sát những đối tượng có kích thước lớn hoặc quan sát khuẩn lạc trên môi trường thạch. Nguồn sáng được chiếu từ trên xuống (một vài trường hợp chiếu từ dưới lên) và phản xạ vào kính, nhờ thế ta có thể quan sát vật thể ở trạng thái không gian 3 chiều.
- Kính hiển vi quang học : độ phóng đại có thể lên đến 2000 lần, dùng để quan sát vi sinh vật có kích thước nhỏ. Ánh sáng chủ yếu được chiếu từ dưới lên.
- Kính hiển vi đối pha : để quan sát vi sinh vật sống không nhuộm màu.
- Kính hiển vi huỳnh quang : kính được trang bị bộ nguồn các ánh sáng kích thích có độ dài sóng khác nhau để kích thích tạo huỳnh quang. Phần lớn các sinh vật không có khả năng phát huỳnh quang hoặc có rất yếu. Vì thế, người ta thường nhuộm tế bào bằng các phẩm nhuộm huỳnh quang khác nhau để quan sát. Lợi điểm của kính này là có thể quan sát, theo dõi sự chuyên biệt các bào quan hoặc phân tử đang quan tâm trong khi tế bào vẫn sống, tăng trưởng.

2. Nội dung thực hành

Sinh viên thực hành các phương pháp sử dụng kính hiển vi để quan sát : vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc...ở trạng thái sống và trạng thái nhuộm màu.

Nhuộm màu để quan sát

- Nhuộm bằng thuốc nhuộm xang methylen hay fucshin 1%.
- Nhuộm bằng thuốc nhuộm lactofucshin (100ml acid lactic : 0.05 gram fucshin).

Nhuộm màu Gram

1. Cố định mẫu bằng ngọn lửa đèn cồn
2. Nhuộm màu bằng dung dịch tím tinh thể (crystal violet) trong 1 phút, sau đó rửa bằng nước cất.
3. Nhuộm màu bằng dung dịch iod (dung dịch lugol) trong 1 phút, sau đó rửa bằng nước cất.
4. Rửa cồn 95⁰ cho đến mất màu, sau đó rửa bằng nước cất.
5. Nhuộm màu bằng thuốc nhuộm đỏ (safranin hay fuchsin Ziehl) trong 30-60 giây, sau đó rửa bằng nước cất và quan sát.

3. Vật liệu

- Thuốc nhuộm Gram
- Phẩm nhuộm xanh methylen hay fuchsin (1%)
- Lame, lamelle, pipette, giấy lọc, giấy thấm, que cấy
- Đèn cồn
- Kính hiển vi quang học, soi nổi
- Nấm : nấm men; vi khuẩn, xạ khuẩn

4. Thực hành

4.4. Quan sát nấm men, vi khuẩn bằng kính hiển vi

- a. Cách sử dụng kính hiển vi quang học : Bật nguồn sáng và chỉnh nguồn sáng để có được ánh sáng xuyên qua mẫu vật. Lúc đầu để vật kính 10 rồi điều chỉnh núm sơ cấp và vi cấp để thấy được hình tượng của mẫu vật sau đó chuyển qua vật kính 40 để quan sát rõ hơn. Chú ý khi đã chỉnh qua vật kính 40 thì chỉ dùng vi cấp để điều chỉnh kính.
- b. Quan sát trạng thái sống : cho 1 giọt nước và laê kính lõm, sau đó cho mẫu vi sinh vật vào giọt nước rồi dùng lamelle để đậy trên bề mặt lame lõm, đặt vào kính hiển vi để quan sát.
- c. Quan sát trạng thái nhúng chìm : Ở trạng thái này chúng ta có thể cho một giọt thuốc nhuộm xanh methylen hay fucshin lên trên bề mặt lame, sau đó cho mẫu vi sinh vật vào trải đều trên giọt thuốc nhuộm bằng que cấy vòng, đặt lamelle lên bề mặt lame đã có vi sinh vật được nhuộm màu, dùng giấy thấm hút thuốc nhuộm ra, đặt lên kính để quan sát.

4.5. Quan sát nấm mốc và xạ khuẩn

- a. Cách sử dụng kính hiển vi soi nổi
- b. Quan sát thô
- c. Quan sát một số tiêu bản nấm mốc thường gặp

PHẦN 2 : VI SINH MÔI TRƯỜNG
PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH LƯỢNG VI SINH VẬT

Bài 6

XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG VI KHUẨN (Bacteria)

- Lấy mẫu và chuẩn bị phân tích như ở phần I. Mẫu chưa phân tích được ngay nhất thiết phải bảo quản ở 4⁰C và phải phân tích chậm nhất sau 1 tuần bảo quản .
- *Môi trường nuôi cấy : Asparagin- manitol- agar . (g.l⁻¹)*

K ₂ HPO ₄	1.0
KNO ₃	0.5
MgSO ₄ .6H ₂ O	0.2
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.1
NaCl	0.1
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.005 (vết)
Asparagin	0.5
Manitol	1.0
Agar	10.0
Nước cất	1 lít
pH	7.4

Nuôi cấy ở nhiệt độ 28⁰ C, trong thời gian 7 ngày, chỉ tính kết quả ở các hộp petri có số lượng khuẩn lạc 30- 300/hộp .Tính kết quả theo công thức tính ở phần 1

I. Xác định số lượng của xạ khuẩn (Actinomycetes)

Các bước chuẩn bị mẫu đất để phân tích như phần I

Môi trường nuôi cấy 1: Glycerol – Agar

Thành phần môi trường (g.l⁻¹)

Glycerol	10.0
Asparaginat natri	1.0
K ₂ HPO ₄	1.0
Agar	15.0
Nước cất	1 lít
pH	7.4

Môi trường 2: Môi trường Gause 1

Thành phần môi trường (g .l⁻¹)

KNO ₃	1.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0.5
NaCl	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01
Agar	15.0
Tinh Bột	20.0
Nước cất	1lít
pH	7.4

Môi trường 3 : Glucose – asparagin

Thành phần môi trường (g .l⁻¹)

Glucose	10.0
Aparagin	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5
Agar	15.0
Tinh bột	20.0
Nước cất	1lít
pH	6.8

Môi trường 4: môi trường tinh bột tan

Thành phần môi trường (g.l⁻¹) :

Tinh bột	10.0
NaNO ₃	1.0
K ₂ HPO ₄	0.3
NaCl	0.5
MgCO ₃	1.0
Agar	15.0
Nước cất	1lít

Nuôi trong tủ ấm nhiệt độ 27⁰ C, sau 7- 10 ngày xác định, khuẩn lạc của xạ khuẩn nhỏ và bám chặt vào môi trường nuôi cấy, vì vậy khi đếm phải dùng que cấy gạt nhẹ trên bề mặt môi trường mới phát hiện được .

Tính toán số lượng xạ khuẩn theo công thức tính ở phần I.

II. Xác định số lượng của vi nấm ở trong đất (Fungi)

Phương pháp lấy mẫu và chuẩn bị mẫu đất để phân tích như phần chuẩn bị cho phân tích vi khuẩn và xạ khuẩn

***Môi trường 1: pepton – glucose - agar + rose bengal và streptomycin (g .l⁻¹)**

KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
Pepton	5.0
Glucose	10.0
Agar	20.0
Rose bengal	1ml ở độ pha loãng .1: 300 cho 100ml môi trường
Streptomycin	30 microgam/ml môi trường
Nước cất	1 lít

Pha rose bengal và streptomycin đều pha loãng trong nước cất, pha 1g rose-bengal trong 300ml nước cất. Sử dụng 1ml dung dịch này (1:300) cho 100ml môi trường.

Chuẩn bị dung dịch streptomycin : lấy 0,3 g streptomycin cho vào bình định mức 100ml và lên thể tích bằng nước cất, khử trùng dung dịch, cất bảo quản trong tủ lạnh khi sử dụng lấy 1ml cho vào 100ml môi trường. Như vậy ta được 30 microgam streptomycin/ml môi trường .

Môi trường 2 : môi trường Czapek (g.l⁻¹) :

NaNO ₃	3.0
K ₂ HPO ₄	1.0
KCl	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
Sacarose	30.0
FeSO ₄	0.01
Agar	20.0
Nước cất	1lít

Sau khi khử trùng, môi trường được làm chua bằng cách cho 1.8 ml acid lactic. Sau 2- 3 ngày đếm sơ bộ khuẩn lạc và vi nấm

Sau 5- 7 ngày thì phân biệt được rõ đến giống : penicillium, Aspergillus, Fusarium, Alterharia...

Môi trường 3: pepton – glucose – agar (g.l⁻¹)

Glucose	10.0
Pepton	5.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
Agar	20.0
Nước cất	1lít

Khi sử dụng xong nhiệt độ môi trường ổ định ở 48⁰C thì nên thêm 1ml H₂SO₄ 0,5N/100ml môi trường và sử dụng ngay.

Môi trường 4 : khoai tây – glucose - agar (g.l⁻¹)

200g khoai tây và 500ml nước cất cho vào bình tam giác khử trùng 1h lọc qua vải màn lấy nước và thêm 20g glucose + 15g agar bổ xung nước cất cho đủ 1 lít, khử trùng và sử dụng

Để ức chế sự phát triển của vi khuẩn ngoài việc sử dụng rose bengal và streptomycin còn có thể sử dụng các chất khác như NaCNS (0,25- 0,4 g/lít) oxytetracylin , clotetracylin (2- 5mg/lít), neomycin, polymycin,...(50mg/lít)

Sau thời gian nuôi cấy trong tủ ẩm ,chọn những hộp petricó nấm phát triển từ 10-100 CFU /hộp petri để xác định.

Tính toán kết quả số lượng nấm/g đất khô cũng tương tự như đối với vi khuẩn và xạ khuẩn

III. Xác định vi sinh vật tổng số trên môi trường TPA : nước chiết thịt (T) pepton (P) – agar (A-thạch)

Đây là môi trường giàu chất dinh dưỡng cho phép phát triển nhiều loại vi sinh vật dị dưỡng, có nhiều nhóm sinh lý và nhóm phân loại khác nhau của vi sinh vật phát triển trên môi trường này. Các vi khuẩn gram âm không sinh nội bào tử thuộc các giống Pseudomonas và Achromobacter, các trực khuẩn gram dương sinh bào tử thuộc loại giống Bacillus, cầu khuẩn thuộc các giống Micrococcus và Sarcina, các loại vi khuẩn phân nhánh (giống Mycobacterium) một số xạ khuẩn bậc cao (giống Actinomyces, streptomyces) và các nấm khuẩn ty như :Aspergillus, Penicillium, Trichoderma, Alternaria .

Thành phần môi trường TPA (g.l⁻¹)

Cao thịt	3.0
Pepton	10.0
NaCl	5.0
Agar	20.0
pH	7.4 – 7.6 điều chỉnh bằng NaOH 10%

Các bước tiến hành chuẩn bị nuôi cấy như đã trình bày ở phần I. Nhiệt độ nuôi cấy 27- 30⁰C, đếm các kết quả vào ngày thứ 3 và thứ 4.

Sau khi xác định tổng số vi sinh vật, tiến hành xác định số lượng riêng biệt của các nhóm vi sinh vật hình thành bào tử và không hình thành bào tử.

PHÂN THỰC HÀNH.

Sinh viên tiến hành phân lập nuôi cấy vi khuẩn trên 2 môi trường sau:

1. Môi trường Gause (dùng để nuôi cấy xạ khuẩn)
2. Môi trường Czapek (dùng để nuôi cấy vi nấm)

Viết báo cáo các kết quả đạt được.

Bài 7

NHÓM VI KHUẨN AMON HOÁ VÀ VI KHUẨN SỬ DỤNG NITƠ KHOÁNG

I. Xác định số lượng nhóm vi khuẩn amon hóa hình thành bào tử (Bacillus)

Dịch nuôi cấy sau khi đã pha loãng ở các độ pha loãng, khác nhau cần phải diệt các vi khuẩn không định hình thành bào tử bằng cách đặt các ống thí nghiệm có chứa dung dịch pha loãng vào nước nóng ở 80⁰C trong thời gian 10 phút, sau thời gian khử trùng thì dịch nuôi cấy chỉ còn lại vi sinh vật hình thành bào tử.

Môi trường 1: TPA + MN (nước chiết thịt – pepton – agar + nước mạch nha)

Thành phần môi trường (g.l⁻¹)

Cao thịt	3.0
Cao mạch nha	3.0
Pepton	5.0
NaCl	2.5
Agar	20.0
pH	7 – 7.2

Cao thịt và cao mạch nha theo tỉ lệ 1:1

Nhiệt độ nuôi cấy : 27 – 30⁰C, xác định sau 48 giờ, đếm khuẩn lạc sơ bộ, sau đó để ra ngoài tủ ấm trong điều kiện nhiệt độ trong phòng để các nhóm vi sinh vật tự phân ly đến loài.

- B. mycodes : khuẩn lạc nhẵn , phát triển lan bò trên khắp bề mặt của môi trường
- B. cereus : khuẩn lạc nhẵn, phân chia hình sóng ở mép ngoài của khuẩn lạc .
- B. magatherium : khuẩn lạc nhẵn, nhày
- B. agglomeratus : khuẩn lạc nhỏ, màu trắng hay xám trắng, đôi khi có màu xanh xám ở xung quanh khuẩn lạc.
- B. idosus : khuẩn lạc có màu vàng xám, khô tạo thành màng trên môi trường nuôi cấy.
- B. mentericus, B. subtilis : khuẩn lạc nhẵn nheo, khô màu xám sáng hay màu vàng cafe

Môi trường 2 : Vi khuẩn hình thành bào tử hóa khí (g.l⁻¹) :

Agar	20.0
Pepton	1.0
Nước cất	1 lít
pH	6.8 – 7.0 dùng NaOH 10% để điều chỉnh

Dịch nuôi cấy phải diệt vi sinh vật không hình thành bào tử. Nuôi trong tủ ấm ở nhiệt độ 30⁰ C . Sau 4 ngày xác định.

II. Xác định nhóm vi khuẩn sử dụng nitơ khoáng

Môi trường TAA (tinh bột - amon - agar (thạch)

Thành phần môi trường (g.l⁻¹)

Tinh bột	10.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ .H ₂ O	1.0
NaCl	1.0
CaCO ₃	3.0
Nước cất	1lít
pH	7.0

Phân thực hành

Sinh viên tiến hành việc phân lập và nuôi cấy vi khuẩn trên 2 môi trường sau:

1. Môi trường TPA + MN (dùng để xác định nhóm vi khuẩn amon hóa hình thành bào tử
2. Môi trường TAA (dùng để xác định nhóm vi khuẩn sử dụng nitơ khoáng)

Viết báo cáo các kết quả đạt được.

Bài 8

VI SINH VẬT PHÂN GIẢI CELLULOSE

VÀ VI SINH VẬT PHÂN GIẢI HỢP CHẤT PHOSPHORE

I. Xác định vi sinh vật phân giải cellulose

- Lấy mẫu và chuẩn bị phân tích như ở phần I
- Thiết bị và dụng cụ : thông thường như chuẩn bị để phân tích các nhóm sinh vật khác trong phòng thí nghiệm
- Cần phải chuẩn bị : giấy lọc có đường kính tương đương với đường kính của hộp petri

Môi trường : môi trường Hutchinson

Thành phần môi trường (g.l⁻¹)

KNO ₃	2.5
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄	0.3
CaCl ₂	0.1
NaCl	0.1
FeCL ₃	0.01
Agar	15.0
Nước cất	1lít
PH	7.2 –7.3 Dùng NaCO ₃ 20% để điều chỉnh pH

Khử trùng trong nồi hấp với áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút. Để môi trường vấp hộp lồng đã chuẩn bị trong khi môi trường còn ở dạng lỏng (45⁰C) trong điều kiện vô trùng, việc cấy ghép dịch huyền phù ở mỗi độ pha loãng thích hợp vào hộp petri, được tiến hành như ở phần I, sau khi đã cấy dịch huyền phù vào hộp petri, ta dùng kẹp sắt vô trùng gấp một giấy lọc tròn (tương đương với độ rộng của hộp petri) đã vô trùng đặt lên bề mặt thạch của hộp và dùng que cấy vi sinh vật đều trên giấy lọc sao cho giấy lọc phải ép sát vào bề mặt thạch của hộp là được. Đặt vào trong tủ ẩm, nuôi cấy ở nhiệt độ 28 – 30⁰ C sau 10 - 14 ngày đêm xác định kết quả.

Đánh giá kết quả : vi sinh vật phân giải cellulose được tính là các khuẩn lạc mọc trên khoang giấy lọc, và số lượng vi sinh vật (B) trong 1g đất khô (cơ chất) được tính theo công thức

$$B = \frac{A \cdot DF}{W}$$

Trong đó : A : Số lượng khuẩn lạc trung bình /hộp petri

DF : Độ pha loãng

W : Trọng lượng khô của 1g mẫu đất (cơ chất) khi phân tích

Công thức tính độ ẩm của đất

$$A\% = \frac{m_1 - m_2}{m_2} \times 100$$

m_1 : khối lượng đất trước khi sấy

m_2 : khối lượng đất sau khi sấy

Công thức tính số lượng tế bào vi sinh vật có trong 1 gam đất khô tuyệt đối

$$Y = \frac{X \cdot 100}{100 - D}$$

Y : số lượng tế bào vi sinh vật có trong 1 gam đất khô tuyệt đối

X : Số lượng tế bào vi sinh vật có trong 1 gam đất ban đầu

D : Độ ẩm của đất (%)

Chú ý

Số lượng khuẩn lạc trung bình được tính là trung bình cộng số khuẩn lạc của các hộp được cấy từ cùng độ pha loãng, trong đó chỉ tính các hộp lồng chứa từ 15 – 300 khuẩn lạc.

- Số lượng khuẩn lạc trung bình cũng có thể được tính từ trung bình cộng số khuẩn lạc của các hộp được cấy từ độ pha loãng kế tiếp nhau bằng cách tính số khuẩn lạc trung bình của mỗi độ pha loãng trong đó số khuẩn lạc ở độ pha loãng cao hơn được nhân với 10, sau đó lấy trung bình cộng của 2 hai giá trị nêu trên nếu tỉ số giữa giá trị lớn và giá trị nhỏ không lớn hơn 2. Nếu tỉ số này lớn hơn hai thì lấy giá trị nhỏ làm kết quả.
- Số lượng vi sinh vật /g đất (ml dịch) được biểu thị bằng một số giữa 1.00 và 9.99 nhân với 10ⁿ , n là số mũ thích hợp của 10.

II. Xác định số lượng nhóm vi sinh vật phân giải hợp chất phosphore khó tan

- Việc kiểm tra đánh giá sự có mặt của nhóm vi sinh vật phân giải các hợp chất lân khó hoà tan trong đất, được tiến hành các thủ tục lấy mẫu và chuẩn bị mẫu để phân tích như ở phần I.
- Môi trường sử dụng để xác định số lượng vi sinh vật phân giải các hợp chất phosphore khó tan :

Môi trường pikovskaia

Thành phần môi trường (g.l⁻¹)

Glucose	10.0
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
NaCl	0.2
MgSO ₄	0.1
KCl	0.2
Cao nấu men	0.5
MnSO ₄	Vết
FeSO ₄ .7H ₂ O	Vết
Agar	20g
Nước cất	1 lít
pH	7.0

Khử trùng môi trường ở 1atm (121⁰C) trong 30 phút. Kiểm tra độ vô trùng của môi trường sau 2 ngày để trong tủ ấm, nhiệt độ 28⁰ - 30⁰C, thủ tục cấy tiến hành như phần I.

Tính kết quả :

Chỉ đếm các vi sinh vật có vòng phân giải bao quanh khuẩn lạc, còn các vi khuẩn không có vòng bao quanh khuẩn lạc là vi sinh vật tạp, loại bỏ .

Chỉ tính kết quả các ở hộp petri có chứa 20 – 300 khuẩn lạc. Số vi sinh vật /g (ml) đất hay cơ chất được tính theo công thức như phần I.

PHÂN THỰC HÀNH

Sinh viên tiến hành phân lập, nuôi cấy và tính toán số lượng vi sinh vật trên 2 môi trường sau:

1. Môi trường Hutchinson (dùng để xác định vi sinh vật phân giải cellulose)
2. Môi trường pikovskaia (dùng để xác định nhóm vi sinh vật phân giải hợp chất phosphore khó tan)

Viết báo cáo các kết quả đạt được

Bài 9

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH MỘT SỐ NHÓM VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ SỐNG TỰ DO TRONG ĐẤT

I. Azotobacter

Là vi sinh vật cố định nitơ tự do trong điều kiện hiếu khí ở trong đất, thường gặp nhất là: *A. chroococum*, *A. agile*, *A. vinelandii*. Sau đây là một số môi trường để xác định số lượng và phân lập *Azotobacter*.

Môi trường 1 : môi trường ($g.l^{-1}$)

Matitol (Glucose)	20.0
K_2HPO_4	0.2
$MgSO_4.7H_2O$	0.2
NaCl	0.2
$CaSO_4$	0.1
$CaCO_3$	5.0
Agar	20.0
Nước cất	1 lít
pH	6.5 – 7.0

Môi trường 2 ($g.l^{-1}$)

Matitol (Glucose)	10.0
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	0.2
NaCl	0.1
Cao nấm men	1.0
Agar	20.0
Nước cất	1 lít
pH	6.8
Công gô đỏ 1%	2.5 ml

Môi trường 3 : Môi trường Beijerinck ($g.l^{-1}$):

Matitol (Glucose)	20.0
K_2HPO_4	0.2
$CaCO_3$	5.0
Agar	15.0

Môi trường 4 : môi trường vinogradski (g.l⁻¹)

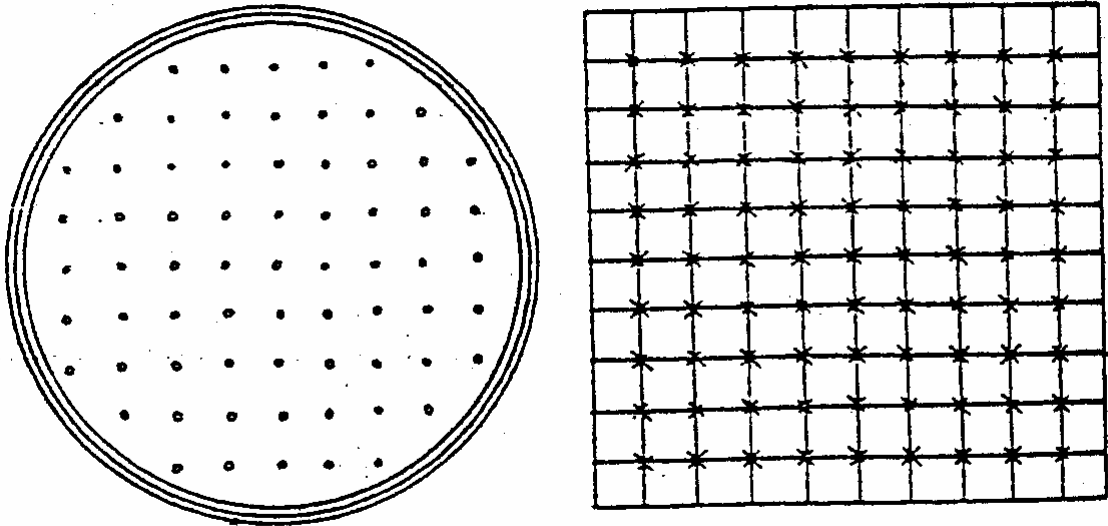
Nước cất	1 lít
Manitol (sacaroza)	20.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3
NaCl	0.3
MnSO ₄	Vết
(NH ₄) ₂ MoO ₄	Vết
FeSO ₄ .7H ₂ O	Vết
CaCO ₃	3.0
Agar	20.0

Môi trường 5: Môi trường Burk (g.l⁻¹)

Nước cất	1lít
Sacarose	20.0
K ₂ HPO ₄	0.64
KH ₂ PO ₄	0.16
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NaCl	0.2
Na ₂ MoO ₄	Vết
CaSO ₄ .2H ₂ O	0.05
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.03
Agar	20.0

Khử trùng môi trường ở điều kiện 1 at (121⁰C) trong 30 phút, phân chia môi trường vào các hộp petri đã khử trùng. Kiểm tra độ sạch của môi trường sau 2 ngày để trong tủ ấm ở nhiệt độ 28⁰- 30⁰C. Chỉ sử dụng các hộp petri chứa môi trường không phát hiện thấy tạp nhiễm. Mọi thao tác chuẩn bị mẫu phân tích được tiến hành theo phần I.

Một phương pháp khác để xác định sự có mặt của Azotobacter trong đất, đó là phương pháp cấy nếm đất trên bề mặt môi trường (xem hình dưới)



Sơ đồ để cấy các nóm đất trên môi trường thạch

Nguyên tắc của phương pháp : đếm sự xuất hiện của Azotobacter ở các nóm đất được cấy trên môi trường thạch cứng, từ đó đánh giá tỉ lệ % xuất hiện, kết luận được mức độ giàu, nghèo Azotobacter có trong đất nghiên cứu.

Bước tiến hành : Cân 1g đất nghiên cứu cho vào đĩa kính khuấy nhào thành chất sền sệt. Dùng que cấy 50 nóm đất trên môi trường thạch cứng trong hộp petri ở các vị trí đều nhau của hộp petri, nuôi trong tủ ấm 28- 30⁰C . Sau 7 ngày xác định % nóm đất có khuẩn lạc Azotobacter phát triển (tạo thành nóm nhầy và màu nâu).

II. Xác định Clostridium Pasteurianum.

Là vi khuẩn cố định nitơ tự do sống trong điều kiện yếm khí, phân bố rộng trong đất.

Môi trường kiểm tra : môi trường dịch thể Vinogradski (g.l⁻¹)

Glucose	10,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
NaCl	0,5
FeSO ₄	Vệt
MnSO ₄	Vệt
Nước cất	1 lít

Cho vào một ống nghiệm một lượng nhỏ CaCO₃, sau cho vào môi trường và khử trùng, sau khi khử trùng cấy dịch thể nghiên cứu vào .Nuôi trong tủ ấm 28- 30⁰C, sau 4-7 ngày xác định. Trong trường hợp phát hiện thấy C. pasteurianum thì ống nghiệm có bọt vẩn.

Tính kết quả theo bảng MPN (Most Probable Numbers)

III. Phương pháp lấy mẫu phân tích vi sinh vật vùng rễ.

Vi sinh vật phát triển xung quanh hệ thống rễ cây trồng được gọi là vi sinh vật vùng rễ và được phân chia làm 3 vùng phát triển :

1. Vùng ngay rễ: Vi sinh vật phát triển trực tiếp ngay trên bề mặt rễ và trong rễ của cây trồng.
2. Vùng cạnh rễ : vi sinh vật ở vùng này phát triển ở trong đất, trực tiếp cạnh rễ (đất bám trên rễ).
3. Vùng xung quanh rễ : vi sinh vật phát triển trong đất ở xung quanh rễ của cây trồng, cách rễ 1cm.

Do quy định như vậy mà việc lấy mẫu phân tích phải hết sức cẩn thận

Cách lấy mẫu được tiến hành như sau : dùng tay xắn vào đất (nếu là đất lúa, cũng có thể dùng xẻng, dao ...) xung quanh cây trồng theo cỡ 15 x15 hoặc 20x20 x15 –20 cm, lấy cả đất và cây lên. Dùng nylon gói phần đất và rễ cây mang về phòng thí nghiệm xử lý (thường phải xử lý ngay trong ngày lấy mẫu)

Cho khối đất có rễ cây ngâm một vài giờ vào bình đựng nước sau đó nhấc nhẹ nhàng cây ra khỏi đất, và rửa bằng nước sạch một vài lần. Sau đó nhặt các rễ chết vứt đi và chuyển cây sang bình sạch và rộng hơn, rửa bằng nước vô trùng, sau đó dùng kéo, dao đã vô trùng cắt nhỏ thành từng đoạn để trên giấy lọc. Từ những đoạn rễ này cân 1g cho vào đĩa thủy tinh và chuyển sang nghiền ở cối sứ đã vô trùng, và chuyển dịch vào bình có chứa 100ml nước cất vô trùng, lắc 6 phút, sau đó lắng khoảng 1 phút và chuẩn bị dịch pha loãng (1:100;1:1000..) để xác định vi sinh vật ở rễ.

Để xác định vi sinh vật ở đất cạnh rễ ta làm như sau : Khi đã để cây và đất vào bình một vài giờ, ta lấy cây ra và kéo theo đất bám ở phần rễ, đặt vào một bình khác có nước vô trùng , lắc nhẹ trong thời gian 6 phút, sau đó nhận được dịch đất và để lắng, lấy cặn phân tích vi sinh vật và độ ẩm, hoặc nhẹ nhàng dùng dụng cụ đã vô trùng gạt lấy đất bám vào rễ cũng được.

Xác định vi sinh vật ở vùng đất xung quanh rễ, chỉ việc lấy đất ở vùng xa rễ, không tiếp giáp với rễ, các bước tiến hành chuẩn bị mẫu để phân tích như ở phần I.

Nuôi cấy vi sinh vật vùng rễ thường được tiến hành trên môi trường sau : TPA, TAA.

Trên môi trường TPA thường xác định được nhóm vi khuẩn huỳnh quang và mang sắc tố (vàng, khuẩn lạc màu đỏ sáng), trên môi trường TAA thường phát hiện thấy vi khuẩn mang sắc tố màu vàng và xạ khuẩn.

Phần thực hành

Sinh viên tiến hành phân lập và nuôi cấy vi khuẩn trên 2 môi trường sau:

1. Môi trường Ashby (dùng để xác định nhóm vi sinh vật cố định nitơ sống tự do trong đất).
2. Môi trường dịch thể Vinogradski (dùng để xác định Clostridium pasteurianum sống trong đất ở điều kiện yếm khí)

Viết báo cáo các kết quả đạt được

Bài 10.

PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP *ESCHERICHIA COLI* (*E. coli*)

E. coli là dạng coliform có nguồn gốc từ phân phát triển được ở $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, sinh indol, sinh nhiều acid, không sinh aceoin và không dùng citrate làm nguồn carbon duy nhất.

Nguyên tắc: *E. coli* được phát hiện do khả năng lên men lactose sinh hơi ở $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ và có kết quả nghiệm pháp IMVIC phù hợp.

1. Vật liệu

- Pipette khắc vạch 10 ml – 1 ml vô trùng
- Que cấy, đèn cồn
- Nước muối sinh lý 8.5% đóng ống 9 ml vô trùng
- Canh thang Lactose loãng đóng ống có ống sinh hơi
- Canh thang BGBL (Brilliant Green Bile Lactose 2%)
- Thạch EMB Agar

2. Môi trường nuôi cấy

+ *Canh thang lactose broth (g.l)*

Nước chiết thịt	3g
Bacto pepton	5g
Lactose	5g
Nước cất	1000ml
pH	6.9

+ *Môi trường tăng sinh: BGBL (g.l)*

Pepton	10g
Lactose	10g
Mật bò	20g
Vebrilliant green	0.0133g
pH	7.2

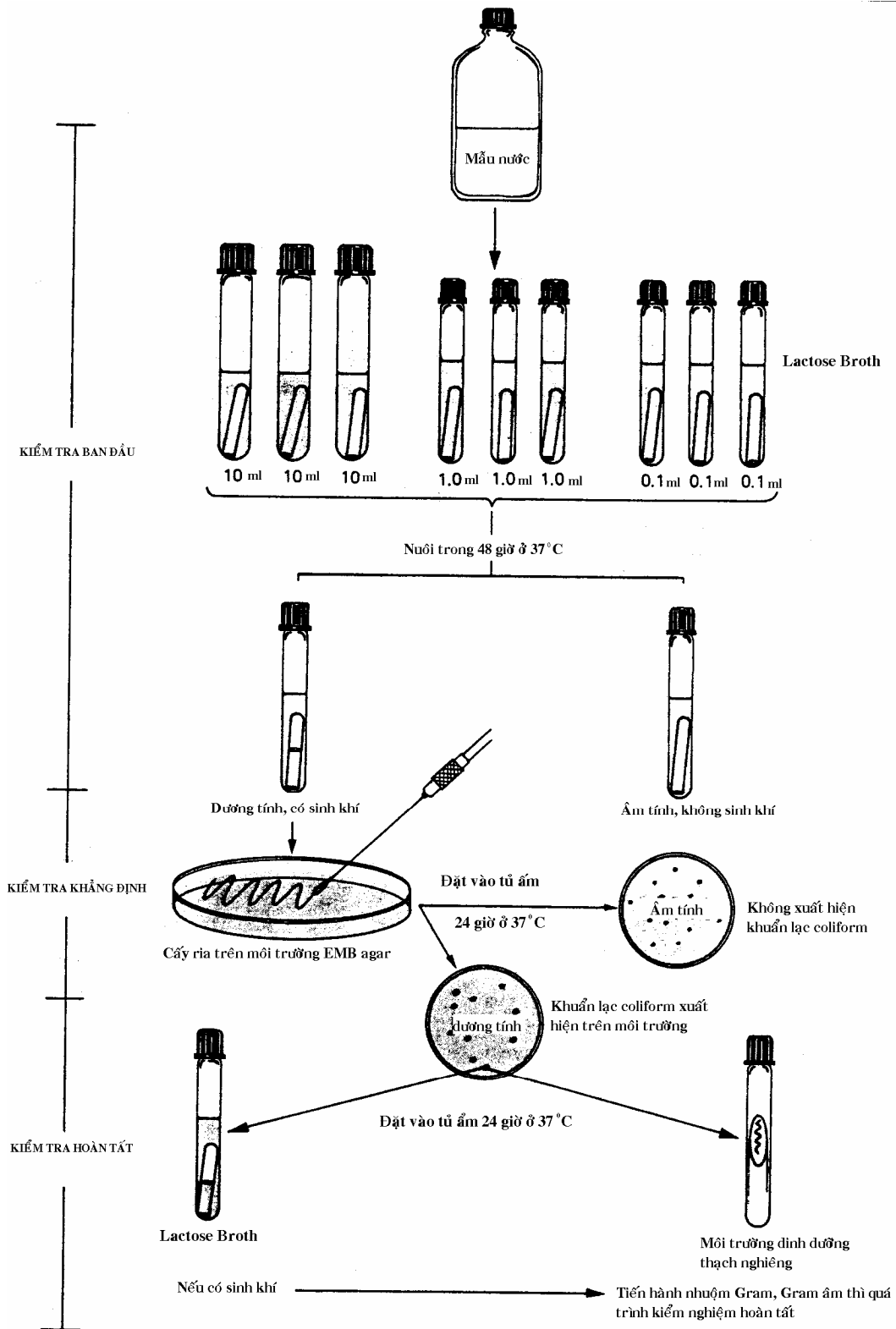
+ *Môi trường EMB Agar (g.l)*

Bacto pepton	10g
Lactose	10g
K_2HPO_4	2g
Agar	13.5g
Saccarose	5g
Eurin	0.4g
Methylen Blue	0.065g
Nước cất	1000ml
pH	7.1

Phân thực hành

- Chuẩn bị mẫu: chọn độ nuôi cấy tùy theo loại nước
- Dùng pipette hút mẫu và pha loãng ở các nồng độ khác nhau
- Cấy chuyển vào các ống nghiệm lactose theo các mức pha loãng
- Để ủ ấm 37°C trong 24-48h
- Dùng que cấy cấy chuyển các ống dương tính vào môi trường BGBL
- Để ủ ấm 37°C trong 24-48h
- Cấy chuyển vào môi trường thạch EMBA các ống dương tính.
- Để ủ ấm 37°C trong 24h lấy ra đọc kết quả. Trên mặt thạch xuất hiện các khuẩn lạc ánh kim.

Quy trình nuôi cấy



Bảng tính số lượng vi khuẩn dựa vào các kết quả kiểm nghiệm

Số lượng các ống có sinh khí			Số lượng có thể /100 ml	95% các giới hạn tin tưởng	
3 ống có 10 ml	3 ống có 1 ml	3 ống có 0.1 ml		Cận dưới	Cận trên
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Viết báo cáo các kết quả đạt được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO.

1. **Bộ Khoa Học, Công Nghệ và Môi Trường, 1995.** Tiêu chuẩn Việt Nam.
2. **Viện Thổ Nhưỡng Nông Hóa, 1998.** Sổ tay phân tích Đất – Nước – Phân bón – Cây trồng. Nxb Nông nghiệp.
3. **Kiều Hữu Ảnh, 1999.** Giáo Trình Vi Sinh Vật Công Nghiệp. Nxb KH và KT.
4. **Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty, 2000.** Vi Sinh Vật Học. Nxb Giáo Dục.
5. **American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1995.** Standard Method for Examination of Water and Wastewater. Washington DC.
6. **Anthony F. Gaudy, J. Elizabeth T. Gaudy, 1980.** Microbiology for Environmental Scientists and Engineers. Printed in United State of America.
7. **Gabriel Bitton, 1999.** Wastewater Microbiology. Printed in United State of America.
8. **James G. C. , Natalie S., 1992.** Microbiology. A Laboratory Manual. Printed by Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.