

B GIÁO D C VÀ ÀO T O
TR NG I H C M THÀNH PH H CHÍ MINH
KHOA CÔNG NGH SINH H C

Giáo trình
TH C T P VI SINH C S

Biên so n: Nguy n V n Minh
D ng Nh t Linh

Tp. HCM, n m 2008
(L u hành n i b)

M C L C

Bài 1: Các qui t c an toàn trong phòng thí nghi m vi sinh v t

Bài 2: Trang thi t b - d ng c - các ph ng pháp kh trùng

Bài 3: S d ng kính hi n vi quang h c quan sát t bào vi sinh v t

Bài 4: Pha ch môi tr ng dinh d ng

Bài 5: Các ph ng pháp phân l p vi sinh v t

Bài 6: Các ph ng pháp quan sát vi sinh v t

Bài 7, 8: Các c tính sinh hóa c a vi sinh v t

Bài 9: Ph ng pháp ki m tra s l ng t bào vi sinh v t

Bài 1: CÁC QUI T C AN TOÀN TRONG PHÒNG THÍ NGHI M VI SINH V T

Thao tác an toàn là yêu c u c c k quan tr ng i v i thí nghi m vi sinh v t. Vi sinh v t có kích th c nh bé mà m t th ng không nhìn th y c. Trong quá trình làm thí nghi m, chúng ta th ng thao tác v i s l ng r t l n và m c t bào vi sinh v t. Bên c nh nh ng gi ng, loài vi sinh v t có ích là nh ng gi ng, loài có kh n ng gây b nh và có h i i v i s c kh e con ng i. M t khác, trong quá trình thí nghi m chúng ta c ng ph i s d ng nhi u lo i hóa ch t, trong ó có nh ng hóa ch t có c tính. Chính vì th , ng i làm thí nghi m trong phòng thí nghi m vi sinh v t c n tuân th các qui t c c b n sau ây:

1. Nh ng qui nh chung:

- Nh ng ng i không có nhi m v không c vào phòng thí nghi m.
- Khi vào phòng thí nghi m ph i m c áo Blouse (cài khuy kín), c t tóc g n gàng.
- Không nói chuy n n ào, gi gìn tr t t . Không n u ng, hút thu c trong phòng ki m nghi m.
- Mang kh u trang, g ng tay khi thao tác v i vi sinh v t và hóa ch t.
- Trên bàn thí nghi m ch v t d ng thí nghi m, s ghi chép, gi y ghi chép. T t c các v t d ng cá nhân, áo khoác, túi xách, sách v ,... ph i úng n i qui nh.
- Tr c và sau khi k t thúc thí nghi m, ph i sát trùng m t bàn b ng các hóa ch t sát trùng ã chu n b s n và lau khô b ng gi y v sinh.

- C n ghi chú tên ch ng, ngày tháng thí nghi m, ng i là thí nghi m lên t t c các h p petri, ng nghi m,...
- Tuy t i không canh tr ng hay v t ph m có vi sinh v t d y lên qu n áo, sách v và d ng c cá nhân. ng th i c ng ph i chú ý b o v da và qu n áo kh i b dính hóa ch t và thu c nhu m.
- C n th n khi thao tác v i èn c n ho c èn Bunsen. T t ng n l a khi ch a có nhu c u s d ng ho c ngay sau khi th c hi n xong m i thao tác. Tuy t i không dùng èn c n m i l a èn c n.
- S d ng qu bóp cao su khi thao tác ng hút nh l ng (pipette), Tuy t i không hút b ng mi ng.
- Không t ý s d ng trang thi t b , d ng c trong phòng thí nghi m khi ch a c h ng d n c th . S d ng theo h ng d n, h t s c th n tr ng, tránh làm v và h h ng.
- T t c các v t li u b nhi m b n c n ph i c kh trùng tr c khi v t b ho c s d ng l i.
- K t thúc thí nghi m ph i v sinh các thi t b , d ng c ã s d ng theo úng qui trình và s p x p vào úng n i qui nh.
- R a tay s ch s tr c khi r i phòng thí nghi m.
- T t c các tr ng h p tai n n ph i báo cáo cho cán b h ng d n thí nghi m k p th i và x lý.

2. M t s l u ý v i sinh viên nh m t k t qu t t trong th c hành vi sinh v t

• Tr c khi th c hành:

- C n c bài tr c n i dung toàn bài hình dung c kh i l ng công vi c s làm.

- Hi u rõ nguyên t c, m c ích c a các thí nghi m.
- c c n th n cách ti n hành thí nghi m.
- **Trong gi th c hành:**
 - Ghi chú c n th n nh ng c n d n c a gi ng viên v các thao tác và qui trình th c hành.
 - Th c hi n thí nghi m theo úng h ng d n c a gi ng viên.
 - Trong quá trình thí nghi m có nh ng thao tác, công o n không rõ c n h i l i gi ng viên h ng d n.
 - Ghi chép c n th n các chú ý quan tr ng c a thí nghi m và k t qu c a m i thí nghi m.
- **K t thúc th c hành:**
 - Làm báo cáo th c hành theo yêu c u c a gi ng viên.

Bài 2: TRANG THI T B - D NG C - CÁC PH NG PHÁP KH TRÙNG

I/ TRANG THI T B - D NG C .

A. M t s trang thi t b , d ng c thông d ng.

1. T s y (vacuum oven): t^o t 60°C – 200°C, dùng s y khô, kh trùng các lo i d ng c ch u c s c nóng khô, ch y u là d ng c th y tinh, kim lo i. Tùy vào i t ng c n kh khu n mà s y ch t^o và th i gian khác nhau, th ng s y 160°C/2 gi , ho c 180°C/30 phút.



Hình 1: Tủ sấy

2. Tủ ấm (incubator or etuve): Tủ ấm có thể điều chỉnh nhiệt độ từ 20°C – 60°C, có chức năng nuôi cấy vi sinh vật hiếu khí thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Tùy vào loại vi sinh vật nuôi cấy mà nhiệt độ khác nhau vì sinh vật có thể phát triển tốt. Ví dụ: Coliform 30°C/24h – 48h, E. coli thích hợp 44°C/24h – 48h.
3. Tủ lạnh hay tủ mát (freezer): dùng bảo quản môi trường đã pha chế, giống vi khuẩn, các chế phẩm sinh học (vaccin, huyết thanh, kháng sinh,...), hóa chất, thuốc thử phân hủy nhiệt thông thường.
4. Tủ hấp (Autoclave): Tủ này có áp suất bên trong cao (hình thức bão hòa áp suất cao), có chức năng khử trùng môi trường, mặt sử dụng nguyên liệu và dụng cụ thí nghiệm. Tùy vào loại vi sinh vật mà sử dụng nhiệt độ và áp suất thích hợp, thông thường dùng 121°C/1 atm/ 15 phút. Hay 127°C/1.5 atm/30 phút với môi trường lỏng, 117°C/ 0.8 atm/15 phút với môi trường chấy nhũ tương, môi trường rắn.....

Ch s áp k c a n i h p áp su t:

Ch s áp k (n v :atm)	0	0,2	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,5	2,0
T° sôi h i n c (n v :°C)	100	105	110	112	114	116	117	119	121	127	134
T° sôi h i n c (n v : °F)	212	221	230	234	237	241	243	246	250	261	273



Hình 2 : N i h p

5. Cân phân tích i n t (analytical balance): tr ng l ng t
100 μ g – 200g. chính xác 10⁻⁴g. Cân k thu t (technical
balance)- chính xác 10⁻²g. Dùng cân hóa ch t, môi tr ng.



Hình 3 : A- cân phân tích, B- cân k thu t

6. T c y vô khu n có ền c c tím (UV) (flux laminar): Có không gian vô trùng c s d ng thao tác v i vi sinh v t nh h th ng ền t ngo i và b ph n th i khí vô trùng.



Hình 4: t c y

7. Máy ly tâm (centrifuge): Dùng tách các ch t các pha r n-l ng ra kh i nhau nh tách sinh kh i t bào ra kh i môi tr ng nuôi c y, tách h ng c u, enzyme,...



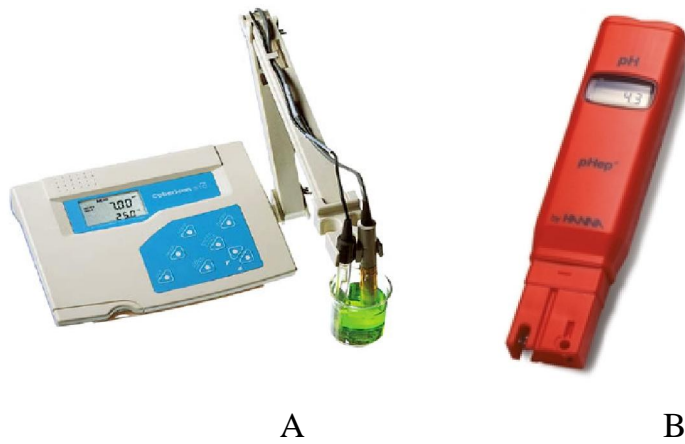
Hình 5: máy ly tâm

8. Máy l c (shaker): Thi t b dùng nuôi c y, nhân gi ng vi sinh v t b ng cách l c các bình nuôi c y theo các chỉ u khác nhau (l c vòng và l c ngang) m t cách u n t ng l ng oxy hòa tan trong môi tr ng.



Hình 6: máy l c

9. Kính hi n vi (microscope): có vai trò r t quan tr ng nghiên c u vi sinh v t. Dùng nghiên c u, quan sát t bào vi sinh v t v c i m hình thái, sinh lý nh vào kh n ng phóng i c a kính (s gi i thi u chi ti t bài s d ng kính hi n vi).
10. Máy o pH (pH meter): o pH dung d ch, môi tr ng nuôi c y,...



Hình 7: A- máy o pH bàn, B- máy o pH c m tay

11. Máy c t n c (single/ double water stills): dùng c t n c.



Hình 8: máy c t n c l l n

12. B n nhi t (water bath): ch a n c và c cài t nhi t
nh t nh n nh nhi t cho nh ng thí nghi m c n s n
nh v nhi t .



Hình 9: B n nhi t

13. N i lên men (fermenter): thi t b lên men nuôi c y vi sinh v t.



Hình 10: N i lên men

14. Các thi t b khác nh : máy m vi sinh v t, máy quang ph , s y
ông khô,...

B. D ng c

Ø Th y tinh: có nhi u lo i v i nhi u kích c khác nhau nh bình tam giác, ng nghi m, a petri, lam kính, a th y tinh, que trang, ng ong, c c ong, bình nh m c,... yêu c u ph i s ch, trong, trung tính. Tr c khi dùng ng môi tr ng ph i c s y khô, làm nút bông và kh trùng trong t s y khô.

- i v i d ng c m i: c n ngâm n c ho c dung d ch H_2SO_4 loãng trong 24 gi . Sau ó m i r a l i b ng n c ho c xà phòng nhi u l n cho n khi pH trung tính.
 - i v i d ng c ã qua s d ng còn ch a môi tr ng và vi sinh v t, c n kh trùng r i m i r a s ch b ng xà phòng, ph i và s y khô.
 - i v i d ng c b bám b n, c n ngâm thêm v i dung d ch sulfocromic vài gi , sau ó r a l i b ng n c s ch.
D ng c s ch khi a lên ánh sáng không có v t m và v t b n.
2. Các d ng c khác: nh òn c n, giá ng nghi m, que c y, k p, kéo, b m tiêm nh a, u tít, b p i n,...

II/ PH NG PHÁP KH TRÙNG.

Nguyên t c.

Di t trùng hay kh trùng là ph ng pháp nh m c ch ho c lo i b , cu i cùng là gi t ch t các vi sinh v t không mong mu n.

Ng i ta th ng kh trùng b ng 2 ph ng pháp chính:

A. Ph ng pháp lý h c.

1. Nhi t khô.

- i v i d ng c c y kim lo i, ôi khi c th y tinh, ph ng pháp th ng dùng là t: t tr c ti p trên ng n l a ho c nhúng c n t.
- i v i d ng c th y tinh có th gói gi y và s y $160^{\circ}C/ 1 gi$.
D ng c a vào s y ph i ch u c nhi t cao và không bu c dây nh a ho c thun.

2. Nhi t m.

- Ph ng pháp lu t: cho v t kh trùng vào n c sôi, nhi t s th m nhanh vào m u v t làm cho protein ông k t, d n n gi t

ch t vi sinh v t. Tuy nhiên, ch di t t bào sinh d ng, bào t v n còn.

- Ph ng pháp Pasteur: Ch di t vi khu n gây b nh (ký sinh), không di t bào t và vi khu n ho t sinh. Ph ng pháp này không di t hoàn toàn m m b nh mà ch ch n m t vài vi sinh v t i kháng m nh nh t. Vì v y, ph i bi t nhi t và th i gian di t cho t ng lo i vi sinh v t.
- Ph ng pháp Tyndall: un cách th y nhi u l n nhi t 70-80°C, m i l n 30-60 phút và liên ti p trong 3 ngày li n.

- Ph ng pháp h i n c b o hòa áp su t cao: dùng autoclave.

3. Di t trùng b c x .

- Tia t ngo i hay UV: ch sát trùng b m t, không xuyên sâu vào m u v t.
- Tia âm c c: dùng trong di t trùng d ng c gi i ph u, thu c, th c ph m. V t kh trùng ph i bao gói kín.

4. Di t trùng b ng sóng.

- Sóng ng n khi tác ng v i c ng và th i gian thích h p có th phá v t bào vi sinh v t, làm ch t các t bào s ng.

5. Di t trùng b ng cách l c.

- D ng c l c th ng là nh ng màng x p b ng s , aminate, cellulose,... th ng là nh ng v t ph m l ng không kh trùng b ng nhi t c.
- i v i kh trùng không khí thì thi t b kh trùng là m t máy l c khí có trang b màng l c hay h p ph vi khu n.

B. Ph ng pháp hóa h c.

1. Ch t sát khu n ngoài da: xà phòng, c n, iod, ph m màu (ph n l n ph m màu có tác d ng sát khu n nh : xanh methylene).
2. Ch t di t khu n và t y u : phenol, formol, h p ch t Clor,...

III/ TH C HÀNH.

Gi ng viên gi ng nguyên lý, công d ng thi t b và h ng d n sinh viên cách s d ng các thi t b có trong phòng thí nghi m.

IV/ BÁO CÁO K T QU .

Trình bày l i nguyên lý, công d ng và cách s d ng các thi t b ã c h c.

B ài 3: S D NG KÍNH HI N VI QUANG H C QUAN SÁT T B ÀO VI SINH V T

I. GI I THI U CÁC LO I KÍNH HI N VI.

1. Kính hi n vi n n en.

Nguyên t c:

Ánh sáng th ng chi u t d i lên, qua rìa c a t quang n n en, chi u h t vào xung quanh tiêu b n, nh ng tia sáng này b tiêu b n làm khúc x r i a vào v t kính. Tiêu b n c soi sáng r c trên n n en, gi ng nh trong phòng t i có m t tia sáng m nh chi u vào, giúp th y rõ t ng h t b i trong không khí b tia sáng chi u vào.

Ch c n ng: quan sát hình thái và c tính c a m t s vi khu n mà kính hi n vi th ng khó quan sát.

2. Kính hi n vi i pha.

Nguyên t c: ánh sáng th ng b i pha và biên dao ng b i c u trúc c bi t c a t quang kính, v t kính và th kính.

Ch c n ng: dùng quan sát rõ nét các c u trúc nh nh tiên mao, các l p màng.

3. Kính hi n vi hu nh quang.

Nguyên t c: chùm tia t ngo i chi u vào tiêu b n ã nhu m màu b ng các ch t hu nh quang. Trong t bào, các c u trúc khác nhau s phát quang v i màu s c khác nhau.

Ch c n ng: quan sát và phân bi t c các c u trúc khác nhau trong t bào vi sinh v t.

4. Kính hi n vi i n t .

Nguyên t c: chùm tia i n t b c sóng r t ng n, n ng su t phân li r t l n nên phân gi i cao, giúp phân bi t 2 i m r t g n nhau.

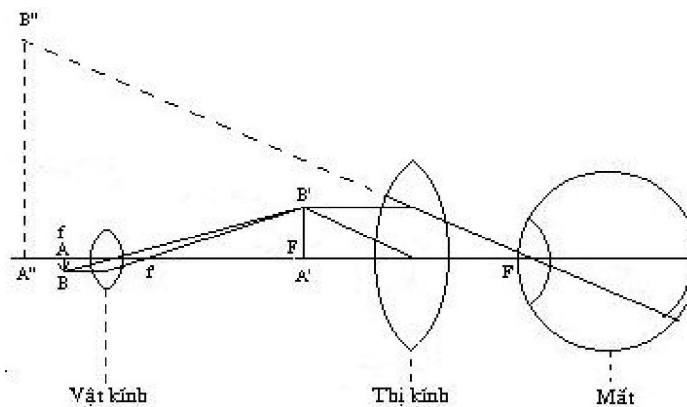
Ch c n ng: dùng quan sát virus, c u trúc phân t c a t bào.

5. Kính hi n vi quang h c.

II. KÍNH HI N VI QUANG H C.

1. Nguyên t c: dùng ánh sáng có b c sóng t 500nm – 560 nm trong chùm ánh sáng th ng t o n ng su t phân ly l n giúp phân bi t 2 i m cách nhau kho ng 0.2 μ m tr lên.

H th ng phóng to c a kính hi n vi quang h c g m hai b ph n: V t kính (quay v phía v t quan sát) và th kính (quay v phía m t nhìn). M i b ph n này là m t h th ng th u kính h i t ph c t p, m u v t c n quan sát AB c t tr c v t kính m t kho ng cách l n h n tiêu c c a v t kính m t chút. nh th t o ng c A'B' c a v t s thu c bên kia v t kính, n m trong kho ng tiêu c c a th kính. Th kính ho t ng nh m t kính lúp. Qua th kính, ng i ta s th y nh o A''B'' c phóng to lên c a nh th t A'B'.



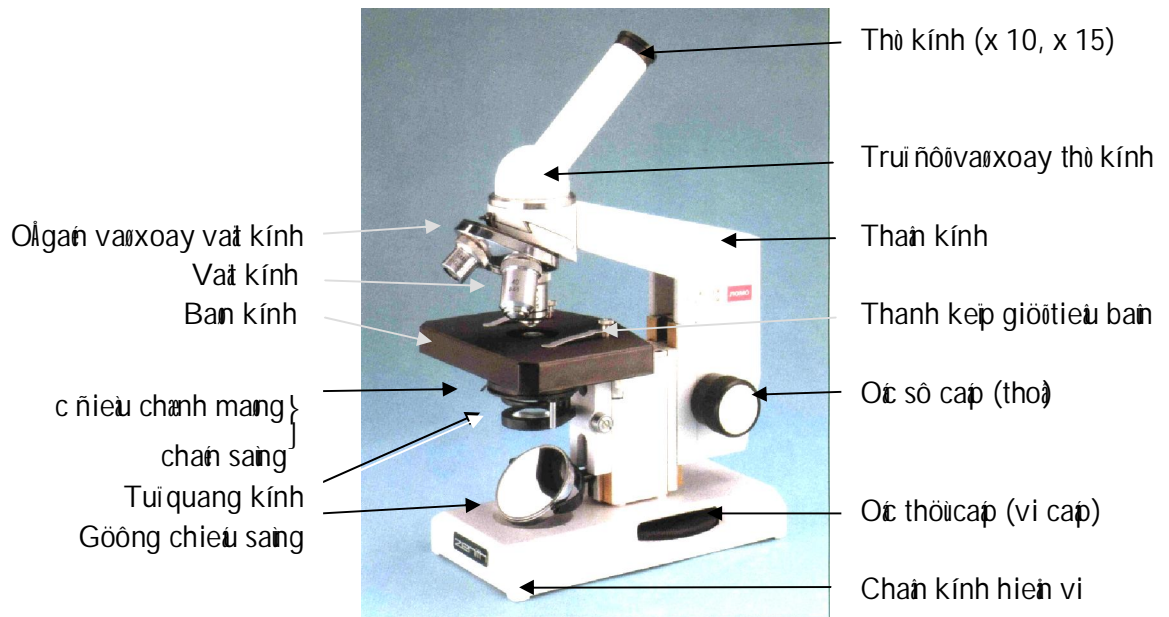
Hình 11. Nguyên t c quang h c c a kính hi n vi.

2. Ch c n ng: quan sát t bào vi sinh v t, ký sinh trùng, t bào ng v t, h c v t.

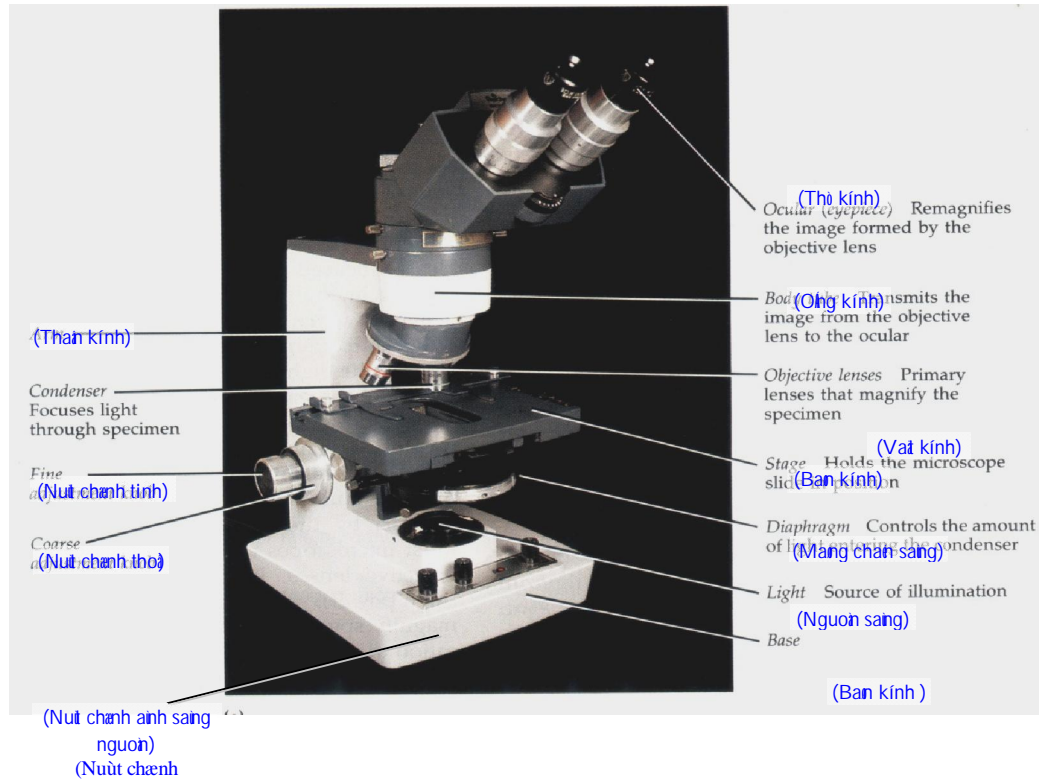
3. C u t o: g m 2 b ph n.

- H th ng c h c: giá kính g m chân kính, thân kính, tr và xoay th kính, g n và xoay v t kính, bàn kính, thanh tr t di chuy n tiêu b n, c di chuy n thanh tr t, k p gi tiêu b n, c di chuy n t quang kính, c i u ch nh s thô c p, c i u ch nh th c p (vi c p).
- H th ng quang h c g m: th kính, v t kính, t quang kính, màn ch n sáng, ngu n chi u sáng (òn i n chi u sáng và/ ho c kính chi u sáng).

Ngoài ra, kính dùng ngu n chi u sáng là òn i n thì có thêm b ph n cung c p i n nh phích c m, dây i n, c u chì, m ch i n (trong chân kính) và nút i u ch nh c ng chi u sáng.



Hình 12: Các b ph n KHV quang h c – dùng g ng.



Hình 13: Các bộ phận KHV quang học dùng đèn.

4. Nguyên tắc hoạt động.

Vật kính là hệ thống quang học phức tạp gồm nhiều thấu kính, trục tiêu điểm phóng đại hình ảnh vật. Các thấu kính sắp xếp theo thứ tự, thấu kính ngoài cùng hướng vào tiêu điểm có phóng đại lớn nhất. Thấu kính tiếp theo thu tiêu cự, tức bán kính cong của thấu kính. Thấu kính càng cong, tiêu cự càng ngắn thì khả năng phóng đại càng lớn.

Có 2 loại vật kính:

Vật kính khô phóng đại như x8, x10, x15, x40, x45.

Vật kính dầu có phóng đại lớn như x90, x100.

Thấu kính có cấu tạo phức tạp, gồm 2 thấu kính, một hướng vào mắt người xem, một hướng vào vật kính. Thấu kính phóng đại hình ảnh lần đầu do vật kính thu vào, làm ảnh to lên, xem rõ hơn.

phóng i c a kính = phóng i c a v t kính x phóng i c a th kính.

Ví d : phóng i c a v t kính: x100

phóng i c a th kính: x10

phóng i c a kính: 100 x 10 = 1.000 l n.

N ng su t phân ly c a kính quan tr ng h n phóng i, và là tiêu chu n chính ch n kính hi n vi.

N ng su t phân ly (phân gi i) c a kính hi n vi là i l ng cho bi t kh n ng phân bi t hai i m c a v t quan sát n m sát nhau. N u kho ng cách gi a 2 i m n m càng sát nhau mà v n có th phân bi t c thì n ng su t phân ly c a kính càng cao.

Khoảng cách này phụ thuộc chiều dài sóng ánh sáng sử dụng và số lượng tia sáng n i vào vật kính, n o c biểu hi n bằng công thức:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

λ : dài b c sóng phát ra t m u v t.

n : Ch s chi t quang c a môi tr ng gi a m u v t và v t kính.

α : N a góc m c a v t kính.

$2n \sin \alpha$: Tr s m c a v t kính.

Qua ó, ta th y mu n có phân ly cao ph i dùng ánh sáng có b c sóng th t ng n, ho c dùng v t kính có tr s m l n.

N u dùng v t kính có tr s m 0,65 và soi v i ánh sáng tr ng (có b c sóng trung bình $\lambda = 0,55 \mu\text{m}$) thì kho ng cách nh nh t có th nhìn th y rõ c là:

$$d = \frac{0,55}{0,65} = 0,85 \mu\text{m}$$

Vì nh ng chi ti t có kho ng cách nhau d i 0,85 μm thì ng i ta không phân bi t c. Trong khi ó n u dùng th kính có phóng i l n h n c ng không ích gì mà ph i thay v t kính khác có tr s m l n h n.

N u thay v t kính chìm (v t kính d u – x100) thì kho ng cách nh nh t gi a các chi ti t c a v t soi có th th y c là:

$$d = \frac{0,55}{1,25} = 0,44 \mu\text{m}$$

Vì λ ã xác nh b i ngu n ánh sáng th y, mu n gi m d t ng kh n ng phân tích c a kính thì ch có cách là t ng $n \sin \alpha$. Trong s này góc α b gi i h n b i nhi u sai l ch khó i u ch nh, còn l i là ch s chi t quang n. Nh ng n không c cao h n ch s chi t quang c a các th u kính trong v t kính, nên ng i ta ch nâng n gi a v t kính và m u v t b ng m t ch t d u g i là d u bách h ng (d u cede) t ch s chi t quang t i a mong mu n b ng ch s chi t quang c a th u kính.

$$n_{\text{khong khí}} = 1,000$$

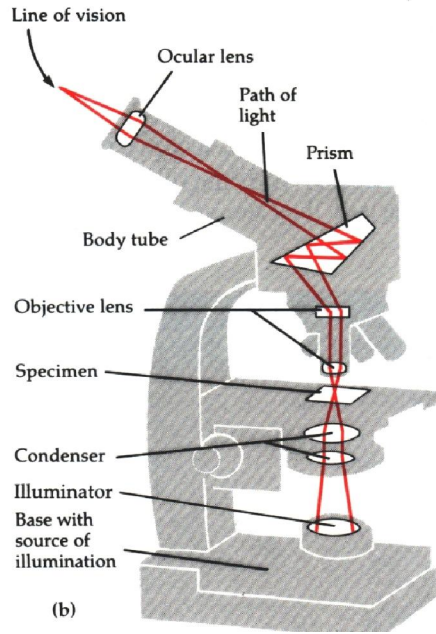
$$n_{\text{thuy tinh}} = 1,515$$

$$n_{\text{dau soi}} = 1,520$$

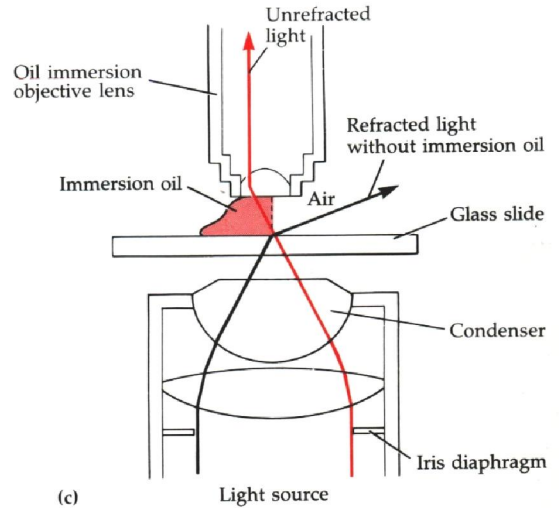
Chi t su t ánh sáng c a không khí nh h n th y tinh, nên tia sáng khi i qua tiêu b n th y tinh s b khúc x m t ph n. Ph n phía ngoài c a tia sáng do b khúc x nên không i vào c v t kính. V t kính có phóng i l n thì ng kính c a th u kính càng nh , l ng tia sáng i vào c v t kính r t ít, nên không

th y rõ nh. h n ch nh c i m này ta dùng d u soi có
 chi t su t ánh sáng g n b ng th y tinh, th y tinh và d u soi
 c xem nh m t môi tr ng ng nh t. Ánh sáng i qua
 không b khúc x , nên t p trung y vào v t kính, giúp xem
 rõ nh.

N ng su t phân ly c a kính càng cao thì góc nghiêng càng l n
 và b c sóng càng nh . T ng góc nghiêng b ng cách ch t o v t
 kính sao cho v t quan sát (tiêu b n) c t g n v t kính.



Hình 14: ng i c a tia sáng



Hình 15: Nguyên lý

ho t ng c a

v t kính d u

D i ây các b ng thông s chính c a v t kính và th kính:

Ký hi u ghi trên v t kính	phóng i c a m VK		Kho ng cách t VK n tiêu b n (mm)	ng kính vi tr ng khi quan sát b ng th kính x10 (mm)
V t kính khoâ				
8 x 0,20	8	0,20	8,91	1,75

10 x 0,25	10	0,25	6,80	
40 x 0,65	40	0,65	0,60	0,35
V t kính d u				
90 x 1,25	90	1,25	0,15	0,15
100 x 1,25	100	1,25	0,12	

Kính t quang là h th ng th u kính dùng t p trung ánh sáng vào tiêu b n, t ng c ng chi u sáng, r t quan tr ng khi dùng v t kính d u.

V i v t kính khô ta dùng t quang có m (A): 0,20 – 0,65.

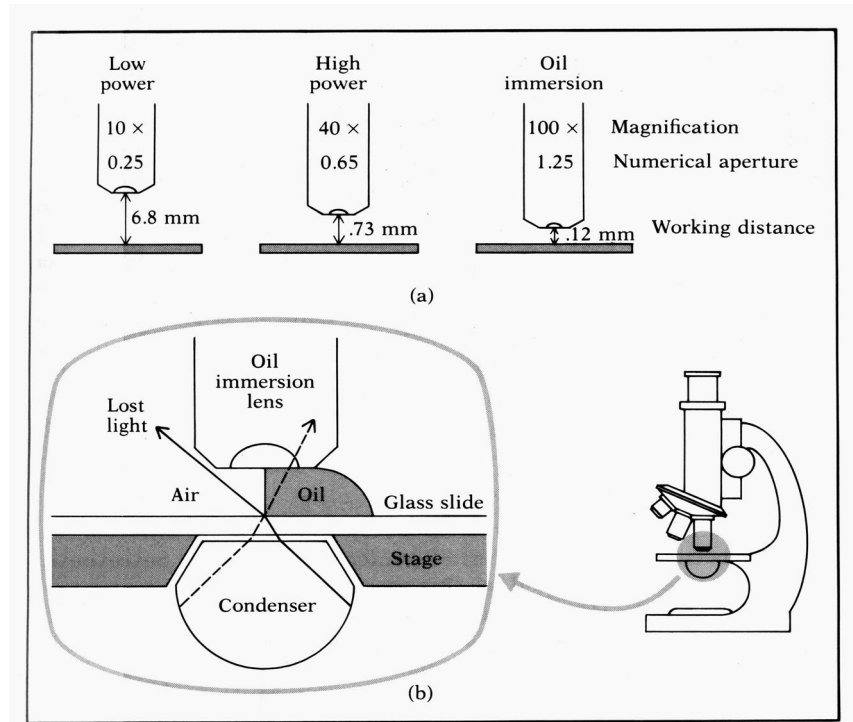
V i v t kính d u th ng dùng t quang có m t : 1,20 – 1,30.

Trong t quang có màng ch n sáng, khi tia sáng càng m nh thì màu c a v t quan sát càng m nh t, nên khép b t màn ch n sáng l i. Ng c l i, c n m h t ch n sáng ra, khi dùng v t kính d u.

i u ch nh t quang c n l u ý:

- Khi ngu n sáng xa thì dùng g ng ph ng, vì t quang ch t p trung c các tia sáng song song.
- i m gi a c a t quang ph i trùng v i tr c quang h c c a kính.
- m c a t quang ph i t ng ngh n m c a v t kính. V y ta dùng màng ch n sáng i u ch nh cho m c a t quang nh i, lo i b t ánh sáng khu ch tán làm nh rõ h n. (m i t ng quan gi a v t kính và lá ch n i u ch nh ánh sáng)
- Ngu n sáng quy t nh hình nh c a tiêu b n, phóng i càng cao thì ngu n sáng ph i càng m nh. i u khi n

c ng chi u sáng có th dùng ền chi u sáng r i ho c l p vào kính k t h p v i màng ch n sáng.



Hình 16: M i t ng quan gi a phóng i c a v t kính v i kho ng cách t v t kính n tiêu b n.

5. Cách s d ng.

Tr c khi s d ng ph i ki m tra t t c các b ph n c a kính, dùng kh n m m lau các b ph n c a kính (Chú ý: ch lau bên ngoài, không tháo r i các b ph n c a kính), kính ngay ng n v a v i t m ng i, sau ó ti n hành tu n t các b c ti p theo soi tiêu b n.

B c 1: L y ánh sáng.

i v i kính hi n vi ph i dùng g ng l y ánh sáng t bên ngoài thì làm nh sau: Ch n phía sáng nh t làm ngu n sáng, quay g ng v phía ngu n sáng ã ch n (n u ánh sáng m nh thì dùng m t ph ng, n u ánh sáng y u thì dùng m t lõm c a g ng), m que ch n

sáng n u h th ng ch n sáng b óng. M t nhìn qua l trên mâm kính, tay i u khi n g ng sao cho th y m t trên h p t quang có l chùm sáng m nh là t yêu c u. Xoay v t kính nh nh t (v t kính 10) v tr c kính (khi nghe ti ng c ch nh là ã úng v trí).

M t nhìn vào th kính, th y vi tr ng sáng tròn u là c N u vi tr ng ch a sáng tròn u thì m t nhìn vào th kính, tay i u khi n g ng cho n khi c vi tr ng sáng tròn u.

i v i kính hi n vi dùng ánh sáng ền thì c m dây ền vào c m, b t công t c, i u khi n n úm ch nh ánh sáng kính có c ánh sáng thích h p. Xoay v t kính nh nh t (v t kính 10x) v tr c kính nh trên.

B c 2: t tiêu b n vào mâm kính.

Tr c khi t tiêu b n vào mâm kính, ph i ch n m t ph i, m t trái c a tiêu b n. M t ph i c a tiêu b n th ng có dán lamén, dán nh n (n u có lamén và nh n) ho c làm gi m b t lóa c a g ng khi nghiêng soi ra ánh sáng (n u không có lamén, không có nh n).

m t ph i c a tiêu b n lên trên, tay ph i m k p tiêu b n, tay trái c m phía u nh n tiêu b n, t tiêu b n vào mâm kính và tay ph i th k p gi tiêu b n ra. Tiêu b n c gi ch t vào xe y, trên mâm kính.

Dùng c xe y i u ch nh sao cho m u v t n m úng vào tr c kính (gi a l mâm kính)

Chú ý: Có th dùng i m sáng c a h p t quang làm i m chu n khi i u ch nh m u v t v i m tr c kính, n u m u v t nh quá.

B c 3: Quan sát.

Nguyên t c b t bu c khi quan sát là ph i quan sát c v t kính có phóng i nh , r i m i chuy n sang quan sát v t kính có phóng i l n h n k nó.

Xem tiêu b n v t kính X10:

- H t quang kính xu ng d i (t c t ng kho ng cách t quang v i tiêu b n, th tr ng m i).
- Xoay v t kính x10 vào kh p c a v t kính (h ng v t kính vào t quang).
- M t nhìn vào bàn t tiêu b n (không nhìn vào th kính), hai tay xoay c i u ch nh s c p a d n v t kính h ng n tiêu b n (không c ch m vào tiêu b n).
- t m t h ng vào th kính, hai tay xoay ch m c i u ch nh s c p h ng ra xa tiêu b n n khi m t th y rõ d n tiêu b n m u v t thì d ng l i.
- Hai tay n m c vi c p i u ch nh cho nh rõ nh t.
- M t v n h ng vào th kính, i u ch nh m t l n n a kho ng cách c a t quang kính v i tiêu b n và màng ch n sáng sao cho nh rõ nh t.

Xem tiêu b n v t kính X40:

- Nâng t quang kính lên v a ph i (th tr ng sáng h n).
- Xoay v t kính X40 vào kh p c a v t kính (h ng v t kính vào t quang).
- t m t h ng vào th kính, có th nhìn th y ngay hình thái c a m u v t (ôi khi không rõ l m). Hai tay n m c vi c p i u ch nh cho nh rõ nh t.
- M t v n h ng vào th kính, i u ch nh m t l n n a kho ng cách c a t quang kính v i tiêu b n và màng ch n sáng sao cho nh rõ nh t.

Xem tiêu b n v t kính X90, X100:

- Nâng t quang kính lên sát tiêu b n, m c ng sáng t i a(th tr ng sáng nh t).
- Xoay v t kính x100 vào kh p c a tr v t kính (h ng v t kính vào t quang).
- Nh m t gi t d u soi vào gi a tiêu b n.
- M t nhìn vào bàn t tiêu b n (không nhìn vào th kính), hai tay xoay c i u ch nh s c p a d n v t kính h ng n tiêu b n v a ch m vào tiêu b n thì d ng l i.
- t m t h ng vào th kính, hai tay xoay ch m c i u ch nh s c p h ng ra xa tiêu b n n khi m t th y rõ d n tiêu b n m u v t thì d ng l i.

L u ý: Khi di chuy n v t kính quá xa, u v t kính không còn nhúng vào gi t d u soi thì th tr ng t i h n i.

- Hai tay n m c vi c p i u ch nh cho nh rõ nh t.
- M t v n h ng vào th kính, i u ch nh m t l n n a kho ng cách c a t quang kính v i tiêu b n và ch nh màng ch n sáng sao cho nh rõ nh t.

6. B o qu n.

- Sau khi s d ng xong, xoay t t c các v t kính ra tr c, m k p tiêu b n, l y tiêu b n ra tr v ch c , h m âm kính, h h p t quang.

Dùng hai tay bê kính c t vào t ch ng m (t b o qu n KHV).

- Ph i gi g i n kính luôn luôn s ch s , không b i b n và hóa ch t dính vào. Luôn luôn gi kính n i khô ráo, mát m các b ph n quang h c không b m c.

- Khi lau kính, khi s d ng kính, không c tháo r i các b ph n c a kính. Không c dùng tay xoa trên m t các th u kính, mà nên

dùng m t bút lông nh s ch ch i b i các m t kính ho c dùng bông m m, s ch lau.

- N u s d ng v t kính x 100 thì ph i dùng dung d ch phù h p th m vào gi y chuyên d ng lau s ch d u cede u v t kính x 100.

- Trá nh m i s va ch m m nh vào kính, không ánh , ánh r i kính. N u di chuy n kính ra kh i phòng thí nghi m, nh t thi t ph i a kính vào h p c a nó có chèn lót c n th n.

- N u phát hi n có l h h ng nào ó, nh t thi t không c t ý tháo ra s a ch a mà ph i báo v i cán b h ng d n bi t x lý.

III/ TH C HÀNH.

1. S d ng kính hi n vi quang h c quan sát vi n m t bào n m m c và n m men:

Quan sát các tiêu b n:

a/ N m m c (X10 và X40):

- + *Aspergillus*
- + *Penicillinum*
- + *Fusarium*
- + *Mucor*
- + *Rhizopus*

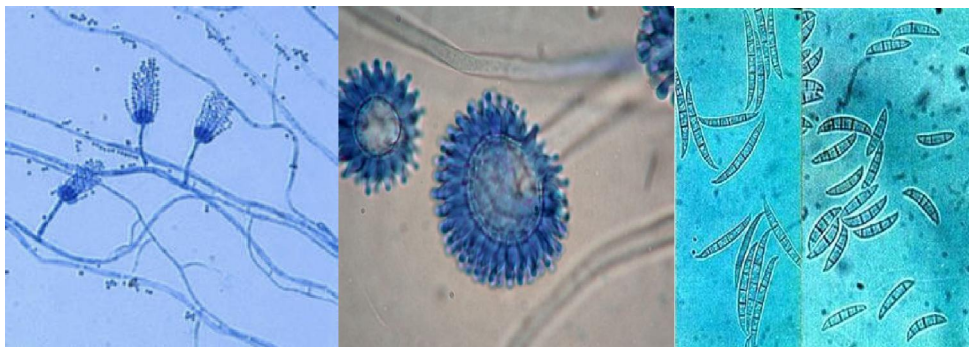
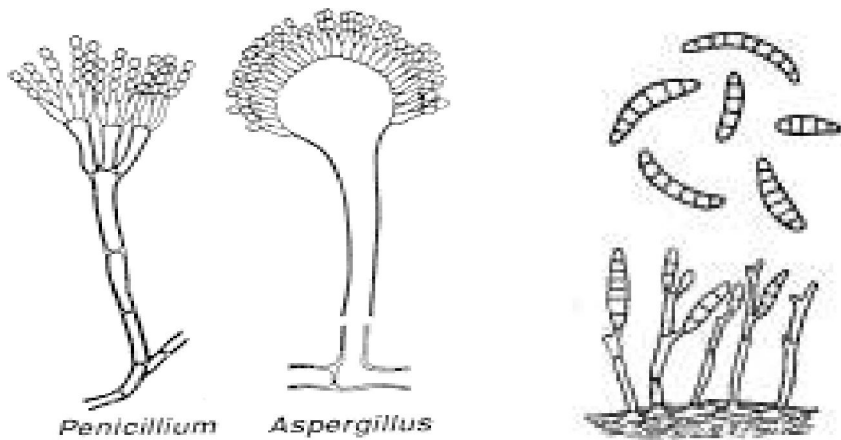
b/ N m men (X40 và X100):

- + *Saccharomyces*
- + *Candida*

Xem chi ti t hình dáng, màu s c c a n m m c: khu n ty, cu ng bào t , th b ng, th bình, túi bào t , bào t , ...

T bào n m men: Xem v t kính x40 quan sát hình d ng t bào: t bào ng riêng l hay k t dính t o s i gi - s i th t.

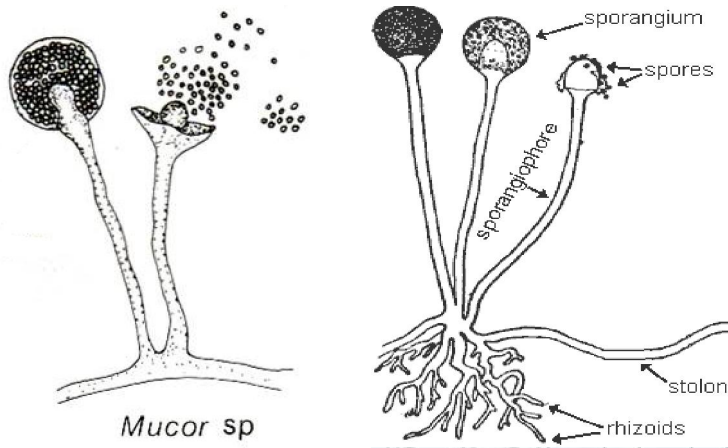
Xem t ng th hình dáng c a n m m c, v hình.



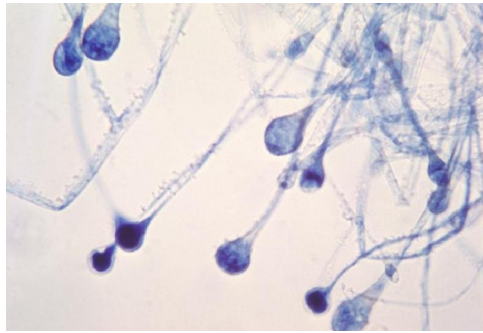
Penicillium

Aspergillus

Fusarium



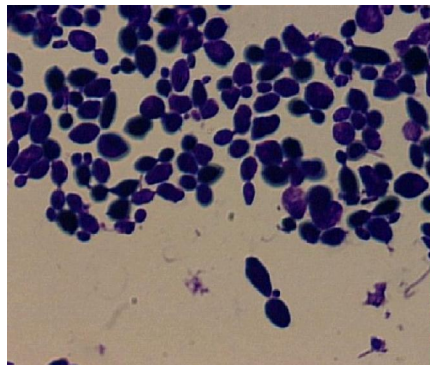
Mucor sp



Mucor



Rhizopus



Saccharomyces

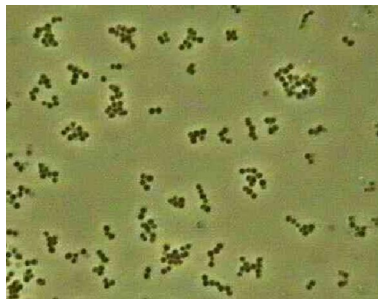


Candida

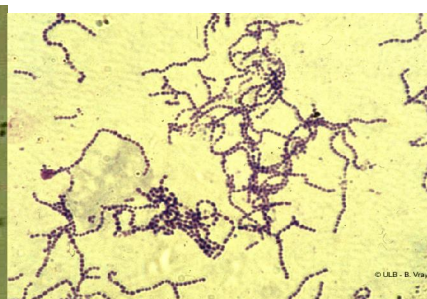
Hình 17: Hình vẽ và hình chụp kính hiển vi các nấm mốc.

2. Quan sát tế bào vi khuẩn (x90 và x100):

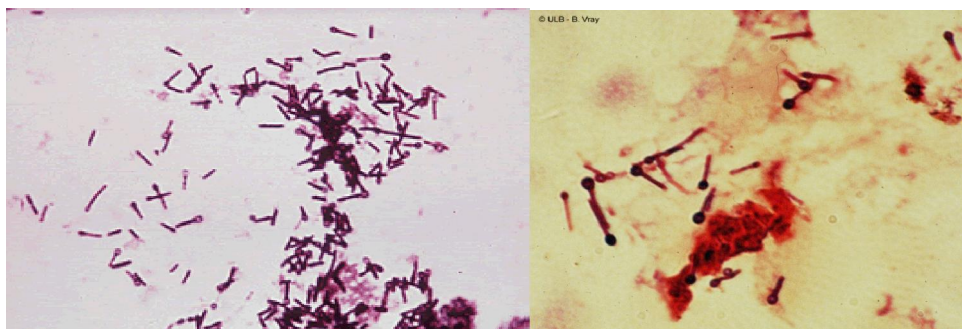
- + C u Gram⁺ : *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*.
- + Tr c Gram⁺ có bào t : *Bacillus spp*, *Clostridium spp*
- + Tr c Gram⁺ không bào t : *Lactobacillus spp*
- + Tr c Gram⁻ : *E. Coli*.
- + Ph y khu n: *Vibrio spp*.



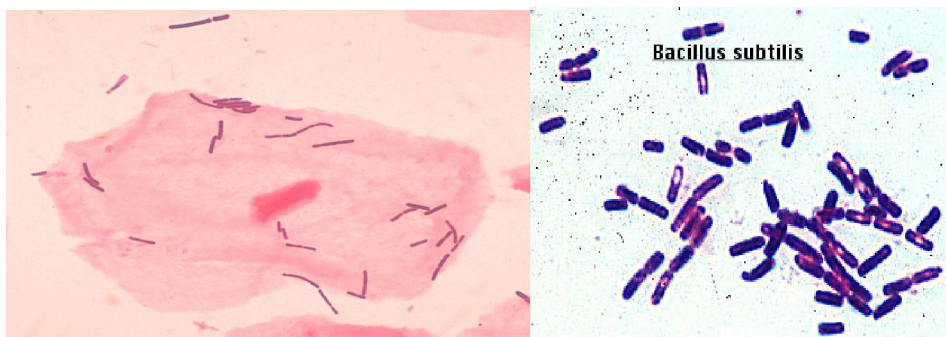
Staphylococcus spp.



Streptococcus spp.

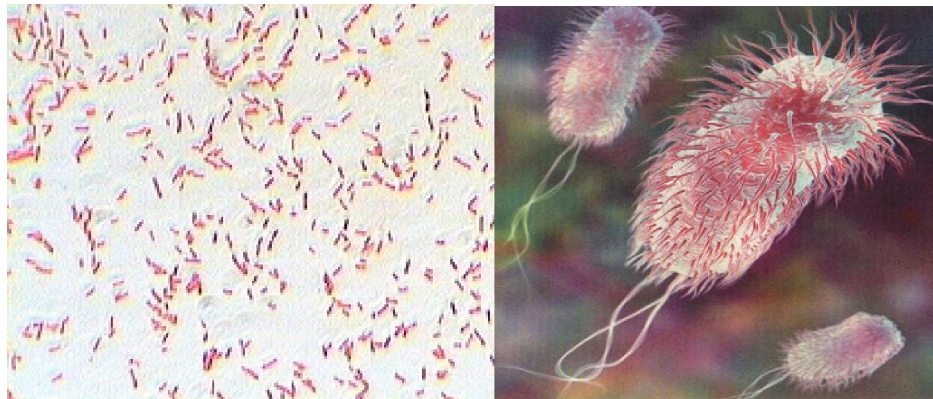


Clostridium spp.



Lactobacillus spp.

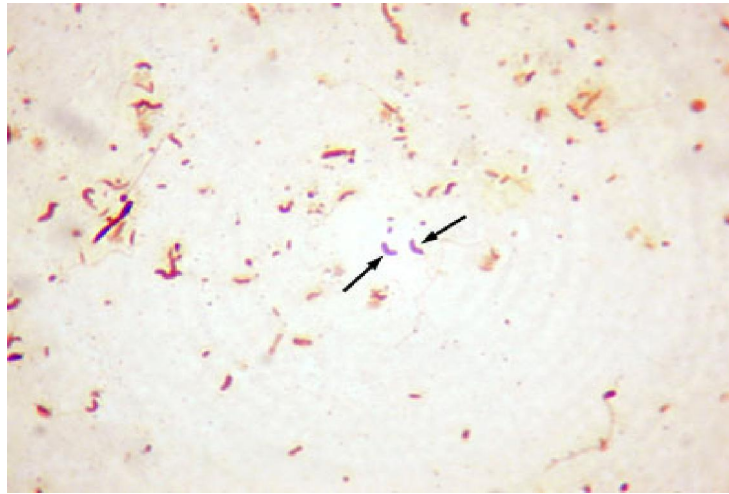
Bacillus subtilis



A

B

E.coli: A- KHV x100; B-KHV *i n t*



Vibrio spp.

Hình 18: hình chụp kính hiển vi các vi khuẩn.

IV/ BÁO CÁO KẾT QUẢ .

Vẽ hình và chú thích các quan sát của các vi sinh vật quan sát.

Bài 4: PHA CH MÔI TR NG DINH D NG

I. KHÁI NI M.

Các ch t dinh d ng là nh ng h p ch t tham gia vào quá trình trao i ch t n i bào.

Môi tr ng dinh d ng là h n h p g m các ch t dinh d ng và các ch t có nhi m v duy trì th oxy hoá kh , áp su t th m th u c a t bào và s n nh pH c a môi tr ng.

Yêu c u c a môi tr ng dinh d ng: Có các ch t dinh d ng c n thi t; Có pH thích h p; Có nh t nh t nh; Không ch a các y u t c h i; Hoàn toàn vô trùng.

II. PHÂN LO I MÔI TR NG DINH D NG:

Ng i ta đ a trên các c s khác nhau phân lo i môi tr ng.

a. C n c vào thành ph n dinh d ng và ngu n g c.

- Môi tr ng t nhiên: n c th t, môi tr ng s a, tr ng, khoai tây, cám,... thành ph n hóa h c không c xác nh chính xác di tính ch t không n nh c a s n ph m t nhi n.
- Môi tr ng t ng h p: các ch t hóa h c c xác nh và nh l ng chính xác. Ví d : NA (Nutrient Agar), EMB (Eosin methylene blue).
- Môi tr ng bán t ng h p: g m ch t t nhiên và t ng h p.

b. C n c vào m c ích s d ng.

- Môi tr ng c s : thích h p cho nhi u l ai vi sinh v t. ví d : canh dinh d ng (Nutrient broth).
- Môi tr ng ch n l c: thích h p cho s t ng sinh kh i u th c a m t loài hay m t nhóm loài vi sinh v t xác nh.

- Môi tr ng sinh hóa: Th kh n ng phân gi i hydratcacbon, các ch t ch a nit ...
- Môi tr ng ch n oán: dùng ch n oán vi khu n nh t nh (ví d : EMB (Eosin methylene blue) cho *E. coli*, BP(Baird Parker) cho *Staphylococcus aureus*).

c. D a vào tr ng thái v t lý.

- Tr ng thái c h c:
 - Môi tr ng c: c s + 1,5-2% agar.
 - Môi tr ng bán l ng: c s + 0,35-0,7% g agar.
 - Môi tr ng canh l ng: c s không cho agar.
- Hình dáng v t ch a:
 - Môi tr ng th ch ng
 - Môi tr ng bán nghiêng
 - Môi tr ng th ch nghiêng

III. PH NG PHÁP LÀM MÔI TR NG.

Làm môi tr ng th c hi n vi c phân l p, nhân gi ng, gi gi ng vi sinh v t, ng th i nuôi c y và nghiên c u các c i m sinh h c c a chúng.

1. Nguyên t c c a vi c ch t o môi tr ng.

D a trên c s nhu c u v các ch t dinh d ng và kh n ng ng hoá các ch t dinh d ng c a t ng lo i sinh v t.

m b o s cân b ng v áp su t th m th u gi a môi tr ng và t bào vi sinh v t nên c n i u ch nh t l và n ng các ch t trong thành ph n môi tr ng.

m b o các i u ki n hoá lý c n thi t cho các ho t ng trao i ch t c a vi sinh v t.

2. Các b c ch t o môi tr ng dinh d ng.

1. Pha ch .

Cân, ong th t chính xác t ng thành ph n môi tr ng và pha ch theo úng trình t h ng d n trong tài li u.

Môi tr ng l ng: Cân, ong các ch t r i cho hoà tan vào n c hay n c m.

Môi tr ng c: n u là th ch b t thì cân cùng v i các thành ph n khác r i hoà tan vào n c; còn n u là th ch s i thì ph i cân th ch s i, ngâm vào n c, v i th ch ra v i màn v t khô n c, cho th ch vào môi tr ng và un tan.

2. Làm trong môi tr ng.

Vi c làm trong môi tr ng s giúp ta d dàng quan sát s phát tri n c a vi sinh v t.

- V i môi tr ng l ng: có th dùng v i màn nhi u l p, bông th m, gi y l c.
- V i môi tr ng c: th ng l c qua v i màn 2 l p.

3. i u ch nh pH c a môi tr ng.

Mu n i u ch nh pH c a môi tr ng ng i ta dùng HCl 10 % hay NaOH 10 %. Ngoài ra có th dùng m t s hoá ch t khác nh : H_3PO_4 , H_2SO_4 , KOH, $NaHCO_3$, Na_2CO_3 ...

xác nh pH c a môi tr ng có th s d ng gi y qu , xanh bromothymol, gi y o pH. Tuy nhiên dùng máy o pH (pH - metre) s cho k t qu chính xác h n.

4. Phân ph i môi tr ng vào d ng c .

Ng i ta th ng phân ph i môi tr ng vào ng nghi m, a petri, bình tam giác. Trình t phân ph i g m các b c sau:

Môi tr ng c n c un cho hoá ch t l ng r i qua ph u thu tinh vào các d ng c .

Tay trái gi d ng c ch a môi tr ng.

Tay ph i k p nút bông và kéo ra.

Nhanh tay rút môi tr ng vào d ng c và y nút bông l i.

* Chú ý:

i v i ng nghi m: n u dùng môi tr ng làm th ch nghiêng thì l ng môi tr ng c n c phân ph i chi m 1/4 th tích c a ng nghi m.

N u làm th ch ng thì l ng môi tr ng c n c phân ph i t 3/4 th tích ng nghi m.

Các thao tác phân ph i ph i nhanh, g n, khéo léo môi tr ng không dính lên mi ng d ng c ho c nút bông và vi c phân ph i c n th c hi n xong tr c khi môi tr ng b ông c.

5. Kh trùng môi tr ng.

Tu theo tính ch t và i u ki n c th c a t ng lo i môi tr ng mà có ch và ph ng pháp kh trùng khác nhau.

Ph ng pháp th ng c s d ng là h p ti t trùng b ng h i n c bảo hòa áp su t cao. Ngoài ra c ng có th s d ng ph ng pháp l c qua màng l c i v i nh ng môi tr ng có thành ph n không ch u nhi t.

6. Làm th ch nghiêng, th ch ng, th ch vào a p êtri:

- Làm th ch nghiêng: c n ti n hành ngay sau khi kh trùng môi tr ng v a k t thúc và môi tr ng ch a ông c. Thông th ng l ng môi tr ng b ng 1/3 th tích ng nghi m. t ng nghi m có môi tr ng lên giá t nghiêng nh ng không c môi tr ng ch m vào nút bông. y ên cho n khi m t th ch ông c. Yêu c u m t th ch ph i ph ng, nh n, liên t c
- Làm th ch ng: t các ng nghi m ã có môi tr ng làm th ch ng vào giá , y ên cho n khi môi tr ng ngu i và ông c.

- th ch vào a petri (môi tr ng và a petri ã c kh trùng): toàn b quy trình th ch vào a petri u th c hi n trong t c y vô trùng.

Thao tác:

- + M bao gi y các a petri ã h p và s y ti t trùng
- + Tay ph i c m erlen ch a môi tr ng ã kh trùng
- + Tay trái l y nút bông ra và h mi ng bình trên ng n l a èn c n
- + Nghiêng bình và rót nh môi tr ng vào a petri sau khi tay trái m hé n p trên c a a.
- + y n p trên l i, t a xu ng m t bàn t c y, xoay tròn nh a petri môi tr ng c phân ph i u
- + y ên cho môi tr ng ngu i và ông c
- + L t ng c cho áy d i c a a petri lên trên và t vào t m 37°C, trong 18-24h h i n c b c ra và khô d n i, ng th i ki m tra vô khu n c a môi tr ng.

Chú ý:

- Thao tác th ch ph i h t s c kh n tr ng và khéo léo h n ch s nhi m khu n.
- M t th ch ph i ph ng, nh n, có dày kho ng 2mm. Thông th ng c 1/4 lít môi tr ng có th phân ph i c 22 - 25 a petri.
- Sau khi môi tr ng vào a petri, 1 - 2 ngày sau khi ki m tra l i xem môi tr ng có b nhi m khu n không r i m i s d ng c y hay phân l p.
- Nh vi t vào nhãn: Tên môi tr ng ... Kh trùng ngày tháng n m ...

7. B o qu n và ki m tra môi tr ng.

Môi tr ng ch a dùng c n c b o qu n ch mát, h n ch tác d ng c a ánh sáng, nhi t t 0 - 5 °C và không môi tr ng b khô.

Tr c khi s d ng, ki m tra vô khu n c a môi tr ng, ng i ta th ng t chúng vào t m 37 °C, trong 48 - 72h. Sau l y ra quan sát, lo i b các ng có vi sinh v t phát tri n và ch s d ng nh ng ng nghi m, nh ng a petri có môi tr ng t yêu c u.

IV/ TH C HÀNH PHA CH MÔI TR NG.

N i dung th c hành này s c l ng vào ph n chu n b môi tr ng nuôi c y cho các bài th c hành có s d ng môi tr ng.

BÀI 5: CÁC PH NG PHÁP PHÂN L P VI SINH V T

I. KHÁI NI M

Phân l p vi sinh v t là quá trình tách riêng các loài vi sinh v t t qu n th ban u và a v d ng thu n khi t. ây là m t khâu có ý ngh a r t quan tr ng trong vi c nghiên c u và ng d ng vi sinh v t.

Vi sinh v t d ng thu n khi t là gi ng vi sinh v t c t o ra t l t bào ban u.

Trong thiên nhiên ho c trong các v t ph m nghiên c u, vi sinh v t th ng t n t i d ng h n h p g m nhi u loài khác nhau. Mu n nghiên c u v hình thái, sinh lý, lý hoá ho c s d ng vào th c t i n m t loài nào ó thì c n ph i a chúng v d ng thu n khi t.

Nguyên t c: Tách r i các t bào vi sinh v t; Nuôi c y các t bào trên trong môi tr ng dinh d ng c tr ng cho khu n l c riêng r , cách bi t nhau.

II. PH NG PHÁP PHÂN L P VI SINH V T THU N KHI T.

V i h u h t các lo i m u nghiên c u, quá trình phân l p vi sinh v t d ng thu n khi t g m các b c c b n sau:

- T o ra các khu n l c riêng r t qu n th vi sinh v t ban u.
- Phân l p vi sinh v t thu n khi t.
- Ki m tra tinh khi t c a các khu n l c.

II.1. PHÂN L P VÀ THU N KHI T VI SINH V T N BÀO.

1. T o ra các khu n l c riêng r t qu n th vi sinh v t trên các môi tr ng phân l p.

a. Yêu c u:

N u m u ban u d ngr nph i a v d ng

l ng b ng cách:

- Nghi n m u.
- Hoà tan m u trong n c c t vô trùng.

Sau th c hi n nh m u là d ng l ng, ti p t c pha loãng n ng c n thi t. C y m u trên môi tr ng c tr ng c a nó.

có c ch ng thu n, c n ti n hành l p l i nhi u l n các k thu t pha loãng nêu trên cho n khi t t c các khu n l c xu t hi n trên môi tr ng u ng nh t. M c thu n khi t c a ch ng có th c ki m tra nh sau:

- Vi c t o h p ria t m t khu n l c n c a ch ng thu n ch t o ra m t lo i khu n l c duy nh t trên b m t môi tr ng có hình thái gi ng v i khu n l c c a ch ng ban u.
- M i khu n l c n ch ch a m t lo i t bào có hình thái gi ng nhau trong quan sát d i kính hi n vi.

Trong thao tác t o khu n l c n c n l u ý h n ch th p nh t nguy c b nhi m b ng cách th c hi n nghiêm túc các yêu c u c a thao tác vô trùng.

b. Ph ng pháp t o khu n l c n.

Có nhi u k thu t ria khác nhau th c hi n h p ria và t o khu n l c n. M t s k thu t ria th ng dùng: k thu t ria ch T, k thu t ria b n góc, k thu t ria tia, k thu t ria liên t c.

Thao tác k thu t t o khu n l c n i v i vi sinh v t hi u khí c th c hi n nh sau:

Ø K thu th p ria:

Kh trùng b m t bàn và tay b ng c n 70° , ch khô t èn c n.
a môi tr ng m i ho c b o qu n l nh t $^{\circ} \approx 4^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$, tr c
khi dùng t vào t m 37°C kho ng 30 phút cho m t th ch th t khô
ráo.

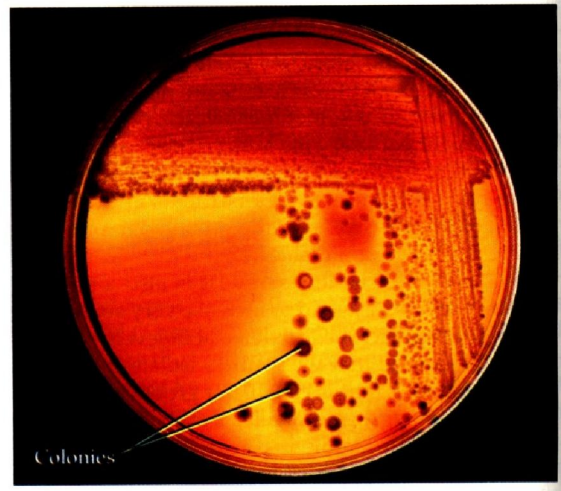
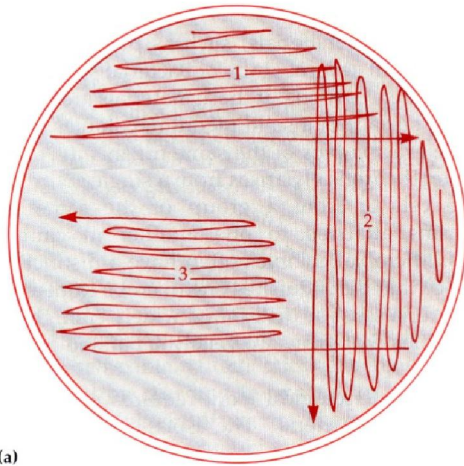
Th c hi n các b c nh sau:

- Dùng bút ghi lên áy h p petri tên m u (b nh ph m, th c
ph m,...), ngày c y, ng i c y.
- c l ng ho c úp a xu ng r i dùng bút và th c chia a
thành 4 ph n b ng nhau.
- t que c y trên ng n l a èn c n và thao tác l y m u trong
ng nghi m.
- Dùng ngón gi a và ngón cái (bàn tay trái) n vào tâm a
petri, các ngón còn l i xoay và h mép n p a trên èn c n
tr c khi c y.
- C m a l t vào lòng bàn tay trái, ngón cái và ngón út t vào
n p y n p lên sao cho n p và áy t o m t góc kho ng
 45° .
- a u que c y vào ph t m t góc nh , sát thành a.
- Th c hi n c y ria ch T và ria b n góc (xem hình).
- Sau khi c y t úp petri l i, gói l i t vào t m nhi t
và th i gian thích h p.
- Xem k t qu minh h a bên d i.

Chú ý:

- t que c y, h mi ng ng nghi m và nút bông, h mép a
tr c và sau khi thao tác.
- Trong su t quá trình c y, mi ng a petri luôn g n ng n
l a. Tránh nhi m vi sinh v t t không khí vào.

- Khi c y, c m góc cu i que b ng 3 ngón tay (cái, tr , gi a), l t nh trên m t th ch. N u t quá m nh s làm v m t th ch.
- N u d oán c s l ng vi khu n có trong d ch m u là nhi u, thì sau m i ng c y t l i que c y làm gi m thi u s l ng vi khu n ng ria k ti p. N u không s khó tách bi t các khu n l c.



(c)

Hình 19: (a) - Sơ đồ phân lập trên thạch a; (b) - Kết quả cấy phân lập trên thạch a; (c) - Kết quả cấy phân lập trên thạch a (4 ngày cấy).

Chú ý: có thể cấy ria t 3 – 5 ngày tùy theo cá a a.

Ø K thu t h p tr i:

- Hút 0,1 ml dịch mẫu đã pha loãng cho vào đĩa petri có môi trường thích hợp.
- Dùng que gọt thực phẩm phân phối dịch mẫu từ đĩa vào khay petri thạch.
- Tiếp tục sử dụng que gọt này gọt mẫu vào khay petri thạch đĩa petri thứ 2 rồi đĩa thứ 3.
- Đặt các đĩa petri 1, 2, 3 trên vào tủ ấm nhiệt độ thích hợp sau một thời gian nhất định để nuôi cấy vi sinh vật ta sẽ nhận được khuẩn lạc riêng rẽ các đĩa thứ 2 và 3.

Ø K thu t h p :

- Dùng pipetman và đầu tip vô trùng, thao tác vô trùng chuyển 1 ml dịch cấy vào ống nghiệm vi sinh vật lên bình môi trường trong đĩa petri.
- Khoảng 15 - 20 ml môi trường đã đun chảy và nguội ở 45 - 55⁰C vào đĩa petri đã cấy mẫu.
- Xoay nhẹ đĩa petri cùng chiều và ngược chiều kim đồng hồ vài lần để dung dịch phân bố đều trong môi trường cấy.
- Ủ đĩa petri, ở nhiệt độ thích hợp.

Thao tác k thu t t o khu n l c n i v i vi sinh v t k khí c th c hi n nh sau:

Phân lập các vi sinh vật k khí trên môi trường cấy đĩa petri.

- Dùng môi trường cấy trong ống nghiệm để thực hiện cách thu

lo i b không khí trong môi tr ng.

- ngu i môi tr ng còn 45 - 50⁰C.
- Hút 0,1 ml d ch nghiê n c u cho vào ng môi tr ng, y nút l i, l c tròn quanh tr c ng nghi m.
- Rót nhanh môi tr ng ng nghi m vào n p d i c a a pêt ri và y th t nhanh n p trên l i, sao cho gi a m t n p và môi tr ng không còn không khí.
- Dùng parafin hàn kín ph n ti p xúc gi a 2 n p c a a pêt ri.
- **Nuôi trong bình y m khí:** sau khi c y vi khu n xong, cho vào bình y m khí. Thoa m t l p parafin l ng lên mi ng bình, t èn c n hay èn c y lên và t vào bình, y n p l i, ho c dùng máy hút chân không. Cho vào t m, nhi t và th i gian thích h p.
- Sau khi vi sinh v t phát tri n, ch n các khu n l c riêng r trong kh i môi tr ng, dùng que c y c t c kh i môi tr ng r i c y vào môi tr ng l ng thích h p.

2. **Ki m tra tính khi t c a gi ng m i phân l p.**

Có nhi u cách ki m tra:

1. Ki m tra v t c y.

Quan sát s sinh tr ng c a vi sinh v t qua v t c y trên môi tr ng c:

- N u v t c y có b m t và màu s c ng u, thu n nh t ch ng t gi ng m i phân l p tính khi t thì gi l i.
- N u v t c y không thu n nh t thì lo i b .

2. Ki m tra l i thu n ch ng c a các lo i khu n l c.

- Ch n các khu n l c riêng r trên môi tr ng th ch nghiê ng.
- Tách các khu n l c này ra và hoà tan, pha loãng n ng c n thi t trong n c c t vô trùng.
- Nh l gi t d ch trên vào a pêt ri có môi tr ng.

- Dùng 1 que g t phân ph i gi t d ch u kh p m t th ch a p êtri th nh t, r i a th 2, th 3.
- t các a p êtri trên vào t m v i nhi t và th i gian thích h p tu lo i vi sinh v t.
- Sau l y ra quan sát các khu n l c riêng r . S thu n khi t c a khu n l c là bi u hi n s thu n khi t c a gi ng.

II.2. PHÂN L P VÀ THU N KHI T VI SINH V T A BÀO D NG S L

i v i x khu n, vi n m,... tách riêng các khu n l c có th áp d ng ph ng pháp pha loãng bào t và trải nh n bào. Ho c dùng ph ng pháp khác nh :

- **Ph ng pháp c t ng n:** Dùng que c y móc (ã kh trùng b ng cách t), g t nh lên h s i t ho c bào t (d ng b i ph n trên m t khu n l c), chuy n sang a petri. ánh ng c ph n l ng móc lên trên thành n p petri cho bào t r i xu ng.

- **Ph ng pháp c y i m:** Dùng que c y l y bào t ho c s i t , c m u móc xu ng m t th ch (ng nghi m ho c Petri) thành 3 i m.

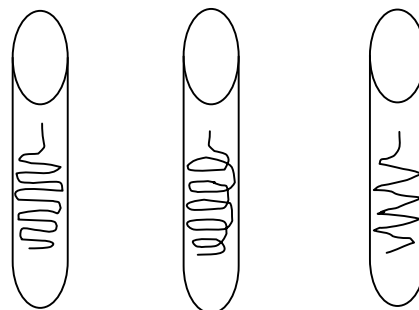
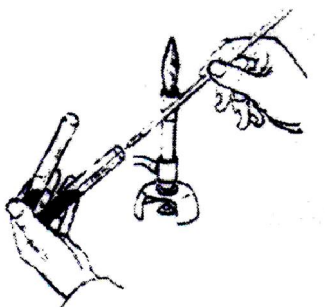
nhi t phòng ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$).Sau 2 ngày, l y ra quan sát. N u trên m t th ch ch có 1 lo i t ho c bào t thì n m m c phân l p là t. N u còn l n m c ho c vi khu n khác thì c n ti p t c phân l p t ng t cho n khi ch còn 1 lo i m c mong mu n.

III/ PH NG PHÁP C Y TRUY N.

Nguyên t c: sau khi phân l p vài l n, t khóm thu n c y truy n sang ng môi tr ng th ch nghiêng hay ng nghi m canh gia t ng s l ng vi sinh v t.

Chu n b : gi ng nh ph n c y phân l p, thay a môi tr ng b ng ng th ch nghiêng hay ng nghi m c nh l ng.

Thao tác: thao tác theo hình v .



Hình 20: Thao tác cấy truyền

Hình 21: Hình cấy truyền

Lau chùi sạch và khử trùng quần hút cá bu ng c y 30 phút trước khi cấy.

ng môi trường m i ho c b o qu n l nh $t^{\circ} \approx 4^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$, trước khi dùng ở t° phòng kho ng 10 phút.

Sau ó, dùng bút ghi lên 1/3 trên c a thành ng tên g c vi khu n, ngày c y, ng i c y.

t que c y trên ng n l a èn c n và thao tác l y m u trong ng nghi m, ho c t a (gi ng nh ã h c ph n c y l p phân), c y truy n sang ng môi trường m i.

t ng nghi m m i c y lên giá ng, cho vào t m 37°C , t 24h – 48h, xem k t qu .

Chú ý:

- t que c y, h mi ng ng nghi m và nút bông, h mép a tr c và sau khi thao tác.
- Trong su t quá trình c y, mi ng ng nghi m luôn g n ng n l a. Tránh nhi m vi sinh v t t không khí vào.
- Khi c y, c m góc cu i que b ng 3 ngón tay (cái, tr , gi a), l t nh trên m t th ch. N u t quá m nh s làm v m t th ch.

IV/ TH C HÀNH.

Ø Phân l p vi sinh v t.

1. Phân l p vi khu n.

Sinh viên th c hành phân l p vi sinh v t b ng k thu t h p ria t h n t p vi sinh v t do phòng thí nghi m cung c p.

2. Phân l p n m m c *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* và *Mucor*:

Có th phân l p các loài n m m c này trên c m ngu i, xôi làm m c t ng, bánh mì khô ít ngày.

3. Phân l p n m men.

Có th phân l p n m men d dàng t các môi tr ng nh :

- B m t trái cây và d ch ép m t s trái cây nh táo, lê, nho, dâu, m , d a, ...
- Trong r u n p, trong các bánh men r u, trong bia, trong n c mía,....

Ø C y truy n.

Sinh viên th c hành c y truy n t ng nghi m sang ng nghi m và t a petri sang ng nghi m.

V/ BÁO CÁO K T QU .

Trình bày li ph ng pháp phân l p và báo cáo k t qu phân l p.

Bài 6: CÁC PH NG PHÁP QUAN SÁT VI SINH V T

I/ K THU T SOI T I.

M c ích: V i thao tác n gi n, ti n hành nhanh, ph ng pháp soi t i c s đ ng quan sát tr ng thái s ng c a t bào vi khu n, c bi t là s chuy n ng c a vi khu n.

Cách làm tiêu b n gi t ép:

- Dùng que c y ho c ng hút l y gi ng vi sinh v t làm v t bôi (theo trình t p h n 3).
- t lá kính lên gi t canh tr ng th t nh nhàn tránh không t o thành b t khí. Mu n v y m t mép lá kính ti p xúc v i phi n kính r i t t h lá kính xu ng.
- a tiêu b n lên quan sát trên kính hi n vi.
- Chú ý:
 - + N u gi t d ch nhi u quá, tràn ra ph n ngoài ti p xúc c a phi n kính và lá kính ta dùng gi y th m b t n c i.
 - + N u c n quan sát tiêu b n lâu thì dùng vaz lin bôi quanh mép lá kính gi t d ch kh i b khô.

Cách làm tiêu b n gi t treo:

Lo i tiêu b n này dùng theo dõi s sinh s n, s hình thành bào t , kh n ng di ng và ph n ng c a t bào vi sinh v t v i các lo i kích thích.

- Dùng phi n kính c bi t có ph n lõm hình tròn gi a.
- Bôi vaz lin quanh ph n lõm c a phi n kính.
- Cho 1 gi t canh tr ng lên gi a lá kính.

- Th n tr ng xoay ng c lá kính cho gi t canh tr ng xu ng phía d i r i d t lên ph n lõm c a phi n kính.
 - Chú ý: không gi t canh tr ng lan r ng hay ch m vào ph n áy c a ph n lõm.
 - t tiêu b n lên quan sát trên kính hi n vi (hình 41)
- u i m c a lo i tiêu b n này so v i tiêu b n gi t ép là giúp ta quan sát t bào vi sinh v t d dàng h n và lâu h n.

II/ CÁC PH NG PHÁP NHU M.

Nhu m t bào vi khu n dùng phân bi t hình dáng t bào vi khu n (c u, tr c, xo n hay phân bi t các thành ph n riêng bi t trên m t t bào vi khu n.

Có 2 ph ng pháp nhu m c b n:

- 1/ Nhu m n: Dùng m t lo i thu c nhu m quan sát hình d ng t bào.
- 2/ Nhu m kép: Dùng 2 thu c nhu m phân bi t vi khu n G^+ và G^- , phân bi t t bào dinh d ng và bào t , hay phân bi t vi khu n lao v i các vi khu n khác...

A/ NGUYÊN T C CHUNG KHI LÀM TIÊU B N NHU M.

1/ Ph t kính tiêu b n.

Lau nh tiêu b n s ch b ng gi y m m, h qua èn c n.

Dùng bút chì m ho c bút lông ghi tên m u, và v vòng tròn $\phi \approx 15\text{mm}$, m t d i lame kính ánh d u v t khu n phía trên lame.

t nóng que c y (tr c và sau khi thao tác), m nút bông, h nhanh mi ng ng nghi m.

Tr ng h p 1: m u nuôi c y trong canh dinh d ng, a u que c y vào mi ng ng nghi m (v n gi g n ng n l a), nhúng vào dung d ch canh c y, l y l vòng que c y. L y que c y ra, h nhanh mi ng ng nghi m và nút bông, y nút bông l i. Ph t canh khu n trên vòng que c y vào m t trên lam, gi a vòng tròn, dàn u ra xung quanh.

Tr ng h p 2: m u nuôi c y trong th ch dinh d ng, nh gi t dung d ch NaCl 9‰ lên gi a vòng tròn (m t trên lam). Thao tác gi ng tr ng h p 1, nh ng dùng c nh vòng tròn c a u que c y t nh lên khu n l c vi khu n, r i t vào gi t NaCl 9‰ trên lam, dàn m ng và u.

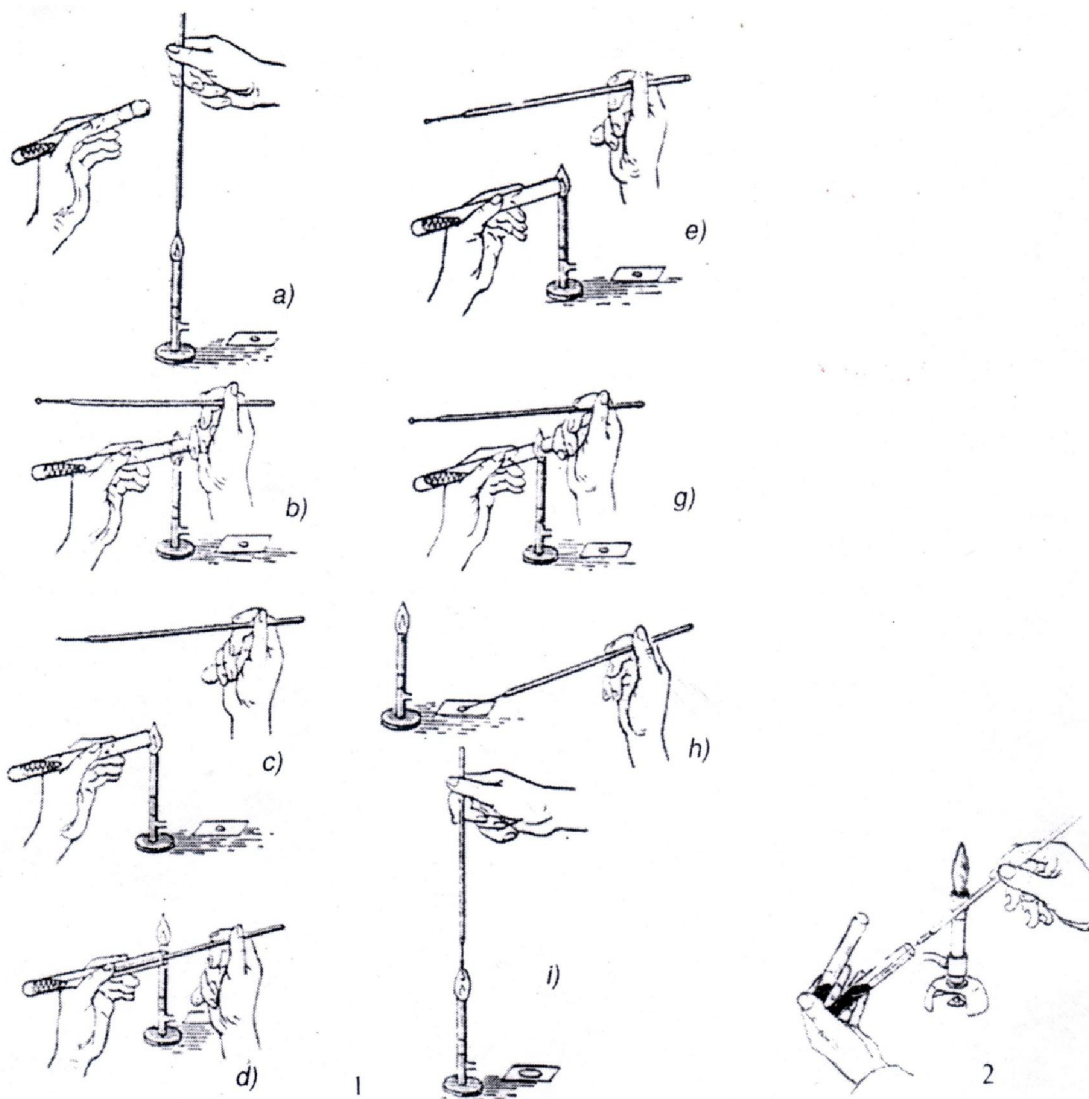
2/ C nh m u: M c ích gi t ch t vi khu n và làm cho vi khu n bám ch t vào lame. C nh m u b ng cách khô t nhiên.

Chú ý:

N u c nh không t t vi khu n s trôi i trong quá trình nhu m.

Khi c nh m u, ch h nhanh ch không t trên ng n l a.

Không c ch m vào thành khi a u que c y vào và ra kh i ng nghi m vi khu n.



Hình 22: Sử dụng thí nghiệm đốt kính.

B/ CÁC PHƯƠNG PHÁP NHU M.

1/ Phương pháp nhu m gram (Christian Gram): Dùng phân biệt vi khuẩn gram dương và gram âm.

Ø Nguyên tắc:

Nhu m Gram, là phương pháp nhu m thông thường nhất trong các phòng thí nghiệm vi sinh. Phương pháp nhu m Gram cho phép xác định hình dạng, cách sắp xếp, và

phân biệt vi khuẩn là thu c lo i Gram[+] hay Gram [-].

Do s khác biệt về cấu trúc vách tế bào nên trong quá trình nhuộm Gram, vi khuẩn Gram [+] sẽ tích tụ thuốc tím Gentian-iode không bắt màu bởi alcohol, trong khi vi khuẩn Gram [-] không tích tụ thuốc tím màu này, do vậy kết quả sau khi nhuộm là vi khuẩn Gram [+] vẫn giữ màu tím của gentian, còn vi khuẩn Gram [-] nhận màu hồng của phẩm màu safranin hay fuchsin.

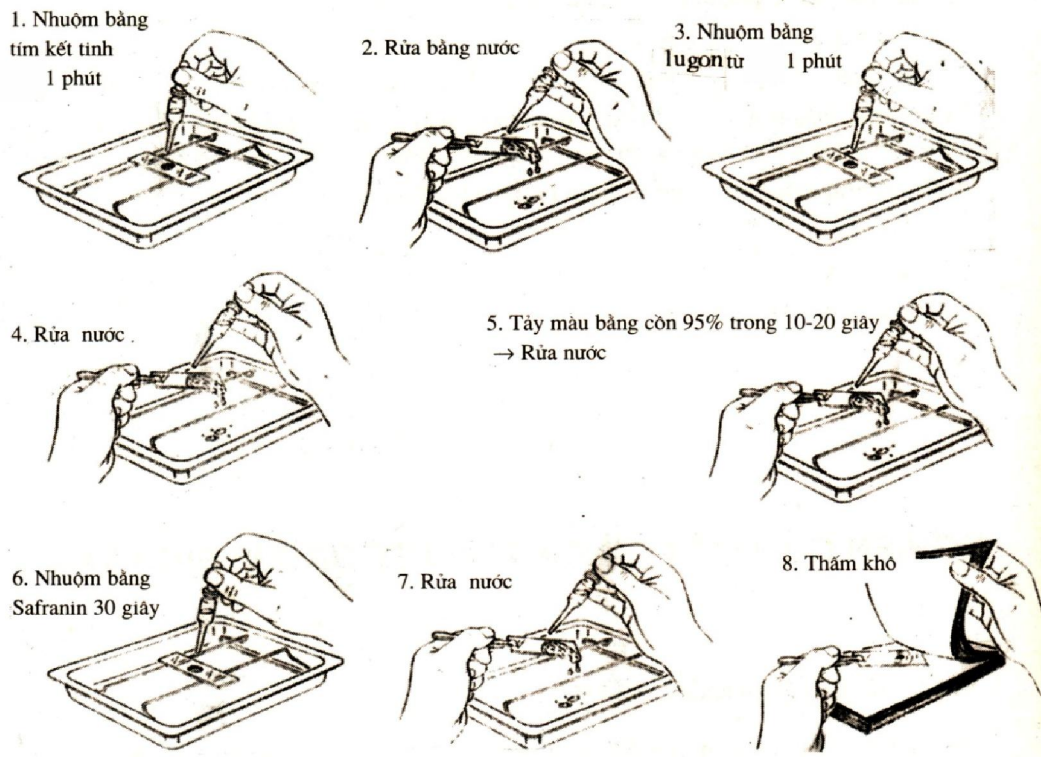
Ø Thao tác:

- Đặt tiêu bản đã nhuộm kính và cố định mẫu lên thanh thủy tinh chữ U, trên thau nhả.
- Đặt miêng giầy lên vòng nhuộm kính.
- Nhỏ dd Crystal violet thấm hết giầy. Đợi 1 – 2 phút (nếu vi khuẩn lỵ cấy canh lỏng 2 phút, lỵ cấy thạch dinh dưỡng 1 phút). Rửa sạch, thấm khô.
- Tẩy sạch 96° trong 15 – 30 giây (đối với canh lỏng tẩy 15 giây, thạch dinh dưỡng tẩy 30 giây). Rửa sạch, thấm khô. *Tẩy sạch bằng cách nghiêng tiêu bản, cho cồn chảy từ mép trên phiến kính. Quan sát mép dưới cho đến khi giọt cồn vẩn màu tím.*
- Đặt miêng giầy lên vật kính, nhỏ dung dịch Fuchsin ki m loãng (hoặc Safranin O), 1 phút. Rửa sạch, thấm khô.
- Quan sát bằng vật kính độ phóng đại 1.000 lần.

Vi khuẩn Gr⁺ bắt màu tím Crystal violet, vi khuẩn Gr⁻ bắt màu hồng Fuchsin(Safranin O).

Chú ý:

- Trám mẫu lên nhuộm như bình thường, đặt miêng giầy lên vật kính.
- Sau khi nhuộm xong rửa sạch và thấm khô tiêu bản.



Hình 23: S t t nhu m Gram

Ø c k t qu :

- Quan sát ph t nhu m Gram qua kính hi n vi, d i v t kính đ u, chúng ta s th y vi khu n Gram[+] n màu tím, còn vi khu n Gram[-] n màu h ng.
- Khi tr l i m t k t qu nhu m Gram, ph i tr l i các chi ti t sau:
 - + Hình dáng vi khu n.
 - + Cách s p x p các vi khu n.
 - + Cách n màu c a vi khu n, t c là vi khu n Gram [+] hay Gram [-].

2/ Ph ng pháp nhu m Ziehl – Neelsen: Dùng phân bi t vi khu n Lao v i các vi khu n khác:

Ø Nguyên t c:

Do t bào vi khu n kháng acid có l p v sáp bao b c nên khi ã nhu m c ph c h p màu carbolfuchsin, ph c h p này s không b t y màu b i dung d ch t y màu m nh (acid, alcool acid). Tuy nhiên ph c h p màu này có th th m xuyên qua l p v sáp c a vi khu n, có hai cách: (1) un nóng ph t nhu m v i dung d ch màu carbolfuchin, nh ó mà carbolfuchsin th m qua l p v sáp c a vi khu n nhu m màu vi khu n; ây là ph ng pháp nhu m nóng Ziehl Neelsen. (2) Ph ng pháp th hai là ph ng pháp nhu m l nh còn g i là ph ng pháp Kinyoun, trong ph ng pháp này ng i ta dùng dung d ch carbolfuchsin m c, nh v y khi ph dung d ch màu m c này lên ph t nhu m v i th i gian lâu, carbolfuchsin v n có th th m qua l p v sáp nhu m màu vi khu n.

Ø Thao tác:

- t tiêu b n ã ph t kính và c nh m u lên thanh th y tinh ch U, t trên thau nh a.
- t mi ng gi y l c lên vòng ph t kính.
- Nh dung d ch Fuschin m c th m t h t gi y l c, h nóng liên t c t 5 – 7 phút.
- Trong khi h ph i nh b sung thu c nhu m liên t c gi y l c luôn th m t.
- R a n c, th m khô.
- T y c n – acid n khi không còn màu h ng c a Fuschin m c (kho ng 30 giây).
- R a n c, th m khô.
- Quan sát b ng v t kính d u, phóng i 1.000 l n.
- Vi khu n lao b t màu h ng Fuschin, vi khu n khác b t màu xanh methylen.

Chú ý:

Tr c m i l n nh thu c nhu m lên tiêu b n, ph i t mi ng gi y l c ph lên v t bô i.

Sau m i l n nhu m u ph i r a n c và th m khô.

Trong khi h nóng: dung d ch nhu m không c sôi, thu c nhu m ph i luôn th m t gi y, không c khô.

Không c nh m lãn gi a c n – acid (nhu m Ziehl Neelsen) và c n 96° (dùng nhu m Gram).

Ø c k t qu :

- Quan sát ph t nhu m kháng acid qua kính hi n vi, d i v t kính d u, tr c khu n kháng acid n màu cánh sen, còn vi
- Khu n th ng c ng nh các n n khác nh t bào bi u mô hay b ch c u n màu xanh methylene blue.
- Khi tr l i m t k t qu nhu m kháng acid, không c k t lu n là d ng tính M. Tuberculosis mà ch tr l i có hi n di n tr c khu n kháng acid.

3/ Nhu m bào t :

M t s vi khu n nh Bacillus hay Clostridium có kh n ng t o thành bào t . Bào t có th t n t i trong môi tr ng thi u ch t dinh d ng, ch u c nhi t và m t s các hóa ch t mà th sinh d ng không th .

Khác v i bào t n m s i (hay n m m c), bào t vi khu n (nha bào) không ph i là c quan sinh s n và th ng có hai d ng: hình c u và hình b u d c. Khi t bào vi khu n s ng trong môi tr ng không thích h p cho s sinh tr ng và phát tri n, do thi u ch t dinh d ng hay m th p, thì bào t c hình thành. Nh ng khi môi tr ng tr

nên thích h p thì bào t l i h i sinh và t bào l i có th ti p t c phân chia.

Bào t r t khó nhu m b i a s các thu c nhu m do màng bào t dày, ch c, khó b t màu và ch a nhi u lipid. Vì th , c n thi t ph i có nh ng ph ng pháp nhu m c bi t i v i bào t . Tuy nhiên, i v i b t kì ph ng pháp nào thì t bào tr c h t c x lý b ng nhi t hay/ và acid t bào ch t bào t d b t màu. Sau ó, nhu m c t bào ch t c a bào t và t bào v i thu c nhu m có tính ho t nhu m m nh r i t y màu c a t bào ch t i và nhu m nó v i m t thu c nhu m phân bi t khác. Khi ó, t bào ch t s mang m t màu, và bào t s mang màu khác. ôi khi bào t c nhìn th y bên trong t bào. Hình thái c a bào t còn giúp nh n di n vi khu n. Hình dáng và kích th c bào t ph thu c vào v trí c a nó trong t bào và kích th c b ngang c a t bào mang nó. Bào t th ng n m trong t bào sinh d ng ba v trí khác nhau: n u n m tâm t bào thì c g i là bào t ki u Bacillus, n u n m l ch tâm – ki u Clostridium và n u n m c c t bào thì g i là bào t ki u Plectidium. m t s gi ng vi khu n khác, các bào t có th t n t i t do b i vì các t bào xung quanh nó ã tan rã.

V t li u và d ng c :

- Gi ng vi khu n Bacillus cereus trên môi tr ng th ch nghiêng dinh d ng ã trong 3 – 4 ngày n 2 tu n 30°C.
- Thu c nhu m: 1 trong 3 cách
 3. L c malachite và thu c nhu m safranin.
 4. Fuschin, HCl 0.5%, H₂SO₄ 1%, và xanh methylene (Loeffler).
 5. Xanh methylene và trung tính.
- Giá nhu m và phi n ph t kính nhu m
- C c beesse và b p un.

Cách tiến hành:

- a. V i thu c nhu m l c malachite và thu c nhu m safranin
- 1- Ch n b v t sôi trên phi n kính s ch và h nóng nh .
 - 2- Thêm 1 ít n c vào c c beesse và un sôi.
 - 3- t giá nhu m lên c c beesse r i t phi n kính lên nó.
 - 4- t nh m u gi y th m (nh h n ph n kính m t chút) lên trên phi n kính. M u gi y này s giúp gi thu c nhu m l i trên phi n kính.
 - 5- Ph phi n kính v i thu c nhu m l c malachite và h h i n c trong vòng 5 phút. Ti p t c thêm thu c nhu m tránh tình tr ng thu c nhu m b khô trên phi n kính.
 - 6- Kh màu v i n c trong 30 giây b ng cách cho n c ch y lên phi n kính. Các t bào sinh đ ng s b m t màu, còn bào t s gi màu l i.
 - 7- Nhu m l i v i safranin trong 30 giây r i r a l i v i n c trong 30 giây n a. Th m khô c n th n.
 - 8- Quan sát đ i kính hi n vi v i v t kính âu (x100). Bào t s có màu xanh còn t bào sinh đ ng s có màu h ng. Ghi l i k t qu .
- L u ý:** Khi nhu m Gram, các bào t không b nhu m nên t bào trông gi ng có các l bên trong.
- b. V i thu c nhu m Fuschin, HCl 0.5, H₂SO₄ 1% và xanh methylene
- 1- Làm v t sôi trên m t phi n kính s ch và khô t nhiên.
 - 2- Nh vài gi t HCl 0.5% lên v t sôi, h nóng trên ng n l a èn c n cho b c h i trong 2 phút r i r a v i n c.
 - 3- Nhu m v t sôi v i thu c nhu m Fuschin, qua mi ng gi y l c, h nóng cho n khi b c h i trong vòng 5 phút.
 - 4- R a v t sôi b ng n c

- 5- T y màu b ng dung d ch H_2SO_4 1% trong 2 phút.
- 6- R a v t bôi b ng n c.
- 7- Nhu m v t bôi b ng xanh methylene trong 5 – 15 phút.
- 8- R a l i v i n c và khô t nhiên.
- 9- Quan sát d i kính hi n vi v i v t kính d u (x100). Bào t s có màu xanh còn t bào sinh d ng s có màu xanh. Ghi l i k t qu .

c. V i thu c nhu m Xanh methylene và trung tính:

- 1- Làm v t bôi trên m t phi n kính s ch.
- 2- C nh tiêu b n trên ng n l a èn c n.
- 3- Nhu m xanh methylene trong 1 phút có h nóng t bên d i
- 4- R a v t bôi b ng n c cho n khi h t màu.
- 5- Nhu m v i trung tính 0.5% trong 1 phút.
- 6- R a l i b ng n c, khô.
- 7- Quan sát d i kính hi n vi v i v t kính d u (x100).Bào t s có màu xanh còn t bào sinh d ng s có màu . Ghi l i k t qu .

III/ TH C HÀNH.

Sinh viên th c hành làm các tiêu b n:

- Gi t ép, gi t treo.
- Nhu m gram vi khu n c phòng thí nghi m chu n b .
- Nhu m Kháng acid t vaccine BCG.
- Nhu m bào t vi khu n *Bacillus subtilis* (malachite và thu c nhu m safranin)

IV/ BÁO CÁO.

Sinh viên báo cáo cách ti n hành và k t qu nhu m

Bài 7, 8: CÁC C TÍNH SINH HÓA C A VI SINH V T

Mu n nh danh vi sinh v t, ta c n xác nh m t s c i m sinh hóa c a chúng. Các c i m này bi u hi n s trao i ch t c a vi sinh v t, th hi n qua s chuy n hóa các thành ph n ã bi t c a môi tr ng dinh d ng dùng nuôi c y vi sinh v t (ch y u là ho t ng c a enzyme). Ph m vi ch ng trình c a môn h c này ch gi i thi u s l c và t ng quát m t s ph n ng sinh hóa c b n.

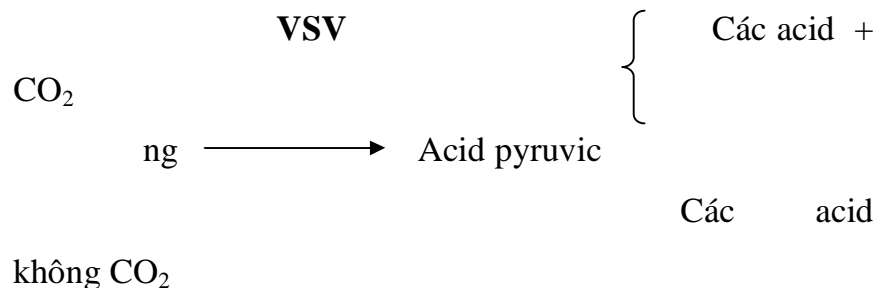
I. XÁC NH KH N NG S D NG CÁC CH T HYDRAT CARBON:

Các vi sinh v t c c tr ng b ng kh n ng s d ng khác nhau ngu n hydrat carbon làm ngu n n ng l ng.

1. Kh n ng lên men ng.

Th ng s d ng các lo i ng Glucose, Lactose, Galactose, Fructose, Saccharose, Maltose, Rhamnose, và m t s r u nh Glycerin, Mannit,...

Ø C ch :



Vi sinh v t có các enzyme phân gi i các lo i ng trên, t o các acid h u c , làm pH c a môi tr ng nuôi c y gi m, và có th t o m t s ch t khí nh H₂, CO₂. pH c a môi tr ng gi m, làm ch th màu

phenol red chuyển sang vàng. Các chất khí sinh ra sẽ tích tụ vào ống Durham, phát hiện các bằng chứng thối rữa.

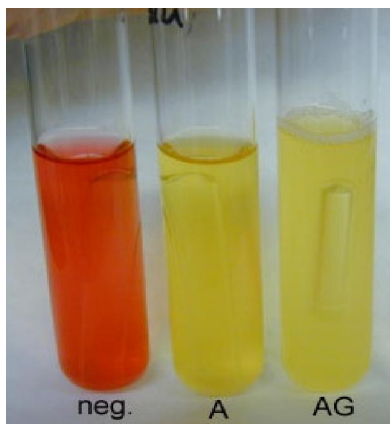
Ø Môi trường:

- Canh dinh dưỡng (NB) bổ sung 1% đường, pH ≈ 7 (môi trường lên men).
- Chất màu phenol red.
- Ống Durham.

Ø Thao tác: cấy VK (*E.coli*) vào môi trường lên men, sau khi ủ nhiệt 37°C/24h lấy ra kiểm tra.

Ø Kết quả:

- Lên men, sinh khí: Phenol red trong ống môi trường chuyển sang vàng, ống Durham có khí. Ký hiệu: (+, h) hoặc (+, G).
- Lên men, không sinh khí: Phenol red trong ống môi trường chuyển sang vàng, ống Durham không có khí. Ký hiệu: (+).
- Không lên men: Phenol red vẫn giữ nguyên màu. Tự nhiên, ống Durham không có khí. Ký hiệu: (-).

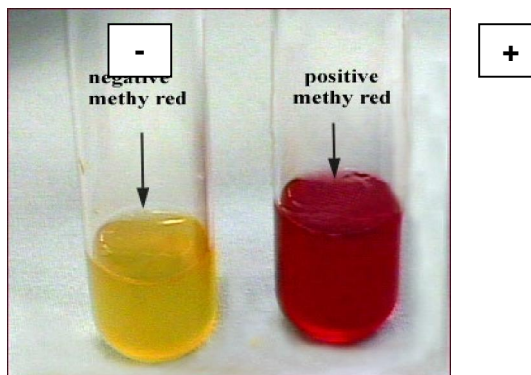


2. Phản ứng MR (Methyl Red).

Ø **C ch** : M t s nhóm ng ru t nh *E. coli*, *Salmonella*,...
chuy n hóa glucose thành acid pyruvic. R i ti p t c chuy n hóa
acid pyruvic thành ethanol, acid acetic, acid lactic, acid
succinic. Các acid t o ra làm pH môi tr ng gi m m nh, $\text{pH} \approx 4$
– 4,5. pH này methyl red màu , ng c l i, pH cao h n thì
Methyl red s chuy n sang màu vàng.

Ø **Môi tr ng và thu c th** : MT Clark – Lubs $\text{pH} \approx 7$, thu c
th Methyl red

Ø **Thao tác**: C y VK *E. coli*, vào MT Clark – Lubs,
 $37^\circ\text{C}/48\text{h}$, l y ra nh 5 – 10 gi t MR, c k t qu .



Ø **c k t qu** :

- Ph n ng Methyl red d ng tính: dung d ch Methyl red
trong môi tr ng v n gi nguyên màu . Ký hi u: MR (+).
- Ph n ng Methyl red âm tính: dd Methyl red trong môi
tr ng chuy n t sang vàng. Ký hi u: MR (-).

3. Ph n ng VP (Voges – Proskauer).

Ø **C ch** : Vi sinh v t chuy n hóa glucose thành acid pyruvic. R i
ti p t c chuy n hóa acid pyruvic thành acetyl methyl carbinol (
AMC). AMC tác d ng v i α - naphtol trong môi tr ng ki m
t o thành diacetyl. Diacetyl ph n ng v i nhân guanidine
(arginine) có trong pepton cho h p ch t màu h ng .

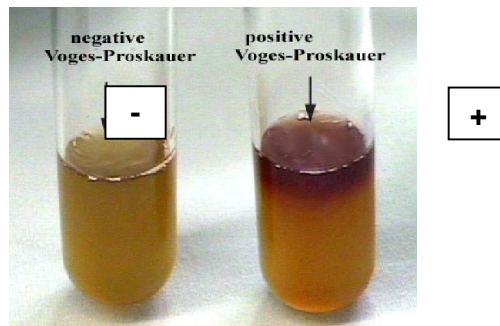
Ø **Môi tr ng và thu c th** : MT Clark – Lubs pH \approx 7, thu c th NaOH 40% (KOH 10%) và α - naphtol 10% trong c n.

Ø **Thao tác:** C y VK (*Bacillus anthracis*, *B. cereus*) vào MT Clark – Lubs, 37°C/24h, l y ra nh kho ng 10 gi t NaOH 40%, h nóng nh , nh ti p kho ng 10 – 15 gi t α - naphtol, l c u, yên 5 – 10 phút. c k t qu .

Ø **c k t qu** :

-Ph n ng VP d ng tính: môi tr ng chuy n màu cam. Ký hi u: VP(+).

-Ph n ng VP âm tính: môi tr ng có màu vàng ho c màu nâu t. Ký hi u: VP(-).



4. Ph n ng tìm kh n ng th y phân tinh b t.

Ø **C ch** : Vi sinh v t ti t enzym amylase, enzym này khu ch tán ra xung quanh khóm, phân gi i tinh b t có trong môi tr ng thành ng. Khi nh dung d ch thu c th Lugol vào, n i nào trên môi tr ng có tinh b t thì Iod tác d ng v i tinh b t t o màu xanh tím. N u quanh khóm VSV không còn tinh b t thì quanh khóm có vòng trong.

Ø **Môi tr ng và thu c th** : a môi tr ng Sabouraud, b sung 1% tinh b t, thu c th Iod 0.02N hay Lugol.

Ø **Thao tác:** Sau khi ã chu n b xong MT, c y VSV (*Aspergillus*) theo t ng khóm trên a, 37°C/24 – 48h, l y ra nh 1 – 2 ml dd Iod 0.02N hay Lugol, c k t qu .

Ø *c k t qu* :

- Ph n ng d ng tính: môi tr ng xung quanh n m không màu, trong su t. ó là vòng phân gi i tinh b t. N i khác có màu xanh tím.
- Ph n ng âm tính: toàn b môi tr ng xung quanh n m màu xanh.

Chú ý: vòng phân gi i càng l n, kh n ng th y phân tinh b t c a vi sinh v t càng m nh.

II. XÁC NH KH N NG PHÂN GI I CÁC H P CH T CH A NITROGEN:

Các h p ch t ch a Nitrogen th ng là ngu n cung c p N cho s t ng h p protein c a t bào vi sinh v t. Các vi sinh v t th ng s n sinh các lo i enzym t ng ng phân gi i chúng thành các ch t d s d ng nh acid amin, NH_3 , ... ng th i c ng có th sinh ra các ch t có tính c nh Indol, H_2S , ...

1. Kh n ng t o Indol.

Ø *C ch* : Vi sinh v t ti t enzym Tryptophanase, chuy n hóa Tryptophan thành Indol. Indol s k t h p v i para – dimethylaminobenzaldehyd trong thu c th Kowac's, t o thành ph c ch t Rosindol màu .

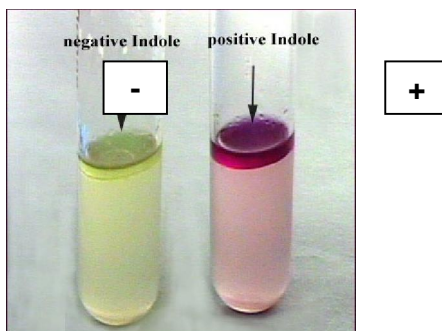
Ø *Môi tr ng và thu c th* : MT NB, pH \approx 7, thu c th Kowac's.

Ø *Thao tác:* c y VSV (*E. coli*) vào canh NB, 37°C/24h, l y ra nh 3-5 gi t Kowac's. c k t qu .

Ø *c k t qu* :

- Ph n ng Indol d ng tính: l p m t môi tr ng xu t hi n vòng . Ký hi u: I(+).

- Ph n ng Indol âm tính: môi tr ng có màu vàng chanh ho c xanh nh t. Ký hi u: I(-).



2. S t o thành H₂S.

Ø **C ch** : Vài lo i vi khu n có kh n ng phân gi i m t s acid amin ch a S nh Cystin, Cystein, Methionin có trong môi tr ng nuôi c y, t o thành H₂S. Có th phát hi n H₂S b ng nhi u cách, ph m vi giáo trình này ch n 2 cách.

- Vi sinh v t phân gi i các acid amin ch a S, t o thành H₂S.

- H₂S sinh ra trong môi tr ng th ch chì (ho c trong môi tr ng canh, H₂S↑) s k t h p v i Pb(CH₃COO)₂ t o thành PbS màu en.



Ø **Môi tr ng và thu c th** : MT th ch chì hay NB có gài gi y t m acetat chì trên mi ng ng nghi m.

Ø **Thao tác**:

Cách 1: MT th ch chì. Dùng que c y th ng c y VSV vào gi a ng nghi m. Cho vào t m 37°C, trong 24- 48 gi .

Cách 2: MT canh NB. Dùng que c y vòng l y VSV c y sang ng nghi m môi tr ng canh NB, gài gi y l c t m acetat Pb 20% (vô

khu n) vào mi ng ng nghi m, dùng b ng keo trong b n nh b t kín mi ng ng nghi m.

L u ý: trong khi thao tác, không c dung d ch môi tr ng nuôi c y ch m vào gi y acetat Pb. Cho vào t m 37°C, trong 24- 48 gi .

Ø **c k t qu :**

Cách 1: MT chuy n màu en (+).

MT không chuy n màu (-).

Cách 2: Gi y t m chuy n màu en (+).

Gi y t m không chuy n màu (-).

3. Kh n ng phân gi i gelatin.

Ø **C ch :** m t s VK có kh n ng t ng h p enzyme gelatinase ngo i bào th y phân gelatin thành polypeptide và a.amin làm phá h y c tính ông c c a gelatin ngay khi t° < 25°C và hóa l ng t° > 25°C.

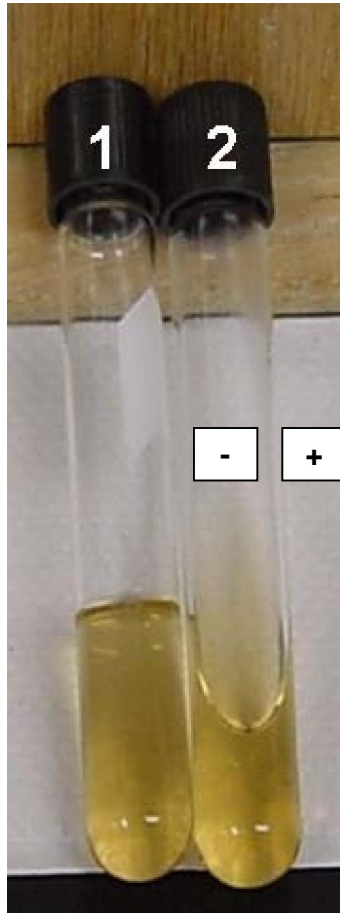
Ø **Môi tr ng:** MT canh NB b sung 10% gelatin, pH ≈ 7.

Ø **Thao tác:** Dùng que c y th ng c y VK (Bacillus cereus ho c Bacillus anthracis) vào MT, 37°/24h, th c hi n song song v i ng i ch ng không c y VK.

Ø **c k t qu :** sau khi l y ra cho vào ng n d i t l nh 30 phút – 1h.

+ N u MT hóa l ng (+).

+ N u MT ông c (-).



4. Kh n ng s d ng Nitrat (kh NO_3^-).

Ø **C ch** : M t s VK có kh n ng s d ng nitrat làm ngu n nh n hydro c ch t trong quá trình hô h p k khí ng th i s d ng nitrat làm ngu n nit do có kh n ng t ng h p enzyme Nitratreductase. Nitrat b kh thành nitrit và r i có th b kh ti p thành NH_3 ho c N_2 .

Ø **Thao tác**: C y VK (*Staphylococcus aureus* ho c *E. coli*) vào MT nitrat, 37°/24h. L y ra nh vào gi t thu c th Gress A (acid sulfanilic) và vài gi t Gress B (α - naphthylamin).

Ø **c k t qu** :

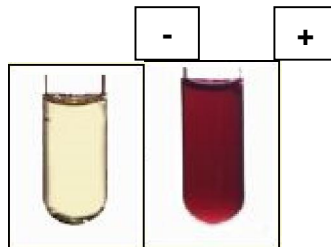
+ MT có màu h ng (+): Trong MT xu t hi n nhóm NO_2^- do NO_3^- chuy n hóa.

+ MT không i màu (\pm): Trong MT không có nhóm NO_2^- .

Nh v y có 2 kh n ng:

- Tr ng h p 1(-): NO_3^- không chuy n thành NO_2^- .
- Tr ng h p 2(+): NO_3^- chuy n thành NO_2^- , sau ó nitrit ti p t c chuy n thành NH_3 hay N_2 nên thu c th Gress A và Gress B không phát hi n c.

Ti p t c cho b t k m vào, n u xu t hi n màu thì âm tính, n u không i màu là d ng tính.



5. Kh n ng phân gi i urê $-(\text{NH})_2\text{CO}$.

Ø **C ch** : Vài loài VK có kh n ng phân gi i urê thành NH_3 , do có kh n ng t ng h p enzyme urease. S phó thích NH_3 làm t ng pH MT và có th theo dõi qua s i màu c a ch t ch th .

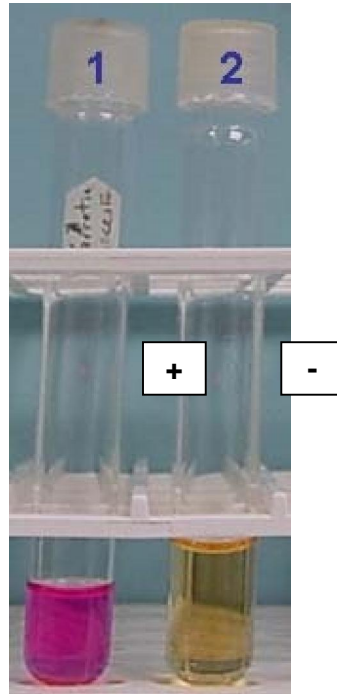
Ø **Môi tr ng**: MT Christesen's Urea b sung urê, ch th màu phenol red, pH $\approx 7,2$.

Ø **Thao tác**: C y VK (*Proteus spp.*) vào MT, $37^\circ/24\text{h}$. L y c k t qu .

Ø **c k t qu** :

+ Phenol red chuy n t h ng sang cánh sen (+).

+ MT không i màu (-).



III. XÁC NH M T S C TÍNH SINH HÓA KHÁC:

1. Ho t tính Oxydase.

Ø **C ch** : Các loài vi khu n hi u khí tuy t i có enzym oxydase (cytochrom oxydase). Có th phát hi n Oxydase b ng 2 cách.

Ø **Môi tr ng**: MT NA ho c TSA, thu c th là gi m t y N-Dimethyl-Para phenylenediamine hay dd thu c th tetra methyl-para phenylenediamine.

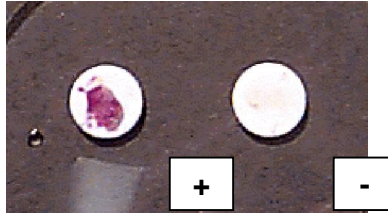
Ø **Thao tác**:

Cách 1: Dùng que c y vòng l y vi khu n trong a vi khu n ã nuôi c y, ph t lên gi y t m thu c th . c k t qu trong vòng 30 giây – 1 phút.

Cách 2: Dùng ng nh gi t, nh 1 gi t Tetr methyl-phenylenediamine lên khu n l c ã nuôi c y vi khu n trong a petri. c k t qu t 30 giây – 1 phút.

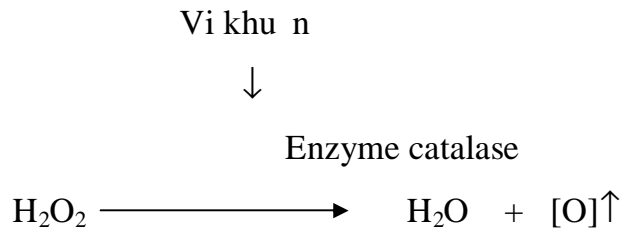
Ø *c k t qu* :

- Ph n ng Oxydase d ng: que gi y t m ho c gi t thu c th chuy n sang màu tím en. Ký hi u: Oxydase (+).
- Ph n ng Oxydase âm: que gi y v n gi màu tr ng c, ho c thu c th v n màu h ng. Ký hi u: Oxydase (-).



2. Ho t tính Catalase.

- Ø *C ch* : Enzym catalase th ng g p vi khu n hi u khí tuy t i hay tùy nghi. Catalase có kh n ng phân gi i peroxyt tao O₂ và n c.

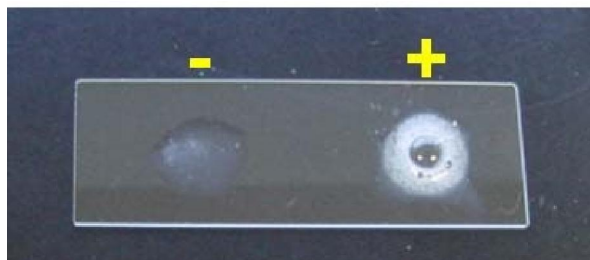


- Ø *Môi tr ng*: a th ch TSA ho c NA, pH ≈ 7,2. ã c y VK (*Staphylococcus aureus*) 37°C/24h.

Ø *Thao tác và c k t qu* :

- Dùng que c y vòng, l y y 1 vòng c y vi khu n hòa vào gi t H₂O₂, quan sát.
- Ph n ng Catalase d ng: Gi t H₂O₂ s i b t m nh ho c y u. Ký hi u: Catalase (+).
- Ph n ng Catalase âm: không có hi n t ng s i b t. Ký hi u: Catalase (-).

- L u ý: n u l H_2O_2 3- 10% không y kín, ho c không b o qu n l nh $\approx 4 - 8^\circ C$, ho c quá lâu. Thì k t qu s sai (âm tính gi).



3. Xác nh kh n ng làm dung huyết (tan máu).

Ø **C ch** : M t vài loài vi sinh v t có kh n ng sinh enzym hemolysin làm tan máu (dung huyết). Khi nuôi c y trên môi tr ng giàu dinh d ng (MHA), có b sung 5 – 10% máu c u ho c th , tùy theo loài vi khu n ta có 1 trong 3 lo i tan máu sau:

- Tan máu α : tan máu không hoàn toàn, vùng tan máu h p, màu xanh, c m .
- Tan máu β : tan máu hoàn toàn, vùng tan máu r ng, không màu, trong su t.
- Tan máu γ : không tan máu.



Ø **Môi tr ng**: a th ch MHA, b sung 5% máu c u, còn g i là th ch máu BA.

Ø **Thao tác và c k t qu :**

- Dùng que cấy vòng l y VK cấy lên MT thạch máu, có thể tiến hành vi VK i ch ng không dung huyết như *Salmonella*. Cho vào tủ ấm 37°C, trong 24 giờ.
- Phản ứng tan máu dương (+): xung quanh khuẩn lạc có vùng tan máu nhỏ mờ trên.
- Phản ứng tan máu âm(-): không có vùng tan máu chung quanh.

4. Xác định khả năng di động.

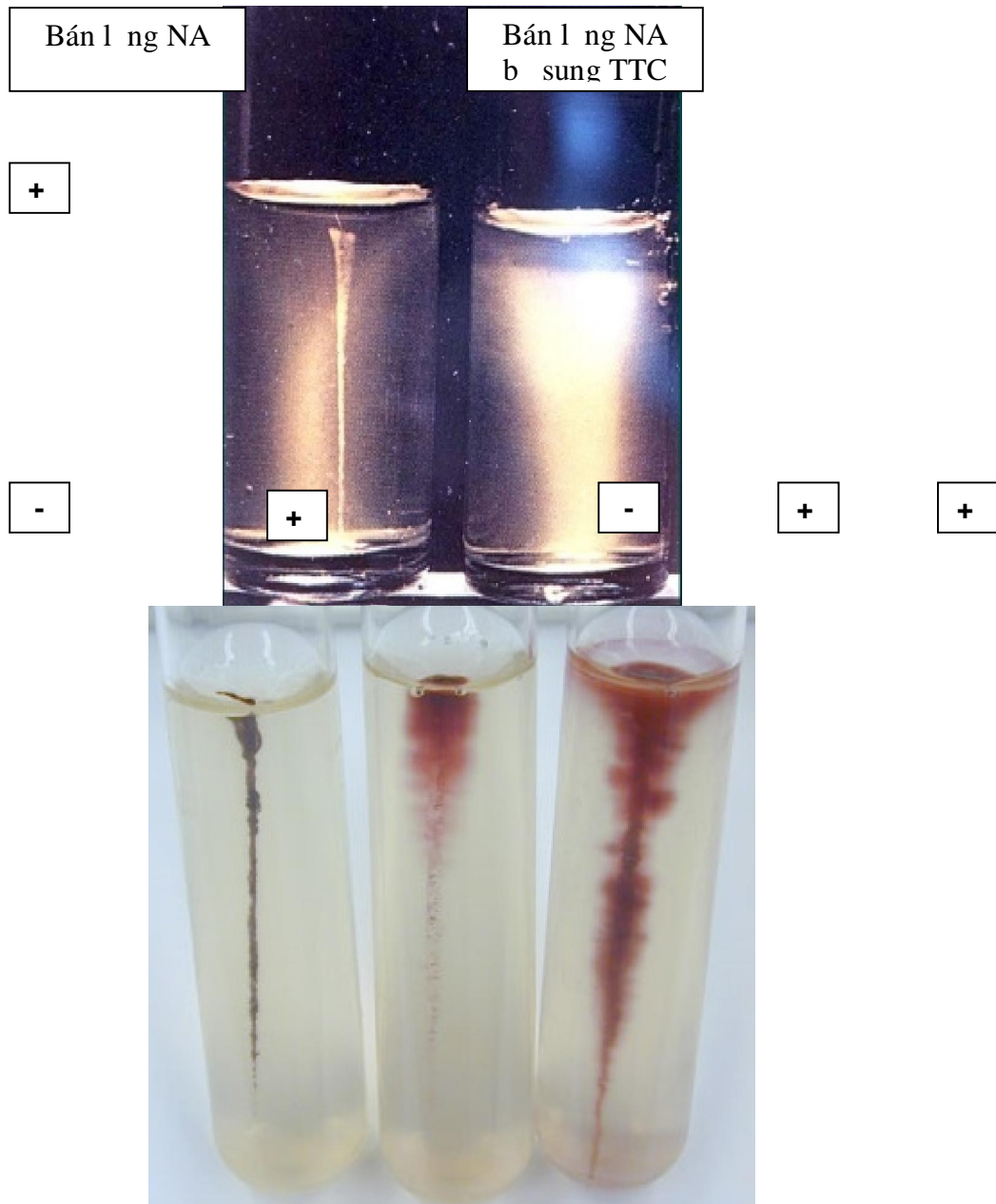
Ø **C ch :** một số vi khuẩn có tiêm mao (lagella) nên có khả năng di động trong môi trường bán lỏng và làm c môi trường hay mọc gi nh r cây xung quanh cấy.

Khi cần có thể dùng mu i tetrazolium trong môi trường thạch di động, tuy nhiên chất này có tính c ch vài loại vi sinh vật. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) thường c pha trộn với nồng độ 1%, thành trùng b ng màng l c vi khuẩn 0,45µm. Vi c b sung TTC giúp phát hiện di động d dàng hơn, c biệt nh ng tr ng h p khó c k t qu .

Ø **Môi trường:** Môi trường bán lỏng NA, ng.

Ø **Thao tác và c k t qu :**

- Dùng que cấy thẳng l y vi khuẩn (*Bacillus subtilis*, *E.coli* hoặc *Salmonella* trong cấy sang ống nghiệm thạch bán lỏng, trích thẳng t trên xuống đĩa ngay giữa ống MT.
- Cho vào tủ ấm 37°C, trong 24 – 48 giờ. c k t qu .
- Phản ứng di động dương (+): Vi khuẩn mọc lan ra khắp ống cấy, xa hay gần tùy theo khả năng di động của vi khuẩn mạnh hay yếu.
- Phản ứng di động âm (-): vi khuẩn chỉ mọc trên ống cấy.



5. Xác nh kh n ng s d ng Citrat.

Ø *C ch* : M t s VSV có enzyme citrat permease có kh n ng s d ng citrat trong MT có Na.citrat làm ngu n cacbon duy nh t. Khi s d ng citrat chúng gi i phóng ra MT ion Na^+ làm t ng pH c a MT. ng th i nh ng VSV có kh n ng s d ng citrat làm ngu n cacbon thì c ng có kh n ng s d ng mu i amonium vô c $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ làm ngu n nit t o ra NH_3 c ng làm ki m hóa

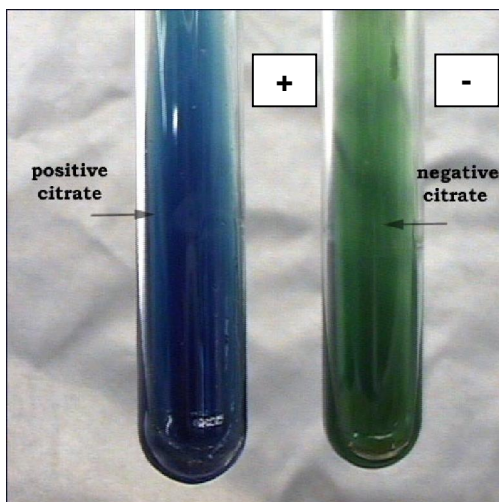
MT, s thay i pH c a MT c nh n bi t nh ch th màu Bromothymol blue.

Ø **Môi tr ng:** MT Simomns Citrat, ch th màu Bromothymol blue, pH ≈ 6.8.

Ø **Thao tác:** C y VK (Salmonella) vào MT theo ng Zích – z c, 37°/24h. L y c k t qu .

Ø **c k t qu :**

- Ph n ng citrat (+): Xanh bromothymol chuy n t màu l c sang màu xanh d ng.
- Ph n ng citrat âm (-): xanh bromothymol v n gi màu l c.



6. Xác nh kh n ng làm ông huy t t ng.

Ø **C ch :** m t s VSV có kh n ng t ng h p enzym coagulase c bi t là các loài thu c gi ng *Staphylococcus*, enzyme này làm ông huy t twong ng i ho c th (enzyme này là m t protein b n v i t°, có tính kháng nguyên y u).

Ø **Môi tr ng:** Huy t t ng ng i hay th ông khô d ng th ng ph m. Ho c có th t i u ch nh sau:

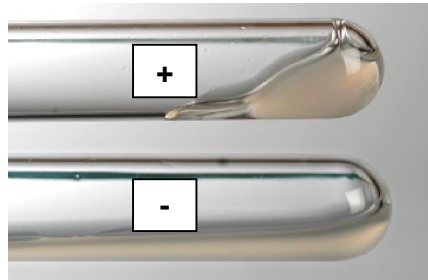
Cách l y huy t t ng th :

- Dùng xylanh vô trùng hút 0,2ml dung d ch kháng ông citrat Na 3,8% (vô trùng), sau ó rút l y máu tim th .

- Cho máu vào ống ly tâm, ly tâm 1500 vòng/phút/10 phút.
Chiết lấy dịch trong là huyết tương.

Ø **Thao tác và kiểm tra :**

- Phân huyết tương vào môi trường nghiệm như 0,5ml. Cấy VSV cần kiểm tra vào. 37°/4-24h. Lấy kiểm tra.
- Phản ứng Coagulase (+): huyết tương đông lại từ 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ hoặc 24 giờ.
- Phản ứng đông tụ âm (-): huyết tương vẫn lỏng sau 24 giờ nuôi cấy (như nước).



7.Th nghiệm KIA (Kligler Iron Agar), TSI (Triple Sugar Iron Agar)

- Ø **Cách :** cách dùng thử nghiệm như thí nghiệm 2 khác nhau: các nguồn carbon khác nhau (glucose, lactose) và khả năng sinh H₂S của VSV. Khi cấy VSV trên MT này, có 3 trường hợp xảy ra:
- Chỉ dùng glucose: sau 18- 24h nuôi cấy phản ứng (bề mặt) trở nên có pH kiềm và phản ứng (phần sâu trong nghiệm) có pH acid. Do glucose trên bề mặt của môi trường VSV oxy hóa hoàn toàn thành CO₂ và H₂O thu lấy năng lượng. Đáp ứng nhu cầu năng lượng trong tế bào, VSV tiếp tục phân giải peptone qua ống nghiệm phóng NH₃ làm phần bề mặt của môi trường có pH kiềm. Trong khi đó, phần sâu trong môi trường có ít oxy không xảy ra, glucose sẽ lên men và sinh các acid hữu cơ làm pH môi trường giảm.

- S d ng c glucose và lactose: sau 18-24h toàn b môi tr ng u tr nên có pH acid vì s bi n d ng ng th i c 2 lo i ng giúp VSV n ng l ng t ng tr ng mà ch a c n s d ng n peptone. N u kéo dài th i gian nuôi c y quá 24h, b m t môi tr ng s tr nên ki m do h t ngu n cacbon và VSV ph i s d ng n peptone.
- Không s d ng glucose, lactose: VSV s bi n d ng peptone thu l y n ng l ng và v t ch t cho s t ng tr ng. Tuy nhiên, do peptone ch c bi n d ng trong i u ki n hi u khí nên hi n t ng ki m hóa môi tr ng ch di n ra trên b m t c a môi tr ng.
- Kh n ng sinh H₂S: do trong môi tr ng sodium thiosulfat, VSV kh sunfate có th kh ch t này, nh có enzyme thiosunfat reductase gi i phóng H₂S, H₂S s ph n ng v i ion Fe²⁺ c a ch th ferric ammonium citrate t o k t t a màu en FeS.
- Trong các tr ng h p trên, N u s lên men ng t o s n ph m khí, thì khí s k t t thành b t khí trong ng nghi m hay s làm v th ch

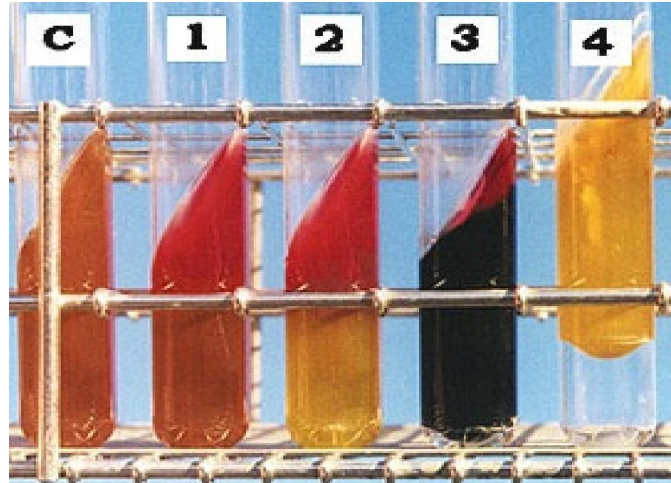
Ø **Môi tr ng:** Môi tr ng KIA ch a 2 lo i ng 0.1% glucose, 1% lactose. T ng t , môi tr ng TSI có thành ph n nh môi tr ng KIA nh ng có thêm 1% sucrose (saccharose).

Ø **Thao tác:** dùng que c y th ng l y sinh kh i (*Salmonella*, *E.coli*, *Shigella*) c y th ng sâu vào ng nghi m nh ng tránh ch m áy ng, sau ó ria trên b m t th ch nghiêng.

Ø **c k t qu :** 37°C/18-24h

- / vàng (ki m/ acid): ch lên men ng glucose
- Vàng/ vàng (acid/ acid): lên men glucose và lactose

- Môi tr ng v n , ph n b m t m h n so v i s bi n d ng peptone: không lên men glucose và lactose
- N u trong ng nghi m sinh k t t a màu en: có kh n ng sinh H₂S.



IV/ TH C HÀNH.

Sinh viên th c hành các c y các ph n ng sinh hóa theo h ng đ n.

V/ BÁO CÁO.

Sinh viên trình bày l i nguyên t c và báo cáo k t qu các th nghi m sinh hóa.

Bài 9: PH NG PHÁP KI M TRA S L NG T BÀO VI SINH V T

I/ TÓM T T LÝ THUY T.

Có 2 PP c b n ki m tra s l ng t bào vi sinh v t:

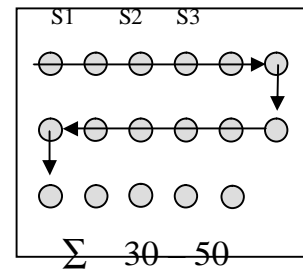
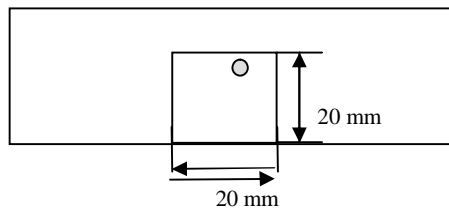
- PP m tr c ti p trên kính HV: PP này m tr c ti p s l ng t bào VSV
- PP m gián ti p: PP này m s l ng t bào VSV thông qua s khu n l c (colonies) m c trên th ch a và d a vào s lên men làm c MT nuôi c y t ó ta có ng +,- → tra b ng.

Ø Nguyên t t chung:

- M u ph i c pha loãng. Tu theo m c nhi m khu n c m u ta có s c l ng pha loãng 1/5; 1/10 ; 1/20 hay 1/10; 1/100; 1/1000.....
- Dung d ch dùng pha loãng m u th ng là NaCl 9%0 hay phot phat m ã c vô trùng.
- Cách pha:
 - + M u 1/5 : 1ml m u + 4ml NaCl 9%0
 - + m u 1/10: 1ml m u + 9ml NaCl 9%0
- T m u 1/10(10^{-1}) l y 1ml + 9ml NaCl 9%0 ta có pha loãng 10^{-2} , c nh v y ta có các pha loãng ti p theo 10^{-3} , 10^{-4}

II/ PH NG PHÁP MTR C TI P.

1. *m trên lam ph t kính*: Tiêu b n VK ã c nhu m màu (nhu m n).



VT

Hình: Diện tích hình vuông ph t kính

S : Di chuy n
 v t kính trong
 hình vuông ph t
 kính, m s
 VSV/1VT

a. Ph t kính:

- Dùng lam s ch và bút chì m (bút lông kim), k m t hình vuông $S = 400 \text{ mm}^2$, m t trên lam. M c ích không cho VK lan ra kh i di n tích m.
- Hút V (0.02 – 0.2 ml) dung d ch ã pha loãng , nh vào gi a hình vuông, m t trên lam.
- t que c y, ngu i, dùng c nh vòng c y u que dần u gi t m u ra xung quanh, v a ch m vào c nh hình vuông.
- C nh tiêu b n, nhu m n b ng thu c nhu m blue methylen.
- Nh m t gi t d u soi, xem v t kính x100.

b. Cách m

- m s t bào VSV/ 1VT (VT: vi tr ng).
- m h t t c t 30 – 50 VT/ hình vuông ph t kính. Theo s hình v .

c. Công th c tính

$$S \text{ t bào}/_{1 \text{ ml m u}} = \frac{X \times 400}{0.0004 \times V \times H}$$

Trong ó:

$X = S \text{ VK m c}$ trong m t vi tr ng

400 = di n tích hình vuông ph t kính, b ng 400mm² } S vi tr ng có c trong S: 4cm²

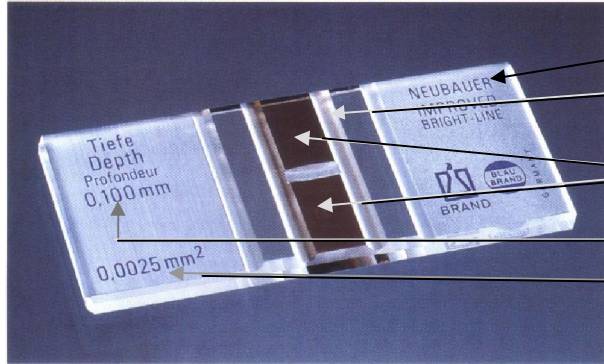
0.0004 = di n tích c a vi tr ng, $\pi R^2 = 0.0004 \text{ mm}^2$.

$V =$ th tích gi t VK ph t kính

$H =$ h s pha loãng m u

2. m trong bu ng m:

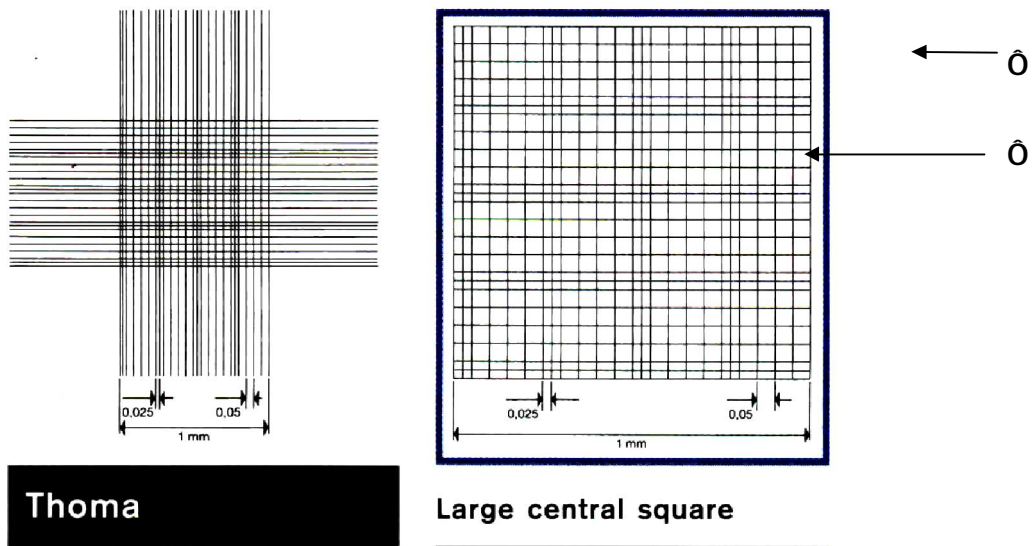
a. C u t o bu ng m.



Hình 24: Bu ng m t bào Vi sinh v t

- Bu ng m là m t phi n kính trong, dày, hình ch nh t.
- Gi a là ph n lõm ph ng, có k m t ho c hai khung m g m 400 ô nh . Bên ngoài có ghi tên lo i bu ng m, và ghi các thông s k thu t nh hình trên.

b. C u t o khung m.



Hình 25: C u t o Khung m Thoma

Ø C u t o m t khung m có:

- Tr ng h p1: 1 khung có 16 ô l n, 1 ô l n có 25 ô nh . V y 1 khung có 400 ô nh .
- Tr ng h p 2: 1 khung có 25 ô l n, 1 ô l n có 16 ô nh . V y 1 khung có 400 ô nh .
- Di n tích 1 ô nh là $1/400 \text{ mm}^2$. V y $V_{\text{ô nh}} = 0.1 \text{ mm} \times 1/400 \text{ mm}^2 = 1/4000 \text{ mm}^3$.

c/ Cách t i n hành.

- t lammen s ch ph lên khung m.
- Dùng ng nh gi t hút dung d ch n m men ã pha loãng, b i vài gi t u, b m nh vào rãnh bu ng m, dung d ch th m vào k bu ng m và lammen.
- Dung d ch ch y tràn t t vào các rãnh, lan t a l p y kh p lammen, h i th a m t ít. N u b b t k t l i trong lammen thì ph i làm l i.

- t bu ng m lên bàn k p c a kính hi n vi, dùng k p c nh bu ng m.
- Thao tác kính hi n vi, dùng v t kính x10 i u ch nh s b tr c, sau ó dùng v t kính x40 m.
- m s t bào trong 5 ô l n (4 ô c nh, 1 ô gi a), m l n l t t ng ô nh trong 1 ô l n . Trong t t c các ô nh c n m s t bào n m h n trong ô tr c, sau ó m s t bào n m c nh phía trên và c nh bên ph i ô.
- m t t c 80 ô nh có trong 5 ô l n (T/h: 1 ô l n có 16 ô nh).
- Ho c m 125 ô nh có trong 5 ô l n (T/h: 1 ô l n có 25 ô nh).

d. Công th c tính.

$$S \text{ t bào}/1 \text{ ml m u} = \frac{a \times 4.000 \times 1.000}{H}$$

Trong ó: a = s t bào trung bình có trong 1 ô nh (V = 1/4.000 mm³)

4.000 = s qui i t 1/4.000 mm³ thành 1 mm³.

1.000 = s qui i t 1 mm³ thành 1ml (1ml = 1.000 mm³)

H = h s pha loãng (ví d : H = 10⁻²)

e. Chú ý:

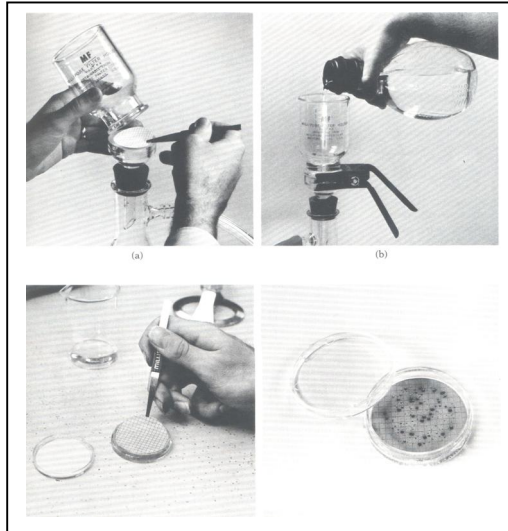
- Ch m c t ng s t bào, không th bi t t bào nào còn s ng, t bào nào ã ch t.
- N ng d ch huy n phù pha loãng sao cho m t trong m i ô nh không quá 10 t bào.
- S d ng xong ph i r a bu ng m ngay và lau khô.
- t chính xác cao, thì s t bào trung bình m c trong 1 ô nh : 2.5 < a < 10.

III/ Ph ng Pháp m Gián Ti p.

1. Ph ng pháp dùng màng l c vi khu n.

Ph ng pháp này th ng c dùng nh l ng VSV ch th trong m u n c khi ti n hành các th nghi m môi tr ng n i có m t VSV t ng i th p. Ph ng pháp này g m b c l c t p trung VSV trong m t m u n c trên màng l c và xác nh s t bào VSV đ a vào s khu n l c m c sau khi t màng l c lên trên môi tr ng th ch có thành ph n dinh d ng thích h p cho lo i VSV c n ki m. Đ a trên kh i l ng m u n c ban u và quy c là m i khu n l c c hình thành t m t t bào VSV, ng i ta quy ra s l ng VSV có trong m t n v th tích n c. Nh v y, ph ng pháp này là s k t h p c a ph ng pháp l c vô trùng và ph ng pháp m khu n l c trên a petri. Màng l c có kích th c l là $0.45\mu\text{m}$ ho c $0.2\mu\text{m}$ c ch t o t nguyên li u là s i thu tinh siêu m nh, s i polypropylene, th ng c cung c p trong tr ng thái vô trùng.

Ngoài màng l c bình th ng hi n nay ng i ta còn s d ng màng l c l i k n c trên ó có in ô vuông b ng v t li u k n c. Các v ch chia ô b ng v t li u này ng n c n s m c la c a các khu n l c. Khác tr ng h p màng l c bình th ng, t s các ô vuông có khu n l c m c, m t VSV trong m u c tính và trình bày đ i đ ng s có xác su t l n nh t (MPN) c a l ng VSV có trong m t n v th tích m u theo công th c: $MPN = N \ln(N/N - x)$; trong ó N là t ng s các ô vuông, x là c s khu n l c m c.



Hình 26: nh l ng vi sinh v t b ng ph ng pháp màng l c.

2. m s khu n l c trên môi tr ng th ch a.

a. Nguyên t c:

C y m t th tích xác nh d ch m u ã pha loãng lên a petri môi tr ng thích h p.

m s l ng khu n l c m c lên sau th i gian nuôi c y vì m i khu n là k t qu phát tri n c a m t t bào.

b. Thao tác a:

Dùng bút lông kim ghi lên áy h p môi tr ng: tên m u, tên ng i th c hi n, ngày c y, th tích d ch c y, n ng pha loãng.

Cách 1: Dùng pipette vô khu n hút d ch pha loãng cho vào 3 a petri môi tr ng, th tích b ng nhau, m i a có V t 0,1 ml – 0,5 ml. L y que g t dàn u m u lên m t th ch tách riêng t ng t bào.

Cách 2: Dùng pipette vô khu n hút Vml d ch pha loãng cho vào 3 a petri vô khu n, th tích b ng nhau, m i a có V t 0,1 ml – 0,5 ml. Môi tr ng pha s n trong bình 250ml, b o qu n l nh.

un cách th y môi tr ng cho tan u, ch ngu i 40°C, vào các a ch a m u, m i a 10 - 15 ml môi tr ng. Xoay tròn a theo chi u kim ng h và ng c l i cho môi tr ng hòa u m u, yên cho môi tr ng c hoàn toàn.

2 cách trên, m i m u u c y 3 n ng liên ti p. M i n ng c y 3 a petri, sau ó l y k t qu trung bình.

t t t c các a ã c y vào t m, nuôi t^o và th i gian thích h p.

c. Cách m khu n l c:

Dùng bút lông kim và th c, k các ô vuông áy h p, c nh ô vuông t 10 – 15 mm. m s khu n l c trong các ô vuông theo l n l t theo hình zig z c.

d. Công th c tính:

$$N(\text{CFU / g hay CFU / ml}) = \frac{\sum C}{(n_1 v d_1 + \dots + n_i v d_i)}$$

N: S t bào (n v hình thành khu n) vi khu n trong 1 g hay 1ml m u.

ΣC: T ng s khu n l c m c trên các h p petri ã ch n.

n₁: S h p petri c y t i pha loãng th 1.

d_i: H s pha loãng th i.

v: th tích d ch m u(ml) c y vào m i a petri.

3. Ph ng pháp pha loãng t i h n (MPN):

Ø Nguyên t c: Ph ng pháp MPN (ph ng pháp có s xác su t cao nh t; s t i kh) còn c g i là ph ng pháp pha loãng t i h n hay ph ng pháp chu n . ây là ph ng pháp dùng ánh giá s l ng vi sinh v t theo s l ng vi sinh v t có xác su t l n nh t hi n di n trong m t n v th tích m u. ây là ph ng pháp nh l ng d a trên k t qu nh tính c a m t lo t thí nghi m c l p l i m t s pha loãng khác nhau. Thông

th ng, vi c nh l ng này c th c hi n l p l i 3 l n 3 pha loãng b c 10 liên ti p, t ng c ng $3 \times 3 = 9$ ng nghi m.

Quy trình th c hi n nh l ng theo ph ng pháp này là nh sau :

Cho vào các ng nghi m có ch a môi tr ng thích h p cho s t ng tr ng c a i t ng vi sinh v t c n nh l ng m t th tích chính xác dung d ch m u 3 n ng pha loãng b c 10 liên ti p (ví d 1/10, 1/100, 1/1000). nhi t và th i gian thích h p. Đ a vào k t qu bi u ki n ch ng minh s t ng tr ng c a vi sinh v t c n ki m nh trong t ng ng nghi m (th ng là các hi n t ng nh sinh h i, i màu, c ...), ghi nh n s l ng các ng nghi m đ ng tính t ng pha loãng. S d ng các s li u này và đ a vào b ng Mac Crady suy ra m t vi sinh v t c trình bày đ i đ ng s MPN/100ml hay s MPN/lg m u. chính xác c a tr s MPN ph thu c vào s l ng ng nghi m l p l i trong m i pha loãng.

Ph ng pháp MPN có th dùng nh l ng b t k lo i vi sinh v t nào b ng cách nuôi c y chúng trên môi tr ng t ng sinh ch n l c (môi tr ng l ng.

- Ø Thao tác: C th là m Coliforms trong th c ph m, n c u ng, n c sinh ho t ho c n c th i.
- L y m u.
 - Pha loãng m u, ch n ba pha loãng liên ti p (thích h p).
 - M i pha loãng hút 3 l n, m i l n 1 ml c y vào 1 ng nghi m môi tr ng Lactose broth.
 - m t $35 - 37^{\circ}\text{C}/24 - 48\text{gi}$. Cách c k t qu , tra b ng MPN theo h ng d n trên.

Trong phân tích mẫu, nếu không oán các chất lỏng và sinh học mẫu, ta có thể tăng số dãy kiểm tra lên tùy ý. Nhưng khi kiểm tra, ta chỉ cần 3 dãy liên tiếp nhau.

4. Phương pháp đo đếm.

Khi môi trường có chứa nhiều phần tử không tan thì sẽ hình thành một huyền phù và có các bị các phần tử hiện diện trong môi trường làm cản ánh sáng, làm phân tán chùm ánh sáng tới. Tủ VSV là một thiết bị nên khi hiện diện trong môi trường cản làm môi trường trở nên đục. Các huyền phù từ vi khuẩn và bào tử. Trong một giờ hiện nay thì các và một tế bào, có thể xác lập các quan hệ tương tự tính giá trị từ bào và các. Do vậy có thể nhận định một tế bào một cách gián tiếp thông qua đo đếm bằng máy số màu các bước sóng từ 550-610nm. Trong trường hợp này, trước tiên cần phải thiết lập các quan hệ tương tự tính giá trị các và một tế bào bằng cách sử dụng một huyền phù tế bào có các xác định bằng một phương pháp trực tiếp khác, ví dụ như phương pháp đếm khuẩn lạc, phương pháp đếm trực tiếp...

* Xây dựng một bảng quan hệ tương tự tính giá trị các và một tế bào

- Pha loãng một huyền phù chứa loại VSV cần kiểm nghiệm có một bất kỳ thành các huyền phù khác nhau có các OD_{610nm} các giá trị lần lượt 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; và 0,5. Các OD_{610nm} của các huyền phù và các pha, ghi nhận số đo thực tế.
- Dùng phương pháp đếm trực tiếp để kính hiển vi hoặc phương pháp đếm khuẩn lạc, xác định một tế bào (N/ml) của các huyền phù này.

- Tính giá trị $\log(N/ml)$ cho mỗi giá trị mật độ N/ml tương ứng với mỗi mật độ c . Vẽ đường biểu diễn của $\log(N/ml)$ (trục tung) theo OD_{610nm} (trục hoành). Xác định khoảng tuyến tính giữa $\log(N/ml)$ và OD_{610nm} .

* Xác định mật độ tế bào theo c

- Xác định các tham số tuyến tính của đường X để xác định mật độ.
- Từ trục OD_{610nm} cho c , dựa vào đường tuyến tính quan hệ giữa $\log(N/ml)$ và c OD_{610nm} , suy ra trục $\log(N/ml)$ và trục mật độ N/ml ($N/ml = 10^a$ với $a = \log(N/ml)$).

Phương pháp này có thể dùng để so sánh mật độ tăng trưởng của hai hay nhiều chủng vi sinh vật trong môi trường lỏng. Trong trường hợp không cần biết giá trị tuyến tính của mật độ tế bào thì không cần phải xây dựng đường tuyến tính quan hệ giữa c và mật độ. Phương pháp này cho kết quả nhanh chóng và đáng tin cậy trong theo dõi hoặc nghiên cứu các trường tăng trưởng của các chủng vi sinh vật trong PTN hoặc trong sản xuất tuy nhiên không thích hợp cho ứng dụng trong kỹ thuật vi sinh vật.

IV/ THỰC HÀNH.

- Nhận định trực tiếp số lượng vi khuẩn *Bacillus subtilis* trên lam kính.
- Nhận định trực tiếp số lượng tế bào nấm men bằng buồng đếm hồng cầu.
- Nhận định gián tiếp vi khuẩn bằng phương pháp đếm màng lọc.
- Nhận định coliforms bằng phương pháp MPN.

V/ BÁO CÁO.

Sinh viên báo cáo k t qu nh l ng vi sinh v t.

PH L C

A. HÓA CH T.

1. C n – Ether T l v th tích 3:1.

ong 750 ml c n 96° + 250 ml ether, ta c dung d ch c n – ether t l 3:1. Dung d ch này dùng t y s ch v t kính đ u, ho c các đ ng c đính đ u soi.

2. C n – acid (dùng nhu m Ziehl Neelsen)

Cách pha: ong 97 ml c n 96° + 3 ml acid HCl ho c H₂SO₄ m c.

3. Dung d ch sunfo – cromic: K₂Cr₂O₇ + H₂SO₄

Công th c:

K ₂ Cr ₂ O ₇	60g
H ₂ SO ₄ m c	66ml
N c	1000ml

Cách pha:

Cân 60g K₂Cr₂O₇, hào vào 500ml n c. Thêm t t 66ml H₂SO₄ m c, cu i cùng l i thêm 500ml n c n a. Bicromate kali s tác đ ng v i acid sulfuric và làm sinh ra acid cromic. Ch t này có tác đ ng oxi hóa m nh do ó có th t y s ch các v t b n trên đ ng c th y tinh.

Th i gian ngâm đ ng c th y tinh t 1 – 2 ngày, x th t k b ng n c s ch, r a b ng savon b t, r i r a l i b ng n c s ch.

Dung d ch này có th dùng nhi u l n cho n khi dung d ch t màu cam bi n thành màu l c en thì b i.

2. Lugol:

Công th c:

KI	2g
Iod tinh th	1g
N c c t	300ml

Cách pha: Hòa 2g KI vào 5ml n c c t, sau ó thêm 1g iod. Ch cho iod tan h t m i thêm n c v a 300ml.

3. Fuchsine ki m ($C_{19}H_{18}N_3Cl = 323,82$):

Công th c:

a) Fuchsine ki m	0,3g
C n 96%	10ml
b) Phenol	5g
N c c t	35ml

Cách pha:

Tr n dung d ch a và b v i nhau → khu y cho tan u, em l c.
B o qu n trong chai màu.

Tr c khi dùng pha loãng 5 l n (d ch pha loãng không gi c lâu còn d ch c có th gi c trong nhi u tháng).

4. Safranin O ($C_{20}H_{19}N_4Cl = 350,80$):

Công th c:

Safranin O (dung d ch 2,5% trong c n 96°)	25ml
N c c t	75ml

B o qu n trong chai màu.

5. Methylene blue ($C_{37}H_{27}N_2Sna_2 = 799,80$):

Công th c:

- | | | |
|----|---------------------|--------|
| a) | Methylen blue | 3g |
| | C n 96% | 30ml |
| b) | Dung d ch KOH 0.01% | 1000ml |

Cách pha: Tr n hai dung d ch a và b l i v i nhau → khu y hào tan
u → em l c. B o qu n trong chai màu.

6. Thu c nhu m tiêm mao:

a/ Thu c nhu m Nishizawa Kangen

✓ Dung d ch A:

- + Acid tanic 5g
- + N c c t 100ml

Khu y cho tan u v a l c cho thêm vào th t các ch t sau:

- + $FeCl_3$ 1,5g
- + Formalin 2ml
- + NaOH 4% 1ml

✓ Dung d ch B:

- + $AgNO_3$ 2g
- + N c c t 100ml

Hòa $AgNO_3$ vào n c c t, l y ra 10ml cho vào c c th y tinh có dung tích 100ml.

C. THU C TH VÀ CH TH MÀU:

1. NaOH 40%:

Cân chính xác 40g NaOH tinh th + 60ml n c c t. Khu y cho tan
u.

2. KOH 10%:

Cân chính xác 10g KOH tinh th + 90ml n c c t. Khu y cho tan u.

3. Thu c th KOWAC:

(tìm kh n ng t o Indol c a vi khu n)

Công th c:

P – dimetilaminobenzaldehyt	5g
R u amilic hay butilic	75ml
HCl m c	25ml

4. Thu c th α - naphtol 10%: pha trong c n 96°, b o qu n l nh trong chai màu tr c khi dùng.

5. Thu c th xác nh kh n ng kh Nitrat:

Griess A:

Acid sulfanilic	0,5g
Acid acetic	30ml
N c c t v a	100ml

Dung d ch này c b o qu n trong 1 tháng, và c ng trong chai màu tránh ti p xúc v i ánh sáng.

Griess B:

α - naphtylamin	0,8g
Acid acetic	30ml
N c c t	100ml

Hòa tan 0,8g α - naphtylamin trong 100ml n c c t un sôi. ngu i r i b sung thêm 30ml acid acetic, em l c. ng trong chai màu. Dung d ch này ch c b o qu n c trong 1 tu n.

6. Thu c th Metyl red 0.5% trong c n:

Metyl red	0,5g
C n 60°	100ml

7. Cách làm gi y t m acetat Pb:

Chu n b :

Gi y l c c t thành s i kh (1 x 6cm)
Dung d ch acetat Pb 10 – 20%

Cách làm: Ngâm các s i gi y l c vào trong dung d ch acetat Pb 10 – 20%, kho ng 15 – 20 phút. Sau ó v t ra em s y khô nhi t 50 – 60°C. B o qu n trong l vô trùng.

L u ý: T t c các b c ti n hành u ph i làm m t cách vô trùng.

D. MÔI TR NG.

I. MÔI TR NG NUÔI C Y N M M C VÀ N M MEN.

1. Môi tr ng Sabouraud: (nuôi c y n m m c và n m men)

Công th c:

Pepton	20g
Mantose hay glucose	40g
Agar	18g
N c c t v a	1000ml

(pH: 5,5 – 6,0 kh khu n trong n i áp su t t° = 121 °C (1atm)/ 15-20 phút).

2. Môi tr ng Czapek: (nuôi c y n m m c)

Công th c:

Saccharose	30g
NaNO ₃	2g
KH ₂ PO ₄	0,5g

MgSO ₄	0,5g
FeSO ₄	0,01g
Agar	18g
N c c t v a	1000ml

(i u ch nh pH: 6, kh khu n trong n i áp su t t° = 121°C (1atm)/
15 – 20 phút).

3. Môi tr ng Hansens (nuôi c y n m men).

Công th c:

Maltose ho c glucose	50g
Pepton	10g
KH ₂ PO ₄	3g
MgSO ₄	3 – 5g
Agar	18g
N c c t v a	1000ml

(pH: 6, kh khu n trong n i áp su t t° = 121°C (1atm)/ 15 – 20
phút).

4. Môi tr ng Gauzer I: (nuôi c y x khu n)

Công th c:

Tinh b t tan	20g
KH ₂ PO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,5g
KNO ₃	1g
NaCl	0,5g
FeSO ₄	0,01g
Agar	18g
N c c t v a	1000ml

(pH: 7,2 – 7,4; kh khu n trong n i áp su t $t^{\circ} = 121^{\circ}\text{C}$ (1atm)/ 15 – 20 phút).

II. MÔI TR NG NUÔI C Y IV I VI KHU N.

1. Môi tr ng Nutrient Broth (NB):

Công th c:

Cao th t	5g
Pepton b t	10g
NaCl	5g
N c c t	1000ml

(pH: 7,4 – 7,6).

Cân 13g b t môi tr ng NB hòa vào 1000ml n c c t, khu y u. em h p kh trùng 121°C (1am)/ 15 – 20 phút.

2. Môi tr ng Nutrient Agar (NA):

Thành ph n môi tr ng nh môi tr ng NB nh ng có b sung 18g agar trong 1000ml môi tr ng.

Cân 23g b t môi tr ng NA hòa vào 1000ml n c c t, r i khu y u. Kh khu n trong n i áp su t $t^{\circ} = 121^{\circ}\text{C}$ (1atm)/ 15 – 20 phút.

3. Môi tr ng Trypticase soya broth (TSB):

Công th c:

Trypticase pepton	15g
Thytone pepton	5g
NaCl	5g
N c c t	1000ml

pH: 7,3

i u ch :Cân 30g b t môi tr ng TSB hòa trong 1000ml n c c t, un sôi cho hòa tan. H p 121°C/ 15 – 20 phút.

4. Môi tr ng Trypticase Soya Agar (TSA):

Công th c:

Trypticase pepton	15g
Thytone pepton	5g
NaCl	5g
Agar	18g
N c c t	1000ml
pH:	7,3

i u ch :Cân 30g b t môi tr ng TSB + 18g agar, hòa trong 1000ml n c c t, un sôi cho hòa tan h t agar.H p 121°C/15 – 20 phút.

5. Môi tr ng Brilliant Green Bile Lactose (BGBL) Broth:

Công th c:

Pepton	10g
Lactose	10g
Oxgall	20g
Brilliant green	0,0133g
N c c t	1000ml
(pH: 7,7 ± 0,1)	

i u ch :Cân 40g b t môi tr ng BGBL hòa vào 1000ml n c c t, r i khu y u. em h p kh khu n 121°C (1atm)/15 – 20 phút.

6. Môi tr ng Lactose Broth:

Công th c:

Chi t th t bò	3g
---------------	----

Pepton	5g
Lactose	5g
N c c t	1000ml

(pH: $6,9 \pm 0,2$)

i u ch :Phân ph i vào ng nghi m, 10ml/ 1 ng. Cho ng Durham vào, h p kh khu n t° = 121°C (1atm)/ 15 – 20 phút.

7. Môi tr ng EC (Enrichmen coli):

Công th c:

Tryptose	2g
Bile salt (mu i m t)	1,5g
Lactose	5g
K ₂ HPO ₄	4g
KH ₂ PO ₄	1,5g
N c c t	1000ml

(pH: $6,9 \pm 0,2$)

i u ch : em h p kh trùng 121°C(1atm)/ 15 – 20 phút.

8. Môi tr ng Clark lubs (dùng th ph n ng MR & VP):

Công th c:

Pepton	7g
Glucose	5g
K ₂ HPO ₄	5g
N c c t	1000ml

(H: $6,9 \pm 0,2$)

i u ch : em h p kh trùng 121°C (1atm)/ 15 – 20 phút.

9. Môi tr ng Simmon's citrat:

Công th c:

Sodium citrat	2g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄	0,2g
Brothymol blue	0,08g
NaCl	5g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1g
Agar	18g

(pH: 6,9 ± 0,2)

i u ch : em h p kh tr ng 121°C (1atm)/ 15 – 20 phút.

10. Môi tr ng Christensen's Urea:

Môi tr ng c b n:

Pepton	1g
NaCl	5g
Glucose	1g
KH ₂ PO ₄	2g
Phenol red	0,012g
N c c t	900ml

Hòa tan t t c các thành ph n trong 900ml n c. H p
121°C/15 phút ngu i n 50 -55°C.

Dung d ch Ure:

Urea	20g
N c c t	100ml
pH:	6,8 ± 0,1

Hòa tan Ure trong 10ml nước, lọc vô trùng, thêm vào môi trường cấy
bên đã làm nguội (thao tác vô trùng). Trộn, phân vào ống nghiệm vô
trùng.

11. Môi trường lên men các loại đường:

Công thức:

Cao thịt	5g
Pepton bột	10g
NaCl	5g
Đường	10g
Phenol red	0,01g
Nước cất	1000ml
pH:	7,4

em h p kh trùng 110°C/15 – 20 phút.

12. Môi trường tinh bột (Starch medium):

Công thức:

Nutrient agar	23g
Tinh bột tan	10g
Nước cất	1000ml

Chỉ u ch : hòa tan tinh bột trong 200ml nước cất. Thêm các chất khác
vào cho theo công thức. em h p kh trùng 121°C (1atm)/ 15 –
20 phút.

13. Môi trường thạch bán lỏng di động:

Công thức:

Nutrient broth	13g
Agar	5g
Nước cất	1000ml

pH: 7,2

i u ch : em các thành ph n c a môi tr ng trên hòa tan trong n c c t, r i un cách th y cho agar hòa tan u. Phân vào trong các ng nghi m 16 x 120 mm, m i ng kho ng 5ml. em h p kh khu n 121°C (1atm)/ 15 – 20 phút. L y ra ng cho môi tr ng ông l i.

14. Môi tr ng Gelatine:

Công th c:

Nutrient broth	13g
Gelatine	150g
N c c t	1000ml

pH: 7,2

i u ch : em các thành ph n c a môi tr ng trên hòa tan trong n c c t, r i un cách th y cho Geslatine hào tan u. Phân vào trong các ng nghi m 16 x 120 mm, m i ng kho ng 5ml. em h p kh khu n 121°C (1atm)/ 15 – 20 phút. L y ra ng cho môi tr ng ông l i.

15. Môi tr ng th ch chì (tìm kh n ng sinh H₂S c a vi khu n):

Công th c:

Nutrient agar	23g
Na ₂ S ₂ O ₃	2,5g
Acetat Pb 10%	5ml
N c c t v a	1000ml

pH: 7,0

i u ch : Hòa tan các thành ph n môi tr ng trên trong n c c t. un cho tan u th ch r i thêm Na₂S₂O₃ sau ó tr n u r i kh khu n 121°C/ 15 – 20 phút. L y ra i ngu i kho ng 45°C, thao tác vô