

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG NGHIỆP HÀ NỘI**  
\*\*\*

**NGUYỄN XUÂN THÀNH (Chủ biên) VŨ THỊ HOÀN  
NGUYỄN THẾ BÌNH - ĐINH HỒNG DUYÊN**

**Chủ biên & hiệu đính  
PGS.TS NGUYỄN XUÂN THÀNH**

# **THỰC TẬP VI SINH VẬT** Chuyên ngành

**Hà Nội - 2007**

## MỤC LỤC

| Nội dung   | Trang |
|--|-------|
| Bài số 1: Trang thiết bị cần thiết trong nghiên cứu vi sinh vật                | 1     |
| Bài số 2: Phương pháp cố định tiêu bản và nhuộm tế bào vi sinh vật             | 12    |
| Bài số 3: Chuẩn bị dụng cụ và môi trường nuôi cấy vi sinh vật                  | 16    |
| Bài số 4: Nuôi cấy vi sinh vật   | 26    |
| Bài số 5: Phương pháp lấy mẫu để phân tích vi sinh vật                         | 31    |
| Bài số 6: Phương pháp phân tích vi sinh vật                                    | 33    |
| Bài số 7: Đánh giá đặc tính sinh học của vi sinh vật                           | 37    |
| Bài số 8: Phân lập tuyển chọn <i>Azotobacter</i> từ đất                        | 40    |
| Bài số 9: Phương pháp lấy mẫu và phân lập tuyển chọn vi khuẩn <i>Rhizobium</i> | 42    |
| Bài số 10: Phương pháp xác định nhanh trao đổi chất ở vi sinh vật              | 46    |
| Bài số 11: Vi sinh vật trong môi trường  | 50    |
| Bài số 12: Phương pháp xác định nấm men, nấm mốc, tảo và nguyên sinh động vật  | 53    |
| Bài số 13: Quá trình chuyển hoá nitơ dưới tác dụng của vi sinh vật             | 60    |
| Bài số 14: Chuyển hoá lưu huỳnh dưới tác dụng của vi sinh vật                  | 63    |
| Bài số 15: Vi sinh vật phân giải lân (phospho)                                 | 65    |
| Bài số 16: Enzym trong quá trình trao đổi nitơ, phospho, lưu huỳnh             | 67    |
| Bài số 17: Xác định sinh khối vi sinh vật đất                                  | 75    |
| Bài số 18: Sinh trưởng của vi sinh vật   | 83    |
| Bài số 19: Thăm quan kiến tập về vi sinh vật                                   | 86    |
| Phụ lục  | 88    |
| Tài liệu tham khảo   | 91    |

## Bài số 1

### TRANG THIẾT BỊ CẦN THIẾT TRONG NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT

#### Mục đích yêu cầu:

- + Nắm được những máy móc, trang thiết bị cần thiết trong nghiên cứu về vi sinh vật.
- + Biết sử dụng thành thạo một số máy móc thông dụng của phòng nghiên cứu.
- + Hiểu được tầm quan trọng của công tác tiêu độc, khử trùng.
- + Sử dụng thành thạo kính hiển vi
- + Phân biệt các dạng hình thái của vi sinh vật

#### Nội dung :

- + Giới thiệu những trang thiết bị cần thiết trong phòng nghiên cứu vi sinh vật.
- + Giới thiệu các dụng cụ và nguyên liệu cần thiết để nghiên cứu vi sinh vật: dụng cụ lọc, khử trùng, dụng cụ quang học, dụng cụ đo lường, môi trường nuôi cấy.
- + Thao tác vận hành và sử dụng các trang thiết bị trong phòng nghiên cứu vi sinh vật
  - + Cấu tạo và sử dụng, bảo quản kính hiển vi
  - + Quan sát hình thái vi sinh vật

## I. MÁY MÓC

### 1. Tủ nuôi cấy vi sinh vật (Incubator)

Tủ nuôi cấy hay còn gọi là tủ định ôn là thiết bị quan trọng dùng trong công tác nghiên cứu vi sinh vật, vì nhiệt độ trong tủ có thể thay đổi từ  $0^{\circ} - 90^{\circ} \text{C}$  tùy theo ý muốn của người nghiên cứu và nhiệt độ trong tủ sau khi đã được xác định thì luôn luôn ở trạng thái ổn định trong suốt thời gian nuôi cấy.

#### 1.1. Cấu tạo

Cấu tạo vỏ tủ nuôi cấy có 2 lớp: lớp trong là kim loại dẫn nhiệt để giữ nhiệt độ bên trong của tủ, lớp ngoài là kim loại dày hơn và được bọc phía trong bởi một chất cách nhiệt (amiant). Giữa lớp trong và lớp ngoài là khoảng trống để giữ cho nhiệt độ trong tủ ít bị biến đổi.

Trong tủ có bộ phận cảm nhiệt để báo nhiệt độ lên xuống cho rơ-le hoạt động và quạt gió được lắp ở phần giữa thân để điều hoà nhiệt độ bên trong.

Phần ngoài tủ nuôi có hệ thống bảng điện tử để điều chỉnh nhiệt độ theo yêu cầu của nghiên cứu. Phía trên tủ được lắp van an toàn, nếu nhiệt độ trong tủ vượt quá dao động biên độ, van an toàn sẽ tự ngắt.

#### 1.2. Cách sử dụng

Đóng mạch điện, bấm nút mở công tắc tủ (có thể giữ vài giây đến khi xuất hiện đèn báo trên bảng điện tử). Sau đó bấm nút đặt nhiệt độ và thời gian (set up) theo yêu cầu nuôi cấy, điều chỉnh nhiệt độ và thời gian bằng ấn nút tương

ứng mũi tên lên hoặc xuống. Nhiệt độ trong tủ ẩm tăng dần và đạt tới nhiệt độ đã xác định.

Nhiệt độ sẽ được duy trì trong suốt thời gian nuôi cấy đã định sẵn. Trên bảng điện tử luôn xuất hiện chỉ số báo nhiệt độ thực tế trong tủ. Khi đủ thời gian nuôi cấy, tủ sẽ phát ra tiếng báo hiệu và rơ le tự ngắt để tự động tắt chế độ làm việc.

Nếu muốn nuôi cấy liên tục lâu dài có thể không cần đặt chế độ thời gian, chỉ đặt nhiệt độ. Khi nào muốn kết thúc thì bấm nút tắt công tắc nguồn.

### ***1.3. Khi sử dụng máy cần chú ý những điểm sau đây***

- + Hiệu chỉnh thiết bị trước khi sử dụng.
- + Phải nối tủ với dây đất và kiểm tra điện thế của máy với điện thế ở nơi đặt máy xem có giống nhau không, trường hợp không giống nhau phải dùng biến thế.
- + Khi sử dụng tủ ẩm lần đầu, phải kiểm tra bộ phận điều chỉnh nhiệt độ xem có chính xác không, nhiệt độ trong tủ có đều không.
- + Cửa tủ luôn luôn phải đóng kín, trừ khi lấy hoặc cho nguyên liệu vào nuôi cấy nhưng cũng không được mở cửa tủ rộng và lâu.
- + Luôn luôn phải đảm bảo cho tủ ẩm được khô ráo, sạch sẽ, phải cho tủ hoạt động thường xuyên nhất là những hôm trời ẩm. Khi làm đổ các chất dịch nuôi cấy hoặc làm bẩn trong tủ, phải lau chùi và sát trùng ngay.
- + Nên đặt trong tủ 1 cốc nước vô trùng trong quá trình nuôi cấy để giúp cho quạt gió hoạt động tốt.
- + Khi không dùng, tắt công tắc điện và rút phích cắm điện ra.

## **2. Tủ sấy khô (Drying oven)**

### ***2.1. Tác dụng***

Dùng tủ sấy khô để khử trùng các dụng cụ thủy tinh, đồ sứ như ống nghiệm, xi lanh, hộp lồng, cốc, phễu, cối chày sứ..., các đồ kim khí như dao, kéo, panh và các dụng cụ khác không có nước khác như bông, băng, vải... Trừ vật liệu làm từ cao su và môi trường nuôi cấy không được khử trùng bằng tủ sấy khô.

Nguyên lý cấu tạo của tủ sấy khô cũng gần giống như tủ ẩm, chỉ khác là có thể tiệt trùng ở nhiệt độ 175 - 200°C.

### ***2.2. Cách sử dụng tủ sấy khô***

Các dụng cụ phải rửa sạch, để khô, bao gói cẩn thận trước khi cho vào tủ, sau khi sắp xếp các thứ vào trong tủ rồi đóng kín cửa và đóng các lỗ thông khí. Bật công tắc điện, đặt chế độ làm việc cho tủ (điều chỉnh nhiệt độ và thời gian giống như với tủ định ôn). Thông thường dụng cụ nuôi cấy và phân tích vi sinh vật được khử trùng ở 160-180°C trong 2 giờ. Với các dụng cụ, như: pipét, xi lanh,... không được sấy quá 60°C vì nhiệt độ cao làm giãn nở thủy tinh dẫn đến mất độ chính xác của dụng cụ. Lưu ý khi sấy không nên đặt dụng cụ sát thành tủ vì ở đây nhiệt độ thường cao

hơn nhiều dễ làm cháy giấy gói hoặc nút bông, cũng không nên xếp dụng cụ quá khít nhau để không khí có thể lưu thông được và làm nóng đều các vật cần khử trùng.

Sau khi ngắt mạch điện, chờ nhiệt độ hạ dần xuống bằng nhiệt độ phòng thì mới được mở cửa tủ để lấy dụng cụ sấy ra. Dụng cụ lấy ra phải để trên giá gỗ, trên giấy hoặc vải, không được để ở trên gạch men, trên sàn gạch hoặc sàn xi măng vì dụng cụ đang nóng gặp lạnh sẽ dễ vỡ và làm ảnh hưởng đến tính vô trùng của dụng cụ.

### 3. Nồi hấp hơi nước cao áp (Autoclave)

#### 3.1. Nguyên lý

Nồi hấp hơi nước cao áp (hình 1) làm bằng kim loại chịu được nhiệt độ cao (ít nhất là 135°C) có thể dùng điện, dùng củi hoặc dùng than đun cho nước sôi, hơi nước sẽ nén dần lại ở trong nồi và nếu tiếp tục để cho nước sôi thì áp lực trong nồi sẽ tăng dần, áp lực càng tăng thì nhiệt độ của hơi nước trong nồi càng cao, như vậy giữa nhiệt độ  $t^0$  của hơi nước và áp lực P của nó có liên quan với nhau, nhưng không phải theo một tỷ lệ đường thẳng (xem đồ thị).

Khi áp lực kế chỉ số 0 có nghĩa là: áp lực P trong nồi hấp = áp lực P không khí.

Cho nên khi áp lực kế chỉ 1kg/cm<sup>2</sup> thì chính là chỉ hiệu số giữa áp lực bên trong với áp lực không khí tồn tại trong nồi.

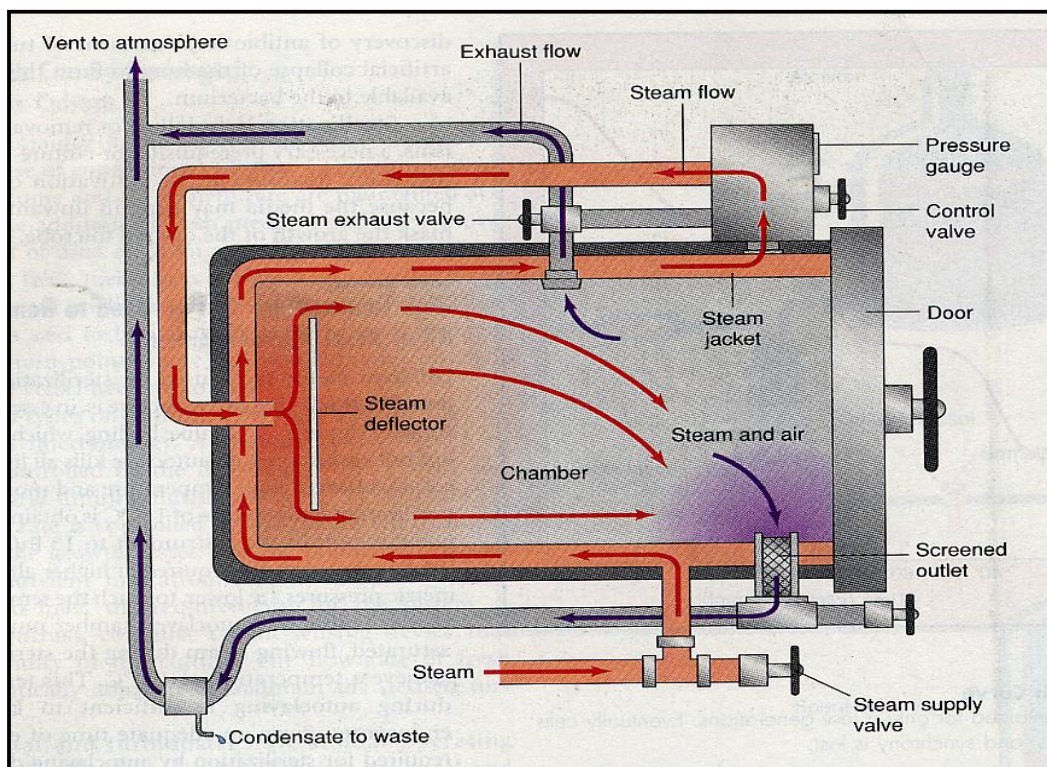
$$1\text{kg/cm}^2 = P (\text{trong nồi}) - P (\text{không khí trong nồi})$$

Do đó áp lực P trong nồi không phù hợp với P áp lực kế hay nói một cách khác, nhiệt độ trong nồi không tương ứng với nhiệt độ của áp lực kế. Vì vậy muốn cho nhiệt độ trong nồi phù hợp với áp lực kế thì phải loại bỏ hết không khí trong nồi ra (1kg/cm<sup>2</sup> = 1atm = 1 phoud).

**Bảng 1. So sánh mối liên quan giữa áp suất ghi trên áp kế của nồi hấp biểu thị bằng atmosphere và nhiệt độ trong nồi đã loại hết không khí**

| Áp suất (atm) | Nhiệt độ (°C) | Áp suất (atm) | Nhiệt độ (°C) | Áp suất (atm) | Nhiệt độ (°C) | Áp suất (atm) | Nhiệt độ (°C) |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 0,0           | 100,0         | 0,5           | 112,5         | 1,0           | 121,0         | 1,5           | 127,0         |
| 0,1           | 102,5         | 0,6           | 114,5         | 1,1           | 129,9         | 1,6           | 128,0         |
| 0,2           | 105,0         | 0,7           | 116,          | 1,2           | 124,0         | 1,7           | 129,0         |
| 0,3           | 107,5         | 0,8           | 117,0         | 1,3           | 125,0         | 1,8           | 130,0         |
| 0,4           | 110,0         | 0,9           | 119,0         | 1,4           | 126,0         | 1,9           | 131,0         |
|               |               |               |               |               |               | 2,0           | 132,0         |





**Hình 1. Sơ đồ nồi hấp áp lực**

Để loại bỏ hết không khí trong nồi ra có 2 cách:

- a) Đóng khóa thoát hơi để tăng áp lực trong nồi lên đến khoảng 0,3 atm rồi xì cho thoát hết hơi ra, sau đó khóa lại và cho tăng áp lực.
- b) Mở khóa thoát hơi và đun cho đến khi hơi nước bắt đầu thoát ra thành một luồng hơi trắng khá mạnh, khá đều thì đóng lại và cho tăng áp lực.

### **3.2. Cách sử dụng nồi hấp cao áp**

- Đổ nước vào nồi hấp với lượng vừa đủ (xem ở vạch ngang ghi trên ống thủy tinh hoặc bình chứa lắp bên ngoài nồi hấp). Chú ý nước phải ngập dây may so trong nồi nếu là nồi hấp xách tay.
- Các dụng cụ đem hấp phải được bao gói kỹ, đối với các bình và ống môi trường có nút bông phải bọc bằng giấy dầu hoặc giấy nhôm để tránh hơi nước đọng làm ướt nút.
- Khi sắp xếp dụng cụ vào nồi hấp không nên để sát nhau quá, để vật nặng xuống dưới vật nhẹ lên trên.
- Đậy nắp, khóa chặt các ốc theo từng đôi đối xứng nhau để khỏi vênh, khỏi hở, khi tháo khóa cũng phải làm như vậy. Đóng van điều áp và van xả hơi.
- Mở mạch điện hoặc đốt nhiên liệu để cung cấp nhiệt cho nồi, ấn nút mở công tắc nồi (nút on), đặt chế độ làm việc (nhiệt độ và thời gian hấp) cho nồi

bằng cách điều chỉnh mũi tên lên xuống. Chế độ làm việc luôn thể hiện trên bảng ghi điện tử. Sau khi hấp đủ theo nhiệt độ và thời gian định sẵn, rơ le sẽ tự ngắt, nồi phát ra tiếng kêu báo hiệu quá trình hấp đã kết thúc.

Với nồi hấp xách tay phải luôn luôn có mặt để theo dõi kim chỉ áp lực trên đồng hồ áp lực kể trong khi hấp, loại hết không khí trong nồi theo 2 phương pháp đã nêu trên. Khi đạt tới mức cần thiết thì điều chỉnh nguồn nhiệt để duy trì áp lực không đổi trong một khoảng thời gian cần thiết.

Nhiệt độ và thời gian hấp khử trùng phụ thuộc vào vật đem khử trùng và mục đích nghiên cứu. Người ta thường hấp ở nhiệt độ  $121^{\circ}\text{C}$  trong khoảng 20 phút thì nha bào của một số loại vi khuẩn cũng sẽ bị tiêu diệt.

- Khi đạt tới thời gian cần thiết thì ngắt điện (ấn nút off) hoặc rút hết nhiên liệu ra và đợi cho áp lực hạ dần xuống  $0^{\circ}\text{C}$ , nhiệt độ trong nồi giảm hẳn rồi mới được mở nắp lấy dụng cụ đã khử trùng ra. Chú ý tránh hạ áp lực đột ngột bằng cách mở van xì hơi ra quá mạnh sẽ làm rạn nứt hoặc vỡ dụng cụ. Cũng không nên để nồi hấp nguội lạnh mới lấy dụng cụ ra, vì lúc này nắp nồi sẽ mút chặt vào miếng đệm cao su rất khó mở.

- Các dụng cụ lấy ra không được để ở nền gạch men, nền đá, nền xi măng (vì dụng cụ đang nóng gặp lạnh sẽ vỡ, nứt) và đảm bảo tính vô trùng cho dụng cụ.

#### **4. Tủ lạnh (Freezer)**

Tủ lạnh là một thiết bị quan trọng dùng để giữ và bảo quản giống vi khuẩn, virus và bảo quản các loại huyết thanh, các loại vaccin, các môi trường dùng để nuôi cấy...

Tủ lạnh  $0^{\circ}\text{C}$  -  $4^{\circ}\text{C}$  dùng để giữ giống vi khuẩn.

Tủ lạnh  $-15^{\circ}\text{C}$  đến  $-30^{\circ}\text{C}$  dùng để giữ giống virus.

#### **5. Máy ly tâm (Centrifugal machine)**

##### **5.1. Công dụng**

- Tập trung ở đáy ống các phần tử cần nghiên cứu chứa trong một bệnh phẩm hay chất mang.

- Tập trung vi khuẩn nuôi cấy trong môi trường lỏng để tách riêng vi khuẩn.

- Làm trong một chất lỏng chứa nhiều phần tử đặc vẩn đục.

- Tách hồng cầu riêng với huyết tương....

##### **5.2. Cách sử dụng**

Máy ly tâm thông thường có một trục quay tròn, về phía trên của trục có một hình sao để nhận các ống chứa chất lỏng cần ly tâm. Các ống này được móc vào sao bằng một cái quai. Khi quay các ống sẽ giãn ra thẳng góc với trục quay đứng và các hạt lắng xuống theo đường trục của ống và dồn về phía đáy. Với kiểu máy này, tốc độ tối đa là 4500 - 6000 vòng trong một phút.

Các máy ly tâm gần đây có bộ phận thắng bằng tự động, có máy để thời gian tự động, có đồng hồ chỉ tốc độ v.v..., khi ly tâm chỉ cần vặn các nút theo ý muốn.

#### **6. Những thiết bị cần thiết khác**

- Máy hút chân không (vacuum gauge)
- Máy đếm khuẩn lạc (colony counting)
- Máy đo pH (pH meter) hay thang đo pH (pH paper set)
- Máy cất nước (Deionizers)
- Máy đánh mẫu (Mixers)
- Máy đếm tế bào (cell counting)
- Máy lắc (shaker)
- Phòng hoặc buồng vô trùng (clean bench, laminars)

## **II. CÁC DỤNG CỤ VÀ THIẾT BỊ PHÒNG THÍ NGHIỆM**

### **1. Thiết bị quang học**

- Kính hiển vi quang học (Microscopy)
- Kính hiển vi chụp ảnh
- Đèn soi kính hiển vi
- Tủ quang nền đen
- Thước đo vật kính và thước đo thị kính
- Kính lúp hai mắt đeo trán
- Máy projector
- Máy Over head
- Máy ảnh
- Đèn tử ngoại (UV lamp)

### **2. Thiết bị đo lường**

- Cân kỹ thuật (technical balance)
- Cân tiểu ly có lồng kính
- Cân tiểu ly xách tay
- Cân bàn
- Cân phân tích điện
- Nhiệt kế treo tường và các loại nhiệt kế đo nhiệt độ khác
- Đồng hồ điện tử đếm phút, giây

### **3. Các loại dụng cụ khác**

- Các loại dụng cụ thủy tinh: Phiến kính, hộp lồng, ống nghiệm, lọ, bình, phễu, cốc ống đong, xi lanh, pipet, que gạt, đèn cồn...



- Các loại dụng cụ kim loại: Dao mổ các loại, kéo thẳng, kéo cong, panh, que cấy, đèn xì, hộp tiêu độc, cưa xương...

- Các loại dụng cụ đồ men, sứ: Khay men, cối chày sứ, xoong nồi để pha chế môi trường.

- Các loại dụng cụ cao su, vải, bông, băng: Găng tay để mổ và để rửa dụng cụ, ủng, bông thấm nước, bông không thấm nước, vải gạc, vải lọc, vải màn.

- Các loại hóa chất để chế môi trường, rửa dụng cụ thủy tinh và sát trùng tiêu độc.

- Các loại thuốc nhuộm và thuốc thử phản ứng sinh hóa.

- Các loại giống vi khuẩn và virus, các loại kháng huyết thanh để chẩn đoán, các loại khuẩn tố để chẩn đoán.

### **III. KÍNH HIỂN VI**

Kính hiển vi là một dụng cụ quang học rất cần thiết để nghiên cứu hình thái vi sinh vật và nghiên cứu những vật hết sức nhỏ mà mắt thường không thể nhìn thấy được, có nhiều loại kính hiển vi khác nhau.

#### **\* Cấu tạo kính hiển vi quang học**

Kính hiển vi quang học gồm có 2 bộ phận:

#### **1. Bộ phận cơ học**

##### **1.1 Chân kính hay đế kính**

Dùng để đỡ kính hiển vi ở trạng thái cân bằng, cấu tạo từ kim khí đặc biệt.

##### **1.2 Thân kính**

Nối liền với chân kính, được tạo từ loại kim khí đặc biệt. Thân kính để gắn toàn bộ các bộ phận của kính hiển vi.

##### **1.3 Ống kính**

Là một ống kim khí rỗng hình trụ lắp trên trụ kính, đầu trên của ống kính lắp thị kính, phía dưới của ống kính là bàn xoay dùng để lắp các vật kính. Tác dụng của ống kính là khi vật ảnh được phóng đại lần thứ nhất bởi vật kính, thì đưa vật ảnh qua ống kính tới thị kính để phóng vật ảnh lần thứ 2. Như vậy vật ảnh ta quan sát thấy chính là ảnh ảo.

##### **1.4 Khay kính hay đĩa kính**

Có thể hình vuông hay hình tròn là nơi đặt tiêu bản để quan sát, ở giữa có lỗ thấu quang để đưa ánh sáng từ bộ tụ quang kính lên tiêu bản. Trên khay kính có bộ phận kẹp tiêu bản cho vững và bộ phận gọi là xa để di chuyển tiêu bản theo hai chiều khác nhau, từ trái sang phải, từ trước ra sau và ngược lại để tìm vật ảnh. Ngoài ra, khay kính còn có thể di chuyển theo các chiều bằng cách vận hai ốc ở hai bên khay kính.

##### **1.5 Ốc điều chỉnh**

Gồm có ốc điều chỉnh lớn (ốc sơ cấp) và ốc điều chỉnh nhỏ (ốc vi cấp). Ốc sơ cấp dùng để điều chỉnh tiêu điểm, ốc vi cấp dùng để điều chỉnh cho ảnh vật rõ nét.

## **2. Bộ phận quang học:**

### **2.1. *Gương phản chiếu***

Đặt ở phía dưới khay kính gồm có hai mặt, một mặt phẳng và một mặt lõm, dùng để lấy ánh sáng.

### **2.2. *Tụ quang kính***

Được lắp vào phía dưới khay kính bởi một ốc cố định, dùng để tập trung ánh sáng vào tiêu bản.

### **2.3. *Bộ phận chắn sáng***

Có hình giống như con người đặt ở phía dưới tụ quang kính có thể mở rộng hay hẹp dùng để điều hòa ánh sáng vào tiêu bản.

### **2.4. *Vật kính***

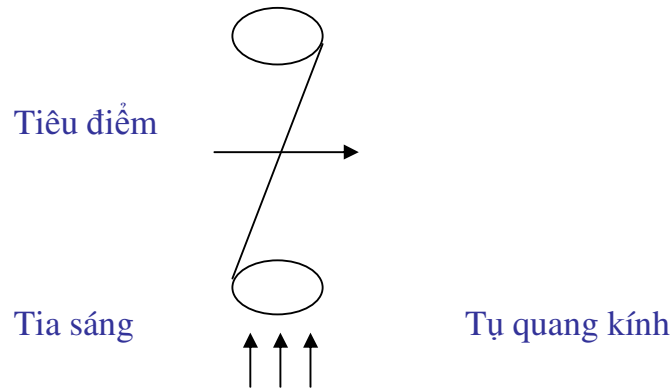
Là một hệ thống quang học rất quan trọng và phức tạp, gồm một số thấu kính, nó trực tiếp phóng đại ảnh thật của vật xem, khả năng phóng đại của vật kính phụ thuộc vào tiêu cự tức là phụ thuộc vào bán kính cong của thấu kính; thấu kính càng cong, tiêu cự càng ngắn thì khả năng phóng đại càng lớn. Vật kính khi dùng được lắp vào bàn xoay ở phía dưới ống kính. Có hai loại vật kính:

+ *Vật kính khô*: là vật kính có độ phóng đại thấp x8; x20; x40; dùng để xem tươi, xem vi khuẩn di động, xem khuẩn lạc, hay xem ký sinh trùng hoặc xem các tiêu bản tổ chức...

+ *Vật kính dầu*: là vật kính có độ phóng đại cao x 90; x100; x 120..., nó có một vòng khác màu ở đầu vật kính để phân biệt với vật kính khô.

Vật kính khô và vật kính dầu khác nhau ở chất mà ánh sáng phải đi qua tiêu bản (phiến kính) và vật kính. Ở vật kính khô chất đi qua là không khí mà chỉ số khúc xạ (chiết xuất) của không khí là  $n = 1$  rất khác với chỉ số khúc xạ của thủy tinh  $n = 1,52$ ; do đó các tia sáng khi ra khỏi tiêu bản sẽ bị phản xạ và phần ngoài của chùm ánh sáng không lọt được vào vật kính.

Ở vật kính có độ phóng đại lớn người ta dùng dầu bạch hương (huile de cèdre) có chỉ số khúc xạ  $n = 1,51$  xấp xỉ với chỉ số khúc xạ của thủy tinh  $n = 1,52$  đặt vào giữa tiêu bản và vật kính. Lúc này thủy tinh và dầu bạch hương là một môi trường gần như đồng nhất, nên ánh sáng khi đi qua thủy tinh sẽ không bị khúc xạ mà chiếu thẳng vào vật kính.



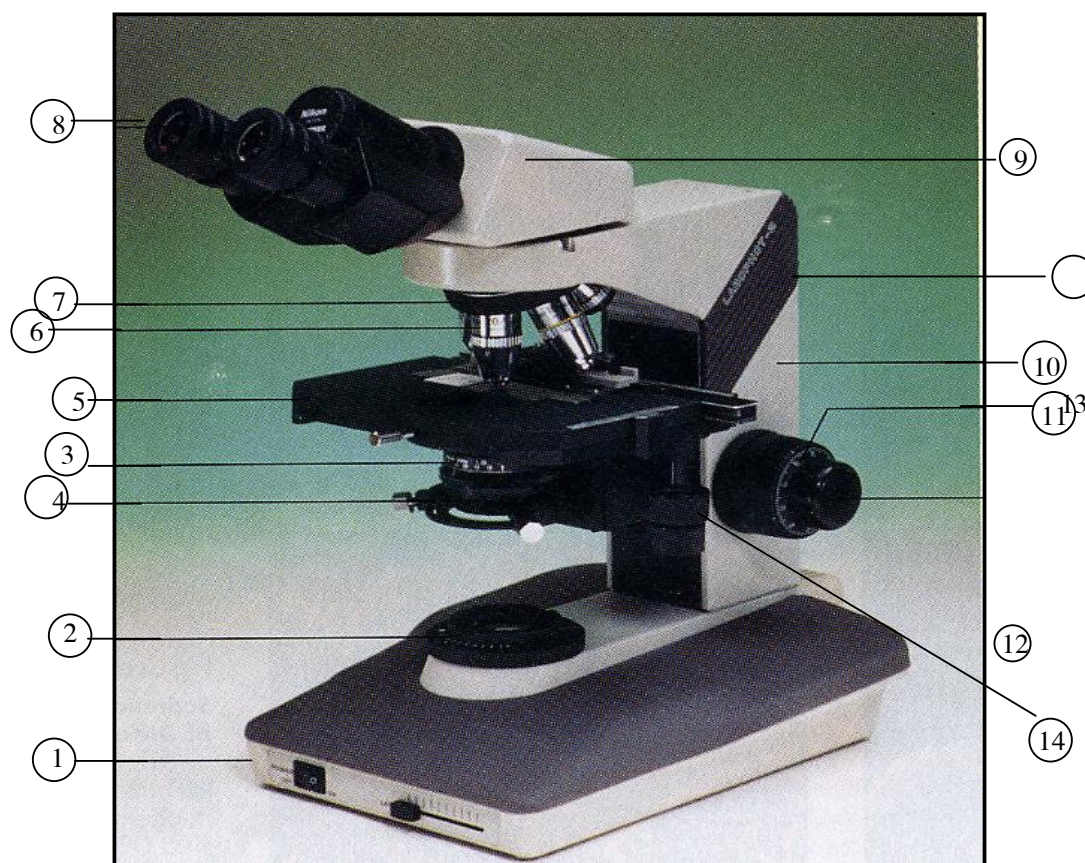
## 2.5. Thị kính

Gồm có hai thấu kính lắp vào hai đầu của một cái ống nhỏ lắp trên đầu ống kính, một thấu kính hướng về mắt người xem và một thấu kính hướng về vật quan sát, kính trên là kính phóng đại ảnh thật do vật kính thu được, kính dưới là kính thị trường làm sáng tỏ thị trường do đó mà ta nhìn thấy rõ ảnh được phóng đại.

Thị kính có độ phóng đại càng cao thì khoảng cách giữa hai thấu kính càng ngắn (tiêu cự của thị kính càng ngắn) và ngược lại. Độ phóng đại của thị kính thường có 4 số: x5 ; x7 ; x10 ; x15.

Muốn biết độ phóng đại của vật quan sát (độ phóng đại của kính hiển vi), người ta nhân độ phóng đại của vật kính với độ phóng đại của thị kính. Ví dụ dùng vật kính đầu x90 và thị kính x15 thì độ phóng đại của vật quan sát hay độ phóng đại của kính hiển vi sẽ là:

$$90 \times 15 = 1350 \text{ (lần)}$$



**Hình 2: Cấu tạo kính hiển vi**

- |                     |                                  |
|---------------------|----------------------------------|
| 1. Đế kính          | 8. Thị kính                      |
| 2. Đèn chiếu        | 9. ống kính                      |
| 3. Bộ tụ quang kính | 10. Thân kính                    |
| 4. Vòng bảo hiểm    | 11. ốc sơ cấp                    |
| 5. Khay kính        | 12. ốc vi cấp                    |
| 6. Vật kính         | 13. Công tắc                     |
| 7. Bàn xoay         | 14. Bộ phận điều chỉnh khay kính |

### **3. Cách sử dụng kính hiển vi**

#### **3.1. Kiểm tra kính hiển vi**

Đặt kính vào vị trí làm việc, cắm điện hoặc quay gương phản chiếu về phía ánh sáng, đặt kính trên bàn cho ngay ngắn ở tư thế có lợi nhất cho người quan sát. Khi quan sát tiêu bản cần sử dụng cả 2 mắt, mắt trái dùng quan sát, mắt phải dùng để ghi chép hoặc vẽ, không nên nheo một mắt lại để xem, vì như thế rất dễ mỏi mắt và đau đầu. Cần luyện tập để có thể xem kính được bằng cả hai mắt.

#### **3.1. Quan sát tiêu bản tươi với vật kính khô**

Không dùng tụ quang kính và bộ phận chắn sáng, nhất là đối với vật kính có độ phóng đại thấp (38), khi nguồn sáng hẹp thì dùng gương phẳng với vật

kính có độ phóng đại thấp, dùng gương lõm với vật kính có độ phóng đại cao (340), khi nguồn sáng rộng thì dùng gương nào cũng được. Hạ thấp tốt cùng tụ quang kính và ít mở bộ phận chắn sáng.

### **3.2. Quan sát tiêu bản nhuộm với vật kính dầu**

Luôn luôn sử dụng tụ quang kính, nâng cao tụ quang cho sát vào tiêu bản. Khi sử dụng tụ quang kính cần chú ý mấy điểm:

Đặt phiến kính lên khay kính và cố định, dùng vật kính có độ phóng đại thấp để có ảnh trong thị trường trước. Hạ thấp vật kính cho sát gần tiêu bản (khi hạ vật kính mắt nhìn ngoài để tránh đè mạnh làm vỡ tiêu bản). Theo dõi trong ống kính, rồi từ từ vặn ốc sơ cấp lên, đến khi trông thấy ảnh (thường có hình chóp) thì ngừng vặn ốc sơ cấp và bắt đầu sử dụng ốc vi cấp, vặn hết sức chậm đến khi thấy ảnh rõ nét thì thôi (có thể vặn tới hoặc vặn lui). Sau khi đã điều chỉnh tiêu điểm với vật kính độ phóng đại thấp thì quay vật kính đó ra, nhỏ một giọt dầu bạch hương vào điểm định soi trên tiêu bản, không để giọt dầu lan rộng ra, xoay đầu vật kính dầu vào, và vặn vật kính dầu sát xuống tiêu bản ngậm vào giọt dầu, chú ý mắt nhìn ngoài để đừng vặn sát quá sẽ đè vỡ phiến kính, đến khi thấy chóp ảnh, tức là ảnh đã trông thấy nhưng chưa thấy rõ, lúc này điều chỉnh ốc vi cấp cho đến khi ảnh vật rõ nét trong thị trường.

### **4. Cách bảo quản kính hiển vi**

+ Khi lấy kính từ trong hộp kính hiển vi ra, dùng tay phải nắm chắc, kéo kính ra theo hướng nằm ngang, không để đụng vào thành hộp, sau đó dùng tay trái đỡ chân kính để mang đi (bao giờ cũng phải dùng 2 tay khi di chuyển). Nếu mang đi xa phải cố định chắc chắn để tránh bị lắc.

+ Không được sờ tay vào đầu vật kính và thị kính, nếu bẩn có thể dùng vải mềm hoặc giấy lau kính để lau. Vật kính dầu dùng xong lấy vải mềm mịn hay giấy dai mịn lau sạch dầu bạch hương ở đầu vật kính, sau đó tấm xylon lau cho hết dầu (xylon có tác dụng làm tan dầu bạch hương). Cuối cùng lau lại một lần nữa bằng vải mềm, mịn hay giấy mềm.

+ Khi dùng xong phải xoay các bộ phận của kính về đúng vị trí quy định, không được để vật kính nằm trong trục kính như lúc quan sát mà phải đặt đúng lỗ mù hoặc xoay vật kính ra hai bên và vặn cho áp sát xuống đĩa kính, tụ quang hạ thấp xuống, gương phản chiếu xoay dọc thân kính. Toàn bộ kính đều coi như ở trạng thái nghỉ.

\* Câu hỏi ôn tập bài số 1:

1. Trang thiết bị, máy móc chuyên dụng cho nghiên cứu VSV?
2. Nguyên lý vận hành và cách sử dụng nồi hấp hơi nước cao áp (Autoclave)?
3. Cấu tạo và cách sử dụng kính hiển vi?
4. Cấu tạo và cách sử dụng máy đếm khuẩn lạc?
- 5 Trình bày phương pháp và cách tính kích thước tế bào VSV?



## Bài số 2

### PHƯƠNG PHÁP CỐ ĐỊNH TIÊU BẢN VÀ NHUỘM TẾ BÀO VI SINH

#### Mục đích yêu cầu:

- + Hướng dẫn học viên làm tiêu bản vi sinh vật từ các mẫu vật.
- + Nắm vững phương pháp nhuộm đơn, nhuộm giemxa và phương pháp nhuộm Gram.
- + Nhận dạng hình thái vi sinh vật và phân biệt vi khuẩn Gram dương, Gram âm

#### Nội dung:

- + Phương pháp làm tiêu bản vi sinh vật
- + Pha chế thuốc nhuộm và các phương pháp nhuộm: nhuộm đơn, Gram, Giem xa, Wright.
- + Quan sát một số tiêu bản hình thái vi sinh vật: cầu khuẩn, trực khuẩn, cầu trực khuẩn

### I. PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN VÀ NHUỘM TẾ BÀO VI SINH VẬT

#### 1. Mục đích của cố định tiêu bản và nhuộm tế bào VSV

Tế bào vi sinh vật gần như là không màu, do đó quan sát bằng phương pháp xem trực tiếp rất khó, vì vậy cần phải làm tiêu bản rồi đem nhuộm màu. Nhuộm vi sinh vật có 4 mục đích:

- Để nghiên cứu hình thái, cấu tạo đặc biệt của vi sinh vật như giáp mô, nha bào, ...
- Để phân loại vi sinh vật căn cứ vào tính chất bắt màu Gram, tính chất kháng cồn, kháng toan.
- Để dễ phân biệt và quan sát được các vi cấu tạo trong tế bào VSV.
- Để bảo tồn tiêu bản trong một thời gian dài, để chụp ảnh.

#### 2. Phương pháp làm tiêu bản vi sinh vật để nhuộm

##### 2.1. Chuẩn bị phiến kính

- Chọn phiến kính trong, sạch, không mờ, không có dầu mỡ, đã được ngâm trong cồn, khi dùng lau khô bằng vải mềm và hơ qua trên ngọn lửa đèn cồn.
- Khoanh diện phết vi sinh vật bằng cách dùng bút chì mờ khoanh một vòng ở mặt dưới phiến kính.

##### 2.2. Phết mẫu vật

- Nếu lấy mẫu vật là vi sinh vật từ ống canh trùng dịch thể thì sau khi đã khử trùng que cấy và đèn cồn, lấy một giọt môi trường nhỏ lên phiến kính chỗ đã khoanh tròn bằng bút chì mờ, rồi dàn mỏng ra trong diện đã khoanh.

Cần chú ý thao tác khi lấy vi sinh vật để phết kính: Tay phải cầm que cấy, nung đỏ que cấy bạch kim và đưa toàn bộ phần kim khí của que cấy qua ngọn

lửa đèn còn 2 - 3 lần, làm trước khi lấy vi sinh vật và sau khi đã phết kính xong; tay trái cầm ống môi trường để vào lòng bàn tay và cầm nghiêng ống bằng 5 ngón tay. Dùng ngón tay út của bàn tay phải mở nút bông, sau khi đã quay nút bông một vòng trong miệng ống cho trơn (kẹp nút bông vào giữa ngón tay út và bàn tay, hay giữa ngón tay út và ngón tay đeo nhẫn) hơ ống môi trường trên ngọn lửa đèn cồn, và đầu ống nghiệm luôn luôn để sát ngọn lửa đèn cồn, cho que cấy vào sâu trong ống môi trường lấy ra một giọt môi trường, rút que cấy ra, hơ miệng ống nghiệm và đóng nút bông lại, cho ống nghiệm vào giá, sau đó cầm phiến kính đã chuẩn bị sẵn, muốn cầm phiến kính cho vững thì ngón tay cái giữ một cạnh dài của phiến kính, ba ngón tiếp giữ cạnh đối diện, ngón út để ở mặt dưới phiến kính, giữ cho phiến kính không di chuyển trong khi phết.

- Nếu là vi sinh vật từ canh trùng đặc (môi trường thạch): thì dùng que cấy bạch kim lấy một ít vi sinh vật ở một khuẩn lạc, (không nên lấy nhiều vi sinh vật vì phết dày quá sẽ khó xem và khó phân biệt hình thái của vi sinh vật). Đặt que cấy lên phiến kính đã có sẵn một giọt nước cất hay nước sinh lý hoặc nước thịt vô trùng để làm huyền dịch vi sinh vật, trộn đều vi sinh vật trong giọt nước rồi dàn mỏng ra.

- Nếu dùng máu để phết kính thì có thể lấy máu ở tĩnh mạch rìa tai (đối với động vật sống) hoặc máu tim (đối với động vật mổ khám). Đặt giọt máu lên phiến kính, rồi dùng đầu một phiến kính khác, có cạnh nhẵn và thẳng hoặc cạnh của một lá kính đặt nghiêng một góc 30 - 45° với phiến kính để giọt máu lan khắp cạnh rồi đẩy nhẹ và đều tới đầu kia của tiêu bản, máu theo phiến kính chứ không phải bị phiến kính đẩy đi, tiêu bản tốt nếu máu được dàn đều trên phiến kính thành một lớp mỏng.

- Nếu dùng phủ tạng lách, gan, thận, hạch, phổi... thì cắt một miếng nhỏ, thấm bớt nước bằng bông hay giấy thấm, rồi chấm nhẹ trên phiến kính độ 3 - 4 chỗ, không đè mạnh trên phiến kính, chỉ thấm nhẹ nhàng, hoặc có thể kéo lướt nhẹ miếng phủ tạng trên phiến kính thành vệt dài cũng được.

- Nếu dùng đờm mủ, tủy xương phết kính thì lấy que cấy lấy đờm ở chỗ có nhiều mủ nhất, rồi dàn mỏng ra trên phiến kính, nếu mủ khô thì trước khi dàn, nhỏ một giọt nước sinh lý vô trùng trên phiến kính, là tương tự với tủy xương.

### **2.3. Sấy khô tiêu bản :** Có 2 cách

- Để tự khô ở nhiệt độ phòng thí nghiệm.
- Hơ cao trên ngọn lửa đèn cồn, không để sát tiêu bản vào ngọn lửa, nóng quá thân vi sinh vật sẽ co quắp lại, protit trong nguyên sinh chất đông nhanh, ảnh hưởng đến hình thái tế bào.

### **2.4. Cố định tiêu bản**

+ Cố định tiêu bản có 3 mục đích:

- Giết chết vi sinh vật để việc sử dụng không gây nguy hiểm.
- Làm cho vi sinh vật gắn chặt vào phiến kính, khi rửa nước không bị trôi đi.
- Làm cho vi sinh vật bắt màu tốt hơn.

Có thể cố định bằng những phương pháp sau đây:

+ Cố định bằng nhiệt độ: Hơ phiến kính trên ngọn đèn cồn bằng cách đưa đi, đưa lại ở khoảng cách 10-15 cm độ 3 - 4 lần, nếu hơ nóng quá sẽ làm biến dạng hình thái vi khuẩn.

+ Cố định bằng chất hóa học:

- Nhỏ vài giọt cồn nguyên chất hay cồn 96° 5 - 10 phút
- Nhỏ vài giọt cồn mêtilylic 2 - 3 phút
- Ngâm tiêu bản vào axêton 5 phút
- + Cố định bằng hơi foocmalin 3 - 5 phút

## II. Phương pháp nhuộm tiêu bản

### 2.1. Thuốc nhuộm đơn và các phương pháp nhuộm đơn

#### 2.1.1. Dung dịch fucxin (fuchsine) trong axit phenic

+ Chuẩn bị thuốc nhuộm

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Fucxin kiềm             | 1 g    |
| Cồn nguyên chất hay 96° | 10 ml  |
| Axit phenic kết tinh    | 5 g    |
| Nước cất                | 100 ml |

Nghiền fucxin với 5ml cồn trong cối sạch, khuấy đều, đổ từ từ 2/3 lượng nước vào, khuấy đều, xong cho thêm axit phenic, trộn đều cho vào lọ kín để 24 giờ, đem lọc qua giấy, tráng cốc bằng 1/3 nước cất và 1/2 cồn còn lại, dung dịch này là dung dịch fucsin đặc, khi dùng nhuộm đơn hoặc nhuộm Gram thì đem pha loãng dung dịch này gấp 10 lần với dung dịch axit phenic 5%.

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Dung dịch fucxin         | 10 ml |
| Dung dịch axit phenic 5% | 90 ml |

+ Phương pháp nhuộm đơn

a) Nhỏ thuốc nhuộm lên tiêu bản đã cố định để 1 - 2 phút, có khi đến 10 phút tùy theo loại thuốc nhuộm.

b) Rửa nước, để vòi nước từ từ chảy xuống một đầu phiến kính cầm hơi nghiêng đến khi nước trong là được.

c) Thấm khô bằng giấy thấm hay bằng hơi nóng.

d) Quan sát trên kính hiển vi

#### 2.1.2. Dung dịch xanh mêtilylen trong axit phenic

+ Chuẩn bị thuốc nhuộm

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Xanh mêtilylen       | 1 g   |
| Axit phenic kết tinh | 1 g   |
| Cồn nguyên chất 100° | 10 ml |
| Nước cất             | 10 ml |

Cách pha giống như fucxin ở trên.

+ Phương pháp nhuộm cũng giống nhuộm fucsin.

## **2.2. Phương pháp nhuộm Gram( nhuộm kép)**

### **2.2.1. Chuẩn bị thuốc nhuộm**

a) Dung dịch tím gentian trong axit phenic

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Tím gentian          | 1 g    |
| Cồn 96°              | 10 g   |
| Axit phenic kết tinh | 5 g    |
| Nước cất             | 100 ml |

b) Dung dịch fucxin trong axit phenic

|                      |      |
|----------------------|------|
| Fucxin kiềm          | 1 g  |
| Cồn 96°              | 10 g |
| Axit phenic kết tinh | 5 g  |
| Nước cất             | 10 g |

Cách pha 2 dung dịch này giống như dung dịch fucxin nói trên

c) Pha dung dịch lugol

|                  |        |
|------------------|--------|
| Iốtđua kali (KI) | 1 g    |
| Iốt tinh thể (I) | 0,5 g  |
| Nước cất         | 150 ml |

Nghiền iốtđuakali với một ít nước cất, sau đó cho iốt đã tán nhỏ vào lắc cho tan hết, cuối cùng cho đủ nước cất, lắc đều, để 24 giờ rồi đem lọc. Đựng vào chai màu. Không nên pha nhiều vì dễ bị biến chất.

d) Pha dung dịch tẩy màu cồn axêton.

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Cồn nguyên chất | 5 phần |
| Axêton          | 1 phần |

Nếu không có axêton thì dùng cồn nguyên chất hoặc 90° cũng được.

### **2.2.2. Phương pháp nhuộm Gram**

- 1) Nhỏ dung dịch tím gentian lên tiêu bản 1 - 2 phút.
- 2) Rửa nước nhanh, vẩy khô nước.
- 3) Nhỏ dung dịch lugol để 1 phút (tiêu bản có màu nâu đen).
- 4) Rửa nước nhanh, vẩy khô nước.
- 5) Nhỏ cồn axêton từ đầu phiến kính, nghiêng phiến kính cho cồn chảy qua chỗ phết vi sinh vật.
- 6) Rửa nước nhanh.
- 7) Nhỏ dung dịch fucxin loãng để 1 phút.
- 8) Rửa nước

9) Thấm khô - hơ khô - xem kính.

Vi khuẩn Gram dương bắt màu tím, vi khuẩn Gram âm bắt màu hồng.

\* **Cần chú ý:** Bước tẩy màu bằng cồn axêton rất quan trọng. Nếu tẩy không kỹ thì dễ nhầm lẫn vi khuẩn Gram âm với vi khuẩn Gram dương và ngược lại, nếu tẩy lâu quá thì vi khuẩn Gram dương mất màu tím cho nên khi nhuộm màu đỏ fucxin thì cũng bắt màu đỏ.

Quan sát trên kính hiển vi nhận thấy: hồng cầu nhuộm màu nâu hồng, nhân bạch cầu nhuộm màu tím.

**\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 2**

1. Trình bày 3 phương pháp cơ bản trong nghiên cứu về VSV?
2. Thế nào là Gram? trình bày sự sai khác giữa nhuộm đơn và nhuộm kép?
3. Các bước tiến hành chế tạo tiêu bản?

## **Bài số 3**

### **CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI SINH VẬT**

#### **Mục đích, yêu cầu:**

- + Biết được và chuẩn bị dụng cụ nuôi cấy VSV
- + Nắm vững cách pha chế môi trường nuôi cấy VSV
- + Hiểu được phương pháp khử trùng các loại dụng cụ và môi trường nuôi cấy VSV

#### **Nội dung kiến tập:**

- + Chuẩn bị và rửa dụng cụ cần thiết để pha chế môi trường nuôi cấy VSV
- + Học cách bọc gói các dụng cụ thông dụng và nút bông cho ống nghiệm, pipet, ...
- + Cách pha chế môi trường thạch nghiêng và đĩa thạch

### **I. CHUẨN BỊ DỤNG CỤ**

#### ***1. Các dụng cụ thường được sử dụng trong nghiên cứu vi sinh vật***

- Đĩa petri (hộp lồng)
- Ống nghiệm, bình tam giác, bình cầu, chai thủy tinh
- Pipét, xi lanh, que gạt, que cấy
- Lam kính, lamên

#### ***2. Yêu cầu***

Các dụng cụ phải sạch về mặt hoá học và vi sinh vật học (các dụng cụ phải được vô trùng).

#### ***3. Cách xử lý dụng cụ trước khi rửa***

- Đối với dụng cụ thủy tinh mới chưa sử dụng, cần ngâm nước lã hoặc dung dịch  $H_2SO_4$  loãng 24 giờ. Rửa lại bằng xà phòng và nước nhiều lần cho tới khi dung dịch rửa có pH trung tính.
- Các dụng cụ đã qua sử dụng, nhất là các VSV gây bệnh trước khi rửa nhất thiết phải được khử trùng bằng hơi nước áp lực để giết chết các tế bào, đảm bảo an toàn cho người rửa, không cho mầm bệnh cũ nhiễm vào môi trường mới.
- Đối với các VSV không gây bệnh cho người và động thực vật, chỉ cần tháo nút bông, xếp vào nồi hoặc chậu nhôm chuyên dụng, đổ nước xà phòng, đim dụng cụ ngập kín nước, đun sôi 15-30 phút. Gom các cặn bẩn vào túi nilon, buộc kín rồi mới đổ bỏ.
- Dịch nuôi VSV trước khi đổ bỏ cần thêm vài giọt formalin, lắc mạnh để giết chết tế bào.
- Sử dụng dung dịch sunfo-cromic để ngâm tẩy các vết bẩn trên dụng cụ thủy tinh.

#### ***4. Cách rửa dụng cụ***



Chọn chổi rửa thích hợp với từng loại ống hoặc bình, phía đầu nên đệm dây chun để phần lõi sắt không chọc thủng đáy ống nghiệm hoặc đáy bình.

Dùng miếng nhám thấm nước rửa hoặc bông thấm cồn lau sạch các ký hiệu ghi trên thủy tinh.

Dùng chổi hoặc miếng rửa đã thấm dung dịch nước rửa cọ kỹ phía trong ống hoặc bình hay đĩa petri tới khi sạch hết các vết bẩn. Dùng khăn mềm cọ kỹ phía ngoài. Xả nước làm sạch chất tẩy rửa. Tráng lại bằng nước cất. Đặt ngược dụng cụ vào giá đựng cho róc hết nước. Làm khô ở nhiệt độ phòng hoặc phơi nắng hoặc sấy khô ở 80-105°C. Đĩa Petri nên rửa và xếp theo bộ để dễ lắp lại với nhau.

Các phiến kính và lá kính dùng xong nên ngâm riêng vào dung dịch tẩy rửa hoặc sát trùng. Dùng khăn mềm cọ rửa, tráng nước cất, thấm khô, hong lại trước khi cất. Các lá kính rất dễ vỡ, cần thận trọng hơn và nên rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.

Với các pipet dùng để hút dịch VSV: sau khi sử dụng cần ngâm ngay vào ống nước sát trùng, khều bỏ nút bông, ngâm tiếp vào dung dịch tẩy rửa 1 ngày rồi chuyển sang bình rửa pipet tự động qua đêm. Tráng nước cất, hong khô. Nếu rửa trực tiếp dưới vòi nước, cần điều chỉnh sao cho dòng nước chảy qua bên trong pipet.

Với các pipet dùng cho các phản ứng hoá học, không cần ngâm nước sát trùng, đặt pipet dưới vòi nước chảy để xả bớt hoá chất bám dính bên trong, ngâm vào ống nước xà phòng một ngày, rửa sạch rồi tráng nước cất. Pipet chỉ nên hong khô ở nhiệt độ phòng. Nếu sấy ở nhiệt độ cao, thủy tinh giãn nở làm sai lệch thể tích.

#### \* Pha dung dịch rửa

##### a) Dung dịch sunfo-cromic:

Bicromat kali: 50 g

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đặc: 500 ml

##### b) Dung dịch kiềm trong alcol:

NaOH viên: 120 g

Nước cất: 120 ml

Alcol 95°: 1000 ml

### **5. Chuẩn bị dụng cụ để khử trùng**

Dụng cụ trước khi khử trùng phải được rửa sạch, làm khô và gói giấy để bảo đảm tính vô trùng sau khi sấy.

Mỗi pipet được gói trong dải giấy dài có chiều rộng 4 - 5cm. Đầu pipet được dùng để hút bằng miếng được đút nút bằng một ít bông, nút bông cần vừa phải, nếu chặt quá sẽ khó hút dịch và khó lấy ra khi rửa. Pipet được gói bắt đầu từ phía đầu nhỏ giọt, quấn giấy dần dần vào theo kiểu xoáy tròn ốc cho đến khi hết ở phía đầu có nút bông. Phải quấn giấy cho sát khít vào pipet. Sau khi quấn

giấy, ta phải giữ cho khỏi bẩn và khỏi rách bằng cách buộc thành từng bó cùng kích cỡ hoặc cho vào ống đựng pipet làm bằng kim loại hay bằng bìa cứng.

Các que gạt cũng được gói riêng từng cái và sau đó cũng bó lại như pipet. Các đĩa Petri được gói thành từng chồng, mỗi chồng khoảng 4-5 bộ.

Các chai lọ, ống nghiệm và ống Burri dùng để nuôi cấy vi sinh vật nhất thiết phải được đậy nút (nút nhựa hoặc kim loại hay cao su nhân tạo chịu nhiệt hoặc bằng nút bông). Nếu làm nút bông phải dùng bông không thấm nước (bông mỡ). Nút bông cần làm đúng kiểu cách để thuận tiện khi thao tác thí nghiệm, có thể làm nút bông trần hoặc nút bông có bọc vải màn.

Lấy bông theo lớp, tùy vào kích cỡ miệng bình, chai lọ và ống nghiệm để lấy lượng bông phù hợp. Có 2 cách làm nút bông thông dụng:

- + Nhồi bông vào giữa, dàn đều ra xung quanh thành hình tròn, lấy đầu một ngón tay đặt vào giữa, các ngón của bàn tay kia giữ đều phía ngoài rồi đẩy sát lên ngón tay đặt giữa tạo thành nút bông.

- + Đặt miếng bông vừa lấy (theo hình chữ nhật) trên mặt bàn sạch, cuộn tròn lại theo chiều dài đến hết, rồi gấp làm đôi tạo thành nút bông.

Xoay đều nút vừa tạo ra vào miệng ống hoặc bình, sâu khoảng 2-3 cm, điều chỉnh sao cho không tạo thành rãnh trên nút bông để ngăn chặn sự tập nhiễm từ không khí, vuốt đều phần còn lại bên ngoài rồi bện chặt lại như hình ngọn lửa. Nút bông đạt yêu cầu cần vừa phải, không chặt quá, cũng không lỏng quá, dễ dàng lấy ra khi thực hiện các thao tác nuôi cấy VSV.

Với các bình môi trường thạch có thể bao giấy bạc thay cho nút bông.

## **6. Khử trùng các dụng cụ thủy tinh**

Phương pháp cơ bản để khử trùng các dụng cụ thủy tinh là phương pháp khử trùng bằng sức nóng khô (bằng nhiệt). Công việc này được thực hiện trong tủ sấy (Drying oven) ở nhiệt độ 160 - 180°C trong vòng 2 giờ. Khi đó có thể tiêu diệt cả tế bào dinh dưỡng lẫn các bào tử của VSV.

Các dụng cụ đã khử trùng được bảo quản trong túi polyetylen cất giữ ở chỗ kín, tránh bụi bặm. Chỉ bóc giấy ngay trước khi sử dụng. Sau khi khử trùng, các que gạt, que cấy chỉ nên sử dụng trong vòng 24 giờ, hộp petri trong vòng 3 ngày, ống nghiệm, bình nón khoảng 7-10 ngày nếu bảo quản tốt. Nếu để lâu, dụng cụ phải được khử trùng lại trước khi sử dụng.

Một số dụng cụ như que gạt, que cấy, ống nghiệm, pipet có thể khử trùng bằng hơi nước ở áp lực cao (sử dụng nồi hấp cao áp), thông thường ở 121°C/30'. Khử trùng xong nên sử dụng ngay.

## **II. CHUẨN BỊ CÁC MÔI TRƯỜNG ĐỂ NUÔI CẤY VI SINH VẬT**

Cũng như các sinh vật khác, để sinh trưởng và phát triển các tế bào vi sinh vật cần các chất dinh dưỡng thích hợp. Khi nuôi cấy nhân tạo, người ta làm các loại “thức ăn” cung cấp cho từng nhóm vi sinh vật khác nhau. Dạng “thức ăn”

này được gọi là môi trường nuôi cấy. Tùy từng giống VSV khác nhau mà có môi trường nuôi cấy chuyên tính khác nhau.

### **1. Các yêu cầu về môi trường nuôi cấy**

- Đầy đủ các chất dinh dưỡng phù hợp với từng kiểu trao đổi chất của từng nhóm vi sinh vật, không chứa các yếu tố độc hại, môi trường nuôi cấy phải được đảm bảo cho sự sinh trưởng bình thường của vi sinh vật.

- Vô trùng tuyệt đối để khi nuôi cấy chỉ phát triển một loại VSV mong muốn.

### **2. Cách gọi tên môi trường**

Môi trường thường được gọi theo tên người chế tạo công thức (ví dụ môi trường Hansen, MacConkey...) hoặc theo nguồn dinh dưỡng chính có trong môi trường (môi trường tinh bột-thạch, malt-thạch, glucoza-pepton,...)

### **3. Phân loại môi trường**

Môi trường được phân loại theo thành phần hoá học, chế độ dinh dưỡng và công dụng

#### **3.1. Phân loại theo thành phần hóa học**

##### **3.1.1. Môi trường có thành phần xác định (môi trường tổng hợp) - defined medium**

Môi trường được chế tạo từ các chất có thành phần được xác định rõ ràng. Ví dụ môi trường A có chứa 5g glucoza, 1g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 lít nước. Nếu như bổ sung 1 lượng nhất định axit amin cụ thể nào đó (Lyzin) vào thì môi trường A vẫn được gọi là môi trường có thành phần xác định.

Môi trường có thành phần xác định được sử dụng để nghiên cứu các nhu cầu dinh dưỡng hoặc các con đường sinh hoá đặc biệt của vi sinh vật

Tuy nhiên, khái niệm môi trường xác định cũng chỉ có tính chất tương đối bởi vì các hoá chất sử dụng để pha chế môi trường ngoài thành phần chính được xác định, còn có các nguyên tố vi lượng tạp nhiễm không được xác định.

Nguồn nước pha chế môi trường cũng cần được chú trọng. Với loại môi trường này nhất thiết phải sử dụng nước cất tinh khiết để pha chế.

##### **3.1.2. Môi trường thành phần không xác định**

(môi trường tự nhiên hoặc bán tổng hợp)- Undefined medium, complex medium

Môi trường có chứa các hợp chất có thành phần không xác định rõ ràng như các chất chiết từ mô động thực vật hay tế bào nấm men.

Ngoài các chất chiết tự nhiên, môi trường còn có cả các hoá chất có thành phần xác định. Ví dụ như môi trường A ở trên được bổ sung thêm pepton.

#### **3.2. Phân loại theo chế độ dinh dưỡng**

##### **3.2.1. Môi trường tối thiểu (Minimal medium)**

Loại môi trường cung cấp nhu cầu tối thiểu của VSV, không dư thừa. Ví dụ nếu một loại VSV nào đó chứa thông tin di truyền sinh tổng hợp tất cả các

loại axit amin cần thiết của chúng thì không cần thêm axit amin vào môi trường. Hoặc nếu VSV bình thường cần 2 loại axit amin, chỉ cần bổ sung 2 loại đó mà không cần thêm bất kỳ loại nào khác.

Tuỳ từng trường hợp, môi trường tối thiểu cho từng loại VSV khác nhau cũng khác nhau. Nhiều môi trường tối thiểu chỉ dùng để nuôi cấy một phạm vi tương đối hẹp các VSV.

### **3.2.2. Môi trường đủ hoặc giàu (All purpose hoặc Rich medium)**

Môi trường chứa hàng loạt chất dinh dưỡng vượt xa nhu cầu tối thiểu của VSV. Môi trường giàu trợ giúp sinh trưởng của nhiều loại VSV. Trong môi trường giàu, VSV sinh trưởng và phát triển nhanh và tốt hơn so với môi trường tối thiểu. Sở dĩ như vậy là vì các nguồn dinh dưỡng mà VSV cần có thể lấy dễ dàng từ các hợp chất như axit amin, axit béo, vitamin, nucleic có sẵn trong môi trường.

### **3.3. Phân loại môi trường theo công dụng**

#### **3.3.1. Môi trường chọn lọc hay môi trường tuyển chọn (Selective medium)**

Môi trường này đảm bảo cho sự phát triển của các VSV mà ta mong muốn và ức chế sự phát triển của các VSV ngoài ý muốn.

Môi trường chọn lọc chủ yếu dùng để phân lập các chủng VSV thuần khiết từ tự nhiên hoặc dùng để nuôi cấy tích lũy(enrichment). Có 2 cách làm tăng tính chọn lọc của môi trường:

- Cho thêm chất ức chế các VSV không mong muốn nhưng không ảnh hưởng tới sinh trưởng của các loại VSV ta định nuôi cấy hoặc tuyển chọn. Các chất ức chế bao gồm các loại thuốc nhuộm như tím kết tinh (crystal violet), các chất kháng sinh, các chất chống nấm,  $\text{NaN}_3$ ... Nồng độ cao của muối, đường tác động đến áp suất thẩm thấu của tế bào được sử dụng như một nhân tố để chọn lọc VSV.

- Loại bỏ một chất mà các VSV khác cần tới khiến chúng không phát triển được.

#### **3.3.2. Môi trường phân biệt (differential medium)**

Môi trường phân biệt cho phép nhiều loại VSV phát triển và phân biệt nhanh chóng loài này với loài khác. Ví dụ môi trường có chứa bromocresol (chất chỉ thị màu) trợ giúp sinh trưởng của nhiều loài VSV nhưng dựa vào khả năng chuyển màu của chất chỉ thị có thể nhận biết ngay loại nào có khả năng hình thành axit từ đường.

#### **3.3.3. Môi trường chọn lọc - phân biệt (Selective - differential medium)**

Môi trường này bao gồm cả 2 chức năng chọn lọc và phân biệt. Nó giúp cho việc chọn lọc một nhóm nhỏ VSV đồng thời phân biệt chúng với những nhóm VSV khác.

### **3.4. Phân loại môi trường theo trạng thái vật lý**

#### **3.4.1. Môi trường lỏng (dịch thể) -Liquid medium**

Thường được sử dụng để nuôi cấy VSV nhằm thu nhận sinh khối, các sản phẩm trao đổi chất (enzim, kháng sinh, vitamin...) hay phát hiện các đặc điểm

sinh hoá và để giữ giống và bảo quản nhiều loại VSV không phát triển được tốt trên các môi trường đặc.

#### **3.4.2. Môi trường đặc (cố thể) - Solid medium**

Để làm đông môi trường, người ta thường sử dụng thạch (agar) đôi khi sử dụng gelatin (keo da, xương động vật) hoặc sử dụng silicagel (chế tạo từ thủy tinh lỏng và HCl).

Môi trường đặc dùng để phân lập giống thuần khiết, đếm số lượng VSV, giữ giống VSV, nghiên cứu hình thái khuẩn lạc, hoạt động đối kháng...

Thạch là một loại polysaccharit chiết từ một loại tảo biển. Vì không bị VSV phân giải nên thạch là chất làm đông môi trường khá lý tưởng. Trong nước, thạch nóng chảy ở gần 100°C và đông đặc ở khoảng 43°C. Thạch thường được bổ sung vào môi trường với số lượng khoảng 16-20g/l. Trong môi trường trung tính, hơi axit hoặc hơi kiềm, thạch vẫn giữ được khả năng tạo gel khá bền vững. Trong môi trường axit pH <5,0 thạch bị thủy phân trong quá trình khử trùng, mất tính tạo gel sau khi để nguội.

#### **3.4.3. Môi trường mềm**

Thường sử dụng để giữ chủng. Thạch được bổ sung với số lượng 6-10g/l

#### **3.4.4. Môi trường bán lỏng**

Thêm thạch vào với lượng 2-5 g/l. Do nồng độ oxy xâm nhập vào bên trong môi trường bán lỏng chỉ ở mức độ nhất định nên môi trường này được sử dụng để nuôi các vi khuẩn hiếu khí (microaerophilic).

#### **3.4.5. Môi trường xộp**

Môi trường xộp được ứng dụng trong sản xuất (VSV học công nghiệp). Chất xộp như trấu, cám... được trộn với các thành phần dinh dưỡng khác.

### **4. Chuẩn bị môi trường**

Cần đọc kỹ công thức cấu tạo môi trường, chuẩn bị các hoá chất và dụng cụ liên quan

#### **4.1. Pha chế**

Nhìn vào các công thức môi trường, lần lượt cân đong các thành phần. Đánh dấu vào công thức các thành phần đã cân hoặc đong. Nếu công thức có thạch thì nên đong nước cho vào nồi đun, cân thạch cho vào nước để thạch ngấm dễ tan khi được đun sôi và lần lượt cân đong các thành phần khác.

Nếu môi trường phải đun nấu, ngoài thể tích nước theo công thức nên bổ sung một lượng nhỏ nước để bù lại thể tích bay hơi khi đun (khoảng 15-20ml/l)

Mỗi hoá chất xúc bằng một thìa riêng khi cân. Cho hoá chất hoặc các thành phần được cân lên đĩa có giấy cân một cách từ từ tới khi vừa đủ. Nắm vững cách sử dụng các loại cân.



Với các thành phần có hàm lượng nhỏ nên pha dung dịch mẹ (stock solution), tính hàm lượng có trong 1 đơn vị thể tích suy ra thể tích cần lấy để bổ sung vào môi trường.

Các loại bột gạo, ngô, cám được cân và cho vào nước lạnh, vừa đun vừa khuấy cho tới khi bột chín.

Các thành phần kém bền nhiệt như chất kháng sinh, vitamin...phải được khử trùng theo phương pháp riêng (thường sử dụng màng lọc khuẩn)

Đôi khi một số thành phần được cân riêng, khử trùng riêng và chỉ được trộn lại với nhau sau khi đã khử trùng để tránh phản ứng tạo thành kết tủa khi toàn bộ thành phần được khử trùng chung (xảy ra khi có mặt đồng thời các muối photphat và  $MgSO_4$ ).

#### **4.2. Đun môi trường**

Môi trường dịch thể: Nếu các thành phần tan đều trong nước thì không cần đun.

Môi trường đặc: Đặt nồi lên bếp vừa đun vừa khuấy đều bằng đũa thủy tinh. Khi môi trường sôi một lúc, thạch tan hết là được, tránh đun lâu nước bay hơi sẽ làm cạn môi trường. Hớt bọt hoặc lọc trong nếu cần.

#### **4.3. Điều chỉnh pH**

Nếu môi trường ở dạng dịch thể trong suốt, không màu không chứa các chất dính nhớt như tinh bột, có thể đo pH bằng máy đo.

Môi trường có màu, chứa các chất dính nhớt không được đo pH bằng máy (điện cực dễ bị hỏng), nên sử dụng giấy đo pH. Cũng có thể nhận biết pH qua màu sắc của môi trường do các chất chỉ thị màu tạo nên.

Nhìn chung, nếu các thành phần môi trường được cân đúng chính xác, các hoá chất đạt tiêu chuẩn, sau khi pha chế môi trường sẽ đạt được giá trị pH cần có. Nếu pH sai lệch quá lớn cần xem lại các khâu và phải pha lại môi trường. Nếu sai khác không lớn, có thể điều chỉnh bằng dung dịch kiềm (KOH, NaOH) hoặc axit (HCl,  $CH_3COOH$ ) loãng hoặc các muối theo chỉ dẫn ở công thức. Việc điều chỉnh pH cần thận trọng để sau khi chỉnh xong thể tích môi trường không bị thay đổi ngoài phạm vi cho phép.

\* **Lưu ý:** Khi pH môi trường thấp hơn 6,0 - 6,5 thì sẽ xảy ra việc pepton hoá gelatin và sau khi khử trùng, môi trường sẽ không đông lại được. Khi pH thấp hơn 5,0 sẽ xảy ra sự thủy phân và thạch mất khả năng tạo gel.

Nếu môi trường có phản ứng kiềm thì khi khử trùng sẽ xuất hiện kết tủa sắt, xuất hiện việc caramen hoá đường và đường trở nên không hấp thu được đối với vi sinh vật. Để tránh những hiện tượng này, các môi trường được dùng để nuôi cấy các vi sinh vật ưa axit hoặc ưa kiềm phải được tiến hành khử trùng ở pH trung tính và sau khi hấp áp lực mới axit hoá hoặc kiềm hoá môi trường. Ngoài ra có nhiều thành phần của môi trường thường được khử trùng riêng ở những chế độ pH không ảnh hưởng tới chúng, sau đó mới đưa vào môi trường một cách vô trùng với số lượng thích hợp.



Sau khi khử trùng, pH môi trường có thể bị thay đổi đôi khi phải kiểm tra lại.

#### **4.4. Phân phối môi trường vào các dụng cụ**

Dụng cụ được dùng phải vô trùng. Để khử trùng tốt, môi trường chỉ được rót tới 1/2 dung tích của vật chứa. Với các ống nghiệm làm thạch nghiêng chỉ rót khoảng 1/4 chiều cao ống và 1/2 với ống làm thạch đứng.

Lớp môi trường càng dày việc tiệt trùng càng khó, hơn nữa ở áp lực cao môi trường sẽ sôi mạnh làm đẩy nút và phụt ra ngoài.

Đối với các bình dùng để nuôi VSV hiếu khí trên máy lắc chỉ rót khoảng 1/5 dung tích bình. Đối với bình dùng nuôi kỵ khí, sau khi khử trùng dồn một số bình lại với nhau trong điều kiện vô trùng để đạt được thể tích cần thiết.

#### **5. Khử trùng môi trường dinh dưỡng**

Khử trùng là một trong những biện pháp cần thiết và quan trọng nhất trong thực nghiệm vi sinh vật học. Thuật ngữ " khử trùng" bắt nguồn từ tiếng La tinh với nghĩa là sự " làm tuyệt dục". Trong vi sinh vật học, khử trùng được hiểu là làm chết tất cả mọi vi sinh vật. Tiến hành khử trùng môi trường, dụng cụ, thiết bị và các thứ khác để tránh sự phát triển lẫn lộn của các hệ vi sinh vật ngoại lai vào giống đang nghiên cứu. Việc khử trùng môi trường và dụng cụ là việc bắt buộc phải làm khi thực hiện tất cả các bài tập.

##### **5.1. Phương pháp khử trùng môi trường dinh dưỡng**

Môi trường dinh dưỡng được khử trùng chủ yếu bằng cách hấp trong nồi hấp áp lực. Phương pháp này dựa trên nguyên tắc làm gia nhiệt các vật bằng hơi nước bão hoà dưới một áp suất lớn hơn áp suất của khí quyển. Khi áp suất hơi nước tăng lên thì nhiệt độ cũng tăng theo.

Tác dụng phối hợp giữa nhiệt độ cao và áp suất bảo đảm cho việc khử trùng thực hiện được tốt. Khi hấp áp lực sẽ làm tiêu diệt cả tế bào dinh dưỡng lẫn bào tử của vi sinh vật. Khi ghi chế độ khử trùng bằng các đơn vị áp suất 0,5 ; 1,0; 1,6; 2,0 atm có nghĩa là người ta muốn nói đến các áp suất bổ sung. Việc tăng áp suất hơi nước được tạo ra trong những thiết bị đậy kín thành dày, đóng kín các nồi hấp áp lực.

##### **5.2. Chế độ khử trùng môi trường**

Nhiệt độ và thời gian khử trùng bằng cách hấp áp lực trước hết được quyết định bởi thành phần của môi trường dinh dưỡng. Các cơ chất có chứa những chất không bền đối với nhiệt độ 120<sup>0</sup>C phải được khử trùng ở 0,5 atm. Sữa, dịch tự phân nấm men, nước nấm men và các môi trường chứa gelatin được khử trùng ở 0,5 atm trong 15 phút. Các môi trường có chứa đường, chẳng hạn như môi trường mạch nha, môi trường nước ép thực vật được khử ở 0,5 atm trong 20 -30 phút. Canh thịt - pepton và thạch - thịt - pepton được khử trùng ở 1 atm trong 20 -30 phút. Môi trường khoai tây nước chiết đất được khử trùng ở 1,5 atm trong 30 phút.

Để lựa chọn chế độ khử trùng phải tính đến pH của môi trường. Khi môi trường có phản ứng axit, các hợp chất cao phân tử trong đó có thể bị thủy phân khi hấp áp lực.

**\* Với các thành phần môi trường kém bền nhiệt có thể khử trùng theo các cách sau:**

- Phương pháp Pasteur: đun nóng dung dịch ở 80°C/15 phút rồi làm nguội ngay.

- Phương pháp Tyndal: đun sôi cách thủy dung dịch trong 30 phút, lặp lại 3 lần mỗi lần cách nhau 24 giờ.

Hai phương pháp này chỉ có thể diệt các tế bào dinh dưỡng, không diệt được các bào tử kháng nhiệt.

- Sử dụng màng lọc vi khuẩn: thường dùng để khử trùng các thành phần như chất kháng sinh, vitamin.... Kích thước của lỗ màng lọc vào khoảng 0,2 - 0,45µm. Lọc khuẩn không loại được virus.

### **5.3. Cách làm đĩa thạch vô trùng**

Tiến hành đổ môi trường ra đĩa trong điều kiện vô trùng (sử dụng phòng vô trùng hoặc tủ cấy vô trùng đã được lau cồn và khử trùng bằng tia tử ngoại). Tay người làm cũng phải được khử trùng bằng cồn hoặc dung dịch sát khuẩn.

Các đĩa petri phải được mới khử trùng trong vòng 24 giờ.

Bình môi trường mới được khử trùng, để nguội đến 50-60°C rồi mới đổ ra đĩa. Không đổ khi môi trường nóng >60°C để tránh hơi nước đọng trên nắp đĩa và mặt thạch sẽ dẫn đến dễ bị tạp nhiễm trong quá trình nuôi cấy. Trước khi đổ nên quay tròn bình để trộn đều môi trường, tránh lắng mạnh sinh bọt khí.

Sau khi đổ môi trường ra đĩa, nếu thấy các bọt khí phải dùng que cấy nung nóng đỏ châm vỡ bọt khí khi thạch còn nóng, chưa đông. Để yên cho thạch đông trong đĩa và nguội dần đến nhiệt độ phòng. Xếp các đĩa môi trường thành từng chồng, bao kín bằng giấy vô trùng.

Có thể làm khô mặt thạch và kiểm tra độ vô trùng bằng cách mở hé nắp đĩa trong tủ cấy thổi khí vô trùng hoặc đặt các gói petri theo chiều ngược trong tủ ẩm 2-3 ngày. Sau đó, chọn lựa các đĩa không nhiễm VSV để sử dụng.

### **5.4. Cách làm môi trường thạch nghiêng**

Trước tiên cần lau sạch mặt bàn nơi sẽ đặt thạch nghiêng, đặt một thước (gỗ, nhựa) sạch cao khoảng 2-3 cm lên mặt bàn, khử trùng mặt bàn và thước bằng cồn. Trải một mảnh vải hoặc giấy vô trùng trùm lên mặt bàn và thước gỗ.

Sau khi khử trùng trong nồi hấp áp lực, cần làm nguội các ống môi trường ở nhiệt độ phòng hoặc dưới quạt mát một lúc đến khi chỉ còn khoảng 50-60°C để tránh hơi nước đọng lại nhiều trên bề mặt thạch.

Nhẹ nhàng đặt ống môi trường nằm trên lớp vải hoặc giấy vô trùng, đầu có nút kê trên thước, điều chỉnh sao cho mép thạch cách xa nút bông 3-4 cm. Đặt các ống thành hàng xít nhau, hết một hàng lại đặt tiếp hàng sau gối lên hàng trước. Đối

với ống thạch dùng để giữ giống VSV chỉ cần đặt nghiêng vát một chút để môi trường giữ được độ ẩm trong thời gian dài.

Nếu có đủ dụng cụ, có thể cho các ống môi trường có cùng kích cỡ vào giá đựng nhiều hàng, rồi đặt cả giá ống nghiêng nghiêng đều một góc trên thước. Do tính chất đồng đều của các ô trên giá sẽ giúp các ống môi trường được nghiêng đều như ý muốn. Cách này giúp thao tác đặt nghiêng được nhanh và bề mặt thạch nghiêng đều hơn, có thể dễ dàng thực hiện với một số lượng lớn môi trường.

Trong quá trình làm thạch đông, không được rung bàn hay rung ống thạch. Sau khi thạch đông, ống nguội hẳn mới gói các ống thạch nghiêng bằng giấy vô trùng, đặt vào tủ ẩm 30-37°C để kiểm tra độ vô trùng và làm khô mặt thạch. Sau vài ngày lấy ra quan sát kỹ bề mặt thạch phát hiện các khuẩn lạc VSV. Soi ống nghiệm dưới ánh đèn để tìm các khuẩn lạc chìm trong thạch. Những ống thạch nghiêng vô trùng (không chứa các khuẩn lạc VSV) được dùng để làm thí nghiệm và giữ giống VSV.

**\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 3**

1. Thế nào là môi trường chuyên tính?
2. Trình bày Sự sai khác cơ bản của môi trường lỏng, rắn, bán rắn?
3. Trình bày các bước cần thiết để tiến hành chế tạo môi trường?
4. Các dụng cụ, hóa chất cần thiết để chế tạo môi trường?

## Bài số 4

### NUÔI CÂY VI SINH VẬT

#### **Mục đích, yêu cầu:**

- + Hiểu rõ yêu cầu đối với nghiên cứu VSV là mọi dụng cụ và điều kiện làm việc phải tuyệt đối vô trùng.
- + Biết được các kỹ thuật nuôi cấy VSV thông dụng.
- + Biết được mỗi loại vi sinh vật yêu cầu môi trường và điều kiện nuôi cấy khác nhau.

#### **Nội dung:**

- + Thực hành thao tác nuôi cấy vô trùng trên đĩa thạch và ống thạch nghiêng.
- + Phương pháp ria cấy phân lập VSV
- + Xác định môi trường chuyên tính thích hợp cho một số loại VSV.

### **I. KỸ THUẬT VÔ TRÙNG**

Trong phòng thí nghiệm, VSV được nuôi cấy nhằm để dễ dàng xác định và kiểm tra khả năng sinh trưởng cũng như trao đổi chất của chúng. VSV được nhiễm hoặc đưa vào trong vài dạng môi trường nuôi cấy giúp giữ cho chúng sống, hoạt động và để nghiên cứu sự sinh trưởng của chúng. Việc nhiễm VSV phải được thực hiện trong điều kiện không có các VSV không mong muốn khác hoặc không bị tạp nhiễm trong môi trường nuôi cấy. Kỹ thuật vô trùng được sử dụng trong nghiên cứu VSV nhằm loại trừ các sự tạp nhiễm.

Tất cả các môi trường nuôi cấy được khử trùng trước khi sử dụng. Việc khử trùng thường được thực hiện bằng sử dụng nồi hấp áp lực. Các dụng cụ chứa môi trường như ống nghiệm hay đĩa Petri không nên mở ra cho tới khi thực sự làm việc với chúng, và thậm chí sau đó cũng vậy.

Cả hai phương pháp nuôi cấy trên đĩa petri hay trong ống nghiệm cung cấp số lượng lớn VSV trong một diện tích nhỏ và dễ dàng cho việc vận chuyển. Thạch nghiêng là các ống nghiệm chứa môi trường đặc đã được đặt nghiêng trong khi thạch đông lại. Thạch nghiêng giống như đĩa Petri cung cấp một bề mặt sinh trưởng cho VSV nhưng ống thạch nghiêng thì dễ bảo quản và vận chuyển hơn. Thạch cho phép làm đông cứng ở tận đáy ống nghiệm tạo ra một môi trường thạch sâu. Độ sâu thường được sử dụng cho VSV cần ít oxy hơn lượng đang có trên bề mặt môi trường. Môi trường thạch bán rắn chỉ chứa 0,5-0,7% thạch thay cho 1,5% thạch có thể thường sử dụng để xác định liệu VSV có di động được hay không. Vi khuẩn di động được sẽ chuyển động từ điểm nuôi cấy tạo ra sự xuất hiện của “cây noen” đảo ngược.

Sự cấy truyền và nhiễm VSV thường được thực hiện với một que cấy vô trùng, được phủ một dây Niken-crom không bị ăn mòn, chịu nhiệt. Trong đó, đoạn cuối của dây được uốn cong thành một cái móc vòng, nó được gọi là một que cấy tròn, nếu đầu dây kim loại thẳng thì gọi là que cấy thẳng. Đối với những

mục đích đặc biệt, sự nuôi cấy có thể cũng được cấy chuyển với các miếng gạc cotton, pipet, que gạt thuỷ tinh hoặc xilanh vô trùng. Những kỹ thuật này rất thông dụng trong nghiên cứu VSV.

Một que cấy tròn hay thẳng được sử dụng phụ thuộc vào dạng (trạng thái) của môi trường. Người ta có thể quyết định trong khi làm thí nghiệm tùy điều kiện và mục đích thí nghiệm.

### **1. Vật liệu thí nghiệm**

- Ống nghiệm chứa môi trường nước thịt
- Ống môi trường thạch nghiêng
- Ống môi trường thạch bán rắn
- Que cấy đầu tròn, que cấy đầu thẳng
- Giá ống nghiệm, thuốc nhuộm Gram
- Nuôi cấy: dịch vi khuẩn *Lactococcus lactic*, *Pseudomonas*

### **2. Kỹ thuật yêu cầu**

Tiến hành thí nghiệm theo thủ tục sau:

a) Thực hiện với chỉ một loại dịch vi khuẩn trong 1 lần, ngăn chặn bất kỳ sự trộn lẫn hoặc nhiễm chéo. Bắt đầu với một loại nước canh thang, nhẹ nhàng khoả đáy và lắc đều lắng cặn.

b) Đặt que cấy vào dung dịch nước thịt, giữ que cấy có giống VSV trong tay thuận, một ống môi trường ở tay kia.

B1- Khử trùng đầu que cấy tròn bằng cách giữ trên ngọn lửa (đèn gas hoặc đèn cồn) cho đến khi nóng đỏ.

B2- Giữ que cấy giống như một cái bút, uốn cong ngón tay út phối hợp với lòng bàn tay nhẹ nhàng rút nút ra khỏi ống nghiệm trong khi quay ống. Không được đặt nút lấy ra xuống mặt bàn làm việc.

B3- Giữ ống nghiệm nghiêng một góc, chuyển miệng của ống nghiệm hướng về ngọn lửa. Luôn giữ ống nuôi cấy và ống môi trường mới ở độ nghiêng để giảm thiểu lượng bụi bẩn có thể rơi vào trong ống. Không để đầu ống nghiệm quá xa hoặc dung dịch sẽ cấy rời khỏi nút.

B4- Nhúng đầu que cấy tròn đã khử trùng, được làm nguội vào dung dịch nước thịt để lấy một vòng sức căng bề mặt dịch nuôi cấy. Đưa que cấy ra ngoài, trong khi cầm que cấy đốt miệng ống nghiệm và đút nút lại bằng cách quay ống vào nút. Đặt ống nghiệm vào giá.

B5- Lấy đầu nút ra khỏi một ống nghiệm chứa môi trường nước thịt đã khử trùng, hơ miệng ống trên ngọn lửa. Nhúng đầu que cấy có giống VSV vào môi trường và sau đó vẽ một đường từ đáy ống. Hơ miệng ống môi trường và đậy nút lại trước khi đặt lên giá.

B6- Khử trùng lại đầu que cấy đến khi nóng đỏ rồi để nguội. Nhiều khi người ta hay cầm nhiều ống nghiệm trên tay trong cùng một lần cấy (hình).



Không nằm ngoài mục đích giữ và cấy chuyển giữa các ống nghiệm nhưng phải thực hiện được kỹ thuật cấy chuyển vô trùng.

c) Đối với môi trường thạch nghiêng, lặp lại bước 1-4 và cấy trên thạch nghiêng bằng cách di chuyển đầu que cấy nhẹ nhàng ngang trên mặt thạch từ đáy ống lên phía đỉnh, phải cẩn thận để không chọc thủng mặt thạch. Hơ miệng ống nghiệm trên ngọn lửa và đút nút lại. Khử trùng đầu que cấy, để nguội, dán nhãn trên ống nuôi cấy.

d) Đối với môi trường thạch bán rắn, sử dụng que cấy thẳng, lặp lại bước 1-4. Cấy sâu vào môi trường bằng cách đâm sâu đầu que cấy thẳng vào giữa, sau đó rút ra. Hơ miệng ống nghiệm trên ngọn lửa và đậy nút lại. Đốt nóng que cấy, để nguội, dán nhãn ống nuôi cấy.

e) Nuôi các ống nuôi cấy ở 35°C với thời gian thích hợp.

g) Ghi nhận hiện tượng xuất hiện ở mỗi ống nuôi cấy, tham khảo các hình mẫu.

h) Xem mùi vị xuất hiện của các ống nuôi cấy. Nhuộm Gram và so sánh chúng.

## **II. KỸ THUẬT PHÂN LẬP VI SINH VẬT BẰNG PHA LOÃNG**

Trong tự nhiên, hầu hết VSV sinh trưởng trong môi trường có chứa nhiều loại VSV khác nhau. Việc nuôi cấy hỗn hợp ít được sử dụng trong nghiên cứu VSV bởi vì khó khăn trong việc xác định riêng rẽ từng loại vì khi đó chúng cùng các vi sinh vật khác cùng biểu lộ các hoạt tính. Nuôi cấy thuần khiết, chỉ chứa một loại VSV đơn là yêu cầu trong các khái niệm nghiên cứu như đặc tính, bệnh phát sinh, trao đổi chất và khả năng kháng kháng sinh...

Trong những năm 1970, Joseph Lister đã đặt vấn đề nuôi cấy thuần khiết bằng cách tiến hành dây pha loãng tới khi mỗi một ô về mặt lý thuyết chỉ chứa một vi khuẩn. Tuy nhiên, sự thành công là rất giới hạn và sự tạp nhiễm (có mặt các VSV không mong muốn) rất phổ biến. Năm 1980, Robert Koch đặt nền móng cho môi trường đặc, nhờ đó các nhà VSV học có thể tách rời VSV bằng pha loãng và thu nhận chúng trên môi trường đặc. Một vi khuẩn được phát hiện dựa trên sự hình thành khuẩn lạc có thể nhìn thấy được chỉ chứa một loại VSV.

Hiện nay có 3 phương pháp nuôi cấy thường được sử dụng để phân lập VSV: ria đĩa, gạt đĩa và đổ đĩa. Trong kỹ thuật ria đĩa, một que cấy tròn được sử dụng để tạo vệt mẫu trộn nhiều lần trên bề mặt của môi trường nuôi cấy rắn trong đĩa Petri. Về mặt lý thuyết, dùng que cấy tròn tạo vệt nhắc lại cho bề mặt thạch, VSV lần lượt rơi khỏi que cấy được phân bố đồng đều trên mặt thạch, mỗi tế bào sẽ phát triển thành một khuẩn lạc. Cấy ria đĩa là một kỹ thuật phân lập đang được sử dụng ngày nay.

Cấy gạt và đổ đĩa là kỹ thuật định lượng cho phép xác định số lượng VSV trong một mẫu cơ chất. Trong kỹ thuật gạt đĩa, một số lượng nhỏ mẫu pha loãng xác định được gạt trên đĩa môi trường đặc bằng cách sử dụng một que uốn cong (hình dạng giống như một chiếc gậy hockey). Trong kỹ thuật đổ đĩa, một lượng nhỏ mẫu pha loãng được trộn với thạch nóng chảy và đổ trực tiếp vào đĩa Petri vô trùng còn rỗng. Sau khi nuôi, VSV sinh trưởng có thể nhìn thấy là các khuẩn



lạc trên hoặc trong đĩa thạch đã đông. Để xác định số lượng VSV trong một mẫu ban đầu, các đĩa với số khuẩn lạc từ 25-250 được lựa chọn. ít hơn 25 khuẩn lạc là không đúng bởi vì một sự tạp nhiễm đơn gây ra ít nhất 4% sai số. Một đĩa có lớn hơn 250 khuẩn lạc thì khó đếm. Số lượng VSV trong mẫu ban đầu được tính theo phương trình sau:

$$\text{VSV/ml} = \frac{\text{Số lượng khuẩn lạc}}{\text{độ pha loãng}}$$

## 1. Vật liệu

Đĩa Petri chứa môi trường thạch  
 Ống nghiệm chứa thạch nóng chảy  
 Đĩa Petri vô trùng, bình nón 250 ml  
 Pipet 1 ml vô trùng, pipet bóp bóng  
 Môi trường thạch nghiêng  
 Dịch nuôi cấy: 2 loại vi khuẩn

## 2. Thủ tục tiến hành

- a. Dán nhãn vào đáy của 2 đĩa môi trường tương ứng với 2 loại dịch nuôi cấy.
- b. Khử trùng que cấy: hơ nóng đỏ đầu que cấy, làm nguội rồi lấy vô trùng một vòng que cấy dịch VSV
- c. Thao tác tạo vết cấy có thể thực hiện với các đĩa Petri đặt trên bàn hoặc trên tay.
  - Nhấc một mép của đĩa petri lên và cấy ở phần đầu tiên bằng cách tạo các đường không chồng nhau (đường rích rấc). Không được làm xước mặt thạch trong khi cấy.
  - Khử trùng que cấy, quay đĩa tiếp và ria qua một khu vực của phần thứ hai sang phần thứ ba hoặc ria trên phần còn lại của bề mặt thạch, cần cẩn thận tránh tạo các đường chạm vào các phần cấy trước đó.
  - Khử trùng que cấy trước khi cắm lại vào giá đựng.
- d. Có thể ria cấy trên nhiều đĩa với một vài loại dịch VSV. Sau đó dán nhãn, ghi tên người thực hiện, ngày và nguồn dịch nuôi cấy.
- e. Nuôi các đĩa vừa cấy ở 30- 35°C trong tủ định ôn cho tới khi phát hiện các khuẩn lạc riêng rẽ phát triển (thường từ 24-48 h). Chú ý khi đặt các đĩa Petri trong tủ phải để ngược lại cho phần nắp đĩa xuống phía dưới.
- g. Sau khi nuôi cấy, ghi lại kết quả
- h. Tiếp tục cấy chuyển từ một khuẩn lạc đơn dòng sang đĩa môi trường mới nhiều lần cho đến khi thu được giống thuần khiết. Sau đó cấy từ một khuẩn lạc trên đĩa đã thuần vào ống môi trường thạch nghiêng để giữ giống.

### III. MÔI TRƯỜNG CHUYÊN TÍNH

Môi trường chuyên tính được sử dụng để phân lập các VSV mà số lượng là giới hạn trong dịch pha loãng có nhiều VSV ưu thế khác nhau. Ví dụ nếu dịch để phân lập có 1 triệu tế bào vi khuẩn A và chỉ có 1 tế bào vi khuẩn B, vi khuẩn B có thể bị hạn chế trong phần rìa cấy thứ nhất ở đĩa phân lập. Để giúp phân lập các VSV thiểu số, các phương pháp nuôi cấy làm giàu và chọn lọc có thể làm tăng cường sự sinh trưởng của một số VSV và hạn chế sự sinh trưởng của các VSV khác. Môi trường chọn lọc chứa các hoá chất ngăn chặn sự sinh trưởng của các VSV không mong muốn mà không ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của các VSV cần phân lập. Môi trường làm giàu chứa các hoá chất kích thích sự sinh trưởng của các VSV mong muốn. Các VSV khác sẽ sinh trưởng nhưng sự sinh trưởng của các VSV mong muốn sẽ được tăng lên.

Môi trường chuyên tính là môi trường mà chỉ tạo điều kiện cho sự phát triển thuận lợi của VSV A mà không tạo điều kiện thuận lợi cho VSV B (hay VSV B không phát triển hoặc phát triển kém trên môi trường này).

Dựa vào môi trường chuyên tính mà xác định được VSV A thông qua việc hình thành khuẩn lạc của VSVS đó.

Một loại môi trường hữu ích khác để phân lập VSV là môi trường phân biệt. Môi trường này chứa vài loại dinh dưỡng cho phép khảo sát để phân biệt một loại VSV này với các loại khác bằng trao đổi chất hoặc thay đổi môi trường.

Do có nhiều phương pháp và nhiều loại môi trường nên phải chọn thủ tục phù hợp với loại VSV mong muốn. Ví dụ nếu vi khuẩn B chịu được muối có thể được thêm vào môi trường nuôi cấy. Các điều kiện vật lý có thể được sử dụng để lựa chọn một loại vi khuẩn. Nếu vi khuẩn B có khả năng kháng nhiệt, mẫu có thể được đun lên trước khi phân lập. Trong thí nghiệm này, sẽ xác định tiêu chuẩn sử dụng để chọn một môi trường nuôi cấy. Hai loại môi trường sẽ được so sánh.

#### 1. Vật liệu

Đĩa Petri chứa môi trường phenylethyl alcohol agar

Đĩa Petri chứa môi trường trypton agar

Thuốc nhuộm Gram

Hỗn hợp dịch nuôi *E. coli* và *Staphylococcus*

#### 2. Thủ tục tiến hành

Môi trường trypton agar

Trypton: 1,0%

Cao thịt: 0,3 g

NaCl: 0,5 g

Agar: 1,5 g

Môi trường phenylethyl alcohol agar

Trypton: 1,0%

Cao thịt: 0,3 g

Phenylethyl alcohol: 0,25

NaCl: 0,5 g

- a. Sử dụng một cái bút đánh dấu chia mỗi đĩa thành 3 phần bằng cách đánh dấu dưới đáy. Dán nhãn một phần trên mỗi đĩa cho mỗi loại dịch VSV.
- b. Rửa mỗi loại dịch VSV trên mặt thạch như hình vẽ.
- c. Đặt ngược các đĩa nuôi trong tủ định ôn ở 30-35°C. Ghi lại kết quả sau 24, 48 và 72h nuôi cấy. Nhuộm Gram các khuẩn lạc xuất hiện khác nhau và quan sát dưới kính hiển vi. Vẽ hình quan sát được.

**\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 4**

1. Các loại dụng cụ hóa chất cần thiết để chế tạo môi trường?
2. Trình bày khử trùng từng loại dụng cụ, môi trường nuôi cấy VSV?
3. Các bước tiến hành và cách làm phân lập, tuyển chọn và cấy truyền VSV?

## **Bài số 5**

### **PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU PHÂN TÍCH VI SINH VẬT**

#### **Mục đích:**

- + Hiểu rõ phương pháp và nguyên tắc lấy mẫu cơ chất để phân tích VSV.
- + Nắm được các cách bảo quản và chuẩn bị mẫu cơ chất phân tích VSV.

#### **Nội dung:**

- + Phương pháp lấy mẫu cơ chất trên thực địa.
- + Bảo quản mẫu
- + Chuẩn bị mẫu để phân tích VSV.

#### **Nguyên lý:**

Mỗi một biện pháp kỹ thuật tác động vào đất hay cơ chất đều gây ra sự thay đổi sinh vật đất và hoạt động của chúng trong môi trường. Mức độ thay đổi hoạt tính phụ thuộc vào kích cỡ của mẫu cơ chất và việc xử lý mẫu tiếp theo (sàng, phơi khô hoặc làm lạnh các mẫu cơ chất tươi lấy từ thực địa).

### **1. Xác định số lượng mẫu và dụng cụ để lấy mẫu**

#### ***1.1 Xác định số lượng mẫu cần lấy:***

- Phụ thuộc vào mục tiêu, nội dung nghiên cứu mà định ra yêu cầu số lượng và vị trí lấy mẫu phải đại diện.
- Phụ thuộc vào điều kiện cụ thể ngoài thực địa, hay khu vực cần lấy mẫu phân tích

Điều quan trọng nhất người lấy mẫu phải thực hiện là lấy mẫu sao cho đồng nhất và phải đại diện được khu vực, khoanh đất hay cơ chất cho khu đó, vùng đó.

Ví dụ: số lượng tương ứng các mẫu cơ chất trong các đồng phế thải, rác thải... được lấy từ khu vực đã điều tra và được trộn lẫn để tạo thành một mẫu đại diện.

#### ***1.2. Các vật liệu cần chuẩn bị để lấy mẫu***

- Dụng cụ lấy mẫu ( Dao, kéo, lõi trụ, mai thuổng...)
- Cồn, bông vô trùng
- Xô đựng
- Túi đựng mẫu
- Thùng làm lạnh

#### ***1.3. Mẫu đại diện***

Các mẫu ngẫu nhiên có thể chỉ để trộn đều nếu chúng được lấy từ một khu vực đồng nhất và đại diện.

Ví dụ: Nếu lấy mẫu đất để phân tích VSV đất (cần dựa vào yêu cầu của mục tiêu nghiên cứu, độ chính xác đến đâu, lấy bao nhiêu mẫu, diện tích rộng hẹp của từng khoảnh đất...)

- Diện tích
- Địa hình
- Độ sâu theo tầng phẫu diện đất
- Loại hình sử dụng đất (thậm chí lấy theo kiểu sử dụng đất)
- Cây trồng
- Điều kiện độ ẩm

Các mẫu đất cần được lấy khác biệt thực sự. Những khác biệt lớn trong vùng lân cận phải được loại trừ khỏi mẫu. Nếu chúng có tầm quan trọng đặc biệt thì mẫu phải được lấy riêng rẽ.

## **2. Phương pháp lấy mẫu và vận chuyển mẫu**

### **2.1 Nguyên tắc lấy mẫu**

Để đảm bảo mẫu đại diện, các điểm lấy mẫu phải được phân bố ngẫu nhiên trong diện tích điều tra. Điều này tốt nhất được tiến hành theo phương pháp lấy điểm theo đường chéo nếu địa hình đồng nhất và diện tích  $< 1000 \text{ m}^2$  sẽ lấy 5 điểm đại diện.

Lấy mẫu không nên gần bờ ruộng hoặc đường, vì số lượng VSV trong mẫu đất đó sẽ không đại diện cho khoảnh đất ở chính vùng đó.

Khi lấy mẫu gạt bỏ lớp rễ cỏ bề mặt (nếu có), sau đó cắt vuông xuống phía dưới. Cứ như vậy lấy càng nhiều điểm càng tốt. Lấy được điểm nào lập tức phải cho ngay vào túi đựng mẫu để tránh sự nhiễm tạp.

Nếu đề tài yêu cầu phân tích VSV theo phẫu diện đất, thì đào phẫu diện (như phần học thổ nhưỡng), sau đó lấy đất theo từng tầng riêng biệt để phân tích.

Nếu ruộng lấy mẫu đang thâm canh các loại cây trồng cạn, mặt ruộng không đồng nhất, thì phải xem xét cụ thể thực địa để lấy mẫu sao cho đồng nhất và chính xác. Ví dụ: luống khoai, ngô, sắn, đậu, lạc, rau...thì không được lấy đất ở trên mặt luống và ở dưới rãnh luống, mà phải lấy ở sườn luống, không được lấy gần gốc cây trồng.

Lấy mẫu đất để phân tích tốt nhất vào thời gian đất tương đối ổn định, nghĩa là người dân không tác động nhiều vào đất (thường sau thu hoạch)

Lấy mẫu từ các cơ chất khác, như: đồng rác thải, phế thải, ...cũng cần phải xem xét rất cụ thể thực địa sao cho lấy mẫu chuẩn nhất, đại diện nhất khu vực nghiên cứu.

Trọng lượng cần lấy khoảng 200 gam/1 mẫu

Lấy mẫu phân tích VSV phải đảm bảo nguyên tắc là vô trùng, tránh sự nhiễm tạp, lấy xong phải cho mẫu vào phích lạnh đựng mẫu (vì sinh sản của

VSV cực nhanh, nếu không bảo quản trong điều kiện lạnh ngay số liệu phân tích sẽ không chính xác)

## **2.2 Vận chuyển mẫu**

Mẫu để phân tích VSV, tốt nhất lấy xong chuyển ngay về phòng phân tích để bảo quản. Trong quá trình vận chuyển mẫu không được làm thùng túi đựng mẫu và luôn luôn giữ trong phích lạnh (để kìm hãm sinh trưởng và phát triển của VSV trong mẫu)

## **3. Bảo quản mẫu**

Tốt nhất khi mẫu đã về tới phòng thí nghiệm cần xử lý mẫu và phân tích ngay (công việc xử lý mẫu phải được thực hiện trong phòng vô trùng để tránh tạp khuẩn vào mẫu phân tích)

Nếu không kịp phân tích, thì phải bảo quản mẫu ở tủ lạnh, nhiệt độ  $< 3^{\circ}\text{C}$ .

Mẫu được bảo quản không quá 30 ngày, tốt nhất phân tích càng sớm càng tốt.

## **\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 5**

1. Chuẩn bị dụng cụ trang thiết bị cần thiết để lấy mẫu phân tích VSV?
2. Các bước tiến hành phân tích VSV trong mẫu cơ chất?
3. Trình bày các vấn đề cần lưu tâm trong bảo quản và phân tích VSV từ mẫu cơ chất



## Bài số 6

### PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH VI SINH VẬT

#### **Mục đích:**

- Giúp cho học viên biết và thực hành một số phương pháp phân tích VSV trong cơ chất
- Nắm được phương pháp phân tích VSV (nuôi cấy trong môi trường dịch thể và trên môi trường rắn hoặc bán rắn)

#### **Nội dung:**

- Giới thiệu phương pháp pha loãng (chuẩn bị dịch cấy)
- Nuôi cấy VSV trong môi trường dung dịch
- Nuôi cấy VSV trên môi trường rắn, bán rắn
- Kiểm tra kết quả nuôi cấy
- Tính số lượng VSV trong 1 gam hay 1 ml dịch môi trường.

### **1. Các bước phân tích**

#### ***1.1 Dụng cụ phân tích:***

- Bình tam giác, bình cầu, ống nghiệm (dung tích: 10ml, 100ml, 250 ml), Pipét chia độ 0,1 - 1,0 ml, 2ml, 5 ml, 10 ml), hộp nhôm, que cấy, que gạt, bi thủy tinh, giấy quỳ, khay men, cuốc, khoan ....Tất cả các dụng cụ đều phải tiệt trùng.

+ Môi trường nuôi cấy VSV đã khử trùng (Bài 3)

#### ***1.2 Chuẩn bị bình nước vô trùng làm dãy pha loãng:***

Chuẩn bị 10 bình tam giác hoặc bình cầu có dung tích 100ml hoặc 250 ml. Cho vào mỗi bình 90 ml nước máy (thường cho 92 ml, vì khi khử trùng bốc hơi khoảng 2 ml). Đem bình các bình đã có nước tiệt trùng hơi ở 1 atm (121<sup>0</sup>C) qua 30 phút. Lấy ra để nguội sẽ được dãy pha loãng, đánh số thứ tự từ 1 đến 10.

#### ***1.3 Xác định độ ẩm mẫu cần phân tích:***

Cân 10 gam mẫu cơ chất tươi cho vào hộp nhôm, có thể cân cả trong lượng hộp nhôm khi chưa có mẫu phân tích, sau đó đem sấy ở tủ sấy nhiệt độ 105 <sup>0</sup>C qua 4 giờ, đem hộp nhôm đã sấy ra cho vào bình hút ẩm cho đến khi nguội. Đem cân trọng lượng, sau đó sấy nhiều lần như vậy đến khi trọng lượng không thay đổi, thì tính độ ẩm của mẫu phân tích theo công thức sau:

$$\text{Độ ẩm X\%} = \frac{A - B}{B - C} \times 100$$

X: Độ ẩm %

A: Khối lượng hộp + cơ chất còn ướt.

B: Khối lượng hộp + cơ chất đã sấy khô.

C: Khối lượng hộp.

Tính hệ số khô kiệt k:

$$k = \frac{1}{1 - x}$$

#### **1.4. Chuẩn bị dãy pha loãng**

Muốn đếm được số lượng vi sinh vật dễ dàng, khi phân tích cần pha loãng cơ chất đến một độ nhất định. Cần lưu ý rằng làm dần mật độ VSV phải pha loãng tỷ lệ luôn luôn = 1/10

- Cân 10g cơ chất cho vào bình thứ nhất đã có 90 ml nước vô trùng, lắc 15 - 20 phút, trên máy lắc 150 lần/ phút. Như vậy chúng ta đã có dung dịch pha loãng  $10^{-1}$ , nghĩa là tỷ lệ 1:10.

- Dùng pipet 10ml hút 10 ml dung dịch ở nồng độ  $10^{-1}$  cho vào 90 ml nước ở ống bình thứ 2, lắc đều, chúng ta có nồng độ pha loãng  $10^{-2}$ , tỷ lệ 1:100.

- Tiếp tục làm như vậy đối với các bình thứ 3, 4...đến khi chúng ta có được dãy pha loãng cần thiết, tỷ lệ  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ...

Chú ý: các pipet đều phải khử trùng, mỗi một nồng độ pha loãng phải dùng 1 pipet riêng.

Có thể chuẩn bị dãy pha loãng bằng ống nghiệm có chứa 9 ml nước, hoặc bình tam giác có chứa 45 ml nước vô trùng .... rồi đem khử trùng như làm với bình tam giác. Nếu làm bằng ống nghiệm, thì chỉ cân 1 gam cơ chất khô, hoặc 5 gam cơ chất khô. Nghĩa là ta vẫn tạo được dãy pha loãng tỷ lệ 1:10. Để phân tán đều dịch cơ chất trong ống nghiệm dùng pipet hút dịch đưa lên đưa xuống nhiều lần nhưng không thổi khí.

#### **2. Nuôi cấy**

Khi đã có dung dịch pha loãng rồi, dùng pipét 0,1 ml lấy từ bình pha loãng nào đó trong dãy pha loãng cấy vào trong môi trường đã chuẩn bị sẵn cho từng nhóm hoặc từng giống VSV định phân tích. Mỗi nồng độ ít nhất phải cấy 3 - 5 lần nhắc lại (số lần nhắc lại càng nhiều, thì kết quả có độ tin cậy càng cao). Cấy ít nhất ở 3 nồng độ pha loãng liên tiếp. Cấy xong dung que gạt thủy tinh vô trùng dàn đều dịch cấy trên mặt môi trường (nếu môi trường rắn hoặc bán rắn trên đĩa môi trường thạch). Còn cấy vào trong môi trường dung dịch trong các ống nghiệm hoặc bình dung dịch dinh dưỡng chỉ cần lắc nhẹ là xong.

Chú ý tất cả các hộp lồng hoặc các bình môi trường thí nghiệm đều phải đánh số thứ tự theo nguyên tắc sau: số mẫu nghiên cứu nồng độ pha loãng - số lần nhắc lại.

Ví dụ: 5.4.3 - nghĩa là mẫu phân tích số 5; cấy ở nồng độ pha loãng thứ 4; cấy ở đĩa môi trường có số lần nhắc lại thứ 3.

Sau khi cấy xong cho đĩa, hoặc bình nuôi cấy vào trong tủ nuôi, nuôi ở nhiệt độ thích hợp cho từng chủng giống VSV khác nhau trong thời gian nhất định (có thể từ 48 - 72 giờ, có giống phải nuôi lâu hơn mới hình thành khuẩn lạc)

Cùng một dung dịch cơ chất pha loãng có thể phân tích nhiều mặt như nấm, xạ khuẩn và các loại vi khuẩn ... bằng cách cấy vào môi trường thích hợp. Môi trường có thể là dịch thể, có thể là thạch bằng và từ những khuẩn lạc đã mọc trên môi trường thạch bằng và những đặc trưng của môi trường dịch thể, chúng ta có thể tính số lượng của vi sinh vật.

### 3. Tính số lượng vi sinh vật

#### 3.1. Phương pháp thạch bằng ( trên môi trường thạch )

- Mỗi tế bào vi sinh vật trên môi trường thích hợp sẽ phát triển và cho chúng ta một khuẩn lạc. Do đó số lượng khuẩn lạc cho ta biết số lượng vi sinh vật trong một gam cơ chất.

- Sau khi VSV đã mọc trên môi trường thạch đĩa (hộp lồng), đem đếm số lượng khuẩn lạc được hình thành bằng máy đếm khuẩn lạc, hoặc đếm trực tiếp theo phương pháp chia ô trên đĩa môi trường.

Kết quả được tính theo công thức sau:

$$S = T \times 10 \times N \times K$$

S: Số lượng vi sinh vật trong một gam cơ chất.

T: Số khuẩn lạc trung bình trong một hộp petri

10: Số khuẩn lạc qui ra 1 ml ( vì lúc nuôi cấy trong hộp lồng chúng ta dùng 0,1 ml dung dịch cơ chất )

N: Số nghịch đảo của nồng độ pha loãng

K: hệ số khô kiệt (Nếu không quy đổi từ khô sang tươi)

#### 3.2 Tính số lượng vi sinh vật trong môi trường lỏng ( phương pháp định tính )

Có những loại vi khuẩn không thể dùng mắt thường quan sát khuẩn lạc hoặc sản phẩm sinh ra cũng không có màu gì đặc biệt để đánh giá vi khuẩn hoạt động. Trong trường hợp này phải dùng phản ứng màu để xác định. Cứ mỗi ống nghiệm có phản ứng màu gọi là ống ( + ). Dựa vào các ống dương tính, căn cứ vào bảng Mc.Crady chúng ta tính ra số lượng vi sinh vật.

Ví dụ:

|              |                |                |                |                |                |           |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------|
| Độ pha loãng | $10^{-4}$      | $10^{-5}$      | $10^{-6}$      | $10^{-7}$      | $10^{-8}$      | $10^{-9}$ |
| Số ống dương | 3 <sup>+</sup> | 3 <sup>+</sup> | 3 <sup>+</sup> | 2 <sup>+</sup> | 1 <sup>+</sup> | 0         |

- Tìm số chỉ tiêu: 321

Số chỉ tiêu là con số có 3 hàng số. Hàng số đầu là số biểu hiện ở nồng độ loãng nhất các ống nghiệm đều dương. Hai số tiếp theo là số ống dương ở 2 nồng độ tiếp theo sau.

- Đem số chỉ tiêu này tra bảng Mc.Crady ta sẽ có số lượng vi khuẩn tương ứng: 15

- Từ con số này ta tính ra số lượng vi khuẩn trong một gam cơ chất theo công thức:

$$S = t \times 10 \times n \times k$$

S: Số lượng vi sinh vật.

t: Số lượng vi khuẩn tra bảng

10: Số lượng vi khuẩn qui ra 1 ml

n: Số nghịch đảo của nồng độ pha loãng

k: Hệ số khô kiệt

$$S = 15 \times 10 \times 10^3 \times 1,52 = 2,28 \cdot 10^5 \text{ tế bào/lg}$$

\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 6

1. Trình bày phương pháp pha loãng?
2. Những dụng cụ cần thiết để làm dãy pha loãng là gì?
3. Nguyên tắc cơ bản nhất của phương pháp pha loãng để nuôi cấy VSV là gì?
4. Phương pháp và cách tính số lượng VSV trên môi trường đặc, môi trường lỏng?

## **Bài số 7**

### **ĐÁNH GIÁ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI SINH VẬT**

#### **Mục đích:**

- Giúp cho học viên hiểu rõ tầm quan trọng phải đánh giá đặc tính sinh học của các VSV
- Biết được các phương pháp cơ bản để đánh giá đặc tính sinh học của VSV

#### **Nội dung:**

- Đánh giá thời gian mọc của chủng giống cần nghiên cứu
- Đánh giá đường kính khuẩn lạc của chủng giống cần nghiên cứu
- Xác định khả năng thích ứng ở môi trường pH của chủng giống cần nghiên cứu
- Khả năng cạnh tranh của chủng giống cần nghiên cứu
- Hoạt tính của chủng giống cần nghiên cứu

#### **1. Dụng cụ và nguyên vật liệu**

##### ***1.1 Dụng cụ:***

Đĩa Petri, cồn 76<sup>0</sup>, nước vô trùng, bình tam giác hoặc bình cầu 100, 250, 500, 1000 ml. Bình tia, lam kính, đèn cồn, thuốc nhuộm, kính hiển vi. ...

Môi trường nuôi cấy chủng giống VSV nghiên cứu

#### **2. Đánh giá đặc tính sinh học theo từng chỉ tiêu:**

Việc đánh giá đặc tính sinh học của các vi sinh vật được tuyển chọn dựa vào các chỉ tiêu sau:

##### ***2.1. Xác định thời gian mọc của các VSV***

Theo phương pháp nuôi cấy trên môi trường thạch bằng hoặc trong môi trường dung dịch (tùy từng giống VSV) ở tủ định ôn nhiệt độ từ 28 - 60<sup>0</sup>c (tùy thuộc vào đặc điểm của từng loại vi sinh vật).

Theo dõi ở từng thời gian khác nhau từ 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 giờ....

Từng thời gian trên quan sát khi VSV đã mọc được trong thời gian nuôi ở tủ định ôn, thì tính giờ. Xác định xem chủng giống đó thuộc nhóm mọc nhanh hay mọc chậm (< 72 giờ thuộc nhóm mọc nhanh; > 72 giờ thuộc nhóm mọc chậm)

##### ***2.2. Xác định kích thước khuẩn lạc đo trực tiếp bằng thước (mm).***

Do nhiều khuẩn lạc sau đó tính trung bình trung (tốt nhất nuôi 5 ngày mới đo)

##### ***2.3. Xác định kích thước tế bào bằng phương pháp đo trực tiếp bằng kính hiển vi (àm)***

Cố định tiêu bản, nhuộm tế bào sau đó đo bằng dụng cụ đo chuyên dụng dưới kính hiển vi

#### 2.4. Xác định khả năng thích ứng ở môi trường pH khác nhau

Bằng phương pháp nuôi cấy trực tiếp ở các mức pH khác nhau, cụ thể là:

pH = 4,0; pH = 5,0; pH = 6,0; pH = 7,0; pH = 8,0. (pH<sub>kcl</sub>)

Cách làm như sau:

- Pha dung dịch đệm Sorensen 1:

+ Cân chính xác 9,078 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1/15 M.

+ Cân chính xác 11,876g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O hoà vào 1 lít nước cất được dung dịch Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1/25 M.

Sau đó pha 2 dung dịch này theo tỷ lệ nh sau: (đối với 1000ml môi trường).

| pH  | Tỷ lệ trong dung dịch (ml)       |                                 |
|-----|----------------------------------|---------------------------------|
|     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| 4,0 | 0                                | 100                             |
| 5,0 | 5                                | 95                              |
| 6,0 | 30                               | 70                              |
| 7,0 | 80                               | 20                              |
| 8,0 | 99                               | 1                               |

pH chính xác của môi trường được tạo ra nhờ sự giúp đỡ của dung dịch đệm photphat được bổ sung vào môi trường vô trùng với số lượng 10% so với thể tích của môi trường.

- Chuẩn bị môi trường chuyên tính của các chủng vi sinh vật sau đó pha môi trường với các nồng độ pH khác nhau, đem hấp khử trùng (1at, 20 phút), đổ ra đĩa pettri (15 - 20 ml/1 đĩa pettri).

Thí nghiệm được nhắc lại 4 lần ở 5 mức pH khác nhau.

- Môi trường dịch thể được cho vào các bình tam giác 100 ml ( 50 ml môi trường dịch thể/ 1 bình tam giác). Cấy 1 ml dịch khuẩn chuyên tính của từng chủng vi sinh vật vào các bình tam giác đã chuẩn bị ở trên rồi đưa lên máy lắc (150 vòng/ phút, trong vòng 48 giờ). Sau đó lấy 0,05 ml dịch vi khuẩn đó cấy vào môi trường thạch bằng (đã được chuẩn bị ở trên), dùng que gạt (đã khử trùng) gạt đều dịch vi khuẩn trên bề mặt thạch. Sau đó đem nuôi trong tủ định ôn (nhiệt độ từ 28 - 30<sup>0</sup>c). Sau 48 giờ nuôi cấy đưa ra đếm số lượng khuẩn lạc mọc ở từng nồng độ pH khác nhau.



## **2.5. Xác định khả năng kháng kháng sinh (khả năng cạnh tranh)**

Theo phương pháp nuôi cấy trực tiếp trên môi trường có Streptomycin với các nồng độ khác nhau: 300, 500, 600, 800, 1000 mg/1lít môi trường (Obtin,1971).

Cách làm như sau:

Pha thuốc kháng sinh theo nồng độ đã định sẵn cho vào môi trường chuyên tính của từng chủng vi sinh vật ( môi trường đã được khử trùng ở 1at, 30'). Sau đó chia ra các đĩa pettri rồi để nguội. Cấy 0,05 ml dịch khuẩn chuyên tính của từng chủng vi sinh vật đĩa pettri, đem nuôi trong tủ định ôn (nhiệt độ từ 28 - 30<sup>0</sup>c). Sau 3 ngày nuôi cấy đưa ra đếm và quan sát số lượng khuẩn lạc mọc ở từng nồng độ kháng sinh khác nhau.

## **2.6. Đánh giá hoạt tính của các chủng giống VSV**

Chỉ tiêu này phụ thuộc vào từng VSV khác nhau, mà đánh giá hoạt tính của chúng khác nhau. Ví dụ: Nghiên cứu về hoạt tính phân hủy cellulô, hoạt tính cố định nitơ, hoạt tính phân huy chuyển hóa phospho khó tan...

Thí nghiệm về xác định hoạt tính phân hủy chuyển hóa lân, thì: xác định cường độ phân giải lân khó tan

Dùng vi sinh vật: T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>.

Nguyên liệu: Apatit, photphorit, canxiphotphat.

Việc đánh giá cường độ phân giải lân khó tan theo 2 phương pháp sau:

Đo đường kính vòng phân giải của vi sinh vật, cách làm như sau:

Cân 10g các chất trên lần lượt cho vào từng loại môi trường chuyên tính. Đem khử trùng (ở 1at, 45') rồi đổ ra đĩa pettri (khoảng 20 - 25 ml/1 đĩa) sau đó để nguội.

Các chủng vi sinh vật được hoà tan thành dịch huyền phù bằng nước cất vô trùng. Dùng que cấy lấy dịch đó cấy điểm vào môi trường thạch bằng có apatit, photphorit, canxiphotphat - Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Đem nuôi trong tủ định ôn (nhiệt độ từ 28 - 30<sup>0</sup>c). Theo dõi sau 3 ngày/ 1 lần đo đường kính vòng phân giải của từng chủng vi sinh vật.

Xác định cường độ phân giải lân khó tan trên môi trường dịch thể bằng phương pháp Oniani trên máy so màu.

Cân 20g các chất trên lần lượt cho vào từng loại môi trường dịch thể, khử trùng (ở 1at, trong vòng 45'), sau đó để nguội.

Cấy giống vi sinh vật vào từng môi trường chuyên tính ở trên và đưa lên máy lắc (150 vòng/phút). Cứ sau 3, 7, 15, 21, 30 ngày thì đo 1 lần trên máy so màu.

**\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 7**

1. Trình bày những chỉ tiêu cơ bản để đánh giá đặc tính sinh học của các chủng giống VSV cần nghiên cứu?
2. Phương pháp chọn và đánh giá từng đặc tính sinh học của VSV để tuyển chọn làm giống cho học tập và nghiên cứu?

## Bài số 8

### PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *AZOTOBACTER* TỪ ĐẤT

#### Mục đích:

- Giới thiệu cho học viên biết cách phân lập tuyển chọn chủng giống VSV thuần khiết từ đất, mà cụ thể trong bài là giống vi khuẩn *Azotobacter*.

#### Nội dung:

- Phương pháp phân lập vi khuẩn *Azotobacter*.
- Môi trường dinh dưỡng để phân lập vi khuẩn *Azotobacter*.
- Đánh giá đặc tính sinh học của vi khuẩn *Azotobacter*.
- Bảo quản giống vi khuẩn *Azotobacter*.

### 1. Chuẩn bị dụng cụ, nguyên vật liệu và môi trường phân lập

#### 1.1. Dụng cụ, nguyên liệu

Đĩa Petri, cồn 76<sup>0</sup>, nước vô trùng, bình tam giác hoặc bình cầu 100, 250, 500, 1000 ml. Bình tia, lam kính, đèn cồn, thuốc nhuộm, kính hiển vi.

Mẫu đất đã sàng qua rây 2mm.

Bình chứa 45 hoặc 90 ml nước vô trùng

#### 1.2. Môi trường phân lập: sử dụng môi trường Asby

|                                |          |                                 |        |
|--------------------------------|----------|---------------------------------|--------|
| Glucô                          | 10g      | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,5g   |
| MgSO <sub>4</sub>              | 0,2g     | NaCl                            | 0,2g   |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0,1g     | CaCO <sub>3</sub>               | 5g     |
| Thạch                          | 15 - 20g | Nước cất                        | 1000ml |

Cân môi trường, đun tan thạch cho vào bình thủy tinh có nút mài, khử trùng ở 0,6 - 0,8 atm (105- 110 <sup>0</sup>C) trong 30 phút. Để ấm (50-60<sup>0</sup>C) phân vào đĩa Petri 20-25 ml/ đĩa (đường kính 9 cm), công việc này được tiến hành hoàn toàn trong phòng vô trùng.

### 2. Các bước phân lập vi khuẩn *Azotobacter*

Cân 5g mẫu đất cho vào bình tam giác 100 ml đã có sẵn 45 ml nước vô trùng, cho lên máy lắc trong 20 phút ở tốc độ 150 -200 lần/phút.

Dùng que cấy lấy dung dịch lắc rĩa cấy lên môi trường thạch bằng. Cấy thành nhiều đường thẳng song song hoặc cấy rĩa 3 pha với lượng dịch giảm dần. Sau đó đem nuôi trong tủ định ôn ở 25 - 28<sup>0</sup>C trong 2 - 3 ngày đối với vi khuẩn mọc nhanh. Để 5 - 7 ngày đối với vi khuẩn mọc chậm.

Khuẩn lạc *Azotobacter* có màu trắng trong, lồi nhầy khi còn non, khi già có màu vàng lục hoặc màu nâu sẫm, biên khuẩn lạc đều. Vi khuẩn gram âm, không sinh bào tử, di động nhờ tiên mao.

### 3. Xác định hình thái khuẩn lạc, tế bào và khả năng di động của *Azotobacter*

- Quan sát các khuẩn lạc VSV đã mọc trong đĩa petri. Nhận xét miêu tả và vẽ hình dạng các khuẩn lạc đứng riêng rẽ. Khi miêu tả các khuẩn lạc không mở nắp đĩa petri. Ghi chép các đặc điểm của khuẩn lạc vào bảng theo mẫu sau:

| Khuẩn lạc số | Hình dạng | Đường kính, mm | Độ sáng, độ trong | Màu sắc | Bề mặt | Nhìn nghiêng | Mép | Cấu trúc | Độ chặt | Huỳnh quang | Hình vẽ khuẩn lạc |
|--------------|-----------|----------------|-------------------|---------|--------|--------------|-----|----------|---------|-------------|-------------------|
|              |           |                |                   |         |        |              |     |          |         |             |                   |

- Làm tiêu bản giọt treo quan sát sự di động của *Azotobacter*. Vẽ dạng di chuyển.

- Làm tiêu bản khô, nhuộm Gram, quan sát hình thái của vi khuẩn. Vẽ hình.

Để phân lập được giống *Azotobacter* thuần khiết, dùng phương pháp loại dần trực tiếp trên đĩa môi trường *Asby*. Nếu quan sát khuẩn lạc không thuần hoặc bị nhiễm tạp ta loại ngay.

### 4. Tuyển chọn chủng giống *Azotobacter*

Khi đã phân lập được chủng giống *Azotobacter* thuần khiết rồi, công việc tiếp theo buộc phải tiến hành đánh giá đặc tính sinh học của chủng giống mới được phân lập.

Đánh giá đặc tính sinh học bằng các chỉ tiêu sau: (trong bài thực hành về đánh giá đặc tính sinh học của VSV)

- Thời gian mọc
- Kích thước khuẩn lạc
- Khả năng mọc ở môi trường pH rộng
- Khả năng cạnh tranh (Kháng kháng sinh)
- Hoạt tính cố định nitơ phân tử
- Khả năng phát triển trên môi trường tạo các enzym.....

### 5. Bảo quản chủng giống *Azotobacter*

Công tác bảo quản chủng giống VSV là việc làm rất cần thiết và diễn ra thường xuyên.

Khi đã phân lập tuyển chọn được chủng giống VSV như ý muốn rồi, thì việc thuần hóa, bảo quản là rất quan trọng.

Phải cấy truyền và nuôi nhắc lại rất nhiều lần để nhận được giống chủng thuần khiết. Sau đó phải thực hiện đúng nguyên tắc trong công tác bảo quản giống VSV tại phòng thí nghiệm. (sẽ giới thiệu trong bài thực hành về bảo quản và giữ giống VSV)

**\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 8**

1. Trình bày các tiêu trí để phân lập, tuyển chọn chủng giống *Azotobacter* trong đất? Môi trường nuôi cấy?
2. Nêu đặc tính sinh học của chủng giống *Azotobacte* cần tuyển chọn?

## Bài số 9

### PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU VÀ PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VI KHUẨN NỐT SẦN (VKNS) – *RHIZOBIUM*

#### Mục đích:

- Giới thiệu cho học viên biết phương pháp lấy mẫu nốt sần rễ cây họ đậu để phân lập chủng giống vi khuẩn *Rhizobium* (vi khuẩn cố định nitơ phân tử cộng sinh)

#### Nội dung:

- Hiểu được các bước phân lập tuyển chọn vi khuẩn *Rhizobium*
- Xác định được chủng giống vi khuẩn *Rhizobium* mới phân lập
- Đánh giá đặc tính sinh học của chủng giống *Rhizobium* mới phân lập
- Bảo quản và sử dụng chủng giống *Rhizobium* mới phân lập

#### 1. Dụng cụ và nguyên vật liệu

##### a. Dụng cụ:

Dao, kéo, kẹp sắt, kéo, hộp lồng, cồn 76<sup>0</sup>, 95<sup>0</sup> nước vô trùng, bình tam giác hoặc bình cầu 100, 250, 500, 1000ml, dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1%. bình tia, lam kính, đèn cồn, thuốc nhuộm, kính hiển vi,

##### b. Môi trường Pochon

|                   |       |                                 |          |
|-------------------|-------|---------------------------------|----------|
| Manit hay glucô   | 10g   | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.5g     |
| MgSO <sub>4</sub> | 0,2g  | NaCl                            | 0,2g     |
| Nước men bia      | 100ml | CaCO <sub>3</sub>               | 1g       |
| Côngô đỏ 1%       | 10ml  | Thạch                           | 15 - 20g |
| Nước cất          | 880ml |                                 |          |

Cân môi trường cho vào bình thủy tinh có nút mài, khử trùng ở 0,6 - 0,8 át.m (105- 110<sup>0</sup>C) qua 30 phút. Để ấm phân vào hộp lồng 25- 30ml/ hộp, công việc này được tiến hành hoàn toàn trong phòng vô trùng.

#### 2. Phân lập vi khuẩn *Rhizobium*

Lấy rễ cây đậu đỗ có nốt sần to, nhiều kẻ sọc trắng, màu hồng ở thời kỳ cây ra hoa, mang về phòng thí nghiệm phân lập. Bên ngoài nốt sần có nhiều tạp khuẩn, phải tiệt trùng trước khi phân lập. Rửa sạch nốt sần, lấy kéo cắt nốt sần ra khỏi rễ. Chú ý không làm nốt sần xây xát. Cho nốt sần vào nước trong rửa thật sạch, cho vào cồn 95<sup>0</sup> trong 3 phút, cho tiếp vào dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 5 phút, rửa bằng nước vô trùng 5 - 6 lần, mỗi lần 3 - 5 phút. Cho nốt sần vào hộp lồng có một ít nước vô trùng. Dùng kẹp sắt bóp nát và làm thành dung dịch nốt sần (có thể dùng dao lam đã khử trùng cắt nốt sần). Dùng que cấy lấy dung dịch nốt sần cấy lên môi trường thạch phẳng. Cấy thành nhiều đường thẳng song song với lượng dịch giảm dần. Sau đó đem nuôi ở tủ nuôi có 25 - 28<sup>0</sup>C trong 2 - 3 ngày đối với vi khuẩn mọc nhanh. Để 5 - 7 ngày đối với vi khuẩn mọc chậm. Khuẩn lạc nốt sần có màu trong suốt hoặc 1/2 trong suốt. Biên khuẩn lạc đều. Nếu có côngô đỏ hay



violet gentian khuẩn lạc vẫn không bị nhuộm màu. Vi khuẩn gram âm, không bào tử, di động nhờ tiên mao.

### 3. Xác định khả năng cố định nitơ

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

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

Môi trường dùng để trồng cây gây nhiễm:

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

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

Có thể dùng ống môi trường thạch nghiêng hoặc đứng.

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

Thành phần dung dịch vi lượng nh sau:

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

Chuẩn bị ống môi trường:

ống nghiệm 150 x 20mm cho hạt đậu nhỏ

ống nghiệm 200 x 30mm cho hạt đậu lớn

Lượng môi trường cho vào theo bảng sau:

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

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

#### Chuẩn bị hạt giống:

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

#### Nhiễm khuẩn:

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

### **3. 2. Gieo trồng cây vào ống nghiệm**

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

### **3.3. Điều kiện**

#### + Chiếu sáng:

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

#### + Nhiệt độ và độ ẩm:

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

+ Chăm sóc:

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

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

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

### **3.4. Đánh giá kết quả**

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

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

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

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

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

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

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

Rn = liên quan cố định đạm

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

### **4. Đánh giá đặc tính sinh học**

Bằng các chỉ tiêu sau: (Trong bài thực hành về đánh giá đặc tính sinh học của VSV)

- Thời gian mọc
- Kích thước khuẩn lạc
- Khả năng mọc ở môi trường pH rộng
- Khả năng cạnh tranh (Kháng kháng sinh)
- Hoạt tính cố định nitơ phân tử
- Khả năng phát triển trên môi trường tạo các enzym.....

### **5. Bảo quản chủng giống *Rhizobium***

Công tác bảo quản chủng giống VSV là việc làm rất cần thiết và diễn ra thường xuyên.

Khi đã phân lập tuyển chọn được chủng giống VSV như ý muốn rồi, thì việc thuần hóa, bảo quản là rất quan trọng.

Phải cấy truyền và nuôi nhắc lại rất nhiều lần để nhận được giống chủng thuần khiết. Sau đó phải thực hiện đúng nguyên tắc trong công tác bảo quản giống VSV tại phòng thí nghiệm. (sẽ giới thiệu trong bài thực hành về bảo quản và giữ giống VSV)

**\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 9**

1. Trình bày các tiêu chí để phân lập, tuyển chọn chủng giống *Rhizobium* rễ cây họ đậu? Môi trường nuôi cấy?
2. Nêu đặc tính sinh học của chủng giống *Rhizobium* cần tuyển chọn?

## Bài số 10

### PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH NHANH TRAO ĐỔI CHẤT Ở VSV

#### Mục đích yêu cầu:

- + Hiểu rõ các thuật ngữ: trao đổi chất, hydratcacbon, enzym thuỷ phân.
- + Xác định sự thuỷ phân hydratcacbon và gelatin.

#### Nội dung kiến tập:

- + Thực hiện test thử sự thuỷ phân tinh bột.
- + Thực hiện và giải thích test thử trên sữa giấy quỳ.

#### Nguyên lý chung:

Leewenhoek đã nhìn thấy VSV trong rượu vang, Pasteur đã chứng minh rằng VSV là các tổ chức sống. Năm 1972, Pasteur đã viết:

“Không thể tưởng tượng nổi là vật chất hữu cơ của các men mới hình thành (vi sinh vật) chứa một nguyên tử cacbon đơn mà nó không có nguồn gốc từ cơ chất lên men”.

Các phản ứng hoá học được quan sát bởi Pasteur và các phản ứng hoá học xảy ra trong tất cả các tổ chức sống được gọi là trao đổi chất. Các quá trình trao đổi chất đòi hỏi phải có enzym, có bản chất là protein xúc tác cho các phản ứng sinh học. Phần lớn các enzym thực hiện chức năng bên trong một tế bào gọi là enzym nội (endoenzymes). Nhiều VSV tiết ra enzym gọi là enzym ngoại bào, chúng được giải phóng ra từ tế bào để xúc tác các phản ứng xảy ra bên ngoài tế bào.

Một số VSV sử dụng các con đường trao đổi chất đặc biệt với sự có mặt của oxy (hảo khí) và các con đường khác khi không có mặt oxy (yếm khí). Pasteur đã nói tiếp:

“Tôi có thể chứng minh rằng từ các men này (VSV) sống sót với sự có mặt của oxy tự do, chúng mất khả năng lên men của mình tỷ lệ với nồng độ của khí”.

Bởi vì nhiều VSV có hình thái tế bào và khuẩn lạc giống nhau, thêm vào đó các yếu tố như trao đổi chất được sử dụng để mô tả và phân loại chúng. Trên cơ sở các cơ chất, một phần VSV sử dụng và trao đổi chất tạo ra các dạng của nó, các test thử trong phòng thí nghiệm đã được thiết kế để xác định các enzym của VSV.

#### **1. Trao đổi Cacbon**

Các phản ứng hoá học giải phóng ra năng lượng từ sự phân giải các phân tử hữu cơ phức tạp được gọi là dị hoá. Hầu hết VSV chuyển hoá hydratcacbon giải phóng  $\text{CO}_2$  và năng lượng. Hydratcacbon là các phân tử hữu cơ có chứa cacbon, hydro và oxy theo tỉ lệ  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ . Hydratcacbon có thể chia thành 3 nhóm dựa vào số lượng: monosaccharit, disaccharit và polysaccharit. Monosaccharit là loại đường đơn có chứa từ 3-7 nguyên tử cacbon, disaccharit

được tạo nên từ 2 đơn phân tử monosaccharit, và polysaccharit bao gồm 8 hoặc nhiều hơn các phân tử monosaccharit.

Enzim ngoại bào là enzim thủy phân chính bên ngoài tế bào, và phá vỡ các vật chất lớn khi có thêm nước thành các thành phần nhỏ hơn mà chúng có thể chuyển vận vào trong tế bào. Enzim ngoại bào Amilaza thủy phân polysaccharit, tinh bột thành các hydratcacbon nhỏ hơn. Glucoza, một loại monosaccharit có thể được tạo ra do thủy phân. Trong phòng thí nghiệm, sự có mặt của các enzim ngoại bào được xác định bằng cách quan sát sự thay đổi cơ chất bên ngoài khuẩn lạc vi sinh vật.

Glucoza có thể vào bên trong tế bào và được dị hoá; một số vi khuẩn dị hoá oxy hoá glucoza tạo thành oxit cacbon và nước. Dị hoá oxi hoá đòi hỏi phải có mặt phân tử oxy ( $O_2$ ). Tuy nhiên, hầu hết vi khuẩn lên men glucoza mà không sử dụng oxy. Dị hoá lên men không yêu cầu oxy nhưng có thể xảy ra trong điều kiện có oxy. Sản phẩm trao đổi chất cuối cùng của quá trình lên men là các phân tử hữu cơ nhỏ, thường là các axit hữu cơ. Một số vi khuẩn vừa oxy hoá vừa lên men, một số khác không thực hiện cả oxy hoá và lên men nhưng lại lấy cacbon và năng lượng từ các phương thức khác.

Một sinh vật bị oxy hoá hoặc lên men có thể được xác định bằng cách sử dụng môi trường cơ bản OF của Rudolph Hugh và Einar Leifson với loại hydratcacbon mong muốn được thêm vào. Môi trường OF là môi trường dinh dưỡng thạch sâu bán rắn chứa nồng độ hydratcacbon cao và nồng độ pepton thấp. Pepton sẽ hỗ trợ một phần sự sinh trưởng của các vi khuẩn không oxy hoá và không lên men. Hai ống nghiệm được sử dụng: một ống mở để lấy không khí và một ống bịt kín để giữ không có oxy. Môi trường OF chứa chỉ thị xanh bromthymol, sẽ trở thành màu vàng khi có mặt axit, chứng tỏ xảy ra dị hoá cacbon. Trong điều kiện có alkan, sẽ sử dụng pepton và không dùng hydratcacbon được biểu lộ bằng màu xanh sẫm. Nếu hydratcacbon được chuyển hoá trong cả 2 ống, sự lên men đã xảy ra. Một số vi khuẩn sinh ra khí trong quá trình lên men các hydratcacbon. Một cơ thể chỉ sử dụng oxy hoá hydratcacbon sẽ chỉ sinh ra axit trong ống nghiệm mở. Môi trường OF được sử dụng để xác định sự dị hoá cacbon của vi khuẩn Gram âm *Bacillus*. Sự dị hoá cacbon sẽ được chứng minh trong bài tập này. Các test thử sẽ rất quan trọng trong việc xác định vi khuẩn.

### **1.1. Vật liệu**

Đĩa Petri chứa môi trường dinh dưỡng thạch - tinh bột

Môi trường thạch sâu gluco-OF

Dầu khoáng

Thuốc nhuộm Gram

### **1.2. Dịch nuôi cấy**

*Bacillus subtilis*

*Escherichia coli*



*Pseudomonas aeruginosa*

### **1.3. Thủ tục kỹ thuật yêu cầu**

#### **1.3.1. Thủy phân tinh bột**

a. Đeo khẩu trang, chia môi trường thạch-tinh bột thành 3 phần bằng cách đánh dấu dưới đáy đĩa.

b. Cấy rìa một đường đơn vi khuẩn *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* trên môi phân.

c. Đặt ngược các đĩa nuôi ở 35°C/24h. Sau khi sự sinh trưởng diễn ra, các đĩa có thể được cất trữ trong tủ lạnh ở 5°C tới giai đoạn thí nghiệm tiếp theo.

d. Ghi lại bất kỳ sự phát triển nào của vi sinh vật, sau đó đổ tràn Indon Gram lên đĩa. Khu vực thủy phân tinh bột sẽ hiện rõ, trong khi khu vực tinh bột không chuyển hoá sẽ nhuộm màu xanh sẫm.

#### **1.3.2. Môi trường OF**

a. Sử dụng que cấy thẳng, nhiễm 2 ống môi trường glucoza-OF với dịch nuôi cấy vi khuẩn đã chỉ định (*Escherichia*, *Pseudomonas* hoặc *Alcaligenes*).

b. Nhỏ khoảng 5ml dịch dầu khoáng trên 1 ống môi trường. Đậy nút lại.

c. Nuôi tất cả các ống ở 35°C cho tới giai đoạn thí nghiệm tiếp theo.

d. So sánh các ống môi trường nhiễm và không nhiễm VSV. Ghi lại kết quả như sau: khuẩn lạc có mọc hay không, liệu glucoza đã được sử dụng? Và loại trao đổi chất?

Sự di động của vi khuẩn có thể xác định từ các ống môi trường OF.

e. Quan sát và ghi lại kết quả các loại VSV mà bạn không nuôi cấy (nhìn màu sắc đĩa nuôi cấy).

## **2. Trao đổi Protein**

Protein là các phân tử hữu cơ chứa cacbon, hydro, oxy và nitơ; một vài loại protein cũng chứa lưu huỳnh. Các đơn vị phụ tạo nên protein được gọi là amino axit. Amino axit gắn chặt với nhau bởi liên kết peptit, hình thành nên một chuỗi nhỏ (peptit) hoặc một phân tử lớn (polypeptit).

VSV có thể thủy phân peptit hoặc polypeptit để giải phóng ra các amino axit. Chúng sử dụng các amino axit là nguồn cacbon và năng lượng khi hydratcacbon không có sẵn. Tuy nhiên, amino axit được sử dụng trước tiên trong các phản ứng đồng hoá.

Các phân tử protein lớn như gelatin, được thủy phân bởi enzym ngoại bào và các sản phẩm nhỏ hơn của sự thủy phân được chuyển vận vào trong tế bào. Sự thủy phân gelatin có thể được chứng minh bằng sự sinh trưởng của vi khuẩn trong dinh dưỡng gelatin. Dinh dưỡng gelatin được làm tan trong nước ấm (50°C), đông lại (tạo gel) khi được làm lạnh dưới 25°C và hoá lỏng (tạo sol) khi gia nhiệt đến khoảng 25°C. Khi một enzym ngoại bào thủy phân gelatin sẽ làm hoá lỏng và không đông lại được thậm chí khi được làm nguội dưới 20°C.

Một số vi khuẩn có thể thủy phân protein trong sữa được gọi là casein. Sự thủy phân casein có thể được xác định trong sữa có giấy quỳ. Sữa giấy quỳ chứa đục vẩn sữa và chỉ thị giấy quỳ. Môi trường bị mờ đục, do casein ở dạng keo huyền phù và giấy quỳ có màu xanh. Sau khi pepton hoá (sự thủy phân các protein sữa), môi trường trở nên trong là kết quả của sự thủy phân casein thành các amino axit hoà tan và các mảnh peptit. Kết quả của sự dị hoá các amino axit sẽ tạo ra một phản ứng alkan (màu tím). Sữa giấy quỳ cũng được sử dụng để xác định quá trình lên men lactoza, trong đó giấy quỳ chuyển màu hồng trong sự có mặt của axit. Lượng axit thừa sẽ gây ra sự hoá đông (sự hình thành sữa đông) sữa. Thêm vào đó, một số vi khuẩn có thể làm biến đổi giấy quỳ làm cho chỉ thị giấy quỳ trở thành màu trắng ở dưới đáy của ống nghiệm.

Ure là một sản phẩm loại thải khó tiêu hoá protein trong hầu hết các động vật có xương sống và được bài tiết ở dạng urin. Sự có mặt của enzym ureaza (giải phóng  $\text{NH}_3$  từ ure) là một thử nghiệm chẩn đoán để xác định vi khuẩn. Thạch-ure chứa pepton, glucoza, ure và đỏ phenol. pH của môi trường chuẩn bị là 6,8 (đỏ phenol chuyển thành vàng). Trong khi nuôi cấy, vi khuẩn chuyển hoá ure sẽ sinh ra  $\text{NH}_3$  làm tăng pH của môi trường, chuyển màu chỉ thị fuchine (hồng đậm) ở pH 8,4.

Chúng ta có thể khảo sát hoạt động của vi khuẩn trên dinh dưỡng gelatin, sữa giấy quỳ và thạch-ure trong bài tập này.

## 2.1. Vật liệu

ống nghiệm chứa dinh dưỡng gelatin.

ống nghiệm chứa sữa giấy quỳ

ống nghiệm thạch nghiêng chứa thạch -ure

## 2.2. Dịch nuôi cấy

*Pseudomonas aeruginosa*

*Proteus vulgaris*

## 2.3. Thủ tục, kỹ thuật yêu cầu

a. Dán nhãn mỗi môi trường 1 ống nghiệm là *Pseudomonas* và 1 ống khác là *Proteus*.

b. Sự thủy phân gelatin. Xác định dinh dưỡng gelatin, ở dạng rắn hay lỏng? Nhiệt độ của phòng thí nghiệm là bao nhiêu? Nếu gelatin ở dạng rắn cần phải làm hoá lỏng. Sau đó lại làm hoá đông.

- Sử dụng que cấy thẳng nhiễm vào một ống nghiệm *Pseudomonas* và một ống khác là *Proteus*.

- Nuôi ở nhiệt độ phòng và ghi lại sự quan sát ở 2-4 ngày và 4-7 ngày. Không lắc mạnh ống nghiệm khi gelatin ở dạng lỏng.

- Nếu gelatin đã hoá lỏng, đặt ống nghiệm trong một cái cốc đá nghiền vài phút. Ghi lại kết quả chỉ rõ sự hoá lỏng hoặc sự thủy phân bằng dấu (+).

c. Sữa giấy quỳ. Miêu tả sự xuất hiện của sữa giấy quỳ.

- Nhiễm *Pseudomonas* vào một ống môi trường, *Proteus* vào một ống môi trường khác.

- Nuôi ở 35°C trong 24-48h và ghi lại kết quả. Giấy quỳ có màu hồng trong điều kiện có axit, màu tím trong điều kiện kiềm và màu trắng khi bị biến đổi. So sánh kết quả với những ống sữa giấy quỳ không nhiễm VSV.

d. Test thử ure

- Nhiễm *Pseudomonas* vào một ống môi trường thạch nghiêng ure-agar và *Proteus* vào ống khác.

- Nuôi ở 35°C trong 24-48h. Ghi lại kết quả: (+) cho sự có mặt của ureaza (màu đỏ) và (-) cho các ống không có ureaza.

- Sử dụng đồ phenol và fuschine để xác định pH môi trường sau nuôi cấy chứng tỏ hoạt động của vi khuẩn có khả năng chuyển hoá ure.

**\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 10**

1. Trữ bày cốc tiệt trùng để xác định nhanh khả năng chuyển hóa các hợp chất của VSV?

2. Các loại thuốc thử, cốc test cho từng loại cơ chất mà VSV chuyển hóa?

## **Bài số 11**

### **VI SINH VẬT TRONG MÔI TRƯỜNG**

**Mục đích yêu cầu:**

+ Thấy được sự đa dạng của VSV trong môi trường.

+ Hiểu được vai trò của VSV trong các môi trường khác nhau.

**Nội dung kiến tập:**

+ Miêu tả hình thái khuẩn lạc VSV sử dụng các thuật ngữ diễn tả được chấp nhận.

+ So sánh sự sinh trưởng của VSV trên môi trường đặc và môi trường lỏng.

#### **1. Quan hệ giữa vi sinh vật và môi trường**

Vi sinh vật có mặt ở khắp mọi nơi, chúng được tìm thấy trong nước chúng ta uống, trong không khí chúng ta thở và trên mặt đất chúng ta bước đi. Chúng sống trong và trên cơ thể chúng ta. VSV sống ở mọi góc ngách của hệ sinh thái, trên tất cả các dạng của cuộc sống và trong hầu hết môi trường. Trong đa số trường hợp, VSV tồn tại ở khắp mọi nơi là không độc hại. Tuy nhiên, trong nghiên cứu VSV, công việc phải được tiến hành hết sức cẩn thận để tránh nhiễm bẩn môi trường vô trùng và nguyên vật liệu bởi các VSV này.

Vi sinh vật luôn hiện diện trong môi trường sống của chúng ta. Tuy nhiên, sự có mặt một số loại vi sinh vật trong các nơi nào đó chẳng hạn trong nước hoặc thực phẩm có thể là không mong muốn. Người ta sử dụng các VSV gây bệnh để xác định sự ô nhiễm nước. Sự có mặt và số lượng vi khuẩn trong thực phẩm có thể biểu thị thực phẩm đó đã bị tạp nhiễm trong quá trình sản xuất, các vi khuẩn này có thể đưa đến kết quả là làm hư hỏng thức ăn, gây ngộ độc cho người sử dụng.

Các phương pháp thử để xác định chất lượng vi sinh vật học của nước đã được phát triển để ngăn chặn sự chuyển giao của nước chứa VSV gây bệnh từ nguồn phân. Tuy nhiên, việc nhìn thấy các VSV gây bệnh trong nguồn nước cung cấp là không thực tế bởi vì các mầm bệnh xảy ra ở số lượng nhỏ nên chúng có thể không gặp được ở trong mẫu. Hơn nữa, khi các bệnh được xác định thì thường là quá muộn để ngăn chặn sự xuất hiện của bệnh tật. Vì thế, sự có mặt của các VSV chỉ thị được sử dụng để xác định sự nhiễm bẩn phân của nước.

Bệnh tật và ngộ độc thức ăn là kết quả của sự sinh trưởng của VSV trong thực phẩm. Kiểm soát sự an toàn, chất lượng của thực phẩm cần được quan tâm với các test kiểm tra sự có mặt các VSV gây bệnh trong thực phẩm. Trong quá trình sản xuất (nghiên, rửa và đóng gói), thực phẩm có thể bị nhiễm bẩn các VSV từ đất và động vật, người sản xuất hoặc máy móc.

Các vi sinh vật có hại chỉ là một phần nhỏ trong toàn bộ quần thể VSV. Hoạt động của hầu hết các VSV là có lợi trong thực tế. Các hoạt động của VSV đất là tiềm năng để duy trì sự sống trên trái đất. Quá trình cố định nitơ phân tử được mô tả lần đầu tiên từ năm 1893 bởi Sergei Vinogradski, ông đã bước vào nghiên cứu các vòng tuần hoàn sinh hoá xảy ra trong đất bởi vì ông đã:

“Cảm kích vì những phát hiện rực rỡ không thể so sánh được của Pasteur. Tôi đã bắt đầu nghiên cứu tỉ mỉ vấn đề tuyệt hay của quá trình cố định nitơ không khí. Tôi đã thành công mà không gặp quá nhiều khó khăn trong việc phân lập một loại vi khuẩn kỵ khí hình que được gọi là *Clostridium* có thể thực hiện được chức năng này”.

Vinogradskii đặt tên vi sinh vật là *Clostridium pasteurianum* để tưởng nhớ Pasteur. Một số VSV khác lại có thể phân rã các chất ô nhiễm nguy hiểm trong môi trường.

Trong thí nghiệm này, chúng ta thử nuôi cấy một vài loại VSV. Môi trường nuôi cấy có thể được chuẩn bị ở vài dạng phụ thuộc vào mong muốn sử dụng. đĩa petri chứa môi trường dinh dưỡng đặc cung cấp một diện tích bề mặt lớn để đánh giá các khuẩn lạc. VSV sẽ được nhiễm hoặc cố ý đưa vào trên dinh dưỡng thạch hoặc dinh dưỡng canh thang. Các vi khuẩn được nhiễm vào môi trường nuôi cấy sẽ tăng số lượng trong giai đoạn nuôi cấy. Sau khi nuôi ở điều kiện phù hợp, môi trường lỏng trở nên vẩn đục do VSV sinh trưởng. Trên môi trường đặc, khuẩn lạc sẽ nhìn thấy được bằng mắt thường. Một khuẩn lạc là một tập hợp tế bào được phát sinh từ một tế bào VSV đơn dòng. Mặc dù nhiều loài

vi khuẩn có sự phát triển các khuẩn lạc hình thành tương tự nhau, mỗi khuẩn lạc xuất hiện khác nhau thường là một loài khác biệt.

## **2. Vật liệu, dụng cụ**

Đĩa petri chứa môi trường dinh dưỡng thạch  
ống nghiệm chứa môi trường dinh dưỡng canh thang  
ống nghiệm có nút bông vô trùng  
ống nghiệm có nước vô trùng

## **3. Thủ tục tiến hành**

### **3.1. Giai đoạn 1**

a. Thiết kế thí nghiệm của bạn. Mục đích là lấy mẫu từ môi trường và cơ thể bạn. Hãy sử dụng trí tưởng tượng của mình. Sau đây là một số gợi ý:

- Có thể sử dụng phòng thí nghiệm, phòng tắm hoặc bất kỳ nơi nào trong khu vực là môi trường tiến hành.

- Một đĩa petri có thể được mở trong không khí từ 30-60 phút.

- Nhiễm một đĩa từ 1 bề mặt môi trường chẳng hạn như sàn nhà hay ghế làm việc bằng một miếng gạc trong nước vô trùng, lau bề mặt môi trường sau đó lau lên bề mặt đĩa thạch.

Sau khi xử lý, miếng gạc nên được bỏ vào thùng có chất tẩy uế.

b. Nuôi 2 đĩa trên. Dùng 1 miếng gạc như miêu tả ở trên để xử lý 1 ống dinh dưỡng canh thang. Sau khi lau trên bề mặt đĩa thạch, đặt miếng gạc trong dinh dưỡng canh thang và để lại trong quá trình nuôi cấy.

c. Các đĩa và ống nghiệm nên nuôi ở nhiệt độ xấp xỉ như khi lấy mẫu môi trường.

d. Nhiễm 2 đĩa từ cơ thể bạn, bạn có thể:

- Đặt một sợi tóc trên mặt thạch

- Tiến hành xử lý bằng miếng gạc ẩm sau khi dùng lau một phần cơ thể (xem bước 1c).

- Chạm các ngón tay bạn vào đĩa thạch.

e. Nuôi VSV từ cơ thể bạn ở nhiệt độ như nhiệt độ cơ thể.

g. Đặt ngược các đĩa nuôi cấy để nước sẽ tụ lại trên nắp thay cho trên bề mặt môi trường thạch, tránh ảnh hưởng đến kết quả.

### **3.2. Giai đoạn 2**

a. Quan sát và miêu tả kết quả VSV sinh trưởng trên đĩa. Ghi chú mỗi loại khuẩn lạc khác nhau xuất hiện và mô tả hình thái khuẩn lạc, sử dụng các đặc trưng đưa ra ở hình bên. Xác định số lượng tương đối của các loại khuẩn lạc. Khi nhiều khuẩn lạc hiện diện, ghi lại những loại quá nhiều.

b. Miêu tả sự xuất hiện trong dinh dưỡng canh thang. Nó vẫn hay đục đồng đều? So sánh với ống không xử lý. Xem sự tạo thành các khối tế bào VSV

(gọi là kết bông). Có màng hay lớp màng xuất hiện ngang trên bề mặt môi trường? Nhìn xem liệu tế bào VSV có lắng xuống đáy ống nghiệm hình thành nên cặn hay không?

Có thể giữ lại các ống canh thang cho thí nghiệm khác.

\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 11

1 Trình bày mối quan hệ giữa VSV và môi trường?

2. Sự sai khác cơ bản theo quan sát bằng mắt thường trong từng các TN đơn giản để sơ bộ bước đầu đánh giá VSV chỉ thị môi trường?

## **Bài số 12**

### **PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH NẤM MEN, NẤM MỐC, NGUYÊN SINH ĐỘNG VẬT, TẢO VÀ VI KHUẨN LAM**

#### **Mục đích yêu cầu:**

+ Phân biệt được nấm men, nấm mốc, tảo, vi khuẩn lam và nguyên sinh động vật.

+ Hiểu rõ các đặc trưng phân loại của các nhóm VSV này.

#### **Nội dung kiến tập:**

+ Nuôi cấy và quan sát hình thái của nấm men, nấm mốc, tảo và nguyên sinh động vật

+ So sánh sự sai khác giữa các nhóm VSV trên.

+ Giải thích hiện tượng lưỡng hình ở nấm mốc.

#### **1. Nguyên lý chung**

Sinh vật thuộc nhóm Eukaryota bao gồm: tảo, nguyên sinh động vật, nấm và các động thực vật bậc cao. Tế bào Eukaryota có quy mô điển hình và cấu trúc phức tạp hơn tế bào Prokaryota. Hệ gen của một tế bào Eukaryota được bao bọc trong một màng nhân giới hạn. Hơn nữa, tế bào Eukaryota chứa màng bao bọc các cơ quan tử, có cấu trúc đặc biệt và thực hiện các chức năng đặc trưng.

Vi sinh vật nghiên cứu trong phần này là các loại dị dưỡng hoá năng sống tự do ngoại trừ tảo và vi khuẩn lam (các loài tự dưỡng quang năng).

Nấm men là những vi sinh vật được biết khá rõ. Chúng được sử dụng rộng rãi trong các quy trình thương mại và có thể mua được trong các siêu thị để nướng bánh. Nấm men là loại nấm đơn bào. Leeuwenhoek lần đầu tiên quan sát được nấm men trong quá trình lên men bia.



Nhiều loại tảo chỉ nhìn thấy được dưới kính hiển vi, trong khi những loại khác có thể dài vài mét. Tảo là “nhà” sản xuất oxy và thức ăn quan trọng cho động vật nguyên sinh và các sinh vật khác. Một vài loại tảo đơn bào, như tác nhân của “thủy triều đỏ” *Gonyaulax catanella* và các loài họ hàng lại độc cho động vật, kể cả con người khi ăn phải với lượng lớn.

Nguyên sinh động vật, bắt nguồn từ tên gọi “lớp mao trùng” được quan tâm nghiên cứu sớm. Từ năm 1778, Friedrich von Gleichen đã nghiên cứu thức ăn không bào bằng cách nuôi nhuộm đỏ các trùng mao.

## 2. Nấm men (Yeasts)

Nấm thuộc loại tế bào eukaryota và có thể tồn tại dưới dạng đơn hoặc đa bào. Chúng là loại dị dưỡng và lấy dinh dưỡng nhờ hấp thụ các vật chất hữu cơ hoà tan thông qua vách tế bào và màng nguyên sinh chất. Nấm (ngoại trừ nấm men) là VSV hiếu khí. Nấm men đơn bào, nấm mốc đa bào và các loài vi mô như nấm mũ thuộc giới nấm. Nấm thường ưa điều kiện axit, chịu áp suất cao và độ ẩm thấp hơn vi khuẩn. Chúng có kích thước tế bào và hình thái chi tiết lớn hơn vi khuẩn. Ngược lại với các đặc trưng của vi khuẩn, các đặc trưng cơ sở như chi tiết hình thái và tế bào được sử dụng để phân loại nấm, với sự tham dự chút ít của các đặc trưng thứ cấp như trao đổi chất và thành phần kháng nguyên. Nấm có cấu trúc phức tạp hơn vi khuẩn nhưng lại trao đổi chất thay đổi ít hơn.

Nấm men là loại nấm đơn bào, không có thể hình sợi, có dạng hình cầu hoặc ovan điển hình. Nấm men được phân bố rộng rãi trong tự nhiên, thường tìm thấy trên hoa quả và lá cây như lớp phủ ngoài dạng bột màu trắng. Nấm men sinh sản vô tính bằng nảy chồi, là quá trình trong đó một tế bào mới hình thành một u lồi (nảy chồi) từ tế bào mẹ. Trong nhiều trường hợp, các chồi không thể tự tách ra, một chuỗi ngắn các tế bào được gọi là dạng giả khuẩn ty. Khi nấm men sinh sản hữu tính, chúng có thể sinh ra một hoặc vài loại bào tử giới tính. Loại bào tử giới tính được sản xuất bởi một loài nấm men được sử dụng để phân loại như sự phân chia (ngành). Hoạt động trao đổi chất cũng được sử dụng để xác định các giống nấm men.

Nấm men là loại yếm khí không bắt buộc. Hoạt động trao đổi chất của chúng thường được sử dụng trong nhiều quá trình lên men công nghiệp. Nấm men thường được dùng để chuẩn bị nhiều loại thức ăn gồm có bánh mì, đồ uống như rượu vang và bia.

Trong phòng thí nghiệm, môi trường lựa chọn thạch Sabouraud thường được sử dụng để phân lập nấm men. Thạch Sabouraud có các chất dinh dưỡng đơn giản (glucoza và pepton) và pH thấp, hạn chế sự sinh trưởng của hầu hết các sinh vật khác. Rất nhiều kỹ thuật hữu ích với vi khuẩn có thể áp dụng với nấm men.

## **2.1. Vật liệu**

ống lên men glucoza

ống lên men saccharoza

Đĩa Petri chứa môi trường Sabouraud

Chai chứa môi trường cao nấm men -glucoza

Gạc bông khử trùng, lam kính, ống nghiệm, xanh methylen, bình cầu, hoa quả hoặc lá cây.

## **2.2. Dịch nuôi cấy**

Men bánh mì

*Rhodotorula rubra*

*Candida albicans*

*Saccharomyces cerevisiae*

## **2.3. Thủ tục tiến hành**

### **2.3.1. Nấm men**

a. Nhẹ nhàng hoà một ít men bánh mì trong một ít nước ấm trong ống nghiệm để tạo ra dung dịch trắng đục.

b. Mỗi cặp sinh viên sẽ sử dụng một loại dịch nuôi cấy nấm men và dịch men bánh mì

- Chia một đĩa môi trường Sabouraud thành hai nửa. Ria cấy dịch nấm men đã biết trên nửa môi trường và men bánh mì ở nửa còn lại.

- Nhiễm mỗi loại dịch VSV vào một ống lên men glucoza và một ống lên men saccharoza.

c. Nuôi tất cả các môi trường ở 35°C tới khi xuất hiện dấu hiệu sinh trưởng.

d. Nhỏ một giọt xanh methylen vào một ít mỗi loại dịch nuôi cấy. Ghi lại kết quả quan sát được.

e. Sau khi nấm men sinh trưởng, ghi lại kết quả. Kiểm tra dịch nấm men không nuôi cấy và xác định kết quả.

### **2.3.2. Phân lập nấm men**

a- Cắt hoa quả và lá cây thành các miếng nhỏ. Đặt chúng trong chai môi trường cao nấm men-glucoza. Đậy miệng chai bằng một quả bóng. Nuôi ở nhiệt độ phòng tới khi xuất hiện sự sinh trưởng. Ghi lại sự xuất hiện của cả hai loại mẫu sau khi nuôi cấy.

b- Chia đĩa môi trường Sabouraud thành 2 nửa. Mỗi loại mẫu nuôi cấy trên một nửa đĩa.

+ Lau bề mặt cái kéo cắt mẫu bằng miếng gạc vô trùng. Đặt miếng gạc trên nửa đĩa môi trường. Một số vi khuẩn sẽ mọc trên môi trường này.

+ Sử dụng que cấy vô trùng cấy rìa một vòng que cấy dịch chiết từ chai vừa chuẩn bị ở phần a.

c. Đặt đĩa cấy đảo ngược, nuôi ở nhiệt độ phòng cho tới khi sự sinh trưởng xuất hiện. Chuẩn bị dịch thử với xanh methylen từ các khuẩn lạc khác nhau. Ghi lại kết quả.

### **3. Nấm mốc (Molds)**

Các nấm đa bào dạng sợi được gọi là nấm mốc. Do sự đa dạng về hình thái nấm mốc nên hình dạng rất hữu ích để phân loại các nấm này. Một khuẩn lạc nấm mốc lớn (dạng vĩ mô) gọi là tản và được tạo thành từ một khối các sợi gọi là hệ sợi. Mỗi sợi là một sợi nấm với sợi sinh dưỡng phát triển trên bề mặt môi trường. Sợi lơ lửng trong không khí gọi là sợi sinh sản, có nguồn gốc từ sợi sinh dưỡng và sinh ra một loại bào tử sinh sản vô tính. Sợi của hầu hết các nấm mốc được tạo thành từ các tế bào phân tách do vách ngang hoặc vách ngăn. Các sợi này được gọi là sợi có vách ngăn. Một số nấm trong đó có *Rhizopus* có sợi không có vách ngăn và là một khối tế bào chất duy trì nhiều nhân. Chúng được gọi là sợi nấm đa nhân.

Nấm được đặc trưng và phân loại bởi sự xuất hiện khuẩn lạc (màu sắc, kích cỡ, vv...), tổ chức sợi (vách ngăn hay đa nhân), cấu trúc và tổ chức của bào tử sinh sản. Do tầm quan trọng của sự hình thành và tổ chức khuẩn lạc, các kỹ thuật nuôi cấy nấm mốc và kiểm tra kính hiển vi rất quan trọng.

Nấm, đặc biệt là nấm mốc rất quan trọng trong công nghiệp và phương diện lâm sàng. Các bào tử trong không khí cũng là nguồn tạp nhiễm phổ biến nhất trong phòng thí nghiệm. Môi trường Sabouraud là môi trường lựa chọn phổ biến để phân lập nấm.

Một số nấm bệnh có biểu hiện lưỡng hình, chúng có 2 dạng phát triển. ở nấm bệnh, sự lưỡng hình thường phụ thuộc vào nhiệt độ. Trong bài tập này, chúng ta sẽ xác định các nấm mốc khác nhau và chứng minh sự lưỡng hình. Sự lưỡng hình của *Mucor* không phụ thuộc vào nhiệt độ, nó sẽ biểu hiện ngược lại khi quyết định điều kiện vật lý nào đó ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của *Mucor*.

#### **3.1. Vật liệu**

##### **a. Nuôi cấy nấm mốc**

Đĩa Petri chứa môi trường Sabouraud

Môi trường Sabouraud nóng chảy

Dịch parafin (một nửa là dầu, một nửa là parafin)

Đĩa Petri, lamên, que gạt thủy tinh, pipet

##### **b. Sự biến đổi lưỡng hình**

Môi trường Sabouraud: 5ml nóng chảy ở 48°C

ống plastic 5ml hoặc cốc giấy nhỏ

Lưỡi dao lam, băng dính

### 3.2. Giống VSV

*Rhizopus, Aspergillus, Penicillium, Mucor*

### 3.3. Thủ tục tiến hành

#### 3.3.1. Giai đoạn 1

a. Làm nhiễm 1 đĩa thạch Sabouraud theo bất cứ cách nào bạn muốn. Để mở đĩa trong không khí (ngoài trời, ở hành lang, phòng thí nghiệm hoặc bất cứ nơi đâu) 15-30 phút. Nuôi ở nhiệt độ phòng từ 5-7 ngày.

b. Nhiễm vào 1 đĩa Sabouraud khác loại nấm mốc đã nuôi cấy. Tạo 1 đường ở trung tâm đĩa. Nuôi ở nhiệt độ phòng 5-7 ngày.

c. Thực hiện nuôi cấy trên lam kính loại nấm mốc đã chọn.

- Rửa sạch lam kính và làm khô

- Nhỏ 1 giọt môi trường thạch Sabouraud lên lam kính. Làm phẳng trên một phần lam và đợi đông lại.

- Dùng que cấy vô trùng cẩn thận nạo bỏ 1 nửa vòng thạch, để lại 1 mép thẳng.

- Lắc nhẹ dịch nấm mốc để tạo lại dịch huyền phù, và nhiễm 1 vòng que cấy trên mép thẳng môi trường thạch mới tạo ra.

- Đặt một lamên trên miếng thạch nhiễm nấm mốc.

- Dùng pipet và parafin nóng chảy để dán 3 mép còn lại. Không dán mép xử lý nấm mốc.

- Đặt 1 miếng khăn giấy ẩm ở dưới đáy của đĩa Petri. Đặt lam kính nuôi cấy trên que gạt thủy tinh ở phía trên khăn và đập đĩa petri lại. Nuôi cấy ở nhiệt độ phòng 2-5 ngày. Không đặt ngược đĩa.

- Quan sát sự biểu hiện của các bào tử vô tính trên lam nuôi cấy.

#### \* Sự thay đổi lưỡng hình

a. Gõ nhẹ ống nuôi cấy nấm mốc để tạo dạng huyền phù. Nhiễm 2 hoặc 3 vòng que cấy dịch *Mucor*. Trộn ống bằng cách lăn trong tay và nhanh chóng đổ toàn bộ vào một cốc rộng trước khi môi trường rắn lại. Cốc đong không cần phải khử trùng trước đó.

b. Đặt một miếng khăn giấy ẩm trong một cái cốc đong khác, lộn ngược lại trên cốc đựng thạch. Dán băng dính hoặc giấy parafin xung quanh mép 2 cốc.

c. Nuôi ở nhiệt độ phòng đến khi sự sinh trưởng xảy ra (5-7 ngày).

#### 3.3.2. Giai đoạn 2

a. Kiểm tra đĩa nuôi cấy mỗi loại nấm mốc, miêu tả sự xuất hiện và màu sắc của chúng. Sau đó kiểm tra dưới kính hiển vi, xem ở phía đỉnh và mặt bên dưới.

b. Kiểm tra sự làm nhiễm đĩa thạch Sabouraud và mô tả kết quả.

c. Kiểm tra lam nuôi cấy của mỗi loại nấm mốc dưới kính hiển vi. Ghi lại sự quan sát.

e. Để kiểm tra sự biến đổi lưỡng hình, bỏ băng dán và dùng dao lam cắt rời 2 cốc.

g. Dùng dao lam cắt một miếng mỏng lớp thạch xử lý theo chiều thẳng đứng. Cẩn thận đặt lên lam kính và đẩy lamên lên trên.

h. Quan sát dưới nguồn sáng mạnh và yếu. Xem tỉ mỉ miếng thạch từ phía đáy đến đỉnh, nhiều mặt phẳng thẳng góc sẽ hiện diện.

i. Loại bỏ phần thừa trong cốc và tẩy uế dụng cụ theo chỉ dẫn.

#### **4. Tảo (Algae) và vi khuẩn lam (Cyanobacter)**

Thuộc về sự quan tâm đầu tiên của các nhà vi sinh vật học là vi khuẩn lam. Vi khuẩn lam có tế bào tiền nhân và thuộc giới Monera, cùng với các vi khuẩn khác.

Tảo là tên gọi thông thường của nhóm sinh vật nhân thật có khả năng quang hợp nhưng chưa phân thân, rễ, lá. Tảo được đặt trong giới Protista. Tảo có thể tìm thấy trong đại dương, nước sạch, vỏ thực vật ẩm và đất. Tảo có thể là đơn bào, dạng sợi hay đa bào. Chúng có hình thái rất đa dạng từ tảo nâu hoặc tảo bẹ và tảo đỏ phơn phớt không lồ đến các khuẩn lạc tảo lam hình cầu. Tảo được phân loại dựa theo sắc tố, sản phẩm dự trữ, thành phần hoá học của thành tế bào và tiên mao.

Trong khi sự sinh trưởng của các loài quang năng có tiềm năng cung cấp oxy và thức ăn cho các loài sinh vật khác, một số tảo dạng sợi như *Spirogyra*, là một mối gây phiền toái cho con người bởi vì chúng cản trở quá trình lọc trong hệ thống nước. Các loài quang năng có thể được sử dụng để xác định chất lượng nước. Nước bị ô nhiễm chứa các dinh dưỡng thừa từ nước thải hoặc các nguồn khác có nhiều vi khuẩn lam và ít tảo cát hơn nước sạch. Hơn thế nữa, số lượng tế bào tảo cho biết chất lượng nước. Nếu có hơn 1000 tế bào tảo/ml biểu thị rằng sự thừa dinh dưỡng đang hiện diện.

##### **4.1. Vật liệu**

Mẫu nước hồ

A. Nuôi ở điều kiện sáng 4 tuần.

B. Nuôi trong điều kiện tối 4 tuần.

C. Thêm nitrat và photpho, nuôi trong điều kiện sáng 4 tuần.

D. Thêm sulphat đồng, nuôi trong điều kiện sáng 4 tuần.

##### **4.2. Thủ tục tiến hành**

a. Chuẩn bị tiêu bản giọt treo từ một mẫu nước hồ. Lấy giọt mẫu từ đáy của bình chứa.

b. Dùng vật kính khô kiểm tra tiêu bản ở độ phóng đại cao và thấp. Xác định sự có mặt của tảo và vi khuẩn lam trong nước hồ. Tham khảo màu sắc cho sự xác định. Vẽ hình các loại tảo mà bạn không thể xác định. Ghi lại mối liên quan giữa số lượng của mỗi loại tảo từ 4+(phong phú) tới + (chỉ thấy 1 đại diện).

c. Lặp lại sự quan sát và thu số liệu với các mẫu nước hồ còn lại.

## **5. Nguyên sinh động vật**

Nguyên sinh động vật là các sinh vật có nhân hoàn chỉnh đơn bào, thuộc giới Protista. Chúng được tìm thấy trong các khu vực có nguồn nước lớn. Nhiều loại nguyên sinh động vật sống trong đất và nước, và một số là khu hệ vi sinh vật bình thường của động vật. Một vài loài nguyên sinh động vật là động vật ký sinh.

Nguyên sinh động vật là các loài dị dưỡng hảo khí. Chúng sống nhờ vào ăn các vi sinh vật khác và các hạt vật chất nhỏ. Nguyên sinh động vật không có thành tế bào, một số (trùng roi và trùng lông mao) phía ngoài được bao bọc một lớp màng dày có tính đàn hồi gọi là lớp da mỏng. Tế bào có lớp da mỏng đòi hỏi cấu trúc đặc biệt để lấy thức ăn. Không bào co rút có thể xác định được trong một số mẫu. Sự làm đầy cơ quan tử này bằng nước sạch và sau đó ngược lại bài tiết nước từ trong tế bào, giúp cho sinh vật sống được trong môi trường có nồng độ chất hoà tan thấp.

Nguyên sinh động vật có thể phân loại trên cơ sở phương thức chuyển động của chúng. Trong thí nghiệm này, chúng ta sẽ xác định các thành viên sống tự do của hai ngành Protista. Ngành trùng mao gồm các nguyên sinh động vật di động bằng sử dụng chân giả hoặc tiên mao. Một số loài sử dụng cả 2 hình thức di chuyển này. Trùng amip di chuyển bởi kéo dài phần lõi ra của tế bào chất giống như các chân gọi là chân giả. Các chân giả bắt nguồn từ cuối tế bào, phần còn lại của tế bào dùng để phóng các chân giả về phía trước.

Các trùng roi có một tiên mao hoặc nhiều hơn. Mặc dù trùng roi là các loài dị dưỡng, các sinh vật sử dụng trong bài tập này là dị dưỡng không bắt buộc. Chúng phát triển nhờ quang hợp khi có ánh sáng và nhờ dị dưỡng trong điều kiện tối.

Các thành viên của ngành trùng mao có nhiều lông mao mọc từ tế bào. Trong một số trùng mao, lông mao xuất hiện thành các hàng trên toàn bộ bề mặt của tế bào. Trong các trùng mao sống gần với các bề mặt rắn, lông mao chỉ xuất hiện xung quanh đường rãnh miệng. Thức ăn được đưa vào đường rãnh miệng thông qua lỗ thở tế bào (miệng) và vào trong hầu, nơi không bào chứa thức ăn hình thành.

### **5.1. Vật liệu**

Methylxellulo 1,5%

Axit axetic 5%

Pipet

Tăm nhọn

### **5.2. Dịch nuôi cấy**

Amip, trùng mắt, Paramecium (trong dịch nấm men - congo đỏ)

### **5.3. Thủ tục tiến hành**



a. Chuẩn bị giọt treo Amip. Đặt 1 giọt lấy từ đáy canh trùng lên lam kính. Đặt 1 mép của lamén vào trong giọt nước và để cho chất lỏng chạy dọc theo lamén. Nhẹ nhàng đặt lamén trên giọt canh trùng. Quan sát sự di chuyển của amip, vẽ đường di chuyển. Vùng nào của tế bào chất có nhiều hạt nhỏ hơn: bên trong hay bên ngoài nguyên sinh chất?

b. Chuẩn bị giọt treo trùng mắt. Làm tương tự như trên và vẽ lại sự di chuyển của trùng mắt. Có thể nhìn thấy được màu đỏ ở trùng mắt (điểm mắt) hay không?

Cho 1 giọt axit axetic thấm qua lamén. Quan sát biểu hiện của trùng mắt.

c. Chuẩn bị giọt treo của trùng mao và quan sát sự di chuyển của nó.

d. Cho 1 giọt methylxellulo lên lam kính. Tạo 1 giọt treo canh thang trùng mao được nuôi trên dịch nấm men - congo đỏ. Trùng mao sẽ chuyển động chậm hơn trong methylxellulo nhớt dính. Quan sát trùng mao ăn các tế bào nấm men nhuộm đỏ. Congo đỏ là 1 chỉ thị pH. Khi không bào chứa thức ăn được làm đầy, chỉ thị sẽ chuyển thành màu xanh. Có phải do sản phẩm trao đổi chất sẽ tạo ra điều kiện axit trong không bào hay không?

Đếm số lượng các không bào xanh và đỏ trong một trùng mao. Vẽ hình 1 trùng mao và xác định các vị trí của không bào.

### **\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 12**

1 Trình bày những nguyên tắc cơ bản để sơ bộ nhận dạng nấm men, nấm mốc, Tảo, NSĐV trên môi trường nuôi cấy rắn, bán rắn?

2. Trình bày một số phương pháp thử nhanh để đánh giá sơ bộ từng nhóm VSV trong môi trường?

## Bài số 13

### QUÁ TRÌNH CHUYỂN HOÁ NITƠ DƯỚI TÁC DỤNG CỦA VSV (AMÔN HOÁ, PHẢN NITƠ RÁT HOÁ, CỐ ĐỊNH N<sub>2</sub>)

#### Mục đích và yêu cầu:

- + Hiểu rõ vòng tuần hoàn Nitơ trong đất, thấy được sự thay đổi hoá học xảy ra ở mỗi bước trong chu trình.
- + Giải thích được tầm quan trọng của vòng tuần hoàn Nitơ.
- + Phân biệt quá trình cố định Nitơ phân tử cộng sinh và tự do

#### Nội dung:

- Các phương pháp phân tích VSV trong quá trình chuyển hóa các hợp chất chứa nitơ trong môi trường
- Thực hành trực tiếp các thí nghiệm về quá trình chuyển hóa nitơ trong môi trường

#### Nguyên lý:

Tiến hành các test thử chứng minh sự có mặt của vi khuẩn amôn hoá, phản nitrat hoá và cố định nitơ phân tử cộng sinh trong đất.

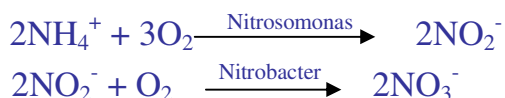
Vòng tuần hoàn Nitơ là một khía cạnh nghiên cứu rộng rãi và ứng dụng quan trọng của vi sinh vật đất. Tất cả các sinh vật đều cần Nitơ để tổng hợp protein, axit nucleic và các hợp chất chứa nitơ khác. Sự phục hồi nitơ bởi các sinh vật khác nhau được gọi là vòng tuần hoàn nitơ. Vi sinh vật đóng một vai trò cơ bản, không thể thay thế được trong vòng tuần hoàn nitơ do chúng tham gia rất nhiều phản ứng trao đổi chất khác nhau nhằm chuyển hoá các hợp chất chứa nitơ. Khi cây trồng, động vật và vi sinh vật chết đi, các vi sinh vật sẽ phân huỷ chúng bởi sự thủy phân protein và amôn hoá.

Thủy phân protein là sự thủy phân các protein thành dạng amino axit. Amôn hoá giải phóng amoniac do khử amin hoá các amino axit hoặc đồng hoá ure thành NH<sub>3</sub>. Trong hầu hết môi trường đất, amoniac hoà tan trong nước tạo thành ion amôn:



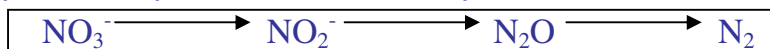
Một số ion amôn sẽ được cây trồng và vi sinh vật sử dụng trực tiếp để tổng hợp các axit amin.

Bước tiếp theo trong vòng tuần hoàn nitơ là sự oxy hoá các ion amôn trong quá trình nitrat hoá. Hai giống vi khuẩn có khả năng oxy hoá NH<sub>4</sub><sup>+</sup> trong hai giai đoạn liên tiếp được chỉ rõ như sau:



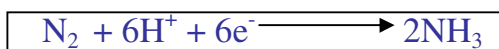
Những phản ứng này được sử dụng để sinh ra năng lượng (ATP) cho tế bào. Vi khuẩn nitrat hoá là các loài dị dưỡng hoá năng và nhiều loài bị ức chế bởi vật chất hữu cơ. Nitrat là một nguồn nitơ quan trọng cho cây trồng.

Vi khuẩn phản nitrat hoá chuyển hoá nitrat và loại bỏ chúng khỏi vòng tuần hoàn nitơ. Phản nitrat hoá là quá trình biến đổi nitrat thành nitrit và khí nitơ. Sự chuyển hoá này có thể được trình bày như sau:



Phản nitrat hoá còn được gọi là hô hấp yếm khí. Nhiều giống vi khuẩn gồm có *Pseudomonas* và *Bacillus* có khả năng phản nitrat hoá trong điều kiện yếm khí.

Nitơ không khí có thể quay trở lại đất bởi sự biến đổi khí nitơ thành amonia, một quá trình được gọi là sự cố định nitơ. Các tế bào vi sinh vật có enzym nitrogenaza có thể cố định nitơ trong điều kiện yếm khí như sau:



Một số sinh vật tiền nhân sống tự do, ví dụ như *Azotobacter*, *Clostridium* và vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ. Nhiều loại vi khuẩn cố định nitơ sống liên kết chặt với rễ các loại cỏ trong đất vùng rẫy, nơi mà lông hút tiếp xúc với đất.

Vi khuẩn cộng sinh cung cấp một vai trò quan trọng hơn trong quá trình cố định nitơ phân tử. Một điển hình là mối quan hệ cộng sinh giữa *Rhizobium* và rễ cây họ đậu (như đậu tương, đậu xanh, đậu Hà lan, cỏ Alfalfa và cỏ ba lá), có đến hàng nghìn loài đậu đỗ khác nhau. Nông dân đã trồng đậu tương và Alfalfa để tái tạo Nitơ trong các cánh đồng của họ. Nhiều loại đậu đỗ hoang dại có thể sinh trưởng trên những vùng đất nghèo dinh dưỡng tìm thấy ở rừng rậm nhiệt đới hoặc sa mạc khô cằn. Loài *Rhizobium* là đặc trưng cho từng loại cây chủ mà chúng nhiễm vào. Khi lông hút và vi khuẩn *Rhizobia* tiếp xúc trong đất, nốt sần rễ được hình thành trên cây chủ. Nốt sần cung cấp môi trường yếm khí cần thiết cho quá trình cố định nitơ.

Quá trình cố định nitơ phân tử cộng sinh cũng xảy ra trên rễ của các cây không thuộc họ đậu. Xạ khuẩn *Frankia* hình thành nốt sần trên cây tổng quán sủi.

Bất kỳ sự phá vỡ nào trong vòng tuần hoàn nitơ cũng có thể ảnh hưởng quyết định đến sự tồn tại của sự sống.

## 1. Quá trình amôn hoá

### 1.1. Vật liệu

ống môi trường canh thang pepton

Đất ẩm

Thuốc thử Nesler

NH<sub>4</sub>OH

Bản sứ lỗ tròn

### 1.2. Thủ tục tiến hành

- Hoà đất vào nước vô trùng tạo dung dịch. Lấy 1 vòng que cấy nhiễm vào ống môi trường canh thang pepton.

- Nuôi ở nhiệt độ phòng và làm test thử amonia ở sau 2 và 7 ngày.

- Test thử amonia: nhỏ 1 giọt dung dịch thuốc thử Nesler vào lỗ bản sứ. Thêm vào 1 vòng que cấy canh thang pepton đã cấy dịch đất, trộn đều. Màu vàng đến màu nâu chỉ ra rằng có amonia. So sánh kết quả với ô có nhỏ dung dịch thuốc thử với  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Sử dụng ống nghiệm canh thang pepton không nhiễm dịch đất làm đối chứng.

## **2. Quá trình phản nitrat**

### **2.1. Vật liệu**

Ống nghiệm chứa môi trường nước thịt - muối nitrat

Đất ẩm

Thuốc thử nitrat A và B

Bụi kẽm

### **2.2. Thủ tục tiến hành**

- Xử lý một ống môi trường nước thịt - muối nitrat bằng dung dịch đất như trên. Nhiễm vào ống khác *P. aeruginosa*.

- Nuôi cả 2 ống ở nhiệt độ phòng trong 1 tuần.

- Kiểm tra sự chuyển hoá nitrat. Thêm 5 giọt nitrat A và 5 giọt nitrat B vào mỗi ống nuôi cấy và ống không xử lý, lắc nhẹ. Màu đỏ xuất hiện trong vòng 30 giây là test thử dương tính. Nếu ống kiểm tra không chuyển màu đỏ, thêm 1 lượng nhỏ bụi kẽm, ống thử chuyển sang màu đỏ là test thử âm tính, nếu không chuyển màu thì đó cũng là kết quả dương tính.

## **3. Quá trình cố định nitơ phân tử**

### **3.1. Vật liệu**

Đĩa petri chứa môi trường thạch nấm men-manitol

Xanh methylen, dao lam, cây họ đậu

### **3.2. Thủ tục tiến hành**

- Cắt 1 nốt sần từ rễ cây đậu đỗ và rửa sạch dưới vòi nước chảy. Quan sát nốt sần.

- Cắt nốt sần thành 2 nửa bằng dao lam. Quan sát bên trong. Nghiền nốt sần giữa 2 lam kính và tạo vết bôi bằng cách quay 2 lam kính với nhau.

- Cấy ria 1 vòng que cấy dịch nghiền trên môi trường thạch. Nuôi ở nhiệt độ phòng khoảng 7 ngày.

- Làm khô trong không khí lam kính có vết bôi và cố định lại bằng nhiệt. Nhuộm tiêu bản trong 1 phút bằng xanh methylen. Rửa và quan sát dưới vật kính dầu.

- Quan sát sự sinh trưởng của vi khuẩn trên đĩa. Nhuộm đơn bằng xanh methylen. So sánh hình thái vi khuẩn trên tiêu bản với tiêu bản đã chuẩn bị sẵn từ nốt sần.

**\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 13**

- 1 Cơ chế của từng quá trình cố định, chuyển hóa nitơ?
2. Phương pháp lập lập, đánh giá hiệu quả của quá trình chuyển hóa nitơ dưới tác dụng của VSV?
3. Kết quả phân tích, tính toán hiệu quả của quá trình chuyển hóa nitơ dưới tác dụng của VSV?

## **Bài số 14**

### **CHUYỂN HOÁ LƯU HUỖNH DƯỚI TÁC DỤNG CỦA VI SINH VẬT**

**Mục đích và yêu cầu:**

- + Hiểu được vai trò của VSV trong việc đảm bảo vòng tuần hoàn lưu huỳnh.
- + Vẽ biểu đồ vòng tuần hoàn lưu huỳnh xảy ra trong cột Vinogradskii.

**Nội dung kiến tập:**

- + Quan sát sự sinh trưởng của vi khuẩn chuyển hoá lưu huỳnh trong cột Vinogradskii.

#### **1. Nguyên lý chung**

Một trong những hướng nghiên cứu vi sinh vật đất là vòng tuần hoàn lưu huỳnh. Vi khuẩn lam và màu tía tham gia vào vòng tuần hoàn sinh hoá lưu huỳnh. Mặc dù sắc tố quang hợp của vi khuẩn lam được quyết định bởi sắc tố vi khuẩn, chúng vẫn có thể xuất hiện màu nâu do sự có mặt thêm của sắc tố quang hợp màu đỏ gọi là carotenoid. Vi khuẩn quang hợp màu tía xuất hiện màu tía hoặc đỏ bởi vì có số lượng lớn carotenoid. Vi khuẩn màu tía cũng có sắc tố vi khuẩn.

Vi khuẩn quang hợp sử dụng sắc tố để sinh ra điện tử cho tổng hợp ATP và sử dụng lưu huỳnh, các hợp chất chứa lưu huỳnh, khí hydro hoặc các phân tử hữu cơ là nguồn cung cấp điện tử. Phương trình tổng quát cho quang hợp ở vi khuẩn là:



Một số vi khuẩn dự trữ các hạt lưu huỳnh trong hoặc trên tế bào như là kết quả của sự sản xuất ion sulfit. Lưu huỳnh dự trữ có thể được dùng làm nguồn

cung cấp điện tử trong quá trình quang hợp, kết quả là tạo ra sulphat. Trong tự nhiên, sunfit hydro được sinh ra từ sự biến đổi sulphat trong hô hấp yếm khí và sự phân rã các amino axit có chứa lưu huỳnh. Sunphat có thể bị biến đổi thành sunphit hydro bởi 5 giống vi khuẩn chuyển hoá sunphát (rõ nhất là *Desulfovibrio*). CO<sub>2</sub> mà vi khuẩn quang hợp sử dụng được cung cấp bởi quá trình lên men hydratcacbon trong môi trường yếm khí.

Kỹ thuật nuôi cấy làm giàu bao gồm phương thức tái tạo môi trường được gọi là cột Vinogradsky sẽ được dùng cho bài tập này. Chúng ta sẽ sử dụng nó để tăng cường sự sinh trưởng của vi khuẩn chuyển hoá lưu huỳnh trong điều kiện yếm khí. Một vài loại vi sinh vật được nuôi cấy phụ thuộc vào sự phản ứng với ánh sáng và oxy sẵn có của chúng.

## 2. Vật liệu

Hỗn hợp bùn (bùn, CaCO<sub>3</sub>, cỏ khô hay giấy và CaSO<sub>4</sub>)

ống nghiệm to hoặc ống đong

Que gạt

Bùn đất

Đệm Vinogradsky (NH<sub>4</sub>Cl, Na<sub>2</sub>S, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Giấy nhôm, nguồn sáng

## 3. Dịch nuôi cấy

*Pseudomonas aeruginosa*

## 4. Thủ tục tiến hành

a. Xếp chặt hỗn hợp bùn đến 2/3 chiều cao của một ống nghiệm lớn hoặc ống đong. Xếp chặt để hạn chế bọt khí trong ống.

b. Cẩn thận xếp một lớp mỏng bùn đất lên trên cùng của lớp hỗn hợp bùn đầu tiên.

c. Nhẹ nhàng đổ dung dịch đệm xuống cạnh của ống đong, chú ý không làm xáo trộn bề mặt bùn. Đổ đầy ống đong đến mức có thể.

d. Đậy miệng ống bằng giấy nhôm và đặt ở phía trước một nguồn sáng. Người hướng dẫn có thể ấn định các nguồn sáng khác nhau (ví dụ như ánh sáng nóng, huỳnh quang, đỏ hoặc xanh).

e. Quan sát ống thí nghiệm mỗi tuần một lần trong 4 tuần. Ghi lại sự xuất hiện các khu vực màu sắc. Bùn hảo khí sẽ có màu hơi nâu và bùn yếm khí có màu đen. (Hình...).

g. Sau 4 tuần, chuẩn bị tiêu bản giọt treo từ các vết xanh hoặc tím trong ống. Quan sát dưới kính hiển vi sự xuất hiện của vi khuẩn và xem có các hạt lưu huỳnh hay không?



\* Câu hỏi ôn tập: **Bài số 14**

- 1 Cơ chế của từng quá trình cố định, chuyển hóa lưu huỳnh?
2. Phương pháp lập lập, đánh giá hiệu quả của quá trình chuyển hóa lưu huỳnh dưới tác dụng của VSV?
3. Kết quả phân tích, tính toán hiệu quả của quá trình chuyển hóa S dưới tác dụng của VSV?

**Bài số 15**

**VI SINH VẬT PHÂN GIẢI LÂN (PHOSPHO)**

**Mục đích và yêu cầu:**

- + Phương pháp phân lập, tuyển chọn giống VSV phân huỷ chuyển hóa lân.
- + Thấy được tác dụng vi sinh vật trong quá trình phân giải Phospho khó tan.
- + Nhận biết được cường độ phân giải lân dưới tác dụng của VSV.

**Nội dung kiến tập:**

- + Phân lập chủng giống VSV phân giải lân.
- + Phương pháp bố trí thí nghiệm.

**1. Vi khuẩn phân giải lân hữu cơ**

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

***1.1. Môi trường phân lập***

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

Lân hữu cơ có thể dùng Loxitin hoặc axit nucleic.

***1.2 Dụng cụ nguyên liệu***

- ống nghiệm có 9ml nước vô trùng
- ống hút 1ml và 10ml
- Hộp lồng đã tiệt trùng
- ống nghiệm có thạch nghiêng

### 1.3 Các bước thực hiện

Cân đất 10g. Cho vào bình tam giác có 90ml nước vô trùng. Lắc 10 phút. Pha loãng mẫu  $10^{-2}$  -  $10^{-5}$ . Trong điều kiện không có axit nucleic hoặc loxitin thì dùng lồng đỏ trứng gà. Dùng dung dịch NaClO 2% tiệt trùng trứng. Dùng nước cất rồi nước vô trùng rửa sạch NaClO. Luộc trứng. Lấy lòng đỏ nghiền nhỏ. Ngâm cón gạn nước cón. Làm như thế nhiều lần. Lọc. Dùng axêton kết tủa. Dùng rượu và axêton để hoà tan và kết tủa. Cuối cùng dùng rượu hoà tan như thế có thể dùng được.

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

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

### 1.4. Kiểm tra kết quả

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

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

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

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

## 2. Vi sinh vật phân giải lân vô cơ khó tan

### 2.1 Môi trường

|                                   |      |  |        |
|-----------------------------------|------|--|--------|
| Saccarô                           | 10g  | MnSO <sub>4</sub>  | 0.03g  |
| (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> | 0.5g | Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> . 7 H <sub>2</sub> O | 0.03g  |
| NaCl                              | 0.3g | Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>                      | 10g    |
| KCl                               | 0,3g | Thạch  | 20g    |
| MgSO <sub>4</sub>                 | 0,3g | Nước cất   | 1000ml |

## 2.2 Dụng cụ và nguyên liệu

Bình tam giác

Hộp lồng

ống nghiệm

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dung dịch

HCl đậm đặc và 0,1N

Bình định mức 50cc

Dung dịch đất pha loãng

Bèo dậu

## 2.3. Các bước

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

## 2.4. Đánh giá kết quả

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

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

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

Để phân lập vi khuẩn phân giải hợp chất lân vô cơ khó tan thành dễ tan có thể dùng bèo dậu. ở cánh bèo dậu và rễ điền thanh có nhiều vi khuẩn phân giải lân khó tan thành dễ tan.

Lấy cánh bèo dậu. Rửa qua nước máy cho sạch, nghiền nhỏ trong một ít nước vô trùng để tạo thành dung dịch. Lấy dịch bèo dậu cấy trên môi trường thạch phẳng. Để ở 28 - 30<sup>0</sup>C trong 5 - 7 ngày, quan sát khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi.

### Chú ý:

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

**\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 15**

1. Cơ chế của từng quá trình cố định, chuyển hóa phospho dưới tác dụng của VSV?
2. Phương pháp lập lập, đánh giá hiệu quả của quá trình chuyển hóa phospho dưới tác dụng của VSV?
3. Kết quả phân tích, tính toán hiệu quả của quá trình chuyển hóa phospho dưới tác dụng của VSV?

## Bài số 16

### ENZYM TRONG TRAO ĐỔI NITƠ, CACBON, PHOTPHO VÀ LƯU HUỖNH

#### **Mục đích:**

- Giới thiệu cho học viên về khả năng sinh enzym của các chủng giống vi sinh vật
- Biết cách xác định enzym của một số giống vi sinh vật thường gặp

#### **Nội dung:**

- Hướng dẫn cho học viên các phương pháp xác định enzym hay hoạt tính của VSV
- Nắm chắc được một số phương pháp xác định hoạt tính sinh enzym của VSV

#### **I. ENZYM TRONG TRAO ĐỔI NITƠ (Nitrat reductaza)**

Protein là thành phần quan trọng của cả hạt và rễ cây trồng. Chúng là thành phần chức năng và cấu trúc cơ bản của thành tế bào cây và chiếm 1/3 nito tổng số trong đất. Protein cung cấp cho đất lấy từ tất cả xác các sinh vật, động thực vật. Protein trong đất được phân huỷ nhanh chóng nhờ nhiều loại vi khuẩn và nấm. Trong quá trình phân giải, proteaza ngoại bào thực hiện việc cắt đứt các liên kết peptit để tạo ra các polypeptit và oligopeptit, kết quả là sau đó giải phóng ra các hợp chất có phân tử lượng thấp và được tích lũy bởi VSV. Nhờ vào proteaza được giải phóng từ các tế bào VSV, các enzym trong đất này được hấp thụ vào các keo đất hoặc gắn hoá trị vào vật chất hữu cơ đất. Các enzym cố định này chỉ rõ khả năng đề kháng cao đối với sự phân giải protein. Ngược lại, proteaza bị ức chế bởi sự làm khô.

Nhiều phương pháp đã được sử dụng để phân tích hoạt động của proteaza, ureaza, amidaza,... ở trong đất. Mặc dù nhiều loại enzym tham gia vào trao đổi nito đã được xác định, vẫn có ít thông tin về nitrat reductaza. Trong điều kiện yếm khí, nitrat được biến đổi thành  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$ . Trong quá trình phản nitrat hoá, men dị hoá nitrat reductaza xúc tác giai đoạn đầu tiên biến đổi  $\text{NO}_3^-$  thành  $\text{NO}_2^-$  trong điều kiện yếm khí. Nghiên cứu của Cooper và Smith (1963) đã chỉ rõ rằng tỉ lệ giới hạn quá trình phản nitrat hoá trong đất axit là sự biến đổi  $\text{NO}_3^-$ , trong đất kiềm là sự biến đổi  $\text{NO}_2^-$ . Trong bài tập này, một phương pháp chính xác, đơn giản và nhạy được sử dụng để xác định nitrat reductaza trong đất (theo Abdelmagid và Tabatabai).

Dùng  $\text{KNO}_3$  là chất nền, mẫu đất được nuôi ở  $25^\circ\text{C}$  trong 24h dưới điều kiện ẩm trong ống nghiệm. Nitrit reductaza bị ức chế do thêm vào 2,4 dinitrophenol. Sau khi nuôi cấy, nitrit giải phóng ra được chiết xuất bằng dung dịch KCl và xác định bằng máy so màu ở bước sóng 520 nm.

#### **1. Vật liệu, hoá chất**

- ống nghiệm 180x18mm.

- 2,4 dinitrophenol 0,9 mM (166,6 mg/l)
- Dung dịch chất nền: KNO<sub>3</sub> 25mM (2,53g/l)
- KCl 4M (298,24g/l)
- Đệm NH<sub>4</sub>Cl 0,19M, pH=8,5 (10g/900ml, điều chỉnh pH bằng KOH 8,5%, lên thể tích đến 1000ml)
- Thuốc thử màu: Hoà 2g sunphanil amin và 0,1 g N-(1-naphthyl)-etylendiamin hydroclorit trong 150 ml nước cất, thêm 20 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> đặc, làm nguội ở nhiệt độ phòng và pha loãng đến 200 ml nước cất trong bình định mức. Dung dịch không màu và chỉ dùng trong ngày.
- Dung dịch tiêu chuẩn mệ: NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 1000àg/ml (4,9257g NaNO<sub>2</sub>/l), giữ ở 4°C
- Dung dịch đo chuẩn (NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 10àg/ml) : pha loãng dung dịch mệ (5ml/500ml)
- Dây hiệu giá chuẩn: 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1 àg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/ml . Pha cho mỗi lần đo.

## 2. Thủ tục tiến hành

- Cân 5g đất ẩm vào 5 ống nghiệm. Dùng pipet thêm 4ml dung dịch 2-4 DNP, 1ml dịch nền, trộn nhanh rồi đậy nắp lại.
- Ủ 2 ống ở 25°C/24h và 1 ống ở -20°C/24h (ống đối chứng), sau khi ủ làm tan ở nhiệt độ phòng.
- Thêm 10ml KCl vào cả 2 mẫu và đối chứng, lắc nhẹ rồi lọc ngay.
- Để so màu cho 5ml dịch lọc, 3ml đệm NH<sub>4</sub>Cl và 2ml thuốc thử màu vào ống nghiệm, trộn đều và để đứng 15 phút ở nhiệt độ phòng.
- Đo mẫu và đối chứng ở 520nm dựa vào phản ứng đối chứng trắng. So sánh với đường cong hiệu chỉnh chuẩn (xử lý 5ml dây hiệu chỉnh chuẩn giống như dịch lọc).

## 3. Tính kết quả

Tính lượng àg N của dung dịch thử từ đường cong chuẩn

$$\frac{(S-C).20.100}{5.5. \% \text{ dm}} = \mu\text{g N.g}^{-1} \text{ dm.2h}^{-1}$$

Trong đó:

- S: Giá trị mẫu (μg N)
- C: Đối chứng (μg N)
- 20: Lượng chiết xuất (ml)
- 5: ước số dịch lọc (ml)
- 5: Lượng mẫu ẩm ban đầu (g)
- 100.%<sup>-1</sup>dm: Hệ số cho đất khô

## II. ENZYM TRONG TRAO ĐỔI CACBON (CMXellulaza - CMCaza)

Xellulo, một hợp chất hữu cơ quan trọng nhất trong tự nhiên được quan tâm rất nhiều. Thực vật có chứa 4-70% xellulo. Sự phân giải xellulo bởi VSV sử dụng ít nhất 3 hệ thống enzym khác nhau (enzym nội bào  $\beta$ 1-4- glucanaza, enzym ngoại bào  $\beta$ 1-4- glucanaza,  $\beta$ 1-4- glucosidaza). Nấm (ví dụ *Chaetomium*, *Fusarium*, Polyporaceae, Poriaceae), vi khuẩn (*Pseudomonas*,...), xạ khuẩn (*Actinomycetes*...) là các loài hảo khí phân giải xellulo quan trọng nhất. Trong điều kiện yếm khí, xelluloza bị thủy phân bởi vi khuẩn thuộc giống *Clostridium*. Sự phân giải của xelluloza ngoại bào kết thúc với xellobioza.

Trong enzym đất, việc xác định hoạt động của xellulaza từ xellulo tự nhiên không hoà tan trong nước là rất khó. Cacboxy methyl xelluloza (CM-xelluloza) xử lý trước đó vì thế thường được sử dụng. Giống như xác định hoạt tính của xylanaza và invertaza, hoạt tính xellulaza được xác định từ các đường được giải phóng.

Sử dụng CM-xelluloza là chất nền, mẫu đất được ủ ở 50°C/24h và pH=5,5. Việc giảm lượng đường được giải phóng ra trong quá trình ủ gây ra sự biến đổi Kali hexacyanoferrate (III) trong dung dịch kiềm. Kali hexacyanoferrate (II) phản ứng với ferric  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  trong dung dịch axit tạo thành phức hợp feric hexacyanoferrate (II) (phổ màu xanh) được xác định bằng máy so màu (theo Schinner và von Mersi, 1990).

### 1. Vật liệu, hoá chất

- Đệm axetat 2M, pH=5,5: Hoà tan 164,06g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  khan/l, pha loãng 60ml axit axetic đóng băng trong 500 ml. Trộn 1000 ml  $\text{CH}_3\text{COONa}$  với 190ml axit axetic pha loãng, điều chỉnh đến pH = 5,5.

- Dung dịch nền (0,7% theo khối lượng): 7g CMC-Na/1000ml đệm axetat, khuấy trên máy khuấy từ ở 45°C/2h.

- Thuốc thử A: 16g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  và 0,9g KCN/1000ml.

- Thuốc thử B: 0,5g Kali hexacyanoferrate (III)/1000ml, giữ trong lọ tối màu.

- Thuốc thử C: 1,5g ferric amonium sulfat + 1g Natri dodecyl sulfat trong 900ml nước cất, thêm 4,2ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đặc, hoà tan ở 50°C. Sau khi làm nguội, lên thể tích đến 1000 ml.

- Dung dịch tiêu chuẩn đậm đặc (250 ãg glucoza/ml): 0,25g glucoza khan/1000ml

- Dung dịch tiêu chuẩn làm việc (25 ãg glucoza/ml): 10 ml dung dịch tiêu chuẩn mẹ/100 ml.

### 2. Thủ tục tiến hành

- Cân 10g đất ẩm vào 3 bình nón 100ml. Thêm 15ml dung dịch chất nền và 15 ml đệm axetat vào 2 bình (mẫu), cho 15ml đệm axetat vào bình còn lại (đối chứng). Lắc nhẹ các bình, đánh dấu, đậy nút và ủ ở 50°C/24h.



- Sau khi ủ, nhỏ 15ml huyền dịch chất nền vào bình đối chứng, lắc nhẹ, lọc các bình mẫu và đối chứng ngay. Pha loãng 0,5ml dịch lọc tới 20ml trong ống nghiệm.

- Để so màu, nhỏ 1ml dịch nền, 1ml thuốc thử A và 1ml thuốc thử B vào ống nghiệm, đánh dấu, trộn đều và ủ 15 phút trong chậu nước sôi.

- Sau khi làm nguội trong chậu nước ở nhiệt độ phòng 5 phút, thêm 5ml thuốc thử C, trộn và để lắng 60 phút ở nhiệt độ phòng cho phát triển màu. Trong vòng sau 30 phút, đo ở 690 nm trên máy quang phổ hấp phụ dựa vào phản ứng đối chứng trắng.

- Để chuẩn bị đường cong hiệu giá chuẩn, hút 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 và 0,6 ml dung dịch làm việc tiêu chuẩn vào 7 ống thử và pha loãng đến 1ml bằng nước cất. Xử lý các dung dịch này giống như lọc đất. Các dung dịch chuẩn hiệu chỉnh chứa 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5 và 15 ãg glucoza.

### 3. Tính kết quả

Hoạt tính CM-xellulaza được chỉ ra là tương đương ãg glucoza trên 1g vật chất khô và thời gian ủ. Lượng glucoza được tính từ đường cong chuẩn.

$$\frac{(S-C).30.40.100}{10.\% \text{ dm}} = \mu\text{g GE.g}^{-1} \text{ dm.24h}^{-1}$$

|                         |                                     |
|-------------------------|-------------------------------------|
| S:                      | Giá trị đo mẫu ( $\mu\text{g GE}$ ) |
| C:                      | Đối chứng ( $\mu\text{g GE}$ )      |
| 30:                     | Lượng hỗn hợp ủ (ml)                |
| 40:                     | Hệ số pha loãng dịch lọc (ml)       |
| 10:                     | Lượng đất ban đầu (g)               |
| $100\%^{-1}\text{dm}$ : | Hệ số đất khô                       |

### III. ENZYM TRONG TRAO ĐỔI PHOTPHO

Tầm quan trọng của photphataza đối với dinh dưỡng của cây trồng đã được nhấn mạnh nhiều lần (Cosgrove 1967, Hayman 1975, Speir 1978, Dick và Tabatabai 1987,...). Trong hầu hết các loại đất, sự phân chia photpho hữu cơ cao hơn photpho vô cơ. Trong các este của axit photpho hữu cơ, sự phân chia lớn nhất ở trong đất là axit phytanic hoặc phytin. Photpho được hấp thụ bởi cây trồng đòi hỏi sự khoáng hoá photpho hữu cơ bởi men photphataza thành photphat mạch thẳng. Photphataza bao gồm các enzym được sinh ra nhiều trong điều kiện lân dễ tiêu thấp. Photphataza được bài tiết ra từ rễ cây trồng và VSV. Photphataza của VSV trội hơn ở trong đất.

Tên photphataza miêu tả một nhóm enzym thuỷ phân este cũng như andehit của axit photphoric. Có nhiều loại photphataza ở trong đất.

Để xác định hoạt tính photphataza, có thể sử dụng hoặc photphat được sinh ra trong quá trình khoáng hoá các este photphat hữu cơ tự nhiên hoặc các

thành phần hữu cơ sau khi khoáng hoá các vật chất hữu cơ nhân tạo (ví dụ  $\beta$ naphtylphotphat, phenylphotphat,...)

Enzym photphomonoesteraza (còn gọi là photphataza) khác nhau trong các cơ chất đặc trưng và pH tối thích của nó. Vì vậy, một trong những sự khác biệt là giữa photphataza kiềm và axit trong đất. Photphodiesteraza phân huỷ các axit nucleic và được tìm thấy ở trong cây trồng, động vật và vi sinh vật. Hoạt động của Photphotriesteraza chỉ mới được phát hiện năm 1976, nhưng chưa được quan tâm nhiều. Hoạt động của polyphophataza được quan tâm đặc biệt khi được ngưng tụ, photphat vô cơ được sử dụng như phân bón cung cấp lân.

Sau khi thêm vào dung dịch phenylphotphat (muối Natri), mẫu đất được ủ ở 37°C/3h. Phenol được giải phóng chuyển màu với 2,6 dibromchinone clorit và được xác định ở bước sóng 614nm (theo phương pháp cải tiến từ phương pháp của Hoffmann, 1986).

### 1. Vật liệu, hoá chất

- Dung dịch nền 0,1 M: 27g Natri phenyl photphat/1000ml nước cất
- Đệm axetat (pH=5):
  - + Dung dịch 1: 60ml axit axetic đóng băng/1000ml nước cất
  - + Dung dịch 2: 136g Natri axetat/1000ml nước cất
- Trộn dung dịch 1 và 2 theo tỉ lệ 1:2 và điều chỉnh pH đến 5
- Đệm xitrat (pH=7): 300g trinatri xitrat/1000 ml, điều chỉnh pH bằng HCl
- Đệm boric (pH=10): 12,4 g  $H_3BO_3$ /100ml NaOH 1M, lên thể tích 1000ml.
- Thuốc thử màu: 200mg 2,6 dibromchinone clorit/100ml etanol (60%v/v)
- Dung dịch chuẩn mẹ (1mg phenol/ml): 1g phenol/1000ml, giữ trong lọ màu.
- Dung dịch chuẩn làm việc (10 $\mu$ g phenol/ml): pha loãng 10ml dịch mẹ/1000ml
- Dãy dung dịch chuẩn hiệu giá: Hút 0; 5;10; 15 và 20 ml dung dịch chuẩn (10 $\mu$ g phenol/ml) vào 5 bình nón 100ml, thêm 5ml dung dịch đệm mong muốn, 1ml thuốc thử màu và 25ml nước cất. Sau 30 phút, lên thể tích với nước cất, trộn đều. Dãy chuẩn chứa 0,50, 100, 150 và 200  $\mu$ g phenol.

### 2. Thủ tục tiến hành

- Cho 5g đất ẩm vào 4 bình nón 50ml, hút vào 10ml đệm axetat, citrat hoặc boric vào mỗi bình.
- Thêm 5ml dung dịch chất nền vào 3 bình (mẫu), lấy 5ml cho vào bình còn lại (đối chứng), lắc nhẹ, đập nút và ủ ở 37°C/3h.
- Sau khi ủ, lên thể tích, lắc đều và lọc vào các ống nghiệm.
- Hút 2 ml dịch lọc (phụ thuộc vào hoạt tính của đất, lượng dịch lọc có thể thay đổi từ 1-4ml) vào bình định mức 100ml chứa 5ml đệm boric. Thêm 1ml thuốc thử màu và 25ml nước cất, trộn đều và để yên 30 phút. Dãy hiệu giá chuẩn cũng được xử lý tương tự.

Sau đó, lên thể tích và trộn đều. Đo mật độ màu của dãy chuẩn, mẫu và đối chứng trên máy quang phổ hấp phụ ở 614nm dựa vào phản ứng đổi chứng trắng trong vòng 24h.

### 3. Tính kết quả

Hoạt tính photphataza được biểu thị là  $\mu\text{g}$  phenol trên 1g chất khô và thời gian ủ. Nồng độ phenol của mẫu và đối chứng được tính từ đường cong chuẩn.

$$\frac{(S-C).50.100}{\text{ml}.5.\% \text{ dm}} = \mu\text{g phenol.g}^{-1} \text{ dm.3h}^{-1}$$

S: Giá trị đo mẫu ( $\mu\text{g}$  phenol)  
 C: Đối chứng ( $\mu\text{g}$  phenol)  
 50: Lượng chiết xuất (ml)  
 ml: ước số dịch lọc (ml)  
 5: Lượng đất ban đầu (g)  
 100%<sup>-1</sup>dm: Hệ số đất khô

## IV. ENZYM TRONG TRAO ĐỔI LƯU HUỖNH

Sulphataza rất quan trọng cho sự khoáng hoá các hợp chất chứa lưu huỳnh trong đất. Chúng thủy phân các sulfat hữu cơ, và nhờ đó cung cấp lưu huỳnh dễ tiêu cho cây trồng. Sulphataza có nguồn gốc chủ yếu là từ vi sinh vật. Trong đất, chúng cũng xuất hiện các enzym ngoại bào có quan hệ chặt với các vật chất hữu cơ. Trong tự nhiên, nhiều loại sulphataza khác nhau có mặt: arylsulphataza, alkylsulphataza, steroidsulphataza, glucosulphataza,... Arylsulphataza là nhóm enzym được phát hiện sớm nhất và đã được điều tra nghiên cứu nhiều. Chúng xúc tác sự thủy phân anion arylsulphat phá vỡ liên kết O-S. Arylsulphataza trong đất được xác định lần đầu tiên bởi Tabatabai và Bremner (1970).

Dimetylsulphit (DMS) đóng một vai trò quan trọng trong vòng tuần hoàn lưu huỳnh và được sinh ra chủ yếu bởi vi sinh vật phù du ở biển. Các vật chất dễ biến đổi này bị oxy hoá quang năng trong khí quyển thành dimetylsulphoxit (DMSO). DMSO bị hoà tan trong nước và được chuyển đến các hệ sinh thái đất và nước thông qua sự kết lắng. Trong đất, vi sinh vật biến đổi DMSO thành DMS.NADH và DMS.NADPH được dùng để giám hoá trị trong các phản ứng trong tế bào.

Đến 95% VSV có thể chuyển hoá DMSO đã gợi ý cho việc dùng phản ứng này là một chỉ tiêu để đánh giá hoạt tính của VSV đất.

Để xác định hoạt tính của arylsulphataza, sau khi thêm dung dịch p-nitrophenylsulphat, mẫu đất được ủ ở 37°C trong 1h. Nitrophenol được giải phóng ra bởi hoạt động của arylsulphataza được chiết xuất và so màu với NaOH và xác định trên máy đo độ sáng (theo phương pháp cải tiến từ phương pháp của Tabatabai và Bremner, 1970).

## 1. Vật liệu, hoá chất

- Đệm axetat (0,5M; pH=5,8): 64g Natri axetat trihydrat/700ml, điều chỉnh pH tới 5,8 bằng khoảng 2ml axit axetic, lên thể tích 1000ml.
- Dung dịch nền (0,02M): 0,515g Kali-p-nitrophenylsulphat trong 100ml đệm axetat, dung dịch này chỉ dùng trong ngày.
- Dung dịch NaOH 0,5M: 20g NaOH/1000ml nước cất.
- Dung dịch tiêu chuẩn gốc (1mg p-nitrophenol/ml): 1g p-nitrophenol/1000ml, giữ ở 4°C.
- Dung dịch tiêu chuẩn (0,1mg p-nitrophenol/ml): 10ml dung dịch chuẩn gốc/100ml.
- Dây tiêu chuẩn hiệu giá: Hút 0; 1; 2; 3; 4 và 5 ml dung dịch tiêu chuẩn vào cốc đong, điều chỉnh đến 5ml bằng nước cất, thêm vào mỗi cốc 25 ml nước cất. Hút 6ml hỗn hợp này vào 6 ống nghiệm rồi thêm 4ml NaOH. Dây hiệu giá chuẩn có chứa 0; 20; 40; 60; 80 và 100 µg p-nitrophenol.

## 2. Thủ tục tiến hành

- Cân 1g đất ẩm cho vào bình định mức 50ml. Thêm 4ml đệm axetat và 1ml dung dịch chất nền vào 3 bình (mẫu), hút chỉ 4ml đệm axetat vào 2 bình còn lại (đối chứng). Lắc nhẹ rồi ủ các bình ở 37°C/1h.
- Sau khi ủ, cho thêm 25ml nước cất vào cả bình mẫu và đối chứng, hút thêm 1ml dịch chất nền vào bình đối chứng. Lắc nhẹ, lọc dung dịch mẫu và đối chứng ngay.
- Trộn 6ml dịch lọc với 4ml NaOH. Đo ở 420nm trên máy quang phổ hấp phụ dựa vào phản ứng đổi chứng trắng. Để có đường cong chuẩn, xử lý dãy tiêu chuẩn tương tự như dịch lọc mẫu.

## 3. Tính kết quả

Tính nồng độ p-nitrophenol (pNP) từ đường cong chuẩn

$$\frac{(S-C).30.100}{6.\% \text{ dm}} = \mu\text{g pNP.g}^{-1} \text{ dm.h}^{-1}$$

- S: Giá trị đo mẫu (µg phenol)  
C: Giá trị đối chứng (µg phenol)  
30: Lượng chiết xuất (ml)  
6: ước số dịch lọc (ml)  
100%<sup>-1</sup>dm: Hệ số đất khô

**\* Câu hỏi ôn tập: Bài số 16**

- 1 Các loại enzym do VSV sản sinh ra trong từng môi trường chuyển hóa?
2. Tính toán kết quả thí nghiệm của từng loại sản phẩm nuôi cấy VSV và lượng enzym tương ứng được sản sinh?

**Bài số 17**

**XÁC ĐỊNH SINH KHỐI VI SINH VẬT ĐẤT**

**Mục đích:**

- Giới thiệu cho học viên hiểu được khả năng tạo sinh khối của VSV
- Các phương pháp xác định sinh khối VSV

**Nội dung:**

- Hiểu được sinh khối vi sinh vật và ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tạo sinh khối
- Biết được phương pháp nuôi cấy VSV tạo sinh khối và những tác động đến quá trình tạo sinh khối VSV

**1. Nguyên lý chung**

Trong đất, vi sinh vật xuất hiện với mật độ và chủng loại rất lớn. Trong đó, vi khuẩn và nấm là các loài vi sinh vật phong phú nhất, nguyên sinh động vật và tảo xuất hiện với số lượng ít hơn. Phần sinh khối cacbon trong đất được tìm thấy có 1-3% cacbon hữu cơ (Sparling 1985). Khảo sát trên đất canh tác cho thấy tỷ lệ sinh khối vi sinh vật do hoạt động trao đổi chất là 1-5 và 2-8% vật chất hữu cơ tương ứng trong đất trồng cây và đất đồng cỏ (Beck và cộng sự, 1992). Sinh khối được xác định dựa trên sự phân tích toán học các đường cong hô hấp cho thấy chỉ có 2-30% tổng sinh khối là hoạt động trao đổi chất.

Hoạt động của vi sinh vật đất tạo nên độ phì cho đất và thực hiện các chức năng trong hệ sinh thái:

- Hoạt động phân giải: Khoáng hoá cơ thể vi sinh vật, động thực vật và các chất hữu cơ tổng hợp, huy động các chất dinh dưỡng vô cơ và các nguyên tố vi lượng.

- Hoạt động tổng hợp: Sản xuất sinh khối vi sinh vật, đồng tổng hợp các hợp chất mùn và chất keo dính, cố định các chất dinh dưỡng.

Sinh khối vi sinh vật đất là khối lượng các tế bào vi sinh vật nguyên vẹn trong lượng đất đã cho.

Các phương pháp khác nhau được sử dụng để xác định sinh khối vi sinh vật:

- Đếm dưới kính hiển vi
- Đếm trên đĩa môi trường đặc hoặc trong môi trường dịch thể.

- Kỹ thuật ủ- xông hơi, chiết xuất-xông hơi và đo hô hấp cảm ứng chất nền.
- Xác định ATP, axit muramic, D-alanin, kitin hoặc các glucosamin khác, axit nucleic, photopolipit, lipopolysacharit,...
- Đo tỉ lệ tổng hợp AND với [ $^3\text{H}$ ] thymidin, tỉ lệ hợp nhất của  $\text{H}_2^{32}\text{PO}_4$  và [ $\text{C}^{14}$ ] axetat.
- Phân tích phổ sinh khối với chất đồng vị bền vững.

Xác định sinh khối trong đất gặp một số khó khăn. Các phương pháp nuôi cấy và đếm trực tiếp dưới kính hiển vi có giá trị giới hạn. Chúng đếm chỉ với một lượng nhỏ, một phần nhỏ chưa biết của tổng sinh khối vi sinh vật do hình thành các khối tế bào, cường độ hấp phụ khác nhau của các sinh vật tới hạt đất và nhiều loại sinh vật khác nhau có thể sinh trưởng trên môi trường nuôi cấy. Đếm trực tiếp dưới kính hiển vi không phân biệt được giữa sinh khối sống và chết. Các phương pháp vật lý có sự lặp lại tốt hơn đếm trên đĩa môi trường và phù hợp cho các nghiên cứu so sánh. Sự chuyển đổi các đơn vị đo sinh khối nên được thực hiện cẩn trọng và đòi hỏi các điều tra sâu hơn. Sự suy luận từ sinh khối hoạt động đo được trong phòng thí nghiệm đến hoạt động trao đổi chất trong đất không khai phá là không thể được. Cả phương pháp đếm VSV sống trên đĩa lẫn phương pháp vật lý đều không tính toán đến phần lớn sinh khối tiềm tàng trong điều kiện tự nhiên.

Những năm gần đây, các phương pháp xác định sinh khối vi sinh vật gián tiếp lại quan trọng hơn. Các phương pháp này đòi hỏi thời gian ít, và có sự lặp lại cao. Tuy nhiên, không thể phân biệt được sinh khối tiềm tàng và hoạt động của vi sinh vật trong đất. Sinh khối vi khuẩn và nấm cũng không thể phân biệt được. Một trong những phương pháp được sử dụng phổ biến là phương pháp chiết-xông hơi. Phương pháp này cho phép đánh giá sinh khối vi sinh vật của đất bằng cách đo toàn bộ lượng vật liệu sinh khối hữu cơ có thể chiết được từ các vi sinh vật mới bị giết. Phương pháp chiết xông hơi sử dụng cho đất khô và đất ướt (ngập úng, ruộng lúa nước) với tất cả các giá trị pH của đất. Sinh khối được xác định trong đất có chứa các chất nền phân huỷ mạnh và đất bão hoà dung dịch kalisunphat.

## **2. Xác định sinh khối cacbon của vi sinh vật đất**

### **\* Nguyên tắc**

Bằng cách xông hơi mẫu đất, các tế bào nguyên vẹn được hoà tan và chất hữu cơ vi sinh vật được giải phóng. Chất hữu cơ của đất không ở thể sống thì không chịu ảnh hưởng của việc xông hơi. Các mẫu đất được xông hơi cloroform trong 24h. Cacbon hữu cơ chiết bằng dung dịch kalisunphat 0.5mol/l được xác định cho mẫu xông hơi và không xông hơi và hiệu số của cacbon hữu cơ chiết được sử dụng để xác định lượng cacbon sinh khối vi sinh vật.

Sự xông hơi bằng cloroform cũng ảnh hưởng tới hệ động vật đất. Phần đóng góp cacbon của các cơ thể loại này thường nhỏ (<5%) và có thể bỏ qua.



## **2.1. Vật liệu, hoá chất và thuốc thử**

- Nếu yêu cầu các mẫu đất cần phải đồng nhất thì sàng các mẫu ở khả năng giữ nước (KNGN) là 40%. Hàm lượng nước của mẫu phải cao hơn khả năng giữ nước 30% để đảm bảo độ phân tán đều của cloroform và để cho sự xông hơi có hiệu quả. Cần chú ý tránh làm đất ướt đóng khối và ồ bẫn. Mẫu lấy từ đất ngập nước không phải sấy khô trước khi phân tích.

- Ống thủy tinh (400 x 200 mm) có phễu lọc, chai nhựa 1000ml có nắp, bình ly tâm plastic hoặc túi nylon, giấy lọc thô, oxit nhôm, hạt chống trào, đĩa petri.

- Cloroform không có rượu etylic: Lọc 70ml Cloroform qua ống thủy tinh với 50g oxit nhôm. Lọc 25ml đầu tiên cho giai đoạn 2. Dung dịch cloroform không có etylic có thể giữ được 14 ngày trong chai tối màu. Khi có ánh sáng, cloroform không có rượu etylic phân huỷ nhanh tạo thành khí phosgen ( $\text{COCl}_2$ ) không mùi và rất độc.

- Dung dịch  $\text{BaCl}_2$  1M: 20,8g/100ml.

- Axit  $\text{HCl}$  0,1M;  $\text{NaOH}$  0,1M

-  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5M: 87.135g/l

- Dung dịch chỉ thị: 0,1g phenolphthalein/100ml etanol (60%v/v)

- Phòng ủ có khả năng duy trì nhiệt độ  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

- Bình hút ẩm được bảo vệ chống nổ, hệ tạo chân không (bơm tia nước hoặc bơm điện), máy lắc nằm ngang hoặc đứng, tủ đá ( $-15^\circ\text{C}$  đến  $-20^\circ\text{C}$ )

## **2.2. Thủ tục tiến hành**

### **2.2.1. Chiết t- xông hơi**

\* **Xông hơi:** Lót hút bình ẩm bằng giấy lọc ẩm để xông hơi mẫu đất. Cần ít nhất ba mẫu đất ẩm trong cốc đốt thủy tinh (hoặc trong đĩa petri), mỗi mẫu chứa khối lượng tương đương với 25 đến 50g đất khô kiệt. Sau đó đặt chúng vào bình hút ẩm cùng với cốc đốt chứa 25ml cloroform không chứa rượu etylic, cho một ít hạt chống trào vào cốc cloroform và cốc đốt chứa vôi. Tạo chân không cho bình hút ẩm cho tới khi cloroform bên trong bình sôi mạnh khoảng 2 phút. Đóng khoá chân không của bình hút ẩm và để ở phòng ủ ( $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) trong bóng tối khoảng 22 - 24h.

Nếu như không có đủ mẫu đất thì dùng mẫu nhỏ hơn nhưng giữ cho tỉ lệ khối lượng đất và dung môi chiết không đổi (1: 4). Trong đất có chứa chất hữu cơ nhiều hơn 20% thì tăng tỉ lệ đất : dung môi trên 1: 4 (cho tới tối đa là 1:30 đối với đất chứa 95% chất hữu cơ, ví dụ tầng thảm mục) để thu được chất chiết. Ghi lại lượng đất đã sử dụng.

Sau khi xông hơi kết thúc, lấy cốc cloroform và giấy lọc ra khỏi bình hút ẩm. Sau đó tiến hành tách hơi cloroform trong mẫu đất bằng cách hút chân không bình hút ẩm (lặp lại 6 lần, mỗi lần 2 phút) và mẫu đất có thể mang đi chiết được.

Cho ba mẫu đối chứng ẩm không xông hơi (50g khối lượng khô) vào chai nhựa PE và dùng 200ml dung dịch kalisunphat để chiết ngay.

\* **Chiết:** Để chiết tách cacbon hữu cơ, chuyển mẫu đất vào chai nhựa PE thật cẩn thận, cho thêm 200ml dung dịch kalisunphat, lắc chai trên máy lắc nằm ngang ở tốc độ 200 vòng/phút trong 30 phút hoặc máy lắc đứng ở tốc độ 60 vòng/phút trong 45 phút và lọc dung môi qua giấy lọc. Chiết đối chứng không xông hơi và lọc dung môi chiết cũng như vậy.

Nếu như không phân tích ngay, bảo quản dịch chiết của mẫu đất xông hơi và không xông hơi ở tủ đá và giữ ở nhiệt độ từ  $-15^{\circ}\text{C}$  đến  $-20^{\circ}\text{C}$ . Trước khi sử dụng làm tan dịch chiết đến nhiệt độ phòng và đồng nhất chúng.

\* **Chú thích:**

1. Trong khi bảo quản dung môi chiết thường xuất hiện kết tủa trắng (đặc biệt khi giữ ở nhiệt độ đông lạnh) bởi vì chúng thường được bão hoà với canxisunphat ( $\text{CaSO}_4$ ). Không cần hoà tan lượng canxisunphat dư này vì nó không tác dụng với bất kỳ hoá chất nào trong quá trình tiến hành theo phương pháp này.

2. Các màng tế bào của các rễ non, sống cũng bị ảnh hưởng qua quá trình xông hơi bằng cloroform. Nếu như đất có chứa nhiều rễ cây sống cần phải tiến hành thêm một qui trình xử lý trước khi chiết theo phụ lục.

\* **Xác định cacbon trong dịch chiết**

Hàm lượng cacbon của vi sinh vật trong mẫu đất được xác định bằng cách phân tích và hàm lượng này có thể sử dụng để so sánh các mẫu đất khác nhau. Nếu như cần số liệu về sinh khối vi sinh vật hiện tại, thì lúc đó các phân tích như vậy được nhân với hệ số chuyển đổi được rút ra từ các thực nghiệm, tương quan giữa khối lượng tế bào đã biết với lượng cacbon sau khi xông hơi và chiết tách. Tất cả các hệ số chuyển đổi đã sử dụng đều tương quan theo hệ số ban đầu này.

Xác định hàm lượng cacbon trong dịch chiết bằng phương pháp oxy hoá dicromat hoặc phương pháp phân tích trên máy.

**2.2.2. Xác định cacbon sinh khối vi sinh vật bằng phương pháp oxy hoá dicromat**

Trong môi trường axit mạnh chất hữu cơ bị oxy hoá và Cr (VI) bị khử thành Cr(III). Lượng dicromat còn lại được chuẩn độ ngược.

- Thuốc thử bổ sung:

+ Kalidicromat  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0.0667 M (19.6125g kalidicromat khô/lit nước). Do bản chất nguy hại của kalidicromat, phải rất cẩn thận khi sử dụng và thải bỏ.

+ Axit photphoric  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $p = 1.71$  g/ml)

+ Axit sunfuric  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $p = 1.84$  g/ml)

+ Sắt (II) amoni sunphat, dung dịch chuẩn độ  $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}] = 0.04\text{M}$ : Sắt (II) amoni sunphat (15.69g) hoà tan trong nước cất, thêm 20 ml axit sunfuric, sau đó cho tiếp nước cất đến mức 1000ml.

+ Dung dịch phức sunphat 1.10 – phenanthrolin 0.025 mol/l.

+ Hỗn hợp axit: Hai thể tích axit sunfuric trộn với một thể tích axit photphoric

- Thiết bị bổ sung:

+ Sinh hàn Liebig (Làm lạnh bằng nước)

+ Bình đáy tròn 250ml, Buret 10ml, chia độ 0.05ml, Pipet 2ml

- Cách tiến hành:

Dùng pipet lấy 2ml dung dịch kali dicromat ( $P_D$ ) và 15 ml hỗn hợp 2 axit cho vào 8ml dịch chiết đã được lọc ( $P_S$ ) trong bình đáy tròn 250 ml. Đun hồi lưu nhẹ toàn bộ hỗn hợp trong vòng 30 phút, sau đó làm lạnh và pha loãng với khoảng 20 ml đến 25ml nước qua đường sinh hàn để trắng.

Cũng tiến hành tương tự như vậy với mẫu trắng, có chứa 8 ml dung dịch  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

Xác định lượng dicromat thừa bằng cách chuẩn độ ngược với muối kép sunphat sắt (II) amoni dùng một vài giọt dung dịch phức 1, 10-phenanthrolin-sunphat sắt (II) làm chỉ thị.

### 2.2.3. Tính toán kết quả

Tính lượng cacbon hữu cơ chiết ra được bằng công thức (1) và (2)

$$C(\text{g/ml}) = [(V_H - V_S)/V_C] \times MP_D \times E \times 1000/P_S \dots (1)$$

Trong đó:

$V_S$ : Thể tích dung dịch chuẩn độ đã dùng để chuẩn mẫu (ml)

$V_H$ : Thể tích dung dịch chuẩn độ đã dùng để chuẩn mẫu trắng hồi lưu (ml)

$V_C$ : Thể tích dung dịch chuẩn độ đã dùng để chuẩn mẫu trắng không hồi lưu (ml)

$M$ :  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (mol /lit)

$P_o$ : Thể tích dung dịch  $\text{K}_2\text{CR}_2\text{O}_7$  bổ sung (ml)

$P_s$ : Thể tích dung dịch mẫu bổ sung (ml)

$E$ : 3 (chuyển đổi từ cacbon hữu cơ  $C[C]$  thành  $\text{CO}_2[C(+IV)]$ )

$$C(\text{g/ g đất khô}) = C(\text{g/ml}) \times (P_K/ D_w + S_w) \dots (2)$$

Trong đó:

$P_K$ : Khối lượng dung môi chiết (g)

$D_w$ : Khối lượng đất khô (g)

$S_w$ : Nước trong đất (g nước/ g đất khô) .

Tính lượng cacbon sinh khối  $B_c$ , theo công thức (3):

$$B_c = E_c / k_{EC} \quad \dots(3)$$

Trong đó:

$E_c$  = (khối lượng cacbon hữu cơ chiết được từ đất xông hơi) – (khối lượng cacbon hữu cơ chiết được từ đất không xông hơi)

$K_{EC}$  = 0.38. Hệ số  $k_{EC}$  được tính toán từ mối liên quan giữa kết quả của những phương pháp ủ - xông hơi và phương pháp chiết-xông hơi (12 loại đất).

#### ***2.2.4. Xác định cacbon sinh khối vi sinh vật bằng phân tích cacbon theo phương pháp quang phổ***

\* Nguyên tắc

Với sự có mặt của kali persunphat ( $K_2S_2O_8$ ), cacbon hữu cơ chiết được của đất bị oxy hoá thành cacbon dioxit và lượng cacbon dioxit được đo bằng phổ (IR) và (UV).

- Thuốc thử bổ sung

+ Kali persunphat ( $K_2S_2O_8$ ).

+ Axit photphoric.

+ Natri polyphosphat  $[(NaPO_3)_m]$ , rất tinh khiết

- Thuốc thử Kali persunphat: Hoà tan 20 g kali sunphat trong 90 ml nước cất, dùng axit phosphoric điều chỉnh pH của dung dịch bằng 2 và sau đó cho nước cất vừa đủ đến 1000ml.

- Thuốc thử natri polyphosphat: Hoà tan 50 g natri polyphosphat trong 90 ml nước cất, dùng axit phosphoric điều chỉnh pH của dung dịch trên đến 2 sau đó thêm nước cất đến 1000ml

- Thiết bị bổ sung

+ Máy phân tích cacbon tự động với bộ phát hiện hồng ngoại hoặc với hệ thống dòng liên tục với đầu đo so màu.

Trong tiêu chuẩn này việc xác định cacbon sinh khối vi sinh vật dựa trên cơ sở oxy hoá cacbon hữu cơ bằng persunphat được hoạt hoá tia cực tím.

- Cách tiến hành

Đối với phương pháp oxy hoá tự động bằng persunphat – tia cực tím, trộn 5ml phần chiết từ đất bằng dung dịch kali sunphat với 5 ml thuốc thử natri polyphosphat. Bất kỳ kết tủa nào của  $CaSO_4$  đều được hoà tan trong quá trình này. Thuốc thử kali persunphat được đưa một cách tự động vào buồng oxy hoá UV, ở đây sự oxy hoá thành  $CO_2$  được thực hiện bằng tia cực tím.  $CO_2$  được tạo thành được đo bằng hấp thụ hồng ngoại hay bằng quang phổ UV.

### 2.2.5. Tính toán kết quả

- Tính lượng cacbon hữu cơ chiết được (C) theo công thức (4):

$$C \text{ (g/g đất khô)} = [(V \times D_V) - (B \times D_V)] \times (P_K / D_w + S_w) \quad \dots(4)$$

Trong đó:

V: C(g/ ml) của mẫu

B: C(g/ ml) của mẫu trắng

D<sub>V</sub>: Độ pha loãng của mẫu bằng natri phosphat (ml)

D<sub>B</sub>: Độ pha loãng của mẫu trắng bằng natri phosphat (ml)

P<sub>K</sub>: Khối lượng dung môi chiết (g)

D<sub>w</sub>: Khối lượng đất khô (g)

S<sub>w</sub>: Nước trong đất (g nước/ g đất khô)

- Tính lượng sinh khối B<sub>C</sub> sử dụng công thức:

$$B_C = E_C / k_{EC} \quad (5)$$

Trong đó:

E<sub>C</sub> = (cacbon hữu cơ chiết được từ đất xông hơi) – (cacbon hữu cơ chiết được từ đất không xông hơi)

$$K_{EC} = 0,35$$

Hệ số K<sub>EC</sub> được tính từ mối liên quan giữa kết quả của phương pháp ủ xông hơi và kết quả của phương pháp chiết – xông hơi (23 loại đất)

Có thể sử dụng phương pháp chiết - xông hơi kết hợp với phương pháp nghiên cứu phân huỷ của các chất hữu cơ đánh dấu <sup>14</sup>C.

#### \* Quy trình chiết sơ bộ với đất có chứa nhiều rễ cây sống

Cho đất ẩm (25 đến 50 g khối lượng khô) vào bình thuỷ tinh 250 ml có chứa 100 ml dung dịch kali sunphat để chiết trong vòng 20 phút trên máy lắc và sàng (đối với đất canh tác kích thước lỗ là 2mm, còn đối với đất đồng cỏ là 3mm). Rửa thật sạch rễ cây (và hạt đá nhỏ) trên sàng bằng 75 ml dung dịch kali sunphat bổ sung thêm và sấy khô, cân chúng. Ly tâm khoảng 500 g huyền phù gồm đất và dung dịch kali sunphat trong bình thuỷ tinh trong 15 phút. Sau đó chặt nước lọc phía trên. Cho thêm 3 giọt cloroform vào đất để xông hơi. Quy trình như trên.

Nếu có các rễ cây sống trong đất thì nhất thiết phải sử dụng quy trình trên. Hơn nữa, quy trình này tạo cho việc đo nitơ sinh khối vì sinh vật dễ dàng hơn bằng việc giảm nitơ vô cơ nền có trong đất. Nó còn giảm những khó khăn khi đo sinh khối vì sinh vật trong đất khô và vì vậy rất tiện lợi cho việc đo sự dao động của cacbon sinh khối vì sinh vật đất và nitơ trong năm. Sinh khối vì sinh vật đo được không bị chiết tách ra khỏi đất bằng quy trình chiết sơ bộ này.

### 3. Xác định sinh khối nitơ của vi sinh vật đất

Sau khi xông hơi bằng cloroform, mẫu đất được chiết bằng dung dịch kali sunphat. Nitơ tổng số trong dịch lọc được xác định và biến đổi sang nitơ sinh khối (Brookes và cs, 1985). Nitơ tổng số được xác định theo phương pháp Kjeldahl.

#### 3.1. Vật liệu, hoá chất và thuốc thử

Các vật liệu, hoá chất, dụng cụ và thuốc thử chuẩn bị như xác định cacbon sinh khối vi sinh vật ở trên.

#### 3.2. Thủ tục tiến hành

##### 3.2.1. Chiết - xông hơi

Xông hơi 150-200g mẫu đất ẩm bằng cloroform trong 24h giống như phân tích cacbon sinh khối ở trên. Sau đó (ngược với kỹ thuật chiết-xông hơi trên, cloroform không được tách ra khỏi mẫu), trộn đất xông hơi với dung dịch kali sunphat theo tỉ lệ 1:4, lắc 30 phút và lọc làm mẫu phân tích (3 lần lặp lại). Tiến hành tương tự với mẫu đối chứng không xông hơi (3 lần lặp lại).

Tiến hành phân tích lượng nitơ tổng số trong dịch lọc ngay theo phương pháp Kjeldahl. Có thể cất giữ dịch lọc ở 4°C cho đến khi phân tích.

##### 3.2.2. Phân tích nitơ theo phương pháp kjeldahl

- Dụng cụ, hoá chất bổ sung:

+ Bình Kjeldahl (250ml), bộ cất đậm Kjeldahl

+ Axit sunfuric  $H_2SO_4$  ( $p = 1.84$  g/ml)

+  $H_2SO_4$  0,05M

+ Hỗn hợp xúc tác: 100g  $K_2SO_4$  + 10g  $CuSO_4$  + 1g Se, nghiền nhỏ

+ NaOH 32% (w/v)

+ Axit boric 2% (w/v)

+ Dung dịch chỉ thị (ví dụ xanh bromcresol, đỏ metyl)

- Tiến hành: Cho 0,5g hỗn hợp xúc tác và 20ml  $H_2SO_4$  đặc vào bình dịch lọc, công phá cho đến khi thu được dung dịch trong, để nguội ở nhiệt độ phòng.

Cho 10ml axit boric và vài giọt chỉ thị vào bình hứng dịch chưng cất. Sau khi thêm xút dư tiến hành chưng cất 3-20 phút để chuyển hoàn toàn  $NH_3$  vào bình chứa axit boric và chỉ thị.

Xác định N- $NH_4$  bằng chuẩn độ với  $H_2SO_4$  0,05M (điểm chuẩn độ là dung dịch chuyển từ xanh sang hồng. Lượng nitơ trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$\frac{(S-C).1,4.100.100}{A. SW.1000} = \%N$$

Trong đó:

S: Lượng axit  $H_2SO_4$  0,05M dùng cho mẫu (ml)



C: Lượng axit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05M dùng cho đối chứng (ml)  
 1,4: Hệ số chuyển đổi (1ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05M tương ứng với 1,4 mgN)  
 100: Lượng dịch tiêu thụ (ml)  
 A: ước số dịch tiêu thụ (ml)  
 SW: Lượng đất ban đầu  
 $100.1000^{-1}$ : Hệ số chuyển đổi (% , w/w)

### 3.3. Tính kết quả

Nitơ sinh khối vi sinh vật được tính theo phương trình:

$$\frac{(S-C)}{0,54} = \mu\text{g N.g}^{-1} \text{ dm}$$

Trong đó:

S: Giá trị của mẫu ( $\mu\text{g N-NH}_4.\text{g}^{-1} \text{ dm}$ )

C: Giá trị đối chứng ( $\mu\text{g N-NH}_4.\text{g}^{-1} \text{ dm}$ )

0,54: Hệ số  $K_{\text{EN}}$  (mối quan hệ giữa nitơ sinh khối VSV và nitơ tổng số trong đất).

### \* Câu hỏi ôn tập: **Bài số 17**

- 1 Sinh khối VSV có mối quan hệ mật thiết với sản phẩm nuôi cấy và môi trường lên men?
2. Các phương pháp thử và các loại thuốc thử, các công thức tính cho từng nhóm VSV?
2. Tính toán kết quả thí nghiệm của từng loại sinh khối cho từng nhóm VSV chuyên tính?

## **Bài số 18**

### **SINH TRƯỞNG CỦA VI SINH VẬT**

#### **Mục đích yêu cầu:**

- + Xác định các điều kiện nuôi cấy cho mỗi loại VSV: hiếu khí, yếm khí bắt buộc, yếm khí không bắt buộc.
- + Hiểu rõ 3 phương pháp nuôi cấy vi khuẩn yếm khí.
- + Xác định 4 pha của đường cong sinh trưởng của một vi khuẩn điển hình.

#### **Nội dung kiến tập:**

- + Nuôi cấy vi khuẩn yếm khí.
- + Đo độ đục sinh trưởng của vi khuẩn. Giải thích số liệu sinh trưởng của vi khuẩn trên đồ thị.
- + Xác định ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng của VSV.

### **1. Nguyên lý chung**

Vi sinh vật có những yêu cầu về dinh dưỡng, lý học, hoá học và môi trường phải được đáp ứng để sinh trưởng và phát triển. Kiến thức về các điều kiện cần thiết cho sinh trưởng của VSV có thể giúp dễ dàng nuôi cấy các VSV và điều khiển các VSV không mong muốn.

Năm 1861, Jean Baptiste Dumas đã trình bày một báo cáo tới viện hàn lâm Pasteur. Trong bài báo này, ông bắt đầu:

“ Sự tồn tại của lớp trùng mao có các đặc trưng của các men là đáng chú ý, nhưng một đặc trưng cần được quan tâm nhiều hơn là các động vật nhỏ trùng mao này sống và nhân lên vô hạn trong sự vắng mặt của lượng không khí nhỏ nhất hoặc oxy tự do...”

Khi chúng ta nói không khí là một yêu cầu sinh trưởng, chúng ta cần xem xét lượng oxy trong không khí. Hơn thế nữa, khi chúng ta nhắc đến oxy, chúng ta thường muốn nói đến oxy phân tử ( $O_2$ ) đóng vai trò là một nguồn cung cấp điện tử trong hô hấp hiếu khí.

Các điều kiện vật lý trong môi trường ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của VSV là nhiệt độ, áp suất thẩm thấu và pH.

### **2. Oxy và sự sinh trưởng của vi sinh vật**

Sự có mặt hay vắng mặt phân tử oxy ( $O_2$ ) có thể là vô cùng quan trọng đối với sự sinh trưởng của VSV. Một số VSV gọi là VSV hiếu khí đòi hỏi có oxy, trong khi các VSV khác gọi là VSV yếm khí lại không sử dụng oxy. Một lý do khiến VSV yếm khí bắt buộc không thể chịu được sự có mặt của oxy là chúng thiếu catalaza và kết quả là sự tích lũy hydro peroxyl gây chết tế bào. Các loài hiếu khí chịu oxy có thể không sử dụng oxy nhưng chịu được nó khá tốt, mặc dù sự sinh trưởng của chúng có thể được tăng cường trong điều kiện vi hiếu khí hầu hết các VSV này trao đổi chất theo kiểu lên men.

Một số loại vi khuẩn chịu khí một phần sinh trưởng tốt nhất trong khí quyển có nồng độ CO<sub>2</sub> tăng (7-10%) và nồng độ O<sub>2</sub> thấp hơn. Chúng sẽ sinh trưởng trong môi trường đặc ở độ sâu mà một lượng nhỏ oxy có thể tan mản vào. Để nuôi cấy các VSV chịu khí một phần trên đĩa petri và môi trường không nghèo đi, một bình cấy nên được sử dụng. Các đĩa và ống nghiệm xử lý được đặt trong bình lớn với một cây nến sáng. Sau khi đầy nút, tắt nến đi khi nồng độ oxy giảm. Các VSV có khả năng sống trong điều kiện có hoặc không có oxy gọi là VSV yếm khí không bắt buộc.

4 giống vi khuẩn thiếu catalaza là *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* và *Clostridium*. Trong đó *Clostridium* là yếm khí bắt buộc, còn 3 giống kia yếm khí chịu khí. 3 loài này không có hệ thống xytocrom để sản sinh ra hydro peroxyt, do đó không cần catalaza. Việc xác định sự có hay không có mặt catalaza là rất hữu ích trong định loại vi khuẩn. Khi một vài giọt hydro peroxyt 3% được cho vào khuẩn lạc và catalaza hiện diện, phân tử oxy được giải phóng ra dưới dạng bọt khí.

Trong phòng thí nghiệm, chúng ta có thể nuôi cấy vi khuẩn yếm khí bắt buộc hoặc không bắt buộc bằng cách loại trừ oxy tự do từ môi trường hoặc sử dụng môi trường biến đổi. Nhiều phương pháp nuôi cấy VSV yếm khí giải quyết được cả 2 quá trình này. Tất cả các phương pháp nuôi cấy VSV yếm khí chỉ hiệu quả nếu như mẫu hay các VSV nuôi cấy được thu thập và chuyển đi theo cách làm giảm thiểu sự biểu lộ của oxy.

### 2.1. Vật liệu

Đĩa petri chứa môi trường dinh dưỡng  
ống nghiệm chứa môi trường Thioglycolat có chỉ thị  
Bình ủ yếm khí  
Hydro peroxyt 3%

### 2.2. Dịch nuôi cấy

*Alcaligenes*  
*Clostridium*  
*Enterococcus*  
*Escherichia coli*

### 2.3. Thủ tục tiến hành

- Không lắc ống Thioglycolat.
- Dán nhãn 4 ống canh thang và nhiễm mỗi ống một vòng que cấy một loại vi khuẩn trong điều kiện vô trùng.
- Nuôi ở 35°C
- Ghi lại sự xuất hiện sinh trưởng ở mỗi ống.
- Dùng bút đánh dấu dưới đáy chia mỗi đĩa thạch thành 4 phần. Dán nhãn 1 đĩa hào khí và 1 đĩa yếm khí.

- Ria cấy 1 đường đơn các vi khuẩn trên mỗi phần đĩa.
- Đặt ngược đĩa hãm khí nuôi ở 35°C. Đĩa yếm khí được đặt ngược trong bình ủ.
- Người hướng dẫn sẽ chứng minh làm thế nào để bình trở thành yếm khí. 10 ml nước được thêm vào túi điều chỉnh khí Gas-Pak (xúc tác hydro kết hợp oxy tạo thành nước, phản ứng sẽ dừng lại khi thêm nước vào) đặt trong bình với chỉ thị xanh methylen. Khi có mặt của oxy chỉ thị có màu xanh, chuyển thành trắng khi oxy giảm đi.
- Nuôi bình ở 35°C
- Sau khi nuôi cấy, ghi lại sự sinh trưởng của vi khuẩn trên mỗi đĩa.
- Thực hiện kiểm tra thử catalaza bằng cách cho thêm vài giọt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% vào các khuẩn lạc khác nhau trên đĩa thạch. Test catalaza dương tính sẽ sinh ra bọt bong bóng trắng. Có thể dùng kính hiển vi để xác định rõ hơn các bọt bóng. Test thử catalaza cũng có thể được thực hiện trên lam kính. Vi khuẩn sinh trưởng trên môi trường thạch máu có thể sử dụng phương pháp này.

### **3. Xác định đường cong sinh trưởng của vi khuẩn: ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ**

Các pha sinh trưởng của VSV có thể được xác định bằng cách độ đục của dịch nuôi cấy. Độ đục không phải là đơn vị đo lường trực tiếp số lượng VSV, nhưng độ đục tăng đã chỉ ra sự sinh trưởng của VSV. Từ sự hiện diện của 1 triệu tế bào/ml có thể phân biệt độ đục bằng mắt, máy đo quang phổ được sử dụng để đo xác định độ đục với lượng VSV nhỏ hơn.

Đa số VSV sinh trưởng trong một khoảng nhiệt độ nhất định. Nhiệt độ sinh trưởng tối thiểu là nhiệt độ thấp nhất mà loài VSV đó sẽ phát triển. Các loài VSV sinh trưởng nhanh nhất ở nhiệt độ sinh trưởng tối ưu của chúng. Và nhiệt độ cao nhất mà chúng có thể sinh trưởng là nhiệt độ sinh trưởng tối đa.

Vi sinh vật được chia thành 3 nhóm chính dựa theo nhiệt độ sinh trưởng của chúng. Nhiệt độ tối ưu của VSV ưa lạnh là 15°C, của VSV ưa ấm là 25°C - 40°C. Nhiệt độ tối thích của nhiều loại ưa nhiệt là 45-65°C, mặc dù một vài loài có khả năng sinh trưởng ở trên 90°C. Khoảng nhiệt độ ưa thích của VSV do di truyền quyết định.

Trong bài tập này, chúng ta sẽ vẽ biểu đồ đường cong sinh trưởng của một loại vi khuẩn ở các nhiệt độ khác nhau để đưa ra khoảng nhiệt độ thích hợp của loài này.

#### **3.1. Vật liệu**

Bình nón chứa dịch dinh dưỡng + NaCl 1,5%

ống nghiệm đo quang phổ

Pipet 5 ml, 10ml vô trùng

Máy đo quang phổ

#### **3.2. Dịch nuôi cấy**

*Vibrio natriegenes*

### 3.3. Thủ tục tiến hành

- Cho 4 ml dịch dinh dưỡng vô trùng vào 1 ống đo quang phổ. ống này là đối chứng để chuẩn hoá máy đo.
- Nhiễm 10ml vi khuẩn *Vibrio* vào một bình nón chứa dịch dinh dưỡng.
- Xoay bình để trộn lẫn dung dịch. Chuyển 4 ml từ bình vào ống đo quang phổ thứ 2, và đo sự hấp phụ (Abs.) trên máy quang phổ.
- Ghi lại các kết quả đo được.
- Để bình nón ở nhiệt độ mong muốn.
- Ghi lại sự hấp phụ sau mỗi 10 phút cho đến 60 và 90 phút. Lấy bình ra khỏi chậu nước cho thời gian tối thiểu có thể để lấy mẫu. Khi lấy mẫu, dùng pipet vô trùng hút 4 ml cho vào ống đo quang phổ thứ 2.
- Vẽ đồ thị từ số liệu thu được để có đường cong sinh trưởng của VSV theo nhiệt độ.

### \* Câu hỏi ôn tập: Bài số 18

- 1 Trình bày thuyết sinh trưởng và phát triển của VSV?
2. Tính toán kết quả thí nghiệm theo sinh khối VSV và các điều kiện cần và đủ của từng thí nghiệm?

## Bài số 19

### THĂM QUAN KIẾN TẬP MÔN HỌC

#### Mục đích và yêu cầu:

- + Nhằm trang thiết bị kiến thức thực tế cho sinh viên về ứng dụng công nghệ VSV trong nông nghiệp và xử lý ô nhiễm môi trường.
- + Yêu cầu sinh viên tham gia đầy đủ các buổi học ngoại khóa theo chương trình môn học.
- + Sau khi học xong sinh viên phải viết tiểu luận về bài học ngoại khóa.

#### Địa điểm học ngoại khóa:

- + Các phòng thí nghiệm VSV hiện đại chuyên phục vụ trong giảng dạy & nghiên cứu về lĩnh vực nông nghiệp.
- + Các loại chế phẩm, phân VSV đang được sản xuất và áp dụng trong nông nghiệp.
- + Trung tâm VSV ứng dụng Trường Đại học Khoa học tự nhiên.
- + Phòng nghiên cứu VSV nông nghiệp Trường Đại học Nông nghiệp I.

- + Viện Sinh học Viện khoa học Việt Nam.
- + Nhà máy (phân xưởng) phân hữu cơ vi sinh vật (Sông Gianh tỉnh Nghệ An, Tiến Nông tỉnh Thanh Hóa, Văn Điển Hà Nội, Việt Trì tỉnh Phú Thọ ...và ở các tỉnh trên toàn quốc).
- + Viện chăn nuôi thú y, xưởng sản xuất thức ăn gia súc, gia cầm, thuốc thú y ở các tỉnh
- + Các trang trại, các công ty nuôi trồng thủy, hải sản trên toàn quốc.
- + Xí nghiệp xử lý phế thải đô thị ở các thành phố và các tỉnh.

**Nội dung:**

- + Xem cách thiết kế phòng nghiên cứu và ứng dụng vi sinh vật.
- + Quan sát và tìm hiểu các quy trình sản xuất hoặc xử lý ô nhiễm môi trường trên cơ sở ứng dụng công nghệ vi sinh vật.
- + Tiến hành lấy mẫu để kiểm tra chất lượng sản phẩm cũng như chế phẩm VSV.

**Bài số 19**

**THĂM QUAN KIẾN TẬP MÔN HỌC**

**\* Câu hỏi ôn tập:**

Viết thu hoạch đợt kiến tập tại các cơ sở thăm quan, kiến tập?



## PHỤ LỤC

**BẢNG 1: PHA DUNG DỊCH ĐỆM SORENSEN I VÀ DUNG DỊCH  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1/15M VÀ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1/15M - SỐ LƯỢNG DUNG DỊCH (ML)**

| pH          | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1/15<br>M | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1/15 M |
|-------------|--|--|
| 4,53        | 0,00                                       | 10,00                                  |
| 4,48        | 0,10                                       | 9,90                                   |
| 5,29        | 0,25                                       | 9,75                                   |
| 5,59        | 0,50                                       | 9,50                                   |
| 5,91        | 1,00                                       | 9,00                                   |
| 6,24        | 2,00                                       | 8,00                                   |
| 6,47        | 3,00                                       | 7,00                                   |
| 6,64        | 4,00                                       | 6,00                                   |
| 6,81        | 5,00                                       | 5,00                                   |
| 6,98        | 6,00                                       | 4,00                                   |
| 7,17        | 7,00                                       | 3,00                                   |
| 7,38        | 8,00                                       | 2,00                                   |
| 7,73        | 9,00                                       | 1,00                                   |
| <b>8,04</b> | 9,50                                       | 0,50                                   |
| 8,34        | 9,75                                       | 0,25                                   |
| 8,67        | 9,90                                       | 0,10                                   |
| 9,18        | 10,00                                      | 0,00                                   |