

PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY PHÂN LẬP VI SINH VẬT

Trong công tác vi sinh vật khâu cấy, khâu phân lập có tầm quan trọng rất lớn trong công tác bảo tồn giống, phân lập ra những giống thuần chủng hay tạo ra các giống mới.

Ở các môi trường mới, vi sinh vật phát triển tốt, tăng nhanh về số lượng tế bào, sau một thời gian dinh dưỡng của tế bào cạn dần, hơn nữa sự tích lũy các sản phẩm của quá trình trao đổi chất tăng lên gây tác dụng ức chế vi sinh vật phát triển thậm chí còn làm thay đổi đặc tính hoặc gây chết tế bào. Nên cần cấy truyền sang môi trường mới.

Qua phân lập người ta có thể sàng lọc ra được các chủng loại vi sinh vật riêng biệt. Trên cơ sở đó xác định được chủng loại vi sinh vật, có cơ sở để nhận biết và thuần chủng các giống theo yêu cầu của con người.

A - PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP

Dùng phương pháp cấy trên thạch đĩa nhằm tạo ra những khuẩn lạc riêng rẽ, thuận lợi cho việc nhận xét, phân biệt hay chọn lọc các chủng loại vi sinh vật có trong mẫu đem phân lập. Phương pháp phân lập được tiến hành theo các bước như sau:

I—LẤY MẪU

Tùy theo loại mẫu đem phân lập mà có cách lấy mẫu và khối lượng mẫu lấy khác nhau. Nhưng cần bảo đảm các điều kiện chung là:

— Số lượng phải đủ để phân lập và tiến hành phân tích các chỉ tiêu khác nếu cần.

— Phải ghi chú rõ ràng thời gian và địa điểm lấy mẫu phân lập.

— Thời gian lấy mẫu tiến hành trên thời gian ngắn thì tốt nhất còn không thì phải có sự bảo quản mẫu cho tốt, nhưng thời gian để không được kéo dài.

— Chú ý công tác vô trùng và chọn lọc mẫu có tính đại diện.

II – XỬ LÝ MẪU

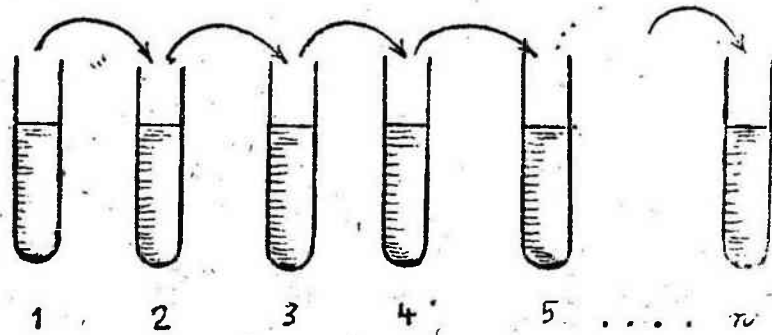
Mẫu rắn: Bao gồm các mẫu đất, mẫu thức ăn bột, mẫu thịt.. Cân chính xác 1g mẫu cho vào cối vô trùng nghiền kỹ, sau đó pha loãng với 100ml nước cất vô trùng. Lắc đều trong 1 phút, sau đó để lắng 15 – 30 giây, hút lấy 1 ml dịch mẫu để làm bước pha loãng mẫu tiếp theo.

Mẫu lỏng: Không cần xử lý trước, chỉ cần hút lấy 1 ml dịch mẫu để pha loãng.

Phương pháp pha loãng mẫu:

Chuẩn bị dãy ống nghiệm chứa nước cất vô trùng, số lượng ống tùy theo sự ước đoán số vi sinh vật trong mẫu nhiều hay ít. Hút 1 ml cho vào ống 1, thổi lên xuống vài lần để trộn đều, sau đó hút 1 ml ở ống 1 cho vào ống 2, cũng làm như vậy đối với các ống tiếp theo ta sẽ được dãy ống có độ pha loãng khác nhau, theo sơ đồ sau: (Hình 12)

Hình 12



Nước cất	9ml	9ml	9ml	9ml	9ml	9ml
Dịch mẫu	1ml					
Độ pha loãng mẫu	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{10000}$	$\frac{1}{100000}$...
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-n}

III – PHƯƠNG PHÁP CẤY PHÂN LẬP

Để đảm bảo hiệu quả tốt trong phân lập một trong những công việc cần thiết là làm thế nào để sau khi cấy tạo được những khuẩn lạc mọc riêng rẽ trong môi trường. Muốn vậy ta có thể dùng một trong hai cách sau đây.

1. Phương pháp hỗn hợp:

Hỗn hợp đều môi trường với mẫu định phân lập đã được pha loãng theo tỉ lệ khác nhau như trên. Phương pháp tiến hành cụ thể như sau:

— Dùng pipét đã khử trùng, hút lấy 1 ml dịch mẫu cho vào hộp lồng đã được khử trùng trước. Mỗi độ pha loãng của dịch mẫu làm 3 đĩa. Ghi rõ độ pha loãng mẫu tương ứng trên từng hộp lồng.

— Môi trường thạch dùng để phân lập, sau khi hấp khử trùng xong để cho nhiệt độ hạ xuống trên dưới 40°C thì đổ vào mỗi hộp có dịch mẫu 12 — 15 ml môi trường, lắc nhẹ để cho mẫu và môi trường hỗn hợp đều.

— Môi trường đông cứng đem lật sắp đĩa và để tủ ấm nuôi cấy ở nhiệt độ cần thiết.

Nói chung sau 24 giờ vi sinh vật đã sinh trưởng và phát dục tốt, hình thành các khuẩn lạc trong môi trường. Để đảm bảo cho vi sinh vật mọc hết có thể ấn định thời gian như sau: với vi khuẩn nuôi cấy trong khoảng thời gian 36 — 48 giờ. Với nấm men 48 — 72 giờ, với nấm mốc 96 — 120 giờ.

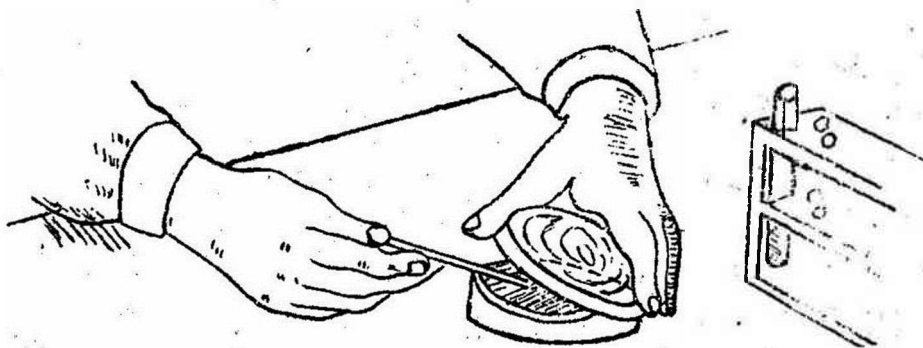
Phương pháp này còn dùng để tính số lượng tế bào vi sinh vật mà bài sau sẽ đề cập tới. Khi đó dung dịch pha loãng và mẫu cần phải định lượng thật chặt chẽ để tiện cho việc tính toán. Đặc biệt chú ý thao tác vô trùng và giữ thật sạch sẽ trong khi hút mẫu và đổ môi trường.

2. Phương pháp ria cấy:

Có nhiều phương pháp ria cấy trên thạch đĩa, tùy theo giống vi sinh vật và mục đích yêu cầu của việc phân lập.

Thao tác chung khi ria cấy như sau:

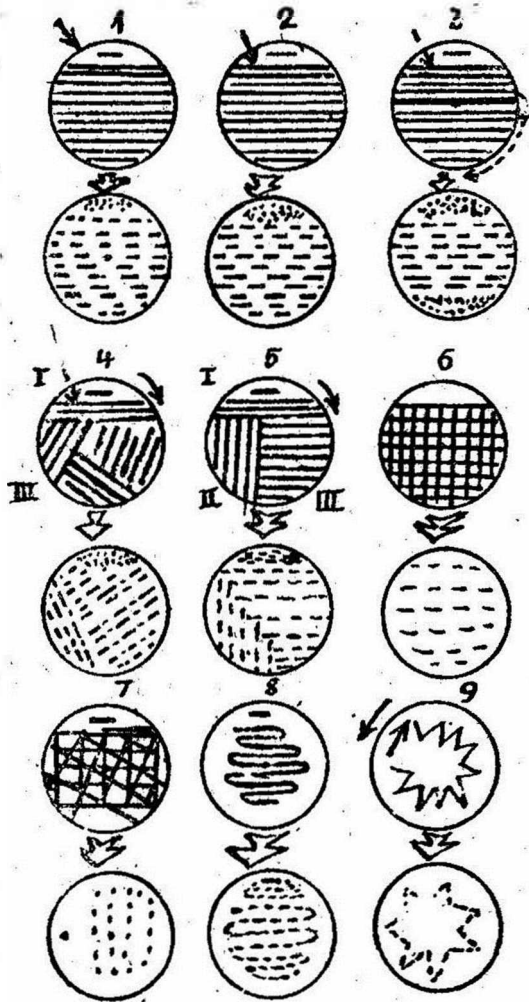
— Hơ quanh đĩa môi trường trên ngọn lửa đèn cồn. Tay trái cầm lấy đĩa đưa gần vào ngọn lửa đèn cồn mở hé nắp (hình 13a).



Hình 13a: Cách ria cấy trên thạch đĩa

– Tay phải cầm que cấy, nung nóng đỏ trên ngọn lửa đèn cồn, đợi nguội lấy một ít mẫu vào vòng bạch kim.

– Đặt mẫu vào góc đĩa rồi tiến hành ria cấy nhẹ nhàng trên mặt thạch nhưng chú ý không làm vỡ mặt thạch. Có nhiều phương pháp ria cấy: (hình 13b).



– Ria ngang từng đường cho hết đĩa, hơ lửa que cấy.

– Ria đến 1/3 đĩa đốt que cấy để nguội. Ria tiếp đến 2/3 đĩa, đốt que cấy. Ria tiếp đến hết đĩa.

– Ria ngang đến 1/2 đĩa, quay ngược đầu ria tiếp đến hết đĩa còn lại.

– Ria ngang ở một góc nhỏ của đĩa, đốt que cấy, xoay đĩa theo chiều kim đồng hồ ria ngang ở một góc nhỏ của đĩa, ria chồng lên một hai đường ria cuối của lần ria thứ nhất. Tiếp tục làm như vậy đến lần ria thứ 4 cho hết đĩa.

– Cách ria như trên nhưng xoay đĩa theo chiều kim đồng hồ một góc 90° và ria cấy 3 lần (3 lần đốt que cấy).

Hình 13b: Các cách ria cấy phân lập khác nhau

– Ria đường ngang cho hết đĩa, đốt que cấy xoay đĩa góc 90° lại ria đường ngang cho hết đĩa.

– Đầu tiên ria như trên, sau đó ria các đường theo hai chiều chéo góc với hình vuông.

– Ria thành các đường gấp khúc từ nhỏ đến to, trái sang phải cho hết 1/2 đĩa, đốt que cấy. Ria tiếp đường gấp khúc từ to đến nhỏ cho hết đĩa.

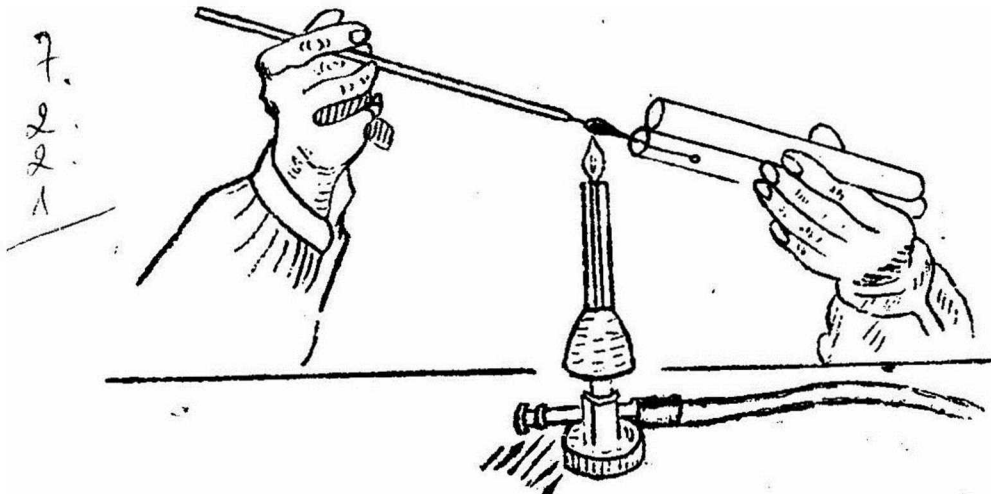
– Ria thành hoa thị gấp khúc hình chữ M quanh đĩa, không đốt hoặc có đốt que cấy ở giữa 2 lần ria cấy.

B — PHƯƠNG PHÁP CẤY TRUYỀN

— Dùng phương pháp cấy truyền để nhân và giữ giống vi sinh vật. Hay trong phân lập thì dùng để cấy tách riêng từng loại vi sinh vật sau khi đã được phân lập trong thạch đĩa. Nói chung thao tác cấy truyền còn dùng trong nhiều lĩnh vực khác về vi sinh vật nữa.

I — PHƯƠNG PHÁP VÀ THAO TÁC CẤY

Trước khi cấy cần chuẩn bị các dụng cụ cần thiết như ống giống, môi trường, que cấy, đèn cồn và các thứ cần dùng khác cho đầy đủ. Rửa tay sạch sẽ xong tiến hành rĩa cấy. Phương pháp và thao tác cụ thể như sau (hình 14).



Hình 14: Thao tác cấy truyền

Tay trái cầm ống giống và ống môi trường. Đặt ống nằm trong lòng bàn tay, đáy ống được kẹp chặt trong lòng bàn tay, ngón trỏ và ngón giữa đỡ thân ống, ngón cái đè lên phía trên các ống giữ chặt.

— Dùng tay phải xoay lỏng nút bông của các ống. Cầm que cấy ở tay phải trên 3 ngón tay (ngón cái, ngón trỏ, ngón giữa) nung đỏ trên ngọn lửa đèn cồn. Đầu tiên hơi ngang vài lượt đến hết que cấy, sau hơi thẳng đứng đến đỏ dây bạch kim.

— Dùng ngón tay út và mép dưới bàn tay và hai ngón tay thứ tư kẹp chặt nút bông, đưa gần miệng ống vào sát ngọn lửa đèn cồn, mở nút ra, hơi qua miệng ống trên ngọn lửa đèn cồn.

— Đưa que cấy đã nguội vào trong ống giống lấy ra một ít giống vào đầu que bạch kim, rút que cấy ra hơi qua miệng ống.

— Đưa nhanh que cấy sang ống môi trường, tùy theo từng loại môi trường mà có thao tác rĩa cấy khác nhau (xem ở phần tiếp theo).

— Đốt que cấy và miệng các ống, đút nút các ống lại. Dùng bút chì sấp viết rõ tên giống (hoặc mẫu) ngày tháng cấy. Để vào tủ ấm 37°C nuôi cấy.

Khi cấy tùy điều kiện không có thiết bị vô trùng (buồng cấy hay lồng cấy đã được khử trùng) thì thường xuyên đặt miệng ống gần sát ngọn lửa đèn cồn và chú ý thao tác vô trùng.

II — PHƯƠNG PHÁP RĨA CẤY TRÊN CÁC MÔI TRƯỜNG KHÁC NHAU

1. Cấy trên môi trường lỏng.

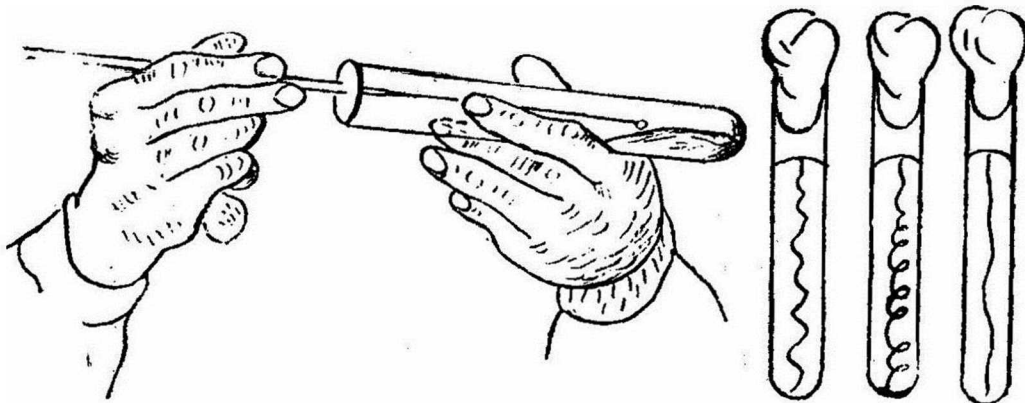
Ngoài các thao tác đã chỉ dẫn ở trên cần chú ý:

— Nếu mẫu hoặc giống là ở thể rắn thì khi cấy phải mài vài lần vào thành ống của môi trường, để cho tan; nếu mẫu lỏng thì chỉ cần ngoáy vài lần trên mặt gần thành ống là được.

— Nếu cấy trên môi trường yếm khí thì đầu tiên phải làm tan lớp dầu trên mặt môi trường. Sau khi lấy mẫu đâm thẳng que cấy qua lớp dầu thật nhanh xuống tới môi trường khoảng vài lần rồi rút ra.

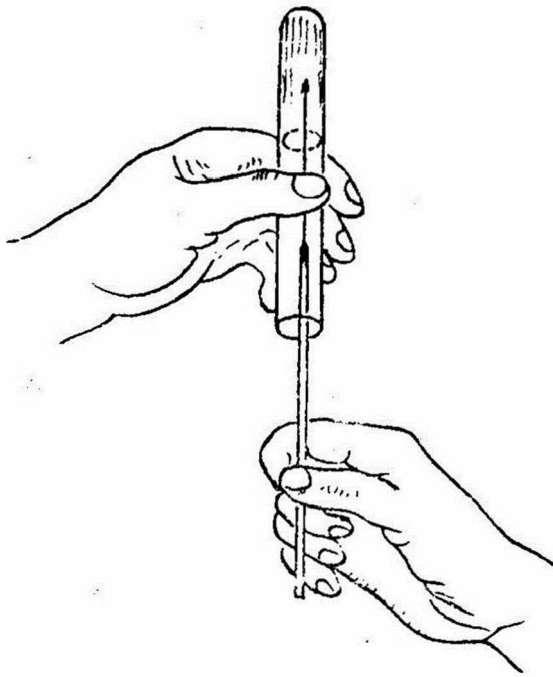
2. Cấy trên môi trường rắn.

Thao tác như trên nhưng chú ý khi cấy phải đưa từ đáy ống lên theo đường gấp khúc, đường xoắn ốc, hoặc đường thẳng (hình 15). Trong khi cấy không được làm rách mặt thạch.



Hình 15: Cấy trên môi trường rắn. Thao tác và các đường rĩa cấy

3. Cây trên môi trường thạch mềm.



Dùng que cấy có dây cấy đại cứng, chọc sâu vào giữa ống thạch đến gần đáy rồi rút nhanh ra, ống để đứng (hình 16).

Hình 16 : Cây trích sâu trên môi trường thạch mềm.

C - PHƯƠNG PHÁP NUÔI DƯỠNG VI SINH VẬT YẾM KHÍ

Nuôi dưỡng vi sinh vật yếm khí phải tiến hành trong điều kiện không có oxy tự do. Có thể sử dụng các phương pháp sau đây:

I - PHƯƠNG PHÁP VẬT LÝ

Có thể dùng biện pháp ngăn cách môi trường với không khí bằng các nguyên liệu như parafin, sáp, vasolin... Sau khi làm môi trường xong đổ một lớp dầu lên trên bề mặt môi trường, sau đó có thể dùng parafin gắn kín sẽ tạo được trạng thái yếm khí trong suốt quá trình nuôi dưỡng. Hoặc dùng dụng cụ nuôi cấy đặc biệt để nuôi cấy. Sau khi đưa môi trường đã cấy vi sinh vật vào trong dụng cụ thì dùng các biện pháp hút không khí ở trong ra (lối dưới 10 mm Hg) đem nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp.

Lượng dùng: Trong 100 cm³ không khí dùng 1g axit pyrogallíc và 18 ml dung dịch NaOH bão hòa hoặc 0,2g Na₂S₂O₄ và Natribicacbonát.

Sau khi để môi trường nuôi cấy trong bình kín phải tìm cách tạo điều kiện cho phản ứng giữa các chất hóa học đem dùng xảy ra ngay sau đó phải chú ý không để phản ứng hóa học và các chất hóa học ảnh hưởng tới môi trường và dụng cụ nuôi cấy.

II – PHƯƠNG PHÁP SINH VẬT

Cơ sở của phản ứng này là dựa vào sự hấp thu oxy tự do trong môi trường do tác dụng của các tổ chức nội tạng như gan, tim, thận... Trong môi trường nuôi cấy người ta cho vào một miếng nhỏ của tổ chức nội tạng như gan, tim, thận... Môi trường được hấp khử trùng xong đợi nhiệt độ hạ đem cấy và đem nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp.

III – PHƯƠNG PHÁP TỔNG HỢP

Ở điều kiện cho phép có thể kết hợp các phương pháp vật lý, hóa học và sinh vật đã nói ở trên để nuôi cấy vi sinh vật yếm khí, hiệu quả sẽ tốt hơn.

Trong việc xác định mức độ cần oxy hóa của vi khuẩn người ta có thể dùng các phương pháp như :

— Cấy hỗn hợp mẫu (hoặc loại vi khuẩn nào đó) với môi trường thạch chưa đông. Sau khi môi trường đông cứng đem nuôi cấy. Sau một thời gian quan sát sự phát triển của vi khuẩn ở các độ sâu khác nhau trong môi trường như vậy sẽ đoán biết được nhu cầu oxy của nó.

— Dùng phương pháp cấy trích sâu vào giữa môi trường thạch đứng rồi quan sát sự phát triển của vi khuẩn đó theo vết cấy.

NỘI DUNG THỰC TẬP VÀ TƯỜNG TRÌNH

Thực hành ria cấy trên môi trường thạch đĩa với mẫu bánh men thuốc bắc đã được pha loãng trước. Sau đó để ở tủ ấm 32°C nuôi cấy. Tường trình quá trình xử lý mẫu bánh men trước khi ria cấy và ghi lại kết quả quan sát được sau khi nuôi cấy phân lập về loại hình, số lượng vi sinh vật có trong mẫu (qua việc xem xét kích thước, hình thái, màu sắc, bờ viền... của khuẩn lạc).

— Thực hành ria cấy trên môi trường thạch nghiêng với ống giống nấm men. Sau khi nuôi cấy quan sát sự phát triển của nấm men trên môi trường.

— Quan sát sự phát triển trên môi trường lỏng, bán lỏng của một nhóm vi khuẩn nào đó, nói rõ đặc điểm sinh trưởng của nó trên các môi trường này.

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Dụng cụ :

Cân
Cối sứ
Đèn cồn
Que cấy
Pipét
Ống nghiệm
Que thủy tinh
Giá đỡ ống nghiệm

Nguyên liệu :

Môi trường Hansen thạch đĩa
Môi trường Hansen thạch nghiêng.
Mẫu bánh men.
Nước cất.
Ống giống nấm men thạch nghiêng.

BÀI 6

ĐẾM SỐ LƯỢNG VÀ ĐO KÍCH THƯỚC TẾ BÀO VI SINH VẬT

Đếm số lượng và đo kích thước tế bào có tầm quan trọng lớn trong công tác nghiên cứu vi sinh vật. Để theo dõi tốc độ sinh trưởng phát dục của một loại vi sinh vật nào đấy người ta cần phải xác định được số lượng vi sinh vật phát triển trong một thời gian và trong một môi trường xác định. Trong phân lập kiểm định và nuôi dưỡng vi sinh vật thuần khiết cần tiến hành đo kích thước tế bào.

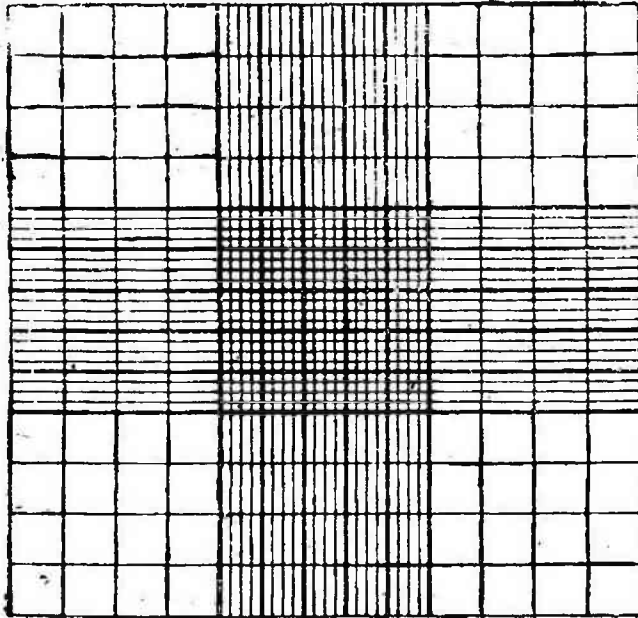
A — PHƯƠNG PHÁP ĐẾM SỐ LƯỢNG TẾ BÀO VI SINH VẬT

Có hai phương pháp đếm số lượng tế bào thường được sử dụng, đó là phương pháp đếm trực tiếp bằng buồng đếm và phương pháp đếm gián tiếp trên môi trường thạch đĩa.

I - ĐẾM TRỰC TIẾP BẰNG BUỒNG ĐẾM HỒNG CẦU

Thường dùng để đếm tế bào vi sinh vật có kích thước lớn như nấm men, bào tử nấm mốc.

Người ta thường dùng hai loại buồng đếm là buồng đếm Nơ-bao-ơ và buồng đếm Go-ri-a-ép. Nguyên tắc cấu tạo của hai



loại buồng đếm này như nhau. Lưới đếm của buồng đếm gốc có nhiều ô vuông lớn, mỗi ô vuông lớn lại chia thành nhiều ô vuông nhỏ có diện tích mỗi ô là $1/400 \text{ mm}^2$ và chiều cao mỗi ô là $0,1 \text{ mm}$ (Hình 17).

Hình 17: Buồng đếm Niu-bao-ơ
C — Lưới đếm và vị trí ô cần đếm

1. Công tác chuẩn bị:

Cách lấy mẫu và xử lý mẫu giống như đã trình bày ở bài trước. Cần chú ý là nếu mẫu có nồng độ lớn thì phải pha loãng với nồng độ cần thiết để đảm bảo cho tế bào phân bố trong lưới đếm đều không dày quá. Khi pha loãng phải ghi lấy hệ số pha loãng của mẫu.

Chuẩn bị buồng đếm: Đặt lá kính ngay giữa buồng đếm, ở vị trí lưới đếm. Dùng đĩa thủy tinh hoặc ống hút vô trùng lấy một giọt mẫu (sau khi đã lắc đều dịch mẫu) nhỏ vào mép lá kính, do mao dẫn giọt mẫu sẽ được dàn đều trên lưới đếm. Nếu quan sát không thấy bọt khí ở vùng lưới đếm là được. Để yên trong vài phút, dùng kính hiển vi quang học có độ phóng đại thích hợp để đếm.

2. Cách đếm:

Đặt buồng đếm lên khay kính, điều chỉnh để quan sát thấy rõ lưới đếm và tế bào trong lưới đếm. Tiến hành đếm tế bào trong 5 ô lớn chéo nhau. Cần chú ý là đếm theo một qui tắc hợp

lý để tránh nhầm lẫn, như có thể đếm theo chiều từ trên xuống dưới, từ trái qua phải. Khi đếm chỉ đếm số tế bào nằm trong ô và các tế bào nằm trên cạnh ô nhưng có phần tế bào nằm trong ô lớn. Sau khi đếm xong rửa sạch và sấy khô buồng đếm.

3. Cách tính

Trước hết tính số tế bào bình quân trong một ô nhỏ. Số lượng tế bào đếm trong 5 ô lớn là số lượng tế bào ở 80 ô nhỏ.

Thể tích của một ô nhỏ là $\frac{1}{4000} \text{ mm}^3$. Vậy số lượng tế bào trong một ô nhỏ chính là lượng tế bào có trong $\frac{1}{4000} \text{ mm}^3$ ($\approx \frac{1}{400.000} \text{ ml}$) dịch mẫu.

Vậy công thức để tính số lượng tế bào trong 1 ml dịch mẫu hay 1 gam vật chất khô của mẫu là:

$$B = A \times 400.000 \times N \times K$$

B: là số tế bào trong 1 ml dung dịch mẫu hay 1 gam vật chất khô của mẫu.

A: số lượng tế bào bình quân trong một ô nhỏ.

N: Hệ số pha loãng (10^n).

K: Hệ số khô của mẫu.

$$\text{Mẫu lỏng } K = 1$$

$$\text{Mẫu khô } K = \frac{100}{100 - \text{độ ẩm \% của mẫu}}$$

II - ĐẾM GIÁN TIẾP BẰNG ĐẾM SỐ KHUẨN LẠC TRÊN MÔI TRƯỜNG THẠCH ĐĨA

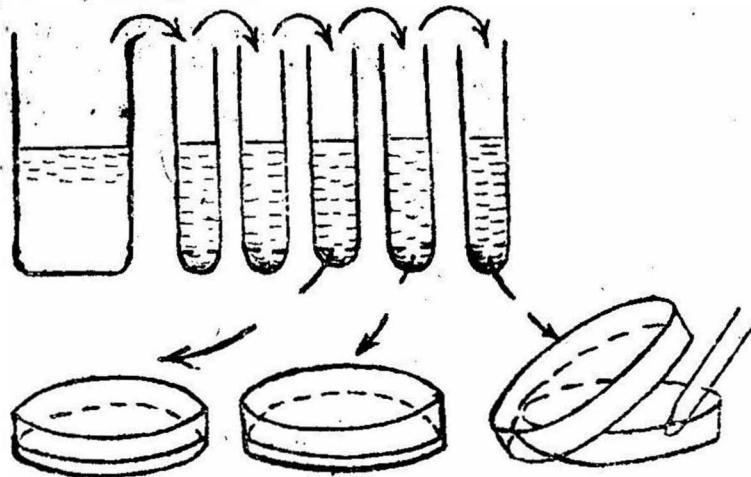
Số lượng tế bào có trong mẫu được tính theo một công thức tính dựa trên số khuẩn lạc đếm được khi cấy chúng ở trên thạch đĩa. Cách tiến hành như sau:

1. Công tác chuẩn bị:

Lấy mẫu và xử lý mẫu như đã trình bày ở bài phương pháp phân lập. Nhưng đặc biệt chú ý đến độ chính xác khi lấy

mẫu và pha loãng. Sau đó cấy trên môi trường đã được chuẩn bị sẵn theo một trong hai phương pháp như đã trình bày ở phía phương pháp cấy phân lập.

Với phương pháp cấy hỗn hợp thì hút chính xác 1 ml dịch mẫu. Với phương pháp rìa cấy thì hút chính xác 0.1 ml dịch mẫu rìa cấy đều trên mặt thạch. Ở mỗi độ pha loãng cấy 3 đĩa và cấy với 3 độ pha loãng liên tiếp (hình 18). Ghi rõ ngày giờ cấy và độ pha loãng trên nắp hộp.



Hình 18: Phương pháp rìa cấy để đếm số lượng tế bào vi sinh vật

Đếm số khuẩn lạc mọc sau một thời gian môi cấy. Ví dụ đối với vi khuẩn thì sau 1 – 2 ngày, nấm men sau 2 – 3 ngày, nấm mốc sau 3 – 5 ngày nuôi cấy.

2. Cách đếm.

Dùng bút chia phía dưới đáy đĩa thành một số khu vực để đếm cho dễ, nhớ đánh dấu các khuẩn lạc đã mọc trong từng khu vực. Sau khi đã đếm toàn bộ số khuẩn lạc ở 3 đĩa trong cùng một độ pha loãng thì tính số khuẩn lạc bình quân trong một đĩa. Dùng công thức để tính số tế bào có trong mẫu.

3. Cách tính.

Công thức
$$B = \frac{A \cdot N \cdot k}{a}$$

B: là số lượng tế bào có trong 1 ml mẫu hay trong 1 gam vật chất khô của mẫu.

A: Số lượng khuẩn lạc bình quân trong một đĩa.

N: Hệ số pha loãng (10^n)

a: Lượng mẫu dùng để nuôi cấy.

k: Hệ số khô của mẫu

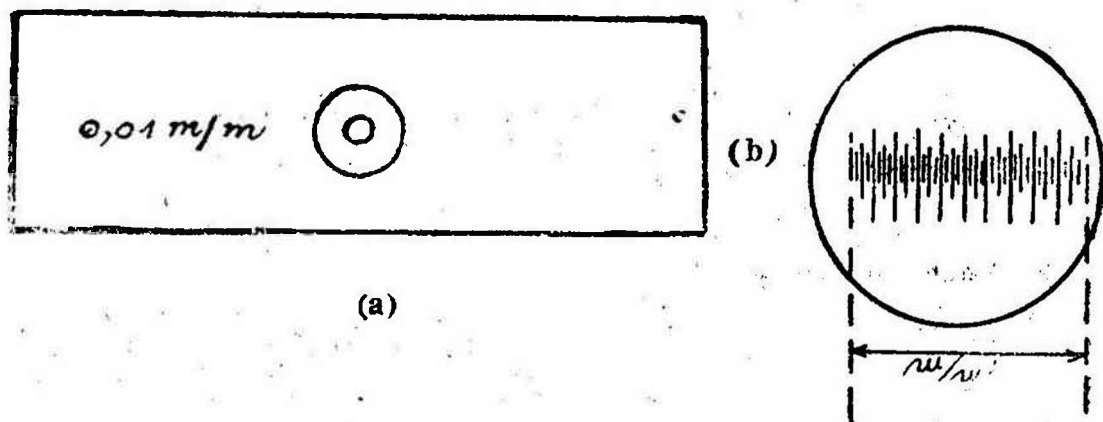
B — PHƯƠNG PHÁP ĐO KÍCH THƯỚC TẾ BÀO VI SINH VẬT

Muốn đo kích thước tế bào người ta sử dụng loại thước đo đặc biệt: Thước đo thị kính và thước đo vật kính.

I — CẤU TẠO VÀ CÁCH SỬ DỤNG THƯỚC ĐO

1. Cấu tạo.

Thước đo vật kính là một bản thủy tinh hay kim loại có kích thước như một phiến kính, ở giữa có một vòng tròn (nếu là kim loại thì ở giữa có một vòng tròn bằng kính). Trong đó có khắc một thước 1mm chia thành 100 khoảng bằng nhau, như vậy mỗi khoảng có độ dài là 10μ (micro) (hình 19). Khi dùng đặt lên khay kính như xem một tiên bản.



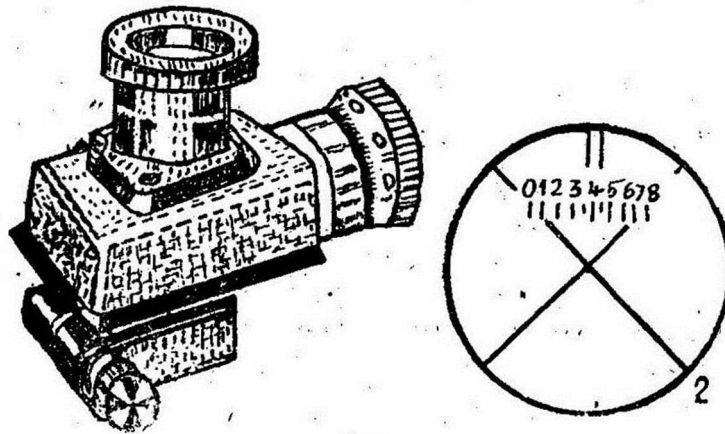
Hình 19: Thước đo vật kính

A — Nhìn ngoài

B — Thước đo bên trong

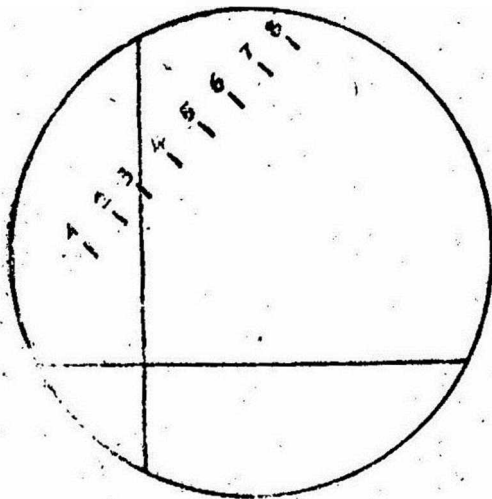
Thước đo thị kính (hình 20) khi dùng gắn ở đầu ống kính thay cho thị kính, vì vậy có thể xem thước này như một thị kính có cấu tạo đặc biệt. Ngoài phần kết cấu giống thị kính nó còn có thêm thước đo và bộ phận điều chỉnh. Có thể nhìn thấy một hệ thống được gắn trong thước đó. Đó là một vạch thẳng được chia làm 8 phần đều nhau (đánh số từ 0 — 8) phần trên có một vạch đôi và một hệ thống giao điểm gồm 2 vạch giao nhau và vuông góc với nhau. Toàn bộ hệ thống vạch này có thể di động được từ trái sang phải và ngược lại là do một ốc điều chỉnh ở bên ngoài gắn liền với thước đo. Trên vành ngoài của

Ốc điều chỉnh này được chia thành 100 khoảng đều nhau (đánh số từ 0 — 100) mỗi một vòng quay của ốc tương ứng với một đơn vị độ dài của thước đo thị kính. Có nghĩa là nếu ta xoay từ điểm 0 theo một chiều và cho trở lại vị trí 0 thì hệ thống vạch trong thước đo sẽ di chuyển được một vạch trên thước từ 0 đến 1 hoặc từ 1 đến 2.



Hình 20: Thước đo thị kính 1 — cấu tạo bên ngoài
2 — thước đo ở trong

2. Cách sử dụng.

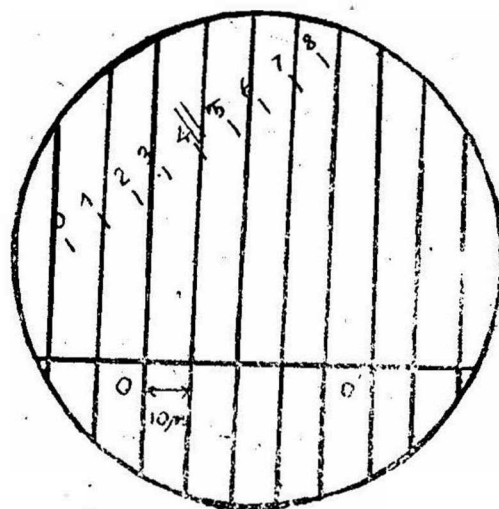


Hình 21: Vị trí của thước đo thị kính khi xác định hệ số đo.

Trước khi tiến hành đo kích thước tế bào vi sinh vật ở độ phóng đại nhất phải xác định được hệ số đo của thước đo thị kính, có nghĩa là xác định được độ dài của một khoảng cách được chia trên thước tương ứng với từng độ phóng đại khác nhau. Hệ số đo của thước khác nhau khi sử dụng vật kính khác nhau và với kính hiển vi khác nhau.

Muốn xác định được hệ số đo này ta cần sử dụng thước đo vật kính có độ phóng đại đã biết. Cụ thể tiến hành như sau:

Lắp thước đo vật kính vào khay kính, điều chỉnh tiêu điểm để xem rõ ảnh của thước trong thước đo vật kính. Lắp thước đo thị kính vào thay cho thị kính điều chỉnh cho vạch đôi về điểm 0 của thước đo thị kính (hình 21a) sau đó điều chỉnh cho một vạch nào đó trên thước đo vật kính trùng khít với trục tung của trục tọa độ (hình 22).



Hình 22: Vị trí của thước đo thị kính và thước đo vật kính khi xác định hệ số đo.

Vặn ốc điều chỉnh trên thước đo thị kính để cho hệ thống giao điểm chuyển dịch đi một khoảng từ 0 -- 0' có chiều dài được xác định bằng số vạch trên thước đo vật kính. Như vậy độ dài trên thước đo thị kính cũng được xác định.

Căn cứ vào độ dài đã biết khi di chuyển trên thước đo vật kính sẽ tính được độ dài của một đơn vị của thước đo thị kính. Đó chính là hệ số đo.

Ví dụ: Xác định hệ số đo với vật kính $\times 40$ của một kính hiển vi nào đó.

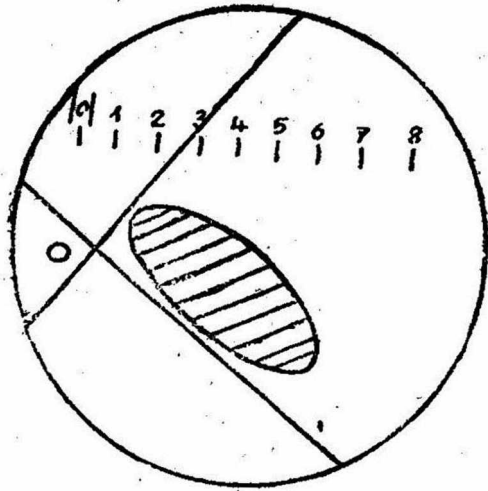
Khi dịch chuyển hệ thống giao điểm của một đoạn 00' có khoảng cách được xác định bởi 6 đơn vị chia độ trên thước vật kính. Khi đó vạch đôi cũng chuyển dịch tương ứng một đoạn dài 5 đơn vị chia độ trên thước đo thị kính nhìn trên khác độ của núm điều chỉnh thấy con số 65. Vì vậy độ dài được dịch chuyển trên thước đo thị kính là 5,65. Ta đã biết rằng mỗi một đơn vị chia độ trên thước đo vật kính có độ dài là 10 μ . Vậy có hệ số đo của vật kính 40 là:

$$d = \frac{6 \times 10\mu}{5,65} = 10,62$$

II - CÁCH ĐO KÍCH THƯỚC TẾ BÀO

Khi đo kích thước tế bào ta phải đo kích thước của cả hai chiều dài và rộng. Các bước tiến hành cụ thể như sau:

— Đặt tiêu bản lên khay kính, điều chỉnh để thấy rõ ảnh của tế bào vì sinh vật cần đo.



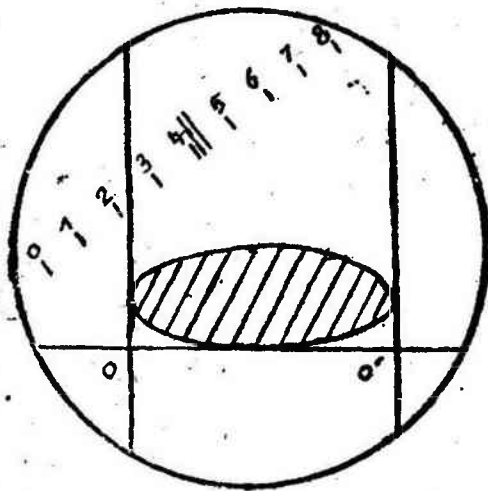
Hình: 23 Vị trí ban đầu để chuẩn bị đo tế bào

— Đưa vạch đôi về vị trí 0 trên thước đo và điều chỉnh để đưa tế bào vào nằm sát trục tung và cạnh ngang của tế bào nằm sát trục hoành của trục tọa độ, nhưng 2 đường vuông góc cắt dọc và cắt ngang tế bào phải song song với trục hoành và trục tung của tọa độ (hình 23).

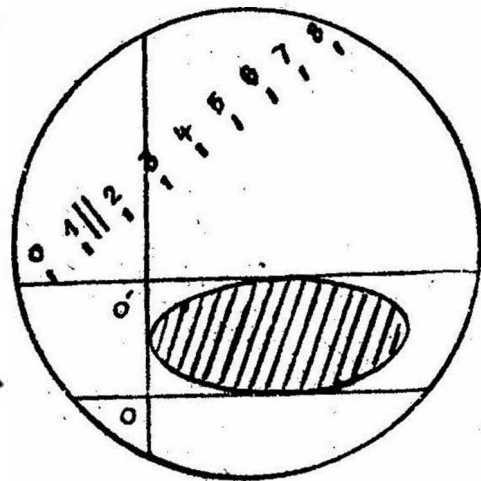
— Đo chiều dài: Vận ốc điều chỉnh để trục tọa độ di chuyển một đoạn 00' có độ dài xác định bằng đúng chiều dài tế bào vi sinh vật (khi đó trục tung của

tọa độ nằm sát đầu kia của tế bào.

Quan sát vị trí của vạch đôi trên thước đo và khắc độ di chuyển trên vạch chia độ của núm điều chỉnh để xác định số đơn vị trên thước đo thì kính ứng với độ dài của tế bào. Cụ thể số đơn vị được xác định là 4,50 (hình 24a).



Hình 24a: Vị trí của tế bào và thước đo khi đo xong chiều dài tế bào



Hình 24b: Vị trí của thước đo khi đo xong chiều rộng

— Đo chiều rộng: Vận núm điều chỉnh để đưa tọa độ về vị trí ban đầu (hình 23). Sau đó vận núm điều chỉnh để trục tọa độ di chuyển một đoạn 00' có độ dài xác định bằng đúng chiều rộng của tế bào (khi đó trục hoành của trục tọa độ nằm sát cạnh ngang kia của tế bào. Xác định số đơn vị trên thước đo thì kính với độ rộng của tế bào. Cụ thể số đơn vị được xác định là 2,65 (hình 24b).

– **Tính toán:** Lấy số đơn vị trên thước đo thị kính ứng với chiều dài và chiều rộng của tế bào sau khi đo đem nhân với hệ số đo của vật kính đem dùng.

Ví dụ: khi đo chiều dài và chiều rộng của tế bào nấm men nào đó với vật kính $\times 40$ đã được xác định hệ số đo (như kết quả phần trên) là 10,62 thì chiều dài của tế bào đo được là 4,25 đơn vị trên thước đo thị kính và chiều rộng là 1,39 đơn vị.

Vậy chiều dài của tế bào là: $4,50 \times 10,62 = 47,8\mu$.

Chiều rộng của tế bào là: $2,65 \times 10,62 = 28,1\mu$.

NỘI DUNG THỰC TẬP VÀ TƯỜNG TRÌNH

Thực hành đếm số lượng tế bào nấm men theo 2 phương pháp, phương pháp dùng buồng đếm hồng cầu và phương pháp đếm khuẩn lạc trên môi trường thạch đĩa với mẫu đã pha loãng trước.

Ghi tóm tắt cách pha loãng mẫu và kết quả đếm được thực hành đo kích thước tế bào nấm men với kính $\times 40$ và $\times 90$ đã được xác định hệ số đo.

Ghi tóm tắt cách xác định hệ số đo và kết quả kích thước tế bào nấm men đã đo được.

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Dụng cụ:

Kính hiển vi

Buồng đếm hồng cầu

Đèn cồn

Đũa thủy tinh

Que cấy

Thước đo vật kính

Thước đo thị kính.

Nguyên liệu:

Tiêu bản nấm men đã làm sẵn

Dung dịch mẫu đã pha loãng sẵn

Môi trường thạch đĩa Hansen.

PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA CÁC PHẢN ỨNG CHUYÊN HÓA VẬT CHẤT CỦA VI SINH VẬT

Vấn đề kiểm tra đặc tính sinh hóa của vi sinh vật có một ý nghĩa quan trọng trong công tác kiểm định vi sinh vật. Căn cứ vào kết quả kiểm tra người ta sẽ xác định những vi sinh vật hiện đang xét đoán là thuộc nhóm vi sinh vật nào, thuộc chủng giống nào.

Người ta tiến hành kiểm tra đặc tính sinh hóa của các chủng vi sinh vật được nuôi cấy thuần, để kiểm tra độ thuần chủng của các chủng.

Trong công tác kiểm tra người ta cũng chỉ tiến hành làm những nội dung cần thiết có liên quan đến mục đích của việc làm mà thôi.

Nội dung và phương pháp tiến hành cụ thể của việc kiểm tra đặc tính sinh hóa gồm có.

I – PHẢN ỨNG THỬ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI ĐƯỜNG

Để thử khả năng phân giải đường người ta dùng các môi trường không chứa cacbon như môi trường nước pépton, môi trường nước giá đậu hay các môi trường tổng hợp khác. Trong các môi trường này sẽ cho vào lượng thích hợp các loại đường cần thử khả năng phân giải.

Thử lên men đường với môi trường nước pépton.

Pépton	10g
NaCl	5g
Nước cất	100g

Đun sôi ở 100°C cho tan hết, sửa độ pH \approx 7,4. Lọc kỹ qua giấy lọc 2 — 3 lần. Hấp ưôt khử trùng ở 120°C trong 30 phút.

Trong khi thử cho thêm thuốc chỉ thị màu vào môi trường, có thể dùng chỉ thị màu Andrade.

Fúcsin axit	0,5g
Nước cất	100 ml
Dung dịch NaOH 1N	16 ml

Nghiền fúcsin axit trong cối sứ với nước cho tan hết, cho NaOH 1N vào từ từ vừa cho vừa lắc nhẹ đến khi nào mẫu chuyển từ màu đỏ tươi sang màu nâu, sau đến vàng úa rồi đến vàng thẫm là được (lượng NaOH 1N dùng trong khoảng 16 ml). Sau 1 – 2 giờ lắng cặn, lọc qua giấy. Hấp ướt 120°C trong 15 – 30 phút.

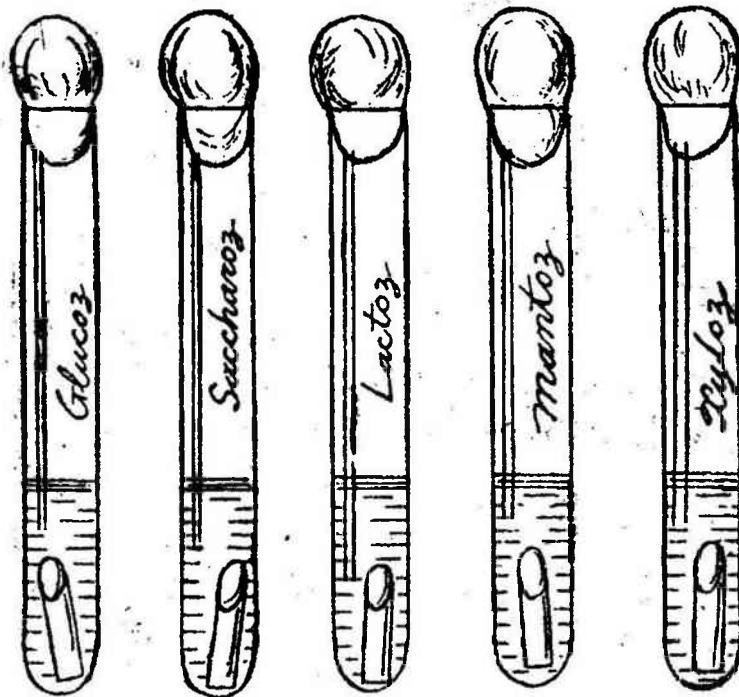
Phương pháp tiến hành thử.

– Cho thuốc chỉ thị màu Andrade vào môi trường theo tỉ lệ 1/10.

– Phân biệt cho từng loại đường vào các ống đựng môi trường theo nồng độ 1% hoặc 2%.

– Hấp khử trùng cùng với ống lên men (Enhorn – Smith) hay ống nghiệm 16 × 1,4 cm, trong đó có chứa ống thủy tinh nhỏ có đáy (gọi là ống Durham) (hình 25).

Khử trùng ướt ở 110°C trong 15 – 30 phút hoặc hấp cách quãng 100°C – 30 phút trong 3 ngày liền.



Hình 25: Thử lên men
Các loại đường

Cần chú ý là: Sau khi khử trùng môi trường có màu vàng cổ sáng. Nếu có màu hồng phải dùng NaOH 1N điều chỉnh. Chú ý các loại đường bị biến đổi ở nhiệt độ cao khi khử trùng.

– Phân môi trường vào ống lên men hoặc ống nghiệm có ống Durham. Đổ môi trường ngập bên ống chia độ và lên tới 1/5 của bên bầu tròn của ống lên men Enhorn – Smith, hoặc đổ 3 – 4 ml môi trường vào ống nghiệm có ống Durham.

— Cây giống vi sinh vật cần thử vào các ống môi trường đã chuẩn bị xong, đặt ở nơi có nhiệt độ 25 – 30°C nuôi cấy.

— Thường xuyên theo dõi kết quả, được xác định ở các dạng phân giải sau.

+ Phân giải đường sinh axit: Nếu vi sinh vật có khả năng phân giải đường sinh axit thì kết quả sẽ làm cho môi trường chuyển từ màu vàng sang màu đỏ. Ngược lại sẽ không có sự chuyển màu.

+ Phân giải đường sinh hơi: Nếu vi sinh vật phân giải đường thì trong các ống thấy xuất hiện bọt khí.

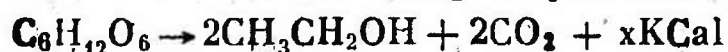
Trong ống lên men Eulrorn – Smth sẽ thấy tầng khí ở phần có chia độ và trong ống có ống Durham bọt khí đẩy ống Durham nổi lên.

Quá trình phân giải kỵ khí các hợp chất hữu cơ không có chứa Nitơ được gọi chung là quá trình lên men.

Các nhóm vi sinh vật có khả năng lên men đường khi tiến hành lên men đường sẽ cho các sản phẩm chứa ô xy hóa hoàn toàn được tích lũy lại sau quá trình lên men khác nhau căn cứ vào các sản phẩm này người ta đặt tên cho các quá trình lên men. Sau đây chúng ta sẽ xét đến một số quá trình lên men.

1. Lên men rượu (Ethylíc).

Nhóm vi sinh vật lên men mạnh nhất là nấm men ngoài ra có đại diện của nấm mốc và vi khuẩn nhưng số lượng rất ít. Quá trình lên men theo phản ứng chuyển hóa sau:



Xác định khả năng lên men rượu.

Cây giống vi sinh vật cần xác định khả năng lên men rượu vào môi trường lên men đã được khử trùng và phân phối vào ống lên men hay ống nghiệm có chứa ống Durham (như đã chỉ dẫn ở phần trên). Nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp và thường xuyên theo dõi cột nước trong ống lên men hay ống Durham. Lượng CO₂ sinh ra mạnh thì cột nước tụt xuống nhanh, chứng tỏ khả năng lên men rượu mạnh. Nếu cột nước không tụt xuống là không có lên men.

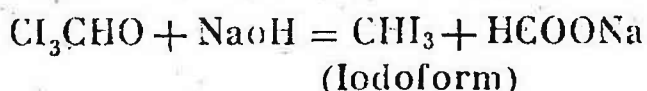
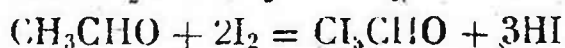
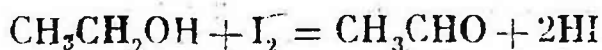
Để thấy rõ khả năng lên men rượu, trong thí nghiệm có thể sử dụng nấm men Saccharomyces Cerevisiac trên môi trường lên men có đường glucoz.

Kiểm tra sự hình thành rượu.

Để kiểm tra có sự xuất hiện rượu trong quá trình lên men hay không có thể dùng các phản ứng định tính sau:

– Phản ứng tạo thành Iodoform.

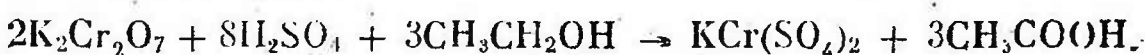
Trong môi trường có rượu ethylic với sự có mặt của Iod (I_2) và xút (NaOH) ở điều kiện có sự tăng nhiệt thì sẽ có phản ứng tạo thành Iodoform tinh thể màu vàng.



Lấy vào ống nghiệm 5ml dịch lên men, cho thêm vào khoảng 0,1g I_2 và 5ml NaOH 20%. Đun nhẹ và giữ ở nhiệt độ trong khoảng 50 – 60°C cho tan hết và mất màu. Để nguội và quan sát sự xuất hiện của tinh thể Iodoform.

– Phản ứng với $K_2Cr_2O_7$.

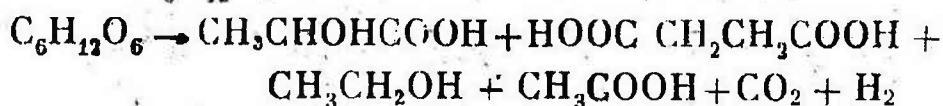
Khi cho $K_2Cr_2O_7$ vào trong môi trường có rượu ethylic với sự có mặt của axit sunfuric (H_2SO_4) sẽ xuất hiện phản ứng cho màu vàng lục.



Lấy vào ống nghiệm 5ml dịch lên men, cho vào 5ml axit sunfuric đặc rồi thêm vào những giọt $K_2Cr_2O_7$ 1% theo thành ống vào cho đến khi xuất hiện màu.

2. Lên men Lactic.

Một số vi sinh vật có khả năng lên men cho axit lactic. Trong đó có nhóm vi sinh vật lên men lactic điển hình, khi lên men cho ra chỉ là axit lactic và nhóm vi sinh vật lên men lactic không điển hình thì sản phẩm ngoài axit lactic ra còn có một lượng các sản phẩm khác như rượu ethylic, axit Xucxinic...



Xác định khả năng lên men Lactic.

Tiến hành bằng thí nghiệm ủ xanh thức ăn, ủ chua thức ăn và làm sữa chua.

— Thức ăn xanh rửa sạch, thái khúc hoặc để nguyên, sau khi kiểm tra và điều chỉnh độ ẩm (còn khoảng 75%) thì cho vào dụng cụ thí nghiệm nèn chặt, đậy kín để ở nhiệt độ 30–34°C trong thời gian 10 – 15 ngày.

— Thức ăn xanh như dưa, bắp cải... thái nhỏ, phơi tái cho vào nước muối 2% ngập thức ăn, đậy kín để ở nhiệt độ 30–32°C trong 2 – 3 ngày.

— Sữa tươi cho vào bình tam giác, đậy kín để ở nhiệt độ 30 – 32°C trong một ngày.

Sau thời gian thí nghiệm lấy thức ăn ra kiểm định về trạng thái, màu sắc, mùi vị, đồng thời lấy tiêu bản phết kính kiểm tra vi khuẩn lactic và tiến hành định tính và định lượng axit lactic.

Phản ứng định tính axit lactic.

Phản ứng với thuốc thử Tioghen. Lấy 5ml dịch lên men cho vào ống nghiệm, cho thêm 5ml H₂SO₄ đặc và 0,5ml dung dịch CuSO₄ bão hòa. Lắc đều và đun sôi cách thủy trong 5 phút. Sau đó lấy ra để nguội và nhỏ vài giọt dung dịch thuốc thử

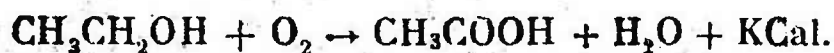
Tioghen (C₄H₄S) 0,2%. Quan sát sự chuyển màu, nếu có axit lactic thì xuất hiện màu mận chín.

Phản ứng với thuốc thử. Uphenmen.

Lấy 5ml dịch lên men cho vào ống nghiệm, cho từng giọt thuốc thử Uphenmen. Quan sát sự chuyển màu của thuốc thử. (Phản ứng định lượng axit lactic xem ở giáo trình thực tập phân tích thức ăn).

3. Lên men Axêtic.

Quá trình oxy hóa rượu thành axit axêtic được gọi là quá trình lên men axêtic hay còn gọi là lên men dấm. Thực hiện quá trình lên men này là do một nhóm vi khuẩn được ghép chung vào một giống riêng biệt là axeto bacter. Phản ứng tạo dấm như sau :



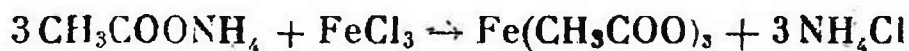
Xác định khả năng lên men Axêtic.

— Cho bia vào bình tam giác với lượng bằng một nửa dung tích của bình, đậy bằng nút bông. Để ở nhiệt độ 30°C trong thời gian từ 5 – 7 ngày.

— Sau thời gian thí nghiệm, lấy ra kiểm tra màu sắc mùi vị của môi trường, đồng thời quan sát trên bề mặt cổ xuất hiện vàng trắng hay không, kết hợp làm tiêu bản phết kính để kiểm tra vi khuẩn axêtic.

Quan sát vi khuẩn axêtic. Lấy một giọt dịch trên bề mặt của dịch lên men để làm tiêu bản giọt ép. Để quan sát rõ có thể nhỏ thêm vào tiêu bản một giọt lugol. Vi khuẩn axêtic có dạng hình que liền kết với nhau thành chuỗi có thể quan sát thấy hình dạng khác nhau như hình phân nhánh.

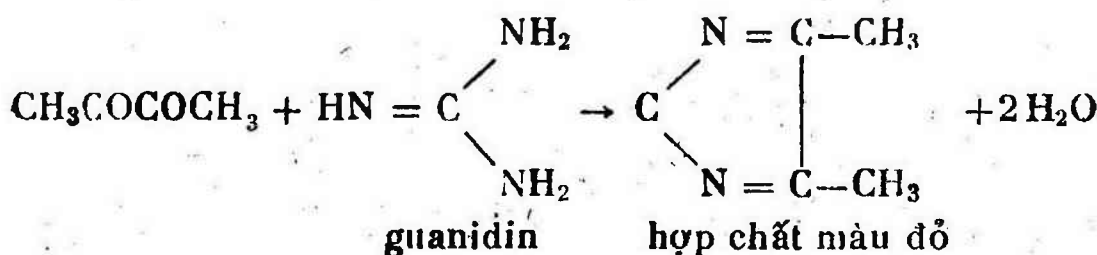
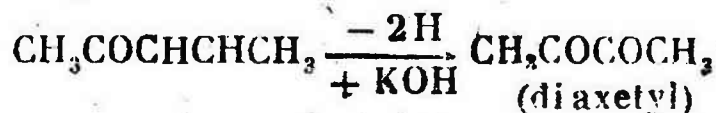
Phản ứng định tính axit axetic: cho vào ống nghiệm 5 ml dịch lên men và 1 ml dung dịch NH_4OH , nhỏ vào vài giọt dung dịch FeCl_3 5%, đun nóng. Quan sát sự chuyển màu của dung dịch. Nếu trong dung dịch có axit axetic thì sẽ tạo thành sắt axetat, kết quả sẽ làm cho dung dịch có màu đỏ xẫm, theo phản ứng sau:



Có thể định lượng axit axetic bằng phương pháp chuẩn độ như hướng dẫn ở giáo trình phân tích thức ăn.

II — PHẢN ỨNG V. P. (VOGES — PVOSKAUER)

Thí nghiệm V. P. chủ yếu dùng để kiểm tra *E. coli* và *Aerobacter*. Cả hai loại đều có khả năng lên men glucôz tạo thành axit pyruvic. *E. coli* chuyển hóa axit pyruvic thành etanol, axit axetic, H_2 , CO_2 , axit lactic và axit xuxinic. Còn *Aerobacter* chuyển pyruvic thành axetyl methyl cacbinol [$\text{CH}_3\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$] hay axetoin ($\text{CH}_3\text{COCHOCH}_3$). Trong môi trường kiểm chúng bị oxy hóa thành đi axetyl sẽ kết hợp với nhóm guanidin chứa trong Acginin của pepton tạo thành hợp chất màu đỏ (Phản ứng V. P dương tính).



1 – Môi trường thí nghiệm:

Để thử phản ứng V.P người ta thường dùng môi trường sau đây:

Pép ton	0,5 g
Glucos	0,5 g
KH_2PO_4	0,5 g
Nước cất	100 ml

pH \approx 7,5

Môi trường được phân ra ống nghiệm, mỗi ống từ 5–10ml. Hấp khử trùng $110^\circ C$ – 15 phút, hoặc hấp cách quãng 3 lần.

2 – Phương pháp tiến hành.

Cấy vi sinh vật cần xác định vào môi trường trên. Nuôi cấy ở tủ ấm $37^\circ C$ trong 4 ngày. Lấy ra cho vào dung dịch KOH 10% tương đương với lượng môi trường, để ở nhiệt độ trong phòng sau 24 giờ xem kết quả. Nếu có màu hồng là phản ứng dương tính, ngược lại là phản ứng âm tính.

III – PHẢN ỨNG M. R (ROUGE METHYL)

Phản ứng M. R cũng chủ yếu dùng để phân biệt Ecoli và Aerobacter. Như đã xét ở phần phản ứng V.P, hai loại vi sinh vật này phân giải đường thành pyruvic. E. coli tiếp tục phân giải pyruvic thành nhiều dạng axit làm cho pH môi trường giảm, pH là 4,5 hay thấp hơn nữa, khi môi trường có thêm đỏ methyl sẽ có màu đỏ (phản ứng dương tính). Còn Aerobacter phân giải pyruvic thành axetyl methyl cacbinol làm cho môi trường có độ pH cao hơn trong môi trường có E. Coli (pH \approx 5,4)

1. Môi trường và thuốc thử.

Môi trường như trong phản ứng V. P.

Thuốc thử: Dung dịch đỏ methyl chế như sau:

Độ Metyl	0,04 g
Cồn 95°	60 ml
Nước cất	40 ml.

Nghiền nguyên liệu với cồn cho tan hết, sau đó cho nước cất vào.

2. Phương pháp tiến hành.

Cấy vi sinh vật cần xác định vào môi trường. Để ở tủ ấm 37°C trong 4 ngày. Lấy ra cho vào mỗi ống 0,2 — 0,5 ml dung dịch đỏ metyl. Nếu có màu đỏ là phản ứng dương tính. Ngược lại nếu có phản ứng màu vàng là phản ứng âm tính, còn giữa đỏ và vàng là khả nghi.

IV — PHẢN ỨNG XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG ĐỒNG HÓA XITRAT

1. Môi trường thí nghiệm: Môi trường Simmons:

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,0 g
MgSO_4	0,2 g
K_2HPO_4	1,0 g
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (xitratnatri)	23 g
NaCl	5 g
Thạch	20 g
Nước cất	100 ml

Dung dịch xanh bromtymol 0,5% trong cồn 20 ml. Sau khi hỗn hợp nguyên liệu với thạch, đun chảy, điều chỉnh pH = 6,8, cho vào dung dịch chỉ thị màu. Phân vào ống nghiệm, mỗi ống 3 ml; hấp khử trong 120°C trong 30 phút.

2. Phương pháp tiến hành

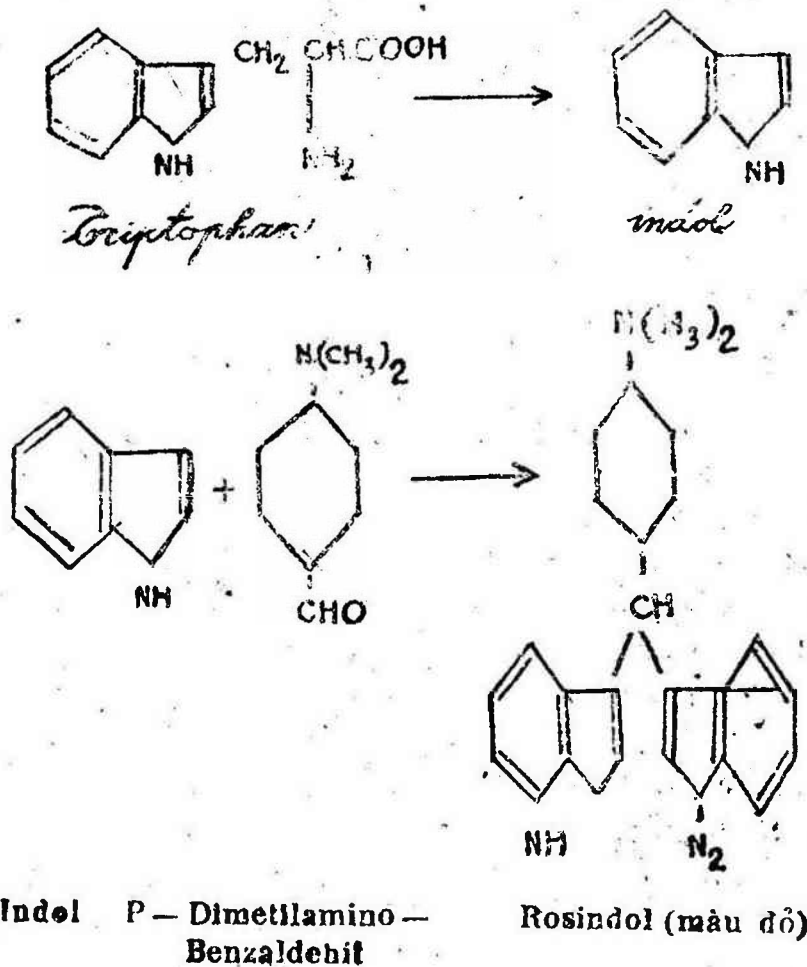
Cấy hai loại vi khuẩn cần giám định vào môi trường thạch nghiêng trên. Nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 — 20 giờ. Nếu như những loại vi khuẩn có thể sử dụng được muối xitrat chúng sẽ phát triển hình thành các khuẩn lạc và môi trường biến từ màu xanh lục sang màu xanh lam, do sự lợi dụng xitrat và phát NH₄ sẽ làm sinh các hợp chất kiềm.

Các loại vi khuẩn như *Aerobacter proteus Vulgaris*... có thể sử dụng được xitrat; các loại khác như *E. Coli* không phát triển được.

Có thể chế môi trường trên nhưng không cho axetat chì. Dùng giấy lọc 1 – 4cm có làm axetat chì 10% – 20% sấy khô để thử phản ứng, khi thử, gài các giấy này vào thành trong miệng ống sau 2 – 4 ngày (hoặc lâu hơn) theo dõi thấy giấy thử có màu nâu đen là có H₂S sinh ra.

VII – PHẢN ỨNG XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG SINH INDOL

Một số loại vi khuẩn có khả năng phân giải Tryptophan tạo thành indol, khi cho thuốc thử vào ta sẽ thấy phản ứng màu sinh ra do indol kết hợp với một hợp chất trong thuốc thử (xem công thức sau).



1. Môi trường và thuốc thử phản ứng.

Môi trường thường dùng là nước peptôn.

Peptôn	1g.
NaCl	0,5g.
Nước cất	100ml.

Hỗn hợp các chất lại, sửa độ pH $\approx 7,5$. Hấp khử trùng ở 120°C trong 30 phút.

Thuốc thử: Có thể sử dụng hai loại thuốc thử khác nhau là thuốc thử Kovac (Kowacs) và thuốc thử Bô-mơ.

Thuốc thử Kôvac:

P. Dimethylamino benzaldehyt:	5g.
Rượu amylic hay Butylic	75ml.
HCl đặc	25ml.

Hỗn hợp P — dimethylamino benzaldehyt với cồn, để vào nước ấm $50 - 60^{\circ}\text{C}$. Lắc đều cho tan hoàn toàn, đợi nguội, nhỏ HCl vào từng giọt một, vừa nhỏ vừa lắc.

Thuốc thử Bô-mơ.

a) P — dimethylamino benzaldehyt	4g.
Cồn 95°	380ml.
HCl	80.

b) Dung dịch persulfat kali 1% trong nước cất.

2. Phương pháp tiến hành.

— Cấy vi khuẩn giám định vào ống môi trường nước peptôn, để ủ ấm 37°C trong 1 ngày.

— Lấy ra nhỏ lên trên mặt 4 — 5 giọt dung dịch Kovac lắc đều. Nếu xuất hiện vòng màu đỏ trên mặt môi trường là phản ứng có sinh indol (phản ứng dương tính, ngược lại là phản ứng âm tính).

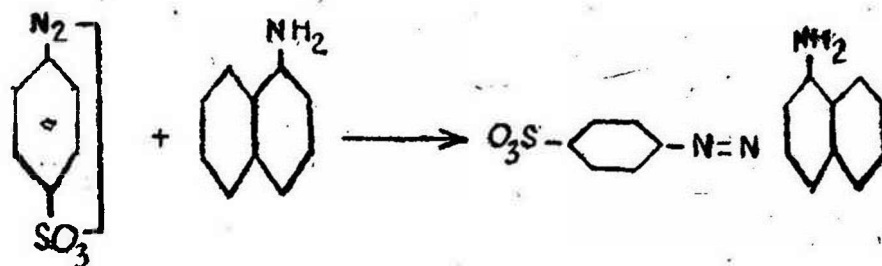
Hoặc có thể làm theo phương pháp sau:

— Cấy vi khuẩn vào môi trường xong đặt ở trong tủ ấm 37°C trong 4 ngày.

— Lấy ra cho vào mỗi ống môi trường 1ml ête, lắc đều, để vài phút, sau cho vào mỗi ống 1ml dung dịch (a) thuốc thử Bô-mơ, nếu thấy xuất hiện màu đỏ là phản ứng dương tính. Trong trường hợp chưa thấy màu đỏ thì cho vào mỗi ống 1ml dung dịch (b) thuốc thử. Nếu có màu đỏ xuất hiện là phản ứng dương tính, ngược lại là phản ứng âm tính.

VIII — PHẢN ỨNG THỬ KHẢ NĂNG KHỬ NITRÁT

Một số loại vi khuẩn có khả năng khử Nitrat thành Nitrit, NH_3 hoặc N_2 . Nếu trong môi trường có Nitrat bị khử thành Nitrit thì nó sẽ kết hợp với axit sunfanilic và α — naftilamin trong thuốc thử thành một hợp chất màu đỏ (sắc pháo).



α - naftilamin

Hợp chất có màu đỏ

1. Môi trường và thuốc thử:

Môi trường:

Pép ton	10g.
KNO ₃	1 - 2g.
Nước cất	1000ml.

Thuốc thử: gồm 2 dung dịch:

Dung dịch 1: α - naftilamin	0,5g.
axít axêtic 5N	100ml.
Dung dịch 2: sunfanilic axit	0,5g.
axít axêtic 5N	100ml.

2. Phương pháp tiến hành:

Cấy vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp. Sau một thời gian lấy ra cho vào dung dịch thuốc thử theo thứ tự từ dung dịch 1 đến dung dịch 2. Nếu có màu hồng là phản ứng dương tính. Nếu không xuất hiện màu hồng thì phản ứng ở một trong trường hợp sau đây.

- Vi sinh vật không có khả năng khử Nitrat thành Nitrit.
- Có khả năng khử Nitrat nhưng Nitrit lại bị khử tiếp thành NH₃ và N₂. Để xác định rõ người ta cho kẽm vào và kẽm sẽ khử Nitrat thành Nitrit, khi thử với thuốc thử sẽ có màu hồng và điều đó chứng tỏ Nitrat trong môi trường vẫn còn chưa bị khử.

— Vi sinh vật có khả năng khử Nitrát nhưng không phát triển được trên môi trường này.

IX — PHẢN ỨNG THỬ KHẢ NĂNG TẠO THÀNH NH₃

Nhiều loại vi sinh vật trong đất cũng như trong nước phân giải hợp chất tạo thành NH₃. Để xác định khả năng tạo thành NH₃ của chúng, người ta tiến hành theo phương pháp sau:

— Cấy vi sinh vật cần xác định vào môi trường nước thịt peptôn, hay môi trường nước peptôn. Dem nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp trong thời gian nhất định.

— Sau khi cấy vi sinh vật vào môi trường, đậy chặt nút bông, không cho khí bay ra. Trong ống có gài những miếng giấy làm thuốc thử dài khoảng 8 — 9 cm và rộng khoảng 0,5 cm. Thuốc thử có thể sử dụng mấy loại sau đây:

a) Giấy litmes có màu đỏ:

Khi gặp NH₃ màu đỏ sẽ chuyển thành màu xanh lam. Phải dùng loại giấy tốt.

b) Thuốc thử Nessler:

Gặp NH₃ xuất hiện màu nâu (30g Iodua kali được hòa tan trong nước cất thành 20 ml dung dịch. Dem hòa 22,5g Iod cho tan hết trong dung dịch này rồi cho thêm 50 g HgCl₂ vào, lắc kỹ. Nếu thử với tinh bột thấy chưa làm hiện màu phải thêm vài giọt KI để đủ làm hiện màu. Dùng nước cất pha loãng đến 200 ml trộn đều rồi thêm từ từ 975 ml NaOH 10%).

c) Thuốc thử Crup:

Gặp NH₃ thuốc thử từ màu vàng chuyển thành đỏ tươi. (Dung dịch fucsin bão hòa trong cồn pha với nước cất theo tỉ lệ 1/99. Dem hỗn hợp hai phần dung dịch này với một phần dung dịch H₂SO₄ 3%.

X — PHẢN ỨNG THỬ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI GÊLATIN

Có một số loại vi sinh vật có khả năng phân giải được gêlatin. Để xác định khả năng phân giải này người ta dùng nhiều cách. Một trong những cách đó như sau:

Đun chảy dung dịch gêlatin 5% đổ vào các ống nghiệm tạo thành môi trường gêlatin nghiêng và đứng. Để ở tủ lạnh bảo quản.

Cấy dung dịch có nuôi cấy vi sinh vật cần thử lên môi trường gêlatin. Cấy ria trên môi trường gêlatin nghiêng và cấy trích sâu vào môi trường gêlatin đứng.

Nuôi cấy ở 22°C trong 2 – 20 giờ hoặc lâu hơn nữa. Lấy các ống trên ra cho vào đó hỗn hợp dung dịch fomalín với dung dịch bão hòa $HgCl_2$ theo tỉ lệ 1/9. Sau 20 – 30 phút lấy ra rửa bằng nước rồi nhuộm bằng dung dịch fuesin cacbonic pha loãng trong nước (1%).

Nếu vi sinh vật có khả năng phân giải gêlatin thì chung quanh chỗ cấy vi sinh vật sẽ xuất hiện những vết trong suốt.

Ở ống môi trường đứng, nếu vi sinh vật có khả năng phân giải gêlatin thì chung quanh chỗ cấy thấy có hiện tượng gêlatin bị dịch hóa, cho vào tủ lạnh một lúc vẫn không trở lại trạng thái cũ.

NỘI DUNG THỰC TẬP VÀ TƯỜNG TRÌNH

– Nắm vững phương pháp và thao tác kiểm tra các phản ứng chuyển hóa vật chất của vi sinh vật.

– Thực hành kiểm tra các phản ứng lên men đường, lên men rượu, lên men lactic, lên men axêtic, quan sát kết quả thu được thử các phản ứng VP và MR, phản ứng phân giải tinh bột, phản ứng tạo thành H_2S , Indol... và các phản ứng khác.

Tường trình phải ghi kết quả của các phản ứng và giải thích các hiện tượng đã quan sát được của phản ứng.

Vẽ và miêu tả rõ các nhóm vi sinh vật đã quan sát được trong các môi trường lên men.

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Dụng cụ.

Ống lên men (Einhorn smith) hoặc ống Durham.

Bình tam giác 250 ml.

Ống nghiệm.

Bocan có nắp 10×20.

Đèn cồn.

Que cấy.

Ống hút kẻ độ 5 ml.

Phiến kính và lá kính.

Kính hiển vi và dầu soi kính.

Dao.

Nguyên liệu.

— Môi trường nước pèptôn và thuốc thử Andrade.

— Các loại đường.

— Iod tinh thể.

— Dung dịch NaOH 20%.

— Axit sunfuric (H_2SO_4) đặc.

— Dung dịch $K_2Cr_2O_7$ 1%.

— Thuốc thử Tiophen.

Tiophen 0.2g.

Cồn 96 100 ml.

— Thuốc thử Uphenman.

Phenol 5% 10ml.

$FeCl_3$ 5% 2ml.

— Nước cất.

— Dung dịch $CuSO_4$ bão hòa.

— Dung dịch NH_4OH .

— Dung dịch $FeCl_3$ 5%.

— Cồn 96°.

— Dung dịch lugol.

— Môi trường đã cấy vi sinh vật khác nhau và thuốc thử để tiến hành các phản ứng VP và MB, các phản ứng xác định khả năng đồng hóa tinh bột, Nitrat, các phản ứng xác định khả năng tạo thành Indol, NH_3 , H_2S và các phản ứng khác.

— Muối.

— Bông.

— Các ống vi sinh vật cần dùng trong thí nghiệm.

— Các loại rau dưa.

— Sữa tươi.

— Bia và các nguyên liệu khác cần dùng trong thí nghiệm lên men axêtic.

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC NHÂN TỐ VẬT LÝ HÓA HỌC VÀ SINH VẬT ĐẾN VI SINH VẬT

Ảnh hưởng của các nhân tố ngoại cảnh đến vi sinh vật rất lớn. Các điều kiện thích hợp sẽ xúc tiến quá trình phát triển của vi sinh vật. Ngược lại, các điều kiện không thích hợp sẽ gây ức chế quá trình sinh trưởng và thậm chí có thể gây chết. Lợi dụng mặt này người ta tìm ra những biện pháp tích cực nhất để nhằm ức chế hoặc tiêu diệt những vi sinh vật gây hại, đó là phương pháp tiêu độc khử trùng và tạo những biện pháp tăng cường sự phát triển của vi sinh vật trong nuôi dưỡng chúng.

I — ẢNH HƯỞNG CỦA NHÂN TỐ VẬT LÝ

1. Ảnh hưởng của nhiệt độ.

Trong phần này cũng như phần sau chúng ta xét đến hiệu quả của việc ức chế, tiêu diệt các vi sinh vật do tác động của điều kiện ngoại cảnh khác nhau.

a) Phương pháp khử trùng bằng nhiệt độ ẩm:

— Kiểm tra hiệu quả tiêu độc của phương pháp tiêu độc Pasteur (xem phần kiểm nghiệm sữa).

— Kiểm tra hiệu quả tiêu độc bằng đun sôi lấy hai ống môi trường canh thịt có nuôi cấy vi khuẩn có nha bào đã biết. Cho vào nồi đun sôi cách thủy (100°C) trong 10 phút. Sau khi lấy ra để nguội cấy vào môi trường canh thịt mới và môi trường thạch nghiêng đã qua khử trùng. Để trong tủ ấm nuôi cấy và quan sát.

— Kiểm tra hiệu quả tiêu độc bằng khí chung cao áp.

Lấy 2 ống môi trường có chứa vi khuẩn như trên, đặt trong nồi chung cao áp, khử trùng ở nhiệt độ 120°C trong 30 phút, lấy ra để nguội, cấy vào hai loại môi trường riêng biệt, đó là môi trường canh thịt và môi trường thạch nghiêng. Quan sát kết quả sau khi đã nuôi cấy và so sánh với kết quả phương pháp tiêu độc trên.

b) Phương pháp khử trùng bằng nhiệt khô:

Lấy các ống nghiệm sạch, đặt trong một miếng bông đầy chặt. Hấp trong nồi hấp nhiệt khô 170°C trong 1 – 2 giờ. Lấy ra để nguội, gấp miếng bông ra và cấy trên môi trường thạch nghiêng. Đem nuôi cấy. Quan sát kết quả và so sánh với môi trường khi cấy miếng bông chưa qua khử trùng.

2. Ảnh hưởng của tia nắng và tia tử ngoại.

a) Ảnh hưởng của tia nắng:

Cấy hỗn hợp trên thạch đĩa loại vi sinh vật đã biết. Cắt 3 miếng giấy đen đánh số 1, 2, 3 và được khử trùng.

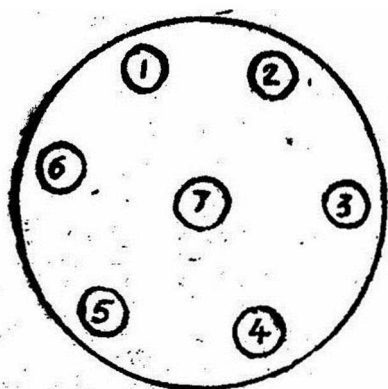
Đặt miếng giấy số 1 vào một góc của môi trường trên đem phơi nắng trực tiếp trong 30 phút tiếp đến lại gấp miếng giấy thứ 2 đặt vào một góc khác đem phơi nắng 30 phút. Sau đó đặt tiếp miếng giấy thứ 3 đem phơi nắng 30 phút. Lấy tất cả các miếng giấy ra để ở điều kiện thích hợp nuôi cấy một thời gian. Theo dõi kết quả đối chứng.

b) Ảnh hưởng của tia tử ngoại:

Lấy 0,1 ml dung dịch có chứa vi khuẩn để lên mặt môi trường thạch bằng, lấy đũa thủy tinh dàn đều. Mở một nửa nắp đĩa cho chiếu sáng bằng tia tử ngoại trong 20 phút. Nuôi cấy ở tủ ấm 37°C trong một thời gian. Theo dõi kết quả.

3. Ảnh hưởng của nhân tố hóa học và sinh vật.

Cấy bằng phương pháp hỗn hợp trên thạch đĩa những loại vi khuẩn đã biết. Dùng kẹp gấp những miếng giấy có tẩm các loại hóa chất và kháng sinh sau: (Hình 26.)



Hình 26: Cách thử ảnh hưởng của các nhân tố hóa học và sinh vật.

- 1 — Cồn 75°
- 2 — Credin 2%
- 3 — Iốt 3%
- 4 — Axit phenic 1%
- 5 — Nước vôi sống 10%
- 6 — Peniculin.
- 7 — Nước tỏi.

Đặt thứ tự trên mặt môi trường, rồi đem nuôi cấy sau một thời gian lấy ra quan sát kết quả,

Khi đặt các hóa chất lên mặt môi trường chú ý tránh lây lan sang bên cạnh và có ghi chú rõ rệt.

NỘI DUNG THỰC TẬP VÀ TƯỜNG TRÌNH

— Thực hành xác định sự ảnh hưởng của nhân tố vật lý, hóa học và sinh vật đối với vài nhóm vi sinh vật khác nhau ghi rõ kết quả.

— Tường trình, qui trình thực hành, kết quả thu được và ghi rõ nhận xét đối với kết quả đã thu được.

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Dụng cụ :

- Pince.
- Đũa thủy tinh.
- Ống nghiệm.
- Ống hút (Pipette) 1 – 5ml.
- Đèn cồn.
- Que cấy.
- Tủ ấm.
- Đèn tử ngoại.

Nguyên liệu :

- Cồn 75°.
- Crêdin 2%.
- Iốt 3%.
- Axit phenic 1%.
- Nước vôi sống 10%.
- Penicillin.
- Tỏi.
- Nước cất.
- Môi trường thạch đĩa đã khử trùng.
- Các miếng giấy đã cắt sẵn có hình khác nhau.

CHẾ TẠO CHẾ PHẨM LẮCTIC DÙNG TRONG CHẾ BIẾN THỨC ĂN

Vi khuẩn lactic có thể làm lên men thức ăn xanh hay thức ăn thực vật sinh ra axit lactic, làm hạ độ pH của môi trường, gây trạng thái ức chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật khác trong môi trường làm cho thức ăn không bị thối hỏng. Trong thực tế người ta đã áp dụng nguyên lý này vào việc ủ xanh tạo thức ăn ủ xanh và thức ăn lên men khác. Trong thức ăn xanh thường đã có sẵn một loài vi khuẩn lactic, do đó không cần cấy vào vi khuẩn lactic thuần thì quá trình lên men vẫn cứ xảy ra bình thường được. Nhưng để đảm bảo thức ăn lên men đạt chất lượng tốt. Người ta thường cấy vào thức ăn loại vi khuẩn lactic thuần qua việc chế thành chế phẩm lactic để xúc tiến quá trình lên men, làm tăng phẩm chất thức ăn lên rõ rệt.

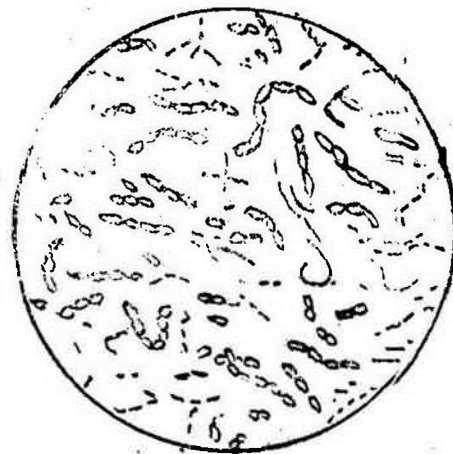
I — HÌNH THÁI VÀ ĐẶC TÍNH SINH LÝ CỦA VI KHUẨN LẮCTIC

Vi khuẩn lên men lactic trong tự nhiên có nhiều, nhưng muốn biết loại nào tốt phải qua kiểm nghiệm.

Vi khuẩn lactic là một loại trực khuẩn không nha bào, hình thái không lớn lắm. Thường đứng riêng rẽ, hoặc liên kết thành đôi. Nhuộm màu gram dương. Trên thạch bằng khuẩn lạc mọc thành những hình tròn nhỏ. Làm dung giải CaCO_3 có trong môi trường tạo thành những vòng trong suốt quanh khuẩn lạc (Hình 27).

Vi khuẩn lactic thuộc loại hình vi sinh vật yếm khí kiềm tính. Ở môi trường kiềm tính sự phát triển càng mạnh, nó làm lên men các hợp chất Hydrate carbon sinh ra lượng lớn axit lactic nhưng không sinh hơi.

Nhiệt độ cần cho sự sinh trưởng tốt nhất là khoảng trên dưới 34°C . Sống thích hợp trong môi trường toan tính, ở độ pH = 3-5 vẫn có thể sinh trưởng được.



Hình 27: Vi khuẩn Lactic
phóng đại 1000 lần

II – PHƯƠNG PHÁP CHẾ TẠO CHẾ PHẨM LACTIC

1. Chuẩn bị giống.

Bắp cải hoặc một loại rau xanh nào đó (lượng tùy theo yêu cầu) được rửa sạch, cắt nhỏ, ép lấy nước. Dùng nước sạch pha loãng theo tỷ lệ 1:1, đem lọc. Cho vào theo tỷ lệ các chất sau: 1% CaCO_3 , 2% đường Saccaroz, 1,8% thạch chế thành môi trường thạch đĩa. Hấp khử trùng ở 120°C trong 15 phút.

Lấy một ít dịch đã pha loãng của thức ăn lên men hoặc thức ăn ủ xanh, ria cấy trên môi trường thạch đĩa đã chế sẵn ở trên, nuôi cấy ở nhiệt độ 34°C trong 2 – 3 ngày. Chọn trên đĩa thạch những khuẩn lạc có vòng phân giải CaCO_3 . Làm tiêu bản để quan sát hình thái để xác định. Cấy các khuẩn lạc được xác định là của của vi khuẩn lactic lên môi trường mới, ta sẽ có vi khuẩn lactic thuần chủng. Muốn chắc chắn ta phân lập lại. Cần ghi rõ đặc tính hình thái và sinh lý của các vi khuẩn lactic này.

2. Nhân giống

Môi trường nhân giống như ở trên, nhưng lượng CaCO_3 có thể tăng lên 2% và không cho thạch. Phân chia môi trường vào các bình tam giác 250ml, mỗi bình khoảng 200ml. Tiêu độc xong đem cấy một ống giống vào nuôi cấy ở 34°C . Sau 2 ngày kiểm tra, nhuộm mẫu. Nếu bảo đảm thuần chủng có thể cấy tiếp sang môi trường sản xuất.

3. Tạo thành chế phẩm men.

Dùng môi trường pha chế như trên để tiếp tục nhân giống lần thứ hai. Qua lần nhân giống này được giống cấp hai hay gọi là chế phẩm lactic.

Dùng tích nuôi cấy ở giai đoạn này lớn hơn và cấy giống theo tỷ lệ 1:4. Sau khi nuôi cấy 2 ngày kiểm dịch. Nếu đạt yêu cầu thì sử dụng.

Có thể dùng các nguyên liệu khác như nước khoai tây, nước mần thóc và các nguyên liệu có hàm lượng đường cao sẵn có khác để chế môi trường.

4. Phương pháp sử dụng.

Chế phẩm lactic dùng để lên men thức ăn hoặc ủ xanh thức ăn. Tỷ lệ dùng là 100kg thức ăn cấy vào 10 0ml chế phẩm lactic.

Quá trình làm cần đặc biệt chú ý thao tác vô trùng.

NỘI DUNG THỰC TẬP VÀ TƯỜNG TRÌNH

– Nắm vững hình thái đặc tính sinh lý của vi khuẩn lactic và cách chế tạo chế phẩm lactic.

– Tường trình kết quả về phần thực tập chế tạo chế phẩm lactic từ khâu nhân giống. Tường trình lại quá trình làm và kết quả thu được.

(quan sát hình thái vi khuẩn, trạng thái của dịch lên men...)

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Dụng cụ:

- Kính hiển vi, dầu soi kính.
- Đèn cồn.
- Que cấy.
- Bình tam giác 250ml.
- Ống nghiệm.
- Dao.
- Phiến kính.
- Cối, chày.
- Phễu, và vải lọc.

Nguyên liệu.

- Bắp cải (rau xanh khác).
- CaCO_3 1%.
- Đường Saccaroz 2%.
- Thạch agar.
- Thuốc nhuộm đơn.

BÀI 10

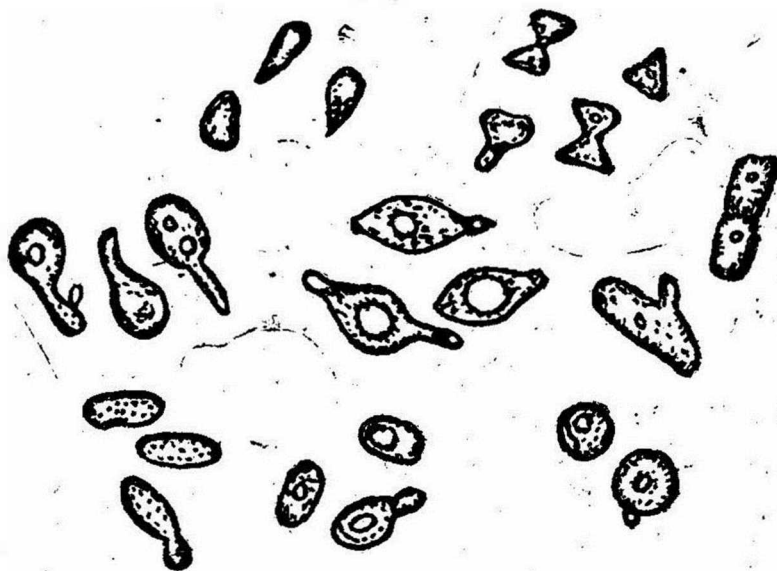
NẤM MEN VÀ PHƯƠNG PHÁP Ủ MEN THỨC ĂN

Nấm men bản thân có hàm lượng protit phong phú, có chứa nhiều axitamin quan trọng và vitamin cũng như một số chất dinh dưỡng khác. Nấm men còn có tác động trong sự biến đổi các thành phần dinh dưỡng của thức ăn như hợp chất có chứa nitơ và các hợp chất cacbon. Vì vậy việc sử dụng nấm men

sẽ đem lại những lợi ích đáng kể. Trong nuôi dưỡng gia súc ở một số nước hiện nay, nấm men được sử dụng làm thức ăn bổ sung protit, vitamin trong khẩu phần. Ở nước ta nấm men được sử dụng trong chế biến thức ăn nhằm nâng cao phẩm chất thức ăn trong khẩu phần, đó là sự ủ men thức ăn. Ủ men thức ăn là phương pháp cấy trực tiếp nấm men vào thức ăn và để nuôi cấy một thời gian đem cho gia súc ăn. Thức ăn sau khi ủ men được gọi là thức ăn ủ men hay nhiều người quen gọi tắt là thức ăn men.

I— HÌNH THÁI VÀ ĐẶC TÍNH SINH LÝ CỦA NẤM MEN

Nấm men có nhiều hình thái khác nhau nhưng thường thấy có hình bầu dục, hình trứng, hình tròn, ngoài ra còn có các hình như bầu dục dài không quý tắc hoặc vuông ở 2 đầu. Chúng thường độc lập tồn tại hoặc liên kết thành đôi, thành chuỗi hay có phân nhánh (hình 28).



Hình 28: Hình thái nấm men

Tế bào nấm men tương đối lớn, có thể thấy dễ dàng khi quan sát với vật kính bội số cao. Trong tế bào có thể phát hiện thấy không bào và các hạt. Khuẩn lạc thường hình tròn, màu trắng hay vàng nhạt, mặt thường nhẵn bóng hoặc khô dạng phấn, nổi vồng cao lên, kích thước to như hạt sương.

Tế bào nấm men thuộc loại hô hấp hiếu khí kiêm lính. Trong điều kiện sống hiếu khí thì tế bào nấm men phát triển nhanh mạnh, làm tăng nhanh về số lượng. Trong điều kiện yếm khí

tương đối thì tế bào phát triển rất chậm nhưng tế bào tăng nhanh sự phân giải đường thành rượu. Điều kiện khác nhau về hô hấp của nấm men sẽ tạo ra các sản phẩm khác nhau, đó là điểm xuất phát của các phương pháp sử dụng nấm men như hiện nay ta thấy.

II – MÔI TRƯỜNG VÀ PHƯƠNG PHÁP GIỮ GIỐNG THUẦN

1. Môi trường.

Có nhiều loại môi trường giữ giống, trong đó có thể sử dụng môi trường HauSen thành phần và cách chế tạo như bài thực tập trước đã chỉ dẫn. Ngoài ra có thể sử dụng môi trường khác như môi trường sabouraud, môi trường Henneberg và các môi trường có chứa các chất dinh dưỡng nguồn gốc từ thực vật.

2. Phương pháp giữ giống

— Chuẩn bị giống: Lấy các giống ở các cơ quan cung cấp giống hay là các giống đã có sẵn.

— Cây truyền: Để đảm bảo giống không bị thoái hóa và đủ cung cấp cho nhu cầu của sản xuất phải luôn luôn cấy truyền giống.

Chuẩn bị tốt những môi trường giữ giống. Chọn những giống cần cấy, liền hành ria cấy trên những ống môi trường đã chuẩn bị. Cấy xong đem nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp từ 24 — 32°C. Sau 24 — 36 giờ.

Các khuẩn lạc đã mọc tốt trên môi trường, quan sát thấy khuẩn lạc ổn định và bảo đảm độ thuần khiết khi kiểm tra thì có thể đem bảo quản sử dụng.

— Bảo quản: Cần tiến hành các biện pháp kiểm tra độ thuần của giống đã được cấy truyền có thể trực tiếp quan sát hình thái, trạng thái của khuẩn lạc, kết cấu của tế bào nấm men để xác định. Nếu như tất cả đều phù hợp với khuẩn lạc và tế bào nấm men điển hình, hơn nữa trong môi trường không phát hiện thấy có khuẩn lạc lạ, các đám vi khuẩn khác hoặc nấm mốc coi như giống được bảo đảm. Để ở tủ lạnh dưới nhiệt độ thấp bảo quản Định kỳ phải cấy truyền như trên để duy trì giống.

III — MÔI TRƯỜNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NHÂN GIỐNG

Mục đích của công tác nhân giống là làm cho số lượng tế bào từ một lượng nhỏ giống cấy vào được nhận lên nhiều lần khi cấy sang một môi trường trung gian khác (đơn giản hơn, dễ kiểm hơn và kinh tế hơn). Rõ ràng trong bước này sẽ đem lại lợi ích về kinh tế và mở rộng phạm vi sử dụng nấm men.

Trong nhân giống người ta tìm ra nhiều loại môi trường phù hợp với yêu cầu sản xuất và phù hợp với điều kiện có thể cho phép. Có thể sử dụng hai môi trường để nhân giống là môi trường lỏng và môi trường đặc.

1. Môi trường nhân giống lỏng.

Hiện nay người ta sử dụng dạng môi trường lỏng có nguồn gốc thành phần các chất dinh dưỡng khác nhau. Nguồn nguyên liệu thường là dễ kiểm, giảm tiện nhưng vẫn bảo đảm cung cấp đầy đủ nhu cầu về N—C và các chất khác cho sự phát triển của nấm men.

a) Môi trường:

Có nhiều công thức chế môi trường nhân giống nấm men, có thể sử dụng một trong những môi trường đó là:

Khoai tây	300g
Gám gạo	100g
Đường	5g
Nước	1000ml

Có thể thay thế khoai tây bằng giá đỗ, củ cải, su hào, bắp cải hoặc đạm, lân vô cơ trong môi trường.

b) Chế môi trường:

Khoai tây thái nhỏ đun với 500ml nước, lọc lấy nước. Cám gạo đun với 500ml nước còn lại, lọc lấy nước trong. Hỗn hợp hai loại với nhau và cho đường vào hòa tan. Điều chỉnh pH=5,6—6,0. Nếu môi trường quá axit có thể dùng NaOH 1% hoặc nước vôi trong để điều chỉnh. Phun vào các dụng cụ nuôi cấy hiệu khí hoặc bình tam giác. Hấp khử trùng ở 115°C trong 30 phút hay có thể hấp cách quãng ba lần ở nhiệt độ 100°C.

c) Cấy.

Môi trường lấy ra đợi nhiệt độ hạ, đem cấy men ở ống giống vào. Lượng giống cấy bằng 5—10% so với môi trường, nhưng nói chung men giống phải bảo đảm nồng độ tế bào là 3×10^3 triệu tế bào/ml.

d) Nuôi cấy:

Cấy xong đem để trong phòng riêng để nuôi cấy, đảm bảo nhiệt độ 27–32°C cách 1–2 giờ lắc nhẹ một lần. Sau 2 ngày có thể kiểm tra. Nếu đạt yêu cầu có thể sử dụng.

e) Kiểm tra:

Có thể xét trên 2 mặt là độ thuần khiết và số lượng tế bào.

Kiểm tra độ thuần khiết bằng cách làm thành tiêu bản kính để kiểm tra hình thái kết cấu của tế bào nấm men. Tiêu bản giọt ép: Lấy một phiến kính sạch, dùng que cấy lấy một ít dịch men chấm vào giữa phiến kính, đẩy nhẹ lá kính lên trên giọt dịch men, không nên lấy dịch men quá nhiều để tránh khi đẩy lá kính lên dịch men trào ra ngoài, khó quan sát.

Tiêu bản giọt treo: Lấy một phiến kính lõm (lame Creuse), dùng vaselin bôi quanh chỗ lõm một lớp mỏng. Nhỏ một giọt dịch men vào giữa lá kính đã chuẩn bị sẵn. Lật ngược lá kính lại đẩy vào chính giữa chỗ lõm của phiến kính, di nhẹ cho lá kính khít vào phiến kính, không được nhỏ dịch men bị chảy lan ra hoặc rơi mất.

Có thể dùng vật kính có bội số cao để quan sát. Qua quan sát thấy được hình thái, sự vận động và các hoạt động sinh lý khác của tế bào nấm men sống.

Tiêu bản nhuộm: có thể nhuộm đơn hoặc nhuộm kép để quan sát rõ hơn bằng vật kính dầu thấy rõ kết cấu bên trong của tế bào nấm men.

Kiểm tra số lượng tế bào: Đếm số lượng tế bào bằng buồng đếm hồng cầu.

g) Tiêu chuẩn đánh giá:

Men giống đạt yêu cầu khi nó đã đạt tiêu chuẩn sau: Độ thuần khiết có thể lĩnh trên 100–200 tế bào, nếu có 80% tế bào men trong đó.

Số lượng tế bào đạt khoảng 3×10^8 triệu tế bào trong 1ml men giống. Tùy theo những chủng nấm men sử dụng mà số lượng tế bào có thể thấp hoặc cao hơn.

2. Môi trường nhân giống đặc.

Cũng như môi trường trên phải đảm bảo về yêu cầu dinh dưỡng và đảm bảo dễ sử dụng. Có nhiều loại nguyên liệu có thể sử dụng làm môi trường. Ngoài ra còn chú ý các nguyên liệu chính để chế môi trường phải tạo được yêu cầu nhất định khi chế môi trường.

Ví dụ: Môi trường nhân giống ở dạng khô như: cám, ngô, thóc nghiền, hạt mì nghiền có bổ sung đạm lân.

a) *Môi trường:*

Cám gạo loại 1, thơm mịn, không có tạp chất, bổ sung thêm đạm 0,4 — 0,6%, lân 0,2 — 0,4%. Môi trường có thể dùng bột ngô, bột gạo hoặc hỗn hợp nhiều loại bột với nhau.

b) *Chế môi trường:*

Cám trộn với nước sạch có độ pH gần như trung tính. Độ ẩm của cám được xác định ở 45 — 50% là thích hợp. Cũng có thể xác định một cách đơn giản sau: dùng tay nắm cám không thành nắm coi như là thiếu nước, hoặc nắm được mà không bóp ra được và đồng thời có nước thấm ra là thừa nước. Nếu nắm thành nắm mà lại bóp rời ra được một cách dễ dàng là nước vừa đủ. Cho đạm và lân vào trộn đều.

Tiến hành hấp khử trùng ở nhiệt độ 120°C. Hoặc có thể dùng phương pháp hấp cách quãng.

c) *Cấy:*

Môi trường hấp khử trùng xong, đợi nguội cấy men giống vào theo tỷ lệ 10 — 15% (với số lượng tế bào là 3×10^2 triệu tế bào/ml men giống).

d) *Nuôi cấy:*

Tãi đều (không nén) vào trong các dụng cụ thủy tinh, sành sứ hay gỗ. Độ dày bảo đảm từ 5 — 10cm trong mùa hè, từ 20 — 30cm trong mùa đông. Chú ý giữ điều kiện thích hợp cho quá trình phát triển của nấm men về nhiệt độ. Sau 1 — 2 ngày sẽ thấy mùi thơm rượu, trạng thái cám khô ráo, nóng ẩm thì có thể lấy ra để kiểm tra.

e) *Kiểm tra:*

Tiến hành kiểm tra như đối với men lỏng, kết hợp với kiểm tra bằng cảm quan về màu sắc, mùi vị, khả năng mọc tạp để đánh giá.

g) *Tiêu chuẩn đánh giá:*

Men giống phải đảm bảo điều kiện sau mới đạt yêu cầu: Trạng thái men khô ráo, màu sắc hơi vàng nhạt, mùi thơm của rượu.

Số lượng tế bào trong 1 gam men khô là 3×10^3 triệu tế bào.

Không có mốc tạp. Số lượng các vi khuẩn tạp không được vượt quá 15%.

3. Phương pháp sử dụng

Trong sản xuất có thể tiến hành nhân giống qua nhiều lần để làm tăng nhanh khối lượng men cần dùng.

Khi dùng có thể ủ men vào thức ăn tinh trong khâu phân theo tỷ lệ từ 4 — 10%. Kiểm tra đạt yêu cầu thì cho ăn.

NỘI DUNG THỰC TẬP VÀ TƯỜNG TRÌNH

— Thực hành nhân giống nấm men qua môi trường lỏng và môi trường đặc. Tường trình lại quá trình làm và kết quả theo dõi phẩm chất men giống về số lượng tế bào trong thao tác của men giống sau khi nhân giống.

— Quan sát và miêu tả rõ một số điểm đặc trưng về khuẩn lạc của nấm men. Quan sát và vẽ hình thái của một số chủng nấm men sử dụng ở phần thực tập.

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Dụng cụ :

- Bồn đếm hồng cầu.
- Chậu thủy tinh Φ 30 — 35cm.
- Bocal Φ 10 \times 20cm.
- Đèn cồn.
- Kính hiển vi và dầu soi kính.
- Que cấy.
- Phiến kính.
- Cốc nấu 250ml.
- Đũa thủy tinh.
- Song nhôm.
- Phễu thủy tinh Φ 20 — 25cm.
- Nhiệt kế 100°C.

Nguyên liệu :

- Cám, ngô, mì nghiền.
- Phân đạm và phân lân.
- Đường.
- Nước cất và nước sạch.
- Bông thấm nước.
- Vải xô.

KIỂM NGHIỆM VI SINH VẬT HỌC SỮA

Sữa tươi là một loại thức ăn giàu chất dinh dưỡng do đó rất dễ bị nhiễm khuẩn. Sự tồn tại của các loại hình vi sinh vật trong sữa và số lượng của chúng có quan hệ lớn đến trạng thái an toàn và phẩm chất sữa. Do đó, kiểm tra vi sinh vật học sữa là một biện pháp bảo đảm độ an toàn và nâng cao phẩm chất sữa.

Để tiến hành kiểm nghiệm người ta sử dụng phương pháp vi sinh vật học kết hợp với phương pháp cảm quan. Nội dung kiểm tra được tiến hành trên hai loại sữa — sữa tươi chưa tiêu độc và sữa đã qua tiêu độc.

I — KIỂM NGHIỆM SỮA CHƯA TIÊU ĐỘC

1. Kiểm định cảm quan.

Sữa tươi chưa tiêu độc được xác định là tốt, bình thường ở dạng lỏng thuần nhất, màu trắng hơi ngả vàng, mùi thơm và có vị ngọt. Không phát hiện có màu sắc mùi vị gì lạ so với một mẫu sữa tiêu chuẩn.

Nhưng do các nguyên nhân nuôi dưỡng, quản lý kém hoặc do tác động của vi sinh vật mà làm thay đổi trạng thái màu sắc, mùi vị của sữa. Qua cảm quan có thể thấy được.

- Thể trạng: Nhầy, vón cục, sủi bọt, loãng.
- Màu : Xanh có mang mủ, màu đỏ hoặc màu vàng.
- Mùi : Có các mùi lạ như mùi hôi, tanh, thối.
- Vị : Chua, đắng, mặn, chát.

Dùng mắt quan sát trạng thái, màu sắc, mũi ngửi mùi vị và lấy lưỡi nếm vị sữa. Chú ý, đối với sữa hỏng chỉ dùng đầu lưỡi để nếm chứ không được nuốt vì có thể gây hại.

2. Chỉ số hóa học.

Khác với các loại thức ăn giàu chất dinh dưỡng khác, sữa hỏng ở giai đoạn đầu thường bị biến chua nguyên nhân là do sự hoạt động của vi khuẩn lactic là nhóm vi khuẩn thường thấy trong sữa. Do đó xác định độ chua của sữa là một chỉ tiêu để đánh giá phẩm chất sữa.

Có thể xác định độ chua của sữa bằng nhiều phương pháp để đánh giá phẩm chất sữa. Phương pháp chuẩn độ: Dùng pipét có bầu 10ml hút 10ml sữa tươi cho vào bình tam giác từ từ không để dính vào thành bình làm sai lượng mẫu.

Cho thêm 3 giọt chỉ thị màu Phenolphthalein (dung dịch 1% trong cồn). Chuẩn độ bằng NaOH (Natri hydroxyt) N/10 cho đến khi xuất hiện màu hồng, bảo đảm không đổi màu trong một phút.

Kết quả biểu diễn bằng độ Thorner (Độ Thorner của một mẫu sữa là số ml NaOH N/10 dùng để chuẩn độ 100ml mẫu sữa).

Sữa đủ tiêu chuẩn phải có độ chua dưới 20 độ Thorner.

Sữa có trên 25 độ Thorner sẽ tự đông vón.

3. Kiểm tra vi sinh vật học trong sữa.

Thời gian bảo quản, vận chuyển, điều kiện sản xuất hoặc phương tiện vận chuyển, chế độ nuôi dưỡng, quản lý đều có ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ vệ sinh trong sữa. Qua số lượng vi sinh vật trong sữa có thể đánh giá cụ thể về mặt này. Phương pháp kiểm tra được tiến hành như sau:

a) Lấy mẫu:

Sữa được đảo đều. Dùng ống thủy tinh hoặc bằng kim loại đã được khử trùng, lấy một ít mẫu cho vào dụng cụ vô trùng. Để rõ ngày lấy mẫu và các ký hiệu khác. Nếu chưa kiểm tra ngay có thể để ở 0 – 5°C bảo quản nhưng thời gian không quá 4 giờ.

Vi trường hợp không kiểm tra được phải nói rõ nguyên nhân thời gian kéo dài.

b) Xác định tổng số vi khuẩn trong sữa.

Có nhiều phương pháp để xác định. Cụ thể xét hai phương pháp sau đây:

— Xác định trên thị trường kính dầu: Phương pháp Bido. Trước hết phải xác định diện tích thị trường của vật kính dầu. Đặt thước đo vật kính lên khung kính, quan sát bằng vật kính dầu. Đo độ dài đường kính của thị trường. Tính diện tích của thị trường, sau đó chia cho 1cm² để tìm hệ số tỷ lệ.

Làm tiêu bản: Dùng pipét đã khử trùng hút 0,01ml mẫu sữa đã lắc đều cho vào khuôn vuông của phiến kính đặc chế. Nếu không có, có thể dùng một phiến kính thường trên đó vẽ bằng bút chì sấp một hình vuông có cạnh là 1cm. Khi cho sữa

vào không để sữa chảy ra ngoài khuôn hình vuông. Lấy que dàn đều trên bề mặt khuôn vuông của phiến kính. Hơ nhẹ qua trên ngọn lửa đèn cồn hoặc đặt trong bình hút ẩm làm khô thời gian không quá 10 phút. Nhúng phiến kính vào nước benzen 1—2 phút để khử mỡ. Lấy ra, đợi khô cho vào cồn 95° trong 1—2 phút để khử benzen thừa. Đợi khô nhuộm xanh Methylen. Đếm số lượng tế bào trong 10—50 thị trường kính dầu.

Cách tính: Tính số lượng tế bào vi sinh vật bình quân trong một thị trường kính. Nhân kết quả với hệ số tỷ lệ đã tìm được thì sẽ được số lượng vi khuẩn có trong 0,01ml mẫu sữa. Số lượng vi khuẩn trong 1ml sữa sẽ bằng kết quả nói trên nhân với 100.

— Phương pháp tính trên đĩa thạch bằng.

Phương pháp tiến hành như phần «Đếm số lượng tế bào» của bài 6 đã chỉ dẫn. Nhưng chú ý đến độ pha loãng thích hợp để số khuẩn lạc mọc không dày cũng không thưa quá. Đối với sữa dự tính có phẩm chất xấu phải pha loãng cao hơn. Thường pha loãng theo tỷ lệ thập phân từ N/10 đến N/10.000.

Kết quả số lượng vi sinh vật đếm được sẽ xác định được cấp sữa theo tiêu chuẩn qui định sau:

Sữa cấp 1 (sữa tốt) lượng tế bào không lớn hơn 50 vạn

Sữa cấp 2 (sữa kém) lượng tế bào không lớn hơn 4 triệu

Sữa cấp 3 (sữa xấu) lượng tế bào không lớn hơn 20 triệu.

Sữa cấp 4 (sữa loại) lượng tế bào lớn hơn 20 triệu.

— Phản ứng khử Methylen (Đo Reductaza của vi khuẩn).

Methylen màu xanh sau khi bị khử sẽ biến thành không màu. Vi sinh vật trong quá trình sinh trưởng đã sinh ra men Reductaza, men này khử mất màu xanh của Methylen. Sự mất màu nhanh hay chậm có liên quan đến số lượng vi sinh vật. Nhưng gần đây người ta cho rằng sở dĩ có sự mất màu Methylen là do vi sinh vật trong sữa đã lấy hết dưỡng khí cho sự sinh trưởng. Số lượng tế bào vi khuẩn càng lớn, thì càng làm mất màu xanh Methylen trong môi trường càng nhanh. Do đó căn cứ vào sự mất màu xanh methylen trong sữa đã xác định được số lượng vi khuẩn có trong sữa.

Dung dịch xanh Methylen.

Dung dịch xanh Methylen bão hòa trong cồn 95° 195ml — 5ml nước cất.

Hỗn hợp với nhau lắc đều. Đựng ở chai màu, tránh có ánh sáng và chỉ pha khi nào cần dùng.

Cách tiến hành: Lấy 20 ml mẫu sữa và 0,3 ml dung dịch xanh Metylen, đậy nút chặt, lắc đều, để ở tủ ấm 37°C hoặc đun cách thủy ở 38°C (Nhưng phải thật chính xác, nhiệt độ không chênh lệch quá $\pm 0,5^\circ\text{C}$). Cứ 15 phút quan sát sự mất màu. Chú ý khi quan sát không được lắc. Nếu như 1/3 bên trên ống còn xanh ít thì coi như phản ứng hoàn thành, ghi lấy thời gian mất màu. Nếu như sau 2 giờ mà không có hiện tượng gì thì ngừng quan sát.

— Phán đoán kết quả: Để xác định số lượng tế bào trong mẫu sữa có thể dựa vào bảng ước lượng số vi khuẩn đối chiếu với thời gian xanh Metylen mất màu:

Phân cấp sữa	Thời gian khử xanh Metylen	Ước lượng số vi khuẩn trong 1 ml sữa
Cấp 4 (sữa loại)	dưới 15 phút	20 000 000
Cấp 3 (sữa xấu)	15 phút — 120 phút	4 000 000 — 20 000 000
Cấp 2 (sữa kém)	2 giờ — 5 giờ	500 000 — 4 000 000
Cấp 1 (sữa tốt)	Trên 5 giờ	500 000

4. Xác định số lượng bạch cầu trong sữa:

Sữa của bò viêm vú thường chứa một lượng bạch cầu nhiều hơn bình thường (mẫu sữa bình thường có số lượng bạch cầu không vượt quá 500 000 trong 1 cm^3) và công thức bạch cầu cũng thay đổi (hàm lượng bạch cầu đa nhân trung tính tăng, chiếm hơn 70% tổng số bạch cầu). Ngoài ra sữa không bình thường còn chứa các tế bào hồng cầu, tế bào vú...

Lấy 10 ml sữa cho vào ống ly tâm đem quay ly tâm với tốc độ 1200 vòng phút trong thời gian 5 phút, lấy chất kết tủa ở đáy làm tiêu bản, nhuộm màu, quan sát dưới kính hiển vi các tế bào bạch cầu, hồng cầu và các tế bào khác. Xác định tổng lượng bạch cầu, công thức bạch cầu và các tế bào khác.

II – KIỂM NGHIỆM SỮA ĐÃ QUA TIÊU ĐỘC

Sữa tươi đã qua tiêu độc, đại bộ phận vi sinh vật bị tiêu diệt, song vẫn tồn tại một số vi sinh vật. Nhưng cũng có khi do quá trình khử trùng chưa chặt chẽ, triệt để hoặc sữa bị tạp sau khi khử trùng hoặc do thời gian vận chuyển không hợp lý mà số lượng vi sinh vật trong sữa sau tiêu độc vẫn khá lớn. Do đó vấn đề kiểm nghiệm sữa tiêu độc là bảo đảm tính chất an toàn của sữa tới người tiêu dùng.

Có thể tiến hành kiểm tra về số lượng vi khuẩn và số lượng Bact – Coli trong sữa.

1. Tính số lượng tế bào trong sữa :

Phương pháp lấy mẫu và cách tính số lượng vi khuẩn bằng cách đếm trên đĩa thạch bằng đã được chỉ dẫn ở trên. Số lượng vi khuẩn được xác định trong 1 ml sữa đã qua khử trùng (cụ thể ở bảng sau).

2. Phương pháp xác định chỉ số Bact – Coli

Trong sữa chưa khử trùng thường có một lượng Bact – Coli nhất định, nhưng nó không có ý nghĩa về vệ sinh học, và nó cũng không quan trọng lắm như sự có mặt của Bact – Coli trong nước.

Quá trình tiêu độc có thể tiêu diệt hoàn toàn hoặc đại bộ phận. Nhưng nếu như sau tiêu độc sữa còn lại lượng Bact – Coli vượt quá mức độ cho phép thì phải có biện pháp xử lý kịp thời về qui trình sản xuất vì nó thể hiện sự khử trùng chưa triệt để hoặc có nhiễm phân người hay động vật vào sữa. Đó chính là nguy cơ gây bệnh đường ruột cho người.

a) Môi trường :

Môi trường dùng để xác định phải có những yếu tố ức chế sự phát triển của vi khuẩn lactic vì sự có mặt của vi khuẩn này sẽ gây khó khăn trong khi kiểm tra. Để đạt được mục đích này người ta thường cho vào đó một số chất như dịch mật bò hay thuốc nhuộm màu (gentian violet).

Môi trường Kesle (Xuinaeton)

Dịch mật bò tươi	50 ml
Pépton	10 g
Đường mantoz	2,5 g
Nước cất cho đủ đến	1000 ml

Đun qua dịch mật và đem lọc. Hỗn hợp với pepton trong một phần nước. Đun sôi, lọc sạch, sau cho đường lactoz vào. Cho nước vừa đủ đến 1000 ml. Điều chỉnh độ pH từ 7,4 — 7,6. Cho vào môi trường 2 ml gentian Violet 1%, khử trùng ở 110°C trong 15 phút.

b) Cấy và nuôi cấy:

Lấy 6 ống môi trường. Trong đó cho vào 3 ống mỗi ống 1 ml sữa. Còn 3 ống kia cho vào mỗi ống 0,5 ml sữa. Lắc đều và để ở nhiệt độ 43°C nuôi cấy 24 — 48 giờ xem kết quả.

c) Xác định chuẩn độ Bact—Coli:

Có thể căn cứ vào tiêu chuẩn sau để xác định:

— Tất cả các ống đều không có hiện tượng sinh hơi thì chỉ số là trên 3 ml.

— Nếu 1 trong 3 ống (có chứa 1 ml sữa) có hiện tượng sinh hơi thì chỉ số là 3 ml.

— Nếu hai ống chứa 1 ml sữa hoặc một ống trong các ống chứa 0,5 ml sữa có hiện tượng sinh hơi thì chỉ số là 0,3 ml.

— Nếu hai ống chứa 0,5 ml sữa và toàn bộ ống chứa 1 ml sữa có hiện tượng sinh hơi thì chỉ số là dưới 0,3 ml.

Dựa vào số vi khuẩn có mặt và chỉ số Bact-Coli người ta chia làm 4 cấp.

Cấp sữa	Số vi khuẩn có trong 1 ml sữa	Chuẩn độ Bact-coli
Sữa đóng bình cấp I	75.000	3
Sữa đóng bình cấp II	150.000	0,3
Sữa đóng bình cấp III	400.000	0,3
Sữa đóng thùng	500.000	—

NỘI DUNG THỰC TẬP VÀ TƯỜNG TRÌNH

— Nhằm vững nội dung và thao tác tiến hành kiểm nghiệm một mẫu sữa. Cụ thể ở bài này, tiến hành kiểm nghiệm mẫu sữa chưa tiêu độc.

— Ghi kết quả cụ thể khi kiểm nghiệm. Cuối cùng nhận định tổng hợp phẩm chất của mẫu sữa. Kiểm nghiệm đối chiếu với tiêu chuẩn đã qui định.

— Quan sát và miêu tả các nhóm vi khuẩn phát hiện được trong một mẫu sữa bị chua.

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Dụng cụ:

Cốc nấu 100 ml

Bình tam giác 100 ml

Đèn cồn.

Que cấy.

Phiến kính, lá kính.

Ống nghiệm.

Kính hiển vi và dầu soi kính.

Đũa thủy tinh, chậu thủy tinh.

Ống hút khắc độ 0,1ml; 0,2 ml.

Bút chì sáp.

Tỷ trọng kế.

Máy đo pH hoặc hộp so màu.

Đồng hồ.

Nguyên liệu:

Cồn đốt và cồn 95°.

NaOH N/10.

Xanh metylen.

Phenolphthalein.

Thuốc nhuộm.

Benzen.

Sữa tươi.

Bông không thấm nước.

Giấy đo pH.

BÀI 12

KIỂM TRA VI SINH VẬT HỌC TRỨNG VÀ THỊT

Đề đánh giá về phẩm chất của trứng và thịt người ta dùng biện pháp kiểm tra vi sinh vật học. Qua kết quả xác định phẩm chất của chúng có thể đánh giá hiệu quả của công tác bảo quản, xác định được điều kiện vệ sinh trong sản xuất, điều kiện vận chuyển có hợp lý hay không. Qua đó có biện pháp xử lý kịp thời.

I — KIỂM TRA VI SINH VẬT HỌC CỦA TRỨNG

1. Kiểm nghiệm trứng tươi:

Kiểm tra chủ yếu trên hai mặt là : cảm quan và kiểm nghiệm vi sinh vật học.

a) Kiểm định cảm quan.

Dùng mắt và tay quan sát độ dày vỏ, màu sắc và độ láng bóng, độ to nhỏ và hình dạng của vỏ và phát hiện các tạp chất trên vỏ.

Dùng đèn để quan sát bên trong của trứng về kết cấu chung của lòng đỏ, lòng trắng, dây chằng và độ thấu quang của bộ phận bên trong của trứng.

Bình thường trứng có vỏ dày vừa phải, mặt láng bóng, không có chất bẩn trên bề mặt hoặc các chấm mốc trên vỏ. Trứng có hình dạng cân đối hình bầu dục, một đầu to, một đầu nhỏ. Tùy theo loại gia cầm mà có trọng lượng, to nhỏ khác nhau.

Qua chiếu đèn cho thấy, ở trứng bình thường có độ thấu quang tốt, lòng đỏ gọn tách rời khỏi lòng trắng, dây chằng rõ rệt, buồng hơi có độ to nhỏ vừa phải.

b) Kiểm nghiệm vi sinh vật:

Tiến hành kiểm nghiệm bằng hai cách: xem trên kính và nuôi cấy kiểm định.

— Nuôi cấy kiểm định:

Lấy một quả trứng rửa sạch bên ngoài bằng xà phòng và bàn chải. Cho trứng vào dung dịch Credin 1/500 trong 15—20 phút.

Dùng rượu cồn rửa sạch và đốt qua ngọn lửa đèn cồn để làm bay hết cồn còn lại.

Lấy kẹp (pince) đục thủng một lỗ ở đỉnh quả trứng đường kính 1,5 cm.

Úp đầu trứng thủng vào một bình tam giác chứa môi trường keo thịt 100 ml và bi thủy tinh. Trọng lượng của bình đã được xác định.

Đốt lửa ở đầu trên của trứng để đẩy hết phần ruột bên trong của trứng vào bình. Cân trọng lượng. Lắc đều cho tan trứng và hỗn hợp đều với môi trường. Nhưng chú ý không lắc mạnh làm hàn nút.

Dùng pipét đã khử trùng, hút 1 ml môi trường trên cho vào đĩa petri để chuẩn bị nuôi cấy. Hút 1 ml khác cho vào ống nghiệm vô trùng để làm tiêu bản.

Đun chảy môi trường canh thịt phổ thông. Đợi nhiệt độ hạ xuống 45°C thì đổ vào đĩa petri trên.

Đặt bình trên và đĩa thạch ở nhiệt độ 32–37°C và nuôi cấy trong 3–5 ngày.

Lấy bình và đĩa ra quan sát đếm số lượng khuẩn lạc trên đĩa thạch. Phết kính xem hình thái tế bào vi khuẩn (so sánh với kết quả khi xem trực tiếp).

Tính số vi khuẩn trong một gam lòng trứng theo công thức sau:

$$B = A \times \frac{100 - P}{P}$$

B: số vi khuẩn trong 1 gam lòng trứng.

A: số khuẩn lạc.

P: trọng lượng của lòng trứng.

– Xem trực tiếp:

Lấy mẫu đã chuẩn bị ở ống nghiệm trên làm tiêu bản kính, nhuộm đơn hoặc nhuộm kép. Quan sát bằng vật kính dầu.

2. Kiểm nghiệm trứng hồng.

a) Quan sát bên ngoài:

Xem xét màu sắc, sự biến đổi của vỏ. Xem xét sự xuất hiện của các nấm mốc, sự xuất hiện các mùi lạ.

b) Dùng đèn quan sát:

Dùng đèn soi trứng quan sát độ thấu quang và kết cấu bên trong của trứng có biến đổi gì không; có thấy xuất hiện các điểm mốc hay không.

c) Quan sát trực tiếp:

Đập vỡ trứng vào đĩa petri, quan sát màu sắc, kết cấu, mùi vị của chúng.

Làm tiêu bản kính, nhuộm màu quan sát các loại hình vi sinh vật gây ra hỏng trứng. Có thể soi tươi bằng vật kính bội số cao để soi nấm mốc.

II – KIỂM NGHIỆM VI SINH VẬT THỊT

Trong thịt tươi có vi sinh vật tồn tại, nhưng không nhiều lắm. Số lượng ở bên trong nhiều hơn bên ngoài. Bên ngoài có thể phát hiện thấy cầu khuẩn đơn thể và trực khuẩn. Bên trong số lượng nhiều hơn và có nhiều loại hình phức tạp hơn bên ngoài. Bằng mắt thường có thể quan sát thấy nấm mốc nếu có.

1. Xác định khu hệ vi sinh vật trong cơ thể gia súc.

Mô khám quan sát bằng mắt và tay có thể thấy được trong cơ thể gia súc cơ quan nào đang mắc bệnh.

Cách tiến hành: Dùng dao vô khuẩn cắt đôi các cơ quan trong cơ thể gia súc, sau đó làm tiêu bản theo phương pháp in vết. Tiến hành nhuộm màu bằng xanh Methylen soi vật kính bội số cao để quan sát vi sinh vật trong từng cơ quan một.

2. Xác định trạng thái cảm quan.

Quan sát bằng mắt và tay có thể thấy và phân biệt được thịt tươi với thịt kém tươi hoặc thịt ôi.

Ở thịt tươi biểu hiện:

— Trạng thái bên ngoài: Màng ngoài khô, mỡ có màu trắng. Độ rắn và mùi vị bình thường. Gân trong, độ đàn hồi bình thường. Mặt khớp láng và trong. Dịch hoạt trong.

— Chỗ vết cắt: Màu sắc bình thường, sáng khô.

— Độ rắn và đàn hồi: Rắn chắc. Độ đàn hồi cao. Nếu lấy tay ấn mạnh không để lại dấu vết gì khi bỏ tay ra.

— Tủy bám chặt vào thành ống tủy, trong và đàn hồi.

— Nước canh đun sôi để lắng: trong, có vị thơm ngon, trên mặt nổi lên một lớp mỡ, vết mỡ to.

Ở thịt kém tươi hoặc thịt ôi có những biểu hiện ngược lại với trên.

— Trạng thái bên ngoài: Biểu hiện khác thường, nhợt, màu mỡ tối, độ rắn giảm sút, gân kém trong. Mặt khớp nhợt, dịch hoạt đục.

— Thịt kém đàn hồi. Nếu ấn tay vào bỏ tay ra còn để lại vết.

— Tủy róc ra khỏi xương, mùi ôi, màu sắc tối.

— Nước canh đục, mùi vị ôi. lớp mỡ trên mặt tách ra thành những váng mỡ nhỏ hoặc không còn váng mỡ.

— Các hiện tượng trên tùy theo mức độ ôi của thịt.

3. Chỉ số hóa học.

a) *Xác định độ pH*: Thịt băm 10g. Nước cất 100ml, ngâm trong 10 phút, ba phút lắc một lần. Xác định độ pH nước chiết thịt bằng phương pháp chuẩn độ hay so màu hoặc đo bằng máy đo pH. Với mẫu thịt tươi có pH: 5,8–6,4.

Thịt của động vật ốm hoặc kém tươi có độ pH lớn hơn 6,3.

b) *Xác định sơ bộ lượng NH_3* : Phản ứng Eber

Thuốc thử: Axit HCl	100ml
Cồn 96°	300ml
Ête	100ml

Cách tiến hành: Cho 3ml thuốc thử vào một lọ thể tích 1000ml. Bên trong treo lơ lửng một miếng thịt 5g. nếu chung quanh miếng thịt xuất hiện lớp «mây» trắng, hơi amoniac đậm đặc, lượng NH_3 cao, biểu hiện thịt kém tươi. Nếu không có mây trắng quanh miếng thịt hoặc có rất ít, chứng tỏ là thịt tươi.

c) *Phản ứng định tính H_2S* .

Đề vào nắp dưới một hộp lồng (Petri) khoảng 10–20 gam thịt. Dán vào phía dưới nắp trên một miếng giấy có tẩm axêtat chì 10%. Đóng nắp hộp lồng lại.

Sau 30 phút nếu giấy biến thành màu đen là có H_2S trong thịt. Chứng tỏ thịt đã ôi. Thịt tươi phản ứng âm tính. Muốn cho phản ứng nhanh hơn nên cho thêm một ít giọt axit phốtphoric 5% lên thịt.

d) *Phản ứng tìm peroxydaza*: Peroxydaza có nhiều trong mô bào thịt động vật khỏe, có hoạt tính oxy hóa khử cao. Ở thịt xấu, thịt của động vật ốm men này kém hoạt động hoặc bị phá hủy. Người ta dùng benzidin và H_2O_2 để phát hiện Peroxydaza, căn cứ vào nguyên tắc khi oxy gặp benzidin sẽ oxy hóa nó thành paraquinondieminít hợp với phân tử benzidin tạo ra một phức chất có màu xanh biển, chất này bị oxy tác động sẽ chuyển dần sang màu đỏ nâu.

Cho vào một ống nghiệm 2ml nước chiết và 4–5 giọt dung dịch benzidin 0,2% pha trong cồn và 4–5 giọt dung dịch H_2O_2 1%. Theo dõi sự thay đổi màu. Có thể nhỏ trực tiếp ở hai nơi trên miếng thịt mới cắt 5 giọt benzidin và 2 giọt H_2O_2 . Nếu thịt xấu thì không biến màu hoặc rất lâu mới đổi màu. Trái lại nếu thịt tươi sẽ xuất hiện màu xanh đục lục, màu xanh lá mạ chuyển sang màu nâu sau vài phút.

d) Phản ứng prôtít sa lắng:

Một số prôtít như globulin không hòa tan trong nước mà hòa tan trong kiềm hoặc trong dung dịch muối, trong quá trình phân hủy của thịt thường sản sinh ra nhiều muối amôni-um kiềm hòa tan prôtít, vì thế nước chiết của thịt không tươi chứa nhiều prôtít hơn thịt tươi. Để phát hiện hiện tượng này người ta dùng những chất làm sa lắng prôtít như sunfát đồng và CH_3COOH .

Cho vào ống nghiệm 2ml nước chiết thịt và 5 giọt dung dịch CuSO_4 1%. Nước chiết thịt kém tươi hơi đục, thịt ôi sẽ đục và có vẩn do prôtít sa lắng. Trái lại nước thịt tươi sẽ trong.

Hoặc cho vào ống nghiệm 2ml nước chiết thịt và 2 giọt dung dịch CH_3COOH 1% đem đun cách thủy ở 80°C trong 5 phút. Đọc kết quả như trên.

4. Kiểm nghiệm vi sinh vật học.

Mặt thịt thường bị ô nhiễm một số vi sinh vật nhất định từ nước và không khí. Ngoài ra còn cảm nhiễm trong quá trình giết mổ do điều kiện vệ sinh trong lò mổ không tốt.

Lượng vi sinh vật nhiều hay ít là biểu hiện tình trạng vệ sinh mổ giết, chuyên chở... Do đó kiểm tra vi sinh vật của thịt có ý nghĩa quan trọng.

Tiến hành kiểm tra vi sinh vật ở hai phần của thịt là trên bề mặt và trong bề sâu.

a) *Kiểm tra trên bề mặt thịt:* Dùng dao vô khuẩn cắt một mẫu thịt nhỏ như hạt đậu xanh phết lên phiến kính để khô, cố định, nhuộm gram soi kính hiển vi.

Mỗi phiến kính nên kiểm tra 5 khoảng nhìn sau đó tính số cầu khuẩn và trực khuẩn gram âm, gram dương và lấy số trung bình.

b) *Kiểm tra bề sâu thịt:* Dùng cùn đốt mặt thịt một khoảng khá rộng. Hoặc dùng dao đốt nóng áp vào mặt thịt với mục đích bảo đảm vô khuẩn.

Dùng dao từ chỗ đã vô trùng khoét sâu vào lấy một miếng thịt nhỏ ở độ sâu 2 — 2,5cm và một miếng thịt ở độ sâu 3 — 3,5cm.

Làm các tiêu bản kính, cố định nhuộm gram và soi kính. Mỗi phiến kính sẽ kiểm tra 5 khoảng nhìn (thị trường kính) rồi lấy số bình quân.

c) Nhận định kết quả:

Có thể căn cứ vào tiêu chuẩn dưới đây để đánh giá phẩm chất thịt.

— Thịt tươi: trên phiến kính không thấy vi sinh vật hoặc trong một thị trường kính có thể nhìn thấy 1 – 2 cầu khuẩn hay trực khuẩn gram (+). Hoàn toàn không tìm thấy các thớ thịt thối rữa.

— Thịt kém tươi trên phiến kính có khoảng 20 – 30 cầu khuẩn và trực khuẩn, lác đác có các thớ thịt bị thối rữa.

Thường khi quan sát bên ngoài mặt thịt qua kính hiển vi ta thấy lượng vi sinh vật có nhiều. Nhưng nó chỉ có giá trị kết luận về tình hình vệ sinh trong quá trình mổ giết vận chuyển...

Để kết luận thịt tươi hay không thì phải xét đến tình trạng vi sinh vật ở bề sâu của thịt. Ở trên là tiêu chuẩn khi kiểm tra bề sâu của thịt.

NỘI DUNG THỰC TẬP VÀ TƯỜNG TRÌNH

— Tiến hành kiểm định cảm quan và kiểm định vi sinh vật của trứng bằng phương pháp soi đếm trực tiếp trên tiêu bản. Tường trình lại quá trình làm và kết quả kiểm định, qua đó nhận định phẩm chất của trứng kiểm định. Phát hiện và miêu tả các nhóm vi sinh vật có trên tiêu bản.

— Tiến hành kiểm định cảm quan, xác định chỉ số hóa học và kiểm định vi sinh vật đối với hai mẫu thịt tươi và thịt kém phẩm chất. Ghi rõ kết quả kiểm định, chú ý miêu tả các nhóm vi sinh vật phát triển thấp.

Giải thích các hiện tượng đã quan sát được khi các phản ứng hóa học kiểm nghiệm thịt hồng.

CHUẨN BỊ DỤNG CỤ VÀ NGUYÊN LIỆU

Dụng cụ:

- Phiến kính để nhuộm tiêu bản.
- Chậu thủy tinh để làm tiêu bản.
- Bình đựng nước rửa.
- Dao.

- Kéo.
- Khay men.
- Cối chày thủy tinh (hoặc bằng đồng).
- Giấy đo pH.
- Hộp lồng.
- Kẹp.
- Kính hiển vi quang học.
- Ống nghiệm.
- Giá đựng ống nghiệm.
- Cốc nấu.

Nguyên liệu :

- Gia súc đã mổ sẵn.
- Thịt làm đối chứng.
- Trứng gia cầm.
- Thuốc thử phản ứng Eber.
- Dung dịch Nesle.
- Benzidin 0,2%.
- H₂O₂ 1%.
- Axitát chì 10%.
- Sunphát đồng (CuSO₄) 1%.
- Axitaxetic 1%.

MỤC LỤC

	Trang
Bài 1 — Phương pháp sử dụng kính hiển vi quan sát hình thái vi sinh vật	5
Bài 2 — Phương pháp làm và nhuộm mẫu tiêu bản	13
Bài 3 — Cách sử dụng một số máy móc. Cách sử lý và bao gói dụng cụ thủy tinh	27
Bài 4 — Môi trường nuôi cấy vi sinh vật	37
Bài 5 — Phương pháp nuôi cấy phân lập vi sinh vật	45
Bài 6 — Đếm số lượng và đo kích thước tế bào vi sinh vật	53
Bài 7 — Phương pháp kiểm tra các phản ứng chuyển hóa vật chất của vi sinh vật	62
Bài 8 — Ảnh hưởng của các nhân tố vật lý hóa học và sinh vật đến vi sinh vật	77
Bài 9 — Chế tạo chế phẩm lactíc dùng trong chế biến thức ăn	80
Bài 10 — Nấm men và phương pháp ủ men thức ăn	82
Bài 11 — Kiểm nghiệm vi sinh vật học sữa	89
Bài 12 — Kiểm tra vi sinh vật học trứng và thịt	95

In tại Nhà in Trường đại Nông nghiệp I. Số lượng 2000 cuốn
khổ 15 × 22. Xong ngày 15-11-1982 nộp lưu chiểu tháng 12-1982.

ĐÍNH CHÍNH

Trang	Dòng	In sai	Sửa lại
3	7 tx	Chúng đã...	Chúng tôi đã
6	10 tx	rồng	rồng
10	15 dl	tươi	tươi
18	15 dl	nhuộn	nhuộm
26	3 tx	Sử	Xử
26	14 tx	Xử	Sử
31	17 tx	báo	bào
49	8 tx	ón	ống
56	11 tx	môi	nuôi
59	15 tx	đà	dài
64	11 tx	Eulrorn — Smth	Euhorn — Smith
66	16 tx	0,5 m	0,5 ml
68	5 dl	Độ	Đổ
69	11 dl	Khử trong	Khử trùng
78	15 dl	đề	đờ
78	2 dl	Peniculin	Penicillin
89	17 dl	nhuộn	nhuộm
91	16 tx	lạcmoc	lạc mọc

7 lỗi nhà in
11 tác giả