NỘI DUNG THỰC HÀNH

<u>Bài số 1</u>: Các quy tắc an toàn trong phòng thí nghiệm vi sinh vật

<u>Bài số 2</u>: Các thiết bị phòng thí nghiệm vi sinh và các phương pháp khử trùng

<u>Bài số 3</u>: Thực hành pha môi trường dinh dưỡng

<u>Bài số 4</u>: Phân lập – Nuôi cấy – Bảo quản vi sinh vật

<u>Bài số 5</u>: Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của vi sinh vật trên kính hiển vi

BÀI SỐ 1: CÁC QUY TẮC AN TOÀN TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH VẬT

Thao tác an toàn là yêu cầu cực kỳ quan trọng trong kiểm nghiệm vi sinh vật. Khi làm việc với vi sinh vật, chúng ta thường thao tác với số lượng rất lớn và đậm đặc tế bào vi sinh vật (ở mức 10^9 tế bào/ml). Nhiều chủng vi sinh vật là tác nhân gây bệnh nên cần luôn luôn cẩn thận với tất cả các chủng đang thao tác. Mặt khác, nhân viên kiểm nghiệm cũng phải sử dụng nhiều loại hóa chất, trong đó có các acid hoặc những hóa chất có độc tính. Do vậy, cần tuân thủ một số quy tắc an toàn để đảm bảo an toàn cho bản thân và cho những người khác trong phòng thí nghiệm như sau:

- Nắm vững nguyên tắc, phương pháp làm việc với vi sinh vật.
- Không ăn uống, hút thuốc trong phòng kiểm nghiệm. Mang khẩu trang khi thao tác với vi sinh vật.
- Mặc áo blouse trong thời gian làm việc.
- Trước khi bắt đầu làm cần sát trùng mặt bàn bằng giấy lau tẩm cồn 70^0 hoặc dung dịch chất diệt khuẩn khác (lysol 5%, amphyl 10%, chlorox 10%), để khô. Thực hiện tương tự cho hai tay. Chú ý chưa đốt đèn cồn hoặc đèn Bunsen khi tay chưa khô cồn. Lặp lại việc sát trùng này sau khi hoàn thành công việc.
- Cần ghi chú tên chủng, ngày tháng thí nghiệm lên tất cả các hộp petri, ống nghiệm môi trường, bình nuôi cấy.
- Khi lỡ tay làm đổ, nhiễm vi sinh vật ra nơi làm việc, dùng khăn giấy tẩm chất diệt khuẩn lau kỹ, sau đó thực hiện khử trùng lại bàn làm việc.
- Cẩn thận khi thao tác với đèn cồn hoặc đèn Bunsen. Tắt ngọn lửa khi chưa có nhu cầu sử dụng hoặc ngay sau khi thực hiện xong mỗi thao tác. Lưu ý tránh đưa tay, tóc qua ngọn lửa. Cần có cách bảo vệ tóc thích hợp trường hợp tóc dài.
- Sử dụng quả bóp cao su khi thao tác ống hút định lượng (pipette), không hút bằng miệng.
- Khi làm vỡ dụng cụ thủy tinh, cẩn thận mang găng tay thu gom tất cả mảnh vỡ vào một túi rác riêng.
- Tách riêng chất thải rắn và chất thải lỏng.
- Tất cả chất thải rắn, môi trường chứa hoặc nhiễm vi sinh vật cần được hấp khử trùng trước khi thải bỏ vào các bãi rác. Các dụng cụ, bình chứa nhiễm vi sinh

vật cần được ngâm vào dung dịch chất diệt khuẩn (nước javel) trước khi rửa và tái sử dụng.

- Cần gói hoặc ràng bằng băng keo khi đặt chồng các đĩa petri lên nhau.
- Không mở hộp petri và dùng mũi ngửi để tránh nhiễm vi sinh vật vào đường hô hấp.
- Khi đốt que cấy có dính sinh khối vi sinh vật, cần đặt vòng hoặc đầu que cấy vào chân ngọn lửa để tránh sự văng nhiễm vi sinh vật vào không khí.
- Sát trùng và rửa tay sạch sẽ trước khi rời phòng thí nghiệm.

BÀI SỐ 2: CÁC THIẾT BỊ PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG

I. MỤC ĐÍCH – YÊU CẦU

1. **Kiến thức lý thuyết**: Củng cố các kiến thức sau:

- Ảnh hưởng của các nhân tố vật lý, hóa học đối với sự tồn tại và phát triển của vi sinh vật

+ Nhân tố vật lý bao gồm: nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, pH ...

+ Nhân tố hóa học bao gồm: acid, base, muối kim loại, cồn ...

- Nguyên nhân gây nhiễm các dụng cụ là do sự tiếp xúc với không khí, các dụng cụ hay vật phẩm có vi sinh vật

2. **Kỹ năng thực hành**: Hình thành và rèn luyện các kỹ năng:

- Bao gói dụng cụ và làm nút bông cho ống nghiệm
- Khử trùng dụng cụ và môi trường bằng nồi hấp áp suất cao và tủ sấy

II. MỘT SỐ DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ PHÒNG THÍ NGHIỆM VI SINH

1. Các dụng cụ thủy tinh

a. Ống nghiệm: được sử dụng để chứa môi trường nuôi cấy vi sinh vật, có nút bằng gòn không thấm nước hay bằng nhựa chịu nhiệt

Hình 1: Ồng nghiệm

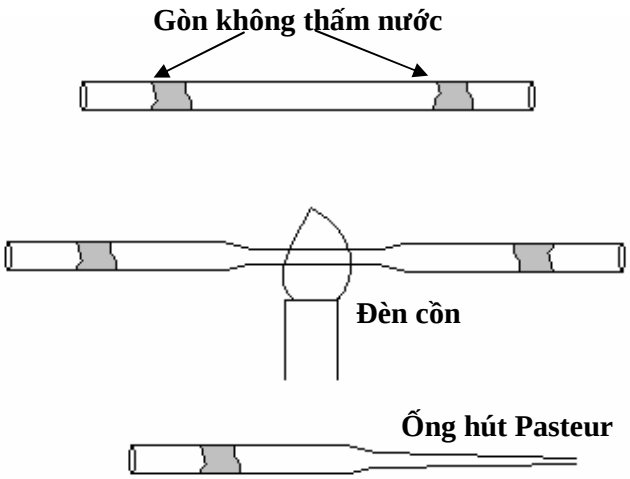
b. Đĩa petri: gồm một nắp lớn và một đáy nhỏ úp lồng vào nhau, đường kính 8cm, 10cm, 12cm .....

Hình 2: Đĩa petri

c. Ống hút (pipette)

- Ống hút có chia độ
- Ống hút Pasteur

Nếu không có sẵn pipette Pasteur ta có thể chế tạo từ ống thủy tinh đường kính 7mm, dài khoảng 25cm với 2 đầu được đốt tròn cạnh và nhét gòn không thấm nước. Để khoảng giữa ống thủy tinh trên ngọn đèn cồn, xoay đều cho đến khi thủy tinh chảy ra, mang khỏi ngọn lửa và kéo đều tay như thế ta có được 2 pipette Pasteur



Hình 3: Cách làm một pipette Pasteur

d. Micropipettes (Pipetman)

Đây là pipet chính xác, cho phép ta hút được một lượng chất rất chính xác.

Hình 4: Micropipette

e. Các dụng cụ bằng thủy tinh khác

- Becher
- Bình cầu đáy bằng và đáy tròn
- Bình tam giác (Erlen)
- Bình Roux

2. Các dụng cụ thiết bị khác

a. Dây cấy

- *Dây cấy thẳng*: sử dụng để cấy sâu hay ly trích vi sinh vật trên môi trường đặc
- *Dây cấy vòng*: dùng cấy ria vi sinh vật trên trên mặt thạch hay phân lập vi sinh vật trong môi trường lỏng hoặc môi trường đặc
- *Dây cấy thước thợ*: dùng để cấy các loại nấm men, nấm mốc, xạ khuẩn

Những loại dây cấy này thường làm bằng kim loại không bị oxy hóa ở nhiệt độ cao

b. *Tủ ấm*: dùng để ủ vi sinh vật hoặc theo dõi sự tăng trưởng của vi sinh vật

Hình 5: Tủ ấm

c. *Lò Pasteur* (xem phần sau)

d. *Autoclave* (xem phần sau)

e. Nồi chưng cách thủy

III. BAO GÓI DỤNG CỤ

1. Nguyên tắc

- Dụng cụ được bao gói phải đảm bảo sạch và khô.
- Bao gói phải kín và cẩn thận để sau khi khử trùng vẫn đảm bảo sự vô trùng của dụng cụ trong lớp giấy gói và lấy ra sử dụng dễ dàng.

2. Phương pháp bao gói dụng cụ

Việc bao gói dụng cụ gồm 2 khâu:

- Làm nút bông: cho các ống nghiệm, bình tam giác, pipet, que trang
- Bao gói: cho hầu hết các dụng cụ khác

a. Cách làm nút bông

- Với các ống nghiệm:
  - ❖ Lấy một ít bông không thấm nước cuộn lại
  - ❖ Dùng que tre ấn vào giữa cuộn bông
  - ❖ Đẩy cuộn bông này gập đôi và từ từ vào miệng ống nghiệm
  - ❖ *Yêu cầu*:

- Nút có kích thước và độ chặt vừa phải.
- Đầu nút tròn, gọn, phần ngoài lớn hơn phần trong.
- Lấy nút ra hay đóng vào dễ dàng

- Với các chai, lọ, bình tam giác có kích thước lớn: cách làm tương tự nhưng sử dụng lượng bông nhiều hơn
- Với các pipet: dùng một sợi dây thép nhỏ nhét một ít bông vào đầu lớn của pipet để hạn chế không khí từ miệng người hút vào pipet

b. Cách bao gói dụng cụ

Với các dụng cụ sau khi làm nút bông cần bao gói phần có nút bông bằng giấy báo để khi khử trùng nút bông không bị ướt và đảm bảo điều kiện vô trùng tốt hơn. Cách làm như sau:

- Cắt các đoạn băng giấy hình chữ nhật với kích thước tùy theo dụng cụ cần bao gói.
- Quấn quanh phần đầu có nút bông.
- Cột lại thật chặt

Yêu cầu:

- Phần giấy bao bên ngoài phải chặt và kín
- Bao bằng giấy dầu với dụng cụ hấp ướt
- Bao bằng giấy báo với dụng cụ sấy khô khi khử trùng ướt.

Với các dụng cụ như pipet, que trang phải dùng giấy bao kín toàn bộ. Có thể dùng hộp nhôm để đựng các dụng cụ trên để khử trùng.

IV. CÁC PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG DỤNG CỤ

1. Nguyên tắc

- Sau khi khử trùng cần đảm bảo:
  - Sự vô trùng tuyệt đối cho dụng cụ và vật phẩm
  - Không làm thay đổi chất lượng mẫu vật
- Bảo đảm an toàn tuyệt đối cho con người

2. Các phương pháp khử trùng

Khi khử trùng bằng nhiệt, các tế bào sinh dưỡng của VSV bị tiêu diệt dễ dàng trong khi các bào tử vẫn còn tồn tại ở ngay nhiệt độ đó

Khả năng chịu nhiệt của vi sinh vật phụ thuộc vào:

- Tính chất môi trường

- Số lượng tế bào
- Độ pH của vật cần khử trùng

Do vậy để khử trùng bằng nhiệt hiệu quả cần xác định ngưỡng nhiệt độ thấp nhất và khoảng thời gian ngắn nhất cần thiết để tiêu diệt toàn bộ VSV và bào tử của chúng có trong dụng cụ cần khử trùng

Có thể khử trùng bằng phương pháp nhiệt khô hay nhiệt ướt

a. Phương pháp nhiệt khô

Khử trùng bằng tủ sấy

- Được thực hiện trong tủ sấy
- Cách tiến hành:

• Đặt các dụng cụ đã được bao gói vào tủ sấy

• Bật công tắc tủ hoạt động

• Điều chỉnh thời gian và nhiệt độ thích hợp (160^0C trong 2h hoặc 180^0C trong 30 phút)

• Tắt tủ sấy, để nguội tới 60^0C rồi mở tủ lấy dụng cụ ra. Tránh mở tủ lấy dụng cụ khi nhiệt độ tủ còn cao sẽ làm dụng cụ thủy tinh dễ vỡ

• Các dụng cụ sau khi sấy mà giấy bao có màu hơi vàng là đạt yêu cầu. Nếu giấy bao có màu nâu chứng tỏ nhiệt độ khử trùng cao làm bông và giấy biến thành gondron (hợp chất có tính sát trùng) thì không thể sử dụng dụng này để nuôi cấy VSV được.

Khử trùng bằng cách đốt que lửa nóng đỏ:

- Phương pháp này dùng để khử trùng que cấy, ống hút, đầu ống nghiệm, miệng bình tam giác sau khi lấy nút bông ra.
- Cách khử trùng:

• Hơ dụng cụ trên ngọn lửa đèn cồn, đưa qua đưa lại đến 3 – 4 lần. Với các dây mayxo ở đầu que cấy phải nung cho thật đỏ hết chiều dài dây cấy.

• Đợi dụng cụ nguội mới được sử dụng để tránh vỡ và vi khuẩn không bị tiêu diệt khi lấy giống.

b. Khử trùng bằng sức nóng ướt

Đun sôi trong nước

Phương pháp này được sử dụng khi cần khử trùng nhanh các dụng cụ: kim tiêm, dao, kéo, kẹp, cốc ....

Cách tiến hành:

- Dùng nước sạch đổ ngập dụng cụ
- Đun sôi từ 10 phút đến 1h

Đun cách thủy ở nhiệt độ thấp (phương pháp khử trùng Pasteur)

Phương pháp này được dùng để khử trùng nhanh các thực phẩm dễ biến tính ở nhiệt độ cao

Cách tiến hành:

- Đun nóng môi trường lên 65 – 70^0C trong 15 – 30 phút

Phương pháp này chỉ có tác dụng ức chế VSV không có bào tử

Hấp cách quãng 100^0C (phương pháp Tyndal)

Phương pháp này dùng để khử trùng một số loại môi trường nuôi cấy men bánh mì, men gia súc, mốc làm nước chấm....

Cách khử trùng:

- Hấp trong trường ở 100^0C từ 30 – 40 phút.
- Lấy ra để tủ ấm 24 giờ để cho bào tử vi khuẩn phát triển
- Hấp môi trường lần thứ hai ở 100^0C trong 30 – 40 phút tiêu diệt các bào tử vừa nẩy mầm.
- Lặp lại quá trình này 3 – 4 lần

Kết quả: môi trường vừa được khử trùng vừa được đảm bảo không thay đổi chất lượng.

Khử trùng bằng hơi nước bão hòa áp suất cao (Autoclave)

Phương pháp này được thực hiện trong nồi hấp vô trùng ở áp suất cao. Đó là thiết bị làm bằng kim loại có tính chịu nhiệt cao có khả năng tự động điều chỉnh nhiệt độ và thời gian

Hình 6: Autoclave

❖ *Nguyên tắc hoạt động*

- Làm tăng nhiệt để khử trùng các vật bằng hơi nước dưới áp suất lớn hơn áp suất khí quyển. Khi áp suất tăng làm nhiệt độ tăng nhờ hệ thống van rất chặt chẽ

- Mối quan hệ giữa áp suất và nhiệt độ của nồi được biểu hiện qua bảng sau:

Áp suất (atm)	Nhiệt độ (^{0}C)
0	100
0,5	112
1,0	121
1,5	128
2,0	134

❖ *Cách sử dụng:*

- Chuẩn bị các dụng cụ chứa môi trường cần khử trùng
- Cho 3l nước cất vào nồi hấp rồi kiểm tra mức nước cho phù hợp.
- Lần lượt đưa các dụng cụ, môi trường cần hấp vào bên trong nồi.
- Đóng chặt nồi hấp.
- Điều chỉnh kim đồng hồ thời gian và áp suất về vị trí mong muốn.
- Cắm phích điện
- Bật công tắc khử trùng nồi hấp để tiến hành hấp.
- Khi kết thúc quá trình hấp, nồi sẽ báo hiệu bằng còi.
- Gạt công tắc khử trùng về vị trí “dry”
- Chờ kim chỉ áp suất trở về 0 mới mở nắp nồi lấy dụng cụ ra.
- Rút phích điện
- Ghi nhãn ngày - tháng – năm vào dụng cụ sau khi khử trùng.

CHÚ Ý: Để đảm bảo an toàn và hiệu quả của việc khử trùng, người thực hiện cần phải:

- Kiểm tra lại nồi hấp trước khi sử dụng
- Thực hiện đúng quy trình hướng dẫn
- Tránh cung cấp điện đột ngột để không gây vỡ dụng cụ, nguyên liệu hoặc gây nổ nguy hiểm.
- Trực tiếp theo dõi quá trình khử trùng cho đến khi kết thúc và ngắt điện.
- Định kỳ kiểm tra chất lượng đồng hồ áp kế và van an toàn.

Tóm lại, phương pháp khử trùng bằng hơi nước bão hòa ở áp suất cao là phương pháp phổ biến và hiệu quả nhất trong các phương pháp khử trùng nhờ khả năng tiêu diệt các tế bào sinh dưỡng lẫn bào tử của vi sinh vật.

c. Khử trùng bằng sự lọc

Sử dụng cho môi trường lỏng, trong, có độ nhầy yếu, không chịu được nhiệt độ cao hơn 60^0C. Cho môi trường đi qua một màng lọc xốp có đường kính lỗ nhỏ hơn đường kính của vi khuẩn. Khi đó, vi khuẩn sẽ bị giữ lại trên màng lọc còn dung dịch đi qua sẽ vô trùng. Màng lọc thường là màng cellulose

d. Diệt trùng bằng bức xạ

- Tia tử ngoại: Bức xạ thường dùng nhất là tia UV. Dòng tia UV diệt trùng không khí phòng bệnh viện, phòng vô trùng. Tia UV chỉ khử trùng bề mặt mà không thấm sâu vào bên trong mẫu vật.
- Tia âm cực: Diệt trùng các dụng cụ giải phẩu, thuốc, thực phẩm, tia âm cực có thể tiêu diệt các vật đã cho vào bao gói kín.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Thực hành bao gói các loại dụng cụ?
2. Phân tích cơ sở vi sinh vật học của các phương pháp khử trùng Pasteur, Tyndal?
3. Tóm tắt cách sử dụng nồi hấp áp suất cao (autoclave)?

BÀI SỐ 3: CHUẨN BỊ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT

I. MỤC ĐÍCH VÀ YÊU CẦU

1. Kiến thức lý thuyết: Củng cố và hình thành mới các kiến thức sau:

- Khái niệm môi trường dinh dưỡng.
- Yêu cầu cơ bản của môi trường dinh dưỡng.
- Cơ sở phân loại môi trường dinh dưỡng.
- Nguyên tắc cơ bản của việc chế tạo môi trường dinh dưỡng

2. Kỹ năng thực hành

- Kỹ năng sử dụng các dụng cụ: cân phân tích, ống đong, pipet, autoclave, tủ ấm.
- Cân đong, pha chế hóa chất.
- Làm trong môi trường.
- Điều chỉnh pH và khử trùng môi trường.
- Kiểm tra kết quả khử trùng.
- Bảo quản môi trường

II. HÓA CHẤT – NGUYÊN LIỆU – DỤNG CỤ

1. Hóa chất – nguyên liệu

Tùy theo yêu cầu và điều kiện thực tế của PTN mà ta chuẩn bị các nguyên liệu, hóa chất của một số loại môi trường để SV thực hành.

2. Dụng cụ

- Ống nghiệm
- Giá để ống nghiệm
- Đĩa petri
- Bình tam giác 250 ml
- Cốc thủy tinh 250 ml
- Pipet các loại
- Ống đong
- Phễu thủy tinh
- Giấy lọc, giấy bao gói
- Bông không thấm nước, bông y tế
- Đèn cồn

III. MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG

1. Khái niệm môi trường dinh dưỡng

- Các chất dinh dưỡng là những hợp chất tham gia vào quá trình trao đổi chất nội bào.

- Môi trường dinh dưỡng là hỗn hợp các chất dinh dưỡng và các chất này có nhiệm vụ duy trì thế oxy hóa khử, áp suất thẩm thấu của tế bào và sự ổn định của pH trong môi trường.

2. Các yêu cầu cơ bản của môi trường dinh dưỡng

- Có đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết
- Có độ pH thích hợp
- Có độ nhớt nhất định
- Không chứa các yếu tố độc hại
- Tuyệt đối vô trùng

3. Phân loại môi trường dinh dưỡng

Người ta dựa trên các cơ sở khác nhau để phân loại môi trường

a. Căn cứ theo thành phần và nguồn gốc: gồm 3 loại

- Môi trường tự nhiên: có thành phần là các sản phẩm tự nhiên như: trứng, sữa, khoai tây, dịch chiết nấm men, đường, cám. Thành phần hóa học của loại môi trường không được xác định chính xác do sự không ổn định của sản phẩm tự nhiên.

- Môi trường tổng hợp: chứa các chất hóa học mà thành phần của chúng được xác định và định lượng một cách cụ thể và chính xác.

- Môi trường bán tổng hợp: chứa cả các chất hóa học lẫn các sản phẩm tự nhiên.

b. Căn cứ theo tính chất lý học: gồm 3 loại

- Môi trường lỏng: thành phần môi trường này không chứa agar và thường được sử dụng để nghiên cứu quá trình tổng hợp của vi sinh vật.

- Môi trường đặc: môi trường này chứa 1,5 – 2% agar hoặc 10 – 20% gelatin. Môi trường này được sử dụng để nghiên cứu các đặc điểm hình thái, sinh lý của vi sinh vật.

- Môi trường bán lỏng: chỉ chứa 0,3 – 0,7% agar

c. Căn cứ vào công dụng: gồm các loại sau:

- Môi trường cơ bản: thích hợp cho nhiều loại vi sinh vật khác nhau.

- Môi trường chọn lọc: là môi trường đảm bảo cho sự phát triển ưu thế của một loài hay một nhóm loài vi sinh vật xác định nào đó.

- Môi trường kiểm định: là môi trường cho phép phân biệt được một số đặc điểm của một số loài vi khuẩn xác định. Thông thường, người ta cho vào môi trường chất chỉ thị màu để tạo ra những màu đặc trưng.

4. Phương pháp pha môi trường

Pha môi trường để thực hiện việc phân lập, nhân giống, giữ giống vi sinh vật, đồng thời để nuôi cấy và nghiên cứu các đặc điểm sinh học của chúng

a. Nguyên tắc pha môi trường

- Dựa trên cơ sở nhu cầu về các chất dinh dưỡng và khả năng đồng hóa các chất dinh dưỡng của từng loài vi sinh vật.
- Để đảm bảo sự cân bằng về áp suất thẩm thấu giữa môi trường và vi sinh vật nên cần điều chỉnh tỷ lệ và nồng độ các chất trong thành phần môi trường dinh dưỡng.
- Đảm bảo các điều kiện hóa, lý cần thiết cho các hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật.

b. Các bước pha môi trường dinh dưỡng

Pha chế

Cân, đong thật chính xác các thành phần môi trường và pha chế theo đúng trình tự hướng dẫn trong tài liệu.

- Môi trường lỏng: cân, đong các chất rồi cho vào nước
- Môi trường đặc:
    - Cân các thành phần của môi trường cho vào nước cất.
    - Cân agar rồi cho vào dung dịch trên

Làm trong môi trường

Việc làm trong môi trường giúp ta dễ dàng quan sát sự phát triển của vi sinh vật.

- Với môi trường lỏng: tiến hành lọc bằng vải thưa hoặc giấy lọc.
- Với môi trường đặc: thường lọc qua vải màn 2 lớp hoặc giấy lọc trong điều kiện có phễu lọc nóng.

Điều chỉnh độ pH của môi trường

- Dùng HCl 10% hoặc NaOH 10% để điều chỉnh pH.
- Muốn kiểm tra độ pH, ta sử dụng máy đo pH vì nó nhạy và cho độ chính xác cao. Nếu không có thể sử dụng giấy quỳ để đo pH nhưng không có độ chính xác cao.

Phân phối môi trường vào dụng cụ

Người ta thường phân phối môi trường vào đĩa petri, ống nghiệm, bình tam giác. Trình tự phân phối như sau:

- Đun cho môi trường hóa lỏng.
- Một tay giữ dụng cụ chứa môi trường
- Tay còn lại kẹp nút bông và kéo ra.
- Nhanh tay đổ môi trường vào dụng cụ và đậy nút bông lại.
- Chú ý:

• Đối với ống nghiệm: Nếu môi trường làm thạch nghiêng thì lượng môi trường cần được phân phối chiếm 1/4 thể tích ống nghiệm. Nếu làm thạch đứng thì lượng môi trường được phân phối chiếm 1/2 - 1/3 thể tích ống nghiệm.

• Đối với bình cầu hay bình tam giác : lượng môi trường được phân phối chiếm 1/2 - 2/3 thể tích bình.

• Các thao tác phân phối phải nhanh gọn, khéo léo để môi trường không dính vào miệng dụng cụ hoặc nút bông và việc phân phối cần được thực hiện xong trước khi môi trường bị đông đặc.

Khử trùng môi trường

Tùy theo tính chất và điều kiện cụ thể của từng loại môi trường mà có chế độ và phương pháp khử trùng khác nhau.

Các phương pháp khử trùng thường được sử dụng là:

- Phương pháp Pasteur
- Phương pháp Tyndal
- Phương pháp lọc bằng dụng cụ lọc vi khuẩn
- Phương pháp hấp bằng hơi nước bão hòa ở áp suất cao

➢ Đối với các dụng cụ chịu nhiệt (sứ, vải, thủy tinh) khử trùng ở 1,5 atm / 20 – 30 phút

➢ Đối với dụng cụ chứa 1l môi trường trở lên thì hấp 1 atm / 30 phút

➢ Với các loại môi trường chứa đường dễ biến tính ở nhiệt độ cao thì hấp khử trùng ở 0,5 – 0,6 atm / 15 phút

Làm thạch nghiêng, thạch đứng và đổ thạch vào đĩa petri

❖ Làm thạch nghiêng: Cần tiến hành ngay sau khi khử trùng môi trường và môi trường chưa đông đặc.

- Đặt ống nghiệm có môi trường lên giá đặt nghiêng và không được để môi trường chạm vào nút bông.

- Để yên cho đến khi môi trường đông đặc. Yêu cầu mặt thạch phải thẳng, nhẵn và liên tục

❖ Làm thạch đứng: Đặt các ống nghiệm có môi trường là thạch đứng vào giá, để yên cho môi trường đông đặc

❖ Đổ môi trường vào đĩa petri: Toàn bộ quá trình đổ thạch vào đĩa petri được thực hiện trong tủ cấy vô trùng và gồm các thao tác sau:

- Mở bao giấy gói các đĩa petri
- Một tay cầm dụng cụ chứa môi trường
- Tay còn lại mở nút bông và hơ miệng bình trên ngọn lửa đền cồn.
- Mở hé nắp đĩa petri. Nghiêng bình và rót môi trường vào đĩa petri.
- Đậy nắp đĩa lại, xoay tròn đĩa để môi trường được phân phối đều bên trong đĩa.
- Để yên cho môi trường đông đặc.
- Lật ngược đĩa lại và bảo quản.

CHÚ Ý:

- Thao tác đổ môi trường phải nhanh và khéo léo để hạn chế sự nhiễm khuẩn.
- Mặt thạch phải phẳng, nhẵn, có độ dày khoảng 2mm. Thông thường cứ khoảng 200 ml môi trường sẽ phân phối được từ 22 – 25 đĩa.
- Sau khi phân phối môi trường vào đĩa petri, kiểm tra lại xem môi trường có bị nhiễm khuẩn sau 1 – 2 ngày.
- Ghi chú môi trường (tên môi trường, ngày khử trùng, hạn sử dụng)

Bảo quản và kiểm tra môi trường

- Môi trường chưa sử dụng được bảo quản ở chỗ mát (0 – 5^0C) và không để môi trường bị khô.
- Trước khi sử dụng, để kiểm tra độ vô khuẩn của môi trường, người ta thường đặt vào tủ ấm 37^oC trong một khoảng thời gian nhất định. Loại bỏ môi trường bị nhiễm khuẩn và chỉ sử dụng môi trường đạt yêu cầu.

IV. CÔNG THỨC VÀ CÁCH PHA MỘT SỐ LOẠI MÔI TRƯỜNG THÔNG DỤNG

1. **Môi trường nuôi cấy vi khuẩn** (môi trường cao thịt – pepton)

Công thức:

- Cao thịt: 5g
- Pepton: 10g
- Nước cất: 1000ml

Cách pha môi trường nuôi cấy:

- Cân chính xác và cho các thành phần của môi trường vào trong cốc chứa sẵn 1 ít nước
- Khuấy cho tan hết và thêm lượng nước theo yêu cầu
- Đun lên cho tan hoàn toàn
- Để nguội và lắng dung dịch vừa đun
- Lọc bằng vải hay giấy lọc
- Phân phối môi trường vào các dụng cụ để khử trùng

2. **Môi trường nuôi cấy nấm men (Hansen)**

Công thức:

- Saccharose hoặc Maltose: 50g
- Pepton: 10g
- KH_2PO_4: 3g
- $MgSO_4$: 3 – 5 g
- Agar: 20g
- Nước cất: 1000ml

Cách pha chế môi trường nuôi cấy:

- Cân chính xác và cho các thành phần của môi trường vào trong cốc chứa sẵn 1 ít nước
- Khuấy cho tan hết và thêm lượng nước theo yêu cầu
- Đun lên cho tan hoàn toàn
- Để nguội và lắng dung dịch vừa đun
- Lọc bằng vải hay giấy lọc
- Phân phối môi trường vào các dụng cụ để khử trùng

3. **Môi trường nuôi cấy nấm mốc** (môi trường Czapek)

- Saccharose: 30g
- $NaNO_3$: 30g
- K_2HPO_4: 1g

- $MgSO_4$: 0,5g
- $FeSO_4$: 0,01g
- Agar: 20g
- Nước cất: 1000ml

pH = 6, khử trùng 1atm/30 phút

4. **Môi trường nuôi cấy xạ khuẩn** (môi trường Gauze 1)

- Tinh bột tan: 20g
- K_2HPO_4: 0,5g
- $MgSO_4.7H_2O$: 0,5g
- KNO_3: 1,0g
- NaCl: 0,5g
- $FeSO_4$: 0,01g
- Agar: 20g
- Nước cất: 1000ml

pH = 7,2 – 7,4 khử trùng 0,5 atm/30 phút

V. CÁC PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG

1. Nguyên tắc khử trùng

Khử trùng môi trường dinh dưỡng nhằm mục đích:

- Tiêu diệt toàn bộ vi sinh vật ngoại lai hiện diện trong môi trường
- Tạo điều kiện vô trùng cho môi trường để kết quả phân lập, nuôi cấy chính xác.

Do đó, khi khử trùng môi trường phải đảm bảo một số điều kiện như sau:

- Không làm biến tính môi trường, không làm biến tính một số chất trong môi trường
- Sau khi khử trùng, trong môi trường không sản sinh ra các chất độc gây chết vi sinh vật nuôi cấy
- Phải đảm bảo điều kiện vô trùng tuyệt đối sau khi khử trùng
- Bảo đảm an toàn đối với người sử dụng

2. Một số phương pháp khử trùng môi trường dinh dưỡng

Phương pháp khử trùng được sử dụng chủ yếu để khử trùng môi trường là autoclave. Tuy nhiên, tùy từng loại môi trường khác nhau sẽ có những điều kiện khử trùng khác nhau

a. Đối với môi trường chứa các chất dễ biến tính (sữa, các đường)

- Đối với môi trường chứa sữa: không được khử trùng trên 100^0C vì ở nhiệt độ cao sữa dễ bị biến tính. Do đó, đối với loại môi trường này, ta tách ra làm 2 phần: sữa tiến hành thanh trùng Pasteur, còn các thành phần khác được khử trùng trong autoclave. Sau đó, hòa trộn 2 thành phần đó với nhau.

- Đối với một số môi trường chứa một số chất dễ bị phân hủy ở nhiệt độ cao như urea thì nếu chúng ta tự pha chế thì chia ra 2 phần để khử trùng còn nếu môi trường tổng hợp thì ta khử trùng bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ nhỏ (0,45 μm) để lọc khử trùng.

b. Môi trường thông thường

Tiến hành khử trùng bình thường với các điều kiện thời gian và nhiệt độ được khuyến cáo cho từng loại môi trường

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Trình bày các nguyên tắc cơ bản của việc pha môi trường dinh dưỡng?
2. Các bước pha môi trường dinh dưỡng?
3. Mỗi nhóm sinh viên thực hành 3 loại môi trường.
4. Mỗi nhóm SV thực hành khử trùng 1 trong 3 loại vừa pha bằng autoclave và phân phối vào ống nghiệm, đĩa Petri.
5. Kiểm tra kết quả khử trùng bằng cách để môi trường vào tủ ấm 37^oC từ 2 – 3 ngày để xác định có vi sinh vật không? Nếu có, hãy giải thích nguyên nhân của hiện tượng này.

BÀI SỐ 4: PHÂN LẬP – NUÔI CẤY – BẢO QUẢN VI SINH VẬT

---

1. MỤC ĐÍCH VÀ YÊU CẦU CỦA BÀI

1. Kiến thức lý thuyết

- Ý nghĩa của việc phân lập, nuôi cấy và bảo quản vi sinh vật trong công tác nghiên cứu vi sinh vật học
- Các nguyên tắc cơ bản của quá trình phân lập – nuôi cấy – bảo quản vi sinh vật

2. Kỹ năng thực hành

- Kỹ năng phân lập vi sinh vật hiếu khí
    - Tạo ra các khuẩn lạc riêng rẽ từ quần thể vi sinh vật
    - Tạo ra các khuẩn lạc riêng rẽ ở môi trường trên đĩa petri để cấy chuyển
    - Kiểm tra độ tinh khiết của giống mới phân lập
- Kỹ năng nuôi cấy vi sinh vật hiếu khí
    - Các thao tác cấy chuyển từ ống giống sang các loại môi trường: thạch nghiêng, thạch đứng, thạch đĩa
    - Các kiểu cấy khác nhau trên các kiểu môi trường trên
- Kỹ năng bảo quản các chủng vi sinh vật thuần khiết
    - Bảo quản trên môi trường thạch
    - Bảo quản trên cát, trên hạt
    - Bảo quản bằng phương pháp đông khô

2. HÓA CHẤT – NGUYÊN LIỆU – DỤNG CỤ

1. Hóa chất, nguyên liệu

- Môi trường thạch đứng, thạch đĩa, thạch nghiêng để nuôi cấy vi sinh vật hiếu khí
- Các ống giống nấm men, nấm mốc
- Đất vườn, cát, lúa

2. Dụng cụ

- Que cấy đầu tròn, đầu nhọn, hình thước thợ
- Que trang, ống hút chia độ 1ml
- Ống nghiệm, giá để ống nghiệm, đĩa petri
- Đèn cồn, diêm quẹt

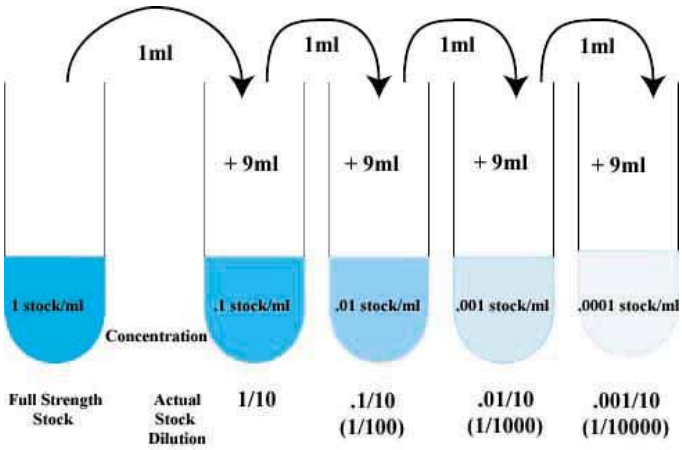
3. CÁCH THỨC PHA LOÃNG MẪU

1. **Nguyên tắc**

Pha loãng mẫu là một trong những công đoạn cơ bản nhưng rất quan trọng trong quá trình phân tích vi sinh vật. Việc pha loãng mẫu ở các nồng độ thích hợp sẽ giúp ích rất nhiều trong quá trình định lượng cũng như phân tích vi sinh vật

2. **Phương pháp**

- ***Đối với mẫu chất lỏng:*** dùng pipet hút 1 ml mẫu cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch pha loãng, khi đó ta sẽ được nồng độ pha loãng là 10^{-1}. Tiếp tục từ ống nghiệm 10^{-1} hút tiếp 1ml và cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch pha loãng → độ pha loãng 10^{-2}. Tiếp tục như vậy đến nồng độ cần thiết
- ***Đối với mẫu rắn:*** cân chính xác 10 g mẫu, sau đó cho vào 90 ml dung dịch pha loãng → nồng độ pha loãng 10^{-1}. Và tiếp tục pha loãng tương tự như mẫu nước



Hình 7: Phương pháp pha loãng

4. PHÂN LẬP VI SINH VẬT

1. **Nguyên tắc**

- Tách rời các tế bào vi sinh vật
- Nuôi cấy các tế bào trên trong môi trường dinh dưỡng để tạo khuẩn lạc riêng rẽ

2. **Quá trình phân lập vi sinh vật ở dạng thuần khiết**: gồm các bước:

- Tạo ra các khuẩn lạc riêng rẽ từ quần thể vi sinh vật ban đầu
- Phân lập các vi sinh vật thuần khiết
- Kiểm tra độ tinh khiết của vi sinh vật

a. Tạo ra các khuẩn lạc riêng rẽ trên môi trường phân lập

- Nếu mẫu ban đầu ở dạng rắn thì phải chuyển về dạng lỏng bằng cách:
    - Nghiền mẫu
    - Hòa tan mẫu vào nước cất vô trùng rồi pha loãng

Sau đó thực hiện như là mẫu dạng lỏng:

- Tiếp tục pha loãng ở các nồng độ cần thiết
- Cấy mẫu trên môi trường đặc trưng

- Chú ý: nếu không có môi trường đặc trưng có thể sử dụng môi trường mà vi sinh vật phát triển bình thường nhưng có bổ sung các chất ức chế các vi sinh vật khác phát triển.

b. Phân lập vi sinh vật trên môi trường thạch trên đĩa petri

Đối với vi sinh vật hiếu khí

- Hút 0,1 ml dịch mẫu đã pha loãng cho vào đĩa petri có môi trường thích hợp.
- Dùng que trang trải đều mẫu khắp mặt thạch
- Tiếp tục sử dụng que trang này để trải đều khắp mặt thạch ở đĩa thứ 2, thứ 3..
- Ủ các đĩa trên ở nhiệt độ thích hợp trong 1 khoảng thời gian nhất định ta sẽ thu được các khuẩn lạc riêng rẽ

c. Kiểm tra độ tinh khiết của giống mới phân lập

Kiểm tra vết cấy

Quan sát sự sinh trưởng của vi sinh vật trên môi trường thạch

- Nếu vết cấy có bề mặt và màu sắc đồng đều, thuần nhất chứng tỏ giống mới phân lập tinh khiết thì giữ lại
- Nếu vết cấy không thuần nhất thì loại bỏ

Kiểm tra độ thuần của các khuẩn lạc

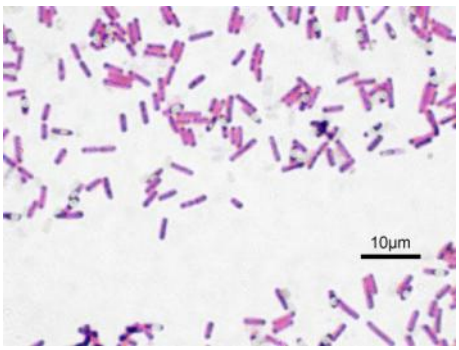
- Chọn các khuẩn lạc riêng rẽ trên môi trường thạch nghiêng
- Tách các khuẩn lạc này ra, hòa tan và pha loãng ở nồng độ cần thiết trong nước cất vô trùng.
- Nhỏ 1 giọt dịch trên vào đĩa petri có môi trường.
- Dùng que trang trải đều dịch khắp mặt đĩa petri thứ nhất, rồi đĩa thứ 2, thứ 3.
- Ủ đĩa petri ở nhiệt độ và thời gian thích hợp.
- Sau đó quan sát các khuẩn lạc riêng rẽ. Sự thuần khiết của khuẩn lạc là biểu hiện sự thuần khiết của giống

3. Phân lập một số vi sinh vật trong thực tế

a. Phân lập vi khuẩn Bacillus subtilis

- Cỏ khô cắt nhỏ cho vào bình tam giác
- Bổ sung thêm: một ít phân và nước sạch cho ngập cỏ

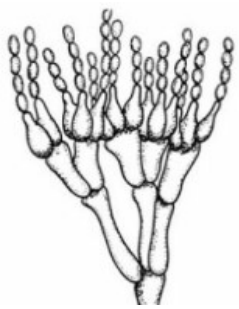
- Đun sôi 15 phút để diệt các tế bào sinh dưỡng và các tế bào không sinh bào tử.
- Đậy nút bông và để tủ ấm 25 – 26^{0}C trong vòng 48 – 72h
- Kết quả:
    - Xuất hiện lớp váng xám có nhiều vi khuẩn *B.subtilis* vì cỏ khô bao giờ cũng xuất hiện bào tử của vi khuẩn này
    - Trên kính hiển vi: Tế bào vi khuẩn *B.subtilis* có hình que, dài, bào tử hình ovan nằm ở xa tâm hay gần tâm khuẩn lạc. Tế bào có kích thước 3 – 5 x 0,6 μm.



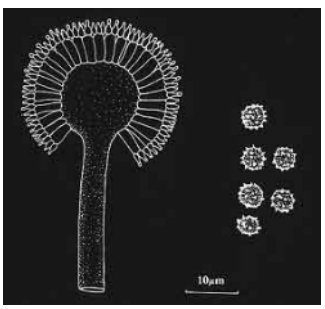
Hình 8: Tế bào vi khuẩn *Bacillus* subtilis quan sát dưới kính hiển vi

b. Phân lập nấm mốc Aspergillus oryzae, Aspergillus niger và Mucor

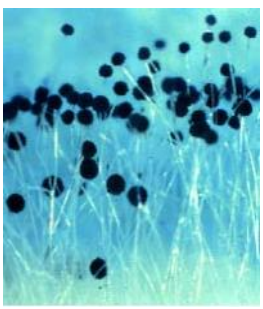
- Có thể phân lập nấm mốc này trên cơm nguội, xôi làm mốc tương, bánh mì để khô ít ngày.
- Thông qua màu sắc của mốc nhận diện:
    - Mốc có màu trắng: *Mucor* hoặc *Rhizopus*
    - Mốc có màu đen: *Aspergillus niger*
    - Mốc có màu xanh lục: *Penicillum italicum*
- Dùng que cấy hình thước thợ lấy 1 ít sợi nấm cấy vào môi trường thạch nghiêng thích hợp (Czapek)



Penicillum



Aspergillus niger

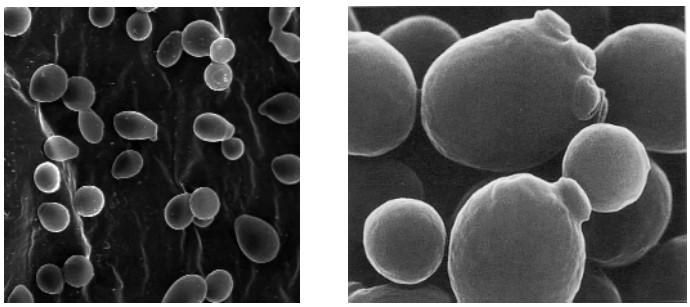


Rhizopus

Hình 9: Hình dạng một số nấm mốc

c. Thu nhận nấm men

- Có thể phân lập nấm men dễ dàng từ các môi trường như:
    - Bề mặt trái cây hoặc dịch ép một số trái cây như táo, lê, nho, dâu....
    - Trong rượu nếp, trong các bánh men rượu, bia, nước mía để vài hôm, hạt kefir....
- Dưới kính hiển vi, nấm men có dạng hình cầu hay hình trứng. Tế bào có kích thước lớn, có khả năng nẩy chồi. Khuẩn lạc có màu trắng sữa
- Chọn khuẩn lạc nấm men riêng rẽ và cấy vào môi trường thích hợp (môi trường Hansen).

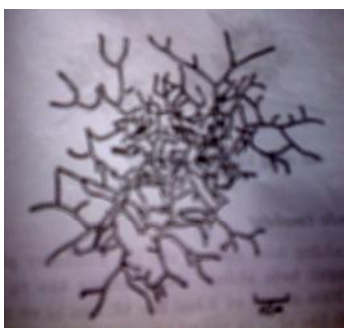


(a) (b)

Hình 10: Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* dưới kính hiển vi quang học (a) và kính hiển vi điện tử (b)

d. Thu nhận xạ khuẩn

- Có thể thu nhận xạ khuẩn dễ dàng từ đất, nước, trên các cơ chất động vật, thực vật và sử dụng môi trường Gauze 1 để phân lập
- Phân biệt xạ khuẩn trên môi trường Gauze 1:
    - Khuẩn lạc vi khuẩn nhầy, ướt
    - Khuẩn lạc vi khuẩn bông xốp, có dạng sợi
- Sau khi cấy 0,1 ml dịch mẫu đất vào môi trường, cần chú ý: nuôi trong tủ ấm (28^0C) từ 7 – 15 ngày mới lấy ra chọn khuẩn lạc riêng rẽ để cấy chuyển



Hình 11: Xạ khuẩn

5. PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY VI SINH VẬT

1. Khái niệm

Quá trình nuôi cấy vi sinh vật gồm 2 khâu: nuôi và cấy

- Nuôi: là quá trình đảm bảo và duy trì những điều kiện thuận lợi nhất cho sự hoạt động và phát triển của vi sinh vật
- Cấy: là những thao tác chuyển vi sinh vật từ môi trường đang sống sang môi trường thuận lợi hơn cho sự phát triển của chúng

Hai khâu này gắn bó với nhau trong quá trình nghiên cứu và ứng dụng vi sinh vật

2. Mục đích

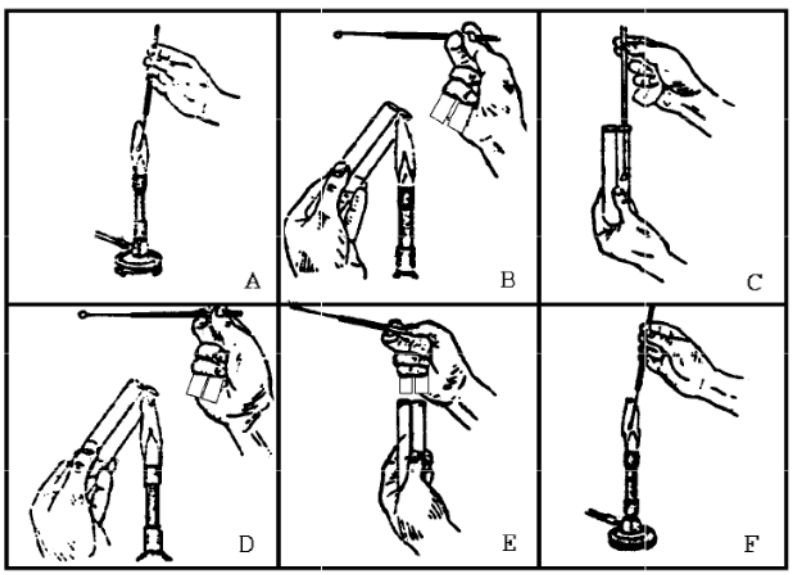
- Phát hiện sự có mặt của vi sinh vật trong các nguyên liệu vật phẩm cần nghiên cứu.
- Tiến hành nhân giống vi sinh vật một cách nhanh chóng
- Bảo tồn các giống thuần khiết.
- Nghiên cứu các đặc tính sinh học và hệ thống sinh học của chúng.

3. Nguyên tắc

- Mọi thao tác nuôi cấy đều phải thực hiện trong điều kiện vô trùng để tránh nhiễm khuẩn.
- Môi trường và dụng cụ nuôi cấy phải được khử trùng
- Duy trì các điều kiện thuận lợi để vi sinh vật phát triển

4. Các phương pháp cấy

a. Phương pháp chung của việc cấy chuyển



Hình 11: Phương pháp cấy chuyển môi trường lỏng sang môi trường lỏng

- Dán nhãn ghi: tên giống vi sinh vật + ngày cấy
- Một tay cầm 2 ống nghiệm: một ống giống và 1 ống môi trường
- Tay còn lại cầm que cấy và đốt đỏ dây cấy trên ngọn lửa đèn cồn để khử trùng
- Dùng ngón út và ngón áp út rút nút bông của ống giống ra.
- Hơ nóng khử trùng miệng ống nghiệm
- Đợi que cấy nguội, đưa que cấy vào ống nghiệm lấy khuẩn lạc trong ống giống.
- Rút que cấy ra và tiến hành cấy chuyển trong ống môi trường
- Khử trùng lại phần không khí nơi miệng ống nghiệm rồi đậy nút bông.
- Khử trùng lại que cấy sau khi sử dụng xong

CHÚ Ý:

- Nếu ống giống là canh trường thì dùng pipet hút canh trường thay cho que cấy.
- Thao tác khử trùng ống hút bắt đầu từ đầu nhỏ ống hút sau khi đã tháo giấy bao gói.
- Sau khi sử dụng, cắm ống hút vào cồn 70% để khử trùng

b/ Phương pháp cấy trên thạch nghiêng

Phương pháp này để cấy chuyển các vi sinh vật hiếu khi:

- Sử dụng que cấy vòng tiến hành các thao tác theo đúng trình tự đã nêu trên
- Thực hiện việc cấy giống vào ống thạch nghiêng bằng các thao tác tiếp theo:
    - Hòa giống ở đầu que cấy vào giọt nước ở đáy ống nghiệm
    - Nhẹ nhàng lướt que cấy trên mặt thạch theo các kiểu: hình chữ chi, vòng xoắn, vạch ngang song song

c. Phương pháp cấy trên thạch đứng: dùng để cấy vi sinh vật kỵ khí

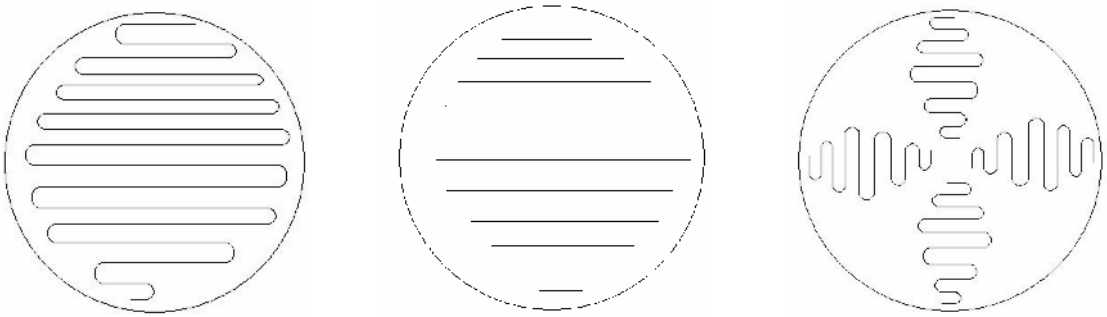
- Sử dụng que cấy hình kim.
- Sau khi lấy sinh khối, dùng que cấy này đâm sâu vào khối thạch. Đâm sát đáy ống nghiệm và đâm thành 3 đường: 1 đường giữa và 2 đường sát thành ống.
- Đường cấy phải thẳng, nhẹ nhàng để không gây nứt, vỡ môi trường

d. Phương pháp cấy trên đĩa petri

Dùng que cấy vòng

Hình 12: Phương pháp cấy chuyển từ môi trường lỏng sang môi trường thạch

- Để đĩa petri lên bàn
- Dùng que cấy lấy sinh khối vi sinh vật
- Mở hé nắp đĩa petri đủ để cho que cấy vào
- Nhẹ nhàng và nhanh chóng lướt que cấy lên mặt thạch theo 1 trong các kiểu sau
    - Theo hình chữ chi trên toàn bộ mặt thạch
    - Theo những đường song song
    - Theo 4 hình chữ chi 4 góc



Hình 13: Kết quả sau khi cấy

- *Dùng pipet*: dùng để định lượng vi sinh vật. Có 2 cách thực hiện:

- Cách 1:
    - Trộn dịch cấy vào thạch bằng cách hút 0,1 ml dịch nghiên cứu cho vào ống nghiệm có môi trường thạch ở nhiệt độ 50^0C
    - Đậy nút bông lại, lắc nhẹ cho vi sinh vật phân phối đều trong môi trường
    - Đổ thạch này vào đĩa petri đã khử trùng
    - Xoay tròn đĩa để thạch phân bố đều mặt đĩa
    - Để yên cho môi trường đông đặc và ủ ở nhiệt độ thích hợp
- Cách 2:
    - Hút 0,1 ml dịch cần nghiên cứu cho vào đĩa petri có môi trường đặc
    - Dùng que trang trải đều khắp mặt đĩa
    - Ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp

e. Kết quả của việc nuôi cấy

Sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ và thời gian thích hợp cho mỗi loại vi sinh vật ta thấy:

- Trong môi trường lỏng: vi khuẩn phát triển sẽ làm đục môi trường
- Trong môi trường rắn ở thạch nghiêng:
    - Nấm men, vi khuẩn phát triển sẽ tạo những vệt nổi thạch trong hay trắng đục
    - Nấm mốc sẽ tạo nên những sợi mảnh từ vết cấy

6. BẢO QUẢN CHỦNG VI SINH VẬT THUẦN KHIẾT

1. Nguyên tắc

- Đảm bảo tốt các điều kiện trong quá trình bảo quản để không làm thay đổi phẩm chất ban đầu của giống.
- Làm chậm quá trình trao đổi chất và hô hấp ở vi sinh vật đồng thời ngăn cản quá trình sinh sản của chúng

2. Các phương pháp bảo quản

a. Phương pháp cấy chuyển định kỳ trên môi trường mới

Phương pháp này áp dụng để bảo quản tất cả các loại vi sinh vật

- Với nấm men, vi khuẩn: cấy chuyển sau 1 – 2 tháng
- Với nấm mốc: cấy chuyển sau 3 – 6 tháng

Thời gian giữa 2 lần cấy có thể kéo dài hơn nếu sau khi cấy vi sinh vật ta bảo quản ở nhiệt độ thấp (3 – 5^0C)

- Ưu điểm: phương pháp này đơn giản, dễ làm, thời gian bảo quả không lâu
- Nhược điểm: Tốn môi trường, công sức, thời gian. Phẩm chất ban đầu của giống có thể bị thay đổi do nhiều nguyên nhân khó xác định cụ thể trong quá trình cấy chuyển.

b. Phương pháp giữ giống trên đất, cát, hạt

- *Trên đất, cát*: bảo quản bào tử tiềm sinh (bào tủ vô tính) và thời gian bảo quản là một hoặc nhiều năm

Cách bảo quản:

- Đất, cát đem rây để lấy hạt đều và ngâm trong HCl hay trong H_2SO_4 đậm đặc 8 – 12 h để loại bỏ các acid hữu cơ trong cát
- Rửa kỹ dưới vòi nước cho đến khi pH trung tính
- Sấy khô và giữ ở điều kiện vô trùng.
- Đổ đầy cát vào ống nghiệm chứa vi sinh vật phát triển trên môi trường thạch và lắc thật đều.
- Rót toàn bộ cát và vi sinh vật vào một ống nghiệm khác
- Hàn kín miệng ống nghiệm này sẽ giữ được rất lâu.

- *Trên hạt*: bảo quản các chủng có dạng sợi dạng sinh bào tử hoặc không. Thời gian bảo quản có thể đạt 1 năm

Cách bảo quản:

- Hạt ngũ cốc được rửa sạch
- Nấu cho hạt vừa nứt, để ráo nước
- Cho các hạt ngũ cốc vào các ống nghiệm.
- Phủ trên mặt các hạt này một lớp bông thấm nước nấu hạt ngũ cốc
- Cấy giống vi sinh vật trên lớp bông cho mọc thật đầy
- Giữ ở nhiệt độ 15 – 20^0C.

c. Phương pháp đông khô

- Phương pháp này làm cho tế bào mất nước ở trạng thái tự do. Đồng thời làm giảm, thậm chí ngừng hẳn quá trình phân chia của vi sinh vật. Nhờ đó chúng chịu được nhiều tác động của ngoại cảnh
- Phương pháp này dùng nhiều trong sản xuất, thời gian bảo quản lên tới vài chục năm

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Nêu tóm tắt các nguyên tắc và phương pháp chung để phân lập vi sinh vật dạng thuần khiết
2. Nêu và phân tích điều kiện chính của quá trình nuôi cấy vi sinh vật?
3. Thực hành việc cấy chuyển từ các ống giống có sẵn sang các môi trường

BÀI SỐ 5: NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA VI SINH VẬT TRÊN KÍNH HIỂN VI

I. MỤC ĐÍCH – YÊU CẦU

1. Kiến thức lý thuyết

- Đặc điểm sinh học của các nhóm vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc, nấm men.
- Ý nghĩa của việc nghiên cứu các đặc điểm sinh học của các nhóm vi sinh vật
- Các đặc điểm sinh học đặc trưng của mỗi nhóm vi sinh vật

2. Kỹ năng thực hành

- Kỹ năng sử dụng kính hiển vi quang học
- Kỹ năng làm tiêu bản tạm thời, tiêu bản cố định.
- Kỹ năng nhuộm màu các tiêu bản
- Kỹ năng quan sát các đặc điểm sinh học của vi sinh vật trên kính hiển vi quang học

II. HÓA CHẤT – NGUYÊN LIỆU – DỤNG CỤ

1. Khái niệm thuốc nhuộm

- Thuốc nhuộm là hợp chất hóa học dùng để nhuộm màu
- Căn cứ vào tính chất hóa lý, chia làm 2 loại thuốc nhuộm chính:

• Thuốc nhuộm kiềm là thuốc nhuộm trong đó gốc kiềm có khả năng nhuộm màu, chúng kết hợp chặt chẽ với phần nhân tế bào.

Ví dụ: thuốc nhuộm tím gentian, fuchsin kiềm, safranin

• Thuốc nhuộm acid là thuốc nhuộm mà gốc kiềm có khả năng kết hợp chặt chẽ với các thành phần tế bào chất

Trong nghiên cứu vi sinh vật, người ta sử dụng chủ yếu là thuốc nhuộm kiềm vì tế bào của chúng bắt màu rất tốt với loại thuốc nhuộm này

2. Một số loại thuốc thuộm được sử dụng

Thuốc nhuộm Fuchsin:

1/ Rượu ethylic 96^0 : 10 ml
   Fuchsin kiềm: 0,3g

2/ Phenol: 5g
   Nước cất: 95 ml

Trộn dụng dịch 1 và dung dịch 2 lại rồi pha loãng 5 lần

- *Xanh Methylen* 0,001%

Xanh methylen: 0,1g

Nước cất: 1000ml

- *Xanh Methylen Loeffler*

Rượu ethylic: 300ml

Xanh methylen: 20g

Hòa tan hỗn hợp trên rồi lọc trong (1)

Dịch lọc (1) 30ml

KOH 1%: 1ml

Nước cất: 1000ml

- *Dung dịch lactophenol*

Phenol kết tinh: 10g

Acid lactic: 10g

Glycerin: 20g

Nước cất: 10ml

- *Tím gentian*

- Công thức:

1/ Gentian violet: 1g

Rượu ethylic 96^0: 10ml

2/ Phenol tinh khiết 5g

Nước cất 100ml

- Cách pha chế:
  - Dùng đũa thuỷ tinh khuấy cho tan hết gentian violet trong rượu
  - Trộn 2 dung dịch (1) và (2) rồi lọc trong
  - Để dịch lọc trong lọ màu
- Ghi chú: Hòa một phần cồn với thuốc nhuộm cho tan hết rồi cho acid vào, lắc đều. Tiếp tục thêm cồn cho đến khi mất hết váng kim loại trên mặt

- *Dung dịch lugol*

- Công thức: Iod tinh thể : 1g

KI: 2g

Nước cất: 300 ml

- Cách pha chế:

Hòa KI vào trong 5ml nước cất cho tan hết rồi cho iod tinh thể vào

Bổ sung đủ 300ml nước sau khi iod tan hết

- *Cồn 95%*
- *Aceton*

3. Nguyên liệu

- Ống thạch nghiêng cấy các loài vi sinh vật sau:
  - *Bacillus subtilis, Sarcina lutea*
  - *Penicillum italicum, Aspergillus niger*
  - *Streptomyces grisea*
  - *Saccharomyces cerevisiae*
- Môi trường Hansen nuôi cấy nấm men *Saccharomyces cerevisiae*
- Môi trường cao thịt – pepton dịch thể cấy *E.Coli*.
- Nước cất vô trùng

4. Dụng cụ

- Lame, lamelle
- Que cấy, đèn cồn
- Giấy lọc
- Bocan, cầu thủy tinh
- Bình tia
- Tăm tre vô trùng
- Kính hiển vi, dầu soi

III. LÀM TIÊU BẢN TẠM THỜI

1. Các đặc điểm của tiêu bản tạm thời

- Thao tác làm tiêu bản đơn giản, tiến hành nhanh.
- Quan sát được các trạng thái sống của tế bào như: sự chuyển động của tiên mao, sự sinh sản, sự hình thành bào tử.
- Chỉ sử dụng một lần rồi bỏ đi

2. Cách lấy giống vi sinh vật để làm tiêu bản

- Đốt đèn cồn lên
- Một tay cầm ống nghiệm chứa vi sinh vật
- Tay còn lại cầm que cấy để khử trùng
- Kéo nút bông ra khỏi ống nghiệm và khử trùng miệng ống nghiệm

- Đưa que cấy vào lấy sinh khối vi sinh vật.
- Rút que cấy ra, khử trùng miệng ống nghiệm
- Đưa giọt môi trường (hoặc sinh khối) vi sinh vật ở đầu que cấy đặt vào giữa lame để làm vết bôi
- Khử trùng lại que cấy

3. Cách làm tiêu bản giọt ép

- Dùng que cấy lấy giống vi sinh vật để làm vết bôi
- Đặt lamelle lên giọt canh trường, tránh tạo bọt khí
- Quan sát trên kính hiển vi
- *Chú ý*:
  - Nếu giọt dịch quá nhiều, tràn ra ngoài lamelle thì dùng giấy thấm bớt nước đi
  - Nếu cần quan sát lâu thì dùng vaselin bôi quanh mép lamelle để giọt dịch khỏi bị khô.

4. Cách làm tiêu bản tạm thời có nhuộm màu

a. Nguyên tắc

Phương pháp này sử dụng thuốc nhuộm không hoặc ít độc đối với vi sinh vật và được pha loãng ở nồng độ đảm bảo cho vi sinh vật vẫn sống và hoạt động sau khi nhuộm màu

b. Cách nhuộm: Có 2 cách nhuộm vi khuẩn sống:

Cách 1:

- Nhỏ 1 giọt thuốc nhuộm xanh methylen 0,001% lên lame
- Nhỏ 1 giọt canh trường vi sinh vật với thuốc nhuộm
- Đậy lamelle
- Quan sát tiêu bản ở vật kính X10 và X40

Cách 2

- Nhỏ 1 giọt thuốc nhuộm xanh methylen 0,001% lên lame
- Dùng que cấy dàn đều thành 1 vùng nhỏ rồi để khô tự nhiên.
- Nhỏ 1 giọt dịch vi khuẩn lên vùng màu đã khô
- Quan sát tiêu bản với vật kính X10 và X40

IV. LÀM TIÊU BẢN CỐ ĐỊNH

1. Các đặc điểm của tiêu bản cố định

Quan sát tiêu bản cố định là một phương pháp phổ biến trong nghiên cứu vi sinh vật học vì nó có ưu điểm sau:

- Tuy thao tác phức tạp nhưng tiêu bản có máu sắc đẹp, giữ được lâu
- Cho phép ta quan sát rõ ràng hình dạng và cấu tạo của tế bào, dễ dàng đếm số lượng vi sinh vật.
- Không sợ lây nhiễm khi làm việc với vi sinh vật gây bệnh.

2. Các bước tiến hành tiêu bản cố định

a. Làm vết bôi

- Chọn lame sạch và khô
- Lấy sinh khối vi sinh vật cho vào giữa lame.
- Để vết bôi khô tự nhiên trong không khí
- *Chú ý*:
    - Lượng vi sinh vật lấy vừa phải
    - Vết bôi tròn gọn, thật mỏng
    - Các tế bào vi sinh vật được dàn đều dễ quan sát

b. Cố định vết bôi

- Việc cố định vết bôi nhằm các mục đích sau:
    - Giết chết vi sinh vật để chúng dễ bắt màu và an toàn khi tiếp xúc.
    - Gắn chặt vi sinh vật vào lame để lúc rửa không bị trôi mẫu
- Các cách cố định:
    - ❖ Cố định bằng nhiệt
        - Là phương pháp đơn giản và phổ biến nhất
        - Dùng kẹp gỗ hay kẹp sắt để kẹp lame
        - Hơ mặt dưới của lam trên ngọn lửa đèn cồn, tránh không để quá nóng
    - ❖ Cố định bằng hóa chất:
        - Cách này tuy phức tạp nhưng không gây biến dạng tế bào, không gây biến đổi cấu trúc tế bào và không làm đứt các tiên mao.
        - Dùng các hóa chất là rượu và aceton để cố định vết bôi
        - Cách cố định:
            - ➢ Nhúng vết bôi vào rượu. Với rượu ethylic ngâm 5 – 15 phút, còn với rượu methylic ngâm 2 – 5 phút.
            - ➢ Ngâm vết bôi vào dung dịch aceton trong 15 phút

➢ Nhỏ vài giọt rượu 95% lên vết bôi. Đốt cháy và dậy tắt ngay. Làm như vậy vài lần rồi để khô

3. Nhuộm màu tiêu bản cố định

a. Nguyên tắc

- Sử dụng thuốc nhuộm có khả năng thẩm thấu qua màng tế bào và kết hợp với các thành phần khác nhau của tế bào thành những hợp chất màu đặc trưng bền vững.
- Tùy theo mục đích nghiên cứu và khả năng bắt màu khác nhau của những thành phần tế bào mà chọn loại thuốc nhuộm và cách nhuộm cho phù hợp.
- Có 2 cách nhuộm chính:
    - Nhuộm đơn: Chỉ dùng một loại thuốc nhuộm trên 1 tiêu bản
    - Nhuộm kép: Dùng đồng thời 2 hay nhiều loại thuốc nhuộm trên 1 tiêu bản

b. Cách nhuộm

- Đặt tiêu bản lên cầu thủy tinh
- Nhỏ vào vết bôi vài giọt Fuchsin, để yên 1 – 2 phút.
- Rửa vết bôi bằng cách nghiêng lame, dùng bình tia xịt nước cho chảy nhẹ qua vết bôi cho đến khi không còn màu nữa.
- Dùng giấy thấm khô tiêu bản hoặc hơ nhẹ tiêu bản trên đèn cồn.
- Quan sát tiêu bản ở vật kính X40 và X100 dùng dầu soi

V. QUAN SÁT ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CÁC NHÓM VI SINH VẬT

1. Quan sát các đặc điểm sinh học của vi khuẩn (*Bacteria*)

a. Các đặc trưng sinh học cần quan sát ở vi khuẩn

- Các kiểu hình dạng của tế bào
- Các kiểu liên kết giữa các tế bào
- Khả năng di động
- Khả năng hình thành bào tử
- Nhuộm Gram

b. Cách quan sát

Quan sát ở cầu khuẩn

- Làm tiêu bản giọt ép với ống thạch nghiêng cấy vi khuẩn *Sarcina lutea*.
- Quan sát các tiêu bản trên kính hiển vi với vật kính X40

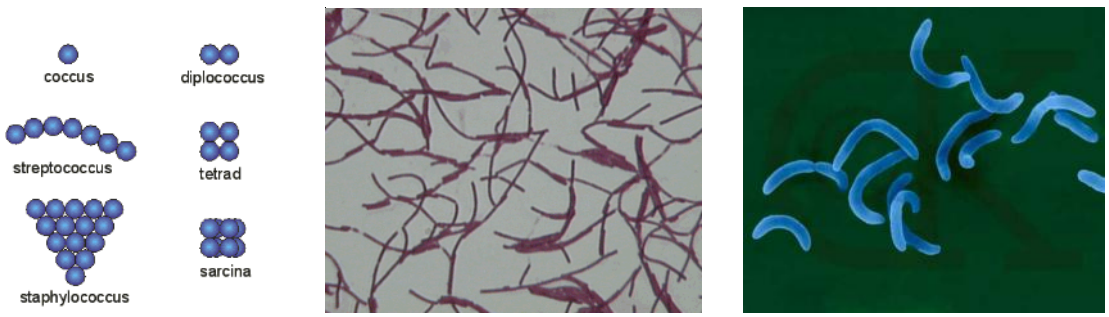
- *Yêu cầu*:
    - Vẽ hình dạng tế bào, các kiểu liên kết giữa các tế bào
    - Nhận xét về sự chuyển động của tế bào

Quan sát ở trực khuẩn

- Làm tiêu bản giọt ép với vi khuẩn *E.Coli* trong môi trường dịch thể (1)
- Làm tiêu bản nhuộm đơn với vi khuẩn *Bacillus subtilis* nuôi cấy trong thạch nghiêng (2)
- *Yêu cầu*:
    - Tiêu bản 1: quan sát ở vật kính X40. Vẽ hình, nhận dạng sự chuyển động của tế bào.
    - Tiêu bản 2: quan sát ở vật kính X40 và X100 bằng dầu soi
    - Vẽ hình và nhận xét về hình dạng tế bào; hình dạng, số lượng và vị trí của bào tử trong tế bào

Quan sát ở xoắn khuẩn

- Làm tiêu bản cố định nhuộm màu với bựa răng để quan sát vi khuẩn *Vibrio, Spirochae, Spirillum.*
- *Chú ý*: dùng tăm lấy bựa răng làm vết bôi
- Lấy bựa răng vừa phải, dàn đều mới quan sát được
- Quan sát ở vật kính X40 và X100 bằng dầu soi
- Vẽ hình các dạng xoắn khác nhau của vi khuẩn (xoắn từ 1 vòng đến nhiều vòng)



a) **b)** **c)**

Hình 13: Các hình dạng chính của vi khuẩn

a) cầu khuẩn
b) trực khuẩn
c) phẩy khuẩn hay xoắn khuẩn

2. *Quan sát đặc điểm sinh học của xạ khuẩn* (*Actinomycetes*)

a. Các đặc điểm sinh học đặc trưng cần quan sát

- Hình dạng bào tử
- Đặc điểm cuống sinh bào tử
- Phương thức hình thành chuỗi bào tử

b. Cách quan sát

- Làm tiêu bản giọt ép với *Streptomyces grisea* trên thạch nghiêng (khi làm tiêu bản này phải dùng que cấy đầu nhọn dìm khuẩn ty xạ khuẩn trong giọt nước và tách rời các sợi, sau đó đậy lamelle rồi quan sát)
- Làm tiêu bản nhuộm đơn với xạ khuẩn trên
- Yêu cầu: Quan sát tiêu bản ở vật kính X10 và X40. Vẽ hình và nhận xét hình dạng chung của xạ khuẩn.
- Làm tiêu bản quan sát cuống sinh bào tử:
    - Cấy xạ khuẩn vào môi trường trên đĩa petri
    - Dùng lamelle cắm vào bề mặt thạch nghiêng một góc 45^0.
    - Đậy đĩa petri thích hợp và ủ ở nhiệt độ thích hợp
    - Sau đó lấy lamelle ra, đậy lên lame và quan sát
- Làm tiêu bản quan sát bào tử
    - Dùng lame ấn nhẹ lên mặt thạch đã có xạ khuẩn mọc
    - Quan sát trên kính hiển vi với vật kính X100
    - Vẽ hình và nhận xét về cuống sinh bào tử và bào tử xạ khuẩn

3. Quan sát đặc điểm sinh học của nấm mốc (*Molds*)

a. Các đặc điểm sinh học đặc trưng cần quan sát

- Đặc điểm của sợi nấm: màu sắc, có vách ngăn hay không?
- Đặc điểm của cơ quan sinh sản: hình dạng, cách sắp xếp các bộ phận của cơ quan sinh sản.
- Hình dạng, cấu tạo, cách sắp xếp của bào tử

b. Cách quan sát

- Làm tiêu bản nấm mốc không nhuộm màu
    - Nhỏ 1 giọt lactophenol lên lame
    - Dùng que cấy lấy khuẩn lạc nấm *Penicillum* hoặc *Aspergillus niger* và dàn mỏng
    - Đậy lamelle và quan sát ở vật kính X10 và X40

Vẽ hình và nhận xét chung hình dạng của sợi nấm; vị trí, hình dạng, cách sắp xếp chung của bào tử, thể bình, cuống thể bình, cuống bào tử đính của 2 loại nấm mốc trên

- Làm tiêu bản nấm mốc nhuộm màu:
    - Nhỏ 1 giọt dung dịch xanh cotton lên lame
    - Lấy 1 ít sợi nấm dàn đều trên lame
    - Đậy lamelle và quan sát ở vật kính X40
    - Vẽ hình cấu tạo sợi nấm và cơ quan sinh sản

4. Quan sát đặc điểm sinh học của nấm men (*Yeasts*)

a. Những đặc điểm sinh học cần quan sát

- Hình thái, kích thước tế bào nấm men
- Sự nẩy chồi của nấm men
- Hình dạng, số lượng bào tử trong 1 túi bào tử

b. Cách quan sát

- Làm tiêu bản nhuộm đơn nấm men cấy trong môi trường xanh methylen Loffler
- ***Yêu cầu***:
    - Quan sát kính hiển vi ở vật kính X40 và X100
    - Vẽ hình chú thích màng tế bào chất, không bào của tế bào

VI. PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GRAM

1. Hóa chất – nguyên liệu - dụng cụ

a. Hóa chất – Nguyên liệu

Hóa chất

- Các loại thuốc nhuộm
- Nước muối sinh lý: dung dịch NaCl 0,85%

Nguyên liệu

- Các ống thạch nghiêng nuôi cấy các giống vi sinh vật: *B.subtilis, E.Coli.*

b. Dụng cụ

- Ống nghiệm đựng nước cất vô trùng
- Lame, lamelle
- Que cấy, đèn cồn, diêm quẹt
- Bình đựng nước rửa tiêu bản
- Chậu thủy tinh
- Cốc thủy tinh, cầu thủy tinh

- Kính hiển vi, dầu soi kính
- Giấy lọc, kẹp sắt

2. Nguyên tắc nhuộm gram

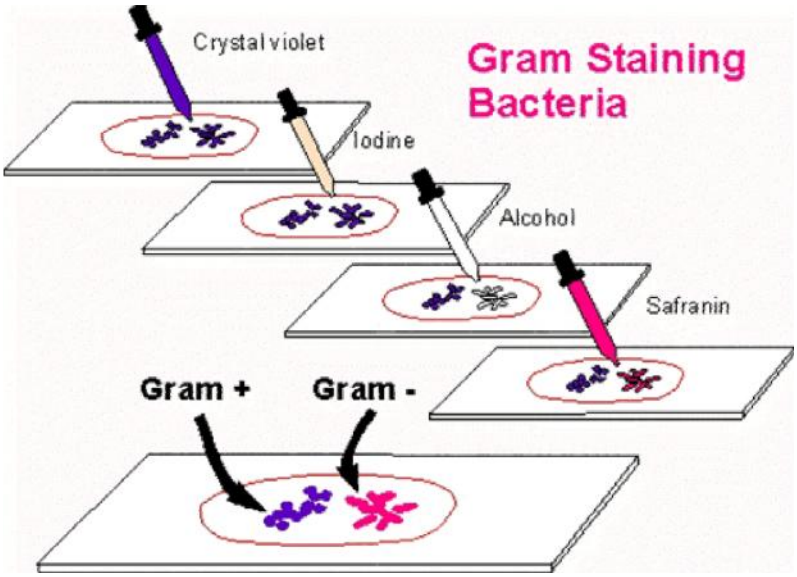
Dựa trên khả năng bắt màu của tế bào chất và màng tế bào với thuốc nhuộm tím kết tinh và iod mà hình thành nên hai loại phức chất khác nhau

- Loại phức chất thứ nhất vẫn giữ nguyên màu của thuốc nhuộm nên không bị rửa trôi khi xử lý bằng cồn. Vi sinh vật có phức chất này là vi khuẩn gram dương.
- Loại phức chất thứ hai không giữ được màu của thuốc nhuộm nên mất màu khi xử lý bằng cồn và bắt màu của thuốc nhuộm bổ sung. Vi sinh vật có phức chất này thuộc loại gram âm.

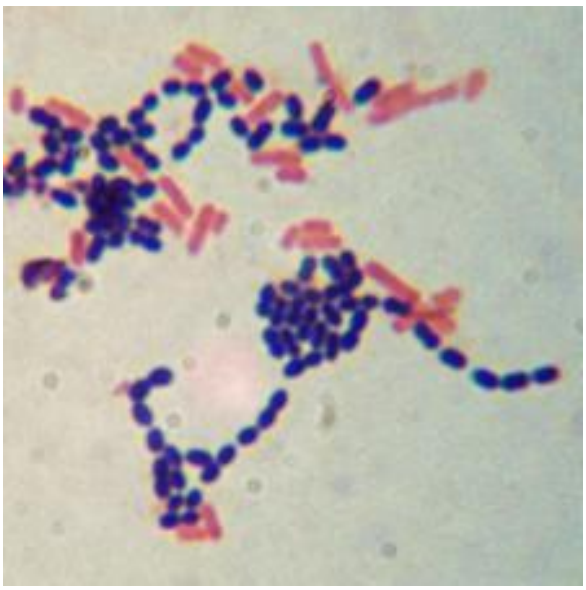
3. Các bước tiến hành

- Làm tiêu bản
  - Dùng que cấy lấy nước vô trùng để làm 3 vết bôi trên lame (hai đầu và giữa lame).
  - Dùng que cấy lấy một chút sinh khối làm vết bôi theo thứ tự sau:
    - Bên trái lame là *B.subtilis*
    - Bên phải lame là *E.Coli*
    - Ở giữa lame là *B.subtilis* trộn lẫn với *E.Coli*
  - Để khô vết bôi trong không khí hoặc cố định nhẹ trên đèn cồn.
- Nhuộm tiêu bản:
  - Đặt 3 miếng giấy lọc lên 3 vết bôi
  - Nhuộm tiêu bản bằng thuốc nhuộm tím kết tinh qua giấy lọc trong 1 phút.
  - Nhuộm lugol trong 1 phút
  - Rửa nước
  - Tẩy cồn trong 30 giây, để nghiêng tiêu bản, nhỏ từ từ từng giọt cồn cho đến khi tan hết màu
  - Rửa nước
  - Nhuộm bổ sung Fuchsin hoặc safranin từ 10 – 30 giây
  - Rửa nước
  - Làm khô và soi tiêu bản với vật kính dầu
- Kết quả:
  - Với vết bôi của *B.subtilis* màu tím – gram dương

- Vết bôi trộn *B.subtilis* + *E.Coli* có màu hồng lẫn màu tím
- Vết bôi của *E.Coli* màu hồng - gram âm



Hình 14: Các bước nhuộm gram



Hình 15: Kết quả sau khi nhuộm gram

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1) Thực hành làm tiêu bản giọt ép đối với vi khuẩn *E.Coli*. Vẽ hình và chú thích các đặc điểm quan sát được.

2) Thực hành làm tiêu bản nhuộm đơn với vi khuẩn *B.subtilis*, vi khuẩn bựa răng. Vẽ hình và chú thích các đặc điểm quan sát được

3) Làm tiêu bản nhuộm màu *A.niger*. Vẽ hình và chú thích các cơ quan mang bào tử của chúng

4) Trình bày nguyên tắc và ý nghĩa của việc nhuộm kép.

5) Nêu tên các loại thuốc nhuộm sử dụng trong nhuộm gram

6) Trình bày của nguyên tắc nhuộm gram

7) Tóm tắt phương pháp nhuộm gram. Vẽ hình, chú thích kết quả nhuộm gram